

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

ELIZABETH APARECIDA KOLTZ

**BRÁSSICAS E TERMOTERAPIA NO CONTROLE DE BOLOR VERDE
DE LARANJA PERA EM PÓS-COLHEITA**

TESE

PATO BRANCO

2018

ELIZABETH APARECIDA KOLTZ

**BRÁSSICAS E TERMOTERAPIA NO CONTROLE DE BOLOR VERDE
DE LARANJA PERA EM PÓS-COLHEITA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Idalmir dos Santos

Coorientador: Prof^a. Dr^a Rosangela

Dallemole Giaretta

PATO BRANCO

2018

K81b Koltz, Elizabeth Aparecida.
Brássicas e termoterapia no controle de bolor verde de laranja pera
em pós-colheita / Elizabeth Aparecida Koltz. -- 2018.
91 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Idalmir dos Santos
Coorientadora: Profa. Dra. Rosangela Dallemole Giaretta
Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2018.
Bibliografia: f. 74 - 86.

1. Mofo (Botânica). 2. Termoterapia. 3. Plantas - Doenças e pragas. 4.
Fitopatologia. I. Santos, Idalmir, orient. II. Giaretta, Rosangela
Dallemole, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD 22. ed. 630

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Tese n°. 038

BRÁSSICAS E TERMOTERAPIA NO CONTROLE DE BOLOR VERDE DE LARANJA PERA EM PÓS-COLHEITA

Por

ELIZABETH APARECIDA KOLTZ

Tese apresentada às treze horas trinta minutos do dia dezoito de maio de dois mil e dezoito, como requisito parcial para obtenção do título de DOUTORA EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos membros abaixo designados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Everaldo Antônio Lopes
UFV/Viçosa
(Á distância, por videoconferência)

Prof^a. Dr^a. Stela Maris Kulczynski
UFMS/RS

Prof^a. Dr^a. Natasha Akemi Hamada
IFPR/Palmas

Prof. Dr. Davi Costa Silva
UTFPR/Pato Branco

Prof. Dr. Idalmir dos Santos
UTFPR/Pato Branco
Orientador

Prof. Dr. Moeses Andrigo Danner
Coordenador do PPGAG

“O Termo de Aprovação, devidamente assinado, encontra-se arquivado na Coordenação do Programa”

Dedico a todos que acreditaram em mim e me auxiliaram nesta fase tão importante, em especial a Deus por me dar forças para nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por permitir essa conquista tão especial. Ao meu esposo Edson, meus filhos Marina e Leonardo, meus pais Zenilda e Renato pelo incentivo, apoio e paciência, principalmente nos últimos dias em que a dedicação foi mais intensa.

Ao meu orientador professor Dr. Idalmir a gratidão será eterna, pela oportunidade do ingresso no programa de pós-graduação, ensinamentos científicos e aqueles ensinamentos que serão levados para a vida toda. Só o senhor sabe de onde parti e onde consegui chegar. Obrigada por ter acreditado em mim!

A minha coorientadora professora Dra. Rosângela pela amizade, ensinamentos e companheirismo.

Aos professores do programa de pós-graduação pelas aulas e membros da banca pela atenção e colaboração nas correções do trabalho.

A todos os meus amigos que colaboraram na execução dos experimentos, Driéli, Alana, Sandra, Rúbia, Patrícia, Melissa, sempre com alegria e dedicação.

Um especial agradecimento vai a algumas pessoas que estiveram ao meu lado, colaborando, ensinando e sendo companheiros incansáveis nas várias etapas do desenvolvimento do trabalho. Carla, você motivou, planejou, colaborou na execução! Obrigada por tudo, nossas conversas serão inesquecíveis! Kelly, com você eu aprendi que foco é tudo e agilidade colabora com isso! Felipe, obrigada pelo companheirismo, disposição e positivismo sempre. Marielle, obrigada pela grande parceria e pelos momentos de estudo e convivência. Matheus, obrigada pelos ensinamentos estatísticos e pela grande amizade. Em especial e com muito carinho agradeço a minha querida amiga Paula que esteve ao meu lado em muitos momentos difíceis na construção desse trabalho. Obrigada pelo carinho, amizade, ensinamentos e pelo fiel companheirismo! Vocês todos moram no meu coração para o resto de nossas vidas!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado-sanduíche no exterior.

Enfim, agradeço a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para o meu crescimento pessoal e desenvolvimento desta tese. Muito obrigada!

“É a partir de inúmeros atos de coragem e crença que a história humana é moldada. Cada vez que um homem defende um ideal, ou age para melhorar a sorte dos outros, ou age contra a injustiça, ele envia uma pequena onda de esperança e cruza-se entre milhões de centros diferentes de energia e ousadia, e essas ondas constroem uma corrente que pode varrer as paredes mais poderosas de opressão e resistência”. Robert F. Kennedy, África do Sul, 1966.

RESUMO

KOLTZ, Elizabeth Aparecida. **Brássicas e termoterapia no controle de bolor verde de laranja Pera em pós-colheita**. 92 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2018.

O bolor verde causado pelo fungo *Penicillium digitatum* é uma das principais doenças de frutas cítricas, que causa perdas em pós-colheita. O estudo objetivou avaliar o potencial dos compostos obtidos da canola e de mostarda-da-índia, no controle de *P. digitatum*, na pós-colheita de laranja Pera. Foram realizados testes com diferentes concentrações de pó de cada brássica, cultivada e coletadas, secas em estufa e trituradas, para obtenção do pó. No tratamento sachê artesanal, as quantidades de 6, 12, 18 e 24 g de pó foram acondicionados em sachês, umedecidos e distribuídos em bandejas contendo os frutos inoculados com o patógeno. O tratamento modos de extração aquosos, no modo simples, o pó foi misturado à água e filtrado. Para extração por maceração, o extrato foi filtrado depois de 8 horas. Para extração por infusão utilizou-se água aquecida a 100 °C e, após 20 minutos a solução foi filtrada. O sachê contendo as concentrações de 24 g de pó e o modo de preparo aquoso simples de cada material vegetal foram selecionados para compor combinações de tratamentos com a termoterapia por imersão dos frutos em água quente (57 °C por 60s). Os tratamentos foram: 1 – Sachê artesanal (S) de canola 24 g ou de mostarda-da-índia 24 g; 2 – Extrato aquoso simples (EAS) de canola ou mostarda-da-índia; 3 – Tratamento térmico + sachê artesanal (TTS) de canola 24 g e de mostarda-da-índia 24 g; 4 – Tratamento térmico associado ao extrato aquoso simples (TTE) de canola ou de mostarda-da-índia; 5 – Tratamento térmico (TT); 6 – Extrato aquoso simples aquecido de canola ou mostarda-da-índia (EA) (57°C); 7 – Extrato aquoso simples de canola ou mostarda-da-índia com posterior inoculação do patógeno e Tratamento térmico (EITT); 8 – Testemunha (T). As associações com a termoterapia não causaram maior efeito na inibição do patógeno e os melhores tratamentos foram selecionados para serem comparados ao tratamento químico (imazalil 1g i.a/L). Os métodos extrativos testados, para as duas espécies de brássicas reduziram significativamente o crescimento micelial e produção de conídios de *P. digitatum* nos testes *in vitro*, assim como a área da lesão do bolor verde e número de conídios nos testes *in vivo*. O tratamento mais eficiente foi com o pó das brássicas em sachê artesanal, reduzindo a doença em até 85,0% (canola) e 63,1% (mostarda-da-índia). A utilização de sachê artesanal com pó das brássicas, destacando-se a canola, e o extrato aquoso simples pela facilidade de aplicação, se apresentam como alternativas eficientes no controle do bolor verde em pós-colheita laranja Pera.

Palavras-chave: *Penicillium digitatum*. *Brássica napus*. *Brássica juncea*.

ABSTRACT

KOLTZ, Elizabeth Aparecida. **Brásicas and thermotherapy in the control of green mold of orange Pear in post-harvest.** 91 f. Thesis (Doctorate in Agronomy) - Postgraduate Program in Agronomy (Area of Concentration: Plant Production), Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2018.

The green mold caused by the fungus *Penicillium digitatum* is one of the main diseases of citrus fruits, which causes postharvest losses. The study aimed to evaluate the potential of the canola and mustard compounds in the control of *P. digitatum* in the postharvest of orange pear. Tests were carried out with different concentrations of powder of each brassica, cultivated and collected, dried in a greenhouse and ground to obtain the powder. In the sachet treatment, the amounts of 6, 12, 18 and 24 g of powder were packed in sachets, moistened and distributed in trays containing the fruits inoculated with the pathogen. The treatment of aqueous extraction modes, in the simple mode, the powder was mixed with water and filtered. For extraction by maceration, the extract was filtered after 8 hours. For infusion extraction, water was heated at 100 ° C and after 20 minutes the solution was filtered. The sachet containing the concentrations of 24 g of powder and the simple aqueous preparation of each plant material were selected to compose combinations of treatments with the thermotherapy by immersion of the fruits in hot water (57 ° C for 60s). The treatments were: 1 - Handmade sachet (S) of canola 24 g or mustard 24 g; 2 - Simple aqueous extract (EAS) of canola or mustard; 3 - Heat treatment + handmade sachet (TTS) of canola 24 g and mustard 24 g; 4 - Thermal treatment associated with the simple aqueous extract (TTE) of canola or mustard; 5 - Heat treatment (TT); 6 - Simple warm aqueous extract of canola or mustard (EA) (57 ° C); 7 - Simple aqueous extract of canola or mustard with posterior inoculation of the pathogen and Thermal treatment (EITT); 8 - Witness (T). The associations with the thermotherapy did not have a greater effect on the inhibition of the pathogen and the best treatments were selected to be compared to the chemical treatment (imazalil 1g a.L / L). The extractive methods tested for the two species of brassicas significantly reduced the mycelial growth and conidia production of *P. digitatum* in the *in vitro* tests, as well as the green mold lesion area and the number of conidia in the *in vivo* tests. The most efficient treatment was with brassica powder in artisanal sachet, reducing the disease by up to 85.0% (canola) and 63.1% (mustard). The use of handmade sachets with brassica powder, such as canola, and simple aqueous extract for ease of application, are presented as efficient alternatives for the control of green mold in post-harvest orange Pera.

Keywords: *Penicillium digitatum*. Canola. Indian mustard.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Formação de isotiocianato	32
Figura 2 -	Fórmulas estruturais da PITC (Fenil ITC), BITC (Benzil ITC), PEITC (Fenetil ITC), PBITC (4-fenilbutil ITC), PHITC (6-fenilhexil ITC), AITC (Alil ITC), Erucin, dehidroerucin, Iberin e Sulforafane	33
Figura 3 -	Efeito das concentrações de canola em sachê artesanal nas concentrações (0,0 g, 0,11 g, 0,22 g, 0,33 g e 0,44 g) sobre o crescimento micelial (cm) (A e B) e produção de conídios (mL) (C e D) do fungo <i>Penicillium digitatum</i> . UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR. 2016	47
Figura 4 -	Efeito das concentrações de pó de mostarda-da-índia em sachê artesanal nas concentrações (0,0 g, 0,11 g, 0,22 g, 0,33 g e 0,44 g) sobre o crescimento micelial (cm) (A e B) e produção de conídios (mL) (C e D) do fungo <i>Penicillium digitatum</i> . UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR. 2016	48
Figura 5 -	Efeito das concentrações (0,0 g, 0,11 g, 0,22 g, 0,33 g e 0,44 g) de pó de canola e mostarda-da-índia em sachê artesanal sobre o crescimento micelial de <i>Penicillium digitatum</i> . UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR. 2016	48
Figura 6 -	Efeito das formas de preparo de extratos obtidos do pó de canola e mostarda-da-índia: aquoso simples (EAS), aquoso infusão (EAI) e aquoso maceração (EAM), na concentração de 12% sobre o crescimento micelial de <i>Penicillium digitatum</i> . UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR. 2016	50
Figura 7 -	Efeito das formas de preparo de extratos obtidos do pó de canola e mostarda-da-índia: aquoso simples (EAS), aquoso infusão (EAI) e aquoso maceração (EAM) em meio fundente, na concentração de 12% sobre o crescimento micelial de <i>Penicillium digitatum</i> . UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR. 2016	52
Figura 8 -	Efeito da concentração de pó de canola em sachê artesanal sobre o bolor verde (cm) em laranjas Pera (Ensaio I e II). UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR. 2016	53
Figura 9 -	Efeito da concentração de pó de mostarda-da-índia em sachê artesanal sobre o bolor verde (cm) em laranjas Pera (Ensaio I e II). UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR. 2016	53
Figura 10 -	Efeito do sachê artesanal com (0, 6, 12, 18 e 24 g) de pó de canola e mostarda-da-índia no controle do bolor verde, em pós-colheita de laranja Pera. UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR. 2016	54
Figura 11 -	Efeito de formas de preparo de extratos aquosos de canola e mostarda da índia, no controle do bolor verde em pós-colheita de laranja Pera. Testemunha (T) aquoso simples (EAS), infusão (EAI) e maceração (EAM). UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR. 2016.....	56

Figura 12 -	Efeito do pó de canola associado à termoterapia no controle do bolor verde em pós-colheita de laranja Pera. T- Testemunha; S - Sachê; EAS – Extrato aquoso simples; TT+S – Termoterapia + sachê; TT+EAS – Termoterapia + Extrato aquoso simples; TT – Termoterapia; EAS+A – Extrato aquoso simples aquecido, EAS+I+TT – Extrato aquoso simples + inoculação + Termoterapia. UTFPR, Câmpus de Pato Branco, 2016	58
Figura 13 –	Efeito do pó de mostarda-da-índia associado à termoterapia no controle do bolor verde em pós-colheita de laranja Pera. T- Testemunha; S - Sachê; EAS – Extrato aquoso simples; TT+S – Termoterapia + sachê; TT+EAS – Termoterapia + Extrato aquoso simples; TT – Termoterapia; EAS+A – Extrato aquoso simples aquecido, EAS+I+TT – Extrato aquoso simples + inoculação + Termoterapia. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2016	60
Figura 14 –	Frutos de laranja Pera tratados com sachê artesanal, extrato aquoso simples de pó de canola e mostarda-da-índia e um fungicida no controle do bolor verde (TC) Testemunha canola; (TM) Testemunha mostarda; (SC) sachê canola; (SM) sachê mostarda; (EASC) extrato aquoso simples canola; (EASM) extrato aquoso simples mostarda. UTFPR, Câmpus de Pato Branco - PR, 2016	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeito de diferentes formas de preparo de extratos aquosos com o pó de canola (aquoso simples, maceração e infusão) sobre o crescimento micelial (cm) e produção de conídios ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) do fungo <i>Penicillium digitatum in vitro</i> . UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2016	49
Tabela 2 -	Efeito de formas de preparo de extratos aquosos com o pó de mostarda-da-índia (aquoso simples, maceração e infusão) sobre o crescimento micelial (cm) e produção de conídios ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) do fungo <i>Penicillium digitatum in vitro</i> . UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2016	50
Tabela 3 -	Efeito de diferentes formas de preparo de extratos aquosos com o pó de canola (aquoso simples, maceração e infusão) em meio de cultivo BSA, sobre o crescimento micelial (cm) do fungo <i>P. digitatum in vitro</i> . UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2016	51
Tabela 4 -	Efeito de formas de preparo de extratos aquosos com o pó mostarda-da-índia (aquoso simples, maceração e infusão) em meio de cultivo BSA, sobre o crescimento micelial (cm) do fungo <i>Penicillium digitatum in vitro</i> . UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2016	51
Tabela 5 -	Efeito de formas de preparo de extratos com pó de canola (aquoso simples, infusão e maceração) no controle do bolor verde em pós-colheita de laranja Pera. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2016	55
Tabela 6 -	Efeito de formas de preparo de extratos com pó de mostarda-da-índia (aquoso simples, infusão e maceração) no controle do bolor verde em pós-colheita de laranja Pera. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2016	55
Tabela 7 -	Efeito do pó de canola associados à termoterapia no controle do bolor em pós-colheita de laranja Pera. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2016	57
Tabela 8 -	Efeito do pó de mostarda-da-índia associados à termoterapia no controle do bolor em pós-colheita de laranja Pera. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2016	59
Tabela 9 -	Comparação entre o pó em sachê artesanal (g), extrato aquoso simples de canola e mostarda-da-índia, fungicida e testemunha sobre o controle da área da lesão e produção de conídios ($\times 10^5/\text{cm}^2$) causada por <i>Penicillium digitatum</i> em frutos de laranja Pera. UTFPR, Câmpus de Pato Branco, 2016	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AITC	Alil isotiocianato
ANOVA	Análise variância
BDA	Batata dextrose ágar
BITC	Benzil Isotiocianato
BSA	Batata-sacarose-ágar
CE	Regulamento (CE) nº 1107/2009
CNA	Confederação Nacional da Fruticultura
COM	Comissão Europeia
CV	Coefficiente de variação
D	<i>Lilliefors</i>
EA	Extrato aquecido (57 °C)
EAS	Extrato aquoso simples
EASC	Extrato aquoso simples canola
EASM	Extrato aquoso simples mostarda
EITE	Extrato aquoso + termoterapia + extratoaquoso
EITT	Extrato aquoso + Inoculação do patógeno + tratamento térmico
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GSLs	Glicosinolatos
IMZ	Imazalil
ITCs	Isotiocianatos
PAA	Ácido paracético
PDs	Produtos derivados
PG	Poligalacturonase
PGE	Extrato alcoólico de romã
PIB	Produto Interno Bruto
PIC	Porcentagem de inibição do crescimento
PVC	Parafilme
RG	Teste de Crescimento Radial
S	Sachê
SC	Sachê canola
SM	Sachê mostarda
T	Testemunha
TBZ	Tiabendazol
TC	Testemunha canola
TM	Testemunha mostarda
TT	Tratamento térmico
TTE	Tratamento térmico + extrato aquoso na melhor forma de extração
TTS	Tratamento térmico + sachê artesanal na melhor dose
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	DOENÇAS FÚNGICAS EM CITROS.....	18
2.2	ASPECTOS GERAIS DO FITOPATÓGENO <i>Penicillium digitatum</i>	19
2.3	USO DE FUNGICIDAS NO TRATAMENTO DE BOLOR VERDE.....	22
2.4	MÉTODOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DE DOENÇAS PÓS-COLHEITA.....	23
2.4.1	Termoterapia associada a outros métodos de controle de doenças.....	24
2.4.2	Extratos vegetais e compostos voláteis naturais no controle de fitopatógenos pós-colheita.....	27
2.4.3	Controle de fitopatógenos com compostos derivados da Família <i>Brassicaceas</i>	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	LOCAL DOS EXPERIMENTOS.....	37
3.2	OBTENÇÃO DO PÓ DE CANOLA E DE MOSTARDA-DA-ÍNDIA.....	37
3.3	PREPARO DO PÓ DE CANOLA E DE MOSTARDA-ÍNDIA EM SACHÊ ARTESANAL.....	37
3.4	PREPARO DOS EXTRATOS AQUOSOS COM PÓ DE CANOLA E DE MOSTARDA-DA-ÍNDIA.....	37
3.5	OBTENÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DO INÓCULO DO PATÓGENO.....	38
3.6	OBTENÇÃO E DESINFESTAÇÃO DOS FRUTOS.....	38
3.7	EFEITO DOS COMPOSTOS FITOQUÍMICOS OBTIDOS DO PÓ DE CANOLA OU DE MOSTARDA-DA-ÍNDIA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL E PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE <i>P. digitatum</i>	39
3.7.1	Efeito de concentrações de pó de canola ou de mostarda-da-índia no sachê artesanal sobre <i>P. digitatum</i>	39
3.7.2	Efeito da forma de preparo de extratos aquosos de pó de canola ou de mostarda-da-índia sobre <i>P. digitatum</i>	40
3.7.3	Efeito direto de diferentes extratos aquosos de pó de canola ou de mostarda-da-índia sobre <i>P. digitatum</i>	40
3.8	EFEITO DE EXTRATOS DE CANOLA OU DE MOSTARDA-DA-ÍNDIA SOBRE O BOLOR VERDE EM FRUTOS DE LARANJA PERA.....	41
3.8.1	Preparo, fermento, inoculação e armazenamento dos frutos.....	41
3.8.2	Efeito da concentração de pó de canola ou de mostarda-da-índia no sachê artesanal sobre o bolor verde.....	41
3.8.3	Efeito do modo de preparo de extratos aquosos do pó de canola ou de mostarda-da-índia sobre o bolor verde.....	42
3.8.4	Efeito do sachê ou extrato aquoso de pó canola ou de mostarda-da-índia associados à termoterapia no controle do bolor verde.....	42
3.8.5	Efeito dos tratamentos alternativos com o pó de canola ou de mostarda-da-índia e fungicida no controle do bolor verde	43

3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4	RESULTADOS.....	46
4.1	EFEITO DOS COMPOSTOS FITOQUÍMICOS OBTIDOS DO PÓ DE CANOLA OU DE MOSTARDA-DA-ÍNDIA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL E PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE <i>P. digitatum</i>	46
4.1.1	Efeito de concentrações de pó de canola ou de mostarda-da-índia no sachê artesanal sobre <i>P. digitatum</i>	46
4.1.2	Efeito da forma de preparo de extratos aquosos obtidos de pó de canola ou de mostarda-da-índia sobre <i>P. digitatum</i>	49
4.1.3	Efeito direto de extratos aquosos obtidos de pó de canola ou de mostarda-da-índia sobre <i>P. digitatum</i>	50
4.2	EFEITO DE EXTRATOS DE CANOLA OU DE MOSTARDA-DA-ÍNDIA SOBRE O BOLOR VERDE EM FRUTOS DE LARANJA PERA.....	52
4.2.1	Efeito de concentrações de pó de canola ou de mostarda-da-índia no sachê artesanal sobre o bolor verde.....	52
4.2.2	Efeito do modo de preparo de extratos aquosos de pó de canola ou de mostarda-da-índia sobre o bolor verde.....	54
4.2.3	Extratos de pó canola ou de mostarda-da-índia associados à termoterapia no controle do bolor verde	56
4.2.4	Efeito de tratamentos alternativos com pó de canola ou de mostarda-da-índia e fungicida no controle do bolor verde	60
5	DISCUSSÃO.....	63
6	CONCLUSÕES.....	72
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74
	APÊNDICES.....	87

1 INTRODUÇÃO

As doenças em pós-colheita diminuem a quantidade e a qualidade dos frutos e ocasionam perdas na comercialização. O bolor verde, causado pelo fungo *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr) Sacc., é a principal doença pós-colheita dos citros e causa danos desde os pomares até o período de comercialização dos frutos (LARANJEIRA et al., 2005). A germinação de esporos e o estabelecimento do patógeno ocorrem em razão de ferimentos na superfície da casca do fruto, presença de umidade e disponibilidade de nutrientes. O bolor-verde é uma podridão mole na qual a lesão é coberta por um micélio branco e logo por grande número de esporos verdes do fungo. Com o passar do tempo os esporos se soltam e se disseminam pelo meio e para outros frutos (FEICHTENBERGER et al., 2005).

O principal método de controle do bolor verde na pós-colheita é a aplicação de fungicidas sintéticos. No entanto, a utilização intensiva de produtos químicos tem gerado preocupação pela ocorrência do fenômeno de resistência por parte do patógeno e também pela demanda dos consumidores por produtos isentos de substâncias tóxicas (ERASMUS et al., 2015). Assim, é crescente o incentivo à pesquisa por novas formas de controle, como alternativa ao uso de fungicidas, segura ao consumidor e ao meio ambiente, eficientes na diminuição das perdas pós-colheita.

Métodos alternativos ao uso dos fungicidas, como produtos de origem vegetal, vêm sendo significativamente explorados. Muitas espécies apresentam compostos bioativos que podem ser utilizados como biopesticidas para o controle de diferentes fitopatógenos, com baixo potencial de contaminação ao ambiente, sem risco à saúde dos seres humanos e economicamente viável.

Óleos essenciais e extratos vegetais de várias plantas produzem em seu metabolismo secundário alcalóides, quinonas, flavonóides, glicosídeos, saponinas, taninos e terpenos e essas substâncias podem inibir ou controlar microrganismos que afetam diferentes tipos de produções (TAIZ; ZEIGER, 2002).

Em geral, membros da família de *Brassicaceae* acumulam constitutivamente altos níveis (até 1% de peso seco) de glicosídeos contendo enxofre, os glicosinolatos (GLS; Fahey et al., 2001), que são hidrolizados pela mirosinase e produzem compostos voláteis com características fungitóxicas chamados isotiocianatos (ITCs). A presença de ITCs já foi relatada no controle de

fitopatógenos de pós-colheita como do bolor azul em peras, mofo cinzento em morangos, podridão parda em pêssegos (MARI et al., 2008; WU et al., 2011; UGOLINI et al., 2014, PAZOLINI et al., 2016). Por isso, conhecer a ação em diferentes formas de extração e avaliar a liberação desses compostos é uma ferramenta valiosa para prever a bioatividade que possuem na supressão de microrganismos como o *P. digitatum*.

O mecanismo de ação pelo qual os ITCs poderiam causar a morte de células fúngicas tem sido investigado e uma das observações realizadas em estudo com *Alternaria brassicicola*, é que a exposição do fungo aos ITCs causa diminuição na taxa de consumo de oxigênio, acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) e despolarização da membrana mitocondrial.

No entanto, normalmente os ITCs são testados isoladamente e na forma sintética no controle dos patógenos, sendo inédito um estudo com informações sobre a atividade fúngica pela liberação de compostos voláteis, do pó de canola e de mostarda-da-índia pertencentes à família *Brassicaceae*, em diferentes formas de extração, com sachê artesanal ou extratos aquosos, combinados a termoterapia no controle de *P. digitatum* em condições *in vivo* e *in vitro*.

A utilização do tratamento térmico pela imersão de frutos cítricos em água quente é uma técnica que pode ser facilmente aplicada em *packinghouses* no controle de doenças de pós-colheita (SISQUELLA et al., 2013b), e apresenta eficiência no controle de *P. digitatum* em laranja Pera (FORNER et al., 2013). Todavia, a efetividade do método de controle pode ser aumentada se associada a outros métodos (MARI et al., 2007; SISQUELLA et al., 2013).

A associação da termoterapia com outras formas de controle, como o sachê artesanal e os extratos aquosos, poderia potencializar o controle do bolor verde visto que ambos têm controle já evidenciado sobre fungos fitopatogênicos (FORNER et al., 2013; MOHAMMADI et al., 2014). Sendo assim, o uso dos compostos obtidos do pó das brássicas se apresenta como alternativa mais barata do que os produtos sintéticos e de fácil obtenção, uma vez que, os produtos vegetais canola e mostarda-da-índia podem ser produzidos e preparados facilmente em pequenas propriedades. Além disso, a combinação da termoterapia aos compostos extraídos das brássicas está sendo utilizado pela primeira vez no controle de bolor

verde causado por *P. digitatum* em frutos de laranja Pera e pode se tornar uma alternativa promissora para a produção convencional e orgânica.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar o potencial dos compostos obtidos da canola e da mostarda-da-índia associados ou não a termoterapia no controle de *P. digitatum*, em pós-colheita de laranja Pera, incluindo diferentes métodos de extração e formas de aplicação dos compostos vegetais para comparar os melhores resultados com os tratamentos alternativos com o controle químico no controle do bolor verde em pós-colheita de laranja Pera.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇAS FÚNGICAS EM CITROS

As doenças na pós-colheita são responsáveis pela perda de quantidades significativas de frutos no mercado consumidor com grande impacto econômico, pois ocorre em múltiplas etapas desde a colheita, armazenamento, comercialização até no domicílio do consumidor. Este, por sua vez, está cada vez mais sensibilizado sobre a importância de uma dieta saudável com produtos de qualidade, livre de resíduos de pesticidas, toxinas ou microrganismos prejudiciais e que tenha boa aparência física (BARKAI-GOLAN, 2001).

Frutas são altamente perecíveis e as perdas causadas principalmente por fungos patogênicos podem atingir entre 25 e 50% da produção total (CITRUSBR, 2015). Devido ao seu maior teor de água e composição de nutrientes, as frutas cítricas têm maior propensão à infecção por agentes patogênicos microbianos no período entre colheita e consumo (TRIPATHI; DUBEY, 2004). As frutas cítricas geralmente são ácidas, na faixa de pH 2-4, razão pela qual a maior parte das podridões em frutos colhidos seja causada por fungos. Além disso, a proliferação de fungos pode resultar na contaminação dos produtos com micotoxinas (WU et al., 2014).

As doenças pós-colheita de citros que desencadeiam problemas na produção são classificadas em dois tipos de infecções: em alguns casos, as infecções se iniciam na pré-colheita e se estendem até a pós-colheita, em outros se iniciam na pós-colheita (FISCHER et al., 2013). Lesões feitas no campo normalmente são decorrentes de práticas inadequadas no processo de colheita e durante o processamento, assim como no pós-colheita, desde o transporte até a embalagem, sendo identificadas as doenças como bolores verdes e azuis, ocasionados por *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., e *Penicillium italicum* Wehmer, respectivamente (ECKERT; BROWN, 1986).

A doença fúngica denominada de bolor verde tem sido considerada uma das causas mais incidentes para as podridões que reduzem a qualidade e a quantidade de frutos para comercialização no Brasil, com destaque em climas quentes (FISCHER et al., 2013). A importância de perdas de produtos em função

desta doença implica na necessidade de buscar formas de controle para o bolor verde em laranjas, visando à eficiência, segurança e perspectiva para a redução dessas perdas em pós-colheita.

Os tratamentos baseados em fungicidas químicos têm sido utilizados como principal método para a redução de perdas de frutos em pós-colheita. No entanto, esta conduta ainda permanece e está associada a impactos ambientais negativos, exposição humana a produtos potencialmente tóxicos e resíduos nos frutos. Observa-se que nas últimas décadas, políticas reguladoras mais rigorosas começaram a ser impostas à sua utilização e a eficácia dos fungicidas sintéticos tem sido questionada pelo desenvolvimento de resistência de alguns patógenos, sendo uma grande necessidade a busca por métodos que possam reduzir a sua utilização, e que sejam mais seguros, alternativos e eficazes (DUAN et al., 2016).

Assim, ressalta-se a relevância de pesquisas por novas formas de controle para o bolor verde em laranjas, que sejam eficientes, seguras e diminuam as perdas em pós-colheita, pois esta doença continua a causar graves perdas econômicas em todo o mundo.

2.2 ASPECTOS GERAIS DO FITOPATÓGENO *Penicillium digitatum*

Dentre os patógenos fúngicos encontra-se o gênero *Penicillium*, que compreende mais de 150 espécies, porém a sua ação fisiológica é restrita a uma pequena parte dos patógenos, à qual é atribuída a responsabilidade pelas doenças de pós-colheita, especialmente ao *Penicillium* spp. (BARKAI-GOLAN, 2001; MUÑOZ et al., 2011).

Especificamente quanto ao patógeno *Penicillium digitatum*, o agente causal do bolor verde em citros, foi classificado por Saccardo em 1881 (SACCARDO, 1881). A fase teleomórfica pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales, família Trichocomaceae e gênero *Penicillium* (PALOU, 2014). A fase anamórfica pertence ao Reino Fungi, grupo incerto dos Fungos Mitospóricos, subgrupo dos hifomicetos, gênero *Penicillium* sp., espécie *Penicillium digitatum* (INDEX FUNGORUM, 2015).

No processo de interação com a fruta cítrica existe a necessidade que a casca do fruto apresente um ferimento para que a infecção ocorra inicialmente, promovendo a germinação de esporos por meio de nutrientes, de modo que possa

penetrar no tecido do hospedeiro e colonizar utilizando enzimas de maceração (ECKERT; BROWN, 1986; SMILANICK et al., 2005; DROBY et al., 2008; BURON-MOLES et al., 2012; VILANOVA et al., 2012).

Em condições de pós-colheita, o armazenamento e o estágio fisiológico do fruto consistem em fatores importantes para o desenvolvimento de doenças fúngicas, associada aos mecanismos de defesa intrínsecos do hospedeiro. Tais fatores são inerentes ao processo, considerando que o fruto se torna gradativamente suscetível à infecção com a idade fisiológica mais avançada (TORRES et al., 2003; SU et al., 2011; VILANOVA et al., 2012).

Em razão de ferimentos na casca do fruto, fato que propicia instalação do patógeno *P. digitatum*, a presença de umidade e a disponibilidade de nutrientes contribuem para que os seus esporos germinem. Outro facilitador para a contaminação do fruto pode ser observado em lesões de ferimentos e ruptura da casca na extremidade do tronco, caracterizando-se como entrada do patógeno (NJOMBOLWANA; ERASMUS; FOURIE, 2013).

A germinação de conídios de *Penicillium* spp., nos frutos com ferimentos e o subsequente desenvolvimento de hifas requer água livre, nutrientes e condições específicas de temperatura e pH. Infecção causada por *P. digitatum* é geralmente vista a olho nu após cerca de 3 dias de incubação à temperatura de 25 °C. Uma área circular em torno do local da infecção (ferimento) com característica encharcada pode ser facilmente penetrada com o dedo. É um patógeno necrotrófico (caracterizado pela degeneração do protoplasma, seguida de morte de células, tecidos e órgão), que produz enzimas pectolíticas, que degradam as substâncias pecticas da lamela média, principalmente poligalacturonases e celulases, responsável pela maceração do tecido durante o desenvolvimento da doença (ECKERT; EAKS, 1989; BARKAI-GOLAN; KARADAVID, 1991). Uma dessas enzimas, a poligalacturonase (PG), tem sido rotineiramente envolvida na facilitação da invasão e colonização do tecido hospedeiro, e há abundante evidência correlativa que apoia o papel da PG na patogênese (ECKERT; EAKS, 1989).

As colônias formadas por *P. digitatum* são planas e crescem rapidamente. Dependendo da quantidade de inóculo a esporulação começa depois de 3 a 4 dias à temperatura ambiente (15 - 28 °C) e se expande radialmente formando uma camada cor verde oliva rodeada por uma faixa larga de denso micélio branco, não-esporulante (FEICHTENBERGER et al., 2005). A parte superior da colônia é verde

oliva e a parte inferior vai do incolor ao amarelo creme ou ao marrom opaco pálido. A textura da colônia é velutina, sem exsudação de gotículas. Não há crescimento fúngico a 37 °C. Pode apresentar odor forte, uma vez que foram detectados metabólitos voláteis em suas colônias tais como limoneno, valenceno, etileno, álcool etílico, acetato de etila ou acetato de metila. As estruturas das hifas portadoras dos conídios (conidióforos) se caracterizam por suas grandes irregularidades, tanto em número como nas dimensões das partes que os compõe “penicilos”. Normalmente estes são curtos, biverticilados e assimétricos, formados por um indefinido número de ramos (métulas) que portam uma limitada, mas variável série de esterigmas que determinam cadeias largas de conídios. Estes são lisos e de cor verde escura em massa, variáveis na forma, onde predominam os elípticos, ainda que seja frequente a presença de cilíndricos e globulosos (PALOU, 2014).

O fungo sobrevive saprofiticamente em pomares, substratos orgânicos e outros ambientes, e produz esporos (conídios assexuados), que podem ser carregados pelo vento e atingir a superfície dos frutos com ferimentos. Temperaturas em torno de 24 °C são consideradas as ideais para o desenvolvimento do fungo, bem como, temperaturas maiores que 30 °C ou menores que 5 - 7 °C paralisam o seu desenvolvimento (LARANJEIRA et al., 2005).

O bolor verde causado pelo *P. digitatum* ocorre através de lesões produzidas no campo, processamento ou durante a cadeia de comercialização da fruta, conforme já referido. Patógenos com infecção por meio de ferimentos, tais como *Penicillium* spp. se reproduzem rapidamente e os seus esporos estão onipresentes na atmosfera e na superfície das frutas e são facilmente disseminados por correntes de ar (FISCHER et al., 2013). Desta forma, a fonte de inoculo fúngico em pomares de citros e em casas de armazenamento “packinghouses” é praticamente contínua durante a estação e os frutos podem contaminar-se desde o pomar até a comercialização.

Nenhuma infecção ocorre se a casca do fruto estiver intacta, porque conídios livres localizados na superfície da casca não são capazes de germinar. Em contraste, os conídios situados em lesões, que rompem glândulas sebáceas ou penetram o albedo da casca geralmente causam infecção irreversível dentro de 48 h a 20-25 °C (GREEN, 1932). O processo, desde a germinação até a infecção, pode ser tão curto, com previsão de ocorrência em até 4 h, a 25 °C (PLAZA et al., 2004). Com o passar do tempo toda a superfície do fruto é totalmente coberta por esporos,

que então começa a murchar e se torna mumificado (FEICHTENBERGER et al., 2005).

2.3 USO DE FUNGICIDAS NO TRATAMENTO DE BOLOR VERDE

Diante das plantas infectadas por patógenos fúngicos, que incluem as doenças pós-colheita de frutas e vegetais, têm sido buscadas alternativas de controle e gerenciamento de doenças, sendo o uso de fungicidas considerado a estratégia adequada (BARKAI-GOLAN, 2001; NARAYANASAMY, 2006). A presença de resíduos de fungicidas nos alimentos, bem como a sua liberação no meio ambiente, contudo, tem preocupado autoridades responsáveis pela saúde pública e assim também os consumidores (MUÑOZ et al., 2011).

Desde o início da década de 1960, os tratamentos baseados em fungicidas químicos, têm sido utilizados como principal método para a redução de perdas de frutos em pós-colheita. A aplicação de fungicidas sintéticos como carbendazim, imazalil, tiabendazol, ortofenilfenato de sódio, fludioxonil ou pirimetanil, foram permitidos por diferentes países e geralmente utilizados como primeira linha de defesa contra os bolores verde e azul na pós-colheita de citros causada por *P. digitatum* e *P. italicum* (SMILANICK et al., 2008).

Devido ao uso intenso de fungicidas em pós-colheita, estudos vêm demonstrando a ineficiência dos mesmos, pela ocorrência de isolados resistentes por parte do patógeno. A partir de 1970, o fenômeno de resistência foi uma das principais causas do fracasso de muitos tratamentos com fungicidas em pós-colheita (ELBOUCHTAOUI et al., 2014; ERASMUS et al., 2015a).

Fischer et al. (2009), analisando que o *P. digitatum* resistente a fungicidas se encontra com elevada frequência em packinghouses, pressupõe que o campo pode se caracterizar como espaço para a ocorrência de resistência do patógeno. A hipótese para esta constatação é de que um maior número de aplicações de fungicidas realizadas no período de produção, visando o controle de diferentes doenças pode ser a causa dessa resistência, considerando que a maior frequência de isolados resistentes foi identificada em packinghouses nos quais não foram aplicados fungicidas pós-colheita.

Esse fenômeno ocorre devido ao curto ciclo de vida dos patógenos e a abundante esporulação na superfície doente que contribuem provavelmente a alta

resistência, aumentando a possibilidade de desenvolvimento de progênies mutantes e sua disseminação (KARAOGLANIDIS et al., 2011).

Dentre os fungicidas citados, o imazalil (IMZ), especificamente, tem sido referido como o tratamento mais comum aplicado na citricultura, pela eficácia verificada contra a deterioração por *Penicillium*, com atividade curativa, preventiva e ant esporulante, com uso registrado a mais de duas décadas (ZHANG;TIMMER, 2007; ERASMUS et al., 2015a, 2015b; KELLERMAN et al., 2016). Trata-se de um fungicida sistêmico, cuja ação inibe a desmetilação da biossíntese de ergosterol, inibindo a esporulação de *P. digitatum* (ECKERT; BROWN, 1986).

A atividade curativa do imazalil é explicada por D'Aquino et al. (2013), especialmente quanto a tipos sensíveis de espécies de *Penicillium*, como *P. digitatum* e *P. italicum*, ainda que em concentrações baixas, com maior resultado verificado em aplicações como emulsão aquecida. Neste estudo foi observado que o imazalil também transmite ação protetora e ant esporulante que se mantém durante o período de armazenamento, mediante aplicações de 1000-2000 mg L⁻¹.

Assim, pela crescente preocupação dos consumidores sobre o acúmulo de resíduos químicos e o desenvolvimento de espécies resistentes a agentes patogênicos, além de políticas reguladoras mais rigorosas sobre a utilização e a eficácia dos fungicidas demonstrada pelo desenvolvimento de resistência de alguns patógenos, está em ascensão à busca por meios seguros e alternativos com produtos naturais eficientes como estratégia de controle (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2014).

2.4 MÉTODOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DE DOENÇAS PÓS-COLHEITA

Na produção de cítricos, o objetivo do manejo pós-colheita é a comercialização de frutos de qualidade, com aumento de sua vida de prateleira e redução de perdas na produção. As perdas mais relevantes sob a análise econômica são aquelas de origem patológica, fator que tem remetido nas últimas três décadas à busca por tratamentos alternativos que visam à redução de fungicidas químicos na pós-colheita compreendendo, por exemplo, a aplicação de microrganismos antagonistas (WAEWTHONGRAK et al., 2015), bem como de aditivos alimentares, que são reconhecidos como compostos seguros, assim como

substâncias antimicrobianas naturais e óleos essenciais ecológicos (EOs) (PALOU, 2009).

Interesse particular tem sido demonstrado pela poderosa ação antimicrobiana de óleos essenciais e extratos vegetais que são considerados relativamente seguros pela sua origem natural e baixa toxicidade para o meio ambiente (GATTO et al., 2011; CABRAL et al., 2013). Além disso, a sua utilização se encaixa bem com o conceito da agricultura sustentável, porque a maioria explora ciclos naturais com impacto ambiental reduzido.

Compostos naturais como compostos orgânicos voláteis, isotiocianatos, trans-2-hexal, cavacrol, timol, citral, ácido trans-cinamaldeído e óleos essenciais, como já documentados, possuem atividade antimicrobiana (SPADONI et al., 2015). Tais métodos alternativos de controle para doenças pós-colheita de citros podem ser aplicados individualmente ou combinados com tratamentos físicos, químicos ou biológicos (CASALS et al., 2010).

A associação de métodos alternativos para o controle de doenças em citros busca integrar dois ou mais métodos de controle, no caso compostos naturais e termoterapia, mediante alcance de objetivos específicos, que incluem o aumento da eficácia ou da persistência de tratamentos individuais; os efeitos complementares que combinam duas atividades: preventivas e curativas; o atraso no desenvolvimento de isolados resistentes a fungicidas, visando ao controle de isolados resistentes a fungicidas já presentes nas embalagens; e, por fim, facilitar a redução das taxas de fungicidas, de modo a minimizar os resíduos nos frutos e os custos com produtos químicos (PALOU; SMILANICK; DROBY, 2008; SMILANICK et al., 2008).

2.4.1 Termoterapia associada a outros métodos de controle de doenças

Os tratamentos físicos para o controle de doenças pós-colheita têm sido enfatizados no sentido de privilegiar a ausência total de resíduos no produto tratado e o mínimo impacto ambiental. As limitações podem incluir a baixa persistência, o risco de efeitos adversos na qualidade do produto, bem como de problemas tecnológicos para aplicação comercial (USALL et al., 2016).

O tratamento físico mais conhecido é o calor. Tradicionalmente, pode ser aplicado sob a forma de mergulho em água quente, escovação em água quente,

vapor, ar quente e cura (FALLIK, 2004; BEN-YEHOSHUA; PORAT, 2005). É uma técnica simples que pode ser facilmente usada para reduzir doenças pós-colheita de diversos tipos de frutos no controle de diferentes patógenos.

O tratamento com a termoterapia em frutos pós-colheita inibe o patógeno e ativa as respostas de defesa do metabolismo secundário dos frutos, evitando a utilização de produtos químicos (SILVA et al., 2008). Este método de termoterapia em frutos pós-colheita pode ser associado a outras combinações, que podem incluir tratamentos químicos ou biológicos no controle de doenças originadas de patógenos (PALOU et al., 2009; CASALS et al., 2010a).

Considerando que tratamentos alternativos para o controle de doenças fúngicas em frutos pós-colheita apresentam limitação em sua eficácia pela influência de fatores ambientais, os estudos têm se concentrado em aprimorar esta eficácia, na combinação de duas ou mais formas de tratamentos (SISQUELLA et al., 2013).

Estudo sobre utilização da termoterapia realizado por Casals et al. (2010a) para controlar a podridão parda em pêssegos e nectarinas utilizou água quente a 60 °C por 40 segundos. À mesma temperatura e com uma exposição de 20 segundos, foi observada redução de 80% da podridão parda em frutos, que foram passados por banho de água sobre escovas rotativas (KARABULUT et al., 2002).

Para Ben-Yehoshua e Porat (2005), a termoterapia em frutas contribuiu para a redução ou retardamento do crescimento de patógenos, pela ação de fechamento completo ou parcial de fraturas ou ferimentos das cutículas compreendidas como vias de entrada para os agentes patogênicos, além da remoção de parte da microflora epífita.

Estudo de Zhang et al. (2010) indicou que o tratamento com água quente a 50 °C por mais de 40 segundos inibiu a germinação de conídios de *M. laxa*, confirmando que quando combinado o uso de ácido paracético (PAA) e água quente possibilita temperaturas mais baixas e menores concentrações de PAA no controle do patógeno, em comparação com a aplicação individual.

Já Sisqueira et al. (2013) realizaram experimento para avaliar a eficácia da aplicação de 100 mg L⁻¹ de ácido paracético (PAA) a 40 °C por 40 segundos em podridão marrom causada por *Monilinia spp.* em frutos naturalmente infectados de pêssegos e nectarinas, com redução significativa da porcentagem de conídios comparativamente à mesma concentração de PAA a 20 °C ou somente água aquecida a 40 °C. As combinações de diferentes concentrações de PAA, em

diferentes temperaturas, foram conduzidas em condições *in vivo* no estudo, de modo que os resultados indicaram como condições ótimas de tratamento 200 mg L⁻¹ de PAA a 40 °C por 40 segundos.

Mari et al. (2007) controlaram a podridão parda em pêssegos e nectarinas com a combinação de bicarbonato de sódio com água quente, observando o efeito sinérgico de produtos químicos e calor. A eficácia de banhos em água aquecida de sorbato de potássio foi confirmada por Palou (2009) na redução de incidência e severidade da podridão parda, comparativamente aos mergulhos aplicados à temperatura ambiente.

A imersão de frutas em água quente possibilita observar aumento na resistência do hospedeiro, bem como melhoria na eficácia de agentes de controle biológico, pois, conforme dispõe (ZHOU; DENG; ZENG, 2014), mesmo quando as imersões em água quente a 45-55 °C foram de 2 a 5 min, verificaram-se reduções nos bolores verdes e azuis em frutas cítricas.

Resultados semelhantes foram identificados com a aplicação de água quente a 55-65 °C por 10-30 segundos em máquinas de embalagem sobre escovas rotativas. A aplicação comercial de água quente como um tratamento autônomo já foi indicada como alternativa para controle de decomposição cítrica, limitando-se este procedimento a frutas pequenas, especialmente quando ocorre o consumo da casca, ou quando as frutas são cultivadas pelo sistema orgânico (BEN-YEHOSHUA; PORAT, 2005). Esta limitação pressupõe que o tratamento com água quente, não sendo fungicidas e nem muito persistente, tem um intervalo de temperatura efetivo muito estreito, dependente do tipo, idade e condição fisiológica da fruta (PALOU et al., 2002).

Com relação à utilização de água quente para um patógeno específico, o *Penicillium expansum*, Spadoni et al. (2015) relatam estudo que investigou a aplicação de água quente a 45 °C por 10 min sobre a resposta da infecção por bolor azul em maçãs Gala, usando dois métodos diferentes. No primeiro método, maçãs feridas foram inoculadas com uma suspensão do patógeno, sendo depois tratadas termicamente após 1, 4 e 24h (Inoc-HT). O método seguinte realizou tratamento térmico e após inoculou as frutas com uma suspensão de esporos do *P. expansum*. Os resultados indicam redução na incidência de podridão da fruta de 100% no método de Inoc-HT, sem efeito letal para a germinação de conídios do *P. expansum*

na aplicação de água quente a 40 °C, indicando a alta tolerância deste patógeno ao calor.

Especificamente quando se trata do controle de bolor azul em laranjas Navelate e Valência livres de ferimento, foi obtido com o tratamento térmico de 65°C, embora estudos demonstrem que temperaturas semelhantes a essa podem causar prejuízos ao fruto. Foi observado controle em 7 dias de armazenamento com tratamentos entre 50 e 55 °C, mas, após 14 dias, o controle foi significativamente inferior (PALOU et al., 2001).

Métodos de controle podem ter a eficiência aumentada quando associados, como por exemplo, o método físico integrado ao químico, utilizando o tratamento com água quente (56 °C por 2 min.) com baixas doses de imazalil (500 mg kg⁻¹) demonstrou controle sobre o *P. digitatum* (PUAWONGPHAT; NIAMJANG; SANCHOTE, 2008). Sendo assim, acredita-se que a associação do método físico termoterapia que apresenta bons resultados, a um método alternativo com compostos vegetais que demonstra significativa ação microbiana deve ser investigado e testado cientificamente, pois vem de encontro aos objetivos que se buscam na redução de perdas pós-colheita, diminuição de patógenos resistentes, bem como aumento na qualidade dos frutos oferecidos a sociedade.

2.4.2 Extratos vegetais e compostos voláteis naturais no controle de fitopatógenos pós-colheita

A natureza conservadora de alguns tipos de plantas é há muito tempo já conhecida, fato que possibilita estudos acerca da utilização de extratos vegetais no controle de fitopatógenos, considerando a diversidade de substâncias presentes na composição das plantas e o potencial fungicida ou fungistático que muitas contêm, apresentando em contrapartida não toxicidade, sistematicidade e biodegradabilidade (GATTO et al., 2011).

Atualmente, a busca por produtos naturais, particularmente relacionados ao manejo de pragas, é muito evidente. Plantas aromáticas e medicinais tem atraído interesse no campo de controle de doenças de plantas, principalmente extratos de plantas com propriedades antimicrobianas, pelo espectro de metabólitos secundários que compõe o vegetal, tais como, alcalóides, quinonas, flavonóides, glicosídeos, saponinas, taninos e terpenóides (TAIZ; ZEIGER, 2002).

Devido à presença dessas substâncias, algumas plantas merecem maior atenção, especialmente porque podem ser utilizadas por produtores que trabalham com cultivo orgânico ou cultivo em ambiente protegido, podendo servir como matéria-prima para síntese de novos produtos ou ainda serem utilizadas pela indução a respostas das plantas às doenças.

Dentre essas plantas se encontram o limão, citronela, cravo, tomilho e orégano, que foram referidas como agentes naturais contra fungos no controle de doenças de plantas (VIUDA-MARTOS et al., 2007). Com a aplicação de subprodutos naturais, que compreendem metabólitos secundários, ocorre em muitos casos significativa redução no dano causado pelas doenças pós-colheita (TRIPATHI et al., 2007).

Com relação aos diversos compostos voláteis com atividade antifúngica isolados de plantas, destacam-se acetaldeído, benzaldeído, álcool benzílico, etanol, salicilato de metilo, benzoato de etilo, formato de etilo, hexanal, (E)-2-hexenal, lipoxigenases, jasmonatos, alicina, glicosinolatos e isotiocianatos, dentre outros (TRIPATHI et al., 2004), alguns se mostram mais específicos no controle do *P. digitatum* ou do *P. italicum*, a exemplo estão os jasmonatos (DROBY et al., 1999), e os componentes de aroma que compreendem acetaldeído, benzaldeído, etanol, formato de etilo, nerolidol e 2-nonanona (UTAMA et al., 2002). Porém pouca ênfase é dada aos glicosinolatos e isotiocianatos para tais patossistemas.

A aplicação de extrato aquoso da casca de romã em limões na concentração de 12 g/L, 6 horas depois da inoculação mecânica do patógeno, resultou na redução da infecção de *P. italicum* e *P. digitatum* em 60 e 76%, enquanto a 1,2 g/L, a redução foi de 45% e 46,7%, respectivamente. Ensaio *in vitro* revelaram atividade fungicida contra a germinação de conídios de *B. cinerea*, *P. digitatum* e *P. expansum* com inibição quase completa da germinação de esporos (NICOSIA et al., 2016).

É importante observar que os modos de obtenção podem influenciar na atividade antifúngica dos extratos vegetais, pois podem reduzir a extração, deixar de extrair alguns compostos ou inativar certas enzimas. Primeiramente é necessário saber quais os principais compostos presentes nas plantas estudadas e depois avaliar seu comportamento diante de variações como temperatura, solvente e

método de extração, bem como a melhor forma de aplicação e a viabilidade da associação de métodos para a eficiência de controle desejado.

A concentração dos compostos bioativos em cada uma das espécies de plantas depende das condições ambientais; com isto, influencia no modo de ação no metabolismo do patossistema, indicando a probabilidade de que a atividade antimicrobiana não possa ser atribuída a um mecanismo específico, mas a diversos modos de ação (CARSON; MEE; RILEY, 2002).

Diante da necessidade de preservação dos alimentos, novos métodos visando a este objetivo são estudados e desenvolvidos incluindo as embalagens antimicrobianas com comprovada eficiência, disponibilizadas em forma de sachês antimicrobianos que contêm agentes voláteis e estes permitem o controle do desenvolvimento de microrganismos (MEDEIROS et al., 2011).

Sendo assim, estudos tem mostrado que o método de extração dos princípios químicos tem um grande efeito sobre o isolamento dos compostos ativos, havendo a necessidade de conhecimento do método mais apropriado para tal finalidade. Neste sentido a investigação de métodos de extração se torna imprescindível em estudos que visem trabalhar com compostos ativos de plantas que podem ser usados como extratos ou compostos voláteis no controle de patógenos específicos.

2.4.3 Controle de fitopatógenos com compostos derivados da Família *Brassicaceas*

A família *Brassicaceae*, também chamada de *Cruciferae*, inclui cerca de 375 gêneros e cerca de 3.200 espécies (LECOZ; DUCOMBS, 2006) dessa família tem mostrado eficiência no controle de fitopatógenos (DROBNICA, 1967; BROWN; MORRA, 1997; ZASADA et al., 2003; MATTHIESSEN; KIRKEGAARD, 2006). Investigações sobre compostos da família *Brassicaceae* demonstram que praticamente todas são capazes de produzir um grupo de metabólitos secundários, chamados glicosinatos (GSLs), cujas propriedades antifúngicas foram relatadas desde 1937 (KJAER, 1976; MOJTAHEDI et al., 1993; POTTER et al., 1998; ZASADA et al., 2003).

Os GSLs são considerados ésteres de (Z)Cis-N-hidroxiaminossulfato, possuindo uma cadeia lateral (grupo R) e uma parte β -D-glucopiranosose ligada ao enxofre. São biossintetizados a partir de aminoácidos e a base da heterogeneidade

estrutural dentro dos glicosinolatos (e das atividades biológicas de seus produtos de clivagem química e/ou enzimática) é a diversidade estrutural, portanto, a reatividade química está associada à variação na estrutura da cadeia lateral (FENWICK et al., 1983). A estrutura da cadeia lateral R pode conter substituintes alifáticos, aromático ou heterocíclicos (por exemplo, indólicos) (FAHEY et al., 2001).

Os GSLs de cada grupo são sintetizados através de uma via metabólica independente e que partilha um conjunto comum de enzimas envolvidas na formação da estrutura nuclear do GSL sob controle genético (FAHEY et al., 2001). Já foram identificados cerca de 200 tipos diferentes de GSLs e os três subtipos formados têm os seus precursores correspondentes de forma que, glicosinolatos alifáticos são derivados de alanina, leucina, isoleucina, valina, e metionina. Glicosinolatos indólicos e glicosinolatos aromáticos são derivados, respectivamente, a partir do triptofano e fenilalanina ou tirosina (ZASADA et al., 2003; ISHIDA et al., 2014).

Grande parte dos GSLs possui cadeia lateral linear ou ramificada. Muitas destas substâncias podem conter, também, ligações duplas (olefínicas), grupos hidroxila ou carbonila ou ligações de enxofre em vários estados de oxidação, sendo este último o maior grupo, compreendendo um terço do total dos glicosinolatos conhecidos, como, por exemplo, metiltioalquilas, metilsulfinil alquilas ou metilsulfonyl alquilas. Alguns glicosinolatos contendo o grupamento benzila apresentam ligação glicosídica com o anel aromático, em que a molécula de açúcar pode ser a glicose, a ramnose ou a arabinose (FAHEY et al., 2001).

A composição e o conteúdo de GSLs no vegetal são influenciados pelo genótipo, clima e condições de cultivo, incluindo fertilização, época de colheita e local de plantio. Eles diferem completamente entre os gêneros de plantas e entre os diferentes órgãos (ROSA et al., 1997). Em geral, várias partes de determinadas brássicas (raízes, hastes, folhas, inflorescências, frutos e sementes) apresentam qualitativamente o mesmo padrão, porém ocorrem mudanças em cada glicosinolato das raízes para órgãos e sementes verdes (KJAER, 1980).

Plantas de canola (*Brassica napus L.*) foram submetidas a análises por Cromatografia Líquida, onde foram detectados em folhas e sementes 12 tipos diferentes de GSLs, pertencentes às três classes químicas: sete alifáticos (progoitrina, epiprogoitrina, sinigrina, gluconapoleiferina, glucoalisina, gluconapina e glucobrassicinapina), quatro indol (glucobrassicina, 4-hidroxicucobrassicina,

neoglobbrassicina, e 4-metoxiglucobrassicina) e um aromático (gluconasturtiin). Entretanto, os glicosinolatos alifáticos foram predominantes em ambos os órgãos da planta (VELASCO et al., 2008).

Os GSLs são formados em todos os tecidos da planta e se degradam via hidrólise enzimática. Quando há autólise ou rompimento no tecido da planta, os GLs entram em contato com a enzima (ou grupo de enzimas) mirosinase (Tioglicosido glucohidrolase EC 3.2.3.1, Myr), presente endogenamente nos tecidos, que é armazenada separadamente na célula. A partir desse contato os GLs deixam de ser quimicamente estáveis (OERLEMANS et al., 2006). Com a atividade da mirosinase ocorre a liberação de uma porção de glicose e um fragmento de aglicona, que forma um intermediário instável (MITHEN et al., 2000), o qual se reorganiza espontaneamente em um rearranjo de Lossen (Figura 1) para produzir vários produtos biologicamente ativos (OERLEMANS et al., 2006).

Nesse processo de hidrólise há produção de compostos bioativos que incluem as nitrilas, epinonitrilas, oxazolidinonas, tiocianatos e/ou isotiocianatos, com diferentes proporções conforme a natureza química do GL precursor e de acordo com as condições de ocorrência da hidrólise, que pode ser o pH, substrato ou disponibilidade de íons metálicos e outros elementos proteicos (ROSA et al., 1997; BONES; ROSSITER, 2006; MORRA et al., 2010).

Entre os produtos derivados (PDs) de hidrólise enzimática de GLs (GL-DPs), os isotiocianatos (ITCs) são os principais produtos formados pela reação e têm algumas propriedades biológicas importantes (ROSA et al., 1997; FAHEY et al., 2001).

Os ITCs são compostos altamente tóxicos aos microrganismos, porém alteram sua toxicidade em diferentes organismos, assim como entre os diferentes compostos voláteis que produzem. Por serem biocidas gerais sua atividade resulta pela interação irreversível com proteínas (BROWN, 1997; SARWAR et al., 1998)

Os compostos voláteis produzidos possuem características inseticidas, nematicidas e fungicidas (SMOLINSKA; HORBOWICZ, 1999; BLOK et al., 2000), além de possuírem efeito herbicida.

Os isotiocianatos são compostos pungentes importantes que afetam o sabor e odor de plantas da família *Brassicaceae* (FAHEY et al., 2001; WILLIAMS; PUN, 2011). Estes são compostos lipofílicos, com baixa solubilidade em água e quando em contato com o solo são rapidamente degradados (RUMBERGER;

MARSCHNER 2003), com tempo de meia vida de dois dias, em temperatura de 20°C (BOREK et al.,1995).

Quando em contato com o solo, a rápida absorção está relacionada à sua volatilização, por ser degradado por microrganismos deste meio (GIMSING; KIRKEGAARD, 2006), e, principalmente, pela capacidade do isotiocianato ligar-se ao grupo nucleofílico encontrado em solos orgânicos (BOREK et al., 1995). Por isso é importante utilizar espécies que possuam no tecido alto teor de GSLs como é o caso da *Brassica napus* (canola) e *Brassica juncea* (mostarda-da-índia) (KIRKEGAARD; SARWAR, 1998; GIMSING; KIRKEGAARD, 2006).

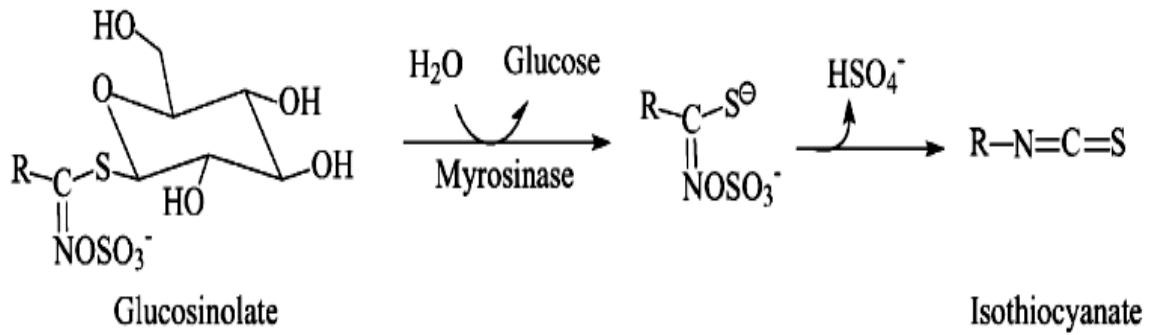


Figura 1 – Formação de isotiocianatos
 Fonte: Zhang (2004).

As estruturas apresentadas na figura 2 são de ITCs oriundos da *Brássica napus*, *Brassica hirta*, *Brassica campestris*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra* e outras (ZHANG, 2004).

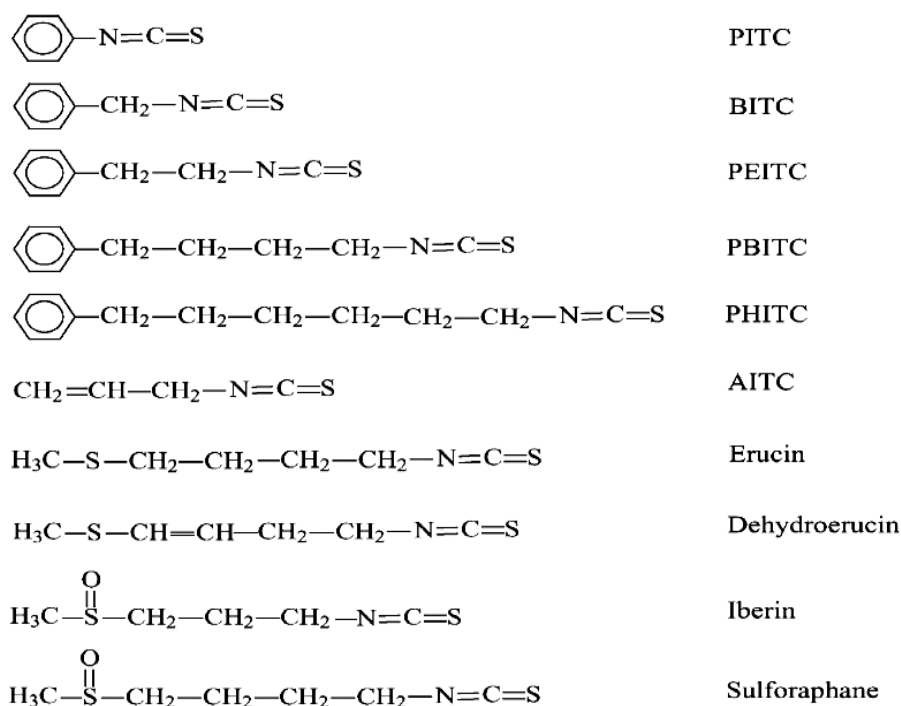


Figura 2 – Fórmulas estruturais da PITC (Fenil ITC), BITC (Benzil ITC), PEITC (Fenetil ITC), PBITC (4-fenilbutil ITC), PHITC (6-fenilhexil ITC), AITC (Alil ITC), Erucin, dehidroerucin, Iberin e Sulforafane Fonte: Zhang (2004).

Diversos tipos de GLs são encontrados nas brássicas, sendo que sua concentração e composição variam entre espécies e entre as diferentes partes da planta. O acúmulo de GLs alifáticos em *B. rapa* é aumentado pelo baixo teor de nitrogênio e alto teor de enxofre (CHEN et al., 2015).

Os níveis de GLs em *B. napus* foram elevados por fermento, metil jasmonato e infecção fúngica. Alguns resultados intrigantes foram obtidos para a relação entre estresse de alta temperatura e síntese de GL. Sabe-se que a exposição de vegetais da família *Brassicaceae* a altas temperaturas aumenta os teores de GLs alifáticos superiores (PEREIRA et al., 2002).

Conseqüentemente, os isotiocianatos, também variam em sua toxicidade a diferentes organismos, dependendo das espécies de plantas, cultivares e estádios de crescimento, composição química da cadeia lateral, concentração e tempo de exposição (BOREK et al., 1995; BROWN; MORRA, 1997; KIRKEGAARD et al., 1998; FAHEY et al., 2001).

Em se tratando de mostarda-da-índia (*Brassica juncea* L.), estudos relataram que foi cultivada durante séculos em muitas partes da Eurásia, da qual se origina. É comumente conhecida pelo uso de suas sementes em muitos países como especiaria picante tradicional (BJÖRKMAN et al., 2011). O principal GSL

encontrado na mostarda-da-índia é a sinigrina, que quando hidrolisada produz o alil ITC (COOLS; TERRY, 2012). Este isotiocianato também pode ser encontrado em altas concentrações nas raízes de canola (SMOLINSKA et al., 2000). Enquanto que para outro tipo de brássica como a *S. alba*, o principal GLS é a sinalbina que produz o ITC de p-hidroxibenzil (ZASADA; FERRIS, 2004).

Considerando que o efeito fungicida dos ITC contra um fungo específico sofre variação conforme o ITC determinado, o relato é de que os ITCs aromáticos apresentaram maior fungitoxidade com relação aos grupos R alifáticos (CARTER et al., 1963). Estudo realizado por Borek et al. (1995) indicou que os ITCs derivados de GSLs aromáticos foram quarenta vezes mais tóxicos para as doenças na videira preta (*Otiorhynchus sulcatus F.*) comparativamente à fração alifática.

A avaliação *in vitro* dos diferentes ITCs mostram que, na maioria dos casos, as espécies de *Brássicas* contêm em sua estrutura mais de um glicosinolato (TRONCOSO-ROJAS et al., 2005).

Piva (2013) testou os extratos de pó de canola obtidos por diferentes formas de extração (alcoólico, infusão, maceração e extrato aquoso), nas concentrações de 0, 3, 6, 9 ou 12%, no controle do oídio do pepino, e verificou que o tratamento com melhor controle foi do extrato obtido por maceração, na concentração de 12%, com redução na incidência e severidade da doença acima de 50% e 90%, respectivamente.

Vários dados podem ser observados com relação ao êxito da utilização das brássicas no controle de fitopatógenos, todavia a utilização de brássicas no controle de fitopatógenos na pós-colheita ainda tem sido pouco relatada, mas trabalhos recentes já mostram o efeito positivo dessas plantas contra alguns patógenos.

O teste *in vitro* de alguns GL-PDs mostrou elevado nível de atividade contra agentes patogênicos pós-colheita em que o alil isotiocianato (AITC) produzido por hidrólise do GL sinigrina foi altamente inibidor do crescimento de *P. expansum* agente causador do bolor azul em peras (MARI et al., 1993; MARI et al., 1996).

Investigação de diferentes formas de extração e de aplicação dos extratos de canola e de mostarda-da-índia associados à termoterapia sobre a podridão parda (*Monilinia fructicola*) foram recentemente realizados. As formas de extração testadas foram aquosa simples, maceração e infusão. Os extratos com concentração 12% (p/v) de duas espécies de brássicas na sua maioria reduziram

significativamente o crescimento micelial e germinação de conídios de *M. frutícola*, assim como a área da lesão da podridão parda e a produção de conídios *in vivo*, não confirmado o mesmo efeito com a aplicação do extrato de mostarda-da-índia em infusão. Dentre várias combinações, quando se realizou a aplicação dos respectivos extratos (canola e mostarda-da-índia) seguidas da inoculação dos frutos, aplicação da termoterapia e aplicação do extrato novamente (EITE), observou-se que ocorreu eficiência no controle da podridão parda em pêssego, reduzindo a doença, em média, 58 e 51%, respectivamente. A comparação dos tratamentos entre si e com o controle químico confirmou a superioridade do tratamento EITE de canola e EITE de mostarda-da-índia, não diferindo do controle químico sobre a produção de conídios nas lesões de podridão parda em pêssego, com redução da área da lesão em mais de 84%, e a esporulação em mais de 90% (PAZZOLINI et al., 2016).

Alguns estudos determinaram e quantificaram isotiocinatos que de forma isolada, mostraram seu efeito inibidor a certos fitopatógenos. Benzil isotiocianato pode ser encontrado no mamão papaya e testes laboratoriais confirmaram que sementes deste, podem matar, de forma efetiva, helmintos *in vitro* e *in vivo* (CASTRO; ANJOS; OLIVEIRA, 2008), sendo o isotiocianato o composto ativo responsável por tal característica (MATTHIESSEN; WARTON; SHACKLETON, 2004).

Segundo Potter, Davies e Rathjen (1998) o ITC formado em maior quantidade na decomposição da canola é o 2-propenil também chamado de alil ITC, sendo este o mais tóxico aos microrganismos, mas ocorre a formação de outros, com menores concentrações e menor poder de supressão de patógenos. O estudo evidencia que a influência na inibição dos microrganismos, não é necessariamente a quantidade de ITC liberada pelo composto e sim o tipo formado (NICOLA et al., 2013).

Muitos trabalhos relatam as dificuldades para identificar e quantificar ITCs. De acordo com Cools et al. (2012), ITCs e nitrilas são frequentemente extraídos usando hidrodestilação pelo sistema de clewenger e analisados por cromatografia gasosa, a autora cita que é um processo trabalhoso, necessita de grande volume de material vegetal e temperaturas elevadas podem degradar os GSL em agliconas.

Smolinska e Horbowicz (1999) quantificaram ITCs em espécies de brássicas usando para a extração o solvente diclorometano na presença do padrão

fenil ITC. A análise foi realizada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama. A *Brassica juncea* apresentou alta quantidade de alil ITC e foi constatado que durante a primavera a liberação desse ITC é duas vezes maior que no outono. Análise química por cromatografia gasosa de *Brassica juncea* confirma que alguns compostos voláteis estão presentes em sementes com concentração 10 vezes maior do que em folhas (MALABED; NOEL, 2012). Estudo de Sharma, Rai e Prasad (2018) identificou nas sementes da mostarda-da-índia um perfil cromatográfico com 32,46% do 2-butil isotiocianato e 28,01% de fenetil isotiocianato, com destaque para a presença de 24,24% de 2-butil isotiocianato nas folhas, confirmando que os glicosinolatos com presença dos grupos alil e feneetil na cadeia lateral são compostos de maior predominância em *Brassica juncea* (D'AQUINO et al., 2017).

Castro et al. (2008) quantificou o benzil ITC em amostras de mamão papaya utilizando o solvente extrator acetato de etila e como método de análise a cromatografia gasosa. As determinações de BITC em mamão forneceram um valor médio de concentração em todas as amostras analisadas de 16,23 µg/g.

A metodologia empregada no processo extrativo para análise química é fundamental para retirar de forma seletiva as frações ou substâncias de interesse para análise. O estado de divisão do vegetal, agitação do sistema, temperatura, natureza do solvente extrator, pH, tempo de extração, são fatores que influenciam diretamente na eficiência da extração (MITHEN, 2001).

As brássicas canola e mostarda-da-índia ainda não foram testadas no controle do bolor verde. Para tanto é necessário maior conhecimento sobre os métodos extrativos, identificação e quantificação dos tipos de isotiocianatos que se fazem presente nesses vegetais. Geralmente estas substâncias são testadas na sua forma sintética e em alguns casos isoladamente, havendo poucas informações sobre a ação dos compostos extraídos das brássicas no controle de patógenos em condições *in vivo* e *in vitro*. Ainda cita-se que compostos extraídos da canola e mostarda-da-índia podem ser considerados alternativas viáveis, pela fácil obtenção e baixo custo, já que podem ser cultivados na pequena propriedade e seus subprodutos produzidos pelo próprio produtor.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus de Pato Branco - Paraná.

3.2 OBTENÇÃO DO PÓ DE CANOLA E DE MOSTARDA-DA-ÍNDIA

A canola 'Hyola 4333' e mostarda-da-índia 'Q 6501', foram cultivadas na área experimental da UTFPR. A parte aérea das plantas foi coletada em pleno florescimento e mantida em estufa a 50°C por 72 horas. Em seguida, foram trituradas em moinho de facas tipo Willey (SOLAB) com peneira de 0,25 mm. O pó foi armazenado no escuro em geladeira a 4 °C até a sua utilização.

3.3 PREPARO DO PÓ DE CANOLA E DE MOSTARDA-ÍNDIA EM SACHÊ ARTESANAL

Para os ensaios *in vitro*, foram utilizados filtros para chimarrão Chicão confeccionados de tecido voil, de 5 cm de comprimento x 4 cm de largura, nos quais acondicionaram-se as quantidades de 0,11; 0,22; 0,33 e 0,44 g de pó de canola ou mostarda-da-índia.

Nos ensaios *in vivo*, os sachês utilizados foram confeccionados de tecido poliéster tipo voil, com fios finos e baixa densidade, no tamanho de 15 cm de comprimento x 4 cm de largura, nos quais acondicionaram-se as quantidades de 6, 12, 18 e 24 g de pó de canola ou mostarda-da-índia.

3.4 PREPARO DOS EXTRATOS AQUOSOS COM PÓ DE CANOLA E DE MOSTARDA-DA-ÍNDIA

Para a obtenção dos extratos aquosos, 120 g de pó seco de canola ou mostarda-da-índia e 880 mL de água destilada foram adicionados em béquer de 1,5 L resultando em concentração de 12% (p/v).

Os extratos aquosos foram preparados da seguinte forma:

a) Aquoso simples (EAS): o pó vegetal de canola ou mostarda-da-índia foi misturado em água destilada (temperatura $\pm 25^{\circ}\text{C}$) e, em seguida, a suspensão foi filtrada com dupla camada de gaze;

b) Infusão (EAI): o pó vegetal de canola ou mostarda-da-índia foi misturado à água destilada (temperatura $\pm 100^{\circ}\text{C}$) por 20 minutos em recipiente escuro e fechado, em seguida a suspensão foi filtrada com dupla camada de gaze;

c) Maceração (EAM): o pó vegetal de canola ou mostarda-da-índia foi misturado em água destilada (temperatura $\pm 25^{\circ}\text{C}$). A suspensão foi mantida por um período de oito horas no escuro, e filtrada com dupla camada de gaze.

Depois do preparo, os extratos foram utilizados imediatamente para cada ensaio experimental separadamente, sem período de armazenamento, como descrito a seguir.

3.5 OBTENÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DO INÓCULO DO PATÓGENO

O fungo *P. digitatum* utilizado neste estudo foi isolado de frutos de laranja Pera com sinais de bolor verde, coletados nos mercados locais de Pato Branco, Paraná.

Após isolamento e identificação do patógeno, a cultura pura do fungo foi repicada para placas de Petri e tubos de ensaios contendo meios de cultivo BSA. Os tubos de ensaio após 7 dias foram armazenados em geladeira a 4°C , no escuro.

3.6 OBTENÇÃO E DESINFESTAÇÃO DOS FRUTOS

Os experimentos *in vivo* foram realizados com frutos de laranjas Pera *Citrus sinensis* (L.) Osbeck obtidos da Distribuidora Comercial de Frutos e Verduras Cantú, localizada na cidade de Vitorino, Paraná. Os frutos sem danos mecânicos ou microbiológicos visíveis foram selecionados com base na uniformidade de tamanho e maturação.

Os frutos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo (v/v) por dois minutos para desinfestação da superfície, seguido pelo enxágue com água de torneira. Em seguida foram distribuídos em bancada para secagem sobre papel toalha por aproximadamente 4 horas em temperatura ambiente (± 23 °C).

3.7 EFEITO DOS COMPOSTOS FITOQUÍMICOS OBTIDOS DO PÓ DE CANOLA OU DE MOSTARDA-DA-ÍNDIA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL E PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE *P. digitatum*

Para avaliar o efeito das quantidades de pó de canola e de mostarda-da-índia ou as formas de preparo de extratos aquosos obtidos dos mesmos produtos vegetais sobre o desenvolvimento do patógeno, foram realizados ensaios com delineamento inteiramente casualizado e cinco repetições por tratamento. Os ensaios foram executados separadamente com cada uma das brássicas e repetidos por duas vezes (ensaio I e ensaio II) conforme descrito a seguir:

3.7.1 Efeito de concentrações de pó de canola ou de mostarda-da-índia no sachê artesanal sobre *P. digitatum*

Para este ensaio foram utilizados somente fundos de placas de Petri. Discos de micélio de 5 mm de diâmetro, retirados de uma colônia de *P. digitatum* de 13 dias de idade foram transferidos para o centro do fundo de uma placa de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio de cultivo BSA. Sachês com 0,0; 0,11; 0,22; 0,33 e 0,44 g de pó de canola ou mostarda-da-índia foram colocados em placas de Petri, contendo papel filtro úmido (descrito modo de preparo no item 3.3). Essas quantidades foram calculadas proporcionais ao volume da placa de Petri com relação ao volume da bandeja, utilizada nos ensaios *in vivo*. Cada sachê contendo pó foi umedecido com 0,11; 0,22; 0,33 e 0,44 mL de água destilada, respectivamente, de acordo com as quantidades em g de pó contido nos tratamentos. Os fundos das placas foram sobrepostos, de modo que o disco de micélio em meio de cultivo BSA ficasse na parte superior e, em seguida, selados com plástico filme. O tratamento testemunha foi considerado a concentração zero.

3.7.2 Efeito da forma de preparo de extratos aquosos de pó de canola ou de mostarda-da-índia sobre *P. digitatum*

Neste estudo, 1 mL de extrato aquoso obtido por extração simples aquosa, infusão e maceração (item 3.4) foi acondicionado em fundo de placa de Petri. Em outro fundo foi adicionado discos de micélio de *P. digitatum* em meio BSA. Os fundos das placas foram sobrepostos e selados com plástico filme. No tratamento testemunha foi utilizada água destilada.

3.7.3 Efeito de extratos aquosos de pó de canola ou de mostarda-da-índia sobre *P. digitatum*

Neste ensaio, os extratos aquosos foram preparados por extração aquosa simples, infusão e maceração, mas na concentração de 24% (p/v). Em seguida os extratos foram homogeneizados e adicionados ao meio de cultivo BSA fundente (± 60 °C), de modo a se obter concentração final de 12%, e vertidos em placas de Petri. Após a solidificação dos meios de cultivo, discos de micélio de *P. digitatum* (5 mm de diâmetro) foram transferidos para o centro das placas de Petri.

Em todos os ensaios, as placas de Petri foram seladas com plástico filme (PVC) e mantidas a 25°C em câmara de crescimento por 12 dias ou até o crescimento micelial alcançar a borda de uma das placas neste período. Foram feitas avaliações do crescimento micelial por meio de medições (cm) do crescimento radial da colônia em dois eixos ortogonais e, posteriormente, calculada a média. Os valores do crescimento micelial foram convertidos para porcentagem de inibição do crescimento (PIC) onde: $PIC = [(diâmetro da testemunha - diâmetro do tratamento)/diâmetro da testemunha] \times 100$, para cada forma de extração em relação à testemunha.

Para a contagem do número de esporos, 10 mL de água destilada contendo 0,5% de Tween-80 foram adicionados em cada placa de Petri e com auxílio de uma alça de Drigalski, o micélio de cada placa foi raspado. Na suspensão de conídios foi acrescentado o volume de 20 μ L de lactofenol. Para determinar a concentração de esporos, uma alíquota foi transferida para a câmara de Neubauer e a contagem foi feita com auxílio de microscópio óptico no aumento de 400 x.

3.8 EFEITO DE EXTRATOS DE CANOLA OU DE MOSTARDA-DA-ÍNDIA SOBRE O BOLOR VERDE EM FRUTOS DE LARANJA PERA

3.8.1 Preparo, fermento, inoculação e armazenamento dos frutos

Para a realização de todos os experimentos *in vivo* deste estudo, bandejas de plástico (36 x 20 cm) tiveram o fundo revestido por folhas de papel toalha umedecidas com água destilada a fim de formar câmara úmida. Sobre o papel toalha foram espalhados uniformemente anéis de policloreto de vinila (PVC) de 50 mm de diâmetro e 2 cm de altura em cima destes foram distribuídos 8 frutos de laranja Pera, previamente selecionados e desinfestados (item 3.6), em cada bandeja.

Para a inoculação foi efetuado um ferimento mecânico na casca dos frutos de 2 a 3 mm, com um perfurador. Em seguida, 20 µL de suspensão de conídios calibrada com um hemocitômetro na concentração 1×10^6 conídios.mL⁻¹, foram depositadas no local do ferimento, com auxílio de uma micropipeta automática.

Logo após a aplicação dos tratamentos, os frutos foram distribuídos nas bandejas, as quais foram acondicionadas em sacos plásticos (50 x 35 cm) e armazenadas em incubadora a 25°C por 96 horas.

Todos os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado e cada unidade experimental representada por uma bandeja, foram compostas por oito frutos, com cinco repetições por tratamento. O experimento foi conduzido por duas vezes.

3.8.2 Efeito de concentrações de pó de canola ou de mostarda-da-índia no sachê artesanal sobre o bolor verde

Sachês contendo de 6, 12, 18 e 24 gramas de pó de canola ou mostarda-da-índia foram avaliados quanto a sua ação no controle do bolor verde. Os sachês foram preparados conforme descrito no item 3.3 em seguida, umedecidos com 0, 6, 12, 18 e 24 mL de água destilada e cada sachê distribuídos no centro das bandejas contendo frutos inoculados com *P. digitatum*.

Após 96 horas, foram avaliadas as áreas das lesões (cm²) nos frutos, causada pelo *P. digitatum*. Para isso, os frutos de todos os tratamentos foram fotografados e a medição foi feita por meio das imagens capturadas com o software Image Tool. O percentual de inibição da doença foi calculado pela redução da área lesionada dos frutos tratados em relação à testemunha: Eficiência (%) = (área da testemunha – área do tratamento) x 100/área da testemunha.

Todos os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado e cada unidade experimental foram compostas por oito frutos, com cinco repetições por tratamento. O experimento foi conduzido por duas vezes.

3.8.3 Efeito do modo de preparo de extratos aquosos do pó de canola ou de mostarda-da-índia sobre o bolor verde

Extratos aquosos simples, de maceração e de infusão do pó de canola e de mostarda-da-índia foram avaliados quanto a sua ação nas diferentes formas de extração no controle do bolor verde. Os extratos foram preparados conforme descrito no item 3.4 e como testemunha foi utilizada apenas água destilada. Os frutos de laranja Pera previamente selecionados, desinfestados e secos, foram imersos por 1 minuto em um recipiente de dois litros, contendo, separadamente os diferentes extratos previamente preparados. No tratamento testemunha os frutos foram mergulhados em água destilada. Em seguida, os frutos permaneceram em bandejas pelo tempo de dois minutos para secagem. Após esse tempo, foram inoculados e armazenados, conforme descrito no teste anterior.

Os experimentos foram avaliados conforme descrição no item 3.8.2. Todos os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado e cada unidade experimental foi composta por oito frutos, com cinco repetições por tratamento. O experimento foi conduzido por duas vezes.

3.8.4 Efeito do sachê ou extrato aquoso de pó canola ou de mostarda-da-índia associados à termoterapia no controle do bolor verde

Neste estudo foram testados os tratamentos selecionados nos testes anteriores, (itens 3.8.2 e 3.8.3) associados ou não com termoterapia no controle do

bolor verde. As metodologias de preparo, fermento e inoculação dos frutos foram realizadas conforme descrita no item 3.8.1.

Os tratamentos foram os seguintes: 1 – Sachê artesanal (S) de canola 24 g ou de mostarda-da-índia 24 g; 2 – Extrato aquoso simples (EAS) de canola ou mostarda-da-índia; 3 – Tratamento térmico (57°C) + sachê artesanal (TTS) de canola 24 g e de mostarda-da-índia 24 g; 4 – Tratamento térmico (57°C) + extrato aquoso simples (TTE) de canola ou de mostarda-da-índia; 5 – Tratamento térmico (TT); 6 – Extrato aquoso simples aquecido de canola ou mostarda-da-índia (EA) (57°C); 7 – Extrato aquoso simples de canola ou mostarda-da-índia + Inoculação do patógeno + Tratamento térmico (57°C) (EITT); 8 – Testemunha (T).

Para o tratamento térmico, os frutos foram mergulhados em água destilada a 57 °C, por dois minutos em banho-maria (Modelo TBI 45/100).

Os tratamentos 1 e 2 seguiram a metodologia de preparo descrita nos itens 3.8.2 e 3.8.3. Nos tratamentos 3, 4, 5 e 6, primeiramente foi efetuada a inoculação e, após repouso de uma hora para a secagem da gota do inóculo do patógeno, os frutos foram submetidos à aplicação da termoterapia e posteriormente foram tratados com o sachê artesanal (tratamento 3 e 4) e extrato aquoso simples (tratamento 5).

No tratamento 7 os frutos foram imersos no extrato aquoso, seguido da inoculação e tempo de espera de uma hora para secagem da gota do inóculo, antes do tratamento térmico. No tratamento testemunha os frutos de laranja Pera foram imersos em água destilada.

Após os tratamentos, os frutos foram distribuídos nas bandejas, acondicionados em sacos plásticos e armazenados. Os experimentos foram avaliados conforme descrição no item 3.8.2. Todos os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado e cada unidade experimental foram compostas por oito frutos, com cinco repetições por tratamento. O experimento foi conduzido por duas vezes.

3.8.5 Efeito de tratamentos alternativos com o pó de canola ou de mostarda-da-índia e fungicida no controle do bolor verde

Os tratamentos selecionados no item 3.8.4 foram comparação com o fungicida imazalil 1g i.a/L (grama de ingrediente ativo por litro), grupo químico

imidazole, indicado para o controle de bolor verde em pós-colheita na cultura de citros.

Os tratamentos foram: 1 – Sachê artesanal (S) de canola 24 g ou de mostarda-da-índia 24 g; 2 – Extrato aquoso simples de canola ou de mostarda-da-índia (EAS); 3 – Fungicida (F) 4 – Testemunha (T). No tratamento com o fungicida, os frutos foram mergulhados por um minuto sob agitação, num recipiente fechado, contendo 2 L de solução de imazalil e, após dois minutos de secagem em bandeja, procedeu-se a metodologia descrita no item 3.8.1 preparo, inoculação, acondicionamento e armazenagem.

Os experimentos foram avaliados conforme descrição no item 3.8.2. e neste ensaio também foram avaliados o número de conídios produzido nos frutos. Os conídios da área da lesão dos frutos foram retirados por raspagem completa com alça de Drigalski e lavagem com água destilada e esterilizada contendo 10 µL de Tween-80 e recolhida em tubos de ensaio, completando o volume final de 10 mL de água destilada e esterilizada e 10 µL de lactofenol para impedir o processo de germinação dos conídios do fungo. Em seguida essa suspensão foi utilizada para determinar o número de conídios, onde uma alíquota foi transferida para a câmara de Neubauer e procedeu-se a contagem em microscópio óptico no aumento de 400 x.

Todos os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado e cada unidade experimental foram compostas por oito frutos, com cinco repetições por tratamento. O experimento foi conduzido por duas vezes.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos ensaios *in vivo* e *in vitro* foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste F ($p \leq 0,05$).

Os dados quantitativos foram avaliados por meio de análise de regressão e os dados qualitativos foram submetidos ao teste de médias, pelos testes de Tukey ou Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Para análise estatística, quando os dados dos ensaios não atenderam às pressuposições da ANOVA de normalidade dos erros pelo teste de Lilliefors e homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett, foram

transformados por $X = \log(X)$. A análise estatística foi executada com auxílio do programa computacional Assistat 7.7 Beta (SILVA; AZEVEDO, 2016).

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DOS COMPOSTOS FITOQUÍMICOS OBTIDOS DO PÓ DE CANOLA OU DE MOSTARDA-DA-ÍNDIA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL E PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE *P. digitatum*

4.1.1 Efeito de concentrações de pó de canola ou de mostarda-da-índia no sachê artesanal sobre *P. digitatum*

Sachês com pó de canola inibiram ($p \leq 0,05$) de 33,2 a 82,0% o crescimento micelial de *P. digitatum* nos ensaios I e II (Figura 3A-3B - Apêndice A). O aumento da concentração de pó aumentou a inibição do fungo. Enquanto que a concentração de 0,11 g de pó de canola reduziu o crescimento do fungo em 52,4% na concentração de 0,44 g as reduções foram de 82,0% (Figura 3B), conforme ilustrado na Figura 5. O modelo de regressão linear foi o que melhor se ajustou para os dois ensaios.

O sachê com as quantidades de 0,33 e 0,44 g de pó de canola inibiram expressivamente a produção de conídios em 75,5 e 82,2%, no ensaio I e o modelo de regressão que melhor se ajustou foi o quadrático (Figura 3C - Apêndice A). No ensaio II, os tratamentos com as quantidades de 0,33 e 0,44 g, inibiram a produção de conídios em 81,7 e 91,1%, em relação à concentração zero. No entanto, o modelo de regressão que melhor se adequou foi o linear (Figura 3D - Apêndice A).

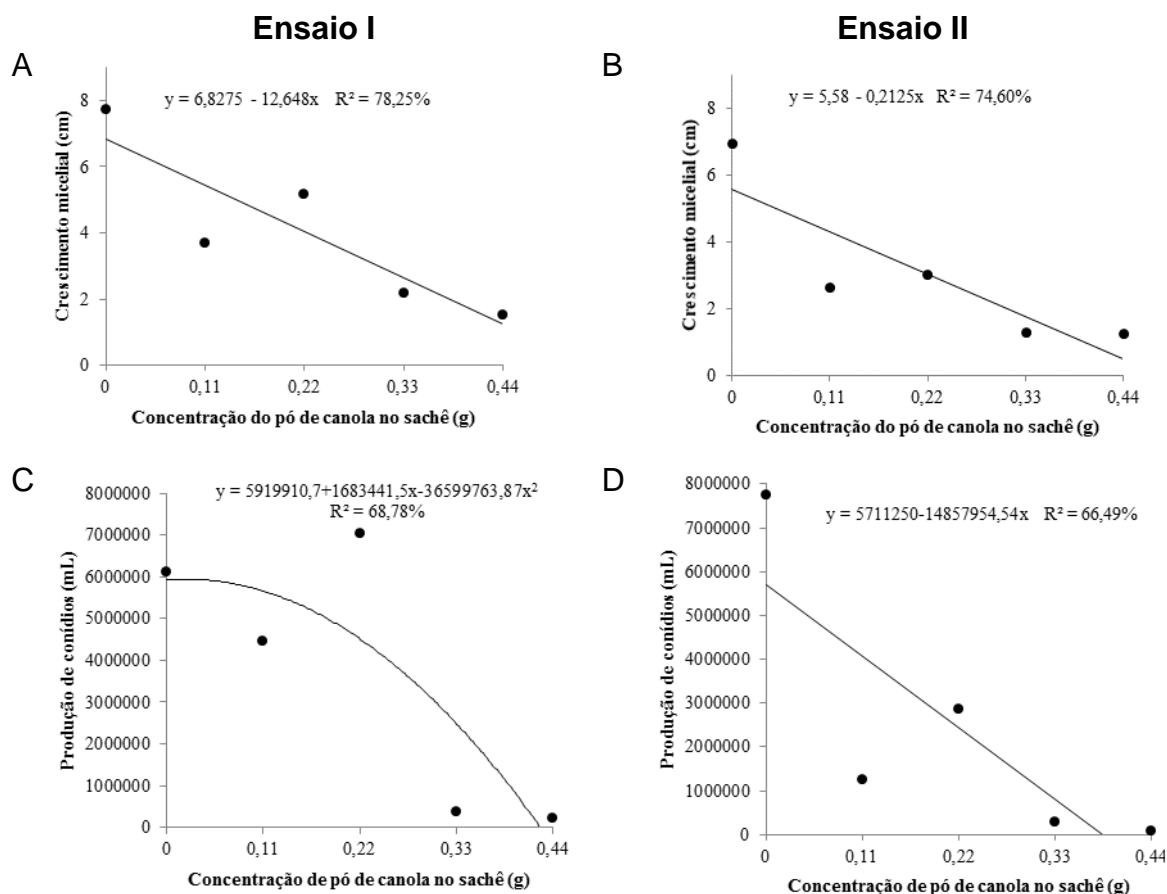


Figura 3 – Efeito das concentrações de canola em sachê artesanal nas concentrações (0,0 g, 0,11 g, 0,22 g, 0,33 g e 0,44 g) sobre o crescimento micelial (cm) (A e B) e produção de conídios (mL) (C e D) do fungo *Penicillium digitatum*. UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR. 2016.

O sachê artesanal de mostarda-da-índia apresentou resultados similares ao da canola quando se testou diferentes quantidades de pó sobre o crescimento micelial do fungo *P. digitatum* (Figura 4 - Apêndice B). A inibição no crescimento micelial do patógeno ocorreu conforme o aumento da concentração do pó entre 23,6 a 82,8%, nos ensaios I e II (Figura 4A - 4B). O modelo de regressão que melhor se adequou foi o linear no ensaio I e o quadrático no ensaio II.

Também se observou que conforme aumentou a quantidade de pó de mostarda-da-índia no sachê, diminuiu a produção de conídios, ficando entre 22,2 e 88,9% nos dois ensaios, com o modelo de regressão linear sendo o mais adequado para ambos.

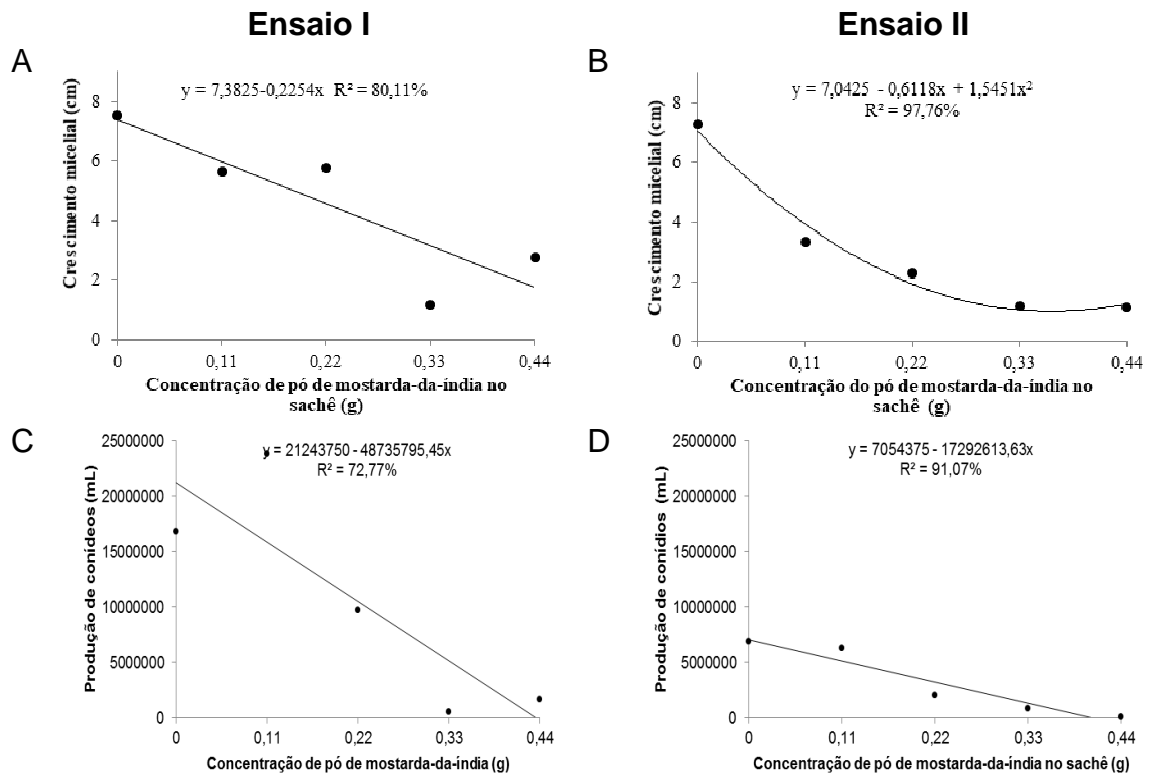


Figura 4 – Efeito das concentrações de pó de mostarda-da-índia em sachê artesanal nas concentrações (0,0 g, 0,11 g, 0,22 g, 0,33 g e 0,44 g) sobre o crescimento micelial (cm) (A e B) e produção de conídios (mL) (C e D) do fungo *Penicillium digitatum*. UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR. 2016.

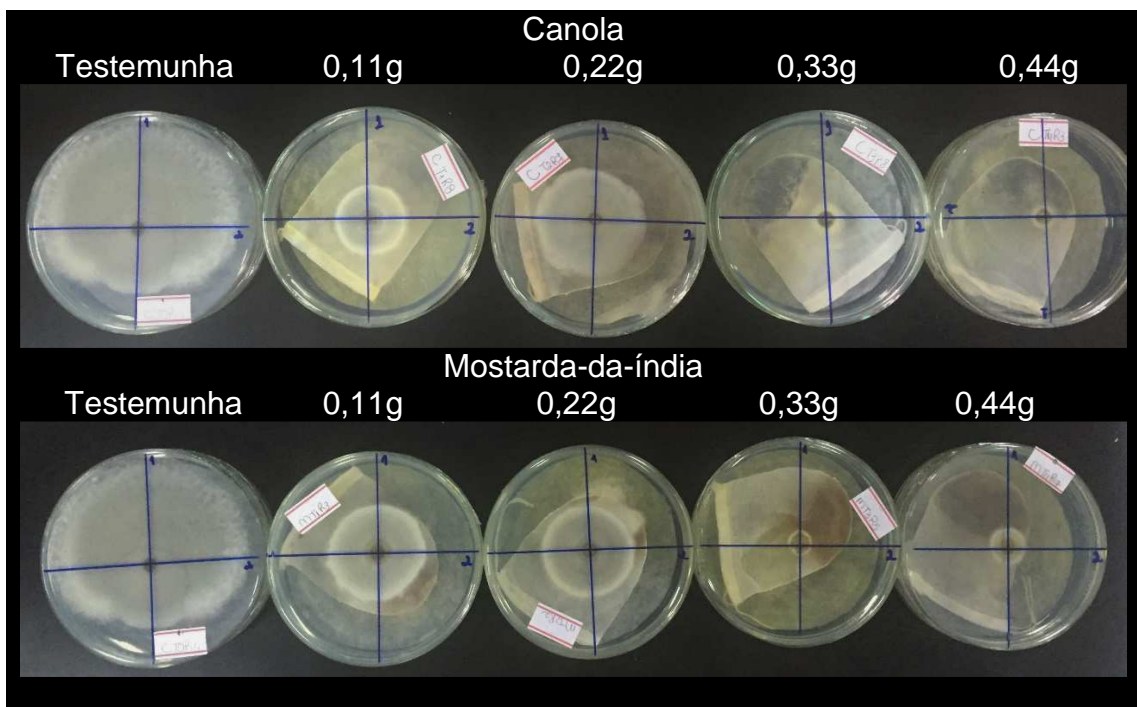


Figura 5 – Efeito das concentrações (0,0 g, 0,11 g, 0,22 g, 0,33 g e 0,44 g) de pó de canola e mostarda-da-índia em sachê artesanal sobre o crescimento micelial de *Penicillium digitatum*. UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR. 2016.

4.1.2 Efeito da forma de preparo de extratos aquosos de pó de canola ou de mostarda-da-índia sobre *P. digitatum*

Entre os diferentes modos de preparo, apenas o extrato aquoso simples do pó de canola reduziu o crescimento micelial e a produção de conídios em 32,1 e 54,7%, respectivamente, em comparação com a testemunha, no ensaio I (Figura 6 - Tabela 1 - Apêndice C).

No ensaio II todas as formas de preparo de extratos reduziram o crescimento micelial em relação à testemunha em até 42,6%, no entanto, não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 1). Resultados similares ao crescimento micelial foram observados na produção de conídios, onde os diferentes modos de preparo de extratos reduziram o número de conídios em até 66,7% quando comparados à testemunha.

Tabela 1 – Efeito de diferentes formas de preparo de extratos aquosos de pó de canola (aquoso simples, maceração e infusão) sobre o crescimento micelial (cm) e produção de conídios ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) do fungo *Penicillium digitatum* *in vitro*. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2016.

Tratamento	Ensaio I		Ensaio II	
	Crescimento micelial (cm)	Produção de conídios ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)	Crescimento micelial (cm) ^a	Produção de conídios ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)
Testemunha	8,08 a	12,6 a	7,47 a	13,5 a
Aquoso simples	5,49 b	5,7 b	4,29 b	4,5 b
Infusão	6,69 ab	8,4 ab	4,64 b	5,7 b
Maceração	6,65 ab	7,7 ab	4,99 b	6,4 b

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. ^a Dados transformados por $X = \log(X)$.

Todos os extratos aquosos de mostarda-da-índia diferiram da testemunha nos ensaios I e II, sem diferirem entre si (Tabela 2 - Apêndice D). O extrato aquoso simples de mostarda-da-índia inibiu em 25,9 e 34,7% o crescimento micelial de *P. digitatum*, enquanto a infusão inibiu em 37,9 e 36,3% e o extrato obtido por maceração reduziu o crescimento do fungo em 28,3 e 33,4%, respectivamente.

O número de conídios do fungo foi reduzido em até 83,2% pelo extrato aquoso simples de mostarda-da-índia e em até 55,8% pelo extrato da planta preparado por infusão (Tabela 2 – Figura 6).

Tabela 2 – Efeito de formas de preparo de extratos aquosos de pó de mostarda-da-índia (aquoso simples, maceração e infusão) sobre o crescimento micelial (cm) e produção de conídios ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) do fungo *Penicillium digitatum* *in vitro*. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2016.

Tratamento	Ensaio I		Ensaio II	
	Crescimento micelial (cm) ^a	Produção de conídios ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)	Crescimento micelial (cm) ^a	Produção de conídios ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)
Testemunha	8,10 a	11,8 a	7,61 a	11,3 a
Aquoso simples	6,00 b	4,8 c	4,97 b	1,9 b
Infusão	5,03 b	6,1 bc	4,85 b	5,0 b
Maceração	5,81 b	10,6 ab	5,07 b	8,7 a

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. ^a Dados transformados por $X=\log(X)$

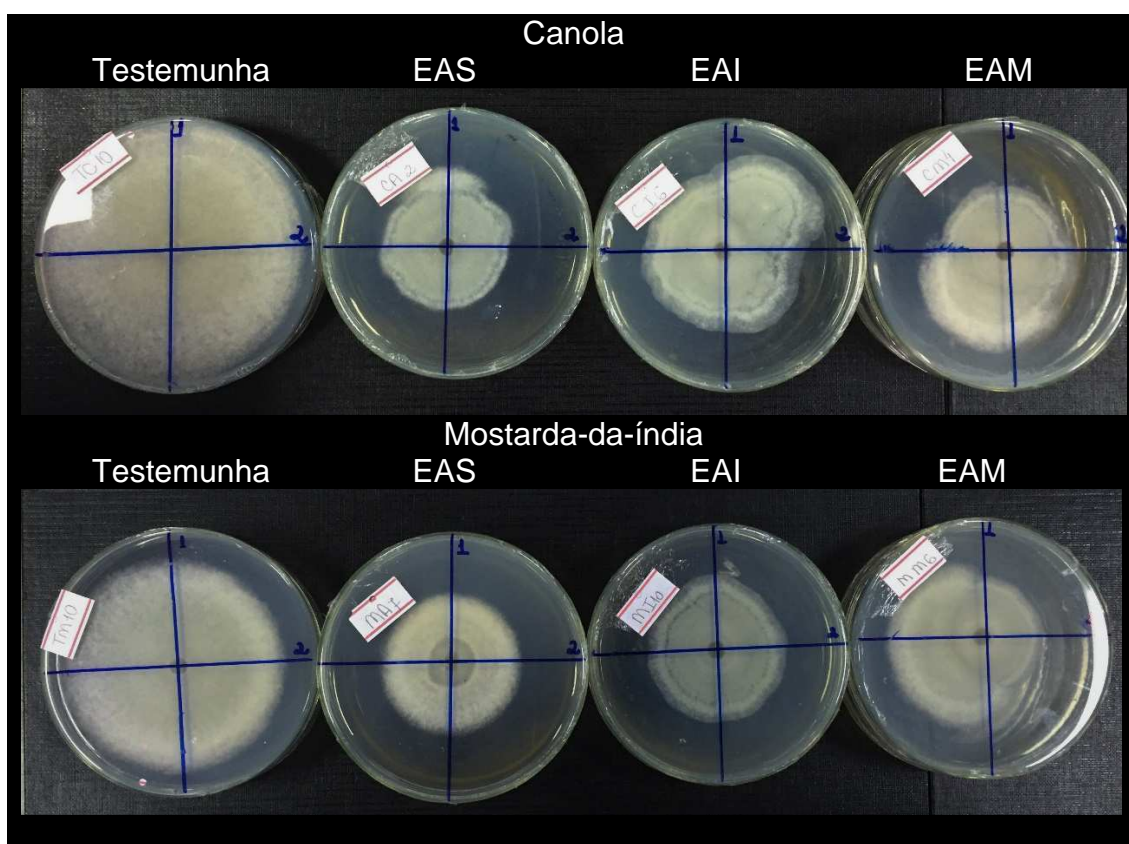


Figura 6 – Efeito de formas de preparo de extratos obtidos do pó de canola e mostarda-da-índia: aquoso simples (EAS), aquoso infusão (EAI) e aquoso maceração (EAM), na concentração de 12% sobre o crescimento micelial de *Penicillium digitatum*. UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR. 2016.

4.1.3 Efeito direto de extratos aquosos de pó de canola ou de mostarda-da-índia sobre *P. digitatum*

O crescimento micelial de *P. digitatum* não foi inibido após o cultivo com meio BSA contendo extratos de pó de canola ou mostarda-da-índia (Tabela 3 e 4 - Figura 7 - Apêndice M e N). Nos ensaios I e II, os extratos de ambas as plantas

preparados por infusão e maceração aumentaram o crescimento do micélio (Tabela 3 e 4).

Tabela 3 – Efeito de formas de preparo de extratos aquosos com o pó de canola (aquoso simples, maceração e infusão) em meio de cultivo BSA, sobre o crescimento micelial (cm) do fungo *Penicillium digitatum in vitro*. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2016.

Tratamento	Ensaio I	Ensaio II
	Crescimento micelial (cm)	
Testemunha	5,28 b	3,86 b
Aquoso simples	5,43 b	1,84 b
Infusão	6,37 ab	7,3 a
Maceração	7,95 a	7,6 a

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 4 – Efeito de formas de preparo de extratos aquosos com o pó mostarda-da-índia (aquoso simples, maceração e infusão) em meio de cultivo BSA, sobre o crescimento micelial (cm) do fungo *Penicillium digitatum in vitro*. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2016.

Tratamento	Ensaio I	Ensaio II
	Crescimento micelial (cm)	
Testemunha	4,45 b	5,29 b
Aquoso simples	6,57 a	6,34 ab
Infusão	7,1 a	7,28 a
Maceração	7,26 a	6,55 ab

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

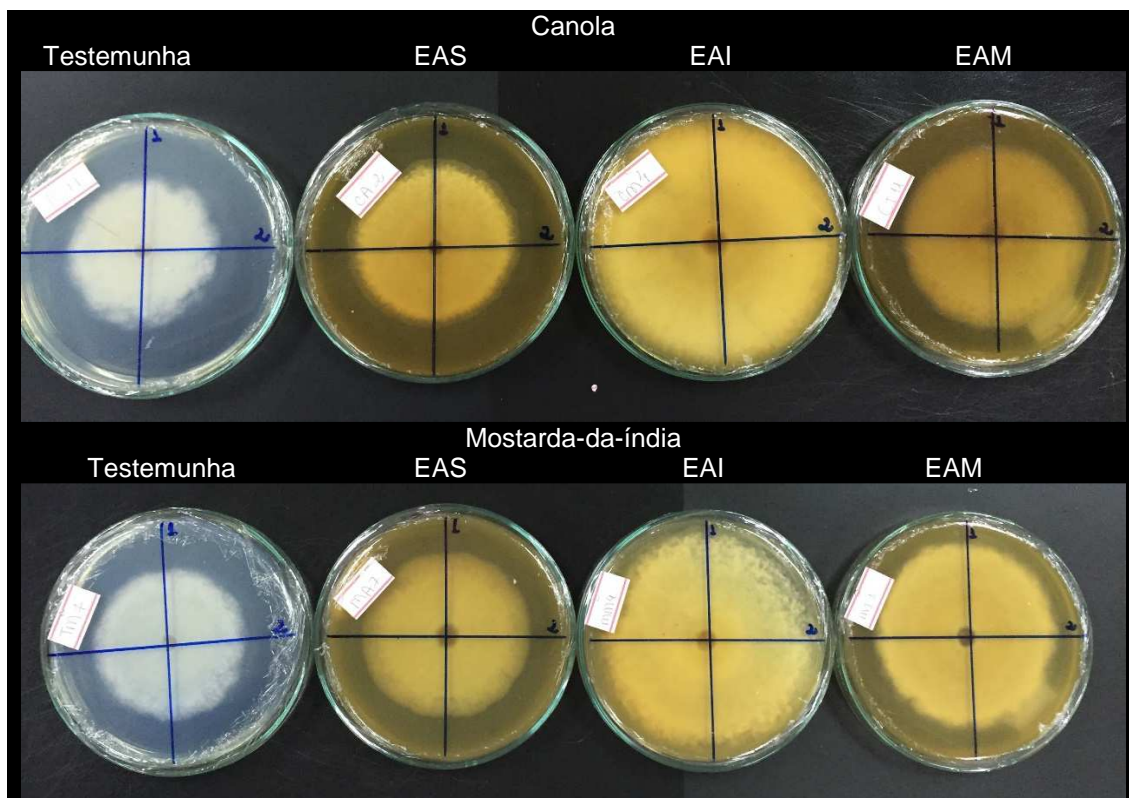


Figura 7 – Efeito de formas de preparo de extratos obtidos do pó de canola e mostarda-da-índia: aquoso simples (EAS), aquoso infusão (EAI) e aquoso maceração (EAM) em meio fundente, na concentração de 12% sobre o crescimento micelial de *Penicillium digitatum*. UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR. 2016.

4.2 EFEITO DE EXTRATOS DE CANOLA OU DE MOSTARDA-DA-ÍNDIA SOBRE O BOLOR VERDE EM FRUTOS DE LARANJA PERA

4.2.1 Efeito de concentrações de pó de canola ou de mostarda-da-índia no sachê artesanal sobre o bolor verde

O aumento das concentrações de pó de canola em sachês artesanais ($p \leq 0,05$), reduziu a severidade do bolor verde em laranjas Pera e o modelo de regressão que melhor se ajustou aos dois ensaios foi o linear (Figura 8 - Apêndice E). Na menor concentração do pó de canola, 6 g por sachê, o controle foi de 6,1 e 12,4%, nos ensaios I e II, enquanto que na maior concentração, 24 g por sachê, a redução da doença foi de 40,0 e 31,5% (Figura 10).

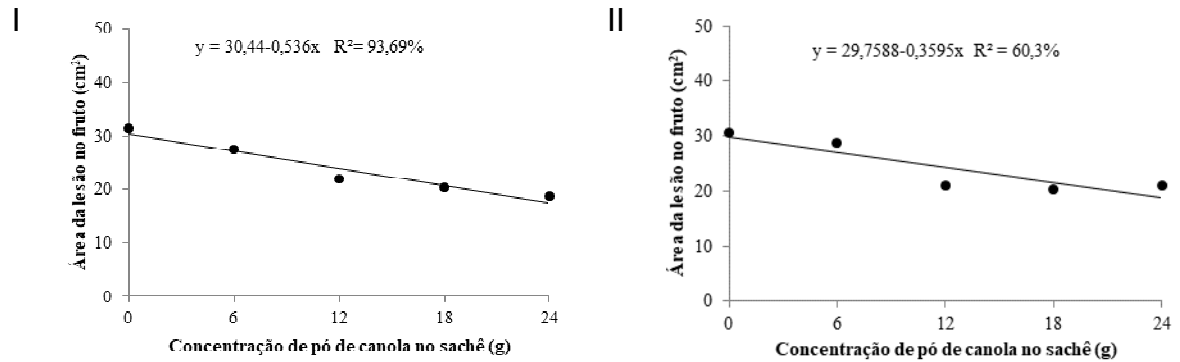


Figura 8 – Efeito da concentrações de pó de canola em sachê artesanal sobre o bolor verde (cm) em laranjas Pera (Ensaio I e II). UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR. 2016.

O aumento da concentração de pó de mostarda-da-índia em sachê artesanal também reduziu ($p \leq 0,05$) a severidade do bolor verde em frutos de laranja Pera e o modelo de regressão que melhor se adequou para os dois ensaios foi o quadrático (Figura 9 - APÊNDICE F). Da menor para a maior concentração de pó no sachê (6, 12, 18 e 24 g) o controle da doença nos frutos de laranja Pera foi de 32,4 e 47,9%, 41,1 e 76,7%, 35,0 e 56,4%, 34,6 e 73,4%, respectivamente, nos ensaios I e II (Figura 10).

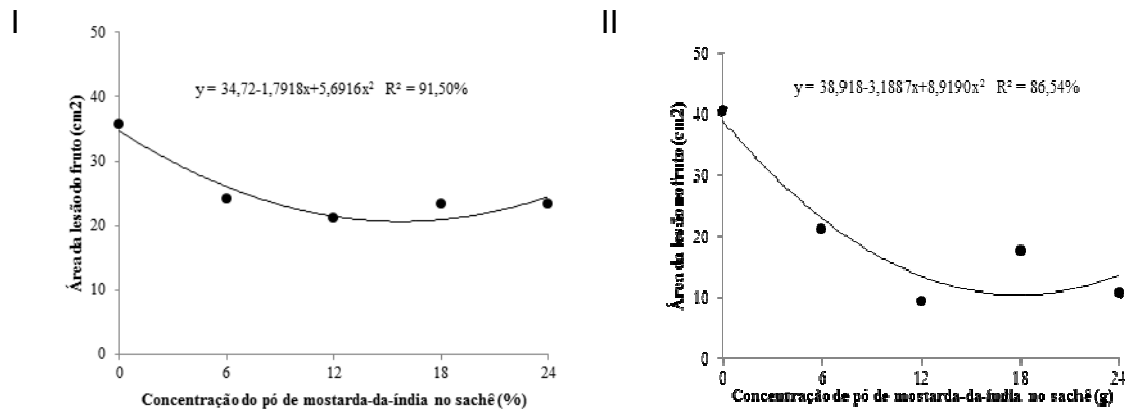


Figura 9 – Efeito da concentrações de pó de mostarda-da-índia em sachê artesanal sobre o bolor verde (cm) em laranjas Pera (Ensaio I e II). UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR. 2016.

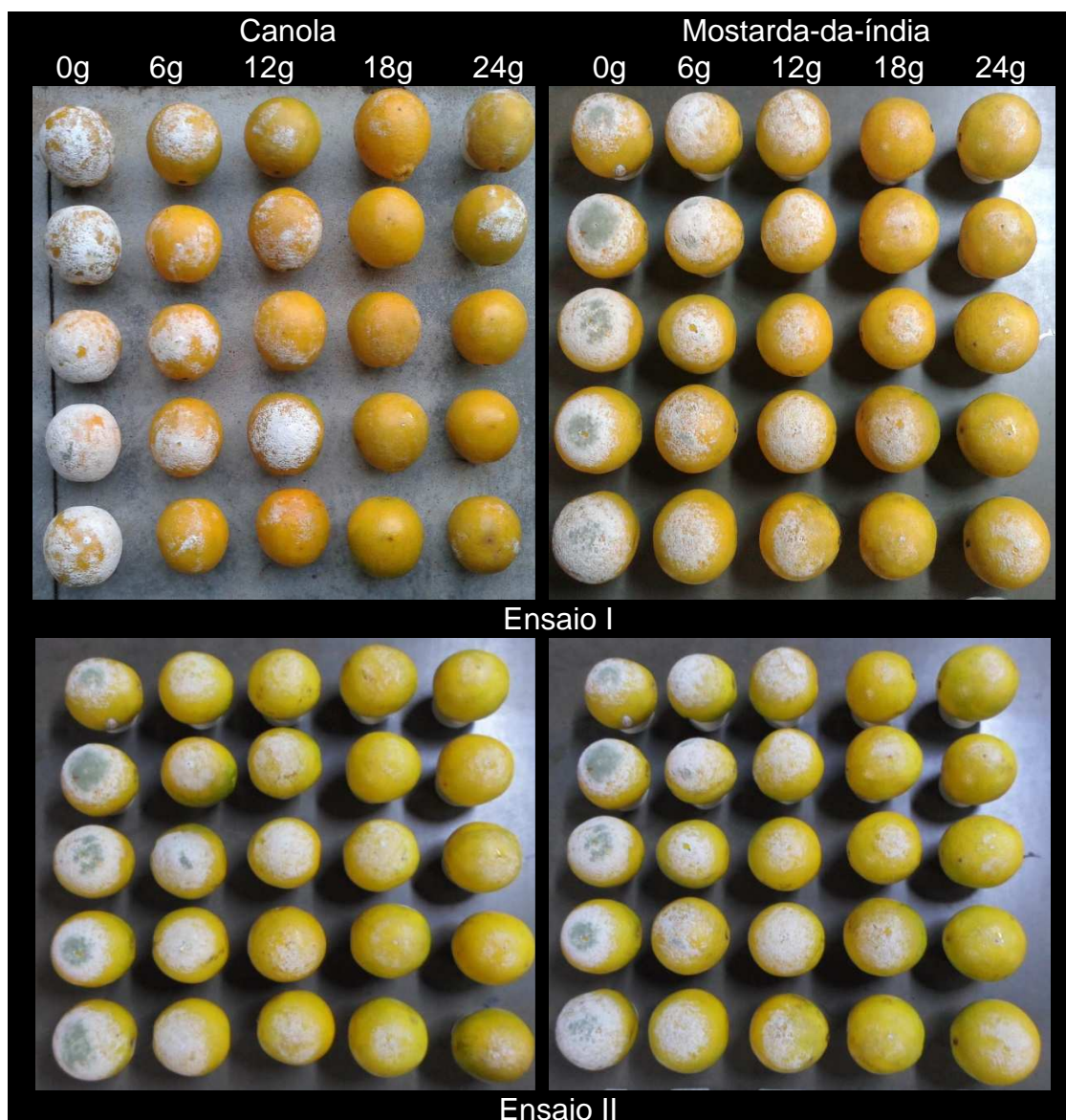


Figura 10 – Efeito do sachê artesanal com (0, 6, 12, 18 ou 24 g) de pó de canola ou mostarda-da-índia no controle do bolor verde, em pós-colheita de laranja Pera. UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR. 2016.

4.2.2 Efeito do modo de preparo de extratos aquosos de pó de canola ou de mostarda-da-índia sobre o bolor verde

Todos os extratos aquosos obtidos a partir do pó de canola reduziram o diâmetro da área da lesão causada pelo bolor verde em laranja Pera, sem efeito significativo entre as formas de preparo nos ensaios I e II (Tabela 5 Figura 11 – Apêndice - G). A redução do diâmetro da lesão em frutos de laranja Pera tratados com extratos de pó de canola foi em média 48,5% no aquoso simples, 44,2% no extrato de infusão e 44,3% no extrato macerado, conforme ilustrado na figura 11.

Tabela 5 – Efeito de formas de preparo de extratos com pó de canola (aquoso simples, infusão e maceração) no controle do bolor verde em pós-colheita de laranja Pera. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2016.

Tratamento	Ensaio I		Ensaio II	
	Diâmetro da lesão (cm)			
Testemunha	34,89	a	41,57	a
Aquoso simples	19,24	b	19,89	b
Infusão	23,28	b	18,72	b
Maceração	18,86	b	23,93	b

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Os extratos aquosos obtidos do pó de mostarda-da-índia, também reduziram o diâmetro da lesão causada pelo bolor verde em laranjas Pera. Todos os modos de preparo diferiram ($p \leq 0,05$) do tratamento testemunha, no entanto, não diferiram entre si (Tabela 6 – Figura 11 - Apêndice H). Os modos de preparo aquoso simples, infusão e maceração controlaram a doença em média 43,1% no ensaio I e 52,1% no ensaio II.

Tabela 6 – Efeito de formas de preparo de extratos com pó de mostarda-da-índia (aquoso simples, infusão e maceração) no controle do bolor verde em pós-colheita de laranja Pera. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2016.

Tratamento	Ensaio I		Ensaio II ^a	
	Diâmetro da lesão (cm)			
Testemunha	39,75	a	45,36	a
Aquoso simples	19,81	b	23,17	b
Infusão	25,47	b	23,25	b
Maceração	22,53	b	18,75	b

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. ^a Dados transformados por $X = \log(X)$.

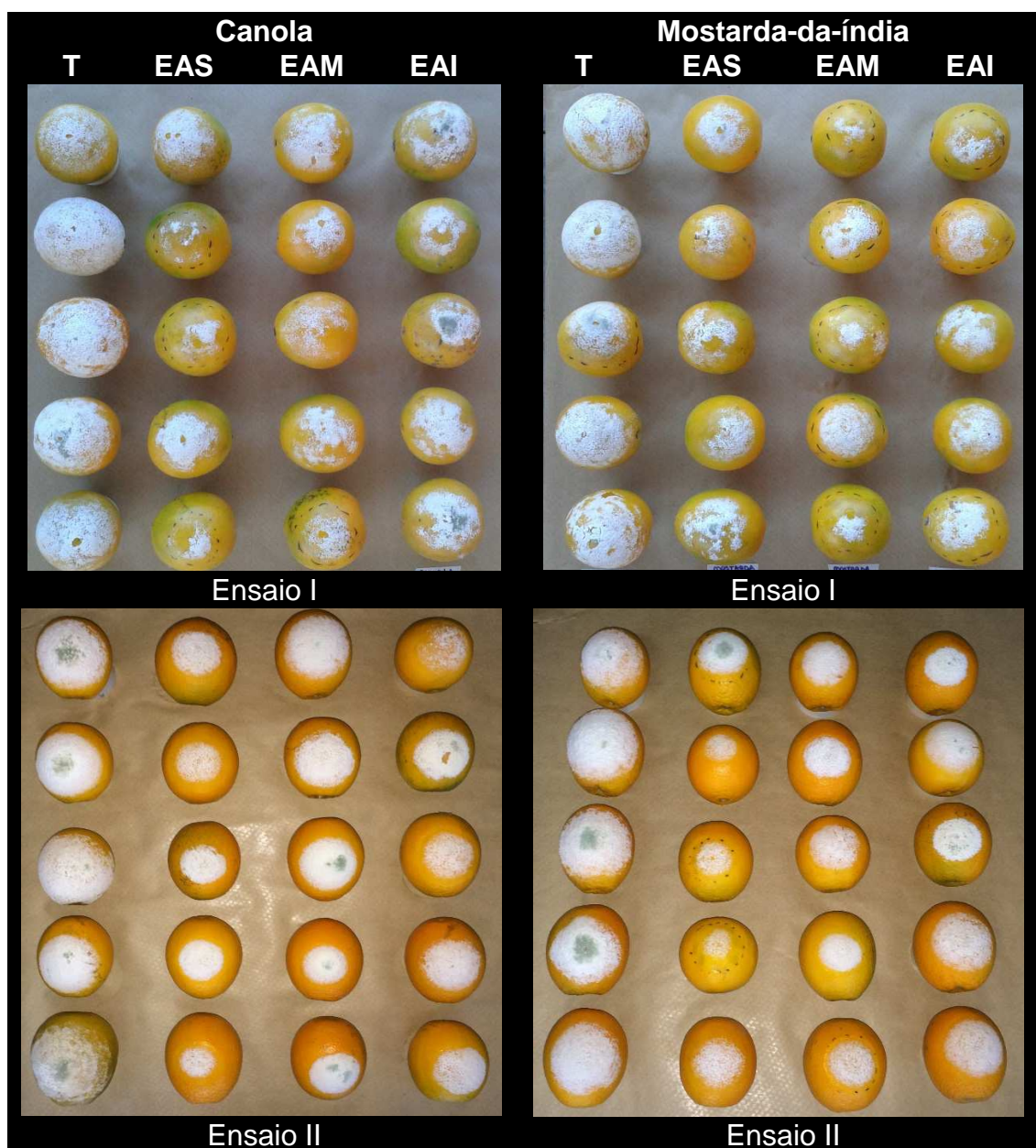


Figura 11 – Efeito de formas de preparo de extratos aquosos de canola e mostarda da índia, no controle do bolor verde em pós-colheita de laranja Pera. Testemunha (T) aquoso simples (EAS), infusão (EAI) e maceração (EAM). UTFPR, Câmpus Pato Branco, PR. 2016.

4.2.3 Extratos de pó de canola ou de mostarda-da-índia associados à termoterapia no controle do bolor verde

Com base em experimentos realizados previamente, a quantidade de 24 g de pó de canola em sachê artesanal e o extrato aquoso simples foram selecionados para compor combinações associadas ao tratamento térmico para o controle do bolor verde. Os tratamentos com sachês artesanais e extratos aquosos

associados ou não a termoterapia diferiram ($p \leq 0,05$) do tratamento testemunha e foram eficientes na redução do bolor verde, com exceção do extrato aquoso simples seguido da inoculação do patógeno e termoterapia, que se igualou ao tratamento testemunha no ensaio II (Tabela 7 - Apêndice I).

A maior eficiência de controle do bolor verde observada com o uso de sachês com 24 g de canola, isoladamente, com redução de 63,1% no ensaio I e 75,3% no ensaio II, e quando associado com a termoterapia com 24 g de canola a redução da doença foi de 56,4 e 84,0% (Tabela 7).

O tratamento extrato aquoso simples (EAS) reduziu o bolor verde em 32,2 e 36,5%. Quando associado à termoterapia (TT+EAS) a redução na doença foi de 36,7 e 26,6%. Quando os frutos de laranja Pera foram imersos somente em água aquecida (TT) na temperatura de 57 °C, o controle foi de 15,6 e 29,0%, nos ensaios I e II, respectivamente (Tabela 7). O tratamento com extrato aquoso simples aquecido, com posterior inoculação e tratamento térmico (EAS+I+TT) obteve redução no bolor verde de 37,0 e 45,3% quando comparados à testemunha (Tabela 7 - Figura 12).

Tabela 7 – Efeito do pó de canola associados à termoterapia no controle do bolor em pós-colheita de laranja Pera. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2016.

Tratamento	Ensaio I		Ensaio II	
	Diâmetro da lesão (cm)			
T	28,53	a	27,05	a
S	10,54	d	6,57	c
EAS	19,34	c	17,18	b
TT+S	12,45	d	4,35	c
TT+EAS	18,05	c	19,86	b
TT	24,09	b	19,20	b
EAS+A	17,96	c	14,80	b
EAS+I+TT	29,62	a	18,90	b

T- Testemunha; S - Sachê; EAS – Extrato aquoso simples; TT+S – Termoterapia + sachê; TT+EAS – Termoterapia + Extrato aquoso simples; TT – Termoterapia; EAS+A – Extrato aquoso simples aquecido e EAS+I+TT – Extrato aquoso simples + inoculação + Termoterapia. *Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

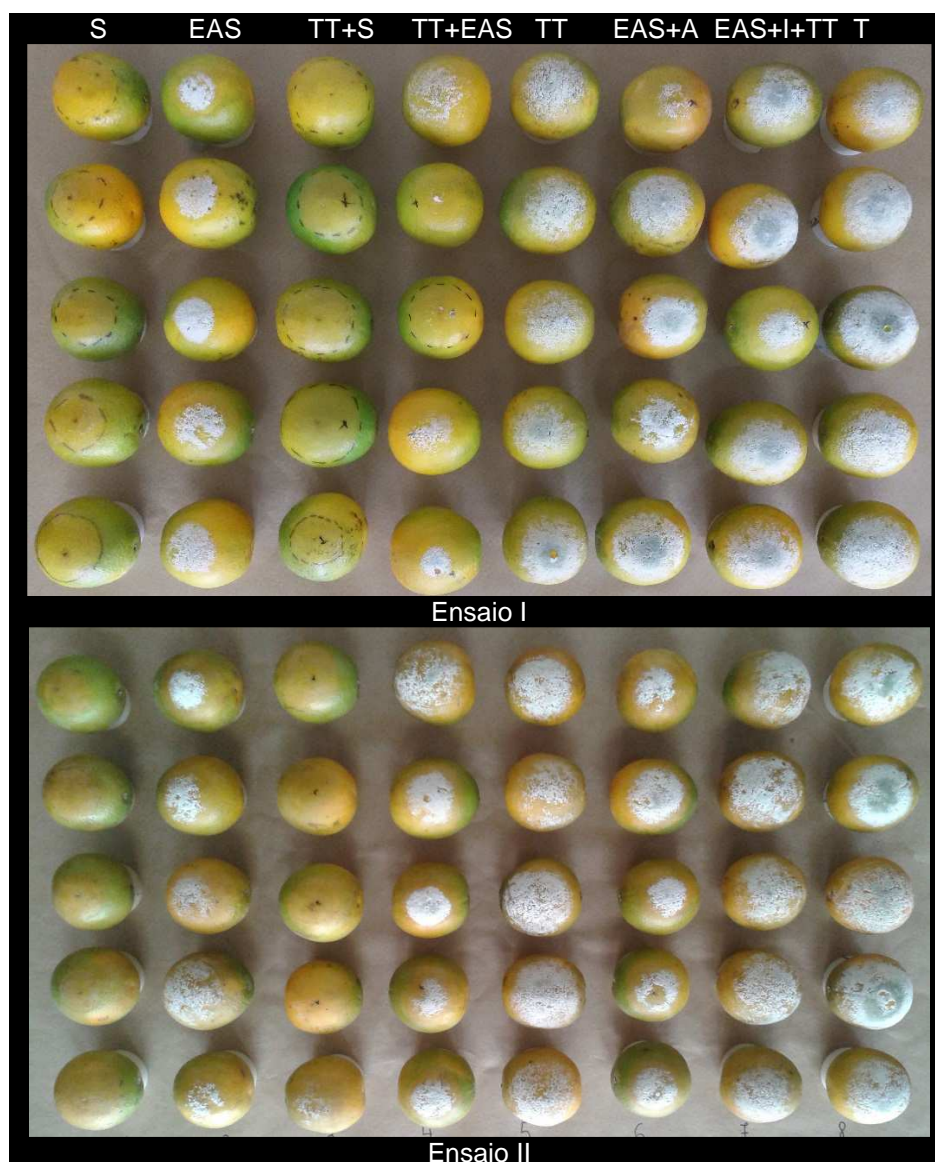


Figura 12 – Efeito do pó de canola associado à termoterapia no controle do bolor verde em pós-colheita de laranja Pera. T- Testemunha; S - Sachê; EAS – Extrato aquoso simples; TT+S – Termoterapia + sachê; TT+EAS – Termoterapia + Extrato aquoso simples; TT – Termoterapia; EAS+A – Extrato aquoso simples aquecido, EAS+I+TT – Extrato aquoso simples + inoculação + Termoterapia. UTFPR, Câmpus de Pato Branco, 2016.

No ensaio I, o controle do bolor verde nos tratamentos sachê (24 g de mostarda-da-índia) foi de 39,8%, Termoterapia + Sachê (24 g de mostarda-da-índia) 34,7%, extrato aquoso simples isolado (EAS) 24,1%, extrato aquoso simples associado à termoterapia (TT+EAS) 28,1%, extrato aquoso simples aquecido (EAS+A) 35,2% comparados à testemunha (Figura 13).

Novamente o sachê se destacou no ensaio II nos tratamentos Sachê (24 g de mostarda-da-índia) com redução de 63,9% e Termoterapia +Sachê (24 g de

mostarda-da-índia) com redução da doença de 66,4%. Os demais tratamentos não diferiram entre si e o controle do bolor verde no extrato aquoso simples isolado (EAS) foi 28,7%, extrato aquoso simples associado à termoterapia (TT+EAS) 28,1%, Termoterapia (TT), 42,6%, extrato aquoso simples aquecido (EAS+A) 46,5% e extrato aquoso simples + inoculação e termoterapia (EAS+I+TT) 36,9%, quando comparados à testemunha, conforme ilustrado na Figura 13. Exceto o tratamento térmico (TT) e o tratamento com extrato aquoso simples + inoculação do patógeno e termoterapia (EAS+I+TT) que se igualaram a testemunha no ensaio I, os resultados indicam, que os demais tratamentos diferiram ($p \leq 0,05$) da testemunha e foram eficientes na redução do bolor verde (Apêndice J – Tabela 8 – Figura 13).

Assim com base nos resultados, constituiu-se como melhores para a etapa final o tratamento com sachê artesanal de mostarda-da-índia de 24 g e extrato aquoso simples.

Tabela 8 – Efeito do pó de mostarda-da-índia associados à termoterapia no controle do bolor em pós-colheita de laranja Pera. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2016.

Tratamento	Ensaio I		Ensaio II	
	Diâmetro da lesão (cm)			
T	27,71	a	29,61	a
S	16,69	b	10,69	c
EAS	21,04	b	18,32	b
TT+S	18,10	b	9,96	c
TT+EAS	19,93	b	21,11	b
TT	22,23	a	16,99	b
EAS+A	17,96	b	15,85	b
EAS+I+TT	23,61	a	18,69	b

T - Testemunha; S - Sachê; EAS – Extrato aquoso simples; TT+S – Termoterapia + sachê; TT+EAS – Termoterapia + Extrato aquoso simples; TT – Termoterapia; EAS+A – Extrato aquoso simples aquecido e EAS+I+TT – Extrato aquoso simples + inoculação + Termoterapia. * Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

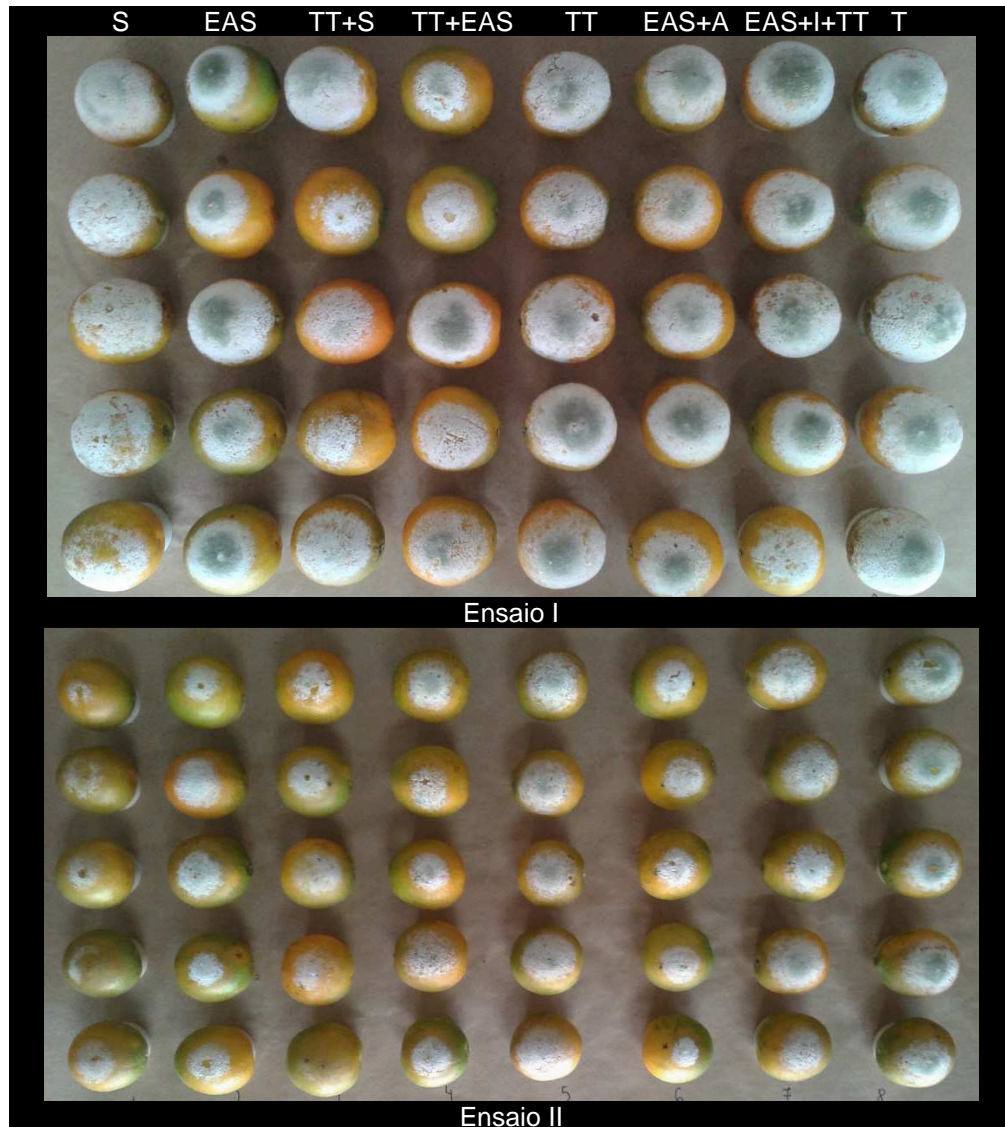


Figura 13 – Efeito do pó-de-mostarda-da-índia associado a termoterapia no controle do bolor verde em pós-colheita de laranja Pera. T- Testemunha; S - Sachê; EAS – Extrato aquoso simples; TT+S – Termoterapia + sachê; TT+EAS – Termoterapia + Extrato aquoso simples; TT – Termoterapia; EAS+A – Extrato aquoso simples aquecido, EAS+I+TT – Extrato aquoso simples + inoculação + Termoterapia. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2016.

4.2.4 Efeito de tratamentos alternativos com o pó de canola ou de mostarda-da-índia e fungicida no controle do bolor verde

Quando as estratégias de controle obtidas do pó de canola e mostarda-da-índia em sachê artesanal (S) e extrato aquoso simples (EAS) foram comparadas ao tratamento com fungicida (imazalil), observou-se que o sachê artesanal de canola e de mostarda-da-índia se destacaram como alternativa (ensaio I), igualando-se ao

tratamento químico no controle do bolor verde e produção de conídios (Tabela 9 - Apêndice K).

No ensaio I, destacou-se o tratamento com o sachê (SC) na concentração de 24 g de pó de canola que controlou 97,6 e 100% e o tratamento com o sachê (SM) na concentração de 24 g de pó de mostarda-da-índia, 65,0 e 96,5% a área da lesão e produção de conídios, respectivamente. No mesmo ensaio, o extrato aquoso simples de canola (EASC), controlou 20,3 e 51,7% e o extrato aquoso simples de mostarda-da-índia (EASM) 29,7 e 65,7% a área da lesão e produção de conídios. O fungicida, como esperado, controlou quase que completamente o bolor verde e a produção de conídios nos frutos de laranja Pera.

No ensaio II, o tratamento de 24 g de pó de canola e de 24 g de pó de mostarda-da-índia, não igualou seu controle ao fungicida, mas diferiram da testemunha em 72,4 e 72,8% e 61,3 e 60,7% no controle da área da lesão e produção de conídios, respectivamente. Todos os tratamentos diferiram da testemunha na produção de conídios, com redução significativa para esta variável. O fungicida obteve 100% de controle nas variáveis analisadas neste estudo (Figura 14).

Tabela 9 – Comparação entre o pó em sachê artesanal (g), extrato aquoso simples de canola e mostarda-da-índia, fungicida e testemunha sobre o controle da área da lesão e produção de conídios ($\times 10^5/\text{cm}^2$) causada por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja Pera. UTFPR, Câmpus de Pato Branco, 2016.

Tratamento	Ensaio I		Ensaio II	
	Diâmetro da lesão (cm)	Produção de conídios ($\times 10^5$)	Diâmetro da lesão (cm)	Produção de conídios ($\times 10^5$)
T	31,22 a	1,70 b	47,14 a	9,77 a
SC	0,73 c	0 d	12,99 d	2,65 b
SM	10,91 c	0,06 d	18,27 d	3,84 b
EASC	24,70 b	0,82 c	25,43 c	4,19 b
EASM	21,96 b	0,60 c	30,70 b	4,59 b
F	3,33 c	0 d	0,00 e	0 c

TC - Testemunha da canola; TM – Testemunha da mostarda-da-índia; SC – Sachê da canola; SM – Sachê da mostarda-da-índia; EASC – Extrato aquoso simples da canola; EASM – Extrato aquoso simples da mostarda-da-índia; F - Fungicida. * Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.



Figura 14 – Frutos de laranja Pera tratados com sachê artesanal, extrato aquoso simples de pó de canola e mostarda-da-índia e um fungicida no controle do bolor verde (TC) Testemunha canola; (TM) Testemunha mostarda; (SC) sachê canola; (SM) sachê mostarda; (EASC) extrato aquoso simples canola; (EASM) extrato aquoso simples mostarda. UTFPR, Câmpus de Pato Branco - PR, 2016.

5 DISCUSSÃO

Estudos relatando a atividade dos compostos presentes na canola e na mostarda-da-índia, no controle de patógenos pós-colheita são raros na bibliografia nacional e internacional. Sendo assim, os dados obtidos no presente trabalho utilizando canola e mostarda-da-índia no controle do bolor verde em laranja Pera são inéditos.

Os compostos voláteis obtidos das brássicas *B. napus* e *B. juncea*, em sua maior eficiência, foram capazes de reduzir o bolor verde em frutos de laranja Pera em 85,0% (canola) e 63,1% (mostarda-da-índia). Tais compostos também foram efetivos na redução no número de conídios de *P. digitatum*, atingindo 86,4 e 78,6%, respectivamente, sendo possível comparar esses resultados aos melhores controles alternativos para esse patossistema.

Neste sentido, muitos trabalhos na literatura têm comprovado a ação de métodos alternativos de controle do patógeno *P. digitatum*, incluindo, os óleos essenciais de *Citrus aurantium*, com redução superior a 94,4% (CRUZ et al., 2014); aditivos alimentares geralmente conhecidos como seguros (GRAS), a exemplo do etilparabeno de sódio, com 57,0% de controle do bolor verde (MOSCOSO-RAMÍREZ; MONTESINOS-HERRERO; PALOU, 2013); filmes bioativos contendo leveduras, com controle de mais de 73,0% em frutas inoculadas (ALLOUI et al., 2015); e extratos vegetais, como o extrato aquoso de casca de romã, que resultou na redução da infecção de *P. digitatum* em 76,0%. Além do mais, os compostos extraídos das brássicas e empregados neste trabalho, destacam-se pelo controle próximo ao alcançado pelo controle químico.

Na etapa inicial do presente estudo, nos ensaios *in vitro*, verificou-se efeito fungitóxico dos compostos voláteis liberados do pó de canola e de mostarda-da-índia na placa de Petri, em diferentes concentrações. Esse efeito foi observado pela inibição do crescimento micelial e da produção de conídios do patógeno, onde os tratamentos não tiveram contato direto com o fungo, em nenhum momento. Foi bastante evidente o efeito da maior concentração de pó de canola no crescimento micelial de *P. digitatum*, em que inibiu acima de 82,0% essa variável. O pó de mostarda-da-índia também diminuiu o crescimento do micélio em 63,7%, assim como o número de conídios nas maiores concentrações, no entanto, esse resultado não se equiparou ao controle alcançado pelo pó de canola.

Do mesmo modo que nos testes *in vitro*, as várias concentrações das brássicas foram claramente eficientes no controle da severidade do bolor verde em frutos de laranja Pera, com maiores respostas de redução para as concentrações mais elevadas, em todos os ensaios. Entretanto, nos testes *in vivo*, a mostarda-da-índia promoveu maior redução que a canola, na área da lesão causada por *P. digitatum*, diferentemente do que ocorreu nos testes *in vitro*. Nos ensaios com canola, quando os frutos foram expostos a diferentes quantidades de pó em sachês artesanais, observou-se que a lesão diminuiu em relação ao aumento da quantidade de pó utilizado.

Os dados dos ensaios comprovam a eficiência de compostos voláteis no controle pós-colheita de bolor verde. A hipótese mais provável pelos efeitos positivos se deve à ação de metabólitos secundários, uma vez que, investigações científicas têm demonstrado que os metabólitos produzidos pelas brássicas têm efeito inibitório sobre o crescimento de diversos patógenos pós-colheita (MARI; NERI; BERTOLINI, 2011). Em concordância, a redução do crescimento do micélio, produção de conídios e da doença, apresentada nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, pode estar relacionada à presença de compostos bioativos oriundos do metabolismo secundário característico à Família *Brassicaceae*, especificamente os compostos orgânicos conhecidos como glicosinolatos, que durante o processo de decomposição formam gases biocidas (MAYTON et al., 1996; MORRA; BOREK, 2010).

A ocorrência desses voláteis no pó de canola e de mostarda-da-índia, se dá por meio da atividade da enzima mirosinase, que está presente nos tecidos das brássicas, dentro dos vacúolos. A quebra do tecido em presença de água transporta a enzima até o local onde se encontram os glicosinolatos. Dessa forma inicia-se a degradação do composto orgânico e a formação de uma combinação de isotiocianatos, nitrilos, tiocianatos e oxazolidinonas em proporções variáveis de acordo com as condições em que ocorre a hidrólise e a natureza química do glicosinolato (FAHEY et al., 2001; MORRA; BOREK, 2010).

Em meio as substâncias formadas como já citado, estão os isotiocianatos (ITCs), compostos voláteis fungitóxicos (MARI et al., 2008; AL-GENDY et al., 2010; SOTELO et al., 2014; MANYES et al., 2015), visto que já tiveram seu efeito comprovado sobre diversos patógenos de pós-colheita (MARI et al., 2008; WANG et al., 2010; WU et al., 2011; UGOLINI et al., 2014; PAZOLINI et al., 2016).

Os ITCs geralmente são testados na forma química pura e isoladamente, havendo poucos relatos na literatura de resultados sobre a atividade antifúngica de brássicas, como a canola e mostarda-da-índia, no controle de patógenos pós-colheita, especialmente *P. digitatum*. Neste estudo, embora não determinados os constituintes químicos presentes nos compostos extraídos dos tecidos vegetais, em suas diferentes formas de extração, infere-se que os ITCs foram os principais responsáveis pelo controle do patógeno.

Na segunda etapa do presente estudo, quando observados os modos de preparo de extratos aquosos com pó de canola e de mostarda-da-índia em uma única concentração, sobre a redução do bolor verde, evidenciou-se que o efeito do modo de extração, foi semelhante em todos os tratamentos testados, quando comparados os extratos aquosos simples, de infusão ou maceração, com redução significativa em média de 45,0%, do bolor verde nos frutos de laranja Pera.

O mesmo efeito não foi observado em testes *in vitro*, quando os diferentes modos de preparo de extratos aquosos foram adicionados ao meio de cultivo, os quais não inibiram *P. digitatum* e, ao contrário, em alguns tratamentos estimularam o crescimento micelial do patógeno. Provavelmente quando os extratos foram inseridos no meio de cultivo, não ocorreu à volatilização dos compostos biocidas.

Entretanto, quando os mesmos extratos foram testados *in vitro*, em relação ao efeito dos compostos voláteis, observou-se novamente a inibição do patógeno, sem que este tivesse contato direto com os tratamentos. O crescimento micelial e produção de conídios foram inibidos em até 42,6 e 66,7% (canola) e 37,9 e 83,2% (mostarda-da-índia), respectivamente, evidenciando efeito da liberação de voláteis presentes na brássicas em uma forma de extração diferente que a do sachê artesanal. Resultados similares em ensaios *in vitro* foram obtidos por Pazzolini et al. (2016) quando testou os extratos aquosos na inibição de *M. fructicola*, e observou que houve redução no crescimento do micélio e na germinação de conídios quando exposto a diferentes modos de extrações do pó de canola e de mostarda-da-índia, sem que houvesse contato com o patógeno. Ainda, quando os mesmos modos de preparo de extratos foram testados no controle de podridão parda em pêssegos, o extrato aquoso simples de canola teve destaque e foi efetivo no controle da doença (PAZZOLINI et al., 2016).

Quando observado o efeito do pó das brássicas contido no sachê artesanal houve fator de inibição mais pronunciado ao fungo, em todos os ensaios. Isso pode ser um indicativo que esse modo de extração, proporcionou retirar quantidades ou até tipos diferentes de ITCs, com maior poder biocida ao *P. digitatum*.

Porém, deve-se considerar que quando os sachês foram acondicionados nas bandejas contendo os frutos de laranja Pera inoculados, o sistema imediatamente foi envolvido em sacos plásticos e fechado. Esse procedimento certamente impediu que os gases formados a partir do contato do pó com a água fossem liberados em menor quantidade para o ambiente externo. Diferentemente do preparo dos extratos aquosos, em que o processo extrativo foi realizado antes dos banhos com a aplicação direta dos extratos sobre os frutos inoculados, para posterior armazenagem em sistema fechado, em que provavelmente, no processo de manipulação causou maior perda dos voláteis ao ambiente externo.

No preparo dos extratos, o solvente extrator para ambos os tratamentos foi à água, entretanto as características distintas entre eles, no modo de preparo, podem também ter influenciado tanto na extração dos compostos qualitativos como quantitativos, e conseqüentemente, no percentual de redução do patógeno sob os diferentes modos. Na extração por infusão o pó permaneceu por vinte minutos em contato com água aquecida (temperatura de fervura), na extração por maceração o pó teve contato com água fria pelo tempo de oito horas e a extração aquosa simples foi à única preparada no momento da utilização e em temperatura aproximadamente de 23 °C a 25 °C, caracterizando-se como a forma mais fácil de preparo para a utilização e com menores perdas de compostos voláteis durante o processo extrativo. Segundo Ugolini et al. (2014), os ITCs são compostos voláteis e, portanto, diferentes quantidades destas substâncias podem ser volatilizadas durante as diferentes formas de preparo dos extratos. Desta forma, acredita-se também que, quando aplicados os tratamentos, os ITCs mais voláteis, supostamente presentes nos extratos, podem ter volatilizado para o ambiente externo com maiores perdas de compostos bioativos, durante a imersão e manipulação dos frutos até o momento do acondicionamento em sistema fechado.

Como já citado, diferentes processos extrativos, podem causar disparidade nos efeitos apresentados ao patógeno. Isso também pode ocorrer pelo

fato da toxicidade dos ITCs para os microrganismos serem dependentes da estrutura do composto, agentes patogênicos alvo do controle e efeito da composição do extrato no hospedeiro (MARI et al., 2008).

Porém, os resultados observados no estudo, também evidenciam os efeitos diferenciais da canola e da mostarda-da-índia sobre o patógeno, pressupondo existir quantidades e tipos diferentes de ITCs formados nas brássicas. Provavelmente pela diferença de seus constituintes, pois as brássicas podem formar em sua composição diferentes tipos e quantidades de ITCs, conforme as condições de hidrólise e composição química da planta (MARI et al., 2008).

Além do mais, a eficiência comprovada dos produtos voláteis tóxicos pode estar relacionada à conversão efetiva dos glicosinolatos para isotiocianatos, que especificamente, pode variar de 10 a 60% dependendo não só da estrutura química, mas também das condições ambientais em que as brássicas são produzidas (ISHIDA et al., 2012a). Deve-se levar ainda em consideração que os extratos podem conter outras substâncias além dos ITCs, tais como nitrilas e tiocianatos, que podem interagir na sensibilidade do patossistema, já que, não foi realizada uma caracterização química específica dos compostos testados neste estudo. Ainda, os teores de glicosinolatos, conseqüentemente, ITCs na brássicas, são influenciados por fatores ambientais como o solo, clima e condições de cultivo, incluindo fertilização e tempo de colheita, além da composição da planta, como já foi citado. Resultados de outras investigações justificam a informação citada quando mostram que os níveis de glicosinolatos em *B. napus* foram elevados por ferimentos, jasmonato de metilo e infecção por fungos. Alguns resultados interessantes foram obtidos para a relação entre o estresse de alta temperatura e a síntese de glicosinolatos, isto porque a exposição dos vegetais de *Brassicaceae* a altas temperaturas é conhecida por aumentar o teor de glicosinolato alifático (PEREIRA et al., 2002).

Ainda, com relação aos modos de preparo dos extratos aquosos, foi observado claramente, que o extrato aquoso simples e a infusão onde, a principal diferença está na temperatura da água misturada ao pó de canola ou de mostarda-da-índia, não diferiram no efeito na inibição do patógeno *P. digitatum*. Assim também ficou evidenciado no estudo de Toubá et al. (2012) em que a eficiência da temperatura do solvente extrator utilizado nos tratamentos com extratos brutos de sete especiarias, quais sejam, cardamomo, pimentão, coentro, cebola, alho,

gingibre e galanga preparados a partir da extração com água fria e água aquecida (infusão) e seus efeitos antifúngicos foram testados no controle de três patógenos *Roselle*, ou seja: *Phoma exigua*, *Fusarium nygamai* e *Rhizoctonia solani*. Todas as especiarias apresentaram significativa atividade antifúngica em concentrações de até 30% do extrato bruto, em ensaios *in vitro*, no entanto, a extração com água fria foi mais efetiva do que a extração com água quente no controle dos patógenos (TOUBA et al., 2012). Além do que já foi pontuado, ressalta-se que os efeitos dos princípios ativos presentes nas plantas são influenciados por muitos fatores que incluem a idade da planta, o solvente de extração, o método de extração e o tempo de colheita dos materiais vegetais (OKIGBO; OGBONNAYA, 2006).

O controle apresentado, principalmente pelo sachê artesanal, está claramente embasado nos efeitos dos voláteis liberados pelas brássicas. Esse efeito manifestou-se mais acentuado nas concentrações mais elevadas, tanto para a canola como para a mostarda-da-índia, com a maior inibição do patógeno *P. digitatum*, confirmado nos testes *in vivo* com a concordância dos testes *in vitro*.

Característica semelhante para outro patógeno do gênero *Penicillium* foi observada sobre a eficiência do mesmo ITCs, obtido de diferentes substâncias, em ensaios realizados para avaliar a fungitoxicidade em diferentes concentrações (entre 3 e 5 mg L⁻¹) no controle de bolor azul em frutos de pera. Os resultados foram satisfatórios para a exposição dos frutos em atmosfera enriquecida em AITC, confirmando *in vivo* os resultados de testes anteriores realizados *in vitro* (MARI et al., 1993). O AITC sintético (5mg.L⁻¹), proporcionou o melhor controle da doença, em frutos inoculados com 10⁴ conídios mL⁻¹. O AITC produzido por hidrólise enzimática da sinigrina mostrou-se igualmente eficaz ao AITC sintético. No entanto, o tratamento com AITC produzido a partir do pó de *B. juncea* foi menos eficaz ao patógeno (57%), em comparação com o controle (93%), provavelmente como consequência da interação de proteínas do pó com AITC, o que pode reduzir a concentração de AITC abaixo do esperado com base no teor de sinigrina do conteúdo (MARI et al., 2002).

Haja vista que no estudo com canola e mostarda-da-índia no controle do bolor verde os ensaios foram realizados com pó das brássicas, a interação de proteínas citada por Mari et al. (2002) também pode ter ocorrido nos tratamentos em sachê artesanal, impedindo maior supressão da doença quando comparado ao fungicida sintético. Além disso, esse fato pode estar relacionado às características

de volatilidade, reatividade e estabilidade de cada ITC, já que esses compostos são fortes reagentes eletrofílicos e podem reagir facilmente com nucleófilos, como aminas, aminoácidos, álcoois, água e sulfitos durante o tratamento e sob condições fisiológicas (MORIMITSU et al., 2002).

Dentre os tratamentos avaliados para a canola e mostarda-da-índia, neste estudo, mesmo que os melhores resultados tenham sido obtidos com o pó das brássicas no sachê artesanal, a utilização dos extratos não deve ser descartada, pois quando aplicados em frutos de laranja Pera, também reduziram a doença. Visto que a aplicação de extratos pode ser mais apropriada para estabelecimentos como packinghouses. Em outros patossistemas os extratos aquosos foram eficientes como no caso do estudo de Pazzolini et al. (2016), em que o extrato aquoso simples controlou *M. frutícola*. No entanto, para esse mesmo patossistema o método com sachê artesanal, não controlou a doença (dados não publicados).

Supõe-se que o controle mais elevado nos tratamentos poderia ter sido alcançado em testes com densidades menores de inóculo. Nos ensaios com *P. digitatum* em laranjas Pera, a concentração do inóculo foi de 10^6 conídios.mL⁻¹, portanto, deduz-se que as quantidades de inóculo em pós-colheita, desde o campo, armazenamento e comercialização dos frutos nem sempre são tão elevadas como a utilizada em tais ensaios. Mari et al. (2002) em suas investigações observou que o aumento na concentração do inóculo de *P. expansum* a uma concentração constante de AITC, resultou em aumento da incidência da doença. Em frutos inoculados com maior concentração de *P. expansum* (10^6 conídios.mL⁻¹) e tratados com 5 mg.L⁻¹ de AITC, as lesões foram reduzidas em apenas 20% em relação ao controle, sendo que quando a concentração do inóculo foi 10^4 conídios.mL⁻¹, a *B. Juncea* atestou controle de até 57%.

Sendo assim, quando os frutos contiverem quantidades naturais de inóculo, o sachê ou os extratos aquosos poderão mostrar-se mais eficientes no controle do bolor verde, ocorrendo à redução na infecção e no acúmulo de inóculo, evitando a proliferação do patógeno. Já que neste estudo, as condições laboratoriais durante a condução dos experimentos, foram ideais para o desenvolvimento da doença em temperatura e umidade, além da alta concentração de inóculo, o que pode não ocorrer num ambiente natural, onde nem sempre as condições serão tão favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, contribuindo para o controle da doença por métodos alternativos, como o apresentado neste estudo.

A eficiência dos compostos voláteis das brássicas, em tese, poderia ser intensificada com a associação a termoterapia. No entanto, a inclusão deste método físico de controle quando associada às brássicas, não teve efeito adicional no controle do bolor verde (Tabela 5). Ou seja, a atuação das temperaturas altas afetando o metabolismo do patógeno não foi suficiente para deixá-lo mais vulnerável à ação dos voláteis biocidas liberados pelas brássicas. Por outro lado a termoterapia é uma alternativa que pode ser utilizada como método já consagrado para diversos fungos, entre eles *Penicillium ssp.* e *Monilinia ssp.* (LIU et al., 2012; FORNER et al., 2013; SPADONI et al., 2014), mas que não superou a utilização das brássicas em questão.

A eficiência do sachê também foi evidenciada na comparação com o controle obtido pelo fungicida que embora não se igualaram nos dois ensaios, mas foram muito próximos. Além do que, o uso dos fungicidas está cada vez mais restrito pelos problemas ambientais, de saúde e de resistência do patógeno.

Além da redução na área da lesão, foi possível observar nos tratamentos com pó das brássicas, que mesmo quando ocorreu o desenvolvimento micelial na superfície do fruto, a produção de conídios foi significativamente reduzida, mostrando uma inibição bem sucedida na esporulação, sugerindo que os isotiocinatos liberados pela canola e mostarda-da-índia apresentam potencial mecanismo de ação como tratamento alternativo ao bolor verde. Uma atividade anti-esporulante é essencial para controlar o número de esporos que se disseminam das frutas infectadas para as outras saudáveis na mesma embalagem ou meio. Dessa forma um tratamento imediatamente antes ou logo após a colheita poderia ser útil para reduzir as infecções nos frutos durante os estágios críticos de colheita e acondicionamento em que os patógenos fúngicos podem penetrar através de ferimentos e estabelecer infecções (TAYEL et al., 2009; IPPOLITO et al., 1997).

A canola com maior destaque e a mostarda-da-índia se adequam ao conceito de agricultura sustentável, pois são produtos vegetais que podem ser produzidos, processados e utilizados na pequena propriedade pelo agricultor. A bioatividade dos compostos voláteis na fase de vapor os torna úteis como possíveis fumigantes de origem orgânica, com pressão de evaporação favorável para proteção dos frutos de laranja Pera contra o bolor verde. Esse mesmo método de controle, em especial, a utilização do pó de canola em sachê, poderá ser promissor em outros patossistemas de frutos pós-colheita, onde os produtos são comercializados em

embalagens fechadas. No entanto, deve-se levar em consideração que o efeito dos compostos das brássicas não é igual para todos os patógenos e por isso devem ser previamente testados.

Por fim, os resultados relatados confirmam a possibilidade de reduzir a incidência de bolor verde em pós-colheita de citros com voláteis baseados em ITCs tornando este tratamento promissor para a produção de frutas tradicionais e orgânicas.

6 CONCLUSÕES

Entre as concentrações de pó das brássicas testadas em sachê artesanal, a canola na maior concentração obteve destaque, no entanto o pó de mostarda-da-índia, também apresentou eficiência no controle de bolor verde, em pós-colheita.

A eficiência dos extratos aquosos no controle do bolor verde não se compara ao sachê artesanal, no entanto o extrato aquoso simples obtido do pó das brássicas pode ser aplicado a frutos de laranja Pera com maior facilidade.

O efeito da termoterapia em suas combinações não influenciou no controle do fitopatógeno

Os compostos voláteis liberados pelas brássicas em sachê artesanal, principalmente de canola, apresentaram controle semelhante ao do fungicida na esporulação de *P. digitatum* e área lesionada em laranjas Pera.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo apresentou uma técnica alternativa eficiente no controle de patógenos pós-colheita, especificamente para o bolor verde em laranjas Pera. As formas de extração dos compostos voláteis das brássicas podem ser aplicadas desde em pequenas propriedades, como estratégia eficiente de manejo da doença, com fácil obtenção e custo reduzido.

No entanto, é necessário um trabalho adicional no que diz respeito às aplicações em diferentes cultivares, bem como estágio de maturação e características de diferentes temperaturas de armazenamento de frutos cítricos, assim como identificação dos compostos presentes nas brássicas e quais partes do vegetal contêm maior produção de ITCs.

Embora o presente estudo indique que existe potencial para a utilização desses compostos vegetais alternativos, são necessários mais estudos para examinar o mecanismo de ação e os possíveis efeitos no patógeno estudado, assim como associar esses tratamentos a certos compostos que podem atuar sinergicamente para aumentar a inibição do desenvolvimento da doença.

É também necessário investigar mais os métodos de distribuição para estratégias de utilização eficazes, incluindo a aplicação por aspersão durante o manuseamento pós-colheita ou a sua aplicação como fumigante em instalações de armazenamento. Também, pela eficiência demonstrada no controle do patógeno *P. digitatum*, sugere-se que a metodologia seja estudada em outros patossistemas de pós-colheita.

REFERÊNCIAS

AL-GENDY, A.A.; EL-GINDI, O.D.; HAFEZ, AL.S.; ATEYA, A.M. Glucosinolates, volatile constituents and biological activities of *Erysimum corinthium* Boiss. (Brassicaceae). **Food Chemistry**, v. 118, p. 519-24, 2010.

ALOUI, H.; LICCIARDELLO, F.; KHWALDIA, K.; HAMDY, M.; RESTUCCIA, C. Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. **International Journal Food Microbiology**, v. 200, p. 22-30, 2015.

BARKAI-GOLAN, R. In: **Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control**. Amsterdam, Netherlands: Edited by Elsevier Science, 2001.

BARKAI-GOLAN, R.; PHILLIPS, D.J. Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control. **Plant Disease**, v. 75, p. 1085-9, 1991.

BAUTISTA-BAÑOS, S. **Postharvest decay: control strategies**. London: Elsevier, 2014.

BENDING, G. D.; LINCOLN, S. D. Characterization of volatile sulphur-containing compounds produced during decomposition of *Brassica juncea* tissues in soil. **Soil Biology Biochemical**, v. 31, p. 695-703, 1999.

BEN-YEHOSHUA, S.; PORAT, R. Heat treatments to reduce decay. In: BEN-YEHOSHUA, S. (Ed) **Environmentally friendly technologies for agricultural produce quality**. Boca Raton, FL: CRC Press – Taylor and Francis Group, 2005.p.11-42.

BLOK, W. J.; LAMERS, J. G.; TERMORSHUIZEN A. J.; BOLLEN, G. J. Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. **Phytopathology**, v. 90, p. 253-9, 2000.

BONES, A. M.; ROSSITER, J. T. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. **Phytochemistry**, n. 67, p. 1053-67, 2006.

BJÖRKMAN, M.; KLINGEN, I.; BIRCH, A. N. E.; BONES, A. M.; BRUCE, T. J. A.; JOHANSEN, T. J. et al. Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health – Influences of climate, environment and agronomic practice. **Phytochemistry**, n. 72, p. 538-56, 2011.

BOREK, V.; MORRA, M. J.; BROWN, P. D.; McCAFFREY, J. P. Transformation of the glucosinolate-derived allelochemicals allyl isothiocyanate and allyl nitrile in soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1935-40, 1995.

BROWN, P. D.; MORRA, M. J. Control of soil-borne plant pest using glucosinolate-containing plants. **Advancing Agronomy**, v. 61, p. 167-231, 1997.

BURON-MOLES, G.; LÓPEZ-PÉREZ, M.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.; VIÑAS, I.; TEIXIDÓ, N.; USALL, J. et al. Use of GFP-tagged strains of *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum* to study host-pathogen interactions in oranges and apples. **International Journal of Food Microbiology**, n. 160, p. 162-70, 2012.

CABRAL, L. D. C.; PINTO, V. F.; PATRIARCA, A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. **Int. J. Food Microbiol.**, n. 166, p.1-14, 2013.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrob Agents Chemother**, n. 46, p. 1914-20, 2002.

CASALS, C.; TEIXIDÓ, N.; VINAS, I.; SILVERA, E.; LAMARCA, N.; USALL, J. Combination of hot water, *Bacillus subtilis* CPA-8 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest brown rot on peaches and nectarines. **Eur. J. Plant Pathol.**, v. 128, p. 51-63, 2010.

CASTRO, I. M.; ANJOS, M. R.; OLIVEIRA, E. S. Determinação de isotiocianato de benzila em *Carica papaya* utilizando cromatografia gasosa com detectores seletivos. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p.1953-9, 2008.

CHEN, H.; GAO, H.; FANG, X.; YE, L.; ZHOU, Y. Effects of allyl isothiocyanate treatment on postharvest quality and the activities of antioxidant enzymes of mulberry fruit. **Postharvest Biol. Technol.**, n. 108, p. 61-7, 2015.

CITRUSBR - ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS EXPORTADORES DE SUCOS CÍTRICOS. **A cadeia produtiva do suco de laranja**. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/>> Acesso em: 9 fev. 2015.

COHEN, M. F.; YAMASAKI H.; MAZZOLA, M. *Brassica napus* seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of *Rhizoctonia* root rot. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 1215-27, 2005.

COOLS, K.; TERRY, L. A. Comparative study between extraction techniques and column separation for the quantification of sinigrin and total isothiocyanates in mustard seed. **Journal of Chromatography B**, v. 901, p. 115-8, 2012.

CRUZ, M. E. S.; ESTRADA, K. R. F. S.; CLEMENTE, E.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. J. S. Effect of alternative products against green mold in postharvest of oranges. **International Journal of Sciences**, v. 4, p. 96-101, january 2014.

D'AQUINO, S.; ANGIANI, A.; SUMING, D.; PALMA, A.; SCHIRRA, M. Residue levels, persistence and effectiveness of imazalil against a resistant strain of *Penicillium digitatum* when applied in combination with heat and sodium bicarbonate. **Commun. Appl. Biol. Sci. Ghent Univ.**, v. 78, n. 2, p. 139-149, 2013.

D'AQUINO, S.; DAIB, S.; DENG, Z.; GENTILE, A.; ANGIANI, A.; PAUE, L. et al. A sequential treatment with sodium hypochlorite and a reduced dose of imazalil heated at 50 °C effectively control decay of individually film-wrapped lemons stored at 20 °C. **Postharvest Biology and Technology**, n. 124, p. 75–84, 2017.

DHINGRA, O. D.; COSTA, M. L. N.; SILVA, G. J.; MIZUBUTI, E. S. G. Essential oil of mustard to control *Rhizoctonia solani* causing seedling damping off and seedling blight in nursery. **Fitopatologia brasileira**, v. 29, p. 683-6, 2004.

DROBNICA, L. Antifungal Activity of isothiocyanates and related compounds I. Naturally occurring isothiocyanates and their analogues. **Applied Microbiology**, v.15, n. 4, p. 701, 1967.

DROBY, S.; EICK, A.; MACARISIN, D.; COHEN, L.; RAFAEL, G.; STANGE, R. et al. Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **Postharvest Biology and Technology**, n. 49, p. 386-96, 2008.

DROBY, S.; LISCHINSKI, S.; COHEN, L.; WEISS, B.; DAUS, A.; CHAND-GOYAL, T. et al. Characterization of an epiphytic yeast population of grapefruit capable of suppression of green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. **Biological Control**, n. 16, p. 27-34, 1999.

DUAN, X.; JING, G.; FAN, F.; TAO, N. Control of postharvest green and blue molds of citrus fruit by application of sodium dehydroacetate. **Postharvest Biology and Technology**, n.113, p.17-9, 2016.

ECKERT, J. W.; BROWN, G. E. 1986. Evaluation of postharvest fungicide treatments for citrus fruits. In: HICKEY, K. D. (Ed.) **Methods for evaluating pesticides for control of plant pathogens**. St Paul, MN, USA: APS Press, 1986.p.92–7.

ECKERT, J. W.; EAKS, I. L. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. In: REUTER, W.; CALAVAN, E. C.; CARMAN, G. E. (editors). **The citrus industry**. Berkeley, CA, USA: University of California Press, v. 5, p. 179–260, 1989.

ELBOUCHTAOUI, M. C.; HASSANI, L. M.; ELMOUSADIK, A.; SALGHI R. Disinfection of Citrus Storage Room by Fumigation with Two Plants and Chemical

Product Deccoferato Pot against the Viability of *Penicillium* Spp Spores. **Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n. 5 (Version 7), p.26-30, 2014.

ERASMUS, A.; LENNOX, C. L.; KORSTEN, L.; LESA, K.; FOURIE, P. H. Imazalil resistance in *Penicillium digitatum* and *P. italicum* causing citrus postharvest green and blue mould: Impact and options. **Postharvest Biology and Technology**, v.107, p. 66-76, 2015a.

ERASMUS, A.; LENNOX, c. l.; NJOMBOLWANA, N. S.; LESAR, K.; FOURIE, P. H. Curative control of citrus green mould by imazalil as influenced by infection age, wound size, fruit exposure time, solution pH and fruit brushing after treatment. **Postharvest Biology and Technology**, n. 101, 26–36, 2015b.

FAHEY, J. W.; ZALCMANN, A. T.; TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 5-51, 2001.

FALLIK, E. Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, n. 2, p. 125-34, 2004.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JÚNIOR, J. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agrônoma Ceres, v. 2, cap. 28, p. 239-69, 2005.

FENWICK, G. R.; HEANEY, R. K.; MULLIN, W. J. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n. 18, p. 123-201, 1983.

FISCHER, I. H.; FERREIRA, M. D.; SPOSITO, M. B.; AMORIM, L. Citrus postharvest diseases and injuries related to impact on packing lines. **Scientia Agricola**, v. 66, p. 210-17, 2009a.

FISCHER, I. H.; PALHARINI, M. C. A.; SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L. Doenças pós-colheita em laranja 'Pêra' produzida em sistema orgânico e convencional e resistência de *Penicillium digitatum* a fungicidas. **Summa Phytopathologica**, v.39, n. 1, p. 28-34, 2013.

FORNER, C.; BETTIOL, W.; NASCIMENTO, L. M; TERAQ, D. Controle em pós-colheita de *Penicillium digitatum* em laranja-pera com microrganismos e tratamento térmico. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 35, n. 1, p. 23-31, 2013.

GATTO, M. A.; IPPOLITO, A.; LINSALATA, V.; CASCARANO, N. A.; NIGRO, F.; VANADIA, S. et al. Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. **Postharvest Biol. Technol.**, n. 61, p.72–82, 2011.

GIMSING, A. L.; KIRKEGAARD, J. A. Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of *Brassica* biofumigants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 8, p. 2255-64, 2006.

GREEN, M. F. The infection of oranges by penicillium. **Journal of Pomology and Horticultural Science**, v. 10, n. 3, p.184-211, 1932.

INDEX FUNGORUM. **Táxons fúngicos.** Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>>. Acesso em: 14 abr. 2017.

IPPOLITO, A.; NIGRO, F.; LIMA, G.; LATTANZIO, V.; Di VENERE, D.; LINSALATA, V. Mechanisms of resistance to *Botrytis cinerea* in wounds of cured kiwifruit. **Acta Horticulturae**, n. 444, p. 719-24, june 1997.

ISHIDA, M.; HARA, M.; FUKINO, N.; KAKIZAKI) T.; MORIMITSU, Y. Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. **Breeding Science**, n. 64, p. 48-59, 2014.

KARABULUT, O.A.; COHEN, L.; WIESS, B.; DAUS, A.; LURIE, S.; DROBY, S. Control of brown rot and blue mold of peach and nectarine by short hot water brushing and yeast an-tagonists. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, n. 2, p. 103-11, 2002.

KARAOGLANIDIS, G. S.; MARKOGLU, A. N.; BARDAS, G. A.; DOUKAS, E. G.; KONSTANTINO, S.; KALAMPOKIS, J. F. Sensitivity of *Penicillium expansum* field isolates to tebuconazole, iprodione, fludioxonil and cyprodinil and characterization of fitness parameters and patulin production. **International Journal of Food Microbiology**, n. 145, p. 195-204, 2011.

KELLERMAN, M.; JOUBERT, J.; ERASMUS, A.; FOURIE, P. H. The effect of temperature, exposure time and pH on imazalil residue loading and green mould control on citrus through dip application. **Postharvest Biology and Technology**, n. 121, p. 159-64, 2016.

KIRKEGAARD, J.A.; SARWAR, M. Biofumigation potential of brassicas. I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brássicas. **Plant Soil**, v. 201, p. 71-89, 1998.

KIRKEGAARD, J. A.; SARWAR, M. Biofumigation potential of brassicas - I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. **Plant Soil**, v. 201, p. 71-89, 1998.

KJAER, A. Glucosinolates in the cruciferae. In: VAUGHAN, J. G.; MACLEOD, A. J.; JONES, B. M. G. (Eds.) **The biology and chemistry of the cruciferae**. London: Academic Press, 1976.p 207-19.

LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; COLLETA FILHO, H. D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Eds.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; FUNDAG, cap. 18, 2005.p.509-66.

LIU, J.; SUJ, Y.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; TIAN, S.; NORELLI, J.; HERSHKOVITZ, V. Effect of heat treatment on inhibition of *Monilinia fructicola* and induction of disease resistance in peach fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 65, p. 61-8, 2012.

LeCOZ, C. J.; DUCOMBS, G. Plants and plant products. In: FROSCHE, P. J.; MENNE, T.; LEPOTTEVIN, J. P. (eds.) **Contact dermatitis**. 4th ed. Berlin-Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 2006.p.751-800.

MARI, M.; IORI, R.; LEONI, O.; MARCHI, A. Bioassay of glucosinolates-derived isothiocyanates against postharvest pest pathogens. **Plant Pathol**, n. 45, p. 753-60, 1996.

MARI, M.; IORI, R.; LEONI, O.; MARCHI, A. In vitro activity of glucosinolate-derived isothiocyanates against postharvest fruit pathogens. **Annals of Applied Biology**, n. 123, p. 155-64, 1993.

MARI, M.; NERI, F.; BERTOLINI, P. Fruit postharvest disease control by plant bioactive compounds. In: RAI, M.; CHIKINDAS, M. (editors). **Natural antimicrobials in food safety and quality**. Cambridge, USA: CABI, 2011.p.242-260.

MARI, M.; LEONI, O.; IORI, R.; CEMBALI, T. Antifungal vapour-phase activity of allyl-isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. **Plant Pathology**, n. 51, p. 231-6, 2002.

MARI, M.; TORRES, R.; CASALINI, L.; LAMARCA, N.; MANDRIN, J. F.; LICHOU, J. Control of post-harvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 1271-7, 2007.

MARI, M.; LEONI, O.; BERNARDI, R.; NERI, F.; PALMIERI, S. Control of brown rot on stonefruit by synthetic and glucosinolate-derived isothiocyanates. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, p. 61-7, 2008.

MATTHIESSEN, J. N.; WARTON, B.; SHACKLETON, M. A. The importance of plant maceration and water addition in achieving high *Brassica*-derived isothiocyanate levels in soil. **Agroindustria**, v. 3, p. 277-80, 2004.

MATTHIESSEN, J. N.; KIRKEGAARD, J. A. Biofumigation and enhanced biodegradation: opportunity and challenge in soilborne pest and disease management. **Critical Reviews of Plant Science**, v. 25, p. 235-65, 2006.

MANYES, L.; LUCIANO, F. B.; MAYNES, J.; MECA, G. In vitro antifungal activity of allyl isothiocyanate (AITC) against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum* and evaluation of the AITC estimated daily intake. **Food and Chemical Toxicology**, n. 83, p. 293-99, 2015.

MAYTON, H. S.; OLIVER, C.; VAUGHN, S. V.; LOIRA, R. Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. **Phytopathology**, v. 86, p. 267-71, 1996.

MEDEIROS, E. A. A.; SOARES, N. F. F.; POLITO, T. O. S.; SOUSA, M. M.; SILVA, D. F. P. Sachês antimicrobianos em pós-colheita de manga. **Rev. Bras. Frutic.**, v. esp.E., p. 363-70, out. 2011.

MITHEN, R. F. Glucosinolates and their degradation products. **Advances in Botanical Research**, v. 35, p. 213-62, 2001.

MITHEN, R. F.; DEKKER, M.; VERKERK, R.; RABOT, S.; JOHNSON, I.T. The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 80, p. 967-84, 2000.

MOHAMMADI, A.; NAZARI, K.; IMANI, S.; AMROLLAHI, H. Antifungal activities and chemical composition of some medicinal plants. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 24, p. e1-e8, 2014.

MOJTAHEDI, H.; SANTO, G. S.; WILSON, J. H.; HANG, A. N. Managing *Meloidogyne chitwoodi* on potato with rapeseed as green manure. **Plant Disease**, v. 77, p. 42-6, 1993.

MORIMITSU, Y.; NAKAGAWA, K.; HAYASHI, H.; FUJII, T.; KUMAGAI, Y.; NAKAMURA, T. et al. A sulforaphane analog that potently activates the Nrf2-dependent detoxification pathway. **J. Biol. Chem.**, n. 277, p. 3456-63, 2002.

MORRA, M. J.; BOREK, V. Glucosinolate preservation in stored Brassicaceae seed meals. **Journal of Stored Products Research**, v. 46, p. 98-102, 2010.

MOSCOSO-RAMÍREZ, P. A.; MONTESINOS-HERRERO, C.; PALOU, L. Control of citrus postharvest penicillium molds with sodium ethylparaben. **Crop Protection**, n. 46, p. 44-51, 2013.

MOTISI, N.; MONTFORT, F.; FALOYA, V.; LUCAS, P.; DORÉ, T. *Growing Brassica juncea* as a cover crop, then incorporating its residues provide complementary control of *Rhizoctonia* root rot of sugar beet **Field Crops Research**, v. 113, p. 238-45, 2009.

MUÑOZ, A.; LÓPEZ-GARCÍA, B.; VEYRAT, A.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.; MARCOS, J. F. Comparative analysis of the sensitivity to distinct antimicrobials

among *Penicillium* spp. causing fruit postharvest decay. **Phytopathol. Mediterr.**, n. 50, p. 392-407, 2011.

NARAYANASAMY, P. (ed.) **Postharvest pathogens and disease management**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006.

NICOLA, G. R.; BAGATTA, M.; PAGNOTTA, E.; ANGELINO, D.; GENNARI, L.; NINFALI P. et al. Comparison of bioactive phytochemical content and release of sothiocyanates in selected brassica sprouts. **Food Chemistry**, v. 141, p. 297–303, 2013.

NICOSIA, M. G. L. D.; PANGALLO, S.; RAPHAEL, G.; ROMEO, F. V.; STRANO, M. C.; RAPISARDA, P. et al. Control of postharvest fungal rots on citrus fruit and sweet cherries using a pomegranate peel extract. **Postharvest Biology and Technology**, v. 114, p. 54–61, 2016.

NJOMBOLWANA, N. S.; ERASMUS, A.; FOURIE, P. H. Evaluation of curative and protective control of *Penicillium digitatum* following imazalil application in wax coating. **Postharvest Biology and Technology**, n. 77, p. 102-10, 2013.

NUNES, C. A. Biological control of postharvest diseases of fruit. **European Journal of Plant Pathology**, v. 133, n. 1, p. 181-96, may 2012.

OERLEMANS, K.; BARRETT, D. M.; SUADES, C. B.; VERKERK, R.; DEKKER, M. Thermal degradation of glucosinolates in red cabbage. **Food Chemistry**, n. 95, p. 19-29, 2006.

OKIGBO, R. N.; OGBONNAYA, U. O. Antifungal effects of two tropical plant leaf extracts (*Ocimum gratissimum* and *Aframomum melegueta*) on postharvest yam (*Dioscorea* spp.) rot. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 9, p. 727-31, 2006.

PALOU, L.; SMILANICK, J. L.; USALL, J.; VIÑAS, I. Control of postharvest blue and Green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate, **Plant Disease**, v. 85, p. 371-6, 2001.

PALOU, L. *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green mold, Blue mold). In: **Postharvest decay: control strategies**, Cap. 2. London, UK: Academic Press, Elsevier Inc., 2014.p.45-102.

PALOU, L. Control of citrus postharvest diseases by physical means. **Tree Forestry Sci. Biotechnol.**, n. 3, p. 127-42, 2009.

PALOU, L.; SMILANICK, J. L.; DROBY, S. Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. **Stewart Postharvest Review**, n. 2, p. 1-16, april 2008.

PALOU, L.; USALL, J.; MUÑOZ, J. A.; SMILANICK, J. L.; VIÑAS, I. Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. **Postharvest Biol. Technol.**, n. 24, p. 93-6, 2002a.

PALOU, L.; SMILANICK, J. L.; USALL, J.; VIÑAS, I. Control of Postharvest Blue and Green Molds of Oranges by Hot Water, Sodium Carbonate, and Sodium Bicarbonate. **The American Phytopathological Society**, v.85, n.4, p. 371-6, april 2001.

PAZZOLINI, K. et al. The use of brassica extracts and thermotherapy for the postharvest control of brown rot in peach. **Scientia Horticulturae**, n. 209, p. 41-6, 2016.

PEREIRA, F. M. V.; ROSA, E.; FAHEY, J. W.; STEPHENSON, K. K.; CARVALHO, R.; AIRES, A. Influence of temperature and ontogeny on the levels of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) sprouts and their effect on the induction of mammalian phase 2 enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 50, p. 6239-44, 2002.

PIVA, C. A. G. **Extratos de canola e própolis no controle de oídio em pepineiro**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Pato Branco: Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, 2013.

PLAZA, P.; USALL, J.; TEIXIDO, N.; VIÑAS, I. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common postharvest citrus fungi. **International Journal of Food Microbiology**, n. 90, p. 75-82, 2004.

POTTER, M. J.; DAVIES, K.; RATHJEN, A. J. Suppressive impact of glucosinolates in Brassica vegetative tissues on root lesion nematode *Pratylenchus neglectus*. **Journal Chemical Ecology**, v. 24, p. 67-80, 1998.

PUAWONGPHAT, P.; NIAMJANG, S.; SANCHOTE, S. Control of green mold (*Penicillium digitatum*) on tangerine fruit by hot water and imazalil treatment and with antagonistic yeasts. **Acta Hort.**, n. 773, p. 39-44, 2008.

ROSA, E. A. S.; HEANEY, R. K.; FENWICK G. R.; PORTAS, C. A. M. Glucosinolates in crop plants. **Hortic. Rev.**, n.19, p. 99-125, 1997.

RUMBERGER, A; MARSCHNER, P. 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rhizosphere of canola. **Soil Biology Biochemical**, v. 35, p. 445-52, 2003.

SACCARDO, P. A. *Penicillium digitatum*. **Fungi Italici Autographice Delineati**. Fascs 17-28, tabs 641-1120, n. 894, 1881.

SARWAR, M.; KIRKEGAARD, J. A.; WONG, P. T. W.; DESMARCHELIER, J. M. Biofumigation potential of brassicas. III. *In vitro* toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens. **Plant Soil**, v. 201, p. 103-112, 1998.

SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. **Biological Control**, n.50, p. 205-21, 2009.

SHARMA, A.; RAI, P. K.; PRASAD, S. GC-MS detection and determination of major volatile compounds in *Brassica juncea* L. leaves and seeds. **Microchemical Journal**, 2018.

SILVA, M. B.; COSTA, A. S. V.; RUFINI, J. C. M.; GALVÃO, E. R.; ZAMBOLIM, L. Tratamento térmico e prochloraz no controle da antracnose em pós-colheita de frutos de banana 'Prata Anã'. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.4, p. 364-5, 2008.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal Agricultural Research**, v. 11, n, 39, p. 3733-40, 2016.

SISQUELLA, M.; CASALS, C.; VINAS, I.; TEXEIDÓ, N.; USALL, J. Combination of peracetic acid and hot water treatment to control postharvest brown rot on peaches and nectarines. **Postharvest Biology and Technology**, v. 83, p. 1-8, 2013.

SMILANICK, J. L.; MANSOUR, M. F.; MLIKOTA-GABLER, F.; SORENSON, D. Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. **Postharvest Biol. Technol.**, n. 47, p. 226-38, 2008.

SMILANIK, J. L.; MANSOUR, M. F.; MARGOSAN, D. A.; MIKOTA-GABLER, F.; GOODWINE, W. R. Influence of pH and NaHCO₃ on the effectiveness of imazalil to inhibit germination or spores of *Penicillium digitatum* and to control green mold on citrus fruit. *Plant Disease*, **Saint Paul**, v.89, p. 640-648, 2005.

SMOLINSKA, U. Survival of *Sclerotium cepivorum* sclerotia and *Fusarium oxysporum* chlamydospores in soil amended with cruciferous residues. **Journal Phytopathology**, v. 148, p. 343-9, 2000.

SMOLINSKA, U.; HORBOWICZ, M. Fungicidal activity of volatiles from selected cruciferous plants against resting propagules of soil-borne fungal pathogens. **Journal Phytopathology**, v. 147, p. 119-24, 1999.

SOTELO, T.; LEMA, M.; SOENGAS, P.; CARTEA, M. E.; VELASCO, P. In vitro activity of glucosinolates and their degradation products against Brassica-pathogenic bacteria and fungi. **Appl. Environ. Microbiol.**, n. 81, p. 432-40, 2014.

SPADONI, A.; NERI, F.; MARI, M. Physical and chemical control of postharvest diseases. In: WILLS, R.B.H.; GOLDING, J. (Eds.). **Advances in Postharvest Fruit and Vegetable Technology**, CRC Press, p. 89-116, 2015.

SPADONI, R.; LOMBARDI, P.; CANAVARI, M.; HINGLEY, M. Private food standard certification: analysis of the BRC standard in Italian agri-food. **British Food Journal**, v. 116, n.1, p.142-64, 2014.

SU, J.; TU, K.; CHENG, L.; TU, S. C.; WANG, M.; XU, H. R. et al. Wound-induced H₂O₂ and resistance to *Botrytis cinerea* decline with the ripening of apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, n. 62, p. 64-70, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TAYEL, A. A.; EL-BAZ, A. F.; SALEM, M. F.; EL-HADARY, M. H. Potential applications of pomegranate peel extract for the control of citrus green mould. **J. Plant Dis. Prot.**, n. 116, p. 252-6, 2009.

TOUBA, E. P.; ZAKARIA, M.; TAHEREH, E. Anti-fungal activity of cold and hot water extracts of spices against fungal pathogens of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) in vitro. **Microbial Pathogenesis**, v. 52, p. 125-9, 2012.

TORRES, R.; VALENTINES, M. C.; USALL, J.; VIÑAS, I.; LARRIGAUDIERE, C. Possible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanisms in 'Golden Delicious' apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, n. 27, p. 235-42, 2003.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, n. 3, p. 235-45, 2003.

TRIPATHI, M. K.; MISHRA, A. S. Glucosinolates in animal nutrition: a review. **Anim. Feed Sci. Tech.**, n. 132, p. 1-27, 2007.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K.; BANERJI, R.; CHANSOURIA, J. P. N. Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants in management of postharvest rotting of citrus fruits. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, n. 20, p. 317-32, 2004.

TRONCOSO-ROJAS, R.; SÁNCHEZ-ESTRADA, A.; RUELAS, C.; GARCÍA, H. S.; TIZNADO-HERNÁNDEZ, M. E. Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by *Alternaria alternata*. **J Sci Food Agric**, n. 85, p. 1427-34, 2005.

UGOLINI, L.; MARTINI, C.; LAZZERI, L.; D'AVINO, L.; MARI, M. Control of postharvest grey mould (*Botrytis cinerea* Per.: Fr.) on strawberries by glucosinolate-

derived allyl-isothiocyanate treatments. **Postharvest Biology and Technology**, v. 90, p. 34-9, 2014.

USALL, J.; IPPOLITO, A.; SISQUELLA, M.; NERI, F. Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, n. 122, p. 30-40, 2016.

UTAMA, I. M. S.; WILL, R. B. H.; BEN-YEHOSHUA, S.; KUEK, C. In vitro efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetable decay microorganisms. **J. Agric. Food Chem.**, n. 50, p. 6371-7, 2002.

VELASCO, P.; SOENGAS, P.; VILAR, M.; CARTEA, M.E. Comparison of Glucosinolate Profiles in Leaf and Seed Tissues of Different *Brassica napus* Crops. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** v.133, n.4, p. 551-8, 2008.

VILANOVA, L.; VIÑAS, I.; TORRES, R.; USALL, J.; JAUSET, A. M.; TEIXIDÓ, N. Infection capacities in the orange-pathogen relationship: Compatible (*Penicillium digitatum*) and incompatible (*Penicillium expansum*) interactions. **Food Microbiology**, n. 29, p. 56-66, 2012.

VILANOVA, L.; TORRES, R.; VIÑAS, I.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.; USALL, J.; FIORI, S et al. Wound response in orange as a resistance mechanism against *Penicillium digitatum* (pathogen) and *P. expansum* (non-host pathogen). **Postharvest Biology and Technology**, n. 78, p. 113-22, 2013.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. **J Food Safety**, n.27, p. 91-101, 2007.

WANG, S. Y.; CHEN, C. T.; YIN, J. J. Effect of allyl isothiocyanate on antioxidants and fruit decay of blueberries. **Food Chem.**, n. 120, p.199-204, 2010.

WU, H.; ZHANG, X.; ZHANG, G.; ZENG, S.; KIN, K. Antifungal vapour-phase activity of a combination of allyl isothiocyanate and ethyl isothiocyanate against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* infection on apples. **J. Phytopathol**, v. 159, p. 4050–5, 2011.

WILLIAMS, D. J.; PUN, S. Glucosinolates in Brassica vegetables:role in bitterness and hence significance. **Food Australia**, n. 63, p. 407-12, 2011.

WU, H.; LIU, X. R.; YU, D. D.; ZHANG, X.; FENG, J.T. Effect of allyl isothiocyanate on ultra-structure and the activities of four enzymes in adult *Sitophilus zeamais*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, n. 109, p.12-17, 2014.

WAEWTHONGRAK, W.; PISUCHPEN, S.; LEELASUPHAKUL, W. Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.99. p. 44–9, 2015.

ZASADA, I. A.; FERRIS, H. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. **Journal Phytopathology**, v. 93, p. 747-50, 2003.

ZASADA, I. A.; FERRIS, H. Nematode suppression with brassicaceous amendments: application based upon glucosinolate profiles. **Soil Biology & Biochemistry**, n. 36, p. 1017-24, 2004.

ZHANG, C. P. Impact of imazethapyr on the micronal community structure in agricultural soils. **Chemosphere**, v.81, n.6, p. 800-6, 2004.

ZHANG, J.; TIMMER, L. W. Preharvest application of fungicides for postharvest disease control on early season tangerine hybrids in Florida. **Crop Protect.**, n. 26, p. 886-93, 2007.

ZHANG, D.; LOPEZ-REYES, J. G.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Efficacy of yeast antagonists used individually or in combination with hot water dipping for control of postharvest brown rot of peaches. **J. Plant Dis. Prot.**, n. 117, p. 226-32, 2010.

ZHOU, Y.; DENG, L.; ZENG, K. Enhancement of biocontrol efficacy of *Pichia membranaefaciens* by hot water treatment in postharvest diseases of citrus fruit. **Crop Prot.**, n. 63, p.89-96, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise de Variância com Graus de Liberdade e Quadrado Médio para verificar a influência das concentrações do pó de canola no sachê artesanal (g) sobre as variáveis crescimento micelial (cm) e produção de conídios de *P. digitatum*, em dois ensaios *in vitro* conduzidos com delineamento inteiramente casualizado. Pato Branco, 2016.

Causas de variação	Ensaio I		Ensaio II		
	Crescimen to micelial	Produção de conídios ^b	Crescimento micelial ^a	Produção de conídios ^b	
	GL	QM	QM	QM	
Tratamentos	4	24,74	4358003,72	0,37	3954021,22
Regressão de 1° grau (RL)	1	77,42*	12123207,7*	1,27*	12553468,92*
Regressão de 2° grau (RQ)	1	1,46 ^{ns}	1287449,51*	0,06 ^{ns}	783930,58 ^{ns}
Regressão de 3° grau (RC)	1	4,19*	311742,12 ^{ns}	0,01 ^{ns}	846473,75 ^{ns}
Desvios	1	-	-	-	-
Resíduo	15	0,72	103461,87	0,01	282120,20
Total	19	-	-	-	-
<hr/>					
Coeficiente de variação (%)		20,96	19,63	32,81	44,26

* significativo em nível de 5% de probabilidade de erro. ^{ns} não significativo em nível de 5% de probabilidade de erro. ^aDados transformados por $X=\log(X)$. ^b Dados transformados por $\sqrt{x+1}$.

APÊNDICE B – Análise de Variância com Graus de Liberdade e Quadrado Médio para verificar a influência das concentrações de pó de mostarda-da-índia (g) sobre as variáveis crescimento micelial (cm) e produção de conídios ($\times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$) de *P. digitatum in vitro* em um experimento conduzido em dois ensaios com delineamento inteiramente casualizado. Pato Branco, 2016.

Causas de variação	Ensaio I		Ensaio II		
	Crescimento micelial	Produção de conídios ^b	Cresciment o micelial ^a	Produção de conídios ^b	
	GL	QM	QM	QM	
Tratamentos	4	22,83	12425190,94	0,45	3738239,64
Regressão do 1° grau (RL)	1	73,17*	37547841,05*	1,69*	14584031,12*
Regressão do 2° grau (RQ)	1	0,80 ^{ns}	200683,21 ^{ns}	0,08*	0,30 ^{ns}
Regressão do 3° grau (RC)	1	3,72	11876352,91*	0,00	169387,60 ^{ns}
Desvios	1	-	-	-	-
Resíduo	15	0,98	418775,69	0,01	299290,31
Total	19	-	-	-	-
<hr/>					
Coeficiente de variação (%)		21,15	23,29	26,26	36,25

* significativo em nível de 5% de probabilidade de erro. ^{ns} não significativo em nível de 5% de probabilidade de erro. ^aDados transformados por $X=\log(X)$. ^b Dados transformados por $\sqrt{x+1}$.

APÊNDICE C – Análise de Variância com Graus de Liberdade e Quadrado Médio de quatro tratamentos referente à forma de preparo de extrato aquoso de pó de canola (g) sobre as variáveis, crescimento micelial (cm) e produção de conídios (mL) de *P. digitatum in vitro* em um delineamento inteiramente casualizado, em dois ensaios. Pato Branco, 2016.

Causas de variação	Ensaio I		Ensaio II		
		Crescimento micelial	Produção de conídios	Crescimento micelial ^a	Produção de conídios
	GL		QM		QM
Tratamentos	3	16,84	41672528645833,3	0,06	81226570312500,0
Resíduo	16	11,27	7817421875000,0	0,00	5930199218750,0
Total	19	-	-	-	-
Coeficiente de variação (%)		12,47	32,36	6,45	32,29

* significativo em nível de 5% de probabilidade de erro. ^a Dados transformados por $X=\log(X)$.

APÊNDICE D – Análise de Variância com Graus de Liberdade e Quadrado médio de quatro tratamentos referente à forma de preparo de extrato aquoso do pó de mostarda-da-índia (g) sobre o variável crescimento micelial (cm) e produção de conídios (mL) *in vitro* de *P. digitatum* em um delineamento inteiramente casualizado, em dois ensaios. Pato Branco, 2016.

Causas de variação	Ensaio I		Ensaio II		
		Crescimento micelial ^a	Produção de conídios	Crescimento micelial ^a	Produção de conídios
	GL		QM		QM
Tratamentos	3	0,04	57573070312500,0	0,04	83842945312500,0
Resíduo	16	0,00	6549628906250,0	0,00	3947285156250,0
Total	19	-	-	-	-
Coeficiente de variação (%)		4,56	30,72	10,29	29,45

* significativo em nível de 5% de probabilidade de erro. ^a Dados transformados por $X=\log(X)$.

APÊNDICE E – Análise de Variância com Graus de Liberdade e Quadrado Médio de três ensaios com diferentes concentrações de pó de canola (g) sobre a variável área de lesão (cm) do bolor verde em frutos de laranja Pera em um delineamento inteiramente casualizado, para três ensaios. Pato Branco, 2016.

Causas de variação	Ensaio I		Ensaio III
	GL	QM	QM
Tratamentos	4	138,04	96,48
Regressão do 1° grau (RL)	1	517,33*	232,72*
Regressão do 2° grau (RQ)	1	26,84 ^{ns}	12,95 ^{ns}
Regressão do 3° grau (RC)	1	1,33 ^{ns}	11,58 ^{ns}
Desvios	1	-	-
Resíduo	20	34,66	34,79
Total	24	-	-
Coeficiente de variação (%)		24,52	23,18

* significativo em nível de 5% de probabilidade de erro.

APÊNDICE F – Análise de Variância com Graus de liberdade e Quadrado médio de três ensaios com diferentes concentrações de pó de mostarda-da-índia (g) sobre a variável área da lesão (cm) de *P. digitatum* em frutos de laranja Pera em um delineamento inteiramente casualizado, para três ensaios. Pato Branco, 2016.

Causas de variação	Ensaio I		Ensaio II
	GL	QM	QM
Tratamentos	4	779,71	169,47
Regressão do 1º grau (RL)	1	1977,45*	326,40*
Regressão do 2º grau (RQ)	1	721,67*	293,89*
Regressão do 3º grau (RC)	1	261,15 ^{ns}	56,28 ^{ns}
Desvios	1	-	-
Resíduo	20	60,22	42,76
Total	24	-	-
Coeficiente de variação (%)		38,96	25,63

* significativo em nível de 5% de probabilidade de erro.

APÊNDICE G - Análise de Variância com Graus de Liberdade e Quadrado médio de diferentes formas de preparo de extratos de pó de canola (g) sobre a variável diâmetro da lesão (cm) de *P. digitatum* em frutos de laranja Pera em um delineamento inteiramente casualizado, para três ensaios. Pato Branco, 2016.

Causas de variação	Ensaio I		Ensaio II
	GL	QM	QM
Tratamentos	3	280,14	561,86
Resíduo	16	21,32	46,67
Total	19	-	-
Coeficiente de variação (%)		19,18	26,25

* significativo em nível de 5% de probabilidade de erro.

APÊNDICE H – Análise de variância com Graus de liberdade e Quadrado médio de quatro formas de preparo de extratos de pó de mostarda-da-índia (g) sobre a variável crescimento micelial (cm) de *P. digitatum* em frutos de laranja Pera em um delineamento inteiramente casualizado, em três ensaios. Pato Branco, 2016.

Causas de variação	Ensaio I		Ensaio II ^a
	GL	QM	QM
Tratamentos	3	394,35	0,13
Resíduo	16	20,75	0,01
Total	19	-	-
Coeficiente de variação (%)		16,94	7,81

* significativo em nível de 5% de probabilidade de erro. ^a Dados transformados por $X=\log(X)$.

APÊNDICE I - Análise de Variância com Graus de Liberdade e Quadrado Médio do sachê artesanal (g), na melhor concentração e mais eficiente forma de preparo do extrato aquoso do pó de canola, associados à termoterapia sobre a variável área da lesão (cm) provocada por *P. digitatum* em frutos de laranja Pera em um delineamento inteiramente casualizado, para três ensaios. Pato Branco, 2016.

Causas de variação	Ensaio I		Ensaio II
	GL	QM	QM
Tratamentos	7	240,76*	273,67*
Resíduo	32	8,69	9,06

Total	39	-	-
Coeficiente de variação (%)		14,69	18,82

* significativo em nível de 5% de probabilidade de erro.

APÊNDICE J - Análise de Variância com Graus de Liberdade e Quadrado Médio do sachê artesanal (g), na melhor concentração e mais eficiente forma de preparo do extrato aquoso do pó de mostarda-da-índia (g), associados a termoterapia sobre a variável área da lesão (cm) de *P. digitatum* em frutos de laranja Pera em um delineamento inteiramente casualizado, para três ensaios. Pato Branco, 2016.

Causas de variação	GL	Ensaio I		Ensaio II	
			QM		QM
Tratamentos	7	64,75*		191,34*	
Resíduo	32	15,79		7,21	
Total	39	-		-	
Coeficiente de variação (%)		19,01		15,22	

* significativo em nível de 5% de probabilidade de erro.

APÊNDICE K – Análise de Variância com Graus de Liberdade e Quadrado Médio da melhor concentração do pó em sachê artesanal (g) e melhor forma de preparo do extrato aquoso de canola e mostarda-da-índia, comparados com o fungicida sobre a variável área da lesão (cm) de *P. digitatum* em frutos de laranja Pera em um delineamento inteiramente casualizado, para três ensaios. Pato Branco, 2016.

Causas de variação	GL	Ensaio I		Ensaio II	
			QM		QM
Tratamentos	6	758,49*		1419,70*	
Resíduo	28	77,37		35,47	
Total	34	-		-	
Coeficiente de variação (%)		50,67		23,33	

* significativo em nível de 5% de probabilidade de erro.

APÊNDICE L - Análise de Variância com Graus de Liberdade e Quadrado Médio da melhor concentração do sachê artesanal (g), extrato aquoso simples do pó de canola e mostarda-da-índia, fungicida e testemunha sobre a variável produção de conídios ($\times 10^5/\text{cm}^2$) de *P. digitatum* em frutos de laranja Pera em um delineamento inteiramente casualizado, em três ensaios. Pato Branco, 2016.

Causas de variação	GL	Ensaio I		Ensaio II	
			QM		QM
Tratamentos	6	86736026429,1*		719299418074,1*	
Resíduo	28	1011904869,05		25280756341,3	
Total	34	-		-	
Coeficiente de variação (%)		32,73		31,27	

* significativo em nível de 5% de probabilidade de erro.

APÊNDICE M – Análise de Variância com Graus de Liberdade e Quadrado Médio de quatro tratamentos referente à forma de preparo de extrato aquoso de pó de canola (g) em meio de cultivo BSA, sobre as variáveis, crescimento micelial (cm) de *P. digitatum in vitro* em um delineamento inteiramente casualizado, em dois ensaios. Pato Branco, 2016.

Causa da variação	G.L.	Ensaio I	Ensaio II
		Q.M.	
Tratamentos	3	7,529125*	38,742*
Resíduo	16	1,153688	1,3318125
Total	19	-	-
Coeficiente de Variação		17,16	22,41

* Significativo a 5% de probabilidade de erro.

APÊNDICE N – Análise de Variância com Graus de Liberdade e Quadrado Médio de quatro tratamentos referente à forma de preparo de extrato aquoso de pó de Mostarda-da-índia (g) em meio de cultivo BSA, sobre as variáveis, crescimento micelial (cm) de *P. digitatum in vitro* em um delineamento inteiramente casualizado, em dois ensaios. Pato Branco, 2016.

Causa da variação	G.L.	Ensaio I	Ensaio II
		Q.M.	
Tratamentos	3	7,529125*	38,742*
Resíduo	16	1,153688	1,3318125
Total	19	-	-
Coeficiente de Variação		17,16	22,41

* Significativo a 5% de probabilidade de erro.