

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE  
MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETERMINAÇÃO DO PERÍODO RESIDUAL DE  
FUNGICIDAS PROTETOR E SISTÊMICO PARA O  
CONTROLE DE *Guignardia citricarpa* EM FRUTOS  
CÍTRICOS**

Rachel Rattis Motta

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Goes

Co-orientador: Marcel Bellato Spósito

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Fevereiro de 2009

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**Rachel Rattis Motta**, nascida na capital paulistana no dia 24 de maio de 1983. Coursou o primeiro e segundo grau no colégio estadual 'Ermano Marchetti' e em 2001 ingressou no curso de Agronomia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal. Em 2002, foi aceita como voluntária do Programa de Educação Tutorial, em Agronomia (PET - Agronomia), onde realizou atividades que, em sua maioria, abrangiam o Ensino, a Pesquisa e a Extensão. Em 2003, foi monitora da disciplina de Solos e em seguida da disciplina de Economia Agrária. Durante o período de agosto de 2004 e agosto de 2005, obteve bolsa de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq), com o projeto de pesquisa intitulado: "Estresses hídrico e salino na germinação de sementes de guandu e labe-labe", sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Durvalina Maria Mathias dos Santos. No segundo semestre de 2005, foi estagiária do Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) com a realização de atividades na área de Epidemiologia, sob a orientação do pesquisador Dr. Renato Beozo Bassanezi.

*“Faça o melhor que puder e faça-o de acordo com seu padrão interior próprio (ou consciência, se assim preferir), não para o conhecimento e avaliação de seus atos pela sociedade. “Fazer o melhor” é apenas uma frase de poucas palavras, mas significa que, em todas as ocasiões de nossa vida diária, precisamos manter nossa mente sob controle, para mais tarde não nos arrependermos de nossos erros, mesmo que os outros nada saibam a respeito. Agindo assim, estaremos fazendo o melhor.”.*

*“As bênçãos, por si só, não são o bastante. Devem vir de dentro. Sem nosso empenho, é impossível recebê-las.”*

*Dalai-Lama*

Dedico...

Aquele, que está interiormente em nós e no infinito.  
A força inexplicável que provém de nossa fé.  
Que formalmente chamamos... Deus!

Aos meus pais, Maria Aparecida Rattis Motta e Esternach  
Pereira Motta e irmã, Rúbia Rattis Motta por terem acreditado  
que meus objetivos poderiam ser realizados.  
Sem a nossa união nada seria concretizado.  
Amo vocês eternamente...

Ao meu grande amor e companheiro, Robert Anuario Pereira, que  
mesmo nos momentos mais difíceis de sua vida nunca se quer pensou  
em deixar de acreditar em meus sonhos.  
Obrigada...

Pelos dias de sono perdido,  
Pelos finais de semana sacrificados.  
Sua ajuda foi de extrema importância para o desempenho deste  
trabalho.  
Amo-te eternamente...

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio de Goes, por ter conferido tal trabalho à minha responsabilidade, sempre acreditando que seríamos capazes de realizá-lo. Por seus ensinamentos, amizade e preocupação não só com a forma de realização desta pesquisa, mas com minha formação acadêmica.

Ao meu co-orientador Dr. Marcel Bellato Spósito, que juntamente ao Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) ajudou grandemente a condução e melhoria deste trabalho e atendeu prontamente aos pedidos de auxílio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudo.

À Fazenda Piratininga, na pessoa do Sr. Wardeley Rodas, pela concessão da área experimental, que possibilitou a condução dos experimentos.

Ao Engenheiro Agrônomo Cláudio Gomes de Oliveira, por ter confiado na importância dessa pesquisa e ter sido o precursor da parceria com a empresa BASF.

À empresa BASF, pelo financiamento das análises de resíduos do produto comercial Comet. Ao GENCS (*Global Environmental and Consumer Safety Laboratory*) por ter concedido suas instalações para a execução das análises e a todas as pessoas que contribuíram diretamente para a realização desta etapa, como Carla Steling, Renata Magale, Samuel Tsuchiya e em especial à Fabiana Carvalho por sua atenção e orientação.

Aos Engenheiros Agrônomos Toshiaki Shitara e Roberto Luiz Trevisan Pimentel, por terem acreditado na importância desta pesquisa e pelos conselhos de aprimoramento do trabalho.

À empresa IHARABRÁS, pelo financiamento das análises de resíduos do produto comercial Cercobin.

À empresa AGROSAFETY, por ter concedido suas instalações para a realização das análises.

À Engenheira Agrônoma e amiga Taís de Almeida, que gentilmente me auxiliou com a metodologia de inoculação do trabalho compartilhando experiências e conselhos.

A todos os amigos do Laboratório de Fitopatologia, do Departamento de Fitossanidade, Eliana, Gabi, Vanessa (Rapidex), Patrícia, Adriano, Vanessa, Andressa, Roberta, Fernanda, Ester, Marcelo, Ronilda, Elton, dentre outros inúmeros sempre presentes, pela colaboração na execução dos trabalhos e companheirismo.

Aos professores do Departamento de Fitossanidade, pelos valiosos conhecimentos, em especial à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margarete Camargo pela convivência e conselhos.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e colaborações no trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade, Luís Carlos, Vanderlei, Lúcia Rita e Rosângela pela atenção e auxílio nos trabalhos executados.

As minhas queridas amigas Andressa, Michele, Aline, Josi e Patrícia, que estiveram sempre ao meu lado nos momentos de felicidade e tristeza. Agradeço a todas pela força e compreensão. Nossa convivência foi única e ficará marcada em minha vida, para sempre. Amigas eternamente.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	1
SUMMARY .....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	7
2.1. Histórico da doença .....	7
2.2. Importância econômica.....	8
2.3. Agente causal .....	9
2.3.1. A espécie <i>Guignardia citricarpa</i> Kiely [anamorfo: <i>Phyllosticta citricarpa</i> (Mc Alpine) Van de Aa].....	9
2.3.2. Etiologia e sintomatologia .....	11
2.3.3. Epidemiologia .....	13
2.3.4. Controle .....	14
2.3.4.1. Fungicidas protetores: os cúpricos.....	17
2.3.4.2. Fungicidas sistêmicos: os benzimidazóis.....	19
2.3.4.3. Fungicidas mesosistêmicos: as estrobilurinas .....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
3.1. Fase de campo .....	26
3.1.1. Condução do experimento.....	26
3.1.1.1. Preparo do inóculo e inoculação dos frutos .....	27
3.1.1.2. Preparo da calda e aplicação dos fungicidas.....	28
3.1.1.3. Obtenção das amostras de campo .....	29
3.2. Fase analítica .....	29
3.2.1. Oxidocloreto de cobre.....	29
3.2.2. Tiofanato metílico .....	30
3.2.2.1. Preparo e processamento das amostras .....	30
A. Superfície dos frutos.....	30
B. Casca dos frutos.....	30

3.2.2.2.	Método analítico.....	31
A.	Superfície dos frutos.....	31
B.	Casca dos frutos.....	32
3.2.2.3.	Monitoramento dos resíduos.....	32
3.2.3.	Pyraclostrobin.....	35
3.2.3.1.	Preparo e processamento das amostras.....	36
A.	Superfície dos frutos.....	36
B.	Casca e polpa dos frutos.....	36
3.2.3.2.	Método analítico.....	37
A.	Superfície dos frutos.....	38
B.	Casca e polpa dos frutos.....	39
3.2.3.3.	Monitoramento dos resíduos.....	40
3.3.	Fase de avaliações.....	41
4.	RESULTADOS.....	43
4.1.	Oxicloreto de cobre.....	43
4.1.1.	Monitoramento dos resíduos.....	43
4.1.2.	Capacidade protetora.....	45
4.1.3.	Capacidade fungistática.....	46
4.2.	Tiofanato metílico.....	47
4.2.1.	Monitoramento dos resíduos.....	47
4.2.2.	Capacidade preventiva.....	49
4.2.3.	Capacidade curativa.....	49
4.3.	Pyraclostrobin.....	50
4.3.1.	Monitoramento dos resíduos.....	50
3.2.4.	Capacidade preventiva.....	52
3.2.5.	Capacidade curativa.....	53
5.	DISCUSSÃO.....	54
6.	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60



## LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Tipos de sintomas em frutos causados pelo fungo *Guignardia citricarpa*. (A) mancha dura, (B) falsa melanose, (C) mancha sardenta, (D) mancha virulenta, (E) mancha trincada e (F) mancha rendilhada. Fonte: Fundecitrus, SP - 2007..... 12
- Figura 2.** (A) Aspersão do inóculo, contendo conídios de *Guignardia citricarpa* no fruto e (B) proteção do respectivo fruto, contra inóculo proveniente da área experimental, com sacos de papel cristal. Bebedouro, SP - 2007. .... 28
- Figura 3.** Casca e polpa de frutos de laranja ‘Valência’ separadas e congeladas prontas para o processamento, respectivamente (A) e (B). Materiais e equipamentos utilizados para o processamento e homogeneização das amostras (C) e quantidades de casca e polpa obtidas após o processamento (D). BASF - Guaratinguetá, SP - 2008. .... 37
- Figura 4.** Padronização do produto das lavagens da superfície dos frutos (A). Amostras em *vials* de análises para injeção no sistema cromatográfico (B). BASF - Guaratinguetá, SP - 2008..... 39
- Figura 5.** Escala diagramática para avaliação da severidade (%) da MPC (*Guignardia citricarpa*). Sintomas do tipo mancha dura (A) e sintomas do tipo falsa melanose (B) (SPÓSITO et al., 2004)..... 42
- Figura 6.** Quantidades residuais de cobre existentes nos frutos de laranja ‘Valência’ (mg/fruto), após aplicação de oxiclóreto de cobre, sob a forma de imersão. Jaboticabal, SP – 2008..... 43
- Figura 7.** Curva de crescimento dos frutos de laranja ‘Valência’ (mg/fruto), entre a primeira semana de avaliação (7DAA) até a sétima semana de avaliação (49DAA). Jaboticabal, SP – 2008..... 44
- Figura 8.** Quantidades residuais de cobre existentes na área dos frutos de laranja ‘Valência’ (mg/fruto), após aplicação de oxiclóreto de cobre, sob a forma de imersão. Jaboticabal, SP – 2008..... 45

- Figura 9.** Efeito das aplicações protetoras do fungicida oxicloreto de cobre na incidência (%) e severidade (ID) da MPC nos frutos de laranja 'Valência'. Jaboticabal, SP – 2008..... 46
- Figura 10.** Efeito das aplicações de oxicloreto de cobre na incidência (%) e severidade (ID) da MPC, após a inoculação dos frutos de laranja 'Valência', em diferentes intervalos de tempo. Jaboticabal, SP – 2008..... 47
- Figura 11.** Quantidades residuais de tiofanato metílico e seu metabólito carbendazim na superfície (mg/cm<sup>2</sup>) (**A**) e na casca (mg/kg) (**B**) de frutos de laranja 'Valência'. Jaboticabal, SP – 2008..... 48
- Figura 12.** Efeito das aplicações preventivas do fungicida tiofanato metílico na incidência (%) e severidade (ID) da MPC nos frutos de laranja 'Valência'. Jaboticabal, SP – 2008..... 50
- Figura 13.** Quantidades residuais de pyraclostrobin na superfície (mg/cm<sup>2</sup>), casca e polpa (mg/kg) de frutos de laranja 'Valência'. Jaboticabal, SP – 2008. .... 51
- Figura 14.** Efeito das aplicações preventivas do fungicida pyraclostrobin na incidência (%) e severidade (ID) da MPC nos frutos de laranja 'Valência'. Jaboticabal, SP – 2008..... 52
- Figura 15.** Efeito das aplicações do pyraclostrobin na incidência (%) e severidade (ID) da MPC, após a inoculação dos frutos de laranja 'Valência', em diferentes intervalos de tempo. Jaboticabal, SP – 2008..... 53

## DETERMINAÇÃO DO PERÍODO RESIDUAL DE FUNGICIDAS PROTETOR E SISTÊMICO PARA O CONTROLE DE *Guignardia citricarpa* EM FRUTOS CÍTRICOS

**RESUMO** - Este trabalho teve como objetivos monitorar a quantidade de resíduo existente em frutos de laranjeira 'Valência' dos fungicidas oxicloreto de cobre, tiofanato metílico e pyraclostrobin, como também determinar a capacidade protetora e fungistática (oxicloreto de cobre) e a capacidade preventiva e curativa (tiofanato metílico e pyraclostrobin) no controle da mancha preta dos frutos cítricos (MPC). No primeiro experimento, aproximadamente 1000 frutos, previamente ensacados, foram primeiramente imersos nas caldas fungicidas e posteriormente inoculados com conídios de *Guignardia citricarpa* em intervalos regulares de 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a aplicação do fungicida, para o oxicloreto de cobre e de 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias após a aplicação do fungicida, para o tiofanato metílico e pyraclostrobin. No segundo experimento, aproximadamente 1000 frutos, previamente ensacados, foram primeiramente inoculados e posteriormente tratados por imersão com os respectivos fungicidas nos mesmos intervalos regulares. Foram utilizados 16 frutos por período de inoculações e oito frutos por período de aplicação do fungicida. Para o primeiro experimento, oito frutos foram utilizados para a realização das análises de resíduo e outros oito frutos deixados na planta até a época da colheita. Para o segundo experimento, somente avaliou-se a incidência da doença e severidade na colheita. As análises de resíduos foram realizadas por técnicas de Espectrofotometria de Absorção Atômica na superfície dos frutos, para o oxicloreto de cobre e de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de massas/massas (CLAE - EM/EM) na superfície e casca dos frutos, para o tiofanato metílico e na superfície, casca e polpa dos frutos para o pyraclostrobin. Na época da colheita, os frutos foram avaliados quanto à incidência, severidade e tipo dos sintomas de *G. citricarpa*. O fungicida oxicloreto de cobre apresentou limitada capacidade protetora e nenhuma capacidade fungistática, sob condições de alta pressão de inóculo. Observou-se que o resíduo encontrado na superfície dos frutos, ou seja, a porcentagem de recobrimento do produto apresentou-

se diretamente ligada ao crescimento dos frutos de laranja 'Valência'. O fungicida tiofanato metílico, logo aos sete dias após a aplicação do fungicida nos frutos converteu-se em seu metabólito carbendazim, estando estes em maior concentração na casca dos frutos. Sob condições de alta pressão de inóculo, o fungicida apresentou capacidade preventiva por apenas um dia, não apresentando capacidade curativa. As maiores quantidades de resíduo do fungicida pyraclostrobin foram encontradas na casca dos frutos e mesmo sob alta pressão de inóculo apresentou eficiente capacidade preventiva, por pelo menos 35 dias e capacidade curativa por sete dias.

**Palavras-chave:** *Citrus sinensis*, *Phyllosticta citricarpa*, pinta preta dos citros e HPLC.

## DETERMINATION OF RESIDUAL PERIOD OF PROTECTIVE AND SYSTEMIC FUNGICIDES FOR THE CONTROL OF *Guignardia citricarpa* ON CITRIC FRUITS

**SUMMARY** - The objectives of this study were: (i) measure the amount of residues of copper oxychloride, methyl thiophanate and pyraclostrobin in 'Valencia' sweet orange fruits after their application; (ii) to evaluate the protective and fungistatic capacity of copper oxychloride and (iii) to evaluate the preventive and curative capacity of systemic fungicides methyl thiophanate and pyraclostrobin for the control of citrus black spot (CBS). Two experiments were carried out, in the first on 1.000 fruits were first immersed in the fungicides and then inoculated with conidia of *Guignardia citricarpa* at regular intervals of 1, 7, 14, 21, 28 and 35 days, for the copper oxychloride and 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 and 56 days for methyl thiophanate and pyraclostrobin. In the second experiment, on 1.000 fruits were first inoculated with conidia of *G. citricarpa* and then treated by immersion with the fungicides in the same regular intervals as described. Sixteen fruits were used for each period of inoculations and eight fruits per application. For the first experiment, eight fruits were used for analysis of residues and eight fruits were left in the plant until harvesting to evaluate disease incidence and severity. For the second experiment it was evaluate only disease incidence and severity in the harvest. Analysis of residues were performed by Atomic Absorption Spectrometry on the fruits surface, for copper oxychloride and High Performance Liquid Chromatography coupled to the detector mass/mass (HPLC - MS / MS) on the fruits surface and peel for the methyl thiophanate, and on the fruits surface, peel and pulp for the fungicide pyraclostrobin. Under conditions of high inoculum pressure, copper oxychloride showed limited protective capacity and no fungistatic capacity. Residues found on the fruits surface were directly related to the fruits growth. Methyl thiophanate was converted on its metabolite carbendazim seven days after application and its residues were found in highest concentration in the fruit peel. Under conditions of high inoculum pressure, this later fungicide showed preventive capacity for only one day and no curative capacity. The highest quantity of pyraclostrobin residues was found in the fruit. Under high

inoculum pressure this fungicide showed efficient preventive capacity, for at least 35 days and curative capacity for seven days.

**Keywords:** *Citrus sinensis*, *Phyllosticta citricarpa* and HPLC.

## 1. INTRODUÇÃO

De todas as árvores frutíferas, uma das mais conhecidas, cultivadas e estudadas em todo o mundo é a laranjeira. A laranja constitui-se na fruta mais produzida no mundo, cuja produção em 2006/07<sup>1</sup> é até o momento de aproximadamente 47 milhões de toneladas. Embora produzida em cerca de 100 países, a produção concentra-se principalmente no Brasil, Estados Unidos e China (AGRIANUAL, 2008).

O Brasil detém 30% da produção mundial e 59% da produção de suco. O Estado de São Paulo e a Flórida dominam a oferta mundial, um caso raríssimo em se tratar de *commodities* agrícolas. O sistema agroindustrial cítrica, um dos setores mais competitivos e de maior potencial de crescimento do agronegócio, movimenta R\$ 9 bilhões por ano e gera mais de 400 mil empregos, diretos e indiretos, só no Estado de São Paulo. Inovações em pesquisa, tecnologia e logística estão na base da eficiência e liderança do Brasil neste setor (NEVES & JANK, 2006).

Atualmente a citricultura brasileira ocupa uma área de aproximadamente 800 mil hectares tendo o Estado de São Paulo cerca de 565 mil hectares distribuídos em 330 municípios e em 29.000 propriedades (AGRIANUAL, 2008). Cerca de 85% dessa produção é destinada à industrialização, cujo suco produzido é exportado para vários países, incluindo-se principalmente Bélgica, Países Baixos, Estados Unidos, Japão e China. O Brasil exportou em 2007 mais de 1 milhão de toneladas de suco de laranja, refletindo em aumentos de 6,8% a mais que no ano anterior (ASSOCITRUS, 2008).

Significativos valores, em divisas, são também oriundos das exportações de frutas frescas que, apenas em 2007, foi responsável por cerca de 53 mil toneladas, entre laranjas (ABECITRUS, 2009).

As plantas cítricas são afetadas por vários agentes fitopatogênicos que, agindo isoladamente ou em conjunto, podem em determinadas circunstâncias tornarem-se limitantes a citricultura. Dentre tais agentes fitopatogênicos insere-se o fungo *Guignardia citricarpa* Kiely, cuja fase anamórfica corresponde a *Phyllosticta citricarpa* McAlp. Van Der Aa, agente causal da mancha preta dos frutos cítricos (MPC).

---

<sup>1</sup> Dado atualizado em agosto de 2008.

A MPC, além de afetar a aparência dos frutos causa grandes prejuízos resultantes da queda precoce dos mesmos que, sob condições favoráveis, pode exceder cerca de 80% dos frutos na planta (KLOTZ, 1978 & SPOSITO, 2003). Dada a possibilidade de contaminação microbiológica, normalmente estes frutos caídos tornam-se rejeitados pela indústria, aumentando significativamente os prejuízos.

Atualmente, o controle da MPC tem sido realizado mediante a combinação de práticas culturais e principalmente pelo uso de fungicidas protetores e, principalmente, pela combinação de fungicidas sistêmicos associados com protetores e óleos mineral ou vegetal. Entretanto, no Brasil, a liberação dos ascósporos tem se dada de forma intermitente, estendendo-se da primavera até os meses do verão, ao contrário de outros países, como a África do Sul, onde se tem praticamente poucos picos de liberação de ascósporos, devido principalmente ao menor índice pluviométrico.

Os resultados de controle obtidos no Brasil apresentam-se inferiores àqueles obtidos em outros lugares, possivelmente, tal diferença se deve a liberação freqüente de ascósporos, ainda que com picos mais baixos, o que, porém, limita a eficiência dos tratamentos quando aplicados de forma semelhante à adotada naqueles países.

Dessa forma, torna-se de fundamental importância o conhecimento do poder efetivo de controle dos fungicidas utilizados atualmente, tanto preventivamente como curativamente, como também o período residual dos mesmos. Tais aspectos são desconhecidos na literatura, principalmente para o controle deste patógeno em específico. Tais informações poderão propiciar otimizações no controle da MPC, como também viabilizar a racionalização do uso dos fungicidas.

Os objetivos do presente trabalho foram determinar a quantidade de resíduo existentes em frutos da laranjeira 'Valência', bem como determinar a capacidade protetora e fungistática, do fungicida oxicloreto de cobre, e a capacidade preventiva e curativa, dos fungicidas tiofanato metílico e pyraclostrobin, em diferentes intervalos de tempo, no controle de *G. citricarpa*.



## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Histórico da doença**

A MPC foi descrita pela primeira vez em 1895, na Austrália, causando perdas consideráveis em frutos de laranja 'Valência', tanto em fase de pré como em pós-colheita (SUTTON & WATERSTON, 1966). Posteriormente, em 1925, foi encontrada na África do Sul, na região litorânea e úmida da província de Natal. Vinte anos depois, o fungo já havia se disseminado para todas as principais regiões produtoras deste país, tornando impróprios para a exportação mais de 90% dos frutos produzidos nos pomares que não realizaram o controle da doença (KOTZÉ, 1964). Atualmente, essa doença encontra-se assinalada em vários países da África como em Moçambique, Zimbábue, África do Sul, Quênia, Swazilândia, Nigéria e Rodonésia; da Ásia, como na China, Coréia, Hong-Kong, Filipinas, Taiwan e Japão; da Oceania como a Austrália e da América do Sul, como Argentina, Peru, Uruguai, Venezuela e Brasil (KOTZÉ, 1988; TIMMER et al., 2000). Dentre esses países, as maiores perdas têm sido registradas na África do Sul, Japão, Argentina e principalmente no Brasil.

No Brasil, a primeira constatação de frutos sintomáticos ocorreu em meados de agosto de 1937, quando estes foram coletados em uma feira livre na cidade de Piracicaba, Estado de São Paulo (AVERNA-SACCÁ, 1940). Após esta data, novos registros foram feitos no Estado do Rio de Janeiro em 1980 (ROBBS et al., 1980), afetando plantas de mexerica 'Rio', nos municípios de São Gonçalo e Itaboraí, a partir dos quais o fungo disseminou-se rapidamente para outros municípios da Baixada Fluminense, afetando diferentes espécies cítricas. Em 1986, o mesmo autor relata a presença desta enfermidade no Vale do Caí, principal região produtora do Rio Grande do Sul (FEICHTENBERGER, 1996).

Em São Paulo, a doença só voltou a se manifestar em 1992, afetando pomares de limões verdadeiros e laranjas de maturação tardia, nos municípios de Conchal e Engenheiro Coelho (GOES & FEICHTENBERGER, 1993). A partir desta data, a doença teve uma expansão muito rápida para os municípios circunvizinhos, presumindo-se que,

além do aspecto biológico do agente causal, as condições climáticas tenham também favorecido a sua disseminação, dada à intensa desfolha das plantas, resultante do déficit hídrico acentuado, precedida de geada, ocorrido no ano de 1994 (FEICHTENBERGER, 1996). Sua expansão também foi rápida na região de Limeira e, atualmente, encontra-se comprovadamente presente, de forma endêmica em 72 municípios produtores do Estado de São Paulo<sup>2</sup>. A MPC também se encontra presente em vários outros Estados como Espírito Santo (COSTA et al., 2003), Minas Gerais (BALDASSARI et al., 2004), Santa Catarina (ANDRADE et al., 2004; THEODORO et al., 2004), Amazonas (GASPAROTTO et al., 2004) e Paraná (CAIXETA et al., 2005).

## 2.2. Importância econômica

A MPC, ou pinta preta dos citros, como também é popularmente designada, causa danos em todas as espécies cítricas de valor comercial, exceção feita à laranjeira azeda (*Citrus aurantium* L.) e seus híbridos (KOTZÉ, 1981) e à limeira ácida 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Osbeck) (AGUILAR VILDOSO et al., 2002). Praticamente todas as variedades de laranjeiras doces, principalmente as de maturação média e tardia, como é o caso da 'Pêra-Rio', 'Valência' e 'Natal', são suscetíveis à doença. Os sintomas mais severos são encontrados nas variedades tardias, como 'Valência' e 'Natal' (FEICHTENBERGER, 1996).

O fungo *Guignardia citricarpa* é específico de citros (BAAYEN et al., 2002), causando lesões em ramos, folhas e frutos. Nos frutos, as lesões ficam limitadas no flavedo (CARDOSO FILHO, 2003), depreciando-os para a comercialização no mercado interno de fruta fresca e restringindo as exportações para a União Européia, maior importador dos frutos cítricos brasileiros (NEVES et al., 2001). A doença é considerada quarentenária A1 na União Européia, não estando presente em seus países membros, e Estados Unidos da América. A tolerância em relação aos frutos importados com sintomas da doença é zero (SPÓSITO, 2003).

---

<sup>2</sup> GOES, Setembro de 2005, informações pessoais.

A MPC não modifica a qualidade dos frutos (FAGAN & GOES, 2000), podendo-se utilizá-los na produção de suco cítrico concentrado (TIMMER et al., 2000). Do ponto de vista industrial, as referências relativas às influências da doença nas características tecnológicas do suco são muito escassas, restringindo-se apenas ao trabalho CITRUS AND SUBTROPICAL FRUIT RESEARCH INSTITUTE (1989). De acordo com este trabalho, foi verificado que, enquanto os teores de sólidos solúveis totais sofrem alterações desprezíveis, o conteúdo de ácidos é muito baixo nos frutos infectados, o que os torna mais adocicados. Teores de ácidos de 0,68% a 1,02% têm sido citados para frutos sintomáticos e sadios, respectivamente. No Brasil, para o caso das variedades 'Natal' e 'Valência', foi verificada uma relação positiva entre os níveis de severidade da doença e teores de sólidos solúveis totais. Quanto às demais características como acidez total titulável, ratio e porcentagem de suco não foram constatadas alterações significativas (FAGAN & GOES, 2000).

Além de afetar a aparência dos frutos, grandes prejuízos resultam-se da queda precoce dos mesmos que, sob condições favoráveis, pode exceder cerca de 80% dos frutos na planta (KLOTZ, 1978 & SPOSITO, 2003). Dada a possibilidade de contaminação microbiológica, normalmente estes frutos caídos tornam-se rejeitados pela indústria, aumentando significativamente os prejuízos.

## **2.3. Agente causal**

### **2.3.1. A espécie *Guignardia citricarpa* Kiely [anamorfo: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van de Aa]**

O fungo responsável pela MPC é o ascomiceto *Guignardia citricarpa* Kiely, cuja fase perfeita (teleomorfa) foi descrita por KIELY (1948b), na Austrália, na região de New South Wales. A forma imperfeita (anamorfa) vem recebendo várias denominações desde a sua detecção: inicialmente foi classificado como *Phoma citricarpa* McAlpine, até 1973; posteriormente, *Phyllostictina citricarpa* (McAlp.) Petrak e, atualmente,

*Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) van der Aa. (SUTTON & WATERSTON, 1966). Existem descritas na literatura duas formas de *Guignardia* spp. morfologicamente idênticas: uma que provoca a MPC e pode produzir infecções assintomáticas em folhas e frutos cítricos, e outra forma que somente provoca infecções assintomáticas. Aparentemente, a forma que provoca a MPC só infecta tecidos de plantas cítricas, enquanto a forma avirulenta pode infectar outros hospedeiros (McONIE, 1964a). As estruturas de frutificação da forma assexuada são representadas pelos picnídios que são formados em lesões de frutos, folhas, folhas em decomposição (em grande número), pecíolos (BEETON et al., 1996) e, ocasionalmente no pedúnculo dos frutos. As estruturas de frutificação da forma sexuada são representadas pelos pseudotécios, que somente ocorrem em folhas em decomposição, não sendo encontrados em lesões de folhas aderidas e frutos contendo os sintomas típicos da doença (SUTTON & WATERSTON, 1966).

As formas anamorfa e teleomorfa geralmente são encontradas associadas. As estruturas de frutificação da forma assexuada são representadas pelos picnídios, os quais são pequenos, globosos, pretos e semi-eruptivos. Em corte vertical eles são globosos, com 70 a 330µm de diâmetro, com parede marrom escura pseudoparenquimatosa (JONNSTON & FULLERTON, 1988)

A colônia de *G. citricarpa* cresce lentamente em meio de cultura, atingindo diâmetro de sete centímetros em 20 dias, em vários meios de cultura, a 20°C, e o micélio fortemente pigmentado é submerso, formando uma crosta plectenquimatosa. As células conidiogênicas são cilíndricas, com cerca de 4-8 x 2-3,5µm. O conídio unicelular, ovóide, elíptico ou subgloboso, algumas vezes clavado quando jovem, com uma base truncada, contendo gútulas, com apêndice apical de 5 a 15µm de comprimento e facilmente perdido é característico da espécie de *Phyllosticta*. O mesmo apresenta uma membrana gelatinosa que o recobre servindo de proteção contra o ressecamento durante a dispersão (PUNITHALINGAM, 1982).

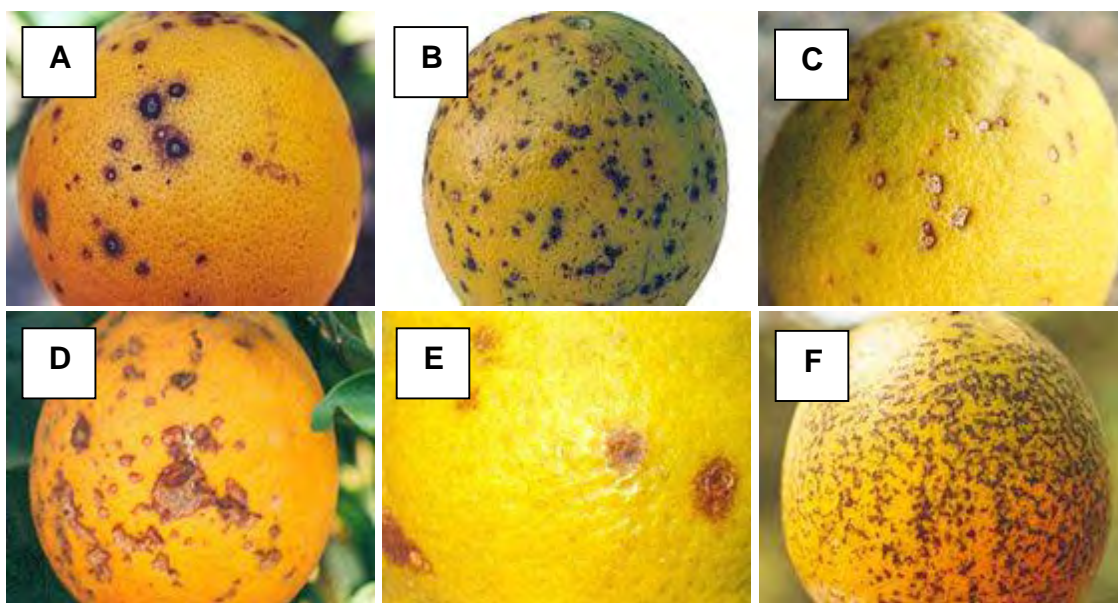
### 2.3.2. Etiologia e sintomatologia

Os sintomas embora possam ser verificados em folhas e no pedúnculo dos frutos, são excepcionalmente raros nesses tecidos (KOTZÉ, 1981). As lesões observadas em folhas, ramos e espinhos não têm importância do ponto de vista econômico, e mesmo em variedades suscetíveis como os limoeiros, não chegam a comprometer a produção (AGUILAR-VILDOSO et al., 2002). Tais sintomas, no entanto, são importantes do ponto de vista epidemiológico, já que contribuem para a formação de inóculo que pode incrementar o nível de doença na planta. Nesses órgãos, normalmente os sintomas caracterizam-se pela presença de lesões necróticas pequenas, com centro acinzentado e bordas bem definidas, de coloração marrom-escura. As folhas de plantas debilitadas, de diferentes espécies cítricas, podem também exibir sintomas típicos da doença. Todavia, as folhas mesmo que infectadas raramente exibem sintomas durante o seu tempo de vida útil, de cerca de três anos (MAUCHMANI, 1998).

Em pomares com histórico da doença, os sintomas são verificados com grande frequência nas fases iniciais de maturação dos frutos, intensificando-se nas etapas subseqüentes. Entretanto, um fato de importância relevante trata-se do aparecimento de sintomas nas fases de pós-colheita. Tem-se verificado que frutos, mesmo após criteriosa seleção e tratamento pós-colheita, têm exibido sintomas nas fases de transporte e durante o armazenamento, no local do destino. Dessa forma, dado o caráter quarentenário da doença, a presença de uma única lesão em um fruto amostrado implica na suspensão do desembarque de todo o carregamento existente no navio. Assim o conhecimento dos mecanismos envolvidos na expressão desses sintomas e a determinação de alternativas que viabilizem a sua supressão tornam-se de importância relevante, podendo significar a possibilidade de aumento do potencial de exportação de frutos pelas empresas brasileiras (SCALOPPI, 2006).

Na literatura internacional constam quatro diferentes sintomas associados à MPC: mancha dura, falsa melanose, mancha sardenta e mancha virulenta (TIMMER et

al., 2000). No Brasil, entretanto, já foram relatados seis diferentes sintomas em frutos relacionados à MPC (FUNDECITRUS, 2003) (Figura 1).



**Figura 1.** Tipos de sintomas em frutos causados pelo fungo *Guignardia citricarpa*. (A) mancha dura, (B) falsa melanose, (C) mancha sardenta, (D) mancha virulenta, (E) mancha trincada e (F) mancha rendilhada. Fonte: Fundecitrus, SP - 2007.

Os sintomas da doença são favorecidos por vários fatores, dos quais os mais importantes são a radiação solar intensa e as altas temperaturas (FEICHTENBERGER, 1996). Um aspecto importante a ser destacado refere-se ao longo período de incubação apresentado pelo fungo. Na presença de umidade, o fungo emite um “peg” de infecção o qual penetra na cutícula e se expande para dentro do tecido, na forma de uma massa de micélio, permanecendo entre a cutícula e a epiderme. Essa se constitui na chamada infecção quiescente que, posteriormente, dá origem às lesões típicas da doença.

### 2.3.3. Epidemiologia

Os mecanismos envolvidos no processo de formação destas infecções não são completamente conhecidos. Porém, sabe-se que os sintomas mais severos, normalmente estão associados à elevação de temperatura por ocasião da maturação dos frutos, maior incidência de raios solares nos frutos mais expostos, estresse hídrico e debilidade das plantas (KOTZÉ, 1981). A doença pode ser originada por duas vias de infecção: por conídios ou ascósporos. Os conídios são produzidos principalmente em frutos sintomáticos, em folhas ainda aderidas ou já caídas da copa, em ramos mortos e no pedúnculo dos frutos. Os ascósporos são produzidos apenas nas folhas caídas e em decomposição. Ambas as formas mostram-se efetivas, tanto para o estabelecimento da doença em áreas anteriormente isentas (ascósporos), como para contribuir no incremento da doença (conídio) nas áreas afetadas (KOTZÉ, 1981).

O período de suscetibilidade dos frutos corresponde desde a queda das pétalas, até cerca de 20-24 semanas após (KLOTZ, 1978; BALDASSARI, 2001).

Nas condições brasileiras, é comum a ocorrência de floradas simultâneas em diferentes variedades de laranjas e limões. Certamente, esse fator deve contribuir de forma decisiva no sentido de que, a doença apresente níveis de severidade mais elevados no Brasil que, em outros países, como por exemplo, na África do Sul.

Não existe um consenso sobre quais das formas, entre conídios e ascósporos, mostram-se de maior importância uma vez que à doença já tenha sido estabelecida. Para as condições da África do Sul, os ascósporos constituem-se na principal fonte de inóculo (McONIE, 1964a; KOTZÉ, 1981). No Brasil, em particular no Estado de São Paulo, dada à ocorrência de vários fluxos de floradas e coexistência simultânea de frutos de diferentes tamanhos e idade, associadas às chuvas freqüentes nos períodos de suscetibilidade dos frutos, aparentemente ambas as fontes de inóculo contribuem para o incremento da doença (FEICHTENBERGER, 1996). Os ascocarpos maduros podem ser encontrados durante o ano todo dentro do pomar, mais sua presença depende da freqüência de umidade e secamento das folhas caídas, assim como da presença de temperatura favorável. O molhamento e secamento intermitente das folhas

mostraram-se essenciais para o desenvolvimento do ascocarpo (KOTZÉ, 1981). Entretanto, a magnitude da importância dessas formas não foi ainda determinada.

Para se entender a epidemiologia desta doença, tem-se que considerar a disponibilidade de inóculo, as condições climáticas necessárias para ocorrer à infecção, o ciclo de crescimento das árvores de citros e, particularmente, o desenvolvimento do fruto em relação ao desenvolvimento da doença (KOTZÉ, 1981).

#### **2.3.4. Controle**

Os níveis atuais de incidência e severidade demonstrados pela MPC nos pomares cítricos do Estado de São Paulo demonstram a gravidade e as boas condições de adaptação climática encontradas pelo fungo, neste Estado. O custo total de produção de uma caixa de 40,8 Kg de frutos passou de US\$ 1,67 em 2003, para US\$ 3,48 em 2005. A alta se deve a um conjunto de fatores, mas o que mais se destaca é o aumento geral no custo dos insumos. Os gastos com a MPC são avaliados em US\$ 0,46 por caixa. Somados, apenas esses tratamentos fitossanitários equivalem a 20% do custo total de produção (AGRIANUAL, 2006).

Dessa forma, as medidas de controle atualmente adotadas alicerçado principalmente no controle químico, apenas têm contribuído para minimizar as perdas potenciais. Essas medidas, além de elevar o custo de produção ameaçam de forma severa o potencial de exportação do Brasil.

A produção de cítricos no Brasil apresentou durante todos esses anos diversas mudanças na forma de condução dos pomares. Um dos principais fatores contribuintes para tal reforma são principalmente os problemas fitossanitários encontrados pela cultura.

Nos anos de 2001 a 2003 os preços pagos ao produtor pela caixa de laranja estiveram entre US\$ 2,80 e US\$ 3,50 e o controle da MPC elevou o custo de produção de uma caixa em US\$ 0,37 na região sul. Portanto apenas para o controle o valor despendido representou 10,5% a 13,2% do valor de venda de uma caixa. Caso a



doença estenda-se para os demais municípios produtores, o custo anual passaria para cerca de 72 milhões de dólares (AGRIANUAL, 2005). Mesmo com estes elevados custos o controle da doença não é totalmente eficiente, onde sob condições severas, com o melhor tratamento utilizado a incidência de frutos com sintomas foi de 53%, enquanto que no tratamento com menor eficiência de controle a incidência foi de 75,5% (SPOSITO, 2003).

O controle da doença baseia-se no emprego de métodos culturais e principalmente no uso de fungicidas. Os primeiros grupos químicos que apresentaram bom controle da doença foram os fungicidas cúpricos, especialmente o oxiclreto de cobre e calda bordalesa, os quais se mostravam como os mais práticos e econômicos. O uso de tais fungicidas foi inicialmente adotado na Austrália e na África do Sul, a partir da década de 50 (CALAVAN, 1960).

Nesses países, para o controle da doença eram realizadas de três a quatro pulverizações com fungicidas cúpricos. A primeira aplicação era realizada no florescimento ou imediatamente após a queda das pétalas, sendo as demais em intervalos de até seis semanas. Entretanto, em pomares mais velhos havia a necessidade de maior número de pulverizações. No entanto, nos anos subseqüentes constatou-se que o uso dos fungicidas cúpricos, dependendo da quantidade de aplicações e épocas as quais eram realizados havia a produção de sintomas de fitotoxicidade nos frutos, que apresentavam pequenas lesões escuras. Tais manchas eram superficiais, restringindo-se à casca, que, embora não afetasse suas características químicas e/ou tecnológicas, ocasionava a sua depreciação comercial, dado aos danos provocados na aparência dos frutos (CALAVAN, 1960; KOTZÉ, 1964; KOTZÉ, 1981).

Na década de 60 foram introduzidos os fungicidas ditiocarbamatos os quais, além de proporcionarem bom controle da doença, não apresentavam efeito deletério à aparência externa da casca dos frutos. Estes foram utilizados em conjunto com os fungicidas cúpricos, até que a partir dos anos 70, com o advento dos fungicidas sistêmicos, notadamente o benomyl, foi verificado um significativo avanço no controle da doença. No caso da África do Sul, apenas uma única aplicação de benomyl

associado com óleo mineral era suficiente para o controle efetivo da doença, enquanto que, com fungicidas ditiocarbamatos, faziam-se necessárias de quatro a cinco aplicações para obter um controle semelhante (KOTZÉ, 1981). Nessas áreas, o controle próximo de 100% foi também obtido mediante o emprego de hidróxido de cobre ou calda bordalesa na fase de queda de pétalas, acompanhado da aplicação de benomyl 16 semanas após essa pulverização (BERTUS, 1981).

Na África do Sul, dada à eficiência dos fungicidas sistêmicos benzimidazóis, esses foram popularizados, sendo utilizados com grande freqüência. Tal fato redundou em forte pressão de seleção, ocasionando o aparecimento de linhagens de *G. citricarpa* resistentes aos benzimidazóis (HERBERT & GRECH, 1985), provocando mudanças nas estratégias que até então estavam sendo empregadas com sucesso no controle da doença. Dentre as alterações incluiu-se o retorno ao uso dos fungicidas protetores, notadamente os ditiocarbamatos e cúpricos, e no emprego, pela primeira vez, da mistura em tanque de fungicida sistêmico, benomyl ou carbendazim, e mancozeb acrescido de óleo mineral (BOT et al., 1987 apud SCHUTTE et al., 1996). Tal tratamento vem sendo empregado com sucesso até os dias atuais.

No Brasil, mediante avaliações da sensibilidade de isolados de *G. citricarpa* procedentes de várias regiões do país concluiu-se que os mesmos mostravam-se sensíveis ao carbendazim, sem, pois, indícios de resistência aos benzimidazóis (MORETTO et al., 2005).

Dentre os fungicidas benzimidazóis, o benomyl foi empregado com sucesso por vários anos, inclusive no Brasil. Entretanto, a partir de 2001 o produto teve sua fabricação e comercialização suspensa, em todo o mundo. Assim, atualmente dentre os benzimidazóis são utilizados o carbendazim e tiofanato metílico.

Estudos com novas moléculas vêm sendo desenvolvidos com o intuito de não apenas encontrar novas alternativas de controle, como também a minimizar os riscos de resistência, como preconizado por BRENT (1995). Dentre os novos grupos de fungicidas testados incluem-se os pertencentes às estrobilurinas.

Os fungicidas desse grupo químico têm se mostrado eficientes na África do Sul (SCHUTTE et al., 1997, TOLLIG et al., 1996), Argentina (FOGLIATA et al., 2004) e Brasil (FELIPPE et al., 2004).

#### **2.3.4.1. Fungicidas protetores: os cúpricos**

Os compostos à base de cobre, como também os à base de enxofre elementar e ditiocarbamatos são considerados fungicidas de modo de ação não-específico. Tais compostos podem agir sobre mais de um metabólito no organismo do fungo conectando-se a várias enzimas e compostos biologicamente significativos, sendo efetivos por mais de um modo de ação (KÖLLER, 1998).

A ação desses fungicidas pode ocorrer via interferência na membrana celular, em diferentes enzimas ou outras micromoléculas, ou ainda reagindo com aminoácidos, com peptídeos ou outros metabólitos (BURCHFIELD, 1967). A maioria desses compostos inibe ações vitais dos fungos pela formação de compostos com o protoplasma ou com metais, ou simplesmente por meio da deposição dos mesmos nas células. No entanto, podem causar efeito fitotóxico quanto penetram na cutícula da planta (BURCHFIELD, 1967; HOLLOWAY, 1993). Outra característica importante seria a pouca indução ou nenhum risco de resistência.

O efeito fungicida do cobre foi cientificamente estabelecido em 1807 em experimentos de avaliação de esporos do fungo causador do carvão. Em 1885, o míldio da videira foi prevenido com sucesso utilizando-se uma mistura de hidróxido de cálcio (calcário) e sulfato de cobre. Tal mistura é conhecida até hoje por calda bordaleza ou mistura de Bordeaux.

A absorção de cobre inorgânico solúvel e íons livres de cobre causam severa fitotoxicidade nas plantas, assim, os fungicidas à base de cobre nada mais são que sais de cobre insolúveis em água. Dessa forma, o controle da germinação dos esporos é efetuado por meio da cobertura da superfície do vegetal. Entretanto, sais de cobre

insolúveis em água e até mesmo a calda bordaleza causam fitotoxicidade em plantas, especialmente em climas úmidos e frios (DELEN et al., 2000).

Os fungicidas cúpricos possuem largo espectro de ação, baixa toxicidade aguda e são efetivos contra bactérias, além de sua produção ser relativamente barata quando comparados com produtos modernos. À semelhança do enxofre elementar, os fungicidas cúpricos tem sido largamente usados na agricultura orgânica (KÖLLER, 1998).

A suposição de que íons de cobre são a causa da reação fungicida é a mais simples hipótese a respeito do efeito fungicida dos compostos cúpricos. Prévost afirmou que a baixa densidade do cobre inibe a germinação de esporos e que os esporos readquirem capacidade de germinação quando lavados com ácido hipoclorídrico logo após a aplicação de sulfato de cobre. Entretanto, a alta solubilidade do acúmulo seco da calda bordaleza com atividade tóxica contra esporos de *Plasmopara viticola* enfraquece esta conclusão. Testes realizados com cobre em depósitos de calda bordaleza em 1938 concluíram que o cobre solúvel pode ser liberado sob condições de densidade suficiente para capacitá-lo a ter ação fungicida. Este ponto de vista poderia não ser considerado e a germinação de esporo de fungos seria considerada inibida por depósitos de cobre insolúveis, uma vez que, o crescimento ativo do tubo germinativo é acompanhado por uma acidificação da área que circunda o esporo. Nestas microscopicamente pequenas e acidificadas áreas, em quantidades suficientes, íons de cobre são dissolvidos subsequentemente inibindo o avanço no desenvolvimento do tubo germinativo (KÖLLER, 1998).

Outro aspecto importante, de extrema importância no controle, é o tamanho das partículas de calda que chegam até o vegetal alvo. Devido à alta capacidade de dissolução, as partículas de menor tamanho foram consideradas mais tóxicas, indicando um significativo aumento da fitotoxicidade do cobre (HEUBERGER & HORSFALL, 1939).

O cobre é passivamente absorvido nas células e, por isso, acumulam-se nas células do fungo. Sua dispersão no esporo afetado varia de acordo com a espécie do fungo. Este fato está ligado à desnaturação de proteínas e enzimas como observado no

grupo sulfidríla (SOMERS, 1963). A reposição de alguns metais em enzimas de cobre é outro fator para a toxicidade do cobre (LEVI, 1977).

#### **2.3.4.2. Fungicidas sistêmicos: os benzimidazóis**

A partir dos anos 70, os primeiros fungicidas derivados dos benzimidazóis que surgiram foram o thiabendazole, o fuberidazole e o benomyl. Tais compostos exercem ação fungicida contra um grande número de patógenos que atacam as folhas das plantas, sementes e alguns originados do solo. Logo após foram introduzidos dois outros produtos deste grupo: o tiofanato e tiofanato metílico. Esses fungicidas apresentam grande similaridade, tanto em seu aspecto fungistático como em suas estruturas químicas. São ativos contra muitos fungos, incluindo os oídios, porém não apresentam ação anti-bacteriana.

Os fungicidas tiofanatos baseados em tiuréia contêm um núcleo aromático e dependem da conversão a um anel benzimidazol para exercer sua atividade anti-fúngica. Por este fato os fungicidas tiofanatos são classificados por muitos autores como fungicidas benzimidazóis.

O primeiro relato da eficiência deste grupo de fungicidas constatou, no fungicida benomyl, propriedades preventivas, curativas e sistêmicas, contra certos fungos, bem como efeito contra ácaros, além de possuir largo espectro de ação contra fungos da classe Ascomycetos (DELP & KLOPPING, 1968 abud PICININI, 1994).

O benomyl decompõe-se rapidamente em água à metil benzimidazole carbamato (MBC). Como os efeitos antifúngicos do benomyl e do MBC são semelhantes, acredita-se que o benomyl atue somente após sua conversão em MBC (CLEMONS & SISLER, 1969, abud PICININI, 1994).

A performance do tiofanato metílico e do tiofanato, no controle de doenças de plantas, é bastante semelhante à do benomyl possuindo espectro de ação muito semelhante. Devido às características similares destes produtos, sugere-se que o tiofanato metílico converta-se também ao MBC, princípio tóxico do benomyl. Quando

em solução aquosa, solução tampão ou em meio de cultura estéril, o tiofanato metílico forma o MBC lentamente. A atividade anti-fúngica e a quantidade de MBC formada aumentam com a idade da solução, entretanto, a fungitoxidade e a taxa de formação de MBC decrescem com a redução do pH. Baseado nestas informações, conclui-se que a ação anti-fúngica do tiofanato metílico depende inteiramente da formação de MBC e que tal fungicida possui o mesmo modo de ação do benomyl (NENE & THAPLYIAL, 1994).

A transformação do benomyl em MBC processa-se muito mais rapidamente do que a do tiofanato metílico, mesmo em pH 7, isto pode explicar a alta fungitoxidade do benomyl e a ocorrência de raças resistentes de fungos comuns aos dois fungicidas.

Os tiofanatos apresentam-se como um grupo de fungicidas sistêmicos que tem como base a tiuréia, derivado do ácido tialofênico. Diferentemente dos fungicidas do grupo dos benzimidazóis, os tiofanatos não apresentam um anel heterocíclico, mas são considerados como derivados do O-phenilanediamina, com um átomo de hidrogênio do grupo amino, substituído pelo grupo  $-C(S).NH.COOR$ , onde R representa um radical alcalil. Os fungicidas tiofanatos são compostos fracamente ácidos, sintetizados pela reação da O-phenilanediamina e dos ésteres isotiocianofórmicos. A estrutura química dos ácidos tialofênicos é  $NH-CSNHCOOH$ .

Até o presente momento, três fungicidas baseados na tiuréia são conhecidos: dois deles, o tiofanato (TF) e o tiofanato metílico (MTF) são amplamente utilizados no controle de doenças em frutos e em hortaliças em muitos países. O terceiro análogo, o BF-48, foi desenvolvido mais tarde (NENE & THAPLYIAL, 1994).

O tiofanato metílico é um fungicida sistêmico levemente solúvel em água, forma complexos com sais de cobre, sua DL50 é de 7500mg/kg por via oral em ratos, pode irritar os olhos e a pele. Seu peso molecular é de 342,4 e é tóxico a peixes.

O tiofanato metílico não pertence estruturalmente ao grupo dos benzimidazóis, entretanto, o estudo de sua transformação e seu espectro anti-fúngico sugere que este produto atua via alquil benzimidazole carbamato, o MBC (carbendazim) e seu análogo o EBC. Aplicado nas plantas, decompõem-se em 2-metoxycarbonilamino-benzimidazol (carbendazim - MBC). Em solução aquosa ou em solução nutritiva estéril, o MTF

converte-se lentamente a MBC. A taxa desta conversão diminui consideravelmente com o decréscimo do pH da solução. A transformação em MBC ocorre também quando a solução do fungicida é irradiada por ultravioleta ou sob luz solar.

O MTF substitui o tiofanato em várias funções, pois possui grande atividade fungicida e grande poder sistêmico. Quimicamente, o MTF é o 1,2-di-(3-metoxicarbonil-2-tiureído)-benzeno. É incompatível com produtos cúpricos e os de reação alcalina. Não é fitotóxico nas doses recomendadas e atua como fungicida protetor, curativo e sistêmico. Pode aumentar a cor verde das plantas e ainda pode ser aplicado no solo. É bastante estável à luz solar e possui um longo poder residual. Possui atividades acaricidas e nematocidas. Previne danos causados por ozônio (PICININI, 1994).

Os benzimidazóis são fungicidas que são absorvidos e translocados com facilidade pelas plantas, no entanto, o uso de adjuvantes ou de surfactantes, bem como a observância de fatores como o pH da formulação, por exemplo, poderão elevar a solubilidade e a absorção dos produtos, proporcionando aumento na performance do controle de doenças em algumas culturas. O movimento transcuticular nos benzimidazóis decresce na seguinte ordem: MTF > TF > Benomyl > MBC > TBZ (ZOLEL & EDGITON, 1972 apud PICININI, 1994).

O modo de entrada dos benzimidazóis na célula do fungo não é bem conhecido, no entanto, assume-se que o seja por difusão e que o movimento através da membrana seria em função da solubilidade dos lipídios na molécula, que é dependente do pH da concentração de H<sup>+</sup>. Quando o pH foi de 4,5 a fungitoxidade observada foi relativamente menor pelo fato de as moléculas estarem na forma ionizada, no entanto, com o pH em índices de 8,6 as moléculas dos benzimidazóis estariam na forma não dissociada, sendo, portanto, mais facilmente permeáveis através da membrana do fungo (SCHOOLEY & MACNEILL, 1971).

Estudos do modo de ação desses compostos concluíram que a síntese do DNA é o processo afetado e que as divisões nuclear e celular também poderiam estar envolvidas, não encontrando, portanto, efeito sobre a síntese de RNA e proteína.

Mais tarde, outros pesquisadores demonstraram que quando culturas de *Saccharomyces pastorianus* eram tratadas com MBC, as células filhas não se

separavam das células paternas, formando agregados de células terminais e alongadas. Dessa forma concluíram que, o benomyl ou MBC inibem o processo da mitose em fungos sensíveis.

O MBC atua como agente tóxico do fuso acromático, no qual se encontra um receptor macromolecular com propriedades semelhantes à tubulina. O processo de união do MBC é altamente específico e restrito a grupos sensíveis de fungos. Obviamente certa configuração específica na proteína do fuso ou no centro de formação do fuso é requerida para que haja sensibilidade a estes fungicidas. Uma pequena mudança nesta região por simples mutação gênica é suficiente para causar resistência na população dos fungos sensíveis.

O modo de ação deste grupo de fungicidas pode explicar também a diferença em sensibilidade dos organismos ao MBC, pois há grande variabilidade na afinidade pela tubulina nas diferentes espécies. O grau de afinidade é que determina se o organismo é sensível ou não a estes grupos de fungicidas. Trabalhos com *Aspergillus nidulans* provaram que a afinidade dos benzimidazóis com a tubulina é o principal fator que determina a atividade do fungicida no organismo. Quanto maior for a afinidade do fungicida benzimidazol com a tubulina, maior será a sensibilidade do organismo ao fungicida. Por outro lado, uma mutação que reduza a afinidade de ligação da tubulina com o fungicida, não afetando o funcionamento normal da tubulina origina uma linhagem resistente (DAVIDSE & FLACH, 1977).

As aplicações foliares têm sido utilizadas com sucesso com os fungicidas benzimidazóis. No Brasil, tem-se obtido bons resultados de controle da doença mediante o uso de fungicidas benzimidazóis, tanto isoladamente ou em mistura de tanque com fungicidas protetores e óleos mineral ou vegetal (GOES et al., 1990; GOES, 1998; GOES & WIT, 1999; BRAZ et al., 2000; FEICHTENBERGER et al., 2000; GOES, 2002). Esses resultados têm sido similares aos obtidos na Argentina (GARRÁN, 1996) e na África do Sul (SCHUTTE et al., 1997; TOLLIG et al., 1996). No entanto, a quantidade de frutos para o mercado *in natura* produzidos quando utilizados estes fungicidas ainda é muito baixo e seu custo muito elevado.



### 2.3.4.3. Fungicidas mesosistêmicos: as estrobilurinas

Na década de 60, observou-se que fungos de um determinado grupo conseguiam sobreviver em florestas européias. Tais fungos competiam por nutrientes com outros fungos existentes no ambiente, mas devido à produção de substâncias inibitórias, conseguiam se sobressair e sobreviver com êxito (LANGE et al., 1993). Estes fungos pertencem ao grupo de cogumelos comestíveis pertence à divisão *Basidiomycota*, e duas espécies, em especial destacam-se por suas propriedades antifúngicas: *Strobilurus tenacellus* (Pers.: Fr.) Sing e *Oudemansiella mucida* (Scha.: Fr.) Höhn. Há relatos de que tais substâncias podem ser produzidas também pelos fungos pertencentes à classe dos *Ascomycetes* (YPEMA & GOLD, 1999).

Existem na atualidade 16 tipos de estrobilurinas isoladas e caracterizadas. Cada molécula compreende um grupo (*E*)-methyl  $\beta$ -methoxyacrylate ligado a uma posição  $\alpha$  de uma unidade phenylpentadienyl. O primeiro composto descoberto foi denominado mucidina, também conhecido como estrobilurina A. Por apresentar uma estrutura muito simples, todas as outras estrobilurinas conhecidas podem ser consideradas variantes desse composto. Na maioria dos casos, ocorre a variação de um anel benzeno, com a substituição de uma simples hidroxidrilal ou complexa (HUTSON & MIYAMOTO, 1998).

Os fungicidas derivados destes compostos atuam através da inibição da respiração mitocondrial, bloqueando a transferência de elétrons entre o citocromo b e o citocromo  $c_1$  (Complexo III). Na cadeia respiratória ocorre liberação de energia livre em grande quantidade. Esta energia livre é suficiente para a biossíntese de uma molécula de ATP, assim, a interferência do fungicida impedirá a liberação de energia e conseqüentemente a formação da molécula de ATP (YPEMA & GOLD, 1999).

Dessa forma, os estádios de desenvolvimento do fungo que são mais prejudicados pelas estrobilurinas são a germinação de esporos e pré-infecção, pois são altamente exigentes em energia (BARTLET et al, 2002).

A ação na germinação de esporos das estrobilurinas explica os altos níveis de atividade preventiva que tipicamente tais fungicidas apresentam. As estrobilurinas também vêm demonstrando ação curativa contra uma gama de doenças, ou seja, há o

controle da doença mesmo após a infecção do patógeno, mas antes que os sintomas sejam visíveis. Em estudo de microscopia eletrônica, por exemplo, é geralmente evidenciada como um colapso do micélio do fungo patogênico. A atividade erradicante (controle da doença após sintomas aparentes) e/ou anti-esporulante (redução da esporulação) por vezes também é demonstrado. (PICCININI, 1994).

Apesar do fato de todas as estrobilurinas terem o mesmo modo de ação, o espectro de ação contra fungos varia amplamente. Além disso, as estrobilurinas variam em relação à proteção de plantas e outras características, como a sistemicidade (STIERL et al., 2000a).

O pyraclostrobin faz parte do grupo das estrobilurinas, análogos sintéticos da molécula natural estrobilurina A. Como as demais estrobilurinas, tal molécula tem a capacidade de inibir a germinação dos conídios, o desenvolvimento do tubo germinativo e a esporulação dos fungos.

Dentre as estrobilurinas estudadas e vendidas nas formulações de produtos comerciais, o pyraclostrobin se apresenta como uma das menos sistêmicas, sendo classificada como locosistêmica (GODWIN et al., 1992). A substância ativa é absorvida e se difunde no interior do tecido vegetal somente a curtas distâncias, formando depósitos nas áreas de cobertura cerosa da epiderme que não foram atingidas diretamente pelo fungicida (BASF, 2004).

Mesmo não sendo classificado como um fungicida sistêmico, o pyraclostrobin apresenta alta estabilidade no tecido vegetal, isto é, fica por muito mais tempo ativo. Além disso, possui liberação lenta, proporcionando elevado efeito residual (STIERL et al., 2000a).

Na África do Sul duas aplicações de kresoxin metil a 0,2g de i.a./L proporcionaram a obtenção de até 97% de frutos comercializáveis, mesmo em áreas de elevado nível de inóculo (TOLLIG et al., 1996).

Na Argentina as estrobilurinas azoxystrobin, pyraclostrobin e trifloxystrobin foram eficientes para o controle de *G. citricarpa* em limoeiro. A eficiência de cada um esteve condicionada à época de aplicação e ao fungicida incluído para o controle (FOGLIATA et al., 2004).

Em relação à severidade da doença é importante destacar que quando se compara o percentual de frutos assintomáticos obtidos nas condições da África do Sul (KOTZÉ, 1964; SCHUTTE et al., 1996; TOLLIG et al., 1996; SCHUTTE & KOTZÉ, 1997), Austrália (BERTUS, 1981) e Argentina (RODRIGUEZ & MAZZA GAIAD, 1996; GARRÁN, 1996) e os obtidos no Brasil (GOES & WIT, 1999; SPÓSITO, 2003), verifica-se que nesses países, o nível de incidência e severidade da doença é significativamente mais baixo. Normalmente o número de frutos assintomáticos nesses países é superior a 90%, enquanto que, no Brasil, esse percentual tem sido verificado, muitas vezes, abaixo de 50%, mesmo após várias pulverizações com fungicidas (GOES, dados não publicados).

Nas condições brasileiras tais fungicidas, em determinadas combinações e períodos de aplicação, podem aumentar o peso médio de frutos e também apresentar uma menor quantidade de doença (FELIPPE et al., 2004). Níveis elevados de controle também foram obtidos em laranja 'Natal', em Conchal/SP, na safra 2003/4, onde mediante o emprego de pyraclostrobin, em duas pulverizações a 0,0375 mL/L, foi obtido 87% de frutos com zero a três lesões (GOES, dados não publicados).

No Brasil, o pyraclostrobin é normalmente aplicado após duas pulverizações de fungicidas cúpricos, realizadas em intervalos de 28 dias, sendo a primeira na fase de  $\frac{3}{4}$  de pétalas caídas. A aplicação das estrobilurinas normalmente é realizada em intervalo de 35 a 42 dias após a segunda aplicação dos fungicidas cúpricos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Fase de campo**

A primeira etapa, denominada como a fase de campo foi implantada em propriedade particular situada no município de Bebedouro, SP. As plantas cítricas utilizadas foram da variedade 'Valência', enxertadas em tangerinas 'Cleópatra', mantidas em condição de campo e sob sistema de irrigação por gotejamento.

##### **3.1.1. Condução do experimento**

No dia 18/10/07 foram ensacados 2.500 frutos com aproximadamente 14,5 mm de diâmetro em 50 plantas. Os experimentos referentes aos fungicidas oxicloreto de cobre e tiofanato metílico foram instalados na área experimental no dia 14/12/07 e conduzidos até o dia 26/02/08, e os experimentos referentes ao fungicida pyraclostrobin foram instalados na área experimental no dia 11/01/08 e conduzidos até o dia 15/03/08.

Durante todo o período experimental os frutos permaneceram protegidos por sacos de papel cristal para evitar qualquer infecção externa por esporos de *G. citricarpa* ou de outros fungos eventualmente presentes na área.

Para os três fungicidas foram realizados dois experimentos, onde no primeiro experimento, frutos previamente ensacados foram primeiramente imersos na calda fungicida e posteriormente inoculados com conídios de *G. citricarpa* em intervalos regulares de 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias (DAA), para o oxicloreto de cobre e de 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias (DAA), para os fungicidas tiofanato metílico e pyraclostrobin. Para o segundo experimento, frutos previamente ensacados foram primeiramente inoculados com conídios de *G. citricarpa* e posteriormente tratados por imersão em intervalos regulares de 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias (DAI), para o oxicloreto de cobre e de 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias (DAI), para os fungicidas tiofanato metílico e pyraclostrobin.

Foram utilizados 16 frutos por período de inoculações (DAA) e oito frutos por período de aplicação do fungicida (DAI), sendo para o primeiro experimento (DAA), oito frutos utilizados para a realização das análises de resíduo e oito frutos deixados na planta até a época da colheita para a avaliação da incidência da doença e severidade dos sintomas de MPC. Para o segundo experimento (DAI) somente avaliou-se a incidência da doença e severidade dos sintomas na colheita.

### **3.1.1.1. Preparo do inóculo e inoculação dos frutos**

O inóculo utilizado em todo o período experimental foi obtido do isolado patogênico de *G. citricarpa*, denominado PC 17-3, proveniente da região de Conchal, SP. O fungo foi cultivado em placas de Petri em meio batata-dextrose-ágar (BDA), e a produção de conídios deu-se em BOD com temperatura de 23°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo alternado (12h/12h). O monitoramento da esporulação do fungo foi efetuado constantemente e a confirmação da produção de conídios feita em microscópio óptico.

A suspensão conidial (inóculo) foi obtida por meio da raspagem de colônias esporuladas de *G. citricarpa* acrescentando-se 10mL de água destilada. Posteriormente, a suspensão foi filtrada em camada de dupla gaze e ajustada para  $1 \times 10^4$  conídios/mL, aferida mediante hemocitômetro (câmara de Neubauer). Antes da inoculação em campo adicionou-se à suspensão sacarose (10g/ L) e suco de laranja da variedade 'Pêra-Rio' (1% v/v) (ALMEIDA et al., 2008).

A inoculação procedeu-se por meio da aspersão do inóculo nos frutos e a quantidade de conídios foi padronizada a uma concentração média de 15 mil conídios por fruto. Após a inoculação os frutos foram protegidos por sacos de papel cristal (Figura 2).



**Figura 2.** (A) Aspersão do inóculo, contendo conídios de *Guignardia citricarpa* no fruto e (B) proteção do respectivo fruto, contra inóculo proveniente da área experimental, com sacos de papel cristal. Bebedouro, SP - 2007.

### 3.1.1.2. Preparo da calda e aplicação dos fungicidas

Os fungicidas utilizados foram o cúprico oxiclreto de cobre (protetor), o benzimidazol tiofanato metílico (sistêmico) e a estrobilurina pyraclostrobin (mesosistêmico). Os produtos comerciais utilizados foram: Cobox® (870g/kg ou 87% m/m do ingrediente ativo oxiclreto de cobre; 500g/kg ou 50% m/m equivalente em cobre metálico), na formulação granulado dispersível, na dosagem de 2g de p.c./L; Cercobin® 500 (500g/L do ingrediente ativo tiofanato metílico), na formulação suspensão concentrada, na dosagem de 0,75mL de p.c./L; Comet® (250g/L ou 25% m/v do ingrediente ativo pyraclostrobin), na formulação concentrado emulsionável, na dosagem de 0,15mL de p.c./L.

O preparo das caldas fungicidas foi realizado conforme as condições especificadas no rótulo dos produtos acrescentando-se 0,5% (v/v) do óleo mineral Assist®, para os fungicidas oxiclreto de cobre e pyraclostrobin e 0,5% (v/v) do óleo mineral Iharol® para o fungicida tiofanato metílico. As aplicações procederam-se sob a forma de imersão e o tempo de contato dos frutos com os fungicidas foi padronizado em 10 segundos. Após o escoamento do excedente de calda os frutos foram ensacados.

### **3.1.1.3. Obtenção das amostras de campo**

As amostras, de oito frutos, foram retiradas sempre uma semana após os tratamentos, ou seja, após as inoculações ou aplicações dos fungicidas. Os frutos foram depositados diretamente em sacos plásticos anulando-se a possibilidade de perdas do ingrediente ativo na superfície dos frutos. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em freezer com temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) até o momento da realização das análises de resíduo.

## **3.2. Fase analítica**

### **3.2.1. Oxicloreto de cobre**

A segunda etapa, denominada como fase analítica, para o fungicida oxicloreto de cobre foi realizada no laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Fitossanidade da FCAV/UNESP. As análises de resíduos foram realizadas por técnica de Espectrofotometria de Absorbância Atômica, com o intuito de se quantificar o remanescente de íons de cobre na superfície dos frutos. Além dessas análises, os frutos foram individualmente avaliados em peso, diâmetro, volume e área.

Para a quantificação dos resíduos de cobre, as amostras coletadas em campo foram divididas em quatro sub-amostras de dois frutos cada. Desta forma, cada tratamento constituiu-se de quatro repetições. Posteriormente, cada sub-amostra foi submersa em 0,25L de HCl 2N, permanecendo em repouso por quatro horas. Após tal procedimento, as suspensões foram filtradas e em seguida levadas ao Espectrofotômetro de Absorbância Atômica, GBC 932 AA, onde se quantificou os íons de cobre remanescentes por meio de comparações com os padrões internos de 0,125; 0,250; 0,500; 1,00; 2,00 e 3,00 mg de cobre/L de HCL 2N. O processamento dos dados foi realizado pelo software GBC Avanta versão 1.3.3.

### **3.2.2. Tiofanato metílico**

A segunda etapa, denominada como fase analítica, para o fungicida tiofanato metílico foi realizada no laboratório de análises de resíduos da empresa AGROSAFETY Monitoramento Agrícola Ltda, Piracicaba, SP. As análises de resíduos foram realizadas por técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de massas/massas (CLAE - EM/EM) na superfície e casca dos frutos. Além dessas análises, os frutos foram individualmente avaliados em peso, diâmetro, volume, área e rendimento em casca. As substâncias de referência analisadas e quantificadas pela técnica foram tiofanato metílico (MTF) e seu metabólito carbendazim (MBC).

#### **3.2.2.1. Preparo e processamento das amostras**

##### **A. Superfície dos frutos**

Para a remoção dos resíduos deslocáveis da superfície, os frutos das amostras foram lavados com solução de surtem (dioctilsulfocinato de sódio, 70%). A quantidade de solução foi padronizada em 300mL para cada amostra e a lavagem dos frutos deu-se em três etapas. Em cada etapa adicionou-se 100mL da solução de surtem no próprio saco plástico utilizado na coleta, sob agitação por 30 segundos. Logo em seguida, o líquido das lavagens foi transferido para recipientes plásticos e acondicionados em câmara fria à -20°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ).

##### **B. Casca dos frutos**

À medida que se procedeu às lavagens determinou-se, o peso individual, o diâmetro e o volume dos frutos. Para determinação do volume os frutos foram, individualmente, mergulhados numa proveta graduada contendo água, onde, o líquido



deslocado foi considerado igual ao volume do fruto cítrico. Finalizada as medições separou-se a casca dos frutos (periderme = exoderme + albedo) da polpa, ainda congelados.

O processamento das amostras constituiu-se em triturar a quantidade de casca obtida, para cada tratamento, com gelo seco, em triturador de alta potência (*cutter*). Após serem trituradas estas foram peneiradas, identificadas e armazenadas em câmara fria, onde se esperou por 12 horas a sublimação do gelo seco contido nas amostras. Desta forma, pôde-se obter a homogeneização do ingrediente ativo em todo o conteúdo amostral.

### **3.2.2.2. Método analítico**

A quantificação do resíduo de tiofanato metílico (MTF) e seu metabólito carbendazim (MBC), presentes na superfície e casca dos frutos foi realizada conforme o Procedimento Operacional Padrão de Determinação de Multiresíduos em Hortifruti e Sucos por CLAE-EM/EM de tiofanato metílico e carbendazim, na matriz citros (POPMET021), com algumas adaptações. Tal metodologia é utilizada pelo laboratório de análises de resíduos da AGROSAFETY Monitoramento Agrícola Ltda, Piracicaba, SP.

#### **A. Superfície dos frutos**

Os recipientes contendo o líquido das lavagens dos frutos foram retirados da câmara fria e aclimatados à temperatura ambiente (25°C). Ulteriormente, retiraram-se dos recipientes das amostras alíquotas de 1mL, transferindo-as para vidrarias específicas contendo 9ml de acetonitrila/água (7:3). Os tubos foram encaminhados para a mesa agitadora, onde se procedeu a homogeneização das alíquotas. Parte destes homogeneizados foram filtrados e transferidos para frascos de injeção próprios para CLAE – EM/EM, sendo em seguida injetados no sistema cromatográfico.

## **B. Casca dos frutos**

Em recipientes de extração devidamente esterilizados (tubos *shotts*), pesou-se 10g de cascas processadas de cada amostra. Em seguida, realizou-se a extração dos ingredientes ativos das amostras, por meio da adição de 100mL de metanol, sob agitação contínua, por um minuto, em homogeneizador (Turrax). Tais amostras foram centrifugadas por 10 minutos a aproximadamente 1400 rpm.

A próxima etapa consistiu na transferência de 1mL do sobrenadante das amostras centrifugadas para vidrarias graduadas, onde ocorreu a evaporação das alíquotas em chapa aquecedora a 34°C, sob injeção de ar comprimido. Os extratos secos obtidos foram ressuspensos em 1mL de acetonitrila/água (7:3), homogeneizados e filtrados para frascos de injeção próprios para CLAE – EM/EM, sendo em seguida injetados no sistema cromatográfico.

### **3.2.2.3. Monitoramento dos resíduos**

A validação de um método analítico consiste na elucidação, por meio da concordância com padrões pré-estabelecidos, de que os requisitos ou parâmetros avaliados em laboratório foram atendidos para determinada fonte de análise. Esse procedimento é de extrema importância, pois serve de relato comprobatório das condições de análise do estudo, bem como balizador, instituindo a faixa de trabalho a ser utilizada e o limite de detecção (LOD) do método.

Anteriormente a injeção das amostras de líquido da superfície e casca dos frutos no sistema cromatográfico, realizou-se a validação do procedimento analítico para as substâncias de referência tiofanato metílico e carbendazim, no limite de quantificação (LOQ) proposto pelo estudo. As avaliações dos parâmetros laboratoriais foram

realizadas por meio da injeção da amostra controle<sup>3</sup> no sistema cromatográfico. Desta forma, os parâmetros avaliados foram:

- Seletividade: possibilitou a verificação da presença ou ausência de interferentes no processo analítico provenientes de solventes, vidrarias e reagentes. A avaliação deste parâmetro consistiu na análise do branco de testemunha, representado por uma amostra com ausência da matriz citros e dos analitos tiofanato metílico e carbendazim.
- Precisão de Medição: avaliou a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, em condições experimentais pré-definidas. As duas formas mais usadas para expressá-la são por meio da repetitividade e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo (INMETRO, 2003). Para o estudo em questão, tal parâmetro foi determinado por desvios padrão relativos (DPR, %) e coeficientes de variação percentual (CV, %) em relação à média, obtidos dos resultados de tempo de retenção (RT) e resposta do detector em área, respectivamente. O estudo foi balizado pela injeção de uma das soluções padrões de calibração em mistura (SPCm) consecutivamente, em cinco replicatas (n=5), no CLAE/EM/EM, considerando-se aceitável  $D_{vp} \leq 3\%$  e  $CV\% \leq 5\%$ .
- Faixa Linear de Trabalho: é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a detecção com exatidão, precisão e linearidade exigidas, sob as condições experimentais utilizadas. Tal intervalo deve cobrir a faixa de aplicação do ensaio a ser realizado. Os valores medidos devem estar linearmente correlacionados às concentrações. Isso requer que os valores medidos próximos ao limite inferior da faixa de trabalho possam ser distinguidos dos brancos de testemunha do método. As soluções padrão de calibração (SPC) foram elaboradas com o intuito de se obter concentrações conhecidas dos analitos, ou substâncias de

---

<sup>3</sup> A amostra controle caracterizou-se por uma amostra de fruto total de citros isenta de resíduos de tiofanato metílico e carbendazim.

referência, para a construção da curva de calibração (concentração x resposta do detector), por meio da injeção dos padrões no equipamento. Os padrões de calibração utilizados foram: 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,00 pg/mL (dissolvidos em acetonitrila) e representaram, respectivamente, em valores aproximados  $\frac{1}{2}$  LOQ, LOQ, 2 LOQ, 5 LOQ e 10 LOQ.

- Exatidão: é definido como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Os procedimentos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são: uso de materiais de referência, participação de ensaios laboratoriais e realização de ensaios de recuperação, em três níveis de fortificação com sete repetições cada (INMETRO, 2003). Para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos exige-se um mínimo de dois níveis de fortificação com cinco repetições nos estudos de recuperação e validação de métodos (ANVISA, 2006). O intervalo de aceitabilidade para os valores individuais de recuperação é de 70 a 110% (EUROPEAN COMMISSION, 2000b) ou valores de variabilidade para a determinação da aceitabilidade de métodos de recuperações entre 70 a 120% (ANVISA, 2006). Neste estudo, a tendência foi determinada com base nos resultados de recuperação analítica (%), realizada em dois níveis de fortificação, com cinco repetições cada.
- Limite de Quantificação (LOQ): é definido como a menor concentração do analito em uma amostra que se pode determinar com precisão aceitável (EUROPEAN COMMISSION, 2000a). O intervalo de aceitabilidade para os valores individuais de recuperação para cada nível de fortificação é de 70 a 110% e o CV% em relação à média para cada nível estudado deve ser igual ou menor que 15% ou valores de recuperação entre 70 a 120 % (EPA, 1996). O LOQ, após ser determinado pela curva e análise da matriz, foi testado com a adição dos analitos (tiofanato metílico e seu metabólito carbendazim) às amostras controle. As análises foram realizadas com cinco repetições e foram calculadas as recuperações em porcentagem, as médias e o desvio padrão para a verificação

da aceitabilidade dos resultados. O LOQ proposto pelo método foi de 0,01 mg/Kg.

- Limite de Detecção (LOD): é definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (EUROPEAN COMMISSION, 2000a).

Após o teste de validação do método, as amostras de água de lavagem e casca dos frutos foram injetadas no equipamento. As condições cromatográficas foram otimizadas de modo a se obter um cromatograma com resolução adequada para os picos de interesse e as determinações foram feitas no espectrômetro de massas. As análises foram realizadas em modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), selecionando-se duas transições de massa/carga ( $m/z$ ).

A aquisição e tratamento dos dados foram realizados com software Analyst® versão 1.4.1. Com a obtenção dos dados no software, as quantidades de tiofanato metílico e carbendazim remanescente nas amostras foram calculadas em miligrama dos ingredientes ativos por litro de solução, para os dados de resíduo encontrados na superfície dos frutos (mg/L), e em miligrama dos ingredientes ativos por quilograma de casca, para os dados de resíduo encontrados na casca dos frutos (mg/kg).

### **3.2.3. Pyraclostrobin**

A segunda etapa, denominada como fase analítica, para o fungicida pyraclostrobin, foi realizada no laboratório de análises de resíduos da BASF (*Global Environmental and Consumer Safety Laboratory - GENCS*), Guaratinguetá, SP. As análises de resíduos foram realizadas por técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de massas/massas (CLAE - EM/EM) na superfície, casca e polpa de frutos. Além dessas análises, os frutos foram individualmente avaliados em peso, diâmetro, volume, área e rendimento em casca e polpa. As

substâncias de referência analisadas e quantificadas pela técnica foram pyraclostrobin (BAS 500F) e seu metabólito BF 500-3.

### **3.2.3.1. Preparo e processamento das amostras**

#### **A. Superfície dos frutos**

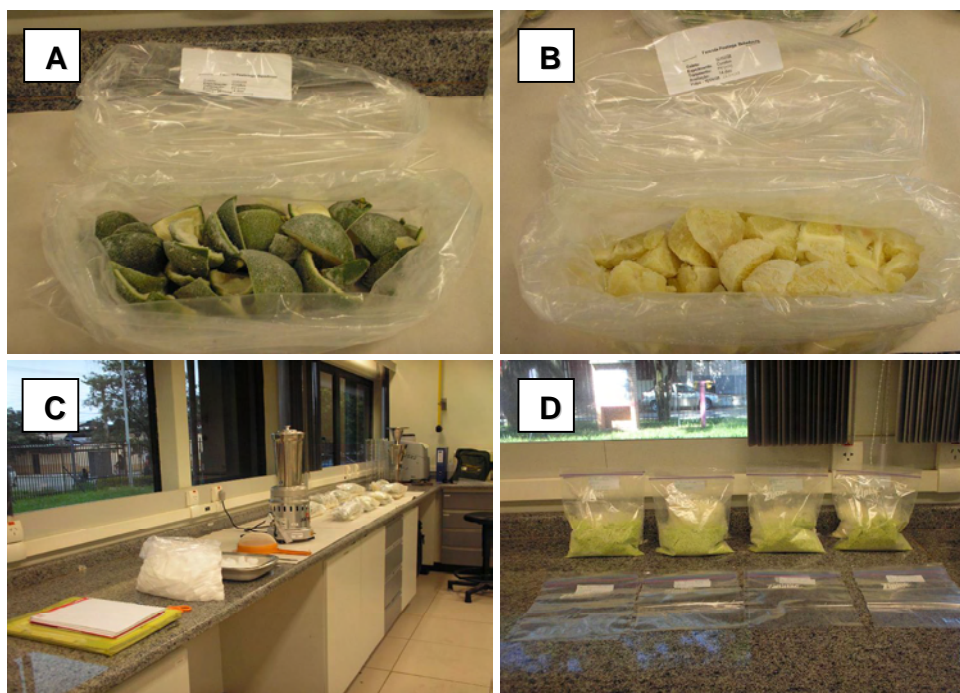
Para a remoção dos resíduos deslocáveis da superfície, os frutos das amostras foram lavados com solução de extração específica para o fungicida pyraclostrobin (metanol: água: HCl 2mol/L, 70/25/5, v/v/v). A quantidade de solução foi padronizada em 400mL para cada amostra e a lavagem dos frutos deu-se em duas etapas. Em cada etapa adicionou-se 200mL da solução no próprio saco plástico utilizado na coleta, sob agitação por 30 segundos. Logo em seguida, o líquido das lavagens foi transferido para recipientes plásticos e acondicionados em câmara fria à -20°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ).

#### **B. Casca e polpa dos frutos**

À medida que se procedeu às lavagens determinou-se o peso individual, o diâmetro e o volume dos frutos. Para determinação do volume os frutos foram, individualmente, mergulhados numa proveta graduada contendo água, onde, o líquido deslocado foi considerado igual ao volume do fruto cítrico. Finalizada as medições de todos os frutos, estes foram separados em casca (periderme = exoderme + albedo) e polpa, ainda congelados (Figura 3A e 3B). Tanto a casca como a polpa foi pesada separadamente para se obter o rendimento.

O processamento das amostras constituiu-se em triturar a quantidade de casca e polpa obtidas para cada tratamento com gelo seco, em liquidificador de alta rotação. Após serem trituradas estas foram peneiradas, identificadas e armazenadas em câmara fria, onde se esperou por 12 horas a sublimação do gelo seco contido nas amostras.

Desta forma, pôde-se obter a homogeneização do ingrediente ativo em todo o conteúdo amostral (Figura 3C e 3D).



**Figura 3.** Casca e polpa de frutos de laranja 'Valência' separadas e congeladas prontas para o processamento, respectivamente (A) e (B). Materiais e equipamentos utilizados para o processamento e homogeneização das amostras (C) e quantidades de casca e polpa obtidas após o processamento (D). BASF - Guaratinguetá, SP - 2008.

### 3.2.3.2. Método analítico

A quantificação do resíduo de pyraclostrobin (BAS 500F) e seu metabólito (BF 500-3) presente na superfície, casca e polpa dos frutos foi realizada conforme o Procedimento Operacional Padrão de Determinação de Resíduos de BAS 500F (pyraclostrobin) e o seu metabólito BF 500-3 em matriz citros (POP-PA.0243), com

algumas adaptações. Tal metodologia é utilizada pelo laboratório de análises de resíduos da BASF (*Global Environmental and Consumer Safety Laboratory – GENCS*), Guaratinguetá - SP.

### **A. Superfície dos frutos**

O líquido das lavagens dos frutos foi retirado da câmara fria, aclimatado à temperatura ambiente (25°C) e avolumado para 500mL em balão volumétrico calibrado, padronizando-se um volume fixo para todas as amostras (Figura 4A).

Foram retiradas alíquotas de 4mL dos balões volumétricos, transferindo-as para tubos de centrífuga contendo 2mL de água e 10mL de ciclohexano. Os tubos foram encaminhados para a mesa agitadora, onde se realizou a partição das amostras por 15 minutos.

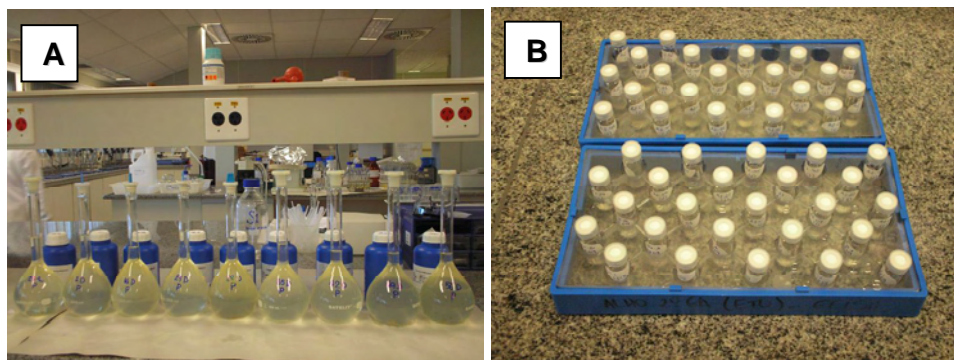
Finalizada a partição, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a aproximadamente 2000 rpm. Novamente uma alíquota de 4mL foi retirada do sobrenadante e transferida para vidraria específica, onde se realizou a concentração da mesma em turbo Vap, a 40°C.

A ressuspensão das amostras foi realizada a partir da adição de 0,250mL de solução de diluição final<sup>4</sup> e transferidas para frascos de injeção próprios para CLAE - EM/EM, sendo injetados no sistema cromatográfico (Figura 4B).

---

<sup>4</sup> 50% da fase móvel A (0,1% de ácido fórmico em água) + 50% da fase móvel B (0,1% de ácido fórmico em metanol).





**Figura 4.** Padronização do produto das lavagens da superfície dos frutos (A). Amostras em frascos de análises próprios para injeção no sistema cromatográfico (CLAE - EM/EM) (B). BASF - Guaratinguetá, SP - 2008.

## B. Casca e polpa dos frutos

Em recipientes de extração devidamente esterilizados, pesou-se 5g de cascas e polpas processadas de cada amostra. A extração dos ingredientes ativos realizou-se, por meio da adição de 100mL de solução de extração específica (metanol: água: HCl 2mol/L, 70/25/5 v/v/v), sob agitação contínua (Turrax), por cinco minutos. O líquido das extrações foi centrifugado por 10 minutos a aproximadamente 2000 rpm.

A próxima etapa consistiu na transferência de 4mL do sobrenadante das amostras centrifugadas para vidrarias específicas, contendo 2mL de água e 10mL de ciclohexano, no qual se realizou a partição em mesa agitadora por 15 minutos. Finalizada a partição, as amostras foram novamente centrifugadas. Uma alíquota de 4mL foi retirada do sobrenadante das amostras centrifugadas e concentradas até a secura, em turbo Vap a 40°C.

Os extratos secos obtidos foram ressuspensos em 1mL de solução de diluição final, homogeneizados e filtrados para frascos de injeção próprios para CLAE – EM/EM, sendo injetados no sistema cromatográfico.

### 3.2.3.3. Monitoramento dos resíduos

Os padrões analíticos utilizados foram pyraclostrobin (BAS 500F) e seu metabólito (BF 500-3), ambos produzidos pela BASF Aktiengesellschaft, com pureza de 99,9% e 100%, respectivamente, de acordo com o certificado de análise emitido pelo laboratório de análises de resíduos da BASF (Global Environmental and Consumer Safety Laboratory - GENCS), em Guaratinguetá.

A validação do método para o BAS 500F e seu metabólito BF 500-3 seguiram as mesmas etapas apresentadas para o ingrediente ativo tiofanato metílico e seu metabólito carbendazim, descritos no item 3.3.2.3. Dessa forma, apresentam-se a seguir somente os detalhes divergentes dos parâmetros analisados:

- Seletividade: a amostra controle foi considerada aquela que obteve o maior desempenho dentre as características avaliadas, sendo ela uma amostra de fruto total de citros identificada como 1819 LPA 015 – 27A.
- Faixa Linear de Trabalho: os padrões de calibração utilizados foram: 0,40; 0,80; 1,60; 4,00 e 8,00 ng/mL e representaram, respectivamente, em valores aproximados  $\frac{1}{2}$  LOQ, LOQ, 2 LOQ, 5 LOQ e 10 LOQ.
- Exatidão: neste estudo, a tendência foi determinada com base nos resultados de recuperação analítica (%), realizada em dois níveis de fortificação. Os níveis de fortificação (NF) são valores associados ao limite de quantificação (LOQ), tanto que o primeiro nível de fortificação ou NF=1, sempre será correspondente a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis. Os NF utilizados foram o NF=1, que representou o valor do LOQ proposto para tal estudo (0,01 mg/Kg), e o NF=8, que representou 4000 vezes o valor do LOQ proposto, com cinco repetições cada.
- Limite de Quantificação (LOQ): o LOQ, após ser determinado pela curva e análise da matriz, foi testado com a adição dos analitos (pyraclostrobin e seu metabólito BF 500-3) às amostras controle. As análises foram realizadas com cinco repetições, as recuperações foram calculadas em porcentagem e as

médias e o desvio padrão para a verificação da aceitabilidade dos resultados. O LOQ proposto pelo método foi de 0,01 mg/Kg.

As condições cromatográficas foram otimizadas de modo a se obter um cromatograma com resolução adequada para os picos de interesse (pyraclostrobin e BF 500-3). As determinações foram feitas em espectrômetro de massas triploquadrupolo API 4000™ (Applied Biosystems/ MDS Sciex). A técnica de *electrospray* no modo de íons positivos foi utilizada para a ionização das substâncias de referência.

As análises foram realizadas em modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), selecionando 2 transições de massa/carga ( $m/z$ ). As transições de massa para pyraclostrobin e seu metabólito (BF 500-3) foram, 388/194 e 358/164, respectivamente.

O cálculo da quantidade de resíduo contido nas amostras foi baseado nas respostas do detector (área ou altura) dos princípios ativos (BAS 500F e BF 500-3) relativo à respectiva injeção da amostra no sistema CLAE-EM/EM. A aquisição e tratamento dos dados foram realizados com software Analyst® versão 1.4.1. Após o tratamento dos dados as quantidades de resíduo de BAS 500F foram ajustadas pela fórmula:  $BAS\ 500F + 1,08 * BF\ 500-3$ , onde somou-se a quantidade de resíduo encontrada de BF 500-3 a cada amostra analisada.

Com a obtenção dos dados no software, a quantidade de pyraclostrobin remanescente nas amostras foi calculada em miligrama do ingrediente ativo por litro de solução, para os dados de resíduo encontrados na superfície dos frutos (mg/L), e em miligrama do ingrediente ativo por quilograma, para os dados de resíduo encontrados na casca e polpa dos frutos (mg/kg).

### **3.3. Fase de avaliações**

Além das avaliações da quantidade de resíduos dos fungicidas, avaliou-se, após a colheita dos frutos, a capacidade protetora e fungistática do oxiclóreto de cobre e a

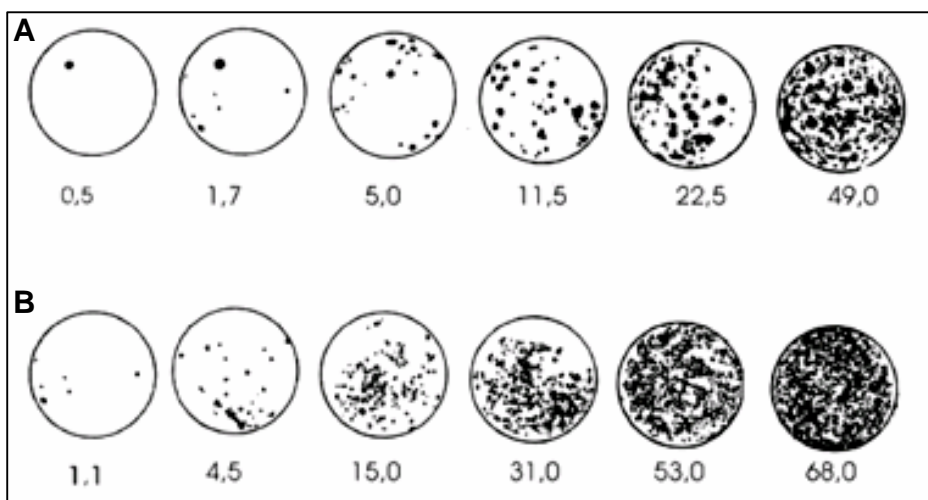
capacidade preventiva e curativa do tiofanato metílico e pyraclostrobin. Para tal as variáveis analisadas foram:

- Incidência da doença: considerou-se como a porcentagem de frutos com algum tipo de sintoma da MPC.
- Severidade: para a avaliação dos sintomas de mancha dura e falsa melanose utilizou-se a diagramática (Figura 5). Para a avaliação dos sintomas do tipo mancha sardenta considerou-se escala desenvolvida mediante observações experimentais do presente trabalho. A severidade foi expressa em índice de doença (ID), conforme WHEELER (1969) sendo:

$$ID = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^m i.n_i, \text{ onde:}$$

ID = índice de doença; N = número total de frutos avaliados; i = nota da doença; ni = número de frutos com nota i; m = nota máxima.

- Tipos de sintoma predominantes da MPC



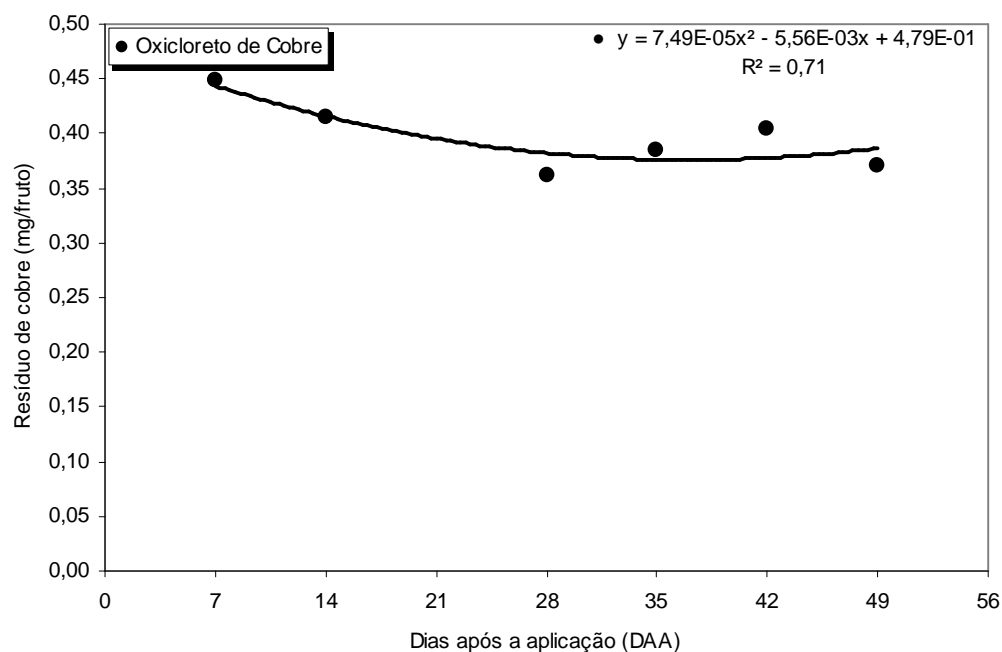
**Figura 5.** Escala diagramática para avaliação da severidade (%) da MPC (*Guignardia citricarpa*). Sintomas do tipo mancha dura (**A**) e sintomas do tipo falsa melanose (**B**) (SPÓSITO et al., 2004).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Oxicloreto de cobre

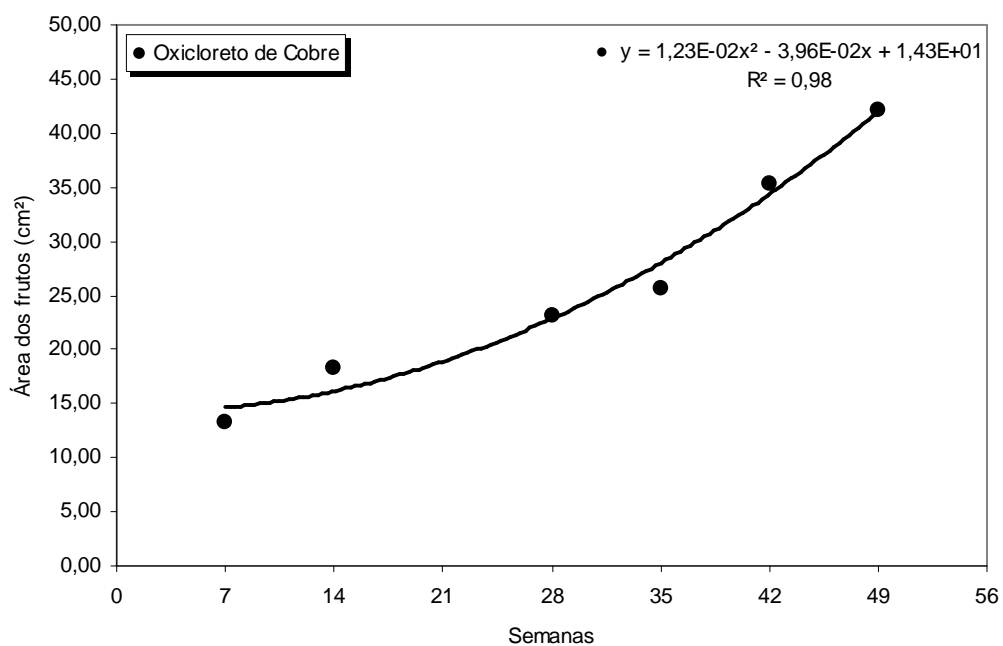
#### 4.1.1. Monitoramento dos resíduos

Avaliando-se os teores residuais de cobre existentes nos frutos (mg/fruto), observou-se que, temporalmente, a quantidade de cobre não demonstrou grandes variações durante as semanas de avaliação, denotando, dessa forma, perdas pequenas da quantidade inicial de calda fungicida ao longo do tempo (Figura 6).

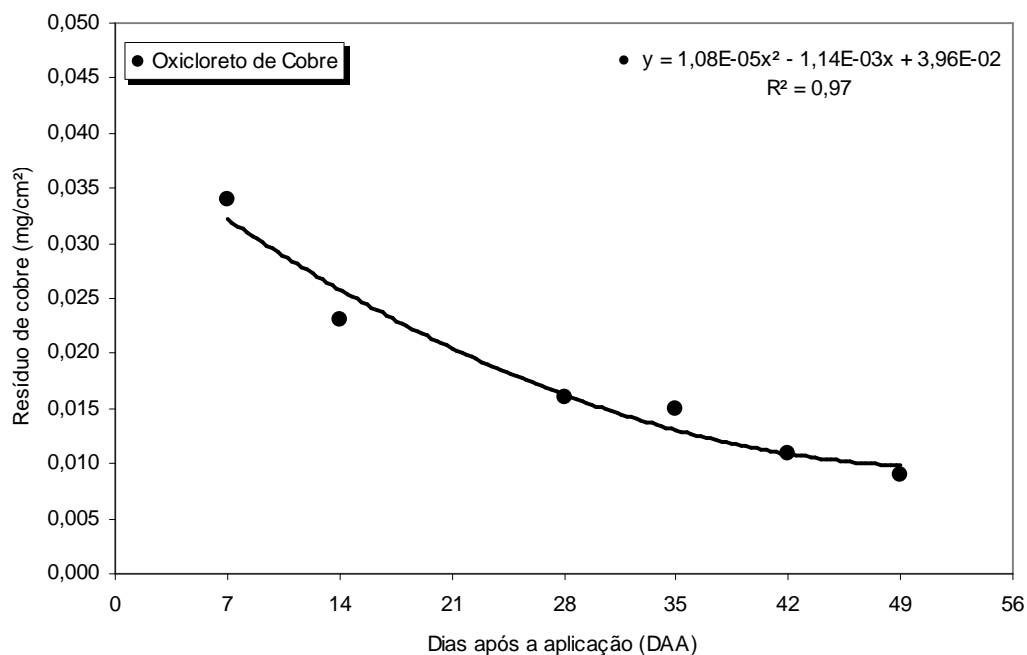


**Figura 6.** Quantidades residuais de cobre existentes nos frutos de laranja 'Valência' (mg/fruto), após aplicação de oxicloreto de cobre, sob a forma de imersão. Jaboticabal, SP – 2008.

Porém, quando os teores residuais de cobre foram relacionados com o crescimento dos frutos (Figura 7), ou seja, obtendo-se a quantidade remanescente de cobre por área ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ), verificou-se que, o resíduo encontrado diminuiu consideravelmente ao longo do tempo (Figura 8).



**Figura 7.** Curva de crescimento dos frutos de laranja 'Valência' ( $\text{mg}/\text{fruto}$ ), entre a primeira semana de avaliação (7DAA) até a sétima semana de avaliação (49DAA). Jaboticabal, SP – 2008.

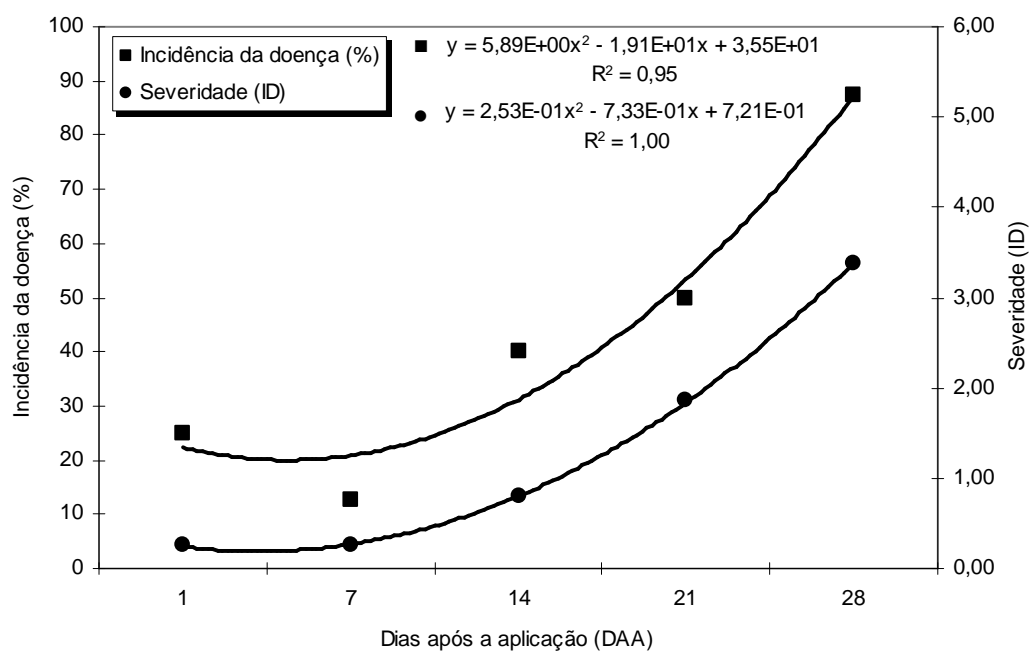


**Figura 8.** Quantidades residuais de cobre existentes na área dos frutos de laranja 'Valência' (mg/fruto), após aplicação de oxicloreto de cobre, sob a forma de imersão. Jaboticabal, SP – 2008.

#### 4.1.2. Capacidade protetora

Em todos os períodos de avaliação, inclusive 24 horas após a aplicação do fungicida oxicloreto de cobre (1DAA), os frutos avaliados apresentaram sintomas típicos da doença, porém com severidade muito baixa (ID=0,3), predominando 80% de frutos assintomáticos (Figura 9).

A incidência e a severidade aumentaram temporalmente, sendo observada, aos 28 dias da aplicação (28 DAA), a presença de 87,5% dos frutos com ID=4, considerada elevada e suficiente para ocasionar expressiva queda de frutos (FAGAN & GOES, 2000) (Figura 9). Os sintomas predominantes em todas as semanas de avaliação foram do tipo falsa melanose e mancha sardenta.



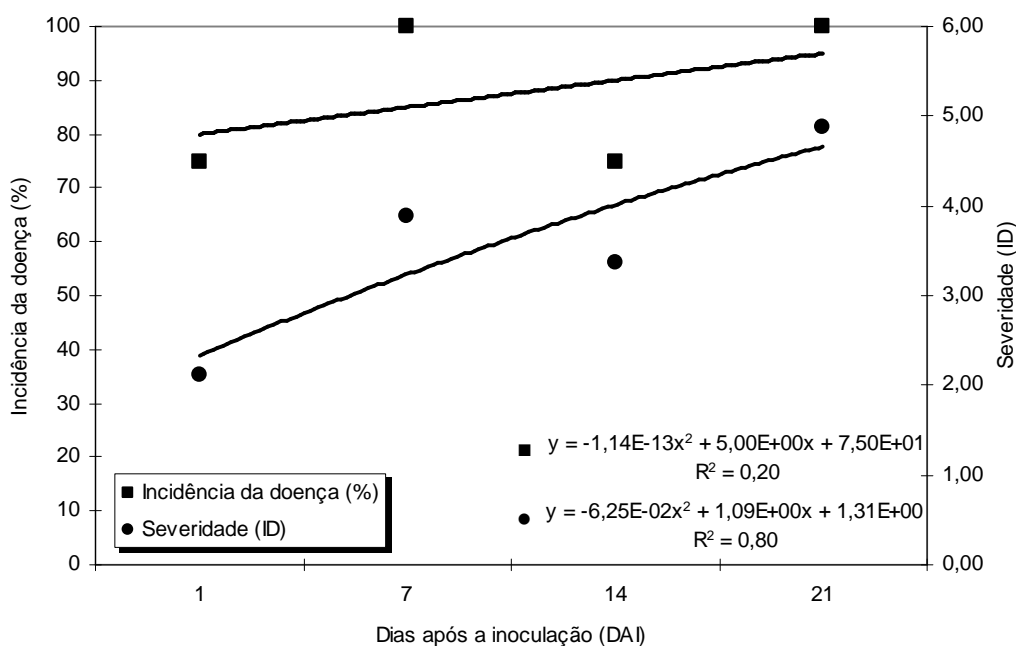
**Figura 9.** Efeito das aplicações protetoras do fungicida oxicloreto de cobre na incidência (%) e severidade (ID) da MPC nos frutos de laranja 'Valência'. Jaboticabal, SP – 2008.

#### 4.1.3. Capacidade fungistática

Em todos os períodos de avaliação observou-se a presença da doença nos frutos avaliados, variando entre 75 a 100% de frutos sintomáticos. Mesmo com a aplicação do fungicida 24 horas após a inoculação (1DAI), houve a presença de 75% de frutos sintomáticos, com níveis elevados de severidade (ID=2) (Figura 10).

A severidade aumentou ao longo das semanas de avaliação, apresentando-se, aos 21 dias após a inoculação (21DAI) a presença de 100% de frutos sintomáticos com ID=5, considerado muitíssimo elevado (Figura 10). Os sintomas predominantes em todas as semanas de avaliação foram do tipo mancha dura e mancha virulenta.





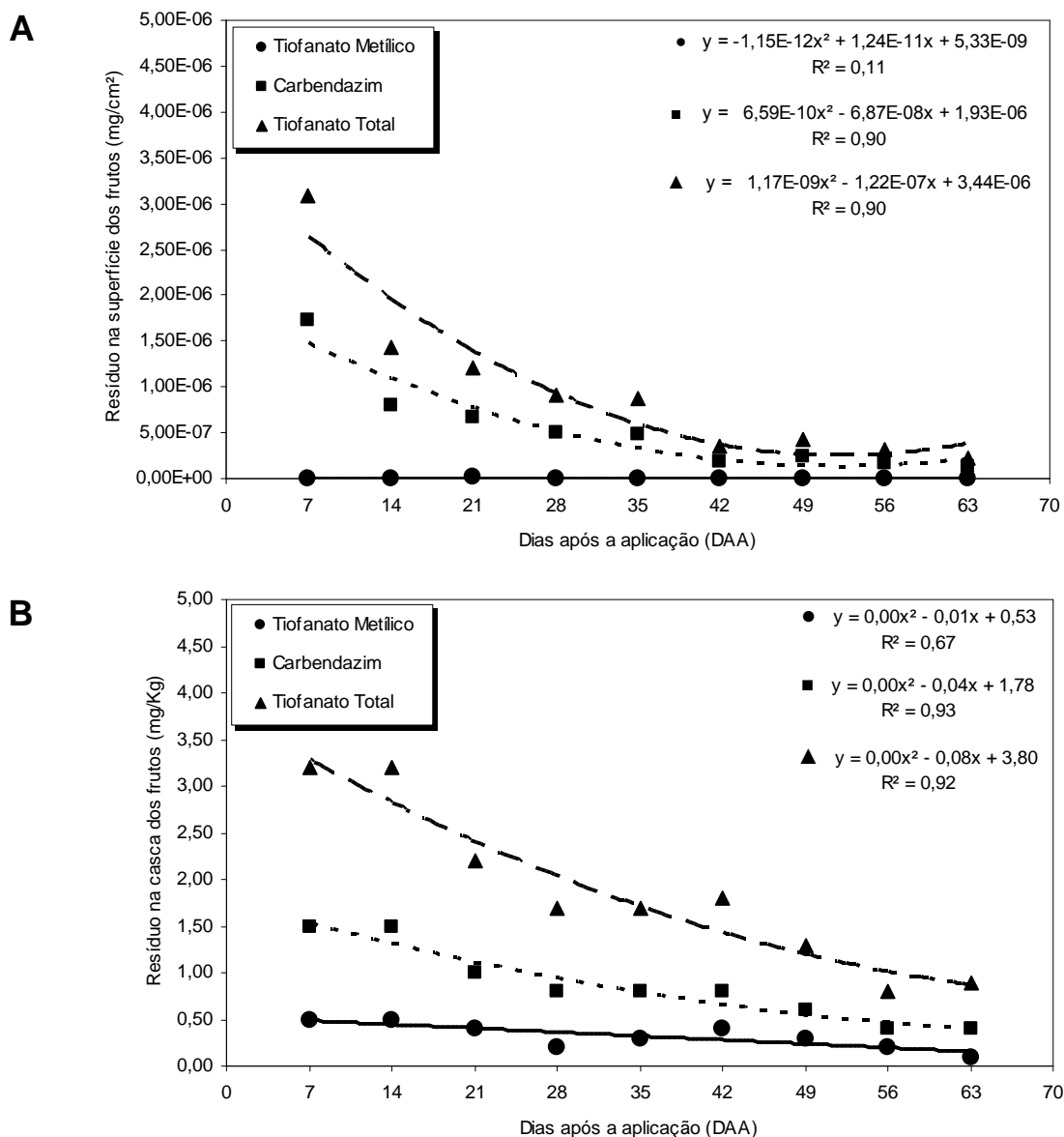
**Figura 10.** Efeito das aplicações de oxiclreto de cobre na incidência (%) e severidade (ID) da MPC, após a inoculação dos frutos de laranja 'Valência', em diferentes intervalos de tempo. Jaboticabal, SP – 2008.

## 4.2. Tiofanato metílico

### 4.2.1. Monitoramento dos resíduos

Os dados referentes às quantidades residuais de tiofanato metílico (MTF) e seu metabólito carbendazim (MBC) na superfície e casca dos frutos, encontram-se contidos nas Figuras 11A e 11B, respectivamente.

O fungicida tiofanato metílico, aos sete dias após a aplicação nos frutos (7DAA), a quantidade de resíduo na casca (Figura 11B), tanto de tiofanato metílico, como de seu metabólito carbendazim foi muito mais elevada do que as quantidades presentes na superfície dos frutos (Figura 11A).



**Figura 11.** Quantidades residuais de tiofanato metílico e seu metabólito carbendazim na superfície (mg/cm<sup>2</sup>) (A) e na casca (mg/kg) (B) de frutos de laranja 'Valência'. Jaboticabal, SP – 2008.

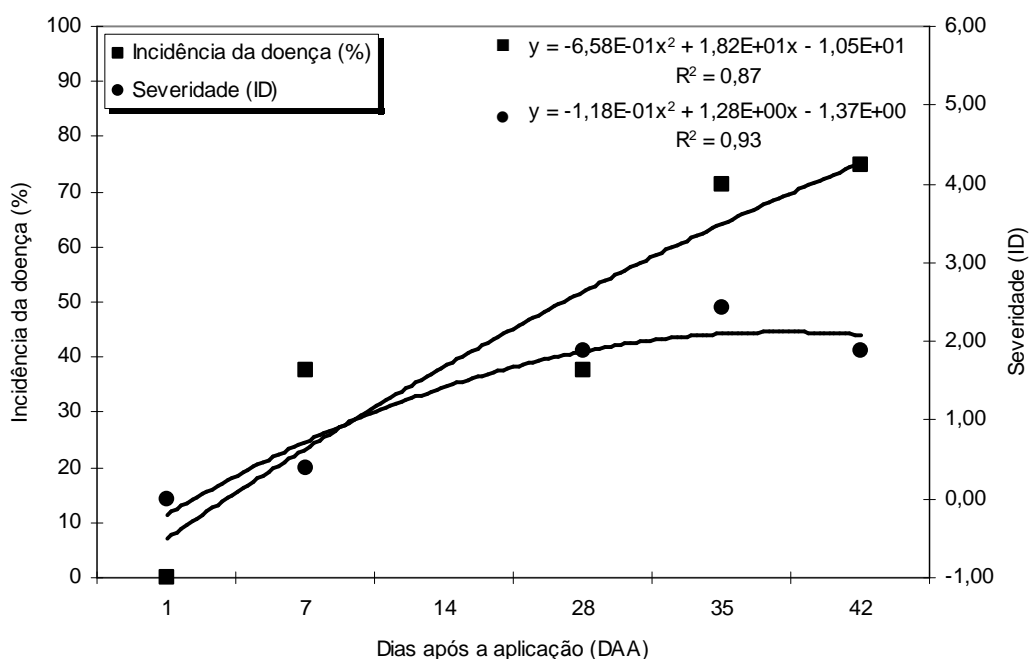
Do total do fungicida aplicado nos frutos, grande parte converteu-se em seu metabólito carbendazim, sendo detectado em maiores quantidades do que seu precursor, desde a primeira semana de avaliação (07DAA). Os teores residuais de MTF e MBC detectados na superfície e casca dos frutos reduziram progressivamente ao longo das avaliações realizadas, apresentando-se, para a superfície dos frutos, quantidades remanescentes próximas ao limite de detecção do método (0,01mg/kg).

#### **4.2.2. Capacidade preventiva**

A presença de sintomas foi observada aos sete dias após a aplicação de tiofanato metílico (07DAA), embora, com baixo nível de severidade (ID=0,4). Ao longo das avaliações observou-se que houve aumento da incidência da doença, alcançando 75% aos 42 dias após a aplicação do fungicida (42DAA), assim como em relação á severidade (ID=2,4) aos 35 dias após a aplicação de tiofanato metílico (35DAA). Diante de tais dados infere-se que o fungicida tiofanato metílico apresentou efeito preventivo por apenas um dia, já que os primeiros sintomas foram observados a partir dos sete dias após a aplicação (Figura 12). Os sintomas predominantes em todas as semanas de avaliação foram do tipo mancha sardenta.

#### **4.2.3. Capacidade curativa**

A aplicação de tiofanato metílico um dia após a inoculação (01DAI) mostrou-se insuficiente para proporcionar o controle completo do patógeno, e conseqüentemente supressão dos sintomas. Os sintomas predominantes na avaliação de um dia (01DAI) foram do tipo mancha dura e mancha virulenta. A incidência de frutos doentes foi de 100% e a severidade apresentada foi muitíssimo elevada (ID=4,5), acompanhada de expressiva queda de frutos. Assim, diante da acentuada queda de frutos as avaliações que seriam realizadas foram suspensas, independente das combinações avaliadas.



**Figura 12.** Efeito das aplicações preventivas do fungicida tiofanato metílico na incidência (%) e severidade (ID) da MPC nos frutos de laranjeira 'Valência'. Jaboticabal, SP – 2008.

### 4.3. Pyraclostrobin

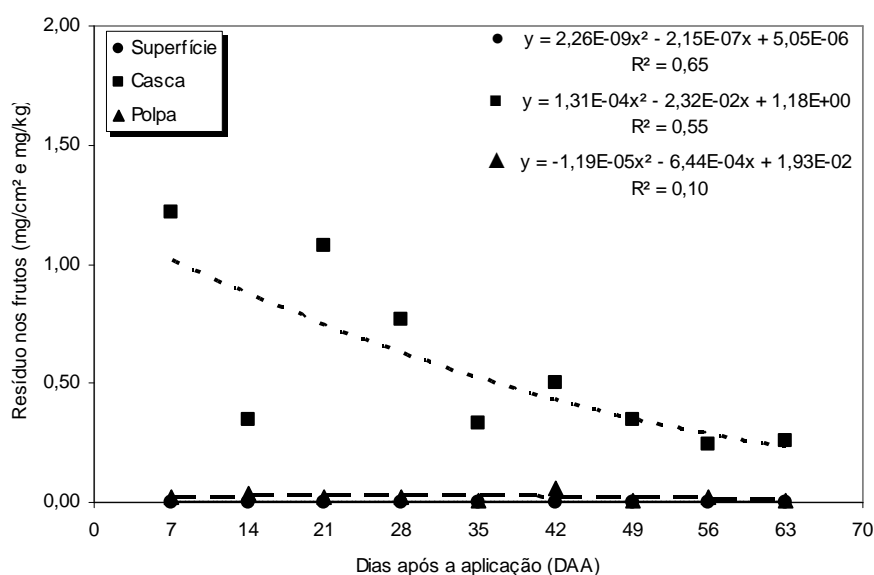
#### 4.3.1. Monitoramento dos resíduos

Os dados referentes às quantidades residuais de pyraclostrobin na superfície, casca e polpa dos frutos, encontram-se contidos na Figura 13.

Verificou-se que, desde a primeira semana de avaliação, aos sete dias após a aplicação do fungicida pyraclostrobin nos frutos (7DAA), a quantidade do ingrediente ativo presente na casca foi muito mais elevada do que as quantidades presentes na superfície e polpa dos frutos. Os teores residuais da superfície dos frutos, logo aos 35 dias após a aplicação (35DAA) apresentaram-se bem inferiores ao limite de

quantificação do método (0,01mg/L), estando próximo ao limite de detecção (LD), ou seja, apenas na forma de traços. Em relação à polpa dos frutos, a partir de sete dias após a aplicação (7DAA) os teores residuais apresentavam-se próximos ao limite de quantificação do método (0,01 mg/kg).

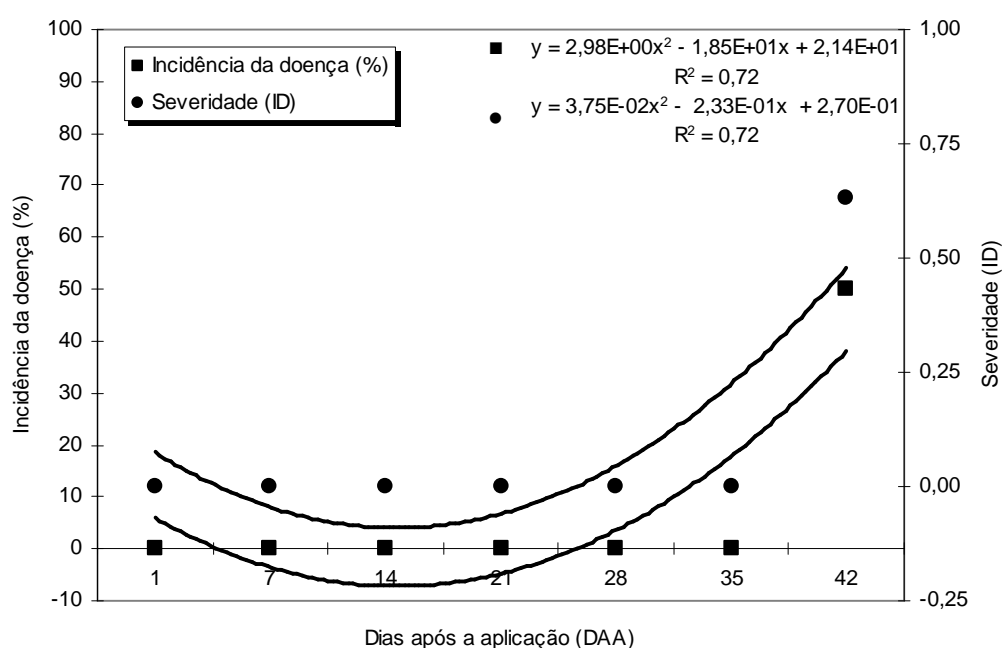
Ao longo das avaliações, a quantidade de pyraclostrobin na casca dos frutos diminuiu consideravelmente, apresentando redução de até 78% aos 63 dias após a aplicação (63DAA).



**Figura 13.** Quantidades residuais de pyraclostrobin na superfície (mg/cm²), casca e polpa (mg/kg) de frutos de laranja 'Valência'. Jaboticabal, SP – 2008.

### 3.2.4. Capacidade preventiva

O aparecimento de sintomas foi observado apenas aos 42 dias após a aplicação do fungicida pyraclostrobin (42DAA), cuja severidade, no entanto, deu-se em baixo nível (ID=0,63) (Figura 14). Os sintomas predominantes foram do tipo mancha dura e mancha sardenta. Dessa forma, o fungicida pyraclostrobin apresentou capacidade de prevenir o desenvolvimento do fungo, por pelo menos 35 dias.

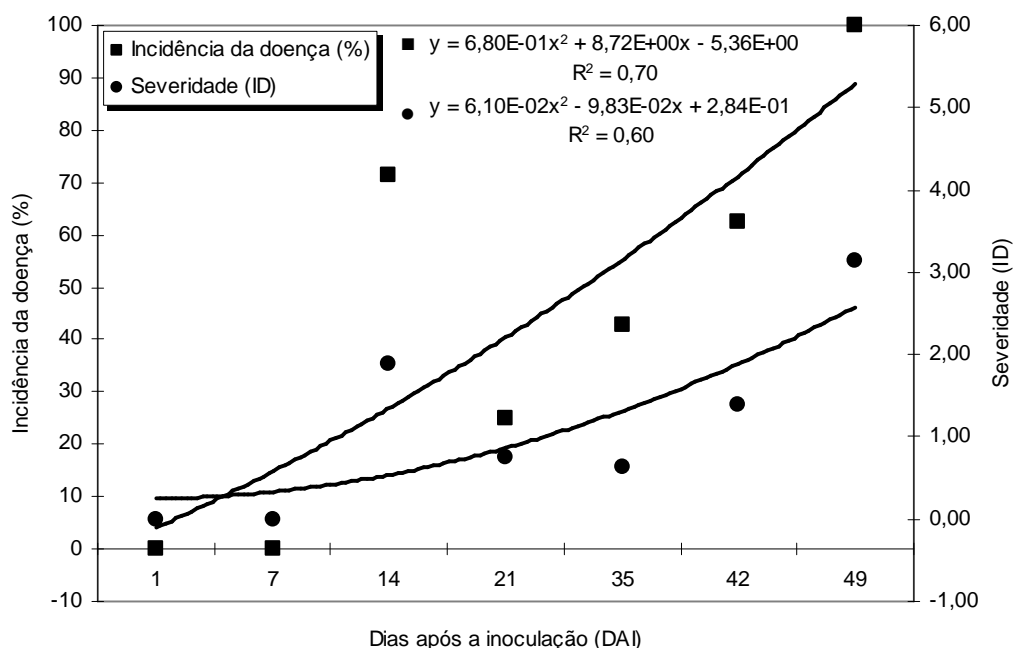


**Figura 14.** Efeito das aplicações preventivas do fungicida pyraclostrobin na incidência (%) e severidade (ID) da MPC nos frutos de laranja 'Valência'. Jaboticabal, SP – 2008.

### 3.2.5. Capacidade curativa

A presença de sintomas foi observada após 14 dias da inoculação (14DAI) em aproximadamente 72% dos frutos avaliados, sendo a severidade em nível intermediário (ID=1,88), segundo escala de Fagan & Goes (1999). Assim a aplicação do fungicida 14 dias após a inoculação (14DAI) não foi suficiente para impedir a expressão dos sintomas (Figura 15).

A incidência alcançou o nível mais elevado, de 100%, 49 dias após a inoculação (49DAI). Nessa avaliação o nível de severidade foi elevado (ID=3,13), considerado como potencial para a queda de frutos (Figura 15). Os sintomas predominantes nos frutos em quase todas as semanas de avaliação foram do tipo falsa melanose e mancha virulenta. Dessa forma, o fungicida pyraclostrobin apresentou capacidade curativa, por pelo menos sete dias (Figura 15).



**Figura 15.** Efeito das aplicações do pyraclostrobin na incidência (%) e severidade (ID) da MPC, após a inoculação dos frutos de laranja 'Valência', em diferentes intervalos de tempo. Jaboticabal, SP – 2008.

## 5. DISCUSSÃO

Os fungicidas cúpricos, considerados de ação não-específica, ou seja, que apresentam mais de um modo de ação contra fungos, são amplamente utilizados na agricultura. O fato de apresentarem eficiente ação protetora, baixa pressão de seleção sobre os agentes fitopatogênicos, amplo espectro de ação contra vários fitopatógenos e fornecer uma quantidade apreciável de íons cobre, fundamentais para a fisiologia da planta, faz desse produto uma excelente alternativa no manejo de muitas doenças associadas às plantas cítricas.

A diminuição da quantidade de oxiclreto de cobre depositada na superfície dos frutos esteve diretamente relacionada ao crescimento dos frutos, ou seja, houve diminuição dos teores de cobre devido ao aumento da área dos frutos. Em toranjas, na Flórida a mesma relação foi encontrada, ou seja, a diminuição nos teores residuais de cobre ao longo das semanas, para frutos com altas taxas de crescimento, esteve muito mais relacionada ao aumento da superfície dos frutos do que as perdas por intemperismo (TIMMER et al., 1998).

Embora o oxiclreto de cobre apresente eficiente capacidade protetora, os sintomas da doença foram observados 24 horas após a aplicação do fungicida. Possivelmente, o aparecimento de sintomas no período descrito esteve relacionado a quantidade de inóculo aplicada (concentração média de 15 mil conídios por fruto) de forma dirigida e sob condições de ambiente favorável para o desenvolvimento do processo infeccioso, já que foi proporcionada a formação de câmara úmida.

As aplicações de fungicidas à base de cobre para o controle de doenças fúngicas do citros, como a MPC, devem respeitar intervalos de no máximo 28 dias entre as aplicações (GOES, 1998). Os dados obtidos neste trabalho, mesmo sob condições controladas, corroboram com as recomendações citadas, onde se observa um aumento expressivo da severidade dos sintomas aos 28 dias após a aplicação de oxiclreto de cobre.

Dessa forma, mesmo para os frutos destinados ao processamento industrial, o intervalo inferior a 28 dias entre as aplicações deve ser respeitado, pois o potencial de



queda de frutos, em uma área com alta presença de inóculo, pode aumentar em 45% em apenas uma semana, conforme cálculos realizados utilizando-se os dados coletados.

Avaliando-se a ação fungistática dos íons de cobre, pode-se verificar que, mesmo a aplicação 24 horas após a inoculação, não impediu o aparecimento de sintomas, assim como o aumento da severidade da doença.

No intervalo de 24 horas muitos dos conídios presentes na superfície dos frutos foram capazes de germinar e penetraram no tecido vegetal, tornando a ação deste fungicida inviável, pois o mesmo não é absorvido pelo tecido vegetal. Tais resultados são indicações de que o fungicida oxicloreto de cobre, em aplicações pós-infecção do fungo, é incapaz de proporcionar uma ação fungistática sobre o patógeno

Em frutos de tangerina 'Fortune', o oxicloreto de cobre, na formulação suspensão concentrada, apresentou elevada capacidade residual, mesmo sob condições de chuva de 71 mm e o controle da mancha marrom de *Alternaria* deu-se satisfatoriamente até 28 dias após a aplicação (VICENT et al., 2007).

Em folhas cítricas, o fungicida hidróxido de cobre apresentou capacidade protetora próxima a 50% dos patógenos *Diaporthe citri*, *Elsinoe fawcettii* e *Alternaria alternata*, até dois dias após a aplicação. Porém, no quarto dia da aplicação tal fungicida não apresentou controle efetivo das doenças. Em relação à capacidade fungistática, o hidróxido de cobre não apresentou resultados satisfatórios (MONDAL et al., 2007).

O tiofanato metílico, um fungicida tipicamente sistêmico, é amplamente usado na agricultura devido ao seu amplo espectro de ação contra diversos patógenos causadores de doenças em muitas culturas de importância econômica para o país.

As maiores quantidades residuais de tiofanato metílico foram observadas na casca. Tal fato confirma as informações existentes na literatura quanto à sistemicidade do fungicida. Por outro lado, o carbendazim, seu metabólito de maior importância, esteve presente em maior quantidade que o mesmo, desde a avaliação realizada aos sete dias após a aplicação da sua formulação.

Avaliando-se os resultados obtidos, tanto para as aplicações preventivas, como curativas, verificou-se que o tiofanato metílico não proporcionou o desempenho esperado de um produto tipicamente sistêmico. Possivelmente, a concentração de inóculo aplicada de forma dirigida nos frutos, as condições favoráveis proporcionadas ao desenvolvimento do patógeno e a aplicação da calda fungicida por imersão nos frutos, somadas, tenham contribuído de forma decisiva para o insatisfatório desempenho deste agroquímico. Muitos questionamentos surgem em relação à metodologia de aplicação pontual, ou seja, sob a forma de imersão dos frutos, principalmente no caso de fungicidas sistêmicos, pois sabe-se que o depósito de calda efetuado nas folhas, contribui grandemente para o desempenho desses fungicidas em campo. Em experimentos realizados por GOES (comunicação pessoal<sup>5</sup>) o ingrediente ativo tiofanato metílico, em pulverizações de alto volume em campo, tem obtido resultados altamente satisfatórios, ou seja, o nível de controle da doença é alcançado.

Admite-se que, quando do emprego de pulverizações a quantidade de ingrediente ativo que alcança as folhas e ramos jovens contribuam ao incremento do mesmo nos tecidos internos da planta, incluindo os frutos, com conseqüente melhoria na deposição e sistemicidade. Segundo Miller, 1969 os fungicidas sistêmicos, como no caso dos benzimidazóis, fenilamidas e triazóis, são absorvidos pela planta e transportados dentro destas, onde revelam suas propriedades fungitóxicas em qualquer localização para onde tenham sido transportados, além disso, a propriedade antifúngica que lhes são conferidos está condicionada à absorção do ingrediente ativo pela planta em quantidades suficientemente elevadas para apresentar ação fungistática.

As estrobilurinas, consideradas como fungicidas de ação específica, são as mais recentes moléculas lançadas no mercado, constituindo-se como uma nova alternativa de controle de doenças de diversas culturas.

Com o monitoramento das quantidades de pyraclostrobin remanescentes na superfície, casca e polpa dos frutos pode-se verificar que, na casca foram detectadas as maiores concentrações do ingrediente ativo, independente do período de avaliação.

---

<sup>5</sup> A. de Goes, Professor da UNESP/FCAV - Campus de Jaboticabal; Departamento de Fitossanidade.

Aparentemente, tal fato deve-se à forte aderência da substância ativa a camada cerosa da planta, dado especialmente à afinidade entre a sua molécula e camada de cutina (BASF, 2004).

O fungicida pyraclostrobin mostrou eficiente capacidade preventiva, pois somente 42 dias após a aplicação observou-se o aparecimento de sintomas. A prevenção da doença ocorreu até 35 dias, mesmo sob elevada pressão de inóculo e boas condições de ambiente pós-inoculação. Tal resultado mostra-se coerente às informações contidas na literatura, já que os intervalos de pulverizações em campo, de fungicidas sistêmicos e mesosistêmicos, são de no máximo 42 dias (GOES, 1998). O nível de incidência observado (62% de frutos sintomáticos) aos 42 dias da aplicação, ainda que elevada, apresentou nível de severidade baixo, não apresentando frutos com potencial de queda prematura (FAGAN & GOES, 1999).

O eficiente desempenho preventivo do fungicida pyraclostrobin deve-se às características intrínsecas do princípio ativo como, baixa solubilidade em água, forte adesão à camada lipofílica das plantas e baixa pressão de vapor, o que permite uma liberação contínua da substância ativa por muitas semanas (STIERL et al., 2000b).

O pyraclostrobin apresentou capacidade curativa até sete dias após a inoculação, apresentando sintomas, em aproximadamente 70% dos frutos, aos 14 dias. Tal resultado mostra-se coerente ao contido na literatura, já que o mesmo mostra-se mais eficiente quando aplicado preventivamente (BARTLET et al., 2002).

O efeito curativo resulta da atenuação da expressão dos sintomas ou reparação dos danos provocados pelo patógeno, sendo, pois, uma ação dirigida contra o patógeno, após o estabelecimento efetivo com o hospedeiro (KIMATI, 1995). Quando fungicidas são aplicados curativamente, o sucesso do tratamento depende de vários fatores como, a espécie do patógeno, a sua fase de desenvolvimento quando do momento da aplicação do fungicida, da concentração e do grau de metabolização dos fungicidas, entre outros.

A medição do grau de metabolização torna-se importante na determinação da capacidade curativa do fungicida, pois quanto mais estável for o composto, mais tempo este irá ficar em contato com o patógeno. Em estudos *in vitro*, o pyraclostrobin

apresentou metabolização de 25% em 24 horas em teste com *Botrytis cinerea*, permanecendo ativo por muito mais tempo (STIERL et al., 2000a, b).

Possivelmente, este nível de absorção e metabolização não só confere boa capacidade curativa, mas também excelente capacidade preventiva, pois o ingrediente ativo fica por muito mais tempo sobre a superfície do vegetal, atuando nas fases iniciais do patógeno, que irá diminuir a fonte de inóculo, evitando, nos casos de total controle, a esporulação do patógeno.

Em folhas cítricas, o fungicida pyraclostrobin apresentou altos níveis de controle dos patógenos *Diaporthe citri*, *Elsinoe fawcettii* e *Alternaria alternata* (>75%), quando aplicado até cinco dias antes da inoculação, ou seja, apresentou satisfatória capacidade preventiva. Em relação à capacidade curativa, o pyraclostrobin obteve elevados níveis de controle (>75%) quando aplicado até dois dias após a inoculação de esporos de *Diaporthe citri* e *Elsinoe fawcettii* (MONDAL et al., 2007).

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados permitiram concluir que:

- O fungicida oxicloreto de cobre apresentou limitada capacidade protetora e ausência de capacidade fungistática;
- Os maiores teores residuais de tiofanato metílico foram encontrados na casca dos frutos;
- As quantidades remanescentes do ingrediente ativo pyraclostrobin estiveram, respectivamente, em maiores quantidades na casca>polpa>superfície. Este fungicida apresentou capacidade preventiva por 35 dias e curativa por sete dias.
- Para os três fungicidas estudados, o nível de controle da doença diminuiu em relação ao aumento dos intervalos entre a aplicação e as inoculações, como também entre a inoculação e as aplicações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECITRUS. Disponível em < [http://www.abecitrus.com.br/exp\\_laranja.html](http://www.abecitrus.com.br/exp_laranja.html)>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2009.

AGRIANUAL 2005. Mercados e Perspectivas. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, 2005. p. 287-291.

AGRIANUAL 2006. Mercados e Perspectivas. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, 2006. p. 257-270.

AGRIANUAL 2008 Mercados e Perspectivas. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, 2008 p. 273- 286.

AGUILAR-VILDOSO, C. I.; RIBEIRO, J. G. B.; FEICHTENBERGER, E. GOES, A. de SPÓSITO, M. B. **Manual técnico de procedimentos da mancha preta dos citros**. Brasília: MAPA/DAS/DDIV, 2002

ALMEIDA, T. F., DOS REIS, R. F., DE GOES, A. Method of inoculation of *Guignardia citricarpa* (*Phyllosticta citricarpa*) on 'Pêra Rio' sweet orange fruit. **IX International Congress of Plant Pathology**, Torino, Itália. 2008. p. 158.

ANDRADE, T. de, et al. Mancha preta (*G. citricarpa*) dos citros no Estado de Santa Catarina. **Summa Phytopathologica**, v.30, p. 126, 2004.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 216, 15 de novembro de 2006. Disponível em <URL:<http://www.anvisa.gov.br>> (Acesso em 30 de maio de 2008).

ASSOCITRUS. Disponível em <<http://www.associtrus.com.br>>. Acesso em: 25 de novembro. 2008.

AVERNA-SACCÁ, R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas por *Phoma citricarpa*. **Revista Agrícola**, v.15, p.468-475, 1940.

BAAYEN, R.P., BONANTS, P.J.M., VERKLEY, G., CARROLL, G.C., van der Aa, H. A., de WEERDT, M., van BROUWERSHAVEN, I.R., SCHUTTE, G.C., MACCHERONI, W., Jr., GLIENK de BLANCO, C. & AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of wood plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology** 92:464-477. 2002.

BALDASSARI, R.B. **Influência de frutos sintomáticos de uma safra na incidência da *Guignardia citricarpa* na safra subsequente e período de susceptibilidade de frutos de laranjeira 'Natal' e 'Valencia'**. 60p. (Dissertação Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Universidade Estadual Paulista - Jaboticabal, 2001.

BALDASSARI, R.B.; REIS, R.F.dos; GOES, A. de Relato de mancha preta do citros em pomares do Estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 27. 2004, Campinas. **Anais...Campinas: INSTITUTO AGRONÔMICO** 2004, p.126.

BARTLET, D. W., CLOUG, J. M., GODWIN, J. R., HALL, A. A. HAMER, M. & PARR-DOBRZANSKI, B. **The strobilurin fungicides**. *Pest Manage.* 58: 649-662. 2002.

BASF. **Manual Técnico COMET – Citros**. p. 35. 2004.

BEETON, K. V.; SCHUTTE, G. C.; VISSER, A. A. *Guignardia citricarpa* Kiely, the cause of petiole infection attendant with defoliation of lemons. In: CONGRESS INTERNATIONAL SOCIETY CITRICULTURE, 8. 1996. Sun City. **Programme and Abstracts...** 1996, p. 116.

BERTUS, A.L. Fungicidal control of black spot and melanose on coastal Valencia oranges in New South Wales. **Australian Plant Pathology**, v.10, p.53-55, 1981.

BRAZ, B.A.; FURUHASHI, S; BASTOS, H. B.; PAIVA, S. B. Comportamento de azoxystrobin no controle de mancha preta em citros (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, p.118-119, 2000.

BRENT, J.K. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?. Brussels: **GIFAP**, p. 48 FRAC (1), 1995.

BURCHFIELD, H. P. Chemical and physical interactions. In: **Torgeson, D. C. (Ed.). Fungicides and advanced treatise**. Monograph No: 31. Academic Press, New York and London, v. 1, p. 463-508. 1967

CAIXETA, M. P.; CORAZA NUNES, M. J.; VIDA, J. B.; NUNES, W. N.; TESSMANN, D. J.; ZANUTO, C. A.; MULLER, G. R. Ocorrência da pinta preta dos citros (*Guignardia citricarpa*) no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n. 1, p. 136, 2005.

CALAVAN, E. C. Black spot of citrus. **The California Citografic**, v. 46, n. 11, p. 21-24, 1960.

CARDOSO FILHO, J. A. **Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) e dos indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-s-metil e *Sacharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (teleomorfo: *Guignardia citricarpa*)**. 125p. (Tese Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo – Piracicaba, 2003.

CITRUS AND SUBTROPICAL FRUIT RESEARCH INSTITUTE. **Sweeter fruit with black spot**. Nelspruit, Information Bulletin, 192p.,1989.

COSTA, H.; VENTURA, J. A.; ARLEU, R. J.; AGUILAR-VILDOSO, C.I. Ocorrência da pinta preta (*Guignardia citricarpa*) em citros no Estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira** – Suplemento, v. 28, p. 205, 2003.



DAVIDSE, L.C. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v.24. p. 43-65, 1986.

DAVIDSE, L.C.; FLACH, W. Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimetabolic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. **The Journal of Cell Biology**, Cambridge, v.72, p.174-193, 1977.

DELLEN, N.; TOSUN, N.; YIMAZ, O.; YILDIZ, Z. Variation in the sensitivities of *Botrytis cinerea* isolates to some fungicides with non-specific mode of action. In: **XII<sup>th</sup> International Botrytis Symposium**, July. Reims, France. P64. 2000.

EPA. Environmental Protection Agency. <URL:<http://www.epa.gov> > (Acesso em 03 de jun. de 2008).

EUROPEAN COMMISSION. Directorate general health consumer protection. **Guidance document on residual analytical method: SANCO/825/00 rev. 6**. 2000b.

EUROPEAN COMMISSION. Quality control procedures for pesticides residues analyses. IN: **guidelines for residues monitoring in the European Union**. 2<sup>nd</sup> edition. 2000a. p. 1-30.

FAGAN, C.; GOES, A. de. Efeito da severidade da mancha preta dos frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa* na queda prematura de frutos de laranja 'Natal'. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, supl., p. 282, 1999.

FAGAN, C.; GOES, A. Efeito da mancha preta dos frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa* nas características tecnológicas do suco de frutos de laranja "Natal" e "Valência". **Summa Phytopathologica**, v. 26, n.1, p.122, 2000.

FEICHTENBERGER, E. "Mancha preta dos frutos cítricos". **Laranja & Cia**, v. 17, p. 79-92, 1996.

FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M.B.; VIANNA, J.H.T. Tratamentos fungicidas no controle de mancha preta (*Guignardia citricarpa*) em laranja 'Valência'. **Summa Phytopathologica**, v.26 p.118, 2000.

FELIPPE, J.M.; COTTAS, M.P.; IKEDA, M. Eficácia do fungicida pyraclostrobin no controle da Pinta preta (*Guignardia citricarpa*) em citros (*Citrus sinensis*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília - Suplemento, v.29, p. S281, 2004.

FOGLIATA, G, et al. Eficiência de estrobirulinas em el control de mancha negra de los cítricos (*Guignardia citricarpa*) en limón. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.S261, 2004.

FUNDECITRUS. **Manual de pinta preta**, Araraquara: Fundo Paulista de Defesa da Citricultura, 7p. ,2003.

GARRÁN, S.M. Citrus black spot in the northeast of Entre Rios: etiology, epidemiology and control. **Proceedings International Society Citriculture**, Sun City, v.1, p.466-470, 1996.

GASPAROTTO, L. et al. Ocorrência da Mancha preta (*G. citricarpa*) dos citros no Estado de Amazonas. **Summa Phytopathologica**, v.30, n.1, p. 126, 2004.

GODWIN, J. R.; ANTHONY, V. M.; CLOUGH, J. M.; GODFREY, C. R. A. ICIA5504: A novel, broad-spectrum, systemic  $\beta$ -methoxyarylate fungicide. **Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases**. p. 435-442. 1992.

GOES, A. **Controle da mancha preta dos frutos cítricos**. Laranja, Cordeirópolis, v.19, n.2, p.305-320, 1998

GOES, A. de. Efeito da combinação de fungicidas sistêmicos e protetores no controle da mancha preta dos frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa*. **Summa-Phytopathologica**, v. 28, p. 9-13, 2002.

GOES, A.; FEITCHBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.15, p.73-75, 1993.

GOES, A.; GRAÇA, J.; MONTEIRO DE BARROS, J. C. S.; PINHEIRO, J. E. Controle da pinta preta em frutos de tangerina "Rio" (*Citrus deliciosa*) ocasionada por *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 73-75, 1990.

GOES, A.; WIT, C.P. Efeito da combinação de diferentes fungicidas sistêmicos e protetores no controle da mancha preta dos frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa*. **Fitopatologia**, v. 34, p.201-202, 1999.

HERBERT, J.A.; GRECH, N.M. A strain of *Guignardia citricarpa*, the black spot pathogen, resistant to benomyl in South Africa. **Plant Disease**, v.69, p.1007, 1985.

HEUBERGER, J. W.; HORSFALL, J. W. Relation of particle size and color to fungicidal and protective value of cuprous oxides. **Phytopathology**, n. 27, p. 301-321. 1939.

HOLLOWAY, P. J. Structure and chemistry of plant cuticles. **Pestic. Sci.** v. 6, n. 37, p. 203. 1993.

HUTSON, D.; MIYAMOTO, J. Fungicidal activity chemical and biological approaches to plant protection. Chichester, John Wiley & Sons Ltd. 1998.

INMETRO. Instituto nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sob validação de métodos de ensaios químicos. **DOC-CGCRE-008 ver. 1**. Brasília, março, 2003.

JOHNSTON, P. R.; FULLERTON, R. A. *Crytosporiopsis citri* sp. Nov., cause of a citrus leaf spot in the Pacific Island. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, v. 16, n. 159-163, 1998.

KIELY, T. B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n. sp. the ascigenous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. And its relation to black spot of citrus. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, v. 73, p. 249-292, 1948b.

KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H & AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. V. 1, 3 ed. São Paulo, Editora Agronômica Ceres. pp. 761-785. 1995.

KLOTZ, L.J. **Fungal, bacterial, and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery, and orchard**. In: REUTHER, W.; CALAVAN, E.C. & CARMAN, G.E. Ed. The Citrus Industry. Riverside, University of California, p.1-66. 1978.

KÖLLER, W. **Chemical approaches to managing plant pathogens**. In: RUBERSON, J. R. (Ed.). Handbook of integrated pest management. Dekker, New York. p. 1-38. 1998.

KOTZÉ, J. M. Black spot. In: WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S. M.; TIMMER, L. W. (Ed). **Compedium of Citrus Diseases**, p. 10-12, 1988.

KOTZÉ, J. M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, v. 65, n. 12, p. 945-50, 1981.

KOTZÉ, J. M. **Studies on the black spot disease of citrus caused by *Guignardia citricarpa* Kiely with particular reference to its epiphytology and control at Lebata**. 147p. (Tese Ph.D). University of Pretoria - Pretoria, 1964

LANGE, L; BREINHOLT, J.; RASMUSSEN, F. W.; NIELSEN, R. I. Microbial fungicides – the nature choice. **Pest. Sci.** v. 2, n. 21, p. 155-160. 1993.

LEVI, M. P. **Fungicides in wood preservation**. In: SIEGEL, M. R.; SISLER, H. D. (Ed.). Antifungal compounds. v. 1, p. 397-436. Dekker, New York. 1977.

MAUCH-MANI, B.; METRAUX, J.P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to plant pathogen attack. **Annals of Botany**, v. 82, p. 535-540, 1998.

- McONIE, K.C. The latent occurrence in citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, v. 54, p.40-43, 1964.
- MILLER, L. P. Mechanisms for reaching the site of action. In: Torgeson, D.C. (Ed.). Fungicides and advanced treatise, vol. 2, p. 02-59. **Academic Press, New York and London**, 1969.
- MONDAL, S. N.; VICENT, A.; REIS, R. F.; TIMMER, L. W. Efficacy of Pre- and Postinoculation Application of Fungicides to Expanding Young Citrus Leaves for Control of Melanose, Scab, and Alternaria Brown Spot. **Plant Disease**. v. 91, n.12, pp1600-1606, 2007.
- MORETTO, C; SOUZA, A. de; GOES, A. de. Sensibilidade de isolados de *Guignardia citricarpa* a carbendazin. *Summa Phytopathologica*, v.31, n. 1, p.103, 2005.
- NENE, Y. L; THAPLYIAL, P. N. Systemic fungicides. In: **Fungicides in plant disease control**. 2 Ed. Oxford & IBH Publishing, New Delhi. pp. 212-349. 1994.
- NEVES, E. M.; DRAGONE, D.; NEVES, M.F.; BOTEON, M. **Conhecendo a citricultura**: impactos alocativos, mercado, preços. Piracicaba, SP: ESALQ – Departamento de Economia Administração e Sociologia, 2001.
- NEVES, M. F.; JANK, M. S. **Desafios na coordenação na citricultura brasileira**. ICONE, p. A-10, 2006.
- PICININI, E. C. Fungicidas Benzimidazoles. In: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. 1994, v.2, p. 357-362.
- PUNITHALINGAM, E. The conidial appendange in *Phyllosticta* spp. **Nova Hedwigia**, v. 36, p. 151-175, 1982.

ROBBS, C.F.; PIMENTEL, J.P. & RIBEIRO, R.L.D. A mancha preta dos frutos cítricos causada por *Phoma citricarpa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 8. 1980, Itaguaí. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1980, p. 455.

RODRIGUEZ, V. <sup>a</sup>; MAZZA GAIAD, S. M. The effects of fungicide and fertilization on the control of black spot of citrus (*Guignardia citricarpa*). **Proceedings International Society Citriculture**, Sun City, v. 1, p. 482-484. 1996.

SCALOPI, E. M. T. **Determinação do efeito curativo de infecções de *Guignardia citricarpa* em frutos cítricos mediante o emprego de fungicidas sistêmicos e mesostêmicos.** 88p. (Tese Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Universidade Estadual Paulista - Jaboticabal, 2006.

SCHOOLEY, J. B.; MACNEILL, B. H. A comparison of mode of action of three benzimidazoles. **Phytopathology**, n. 61, pp. 816-819. 1971.

SCHUTTE, G. C. ; KOTZÉ, J. M. Grass mulching as part an integrated control programme for the control of citrus black spot. **Citrus Journal**, Tampa, v.7, n.11, p. 18-20. 1997.

SCHUTTE, G. C.; TOLLIG, B. MANSFIELD, R. I.; KOTZÉ, J. M. Effect of kresoxim-methyl and azoxytrobin for the control benzimidazole resistan strain of citrus black spot. **Proceedings International Society Citriculture**, Sun City, v. 1, p. 345-349, 1996.

SCHUTTE, G.C.; BEETON, K.V.; KOTZÉ, J.M. Rind stippling on Valencia oranges by copper fungicides used for control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, p.851-854, 1997.

SOMERS, E. The uptake of cooper by fungal spors. Ann. **App. Biol.** n. 49, pp. 246-253. 1963.

SPOSITO, M.B. **Dinâmica temporal e espacial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros.** 112p. (Tese

Doutorado). Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Piracicaba, 2003.

STIERL, R., MERK, M., SCHROF, W. & BUTTERFIELD, E. J. Activity of the new BASF strobilurim fungicide, BASF 500 F, against *Plasmopara viticola* on grapes. **Proceedings of The Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases**. pp. 859-864. 2000a.

STIERL, R., MERK, M., SCHROF, W. & BUTTERFIELD, E. J. Activity of the new BASF strobilurim fungicide, BASF 500 F, against *Septoria tritici* on wheat. **Proceedings of The Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases**. pp. 261-266. 2000b.

SUTTON, B.C. & WATERSTON, J.M. *Guignardia citricarpa*, Kew: C.M.I. (Descriptions of Pathogenic fungi and bacteria, 85), 1966.

THEODORO, G. de F.; GOES, A.de; BALDASSARI, R.B; Mancha Preta (*Guignardia citricarpa*) dos citros no Estado de Santa Catarina. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 27. 2004, **Anais...**Campinas: INSTITUTO AGRONÔMICO 2004,p. 126.

TIMMER, L. W.; ZITKO, S. E.; ALBRIGO, L. G. Split applications of copper fungicides improve control of melanose on grapefruit in Florida. *Plant Disease*. Vol. 82, p. 983-986, n. 9.1998.

TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. **Compendium of Citrus Diseases**. 2.ed., 92p., 2000.

TOLLIG, B.; MERWE, J.L., VAN DER,; SCHUTTE, G.C. BAS 490 F: a new fungicidal strobilurim for the control of citrus black spot. **Proceedings International Society Citriculture**, Sun City, v.1, p.369-371, 1996.

VICENT, A.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Rain Fastness and Persistence of Fungicides for Control of Alternaria Brown Spot of Citrus. **Plant Disease**. v. 91, n. 4, pp. 393-399, 2007.

YPEMA, H. L.; GOLD, R. E. kresoxim-methyl – modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. **Plant Disease**. v. 1, pp. 4-19, 1999.