

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE
ANTRACNOSE E NA QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE
ABACATES**

Kelly Magalhães Marques
Engenheira Agrônoma

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE
ANTRACNOSE E NA QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE
ABACATES**

Kelly Magalhães Marques

Orientador: Prof. Dr. Ben-Hur Mattiuz

Co-orientador: Dr. Eduardo Micotti da Gloria

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

2015

M357q Marques, Kelly Magalhães
Quitosana e óleos essenciais no controle de antracnose e na
qualidade pós-colheita de abacates / Kelly Magalhães Marques. – –
Jaboticabal, 2015
xii, 105 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Ben-Hur Mattiuz
Coorientador: Eduardo Micotti da Gloria
Banca examinadora: Antônio de Goes, Cristiane Maria Ascari
Morgado, Eliane Aparecida Benato Rodrigues da Silva, Marcel Bellato
Spósito.
Bibliografia

1. *Persea americana*. 2. Doenças de pós-colheita. 3. Controle
alternativo. 4. Produtos naturais. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.56:634:653

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço
Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE ANTRACNOSE E NA QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE ABACATES"

AUTORA: KELLY MAGALHÃES MARQUES

ORIENTADOR: Prof. Dr. BEN-HUR MATTIUZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. BEN-HUR MATTIUZ

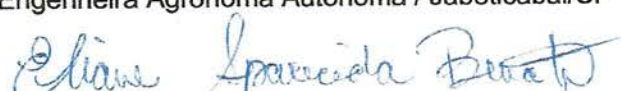
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. ANTONIO DE GOES

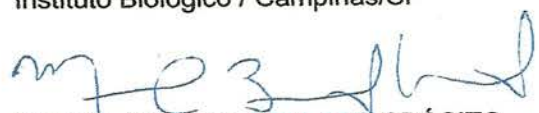
Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. CRISTIANE MARIA ASCARI MORGADO

Engenheira Agrônoma Autônoma / Jaboticabal/SP


Profa. Dra. ELIANE APARECIDA BENATO RODRIGUES DA SILVA

Instituto Biológico / Campinas/SP


Prof. Dr. MARCEL BELLATO SPÓSITO

Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP

Data da realização: 18 de setembro de 2015.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

KELLY MAGALHÃES MARQUES – Nascida em Araxá, MG, no dia um de fevereiro de 1985. Filha de Helder de Paiva Marques e Elizena Aparecida Marques. Iniciou o curso de Engenharia Agrônoma em 2005, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal (FCAV/UNESP), que foi concluído em fevereiro de 2010. Foi bolsista de iniciação científica, PIBIC, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no período de 01/08/2007 a 31/07/2009. Em agosto de 2010, ingressou no curso de Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal) como bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Câmpus de Jaboticabal, na linha de pesquisa em Pós-colheita de frutas e hortaliças. Recebeu o título de Mestre em julho de 2012. Em agosto de 2012, ingressou no curso de Doutorado em Agronomia (Produção Vegetal), pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Câmpus de Jaboticabal, na linha de pesquisa em Pós-colheita, sendo bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Aos meus pais, Helder e Elizena,
pelos quais eu não tenho apenas amor,
mas uma enorme gratidão por toda orientação,
incentivo e apoio incondicional,

Ofereço

Ao meu marido, José Eduardo, aquele que
caminha comigo o mesmo caminho, os quais os
passos estão sempre ao lado dos meus, e não
importa a situação em que eu esteja, eu sei que
ele sempre estará ao meu lado,

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pela minha saúde, e por iluminar meus caminhos nas minhas conquistas. É por Ele que sigo na fé de que amanhã sempre será um dia melhor.

Ao Prof. Dr. Ben-Hur Mattiuz, pela orientação, ensinamentos, amizade e confiança durante esses anos de convívio.

Ao Dr. Eduardo Micotti da Gloria, pela co-orientação, e pela parceria na execução da primeira parte do trabalho, referente a extração, avaliação e composição química dos óleos essenciais.

À Profa. Dra. Claudia F. Machado Mattiuz, pelos ensinamentos, conselhos e amizade.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Antonio de Goes, Dra. Cristiane Maria Ascari Morgado, Dra. Eliane A. Benato, Prof. Dr. Marcel Bellato Spósito, pela disponibilidade e sugestões para a melhoria do trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro na forma de bolsa de estudo (nº Processo 2013/09268-6).

À empresa Jaguacy pelo fornecimento dos abacates 'Hass'.

À empresa Aruá pelo fornecimento da cera utilizada neste trabalho.

À FCAV/UNESP (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal) e especialmente ao Departamento de Tecnologia, pela infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Tecnologia, em especial, Prof. Dr. Ben-Hur Mattiuz, Prof. Dr. José Fernando Durigan, e as funcionárias, Andréia, Denise, Bete e Renata, pela amizade, apoio e convivência.

Aos companheiros do Laboratório de Pós-colheita: Cris, Vanessa Galati, Josi, João Emmanuel, Carlos, Vanessa Voigt, Carol, Ariadne, Joana, Julianna, Maria Carolina e Isabela por toda ajuda fundamental neste trabalho, pela convivência e aprendizado durante esta etapa da minha vida. Vocês foram fundamentais para essa minha conquista.

Aos meus familiares, em especial: meus pais, Helder e Elizena, meus irmãos, Hellen, Bruno e Leandro, os quais são o meu maior tesouro, aqueles que se preocupam e torcem por mim verdadeiramente; a minha avó querida Maria Eunice; aos meus avós Maria e Délio, *in memoriam*, que sempre foram exemplos de caráter e de vida, e dos quais sinto muita falta; e a minha segunda família, Vó Rosa, Luiz Carlos, Rosângela, Fábio, Bia, Dani, Rafa e Lóris, por todo amor, carinho e apoio, sempre presentes nos momentos especiais.

Ao meu amado marido, Dú, sempre presente, dedicado, carinhoso, e que demonstra a cada dia o seu amor por mim, não somente com palavras, mas o mais importante, com atitudes.

Aos meus queridos amigos, não vou listar os nomes mas estes estão gravados no fundo do meu coração, por tornarem mais doces e alegres os meus dias, quem tem amigos, tem tudo.

E a todos que contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho, e desta etapa da minha vida.

Meus sinceros agradecimentos!
“A gratidão é a memória do coração”
- autor desconhecido

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. O abacate	3
2.2. Antracnose	5
2.3. Quitosana	6
2.4. Óleos essenciais	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Material vegetal	11
3.2. Obtenção do patógeno	12
3.3. Extração e avaliação inicial do potencial antifúngico dos óleos essenciais	12
3.4. Avaliação química dos óleos essenciais	14
3.5. Atividade antifúngica dos produtos naturais no controle de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>in vitro</i>	15
3.5.1. Experimento <i>in vitro</i> utilizando a quitosana	15
3.5.2. Experimentos <i>in vitro</i> utilizando os óleos essenciais	16
3.6. Inoculação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e avaliação dos produtos naturais no controle da doença e qualidade dos frutos	16
3.6.1. Experimento utilizando a quitosana em abacate ‘Breda’ inoculado com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	16
3.6.2. Experimento utilizando a quitosana em abacate ‘Hass’ inoculado com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	17
3.6.3. Experimentos utilizando os óleos essenciais em abacate ‘Hass’ inoculado com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	17
3.7. Avaliações	18
3.7.1. Experimentos <i>in vitro</i>	18
3.7.2. Experimentos <i>in vivo</i>	18
3.8. Análise dos dados	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21

4.1. Efeito da quitosana no crescimento micelial e na germinação conidial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	21
4.2. Efeito da quitosana em abacates ‘Breda’ inoculados com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ..	22
4.3. Efeito da quitosana em abacates ‘Hass’ inoculados com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ..	35
4.4. Avaliação do potencial antifúngico dos óleos essenciais.....	47
4.5. Avaliação da composição química dos óleos essenciais.....	48
4.6. Efeito dos óleos essenciais no crescimento micelial e na germinação conidial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	51
4.7. Efeito dos óleos essenciais em abacates ‘Hass’ inoculados com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	55
5. CONCLUSÕES.....	89
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS	90
7. REFERÊNCIAS	91
APÊNDICE	104

QUITOSANA E ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE ANTRACNOSE E NA QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE ABACATES

RESUMO – O objetivo do trabalho foi avaliar produtos alternativos, considerados naturais, como a quitosana e óleos essenciais, no controle pós-colheita da antracnose em abacates ‘Breda’ e ‘Hass’. Foram extraídos dez óleos essenciais de plantas e avaliados, inicialmente, quanto ao potencial antifúngico contra o *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*. Dentre os óleos testados, os de *Thymus vulgaris*, *Lippia sidoides* e *Cymbopogon citratus* foram selecionados pelos seus destacados efeitos inibitórios. Na etapa *in vitro* foram realizados quatro experimentos, em que foram testados concentrações de quitosana e os óleos, utilizando seis repetições por tratamento. Na etapa *in vivo*, foram realizados cinco experimentos em que abacates ‘Breda’ e ‘Hass’ foram imersos, por 1 minuto, em concentrações de quitosana, e abacates ‘Hass’ imersos em três concentrações de cada óleo essencial associado a cera comercial. Após a secagem e formação dos revestimentos, os frutos foram armazenados a 22 ± 2 °C e $65 \pm 5\%$ UR por 7 dias, para os abacates ‘Breda’, e a 12 ± 2 °C e $80 \pm 5\%$ UR por 14 dias, e por mais 3 dias em temperatura de 22 ± 2 °C e $65 \pm 5\%$ UR, para o ‘Hass’. Para a análise de variância dos dados, foi conduzido o teste F, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). O uso de quitosana a partir da concentração de 1,0% inibe o crescimento micelial e a germinação de conídios de *C. gloeosporioides in vitro*, e quando aplicada em abacates ‘Breda’ a 1,0%, e em abacates ‘Hass’ a 2,0%, é eficiente na redução dos sintomas e da incidência da antracnose nos frutos, e na manutenção da qualidade dos mesmos. Os óleos de tomilho (*T. vulgaris*) e de alecrim-pimenta (*L. sidoides*), nas concentrações a partir de $200 \mu\text{L L}^{-1}$, inibem o crescimento micelial e a germinação conidial de *C. gloeosporioides*, enquanto que as concentrações de 500 e $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ dos óleos associados à cera de carnaúba são mais efetivas na redução dos sintomas da antracnose, e na manutenção da qualidade dos abacates ‘Hass’.

Palavras-chaves: controle alternativo, doenças de pós-colheita, *Persea americana*, produtos naturais

CHITOSAN AND ESSENTIAL OILS IN ANTHRACNOSE CONTROL AND QUALITY OF AVOCADO POSTHARVEST

ABSTRACT – This study aimed at evaluating alternative natural products, such as chitosan and essential oils, to control anthracnose in postharvest of 'Breda' and 'Hass' avocados. Ten plant-extracted essential oils were assessed regarding their initial antifungal potential against *Colletotrichum gloeosporioides* *in vitro*. *Thymus vulgaris*, *Lippia sidoides* and *Cymbopogon citratus* were selected among the oils for their outstanding inhibitory effects. Four experiments were performed in an *in vitro* stage, in which concentrations of chitosan and oils were tested in six replicates for each treatment. Then, five experiments were set in an *in vivo* stage, where in 'Breda' and 'Hass' avocados were immersed in different chitosan concentrations for 1 minute, as well as 'Hass' avocados were dipped in three concentrations of each essential oil associated with commercial wax. After drying and covering, 'Breda' avocados were stored at 22 ± 2 °C under $65 \pm 5\%$ RH for 7 days; and 'Hass' fruit were kept at 12 ± 2 °C and $80 \pm 5\%$ RH for 14 days, then for more 3 days at 22 ± 2 °C and $65 \pm 5\%$. Data underwent F test for variance analysis and means were compared by Tukey test ($P \leq 0.05$). Chitosan from 1.0% inhibits *C. gloeosporioides* mycelial growth and spore germination. The use of 1.0% chitosan in 'Breda' variety and at 2.0% in 'Hass' fruit, is effective in reducing of symptoms and incidence of anthracnose in the fruit, and also maintenance of quality. The thymol (*T. vulgaris*) and rosemary pepper (*L. sidoides*) oils from $200 \mu\text{L L}^{-1}$, inhibit mycelial growth, while concentrations of 500 and $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ of oils with carnauba wax are more effective in reducing of symptoms of anthracnose, and by maintaining fruit quality of 'Hass' avocados.

Keywords: alternative control, diseases of postharvest, natural products, *Persea americana*

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem ocorrido aumento na demanda por frutas e hortaliças frescas, devido às mudanças nos hábitos alimentares dos consumidores que estão mais preocupados em manter uma alimentação saudável. Neste contexto, destaca-se o abacate que possui boas qualidades nutricionais, uma vez que é rico em lipídios insaturados, vitaminas e fibras (OLIVEIRA et al., 2000; FRANCISCO; BAPTISTELLA, 2005; NIETO-ANGEL et al., 2006).

Dentre as variedades de abacates mais consumidas no Brasil cita-se a Breda, que apresenta boa resistência ao manuseio, apresentando bom potencial de comercialização (OLIVEIRA et al., 2013). Enquanto que a variedade Hass é muito valorizada no mercado, provavelmente devido a redução do número de pessoas por família, com consequente demanda por alimentos em menores proporções, evitando assim, o desperdício (DAIUTO et al., 2010).

O Brasil está entre os oito maiores produtores mundiais de abacate (FAO, 2015), mas encontra dificuldades na sua exportação devido a problemas como danos por frio, falta de uniformidade na maturação, escurecimento de polpa e doenças como a antracnose (NIETO-ANGEL et al., 2006).

As doenças em vegetais representam significativas perdas econômicas, principalmente na etapa de comercialização dos frutos, sendo as doenças fúngicas as mais importantes (PRUSKY, 2011). Dentre essas doenças, destaca-se a antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, considerada uma das mais importantes doenças de frutos tropicais e que ocorre em todos os países produtores de abacate (PEGG et al., 2002; AVILA-QUEZADA; ROJAS; TELIZ, 2007).

O controle químico da antracnose em frutos é, geralmente, o método mais utilizado, entretanto, com o desenvolvimento de patógenos resistentes a fungicidas e o aumento da preocupação pelos consumidores com a saúde e com o meio ambiente, a tendência é a redução no uso de agrotóxicos associada ao desenvolvimento de métodos alternativos de controle de doenças (YOUSSEF et al., 2012).

Dentre os métodos de controle de doenças em vegetais, cita-se o uso de produtos naturais como alternativas de controle, com destaque para a quitosana, um produto natural que tem sido utilizada como películas ou revestimentos comestíveis, atuando também na redução da deterioração microbiana, revelando-se como um produto em potencial na proteção de plantas contra patógenos (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006; XING et al., 2011).

Estudos com óleos essenciais (OE) que apresentam atividade antimicrobiana também têm ganhado importância no meio científico, por considerar esses produtos uma alternativa natural aos agrotóxicos (KOUASSIA; BAJJI; JIJAKLI, 2012; SELLAMUTHU et al., 2013). Portanto, o uso destes produtos no controle pós-colheita de doenças em vegetais representa uma alternativa aos defensivos no controle de microrganismos patogênicos, resultando em aplicações de produtos naturais, seguros e ecologicamente corretos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar produtos alternativos, considerados naturais, no controle de antracnose e na qualidade pós-colheita de abacates 'Breda' e 'Hass'.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O ABACATE

O Brasil destaca-se no cenário mundial como um dos maiores países produtores de frutas tropicais, devido, sobretudo, às extensas áreas com condições de clima favorável. Neste contexto, cita-se a produção de abacate, com quase 160 mil toneladas produzidas em 2013 (FAO, 2015). O Estado de São Paulo é o maior produtor de abacates do Brasil, com 52% do total de frutos produzidos no país em 2012 (AGRIANUAL, 2015).

O abacateiro é originário do México e América Central, pertence à família *Lauraceae*, gênero *Persea*. Cultivares de abacates são, em geral, híbridos entre as espécies ou raças: Mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*), Antilhana (*P. americana* var. *americana*) e Guatemalteca (*P. nubigena* var. *guatemalensis*) (DONADIO, 1995).

O abacate é uma fruta que apresenta elevado valor nutritivo, conteúdo de fibras, proteínas, sais minerais e vitaminas, principalmente A e B (OLIVEIRA et al., 2000; FRANCISCO; BAPTISTELLA, 2005; NIETO-ANGEL et al., 2006). Possui também significativa quantidade de ácidos graxos monoinsaturados que apresentam potencial benéfico para a saúde, como na prevenção de doenças cardiovasculares (FULGONI; DREHER; DAVENPORT, 2013).

Dentre as variedades de abacates que são mais consumidas no Brasil, cita-se a Breda, que atende as características do hábito alimentar do consumidor brasileiro que utilizam esta fruta principalmente para o preparo de pratos doces (DAIUTO; VIEITES, 2008). Abacates 'Breda' apresentam bom potencial de comercialização por ser mais resistente ao manuseio (OLIVEIRA et al., 2003). Os frutos desta variedade apresentam formato elíptico, coloração de casca verde e de polpa amarelada, casca de textura lisa e de espessura fina (HORTIESCOLHA, 2015).

Os frutos da variedade Hass apresentam casca grossa, rugosa, de coloração verde, chegando ao violáceo escuro, quando amadurecidos, pesam 180-300 g,

possuem polpa sem fibras e são muito valorizados comercialmente, sendo exportados com selo de certificação (DONADIO, 1992; DAIUTO et al., 2009). De acordo com Daiuto et al. (2014) esta variedade tem sido muito reconhecida devido ao seu valor comercial e nutricional, sendo muito estudada quanto à preservação de suas características de qualidade, agregação de valor e novas formas de consumo.

O estágio de maturação em que os frutos são colhidos está relacionado com a qualidade do mesmo, estes deverão ser colhidos fisiologicamente maduros, ou seja, antes de completar o amadurecimento. Se colhidos verdes, apresentarão qualidade inferior e alto índice de perda de água, além de apresentarem maior suscetibilidade às desordens fisiológicas, no entanto, se colhidos muito amadurecidos, rapidamente entram em senescência (MANICA et al., 2000).

O abacate é climatérico, cujo amadurecimento ocorre poucos dias após a colheita, ocasionando transformações nos frutos que se refletem em mudanças nas suas características, tais como, textura, cor, sabor, aroma, teor de sólidos solúveis totais, açúcares totais, acidez titulável, pH, atividade respiratória, produção de etileno e outras variáveis, que são indicativas do processo de amadurecimento e posterior senescência. O fruto apresenta grande sensibilidade térmica, sendo a temperatura ideal de amadurecimento em torno de 20°C (LIMA, 2002; CHITARRA; CHITARRA, 2005). De acordo com Gayet et al. (1995) o abacate requer no máximo 10 dias a partir da colheita para atingir seu total amadurecimento, quando mantido à temperatura ambiente.

Durante o processo de amadurecimento, os frutos geralmente tornam-se mais suscetíveis à invasão por patógenos, devido, principalmente, ao decréscimo de componentes fenólicos e ao aumento da predisposição às injúrias mecânicas, em decorrência do amolecimento dos frutos (COURSEY, 1983; PALAZÓN; PALAZÓN, 2000; CHITARRA; CHITARRA, 2005). Dentre os problemas que ocorrem na pós-colheita do abacate, destacam-se as doenças fúngicas como a antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* considerada uma das mais importantes doenças de frutos tropicais e que ocorre em todos os países produtores de abacate (PEGG et al., 2002; AVILA-QUEZADA, et al., 2007).

2.2. ANTRACNOSE

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) é um dos mais importantes causadores de doenças nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, causando a antracnose em flores, frutos, caules e folhas em diversas frutíferas como abacate, manga, mamão, goiaba, banana, na pré e na pós-colheita (NIETO-ANGEL et al., 2006).

A doença apresenta um ciclo que envolve desde a deposição do conídio do fungo na superfície da planta, à formação do apressório e penetração nas células epidérmicas do hospedeiro, dando origem aos conídios (JEFFRIES et al., 1990; PERFECT et al., 1999; PRUSKY; FREEMAN; DICKAM, 2000; PEGG et al., 2002; MORAES, 2009).

A penetração do patógeno no vegetal pode ocorrer de forma direta no hospedeiro, mas também por penetração por ferimento ou por aberturas naturais presentes no fruto. Nos frutos verdes os apressórios permanecem quiescentes e apenas após a colheita e o amadurecimento dos abacates, o processo de infecção continua, ocorrendo o desenvolvimento dos sintomas da antracnose (BINYAMINI; SCHIFFMANN-NADEL, 1972). Sendo assim, os prejuízos devido à doença podem ser ainda maiores, uma vez que os sintomas podem aparecer somente após o transporte, beneficiamento e armazenamento, quando os abacates possuem maior valor agregado.

Os sintomas da doença nos abacates caracterizam-se por lesões arredondadas, grandes, necróticas, com o centro dos tecidos deprimidos, onde são produzidas massas de conídios de coloração alaranjada (BAILEY et al., 1992), podendo ocorrer uma podridão mole nos frutos, prejudicando a sua comercialização (LIMA FILHO; OLIVEIRA; MENEZES, 2003). Com a evolução das lesões ocorre a necrose da casca dos frutos, atingindo sua polpa, tornando-a escurecida. Na presença de alta umidade, forma-se uma massa mucilaginosa de coloração salmão contendo os conídios, no centro das lesões, em acérvulo (PEGG et al., 2002).

O controle químico da antracnose geralmente é feito com a utilização de fungicidas em pré-colheita, aplicados de duas a três vezes no pomar no período entre o florescimento e a frutificação. Na etapa de pós-colheita, apenas o fungicida tiabendazol é registrado para a utilização em abacates, desde que seja respeitado o período de

carência do produto (PICCININ; PASCHOALATI; DI PIERO, 2005). As perdas na pós-colheita de vegetais devido à antracnose podem aumentar em até 80% se não forem adotadas medidas de controle da doença (BOSSE; BOWER; BERTLING, 2013).

No entanto, há uma crescente demanda pelos consumidores por alimentos seguros, livres de resíduos de agrotóxicos. Além disso, o mercado valoriza cada vez mais o aspecto qualitativo e a preocupação com o meio ambiente na produção de alimentos. Outro aspecto importante no uso desses produtos no controle de doenças é o desenvolvimento de patógenos resistentes a fungicidas sintéticos. Sendo assim, há uma necessidade de estratégias de controle de doenças fúngicas, visando à substituição ou redução de fungicidas (SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014).

2.3. QUITOSANA

A quitosana é um polissacarídeo de alta massa molecular, solúvel em ácidos orgânicos, é comestível e segura para os seres humanos (BAUTISTA-BANÑOS et al., 2006), além de oferecer um promissor e versátil polímero biodegradável para embalagens de alimentos (DUTTA et al., 2007). Este produto natural é obtido a partir da desacetilação da quitina, que é o maior constituinte de exoesqueletos de crustáceos e de outros animais marinhos (GOOSEN, 1997).

A quitosana tem se mostrado efetiva para o controle de doenças devido à capacidade para formar recobrimentos protetores, similares às ceras empregadas no revestimento de frutas e, assim, atuar na regulação das trocas de gases e de umidade entre o produto e o ambiente, além da possibilidade de induzir respostas de resistência nos tecidos vegetais (EL GHAOUTH et al., 1992). Estes efeitos têm sido atribuídos a sua atividade direta antifúngica, ao efeito da modificação atmosférica e/ou a indução na pós-colheita de respostas de resistências em tecidos vegetais (TERRY; JOYCE, 2003). Porém, para conseguir o efeito desejado, devem ser considerados alguns fatores como o peso molecular da quitosana, sua concentração, o modo de aplicação, além das características do próprio vegetal como respiração, formato, espessura da casca, assim

como as condições de armazenamento dos frutos (VELÁZQUEZ-DEL VALLE et al., 2012).

Tratamentos com quitosana têm sido utilizados para retardar o amadurecimento e prolongar a vida de prateleira em manga (SOUZA et al., 2011) e limitar a degradação por fungos em muitas commodities, incluindo uva 'Itália' (CAMILI et al., 2007) e morango (ROMANAZZI, et al., 2013).

O uso de quitosana em tomate infectados com *Botrytis cinerea* resultou no controle da doença, sugerindo a ação antimicrobiana da quitosana sobre o patógeno e como elicitadora por meio de estímulos a defesas bioquímicas na fruta (BADAWY; RABEA, 2009).

Bananas infectadas com *Colletotrichum musae*, *Fusarium* spp. e *Lasiodiplodia theobromae*, fungos responsáveis pela podridão da coroa em bananeira, foram tratadas com quitosana e apresentaram atraso no amadurecimento e na severidade da doença (WIN et al., 2007).

O uso da quitosana, quando aplicada na superfície de morangos, resultou no controle dos fungos *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* e *Penicillium* spp, responsáveis pelas doenças mofo cinzento, podridão mole e mofo azul, respectivamente (ROMANAZZI et al., 2013).

A quitosana também tem apresentado efeito sobre patógenos de pós-colheita quando aplicada em associação a outros produtos naturais como cera de abelha e óleo essencial de limão, os quais apresentaram efeito contra os patógenos *Rhizopus stolonifer* e *Escherichia coli*, em tomates (RAMOS-GARCÍA et al., 2012). Assim como quando enriquecida com óleo essencial de canela aplicada em pimenta doce, os quais contribuíram para a redução da incidência de podridão nos frutos, de 35,0% nos frutos do controle para valores abaixo de 5,0% nos frutos tratados, e ao final do período de armazenamento, as amostras tratadas mantiveram boa aceitabilidade sensorial (XING et al., 2011).

Em pesquisa com mangas da variedade Kent inoculadas com *C. gloeosporioides*, tratadas com produtos naturais como o própolis e a quitosana, os resultados sugeriram que esses produtos podem ser usados como tratamento para controlar a antracnose,

mantendo a qualidade dos frutos. O desempenho da quitosana no controle da doença foi superior ao desempenho do própolis (MATTIUZ et al., 2015).

2.4. ÓLEOS ESSENCIAIS

O uso de produtos naturais como os óleos essenciais (OE), têm se mostrado uma escolha eficiente no controle de doenças fúngicas em frutos por apresentarem efeitos antimicrobianos e por serem consideradas alternativas naturais aos fungicidas sintéticos (COMBRINCK; REGNIER; KAMATOU, 2011; KOUASSIA; BAJJI; JIJAKLI, 2012).

Os óleos voláteis são definidos pela International Standard Organization (ISO) como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d'água ou por prensagem de pericarpos de frutos cítricos. São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, de aparência oleosa em temperatura ambiente, de aroma agradável e intenso, e são solúveis em solventes orgânicos apolares como éter, porém em água apresentam solubilidade limitada, não são muito estáveis, na presença de ar, luz, calor, umidade e metais. A principal característica é a volatilidade que os difere dos óleos fixos (mistura de substâncias lipídicas), obtidos geralmente de sementes (SIMÕES; SPITZER, 2000).

Os produtos naturais podem apresentar efeito antimicrobiano, atuando diretamente contra os fitopatógenos na inibição do crescimento micelial, na produção e na germinação de esporos ou na multiplicação de bactérias, e também atuar como indutores de resistência, capazes de induzir ou ativar mecanismos de defesa de plantas por conterem moléculas bioativas (STADNIK; TALAMINI, 2004).

A aplicação de vapor de óleo de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) sugeriu que este óleo essencial pode ser usado como uma alternativa natural de fungicida para o controle dos fungos *C. gloeosporioides* e *Lasiodiplodia theobromae*, responsáveis pelas doenças pós-colheita mais comuns em abacates (SELLAMUTHU; SIVAKUMAR; SOUNDY, 2013). O efeito do óleo de tomilho também foi comprovado em outro trabalho com abacates 'Furte' e 'Hass' feridos artificialmente e inoculados com *C. gloeosporioides*, os quais foram tratados com o óleo, aplicado por vaporização na concentração de 66,7 µL

L⁻¹, que resultou na redução da antracnose nos frutos de 100% (frutos do controle) para 8,3% após quatro dias (SELLAMUTHU et al., 2013).

Misturas de O.E. de espécies de plantas de alecrim -pimenta (*Lippia sidoides*), hortelã-do-brasil (*Mentha arvensis*), manjerição (*Ocimum gratissimum*), e o óleo de soja (*Glycine max*), foram utilizados no tratamento pós-colheita do pedúnculo do melão 'Orange Flesh' inoculados com *Fusarium* sp., obtendo os melhores resultados no tratamento preventivo com a concentração de 20 ml L⁻¹ e no tratamento curativo na concentração de 40 ml L⁻¹ (GADELHA et al., 2003).

Os OE de plantas das espécies *Cymbopogon citratus* e *Eucalyptus citriodora* a 1%, apresentaram efeito no controle de *C. gloeosporioides* em mamão (CARNELOSSI et al., 2009).

O OE da planta alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) demonstrou o potencial inibitório no crescimento micelial do fungo *C. gloeosporioides* coletado em frutos de mamoeiro evidenciando que tal planta apresenta composto fungitóxico (BONETT et al., 2010). Assim como o óleo essencial de eucalipto-comum (*Eucalyptus globulus*), também apresentou ação antimicrobiana no controle *in vitro* de *Penicillium* sp., responsável pela principal doença pós-colheita em citros (PIATI; SCHNEIDER; NOZAKI, 2011).

Outro efeito da aplicação dos OE nos frutos parece estar relacionado com o desencadeamento de respostas de defesas bioquímicas no fruto relacionado à indução da atividade de enzimas como quitinase, 1,3-glucanase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase (SELLAMUTHU; SIVAKUMAR; SOUNDY, 2013).

A associação de OE com revestimentos à base de cera tem demonstrado efeito no controle de patógenos em manga (CRUZ et al., 2012), citros (KOUASSIA; BAJJI; JIJAKLI, 2012), nectarinas e ameixas (GONÇALVES et al., 2006) e abacates (REGNIER et al., 2010).

A combinação de tecnologias, como o uso de coberturas em frutos e a aplicação de OE, tem mostrado resultados no controle de doenças na pós-colheita de vegetais, assim como na manutenção da qualidade dos frutos. Os OE podem causar danos à membrana citoplasmática dos microrganismos, por atravessar sua parede celular e a

membrana citoplasmática, afetando suas estruturas e tornando-a mais permeável (BAKKALI et al., 2008). E a vantagem do uso de revestimentos está no aumento da vida útil de vegetais por proporcionar diminuição da respiração, da perda de água por transpiração, e conseqüentemente da perda de massa pelos frutos, devido à barreira semipermeável formada ao redor do vegetal, dificultando a difusão dos gases (ALI et al., 2011).

Diante deste contexto, torna-se importante o desenvolvimento de pesquisas que busquem tratamentos alternativos eficientes na redução de perdas, causadas por patógenos responsáveis pelas doenças em frutos na pós-colheita, em substituição ao uso de agrotóxicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Abacates ‘Breda’ provenientes do município de São Sebastião do Paraíso-MG (20°55’02”S e 46°59’03”W), e abacates ‘Hass’ provenientes de produtores comerciais da região de Bauru-SP (22°18’53”S e 49°03’38”W) foram colhidos no estágio de maturação fisiológico. Em seguida, foram transportados ao Laboratório de Pós-colheita da FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, lavados com detergente neutro, enxaguados em água corrente e sanitizados em solução de Sumaveg® (Dicloroisocianurato de Sódio Dihidratado, Teor de Cloro Ativo = 3% mínimo) a 200 mg L⁻¹ de cloro livre, por 5 minutos. Depois de secos ao ambiente foram selecionados, de acordo com a coloração, tamanho e ausência de defeitos e de sintomas de doenças, e separados em lotes, correspondentes aos tratamentos.

Na tabela 1, encontra-se a caracterização inicial do abacate ‘Breda’ verde.

Tabela 1. Caracterização do abacate ‘Breda’ verde (dia 0).

Determinações	Fruto verde
Peso (g)	479,6±49,5
Acidez titulável (g ác. cítrico 100g ⁻¹)	0,235±0,021
Sólidos solúveis (°Brix)	8,68±0,4
Luminosidade da casca	53,37±1,56
Ângulo Hue da casca	115,36±2,80
Cromaticidade da casca	36,14±3,69
Luminosidade da polpa	79,23±1,46
Ângulo Hue da polpa	100,45±0,81
Cromaticidade da polpa	39,52±0,65

Na tabela 2, encontra-se a caracterização inicial do abacate ‘Hass’ verde. Esses valores representam a média dos dados obtidos nos frutos, em todos os experimentos que utilizaram essa variedade.

Tabela 2. Caracterização do abacate ‘Hass’ verde (dia 0).

Determinações	Fruto verde
Peso (g)	219,98±37,5
Acidez titulável (g ác. cítrico 100g ⁻¹)	0,223±0,103
Sólidos solúveis (°Brix)	7,28±4,3
Luminosidade da casca	34,98±5,28
Ângulo Hue da casca	121,84±11,15
Cromaticidade da casca	19,98±6,46
Luminosidade da polpa	80,56±0,60
Ângulo Hue da polpa	100,61±2,09
Cromaticidade da polpa	44,64±7,36

3.2. OBTENÇÃO DO PATÓGENO

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* foi isolado de abacates ‘Hass’ e ‘Breda’ naturalmente infectados, e mantidos à temperatura de 27±1 °C. A suspensão de conídios foi obtida pela raspagem superficial das colônias em presença de água destilada e esterilizada, e Tween a 0,01%, e após, foi feita a filtragem em gaze, obtendo-se, por meio de contagem em hemocitômetro, uma suspensão conidial do patógeno na concentração de 2x10⁵ conídios mL⁻¹.

3.3. EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO INICIAL DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Nessa etapa da pesquisa, a qual foi realizada na Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, no Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, foram extraídos 10 óleos essenciais de plantas, selecionados pelos seus compostos majoritários (Tabela 3).

Tabela 3. Nomes comuns e espécies de óleos selecionados a partir do composto majoritário .

Nome comum	Espécie	Composto Majoritário
Alecrim-pimenta	<i>Lippia sidoides</i>	Timol
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	Timol
Capim-limão	<i>Cymbopogon citratus</i>	Citral
Erva-cidreira	<i>Lippia alba</i>	Citral
Eucalipto- staigeriana	<i>Eucalyptus staigeriana</i>	Citral
Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i>	Citronellal
Eucalipto-cidrô	<i>Corymbia citriodora</i>	Citronellal
Eucalipto-comum	<i>Eucalyptus globulus</i>	1,8 Cineol
Eucalipto-Nitens	<i>Eucalyptus nitens</i>	1,8 Cineol
Alecrim-do-campo	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Nerolidol

A extração dos óleos essenciais foi realizada por hidrodestilação adicionando-se 400 gramas de folhas e 4 litros de água destilada a um balão volumétrico de 5 litros. O balão foi aquecido por uma manta aquecedora e a hidrodestilação mantida por 3 horas a partir do início de fervura da água. O equipamento utilizado para extração do óleo consiste em um destilador tipo Clevenger, um balão volumétrico de 5 litros, manta de aquecimento, dean e condensador.

O potencial antifúngico dos óleos essenciais obtidos foi determinado pelo método de avaliação da concentração inibitória mínima, que tem por objetivo verificar a concentração mínima de cada extrato para inibir o desenvolvimento da espécie fúngica avaliada.

A técnica utilizada foi a da microdiluição em caldo (HADACEK; GREGER, 2000). Nesta técnica, diferentes concentrações de cada extrato ($0,2$ a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram colocadas em micropoços contendo o caldo extrato de malte 4% ($50 \mu\text{L}$) esterilizado, seguido da deposição de suspensão contendo $50 \mu\text{L}$ (10^4 conídios mL^{-1}). As placas contendo os micropoços foram incubadas no escuro a 25°C por 18h. Os tratamentos foram realizados em triplicata. Depois de decorrido o tempo de incubação, o tamanho da colônia foi mensurado através da técnica da produção da esterase, resultante da conversão do diacetato de fluoresceína a fluoresceína (CHAND et al., 1994). A leitura

da fluorescência foi realizada conforme técnica preconizada por Hadacek e Greger (2000).

A percentagem de inibição do crescimento comparada à testemunha foi determinada segundo a fórmula:

$$\frac{(\text{leitura da amostra} - \text{leitura do branco}) \times 100}{(\text{leitura da testemunha} - \text{leitura do branco})}$$

Dentre os óleos testados, os óleos de *T. vulgaris*, *L. sidoides* e *C. citratus* foram selecionados pelos seus destacados efeitos inibitórios.

3.4. AVALIAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A caracterização dos óleos essenciais selecionados, também foi feito na Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, no Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, a qual foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, utilizando um equipamento CGMS2010 (SHIMADZU), equipado com detector de massas QP2010 Plus (SHIMADZU) e coluna cromatográfica capilar Difenil Dimetil polissiloxano (5% diphenyl e 95% dimethyl polysiloxane), Rxi-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A programação de temperatura para o forno foi: 50°C por 1,5 min, elevada a 4°C min⁻¹ até 200°C, e então elevada a 10°C/min até 240°C, permanecendo nesta temperatura por 7 min. A temperatura do injetor foi de 240°C e 220°C para fonte de íons e interface. A injeção foi realizada no modo “Split”, o volume de amostra injetado foi de 1 µL para óleos. A razão do “Split” foi de 1:20. O gás Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 1,2 mL min⁻¹. O detector de massas foi configurado no modo scan, com faixa de varredura de 40 a 500 m z⁻¹.

Os picos cromatográficos foram identificados através da comparação entre o índice de Kovats (IK) calculado e o observado na literatura (ADAMS, 2007) e também por comparação do espectro de massa observado com o existente no cromatógrafo (NIST05s, NIST107 e WILEY8).

Uma solução padrão contendo os alcanos (C7 a C30) foi injetada no mesmo momento das injeções dos óleos. Foram considerados identificados os picos

cromatográficos que apresentaram um espectro de massa idêntico aos da biblioteca existente no cromatógrafo (NIST05s, NIST107 e WILEY8) e que apresentem um índice de Kovats igual ou dentro de uma faixa de tolerância de ± 10 unidades ao observado na literatura (ADAMS, 2007).

3.5. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS PRODUTOS NATURAIS NO CONTROLE DE *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES* IN VITRO

Como produtos naturais foram utilizados os 3 óleos essenciais (*T. vulgaris*, *L. sidoides* e *C. citratus*), selecionados na avaliação inicial do potencial antifúngico, e a quitosana com baixo peso molecular e grau de desacetilação de 75-85% (Sigma-Aldrich Co. 5LBG1673V). As concentrações da quitosana foram obtidas por meio da diluição do produto em água destilada com adição de ácido acético a 1,0% do volume e o pH corrigido para 5,6 com NaOH 0,1M, de acordo com o descrito por Jiang e Li (2001).

Os produtos naturais foram incorporados em meio de cultura BDA (batata, dextrose e agar) autoclavado, nas diferentes concentrações. Para a quitosana, as soluções foram obtidas misturando-se parte do produto dissolvido com o meio de cultura BDA de modo a obter no final a concentração desejada. No caso dos óleos essenciais, estes foram dissolvidos em Tween 80 a 0,01%, antes da incorporação ao meio (XING et al., 2011). Em seguida, os meios foram vertidos sob condições assépticas (câmara de fluxo laminar), em placas esterilizadas de 9 cm de diâmetro. Após a solidificação do meio, foram transferidos colônias de 5 mm de diâmetro, retirados da borda das culturas, para o centro de placas contendo meio BDA. As placas foram mantidas a 27 ± 1 °C e fotoperíodo de 12h.

3.5.1. Experimento *in vitro* utilizando a quitosana

No experimento com quitosana, em BDA, utilizou-se as concentrações de 0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos (5 concentrações da quitosana + testemunha), com 6 repetições.

3.5.2. Experimentos *in vitro* utilizando os óleos essenciais

Para o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*), em BDA, utilizou-se as concentrações de 0; 10; 50; 100; 200; 500 e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por 7 tratamentos (6 concentrações do óleo + testemunha), com 6 repetições.

Para o óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), em BDA, utilizou-se as concentrações de 0; 100; 200; 400; 500 e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por 6 tratamentos (5 concentrações do óleo + testemunha), com 6 repetições.

Para o óleo essencial de capim-limão (*C. citratus*), em BDA, utilizou-se as concentrações de 0; 50; 100; 200; 500; 1000 e 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por 7 tratamentos (6 concentrações do óleo + testemunha), com 6 repetições.

3.6. INOCULAÇÃO DE *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES* E AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS NO CONTROLE DA DOENÇA E QUALIDADE DOS FRUTOS

3.6.1. Experimento utilizando a quitosana em abacate 'Breda' inoculado com *Colletotrichum gloeosporioides*

Os frutos foram feridos (2 mm de profundidade e 6 mm de diâmetro) e inoculados, em dois pontos opostos na região equatorial, com 25 μL da suspensão conidial de *C. gloeosporioides* (2×10^5 conídios mL^{-1}), e armazenados por 10 h a 22 °C, para estabelecimento do fungo. Em seguida, os frutos foram imersos por 1 minuto em solução de quitosana nas concentrações de 0; 0,25; 0,50; 1,0; 1,5 e 2,0%. Os frutos do tratamento testemunha foram imersos em água destilada. Após a secagem e formação do recobrimento, os frutos foram armazenados a 22 ± 2 °C e $65 \pm 5\%$ UR, por 7 dias. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos (5 concentrações da quitosana + testemunha). Foram utilizadas 4 repetições com 5 frutos cada.

3.6.2. Experimento utilizando a quitosana em abacate 'Hass' inoculado com *Colletotrichum gloeosporioides*

Os frutos foram inoculados, em dois pontos opostos na região equatorial, com o auxílio de uma seringa de cromatografia com 25 μL da suspensão conidial de *C. gloeosporioides* (2.10^5 conídios mL^{-1}), e armazenados por 10 h a 22 °C, para estabelecimento do fungo. Em seguida, os abacates foram imersos, por 1 minuto, em solução de quitosana nas concentrações de 0, 0,50; 1,0 e 2,0%. Os frutos do tratamento testemunha foram imersos em água destilada. Após a secagem e formação do recobrimento, os frutos foram armazenados a 12 ± 2 °C e $80 \pm 5\%$ UR. Após 14 dias de armazenamento, um conjunto de frutos, de cada tratamento, foi avaliado e outro transferido para temperatura de 22 ± 2 °C e $65 \pm 5\%$ UR na qual permaneceram por 3 dias. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos (3 concentrações da quitosana + testemunha). Foram utilizadas 4 repetições com 5 frutos cada.

3.6.3. Experimentos utilizando os óleos essenciais em abacate 'Hass' inoculado com *Colletotrichum gloeosporioides*

Os frutos foram inoculados, como descrito no item anterior. Em seguida, os abacates foram imersos, por 1 minuto, em solução de cera de carnaúba e resina vegetal (Aruá® BR-A2 Tropical) associada a três concentrações de cada óleo.

Para os óleos de tomilho e de alecrim-pimenta, realizou-se 1 experimento com os dois óleos, sendo utilizada três concentrações de cada óleo associadas a cera. As concentrações definidas foram de 200; 500 e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo em cera. Para o óleo de capim-limão, realizou-se 1 experimento separadamente dos demais óleos, sendo as concentrações escolhidas de 1000; 1500 e 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo em cera. Os frutos dos tratamentos testemunha foram imersos em água destilada (1) e em cera (2). Após a secagem e formação do recobrimento, os frutos foram armazenados a 12 ± 2 °C e $80 \pm 5\%$ UR. Após 14 dias de armazenamento, um conjunto de frutos, de cada tratamento, foi avaliado e outro transferido para temperatura de 22 ± 2 °C e $65 \pm 5\%$ UR na qual permaneceram por 3 dias. O experimento foi conduzido em delineamento experimental

inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos (imersão dos frutos em água (1) + imersão dos frutos em cera (2) + imersão dos frutos em cera/3 concentrações do óleo). Foram utilizadas 4 repetições com 5 frutos cada.

3.7. AVALIAÇÕES

3.7.1. Experimentos *in vitro*

O crescimento micelial do fungo foi medido diariamente até que a colônia de um dos tratamentos atingisse a borda da placa. Para calcular a porcentagem de inibição do crescimento micelial foi aplicada a fórmula $I = [(CFC - CFT) / CFC] \times 100$, em que: I= porcentagem de inibição; CFC= crescimento do fungo no controle, aos sete dias; CFT= crescimento do fungo no tratamento, aos sete dias.

A germinação de conídios foi realizada pela deposição de 150 µL de suspensão conidial do patógeno (2×10^5 conídios mL⁻¹) sobre lâminas contendo ágar-água fundente a 1%. Após a deposição de esporos, foi efetuada a incubação da suspensão por 12 horas sob luz constante a 27 ± 1 °C, para a avaliação da germinação de 100 conídios por lâmina por repetição, considerando-se germinado o conídio que apresentou o tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao do comprimento do esporo (MERCIER et al., 2001).

Paras as análises realizadas *in vitro*, foram utilizadas 6 repetições por tratamento.

3.7.2. Experimentos *in vivo*

O diâmetro da lesão da antracnose foi medida em dois sentidos ortogonais no fruto. Quando os frutos apresentavam coloração de casca escurecida, devido a evolução do amadurecimento, a medição do sintoma era realizada na região escurecida da polpa, logo abaixo da casca, no local da inoculação.

A incidência da antracnose foi determinada de acordo com Xing et al. (2010) utilizando a seguinte equação: Incidência de sintomas (%)= (Número de ferimentos infectados/Número total de frutos inoculados) × 100.

A atividade enzimática da fenilalanina amônia-liase (PAL) (EC 4.3.1.5) foi determinada pelo método de Peixoto et al. (1999), na qual o extrato com tampão borato e fenilalanina foi incubado a 36°C por 60 minutos, adicionado solução de ácido clorídrico para a parada da reação enzimática e leitura em espectrofotômetro a 290 nm. Os resultados foram expressos em nmol/min.

Para a peroxidase (POD) (EC 1.11.1.7) foi realizada a extração da amostra pelo método de Lima, Brasil e Oliveira (1999), utilizando-se tampão fosfato de potássio (0,2M), e a atividade foi determinada no sobrenadante pelo método de Allain et al. (1974), utilizando-se como reagentes peróxido de hidrogênio e fenol. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 505 nm. Os resultados foram expressos em μmol de H_2O_2 degradado $\text{g}^{-1}\text{min}^{-1}$.

Para a atividade da enzima polifenoloxidase (PPO) (EC 1.14.18.1) utilizou-se o mesmo extrato preparado para a determinação da peroxidase, e para a determinação da atividade se utilizou apenas o fenol como reagente. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 420 nm. Os resultados foram expressos em μmol de fenol degradado $\text{g}^{-1}\text{min}^{-1}$.

A determinação dos polifenóis extraíveis totais nos frutos foi realizada de acordo com Singleton e Rossi (1965). Para a extração utilizou-se acetona 50% e para a reação foi utilizado 0,1 ml do sobrenadante, no qual foi adicionado 0,9 ml H_2O deionizada, 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 2,5 mL de carbonato de sódio a 20%. A leitura das amostras foi realizada a 725 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico por 100 g de polpa.

A taxa respiratória e a produção de etileno dos frutos, foram avaliadas por meio das análises das amostras de gases, recolhidas com uma seringa de cromatografia, de frascos hermeticamente fechados contendo os frutos, em cromatógrafo modelo Trace GC Ultra, Thermo Scientific, equipado com detector de ionização de chama (FID). O gás de arraste foi o hidrogênio a um fluxo de 35 mL min^{-1} . As temperaturas mantidas no aparelho foram de 110 °C para a coluna, 250 °C para o detector, 200 °C para o injetor e 350 °C para o metanador. A produção de CO_2 ($\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1}\text{h}^{-1}$) e de etileno (μL

C_2H_4 $kg^{-1}h^{-1}$) foram determinadas pela diferença entre a concentração gasosa inicial (quando os frascos foram fechados) e final (após 1 h).

A evolução da perda de massa fresca dos produtos foi quantificada em balança com precisão de 0,01g, expressa em porcentagem, considerando-se a diferença entre o peso inicial do fruto e aquele obtido a cada intervalo de tempo de amostragem.

A firmeza da polpa foi determinada na região equatorial dos frutos após a retirada da casca, realizando duas leituras, em lados opostos, utilizando-se penetrômetro marca Bishop FT 327 provido de ponteira de 0,8 cm, sendo os resultados expressos em Newtons (N).

A mudança da coloração da casca e da polpa foi feita utilizando-se colorímetro MINOLTA CR 400, marca KONICA MINOLTA, aonde foram determinados os valores de L^* , h^* e C^* , sendo L^* : luminosidade (100 = branco; 0 = preto), h^* : Ângulo Hue e C^* : cromaticidade (MINOLTA, 2007). A leitura foi realizada na casca e na polpa em dois pontos diferentes no fruto.

A acidez titulável dos frutos foi determinada em 10 gramas de polpa triturada, que foi diluída em 50 mL de água destilada, por meio de titulação com NaOH a 0,01 M. Para a quantificação utilizou-se a metodologia descrita pela AOAC (1997), método 942.15.

Os teores de sólidos solúveis dos frutos foi determinado, segundo AOAC (1997), método 932.12, a partir da polpa triturada dos frutos, utilizando gaze para a obtenção do líquido, e quantificado em refratômetro digital modelo PR 101, sendo os resultados expressos em °Brix.

Paras as análises realizadas *in vivo*, foram utilizadas 4 repetições por tratamento. A unidade experimental foi constituída por 20 frutos.

3.8. ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e o efeito dos tratamentos, quando significativo, por meio do Teste *F*. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EFEITO DA QUITOSANA NO CRESCIMENTO MICELIAL E NA GERMINAÇÃO CONIDIAL DE *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES*

A quitosana inibiu o crescimento micelial de *C. gloeosporioides in vitro* de maneira dependente da dose, visto que as maiores concentrações, 1,0%; 1,5%; e 2,0%, inibiram o crescimento do fungo em 75, 86 e 90%, respectivamente (Figura 1A) (Apêndice 1). Isso indica o efeito da quitosana contra o patógeno, podendo inibir ou retardar o crescimento do fungo. Estudos *in vitro* que utilizaram a quitosana nas concentrações de 2,5% e 3,0%, mostraram que este produto apresentou efeito fungicida contra *C. gloeosporioides*, inibindo por completo o crescimento micelial, além de provocar mudanças na morfologia dos conídios do patógeno (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003; BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006).

Quanto ao efeito da quitosana sobre a germinação conidial, verifica-se que o produto nas concentrações a partir de 1% inibiu a formação do tubo germinativo de *C. gloeosporioides in vitro* (Figura 1B). Este polímero nas concentrações de 0,25%; 0,5%; e 1,0% inibiu a germinação de conídios em 71%; 83,5% e 98%, respectivamente. Estes resultados refletem o potencial fungicida da quitosana, utilizada nas concentrações a partir de 1,5% sobre o microrganismo, uma vez que inibiu em 100% a germinação conidial do fungo.

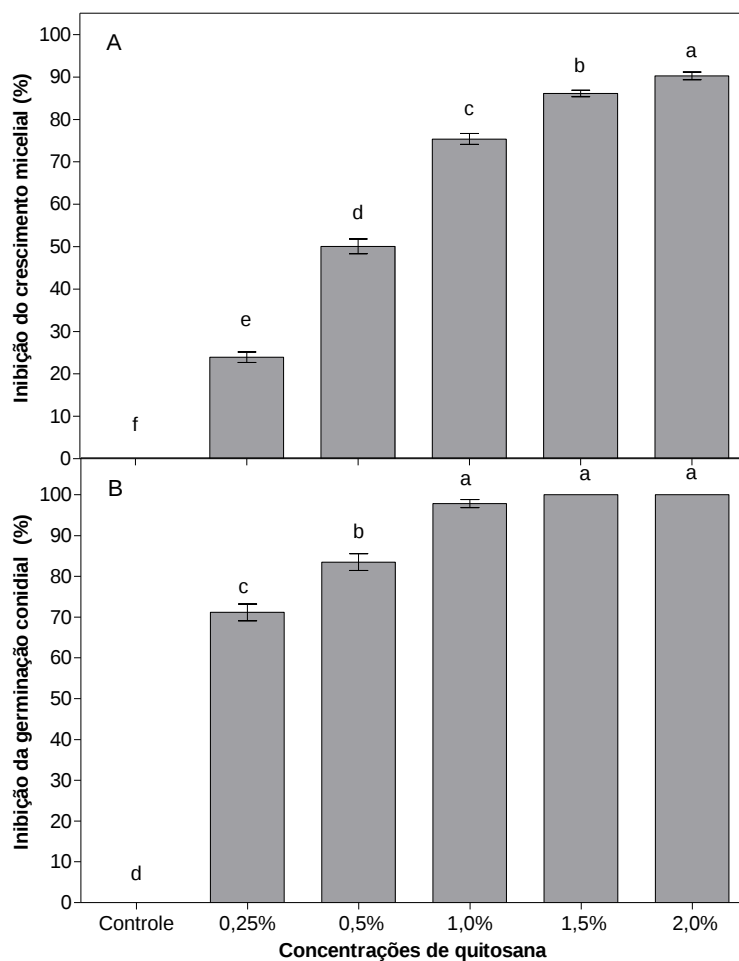


Figura 1. Efeito inibitório de quitosana no crescimento micelial (A) de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de abacate ‘Hass’, após 7 dias a 27 ± 1 °C, e na germinação conidial (B) de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de abacate ‘Hass’, incubado por 10 horas a 27 ± 1 °C. Médias $\pm$ erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,05$) (n=6).

4.2. EFEITO DA QUITOSANA EM ABACATES ‘BREDÁ’ INOCULADOS COM *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES*

O diâmetro da lesão da antracnose foi maior nos frutos que não receberam a aplicação de quitosana, e menor significativamente naqueles tratados com quitosana a 1,0% e 2,0% (Figura 2A).

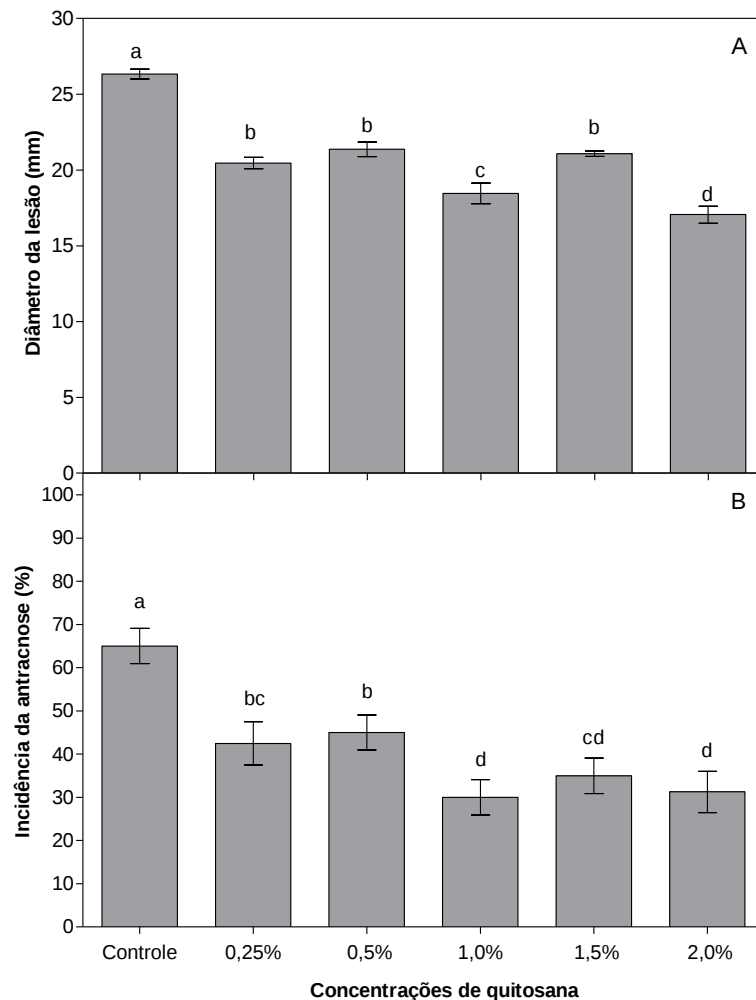


Figura 2. Efeito de quitosana no diâmetro da lesão da antracnose (A) e na incidência da antracnose (B) em abacates 'Breda' inoculados armazenados por 7 dias a 22 ± 2 °C e $65 \pm 5\%$ UR. Médias $\pm$ erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) ($n=4$).

A aplicação da quitosana também reduziu a incidência de sintomas em todos os tratamentos quando comparados aos frutos do controle, sendo que, nas concentrações acima de 1,0% houve menor incidência da doença, com destaque para os tratamentos a 1,0% e 2,0% os quais reduziram a incidência da antracnose nos frutos em 54% em relação tratamento controle (Figura 2B). Resultados semelhantes foram observados em uvas de mesa tratadas com quitosana a 0,1%; 0,5% e 1,0% aplicada na pós-colheita, e

inoculadas com *Botrytis cinerea*, os quais demonstraram redução da incidência e severidade dos sintomas do mofo cinzento em comparação ao controle, com destaque para a maior concentração (ROMANAZZI et al., 2002).

Esses resultados demonstram o efeito positivo da quitosana no crescimento do fungo, que se deve ao acúmulo de compostos fungitóxicos do produto em locais de penetração pelo patógeno. Devido à propriedade da quitosana de formar um revestimento nos vegetais, este polímero também pode agir como uma barreira para o fluxo de nutrientes presentes nos frutos reduzindo a disponibilidade de nutrientes para o crescimento do patógeno, visto que, células fúngicas expostas a quitosana frequentemente exibem sinais de privação de nutrientes (EL GHOUTH, SMILANICK; WILSON, 2000; AIT BARKA et al., 2004).

Neste experimento, era esperado que com o aumento da concentração de quitosana aplicada nos frutos ocorre-se diminuição da lesão da antracnose e da incidência de sintomas, no entanto, isso só ocorreu até a concentração de 1,0% utilizada, sendo que na concentração de 1,5% tanto o diâmetro da lesão quanto a incidência de sintomas nos frutos aumentaram (Figuras 2A e 2B). Estes resultados podem ser consequência da anaerobiose causada nos frutos tratados com quitosana acima de 1,5%, percebido pelo odor característico de frutos fermentados, podendo ter comprometido a capacidade dos frutos de reagir contra a infecção pelo patógeno.

Além do efeito microbiano direto, a quitosana pode induzir reações de defesa pela planta, bem como induzir a formação de barreiras estruturais no tecido do vegetal, restringindo o desenvolvimento do microrganismo invasor, assim como retardar a retomada de infecções quiescentes, sendo interessante, neste caso, aplicar a quitosana nos frutos como tratamento preventivo (EL GHOUTH et al., 1994; BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006).

A atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) na polpa dos abacates apresentou aumento ao final do período de armazenamento, sendo que os maiores valores da atividade desta enzima foram registrados nos frutos não tratados com quitosana (Figura 3A).

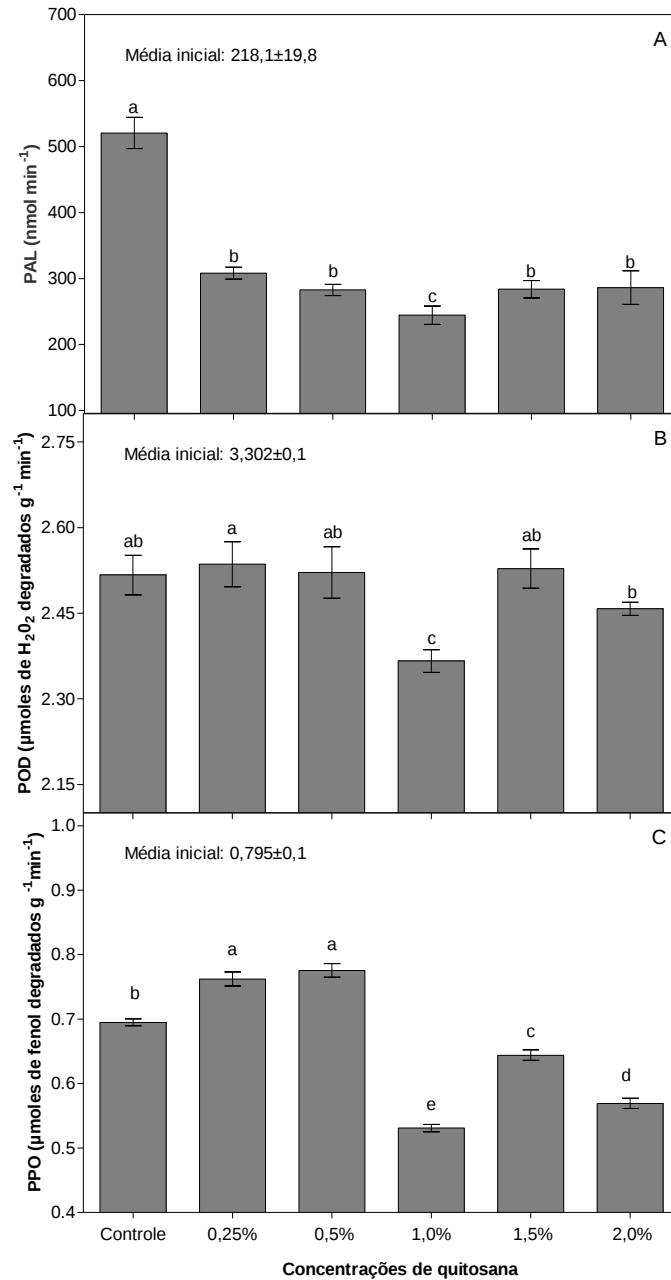


Figura 3. Efeito de quitosana na atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL) (A), peroxidase (POD) (B) e polifenoloxidase (PPO) em abacates 'Breda' inoculados armazenados por 7 dias a 22±2 °C e 65±5% UR. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,05$) ($n=4$).

O aumento na atividade desta enzima indica que o tecido vegetal encontra-se sob condições de estresse, pela ação de agentes abióticos ou bióticos, como o ataque de patógenos (RIVERO et al., 2001; TAIZ; ZEIGER, 2013).

O tratamento com quitosana na concentração de 1,0% proporcionou aos frutos menores valores da atividade da PAL. Resultados semelhantes aos encontrados em uvas de mesa tratadas por imersão em quitosana a 1,0%, e armazenadas a 20°C, que apresentaram menores valores para a atividade desta enzima em comparação aos frutos do controle (MENG et al., 2008). Estudos têm demonstrado que a quitosana é um elicitor exógeno de respostas de defesa do hospedeiro, apresentando diversos mecanismos de ação como o acúmulo de quitinase e compostos fenólicos, a lignificação e indução da atividade de enzimas como fenilalanina amônia-liase, peroxidase e polifenoloxidase (BAUTISTA BAÑOS et al., 2006).

Para a atividade da peroxidase (POD) na polpa dos frutos, os valores encontrados foram menores nos frutos tratados com quitosana a 1,0% (Figura 3B). A imersão de morango e bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) em quitosana a 1,0% foi eficaz na redução da atividade da POD e PAL, em comparação às concentrações mais baixas e ao tratamento controle (MENG et al., 2008; HANA et al., 2014).

A atividade da polifenoloxidase (PPO) foi maior nos frutos do controle e naqueles tratados com as menores concentrações de quitosana (0,25% e 0,5%), quando comparados aos demais tratamentos, sendo que os menores valores para atividade desta enzima foram encontrados nos frutos do tratamento com quitosana a 1,0% (Figura 3C), resultado semelhante ao observado para as enzimas PAL e POD.

A enzima PPO normalmente é elevada em tecidos infectados e está relacionada aos mecanismos de defesa das plantas, uma vez que essas reações são induzidas em vegetais e estão relacionadas às respostas enzimáticas (AGRIOS, 1997; BAUTISTA BAÑOS et al., 2006). Quitosana de diferentes pesos moleculares reduziu a atividade da PPO em tomates inoculados com o fungo *Botrytis cinerea* (Pers.), responsável pelo mofo cinzento, uma das principais doenças pós-colheita de vegetais (BADAWY; RABEA, 2009).

Os menores valores para polifenóis extraíveis totais da polpa foram encontrados nos frutos tratados com as maiores concentrações de quitosana, 1,0%; 1,5% e 2,0%, porém apenas o tratamento a 1,5% de quitosana diferiu significativamente do tratamento controle (Figura 4). Isso sugere que houve menor estresse nesses frutos, uma vez que a infecção dos frutos por microrganismos pode ativar o metabolismo secundário de vegetais, com a liberação de compostos fenólicos presentes nos vacúolos dos frutos (NACZK; SHAHIDI, 2004; ZARDO et al., 2009).

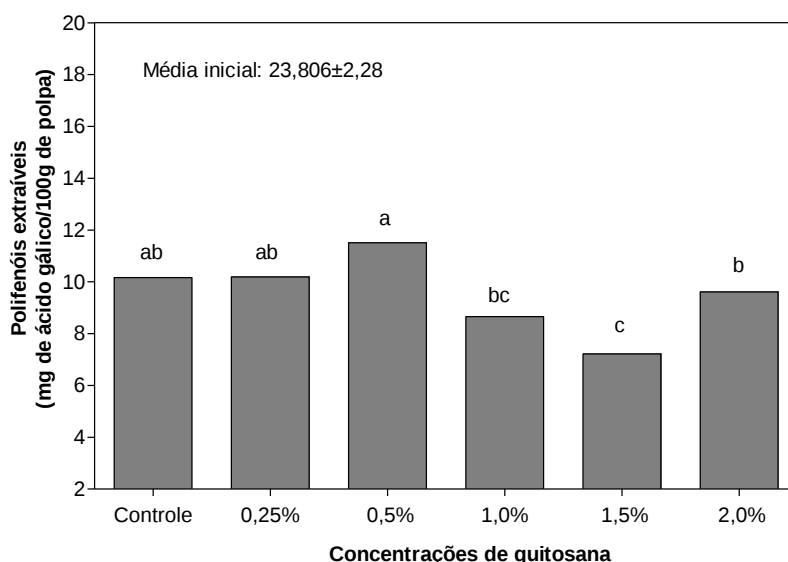


Figura 4. Efeito de quitosana nos polifenóis extraíveis em abacates 'Breda' inoculados armazenados por 7 dias a 22 ± 2 °C e $65\pm 5\%$ UR. Médias $\pm$ erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,05$) ($n=4$).

Após 7 dias de armazenamento, os abacates tratados com as concentrações mais elevadas de quitosana apresentaram redução da taxa respiratória dos frutos, sendo que as médias finais diferiram significativamente do controle e daqueles tratados com as concentrações de 0,25% e 0,5% de quitosana (Figura 5A).

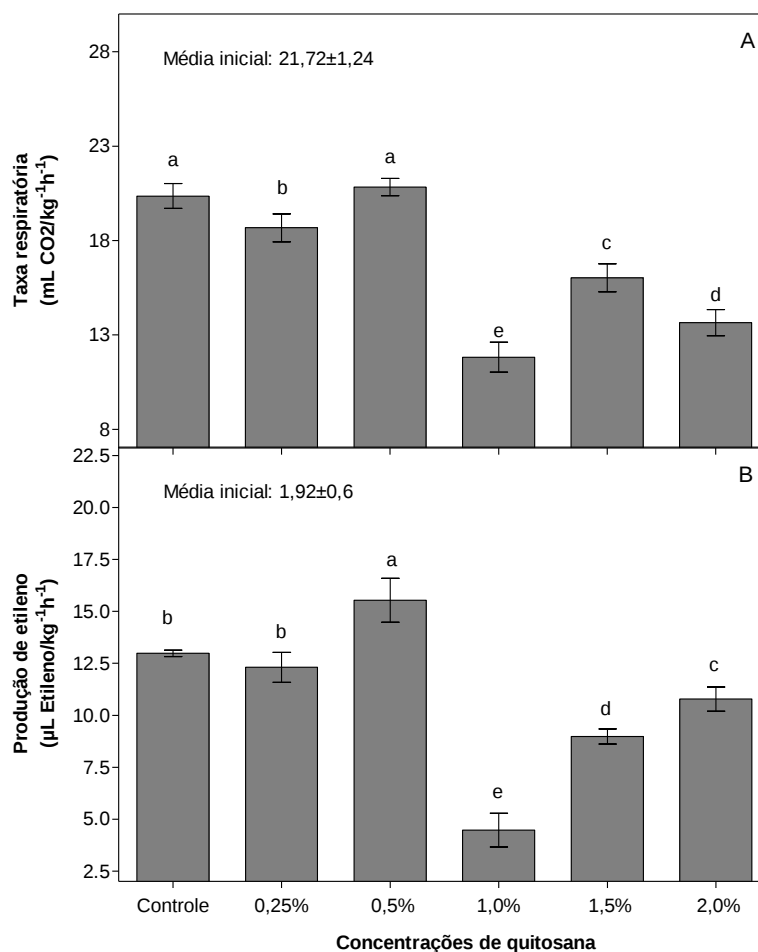


Figura 5. Efeito de quitosana na atividade respiratória (A) e na produção de etileno (B) de abacates ‘Breda’ inoculados armazenados por 7 dias a 22±2 °C e 65±5% UR. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,05$) (n=4).

Com relação à produção de etileno, verificou-se aumento considerável deste gás ao final do período (Figura 5B). Entretanto, verifica-se que após 7 dias de armazenamento houve tendência similar à apresentada na taxa respiratória, ou seja, os frutos tratados com as maiores concentrações de quitosana foram os que apresentaram menor produção de etileno, com destaque para o tratamento com quitosana a 1,0%

Alguns frutos como abacate e manga, depois de colhidos e armazenados em condições de temperatura ambiente, podem apresentar um aumento rápido da taxa

respiratória, iniciando em seguida o processo de amadurecimento (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Neste trabalho, as análises de CO₂ e etileno foram realizadas aos 7 dias de armazenamento, sendo assim, é possível que o pico climatérico dos frutos tenha ocorrido antes dos 7 dias, e que esses já haviam iniciado o processo de senescência, o que explicaria os baixos valores de CO₂, verificados ao final do armazenamento. Entretanto, em relação ao etileno produzido pelos frutos, verificou-se aumento ao final do período. A produção de etileno aumenta de maneira acentuada nos frutos climatéricos, e este aumento pode ou não anteceder a elevação da respiração dos frutos (CHITARRA; CHITARRA, 2005). De acordo com Koshiyachinda e Young (1975), no abacate o pico de etileno ocorre após o início da elevação do CO₂.

Nos tratamentos com 1,0%; 1,5% e 2,0% de quitosana observaram-se menor taxa respiratória e menor produção de etileno pelos frutos. Isto pode ser explicado pelo efeito positivo e adicional da quitosana que está relacionado à sua capacidade de prolongar a vida útil de vegetais, pois além de possuir ação direta sobre patógenos, pode atuar de maneira indireta pelo retardo do processo de amadurecimento dos frutos. A quitosana aplicada nos frutos como revestimento forma uma película semipermeável que atua na regulação da troca de gases, reduzindo a taxa respiratória, a transpiração e consequentemente retardando a maturação dos vegetais. Este resultado tem sido observado em muitos produtos hortícolas tais como manga (SOUZA et al., 2011), mamão (ALI et al., 2011), banana (WIN et al., 2007) e pêssego (LI; YU, 2000).

No entanto, apesar da redução da respiração e da produção de etileno nos frutos dos tratamentos de 1,5% e 2,0% de quitosana, foi observado que essas concentrações proporcionaram condições de anaerobiose aos frutos, percebido pelo odor característico de frutos fermentados nos abacates.

A perda de massa fresca pelos frutos foi menor naqueles tratados com quitosana, com destaque para as concentrações de 1,0% e 2,0%, as quais diferiram significativamente do controle e do tratamento a 0,25% (Figura 6A). Este resultado pode ser atribuído à barreira formada pela quitosana contra a difusão de vapor de água através da cutícula, reduzindo assim a perda de água pelo vegetal e consequentemente reduzindo sua perda de peso (BAUTISTA-BÃNOS et al., 2006; ALI et al., 2011). Estes

resultados estão coerentes com os obtidos nas avaliações de taxa respiratória e produção de etileno pelos frutos (Figuras 5A e 5B), os quais podem ser atribuídos ao revestimento nos abacates formado pela quitosana, que contribui para a redução da difusão dos gases entre os frutos e atmosfera, reduzindo dessa maneira a perda de água pelo vegetal, a respiração dos frutos e a produção de etileno.

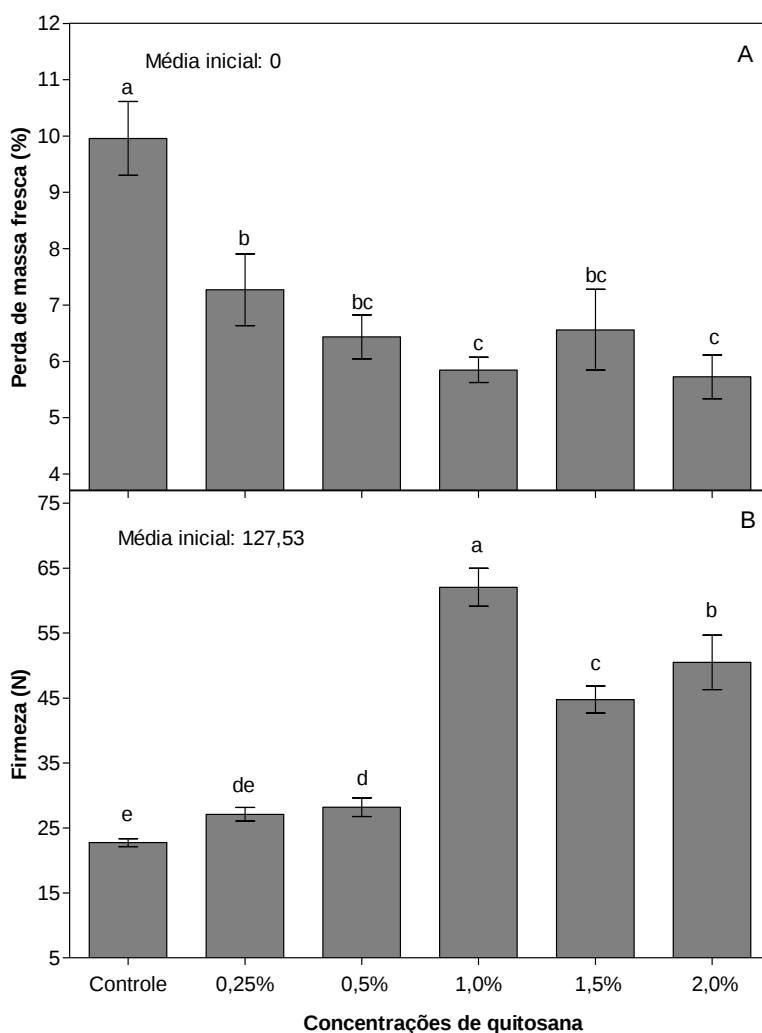


Figura 6. Efeito de quitosana na perda de massa fresca (A) e na firmeza (B) de abacates 'Breda' inoculados armazenados por 7 dias a 22 ± 2 °C e 65 ± 5 % UR. Médias $\pm$ erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) ($n=4$).

No presente trabalho, os frutos tratados com quitosana a 1,0% e 2,0% após 7 dias de armazenamento apresentaram perdas de massa de 43% menor do que os frutos do controle (Figura 6A). Mamões revestidos com quitosana e armazenados a 12 °C durante cinco semanas apresentaram redução da perda de massa proporcional ao aumento da concentração utilizada, sendo que os menores valores encontrados para esta variável foram observados nos tratamentos a 1,5% e 2,0% (ALI et al., 2011).

Na firmeza da polpa dos frutos verificou-se redução ao final dos 7 dias de armazenamento, sendo que os frutos tratados com quitosana nas concentrações acima de 1,0% apresentaram maiores valores de firmeza, comparados aos demais frutos (Figura 6B). Os resultados obtidos para esta variável estão de acordo com os obtidos na análise de perda de massa pelos frutos, uma vez que os frutos tratados com quitosana a 1,0% apresentaram menor perda de massa fresca (Figura 6A). Valores de firmeza em mamão inoculado com *C. gloeosporioides*, também foram mais altos nos frutos tratados com quitosana a 0,5% e 1,0% comparados aos frutos sem o tratamento (BAUSTISTA-BÃNOS et al., 2003).

A firmeza é um importante atributo de qualidade, o qual está relacionado à vida útil dos frutos. O amaciamento dos tecidos das frutas é uma consequência da ação de diversas enzimas responsáveis pela degradação e solubilização de pectinas, e por modificações da composição da parede celular (TOIVONEN; BRUMMELL, 2008). A manutenção da firmeza dos frutos tratados com quitosana nas concentrações acima de 1,0% pode ser devida a atividade antifúngica deste produto e pela formação de recobrimento semipermeável, contribuindo dessa maneira para a redução do processo de infecção pelo patógeno, e para o atraso dos processos de amadurecimento dos frutos (BAUSTISTA-BÃNOS et al., 2006; ALI et al., 2011).

Em relação à luminosidade da casca dos frutos, aqueles tratados com quitosana a 1,0% apresentaram maiores valores em relação aos demais tratamentos, exceto para o tratamento a 0,5%, indicando atraso no escurecimento da casca desses frutos para esse tratamento (Tabela 4).

Para a luminosidade da polpa dos frutos, os maiores valores foram encontrados nos frutos tratados a 1,0% e 2,0% de quitosana, indicando retardo no escurecimento da

polpa dos abacates destes tratamentos, diferindo significativamente do controle e do tratamento com a menor concentração de quitosana (Tabela 4). Além do efeito da quitosana no retardo do escurecimento dos frutos, outra consequência da aplicação deste produto pode estar relacionado ao desenvolvimento da antracnose nos abacates, sugerindo menor estresse nesses frutos tratados, uma vez que a infecção dos frutos por microrganismos pode ativar o metabolismo secundário de vegetais, com a liberação de compostos fenólicos presentes nos vacúolos dos frutos, resultando no escurecimento enzimático nos vegetais (NACZK; SHAHIDI, 2004; ZARDO et al., 2009).

Tabela 4. Efeito de quitosana na coloração da casca e da polpa de abacates ‘Breda’ inoculados armazenados por 7 dias a 22 ± 2 °C e $65\pm 5\%$ UR.

Tratamentos	Luminosidade	Cromaticidade	Ângulo Hue
----- Casca -----			
Controle	47,43 BC	37,26 A	102,23 B
Quitosana 0,25%	47,81 B	34,23 BCD	97,75 C
Quitosana 0,5%	48,05 AB	34,73 BC	98,80 C
Quitosana 1,0%	49,06 A	36,14 AB	103,43 B
Quitosana 1,5%	46,77 CD	32,04 D	98,78 C
Quitosana 2,0%	46,12 D	32,87 CD	115,72 A
F	**	**	**
CV	0,95	2,93	0,98
----- Polpa -----			
Controle	73,37 B	33,72 CD	98,11 A
Quitosana 0,25%	72,21 C	34,61 BC	98,09 A
Quitosana 0,5%	72,81 BC	34,00 C	97,27 A
Quitosana 1,0%	74,47 A	32,68 D	96,55 A
Quitosana 1,5%	73,51 AB	35,52 B	97,89 A
Quitosana 2,0%	74,37 A	36,75 A	97,94 A
F	**	**	NS
CV	0,58	1,45	0,80

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

De acordo com Bautista-Bãnos et al. (2006), o uso de quitosana pode melhorar a aparência externa de frutas por meio da retenção da coloração da casca destes vegetais. Uma vez que o uso de revestimento atrasa o processo de amadurecimento e a senescência dos produtos, resultando em redução da mudança de coloração dos frutos (ALI et al., 2011). No entanto, em geral, observa-se que não houve destaque para a prevenção do escurecimento da casca e polpa dos frutos tratados com quitosana em relação aos frutos do controle, como resultado do amadurecimento e início do processo de senescência dos frutos, e do desenvolvimento dos microrganismos.

O ângulo Hue da casca dos abacates apresentou redução nos valores em média de 115,36° para 100,2°, ao final do armazenamento, exceto para os frutos tratados a 2,0% de quitosana, sugerindo para este tratamento melhor manutenção da cor (Tabela 4). Segundo Cerqueira (2007), aplicação de quitosana em maiores concentrações, como 6,0%, em goiabas 'Kumagai', foi eficiente na retenção da cor da casca.

Em relação à polpa dos frutos, o valor do ângulo Hue obteve pequena redução ao final do período de estocagem, não apresentando diferença entre os tratamentos (Tabela 4).

Os valores para a cromaticidade da casca dos abacates foram menores nos frutos com quitosana a 1,5% e 2,0%, em relação ao controle, indicando retardo das transformações nos pigmentos dos frutos destes tratamentos, como consequência do atraso do amadurecimento dos vegetais proporcionado pelas maiores concentrações de quitosana (Tabela 4).

Para a cromaticidade da polpa dos frutos observou-se efeito contrário do ocorrido na casca, sendo que os frutos com as maiores concentrações de quitosana, 1,5% e 2,0%, apresentaram maiores valores para a variável analisado em relação ao tratamento controle (Tabela 4).

A acidez titulável dos frutos foi maior naqueles tratados com quitosana acima de 0,5% (Figura 7A), comprovando o efeito deste produto no atraso do amadurecimento dos abacates, uma vez que os ácidos orgânicos na maioria dos frutos diminuem com o amadurecimento do vegetal, devido ao consumo dos ácidos durante sua etapa respiratória (KAYS, 1991). Segundo Fischer et al. (2009), o teor de acidez titulável em

manga está associado a resistência/suscetibilidade à antracnose, estando relacionado o aumento de infecções com a diminuição da acidez dos frutos. No presente trabalho, pode-se sugerir o aumento da acidez titulável nos frutos tratados com as maiores concentrações de quitosana, acima de 1,0%, com uma possível resistência à antracnose, uma vez que nesses frutos o desenvolvimento da doenças foi menor (Figura 2A).

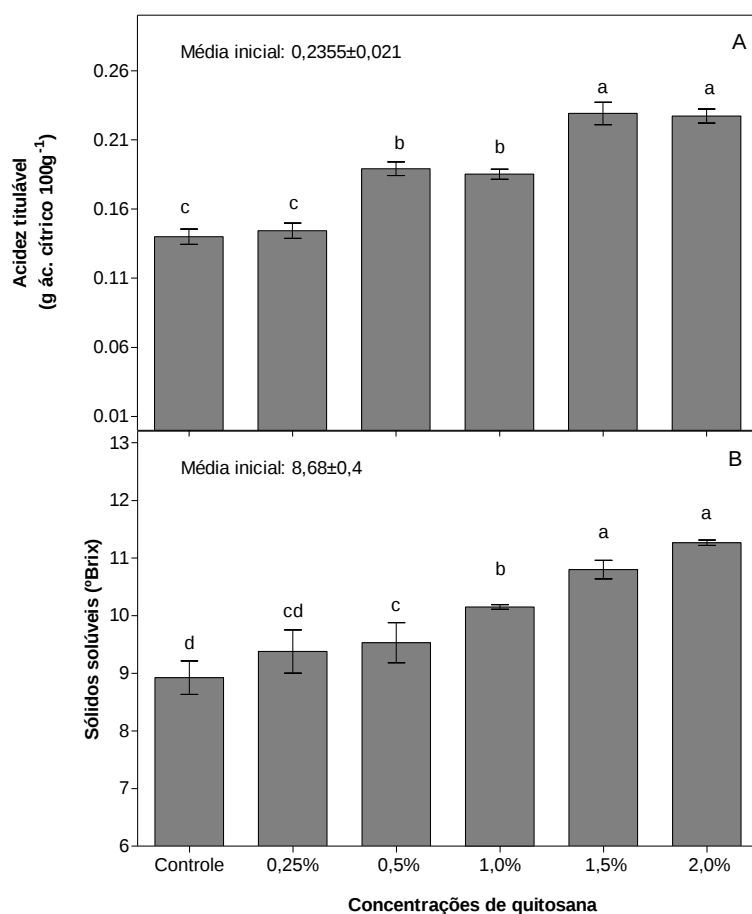


Figura 7. Efeito de quitosana na acidez titulável (A) e sólidos solúveis (B) de abacates 'Breda' inoculados armazenados por 7 dias a 22±2 °C e 65±5% UR. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,05$) (n=4).

Os teores de sólidos solúveis (SS) dos frutos aumentaram com o período de armazenamento, como consequência do amadurecimento dos abacates (Figura 7B). Os

maiores valores para esta variável foram observados nos frutos tratados com quitosana acima de 0,5% em relação aos frutos do controle, não demonstrando assim a eficácia do produto em retardar a solubilização dos açúcares nos abacates, como era esperado. No entanto, os menores valores de sólidos solúveis para os frutos do controle e com quitosana a 0,25%, podem ser devido ao maior consumo de açúcares pelos frutos durante o processo respiratório, constatado através da alta taxa respiratória obtida nos frutos destes tratamentos (Figura 6 A) (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

De acordo com Bautista-Baños et al. (2006), após o armazenamento os teores de sólidos solúveis em frutos tratados com quitosana diferem de acordo com o vegetal. Segundo estes autores, mangas e bananas revestidas com o produto apresentaram menores teores do que o controle, enquanto que em pêssegos os valores de sólidos solúveis foram maiores nos frutos tratados. Neste experimento, com os abacates 'Breda', os frutos tratados com quitosana acima de 0,5% apresentaram maiores teores de sólido solúveis em relação aos frutos do controle.

4.3. EFEITO DA QUITOSANA EM ABACATES 'HASS' INOCULADOS COM *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES*

Para o diâmetro da lesão da antracnose nos frutos, observou-se aos 14 dias redução com o aumento da concentração de quitosana (Figura 8A). Aos 17 dias de armazenamento todos os tratamentos contribuíram para a diminuição do diâmetro da lesão da antracnose, com destaque para a maior concentração, de 2,0%, que reduziu em 43% o diâmetro da lesão em comparação aos frutos do controle.

A incidência dos sintomas da antracnose também foi reduzida, aos 14 dias de armazenamento dos frutos, de acordo com o aumento das concentrações do produto (Figura 8B). No entanto, só houve diferença significativa nos frutos tratados com quitosana a 2,0%, em comparação aos demais tratamentos. O uso de quitosana a 1,5% também foi eficiente na redução da severidade e incidência de podridão mole causada por *R. stolonifer*, em caqui 'Rama Forte' (CIA et al., 2010).

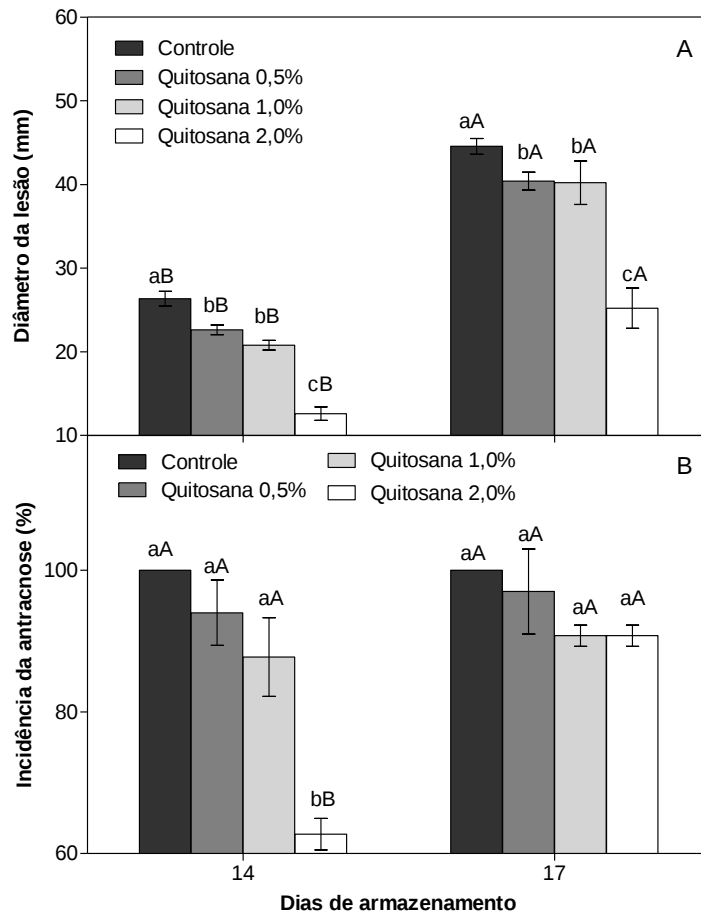


Figura 8. Efeito de quitosana no diâmetro da lesão da antracnose (A) e incidência da antracnose (B) em abacates 'Hass' inoculados armazenados por até 14 dias a 12 ± 2 °C e $80\pm 5\%$ UR, e por mais 3 dias a 22 ± 2 °C e $65\pm 5\%$ UR. Médias $\pm$ erro padrão com letras minúsculas iguais dentro do grupo e maiúsculas entre os grupos de colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,05$) ($n=4$).

Estes resultados demonstram que a quitosana atua diretamente no crescimento de patógenos, sendo que este produto pode atuar também de forma indireta no controle de algumas doenças por meio do atraso no amadurecimento dos frutos, ao formar um recobrimento semipermeável ao redor do fruto, e também por induzir respostas de resistência pelo vegetal (BARKAI-GOLAN, 2001).

A atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) na polpa dos frutos aumentou durante o armazenamento dos abacates, como possível consequência do estresse sofrido pelos frutos devido à infecção pelo patógeno (Figura 9A). Enzimas como a PAL e peroxidases estão envolvidas na produção de componentes relacionados a mecanismos de resistência a doenças de plantas tais como os metabólitos secundários, que desempenham papéis importantes no mecanismo de defesa das plantas durante infecção patogênica (ARFAOUI et al., 2007). Aos 14 dias foram observados menores valores para esta variável nos frutos tratados com quitosana a 2,0%, indicando a superioridade deste tratamento, uma vez que o aumento da atividade da PAL está relacionado à resposta de estresse pelo vegetal (RIVERO et al., 2001; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Para a atividade da peroxidase (POD) na polpa dos frutos, aos 14 dias da aplicação da quitosana, verificou-se redução nos valores desta variável em comparação ao tratamento controle (Figura 9B). Ao final do período de armazenamento, os valores encontrados para a POD foram menores nos frutos tratados com quitosana a 2,0%. Diversos trabalhos têm demonstrado que a quitosana possui atividade antimicrobiana e que também está relacionada à indução de resistência às doenças pelas plantas, contribuindo na sua proteção (WAEWTHONGRAK; PISUCHPENB; LEELASUPHAKUL, 2015).

Os resultados para a atividade da polifenoloxidase (PPO) nos abacates foram semelhantes aos encontrados para a POD, sendo que aos 14 dias o uso da quitosana nos frutos reduziu os valores da atividade da PPO comparados aos frutos do controle, apresentando menores valores aos 17 dias no tratamento com quitosana a 2,0% (Figura 9C). A PPO também tem sido relacionada com resposta do vegetal contra estresse, ocorrendo aumento da atividade da enzima durante o processo de infecção por patógenos (OJAGHIAN et al., 2013).

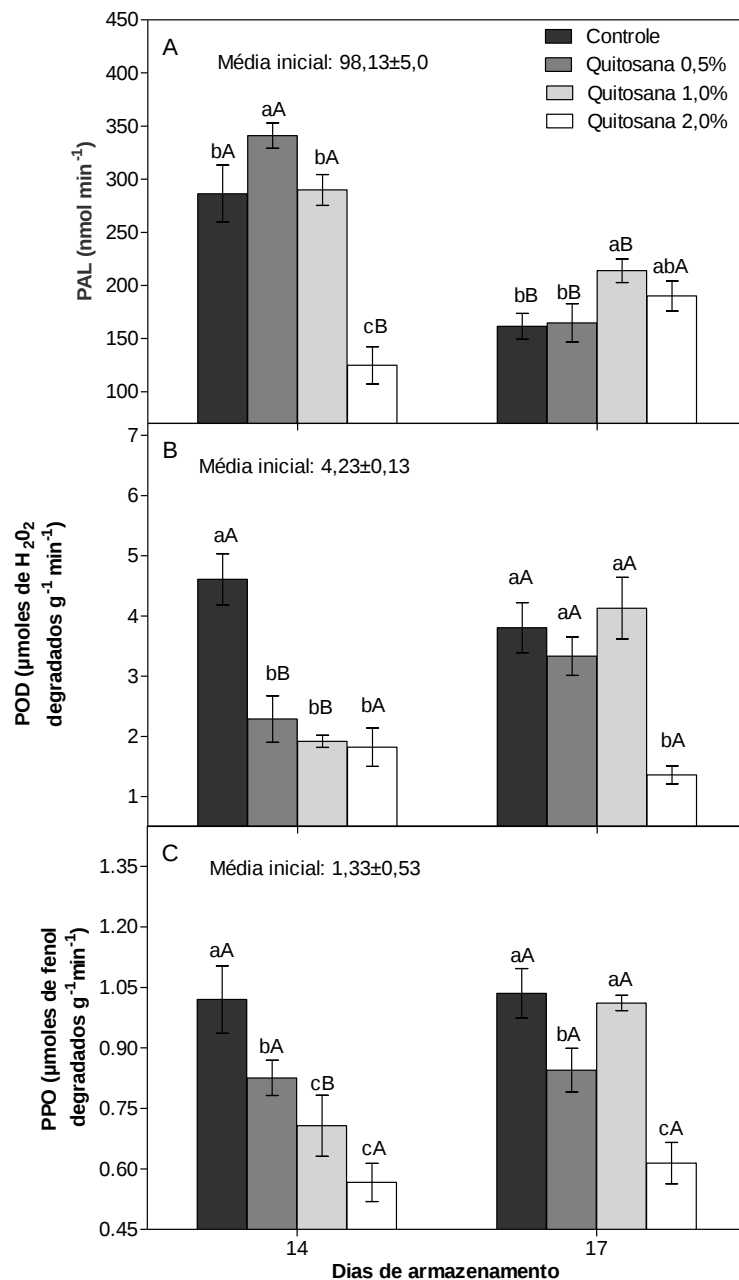


Figura 9. Efeito de quitosana na atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL) (A), peroxidase (POD) (B) e polifenoloxidase (PPO) (C) em abacates ‘Hass’ inoculados armazenados por até 14 dias a 12 ± 2 °C e $80 \pm 5\%$ UR, e por mais 3 dias a 22 ± 2 °C e $65 \pm 5\%$ UR. Médias $\pm$ erro padrão com letras minúsculas iguais dentro do grupo e maiúsculas entre os grupos de colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) ($n=4$).

Os menores valores para polifenóis extraíveis totais da polpa foram registrados nos tratamentos com as maiores concentrações de quitosana, 1,0% e 2,0%, ao final do armazenamento dos frutos (Figura 10). A formação de compostos fenólicos nos frutos está relacionada ao metabolismo secundário dos vegetais, que pode ser ativado em resposta a algum estresse sofrido pelo vegetal, como o ataque de patógenos (NACZK; SHAHIDI, 2004; ZARDO et al., 2009). Sendo assim, os resultados encontrados neste trabalho indicam que os frutos tratados com quitosana nas maiores concentrações se encontravam em situação de menor estresse, o que pode ser verificado pelo menor desenvolvimento da doença nesses tratamentos em comparação ao controle (Figura 8A).

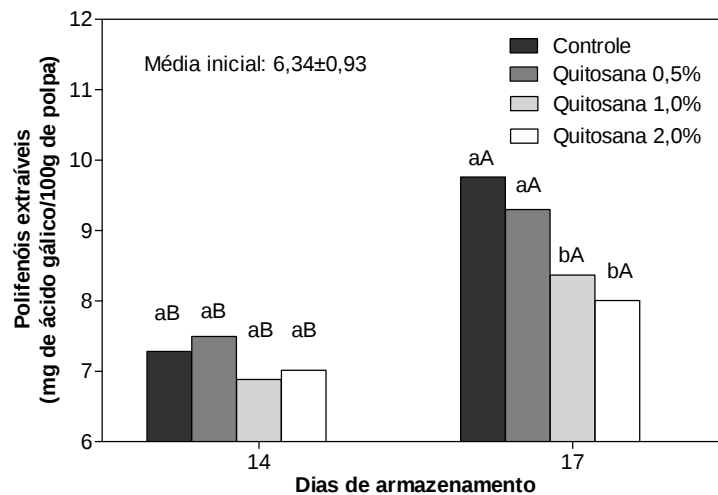


Figura 10. Efeito de quitosana nos polifenóis extraíveis em abacates ‘Hass’ inoculados armazenados por até 14 dias a 12 ± 2 °C e $80\pm 5\%$ UR, e por mais 3 dias a 22 ± 2 °C e $65\pm 5\%$ UR. Médias $\pm$ erro padrão com letras minúsculas iguais dentro do grupo e maiúsculas entre os grupos de colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) ($n=4$).

Para a taxa respiratória dos frutos, o tratamento com quitosana a 2,0% foi eficiente na redução da respiração dos frutos aos 14 dias (Figura 11A).

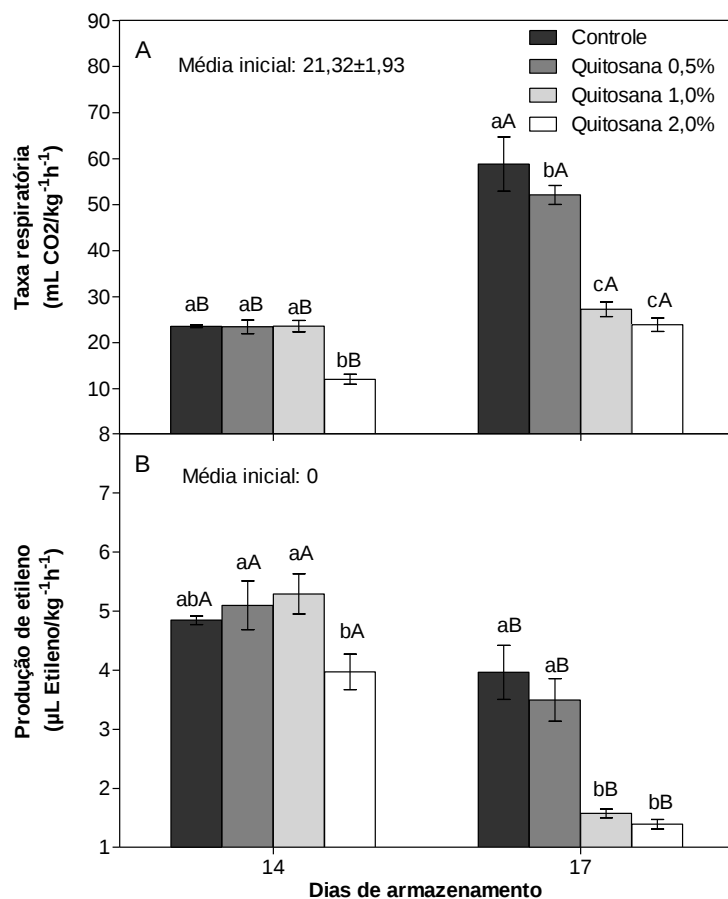


Figura 11. Efeito de quitosana na taxa respiratória (A) e na produção de etileno (B) de abacates ‘Hass’ inoculados armazenados por até 14 dias a 12±2 °C e 80±5% UR, e por mais 3 dias a 22±2 °C e 65±5% UR. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais dentro do grupo e maiúsculas entre os grupos de colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) ($n=4$).

Ao final do armazenamento, com o aumento da concentração da quitosana ocorreu redução da taxa respiratória dos frutos, sendo que os tratamentos a 1,0% e 2,0% de quitosana proporcionaram redução de 54% e 60%, respectivamente. Notou-se, também, aumento da taxa respiratória dos frutos ao final do período de estocagem, como consequência do aumento da temperatura na qual os abacates foram submetidos, após a transferência dos frutos do armazenamento refrigerado a 12 °C para o armazenamento em condições de ambiente a 22 °C.

A produção de etileno pelos frutos foi menor naqueles tratados com quitosana a 2,0% aos 14 dias de armazenamento, e ao final do período a redução foi mais acentuada nos frutos a 1,0% e 2,0% (Figura 11B).

Estes resultados comprovam o efeito positivo da quitosana em prolongar a vida útil de frutos, por meio do atraso do processo de amadurecimento dos vegetais. A quitosana, utilizada como revestimento, forma uma película semipermeável que modifica a atmosfera ao redor do fruto atuando assim na regulação da troca de gases, na redução da taxa respiratória, na transpiração e consequentemente no atraso da maturação dos frutos (BARKAI-GOLAN, 2001). Além da inibição da produção de CO₂ pelos frutos, o uso da quitosana também pode reduzir a produção de etileno pelo produto. Ambos os efeitos de redução foram relatados por Li e Yu (2000) em pêssegos revestidos com quitosana a 5 mg mL⁻¹ e 10 mg mL⁻¹, os quais foram tratados com o revestimento natural após a inoculação com *Monilinia fructicola*, agente causal da podridão parda nos frutos, e verificaram redução na taxa respiratória e na produção de etileno pelos frutos, em comparação ao tratamento controle.

A aplicação de quitosana a 1,0% e 2,0% resultou na redução da perda de massa fresca pelos frutos durante o período de armazenamento (Figura 12). Observou-se que ao final do armazenamento, os frutos que não receberam a aplicação de quitosana apresentaram perda de 30% a mais de massa fresca pelos frutos em comparação àqueles tratados com o produto a 2,0%. Um dos efeitos de revestimentos aplicados em vegetais é o controle da transferência de umidade do produto para o ambiente, o que possibilita diminuição da perda de água pelo vegetal, reduzindo sua perda de peso (BAUTISTA-BÃNOS et al., 2006; ALI et al., 2011). Os resultados relacionados a perda de massa fresca pelos frutos deste experimento, estão de acordo com os resultados encontrados para a taxa respiratória e produção de etileno (Figuras 11A e 11B), em relação a aplicação de quitosana, a qual contribui para a redução da difusão de gases entre os frutos e atmosfera, reduzindo assim a perda de massa fresca, a taxa respiratória e a produção de etileno pelos frutos.

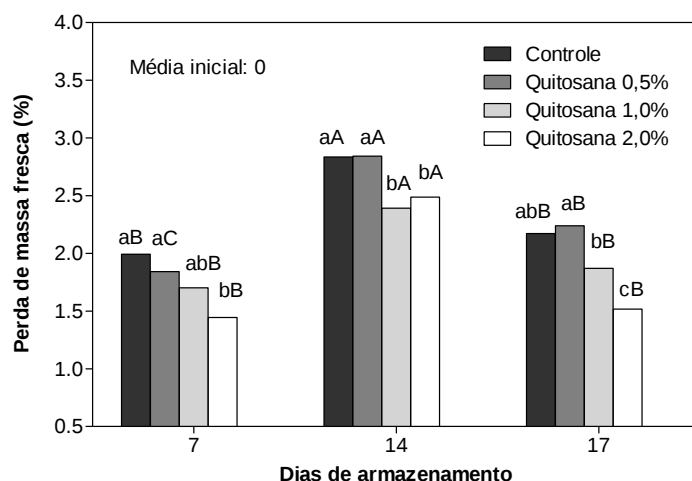


Figura 12. Efeito de quitosana na perda de massa fresca de abacates ‘Hass’ inoculados armazenados por até 14 dias a 12 ± 2 °C e $80\pm 5\%$ UR, e por mais 3 dias a 22 ± 2 °C e $65\pm 5\%$ UR. Médias $\pm$ erro padrão com letras minúsculas iguais dentro do grupo e maiúsculas entre os grupos de colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) ($n=4$).

A firmeza da polpa dos frutos foi maior naqueles tratados com quitosana a 1,0% e 2,0% aos 14 dias, e aos 17 dias nos frutos a 2% (Figura 13).

Estes resultados demonstram que estes frutos sofreram atraso nos processos de amadurecimento devido ao efeito da quitosana, uma vez que, durante o amadurecimento dos vegetais ocorre a solubilização de substâncias pécticas da lamela média ocasionando a diminuição de firmeza dos tecidos dos vegetais. Sendo assim, a quitosana pode contribuir para a manutenção da firmeza do tecido dos frutos por mais tempo, e dessa maneira, diminuir a vulnerabilidade dos vegetais ao ataque de microrganismos patogênicos (BARKAI-GOLAN, 2001). Em bananas inoculadas com *Colletotrichum musae*, *Fusarium spp.* e *Lasiodiplodia theobromae*, o uso de quitosana na concentração de 1% atrasou significativamente o amadurecimento dos frutos mantendo os maiores valores de firmeza da casca (WIN et al., 2007).

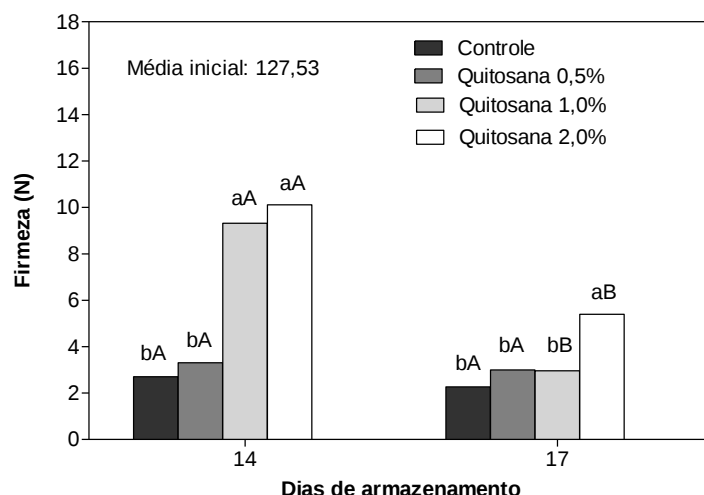


Figura 13. Efeito de quitosana na firmeza de abacates 'Hass' inoculados armazenados por até 14 dias a 12 ± 2 °C e $80\pm 5\%$ UR, e por mais 3 dias a 22 ± 2 °C e $65\pm 5\%$ UR. Médias $\pm$ erro padrão com letras minúsculas iguais dentro do grupo e maiúsculas entre os grupos de colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) ($n=4$).

A luminosidade da casca dos frutos apresentou maiores valores para os frutos com quitosana a 1,0% e 2,0% aos 14 dias de armazenamento, em comparação aos frutos do controle, demonstrando a eficiência deste tratamento na prevenção do escurecimento da casca (Tabela 5). Aos 17 dias, observou-se diferença significativa entre os tratamentos a 1,0% e controle, nos quais os frutos do controle apresentaram escurecimento da casca indicado pela redução dos valores de luminosidade. A aplicação de quitosana a 1,0% em uvas de mesa cv. Moscatel, também mantiveram maiores os valores de luminosidade do fruto (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011a). Este efeito foi atribuído ao recobrimento formado pela quitosana, que inibe ou diminui a absorção de luz pela superfície dos frutos .

Tabela 5. Efeito de quitosana na coloração da casca de abacates ‘Hass’ inoculados armazenados por até 14 dias a 12 ± 2 °C e $80\pm 5\%$ UR, e por mais 3 dias a 22 ± 2 °C e $65\pm 5\%$ UR.

Tratamentos	Dias de armazenamento	
	14	17
Luminosidade casca		
Controle	33,22 bA	33,77 bA
Quitosana 0,5%	34,41 abA	33,91 abA
Quitosana 1,0%	35,05 aA	35,45 aA
Quitosana 2,0%	35,37 aA	34,34 abA
Ângulo Hue casca		
Controle	118,56 bA	111,47 bB
Quitosana 0,5%	118,97 bA	110,09 bB
Quitosana 1,0%	123,68 aA	124,60 aA
Quitosana 2,0%	125,64 aA	121,26 aB
Cromaticidade casca		
Controle	20,70 abA	14,32 bB
Quitosana 0,5%	22,18 aA	13,96 bB
Quitosana 1,0%	19,28 bA	18,00 aA
Quitosana 2,0%	20,38 abA	17,55 aB

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Para o ângulo Hue da casca, observou-se que aos 14 dias e ao final do armazenamento os frutos com quitosana a 1,0% e 2,0% apresentaram maiores valores para o ângulo de cor em relação aos demais tratamentos, indicando atraso na mudança de cor nesses frutos (Tabela 5). Estes resultados estão de acordo com os verificados por Zhu et al. (2008), os quais observaram atrasos na mudança de cor da casca de mangas ‘Tainong’ com a aplicação de quitosana.

Para os valores de cromaticidade da casca dos abacates, observou-se diferença entre os tratamentos ao final do armazenamento, sendo que os frutos tratados com quitosana a 1,0% e 2,0% apresentaram maiores valores para esta variável, sugerindo o atraso do processo de amadurecimento destes abacates devido ao retardo das transformações de pigmentos presentes na casca dos frutos, como resultado da aplicação da quitosana nas maiores concentrações (Tabela 5).

A luminosidade da polpa dos frutos apresentou maiores valores, aos 14 dias, nos frutos tratados com quitosana a 2,0% em relação ao tratamento controle, indicando

atraso no escurecimento da polpa dos frutos (Tabela 6). Ao final do período de armazenamento os frutos do controle apresentaram redução nos valores de luminosidade em comparação aos demais tratamentos.

Para o ângulo de cor da polpa dos frutos observou-se menores valores nos frutos do controle em relação aos demais tratamentos, e aos 17 dias os valores foram menores nos frutos com quitosana a 1,0% (Tabela 6).

Em relação à cromaticidade da polpa dos frutos, observaram-se ao final do armazenamento, resultados semelhantes aos encontrados para a cromaticidade da casca, nos quais os frutos tratados com quitosana a 1,0% e 2,0% confirmaram os maiores valores para esta variável analisada, indicando atraso das mudanças nas transformações de pigmentos na polpa destes frutos (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito de quitosana na coloração da polpa de abacates ‘Hass’ inoculados armazenados por até 14 dias a 12 ± 2 °C e $80\pm 5\%$ UR, e por mais 3 dias a 22 ± 2 °C e $65\pm 5\%$ UR.

Tratamentos	Dias de armazenamento	
	14	17
----- Luminosidade polpa -----		
Controle	75,60 bcA	73,09 bB
Quitosana 0,5%	74,44 cA	74,46 aA
Quitosana 1,0%	76,18 abA	74,56 aB
Quitosana 2,0%	77,34 aA	74,67 aB
----- Ângulo Hue polpa -----		
Controle	97,32 bA	97,84 bA
Quitosana 0,5%	99,22 aA	99,66 aA
Quitosana 1,0%	99,65 aA	97,66 bB
Quitosana 2,0%	99,20 aA	100,09 aA
----- Cromaticidade polpa -----		
Controle	34,00 abA	32,66 bA
Quitosana 0,5%	32,79 cA	32,84 bA
Quitosana 1,0%	35,97 aA	36,00 aA
Quitosana 2,0%	34,67 abB	37,00 aA

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Para a acidez titulável dos abacates, notou-se diminuição durante o período de armazenamento, como consequência do amadurecimento dos frutos (Figura 14A). Aos

17 dias de armazenamento, os frutos do controle apresentaram maiores valores de acidez em relação aos tratamentos com quitosana a 1,0% e 2,0%. Estes resultados não estão de acordo com Fischer et al. (2009), os quais relacionaram a diminuição da acidez dos frutos com o aumento de infecções em manga, uma vez que neste trabalho os frutos do controle e do tratamento a 0,5% apesar de apresentarem maiores teores de acidez nos frutos, também apresentaram maior severidade e incidência da doença (Figuras 8A e 8B).

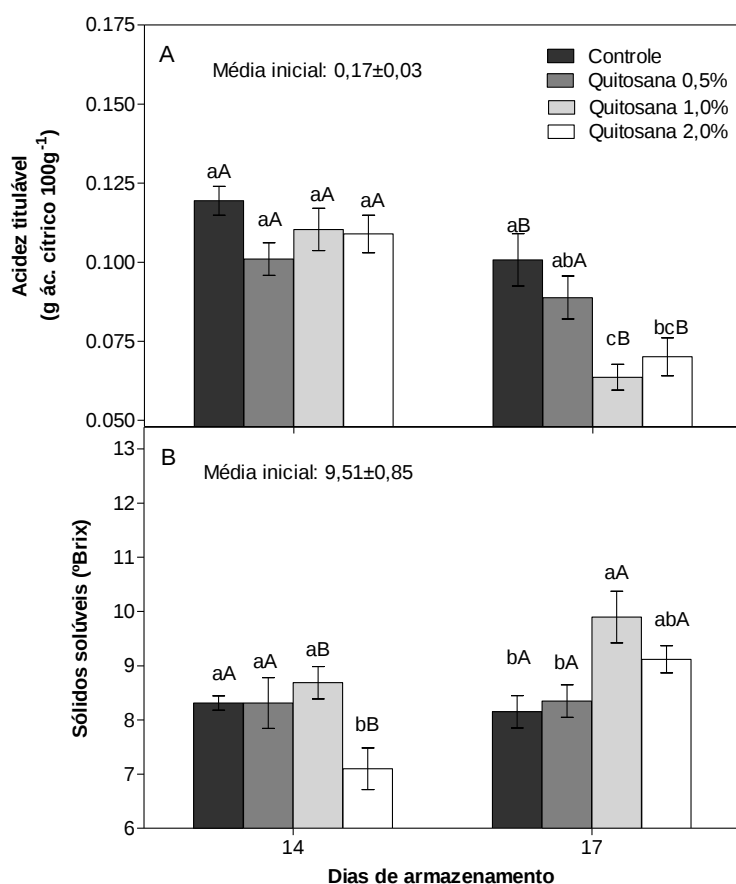


Figura 14. Efeito de quitosana na acidez titulável (A) e nos sólidos solúveis (B) de abacates 'Hass' inoculados armazenados por até 14 dias a 12 ± 2 °C e $80 \pm 5\%$ UR, e por mais 3 dias a 22 ± 2 °C e $65 \pm 5\%$ UR. Médias $\pm$ erro padrão com letras minúsculas iguais dentro do grupo e maiúsculas entre os grupos de colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) ($n=4$).

Os teores de sólidos solúveis (SS) nos frutos com quitosana a 2,0% apresentaram menores valores comparados aos demais tratamentos (Figura 14B). Isto pode ser devido ao efeito da quitosana associado à refrigeração, no retardo do amadurecimento destes frutos. Porém, ao final do armazenamento nota-se que os frutos a 1,0% e 2,0% obtiveram maiores valores para esta variável. Essa redução nos teores de SS nos frutos do controle e com quitosana a 0,5% pode ser consequência do maior consumo de açúcares por estes frutos durante a etapa respiratória, indicando o avançado estado de maturação desses frutos (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Os resultados mostraram que a quitosana apresenta-se como grande potencial de utilização para a redução dos sintomas e da incidência da antracnose em abacates na pós-colheita e na manutenção da qualidade dos frutos. Sendo que, a partir da concentração de 1,0% inibiu o crescimento micelial e a germinação de conídios de *C. gloeosporioides*, e a 1,0% foi eficiente na redução dos sintomas e da incidência da antracnose em abacates 'Breda', e na manutenção da qualidade dos mesmos. Na concentração de 2% em abacates 'Hass', foi eficiente na redução dos sintomas e da incidência da antracnose, e na manutenção da qualidade dos frutos.

4.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Foram realizados dois ensaios com os óleos essenciais para avaliar a porcentagem de inibição do crescimento de *C. gloeosporioides*, nos quais a porcentagem de inibição foi calculada em relação à testemunha.

Dentre os óleos avaliados, no primeiro ensaio, destacou-se o extraído da espécie *Thymus vulgaris* que apresentou a concentração inibitória mínima para o fungo de 0,047%, seguido das espécies *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba*, *Cymbopogon winterianus*, *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens* com 0,75% (Tabela 7). Neste ensaio o óleo *Lippia sidoides* não apresentou resultados conclusivos.

No segundo ensaio, o melhor resultado foi para o óleo extraído da espécie *L. sidoides* que apresentou a concentração inibitória mínima para o fungo de 0,0125%, seguido das espécies, *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon*

winterianus com 0,0250% (Tabela 7). Neste ensaio os óleos *Eucalyptus staigeriana* e *Baccharis dracunculifolia* não apresentaram resultados conclusivos.

Tabela 7. Concentração mínima inibitória (CMI) dos óleos essenciais encontrada para o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*.

Nome comum	Espécie	CMI para <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	
		1 ° ensaio	2 ° ensaio
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	0,047%	0,0250%
Capim-limão	<i>Cymbopogon citratus</i>	0,750%	0,0250%
Erva-cidreira	<i>Lippia Alba</i>	0,750%	RI
Eucalipto- staigeriana	<i>Eucalyptus staigeriana</i>	1,50%	*
Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i>	0,750%	0,0250%
Eucalipto-cidró	<i>Corymbia citriodora</i>	0,750%	0,0500%
Eucalipto-comum	<i>Eucalyptus globulus</i>	0,750%	RI
Eucalipto-Nitens	<i>Eucalyptus nitens</i>	0,750%	RI
Alecrim-do-campo	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	1,50%	*
Alecrim-pimenta	<i>Lippia sidoides</i>	RI	0,0125%

RI: resultados inconclusivos. *: não ocorreu inibição.

Nos dois ensaios realizados para a avaliação da concentração mínima inibitória do fungo, utilizando a técnica de microdiluição em caldo, ocorreram diferenças nos resultados entre os óleos avaliados, o que pode ser devido a metodologia utilizada ou devido a espécie fúngica avaliada.

4.5. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Na avaliação da composição química do óleo essencial *T. vulgaris* foram identificados os compostos majoritários de timol (17,30%), β -cymene (19,10%) e carvacrol (20,00%) (Tabela 8). Nessa avaliação foram identificados 23 compostos no óleo essencial de tomilho, representando 98,78% da composição total do óleo.

Tabela 8. Composição química do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*).

Composto	Índice de Kovats (IK) observado	%
Tricyclene	967	0,13
Sabinene	981	0,12
α -Pinene	1018	5,84
α - Terminene	1025	4,01
β -Pinene	1072	0,82
Myrcene	1094	1,81
α -Fellandrene	1127	1,18
3-Carene	1158	0,59
Terpinolene	1179	0,48
β -Cymene	1201	19,10
α -limonene	1206	4,22
1,8-cineole	1210	2,87
γ -Terpinene	1248	0,86
α -Terpinolene	1288	1,00
linalool	1302	5,51
Camphor	1349	0,88
Isoborneol	1362	1,98
Borneol	1371	4,06
Terpinen-4-ol	1382	1,65
α -Terpinol	1395	1,84
Isobornyl acetate	1492	2,53
Thymol	1496	17,30
Carvacrol	1507	20,00
Total identificado		98,78%

A avaliação da composição química do óleo essencial de *L. sidoides* identificou o composto majoritário de timol (49,46%), sendo que foram identificados 20 compostos no óleo essencial avaliado, representando 99,86% da composição total do óleo (Tabela 9).

Tabela 9. Composição química do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*).

Composto	Índice de Kovats (IK) observado	%
α -Felandreno	930	1,51
α -pineno	937	0,54
Mirceno	995	2,37
α - Terpineno	1021	2,50
Cimeno	1029	11,40
Limoneno	1033	1,08
Cineol	1036	2,31
γ -Terpineno	1063	8,06
Cis Hidrato Sabineno	1072	0,38
2-Metill-6-metileno-2,7-octadien-4-ol	1151	1,07
4-Terpineol	1183	1,31
α - Terpenol	1198	0,38
Anisol	1240	4,08
Thymol	1299	49,46
Copaeno	1384	1,00
Iso-cariofileno	1430	8,80
Aromadendreno	1449	0,69
Humuleno	1464	0,55
Lepidozeno	1507	1,71
δ -Cadineno	1533	0,68
Total identificado		99,86%

Na avaliação da composição química do óleo essencial de *C. citratus*, foram identificados os compostos majoritários de β -citral (29,90%) e α -Citral (35,68%) (Tabela 10). Nessa avaliação foram identificados 11 compostos no óleo essencial de capim limão, representando 94,14% da composição total do óleo.

Tabela 10. Composição química do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*).

Composto	Índice de Kovats (IK) observado	%
Camphene	1026	1,03
5-Hepten-2-one, 6-methyl	1089	1,42
4-Nonanone	1266	1,42
linalool	1302	1,87
Carane, 4,5-epoxy	1385	4,01
α -terpineol	1396	0,84
β -Citral	1446	29,90
cis-Geraniol	1458	7,65
α -Citral	1476	35,68
Geraniol acetate	1588	6,72
β -Caryophyllene	1801	3,60
Total identificado		94,14%

4.6. EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS NO CRESCIMENTO MICELIAL E NA GERMINAÇÃO CONIDIAL DE *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIODES*

A dose mínima inibitória do fungo foi de 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ dos óleos essenciais de tomilho (*T. vulgaris*) e de alecrim-pimenta (*L. sidoides*), sendo que a partir desta dose a inibição do crescimento micelial do patógeno foi de 100%, refletindo o potencial fungicida dos óleos avaliados sobre o microrganismo (Figuras 15A e 16A) (Apêndice 2A, 2B e 2C).

De acordo com Arrebola et al. (2010), o óleo de tomilho inibe diretamente o crescimento de patógenos e a germinação de esporos porque afeta os sítios ativos das enzimas dos microrganismos e o seu metabolismo celular. O uso do óleo essencial de *Lippia scaberrima*, aplicado *in vitro*, na concentração de 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$, causou inibição significativa do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, e *Alternaria isolate*, conforme reportado por Regnier et al. (2010).

A dose mínima para a inibição da germinação conidial do *C. gloeosporioides* ocorreu a partir de 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo de tomilho, na qual inibiu em 90% a germinação

do patógeno (Figura 15B). Esses resultados concordam com o resultado verificado para o mesmo óleo na inibição do crescimento micelial do fungo (Figura 15B).

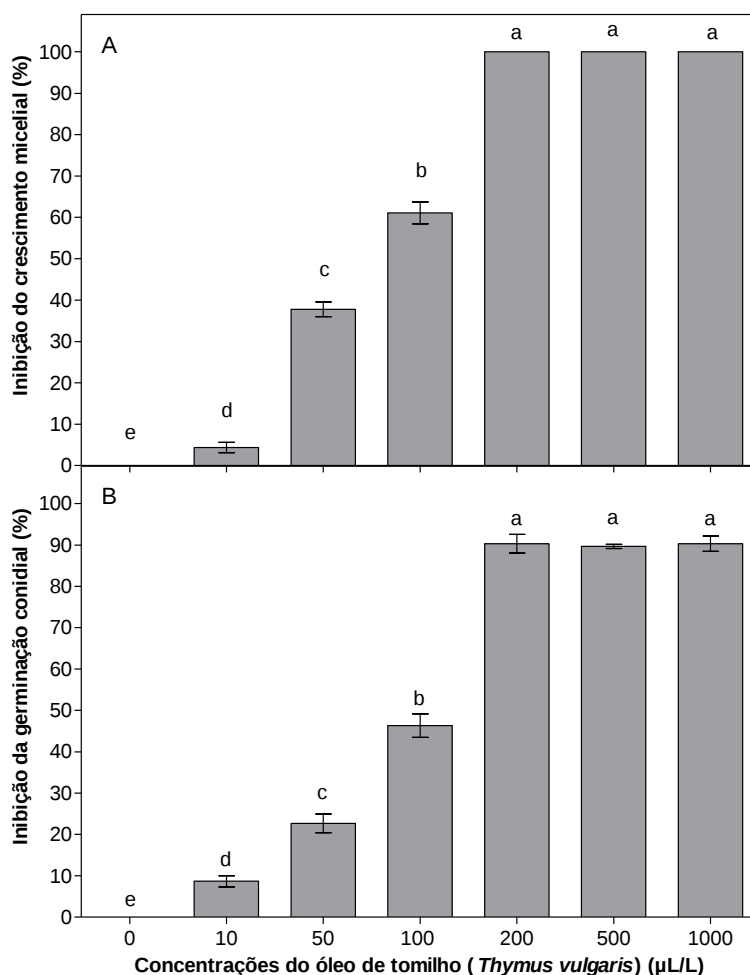


Figura 15. Efeito inibitório do óleo de tomilho (*Thymus vulgaris*) no crescimento micelial (A) de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de abacates 'Hass', após 7 dias a 27±1 °C, e na germinação conidial (B) de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de abacates 'Hass', incubado por 10 horas a 27±1 °C. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) (n=6).

Para o experimento com o óleo de alecrim-pimenta, verificou-se que ocorreu a inibição da germinação conidial do fungo a partir da dose de 200 µL L⁻¹ do óleo, sendo que nesta dose a inibição foi de 88% (Figura 16B). A dose mínima inibitória da

germinação conidial do patógeno, 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo de alecrim-pimenta, foi a mesma dose verificada para a inibição do crescimento micelial do fungo (Figura 16A).

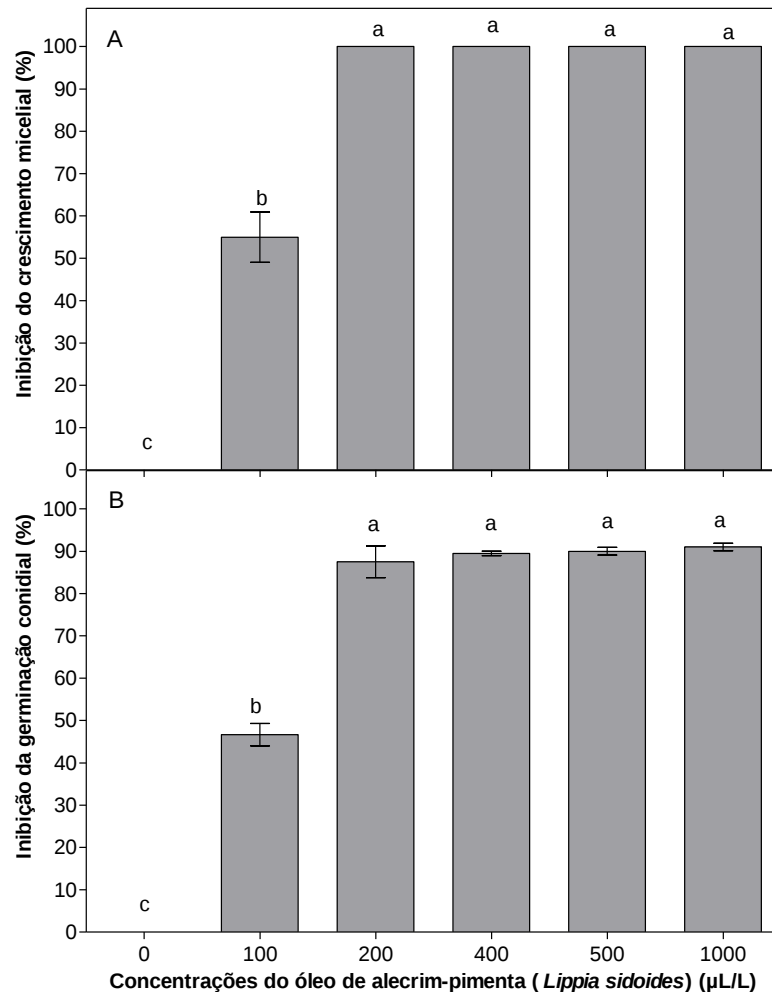


Figura 16. Efeito inibitório do óleo de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) no crescimento micelial (A) de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de abacates 'Hass', após 7 dias a 27 ± 1 °C, e na germinação conidial (B) de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de abacates 'Hass', incubado por 10 horas a 27 ± 1 °C. Médias $\pm$ erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) ($n=6$).

Para o óleo de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) a dose mínima inibitória do fungo foi de 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo (Figura 17A) (Apêndice 2D). Os experimentos *in vitro*

são muito importantes por permitir a identificação de óleos essenciais, e suas concentrações, que são eficazes na inibição de uma espécie ou de um grupo de microrganismos patogênicos (COMBRINCK; REGNIER; KAMATOU, 2011).

Os óleos essenciais de tomilho e capim-limão inibiram em 50% e 25%, respectivamente, o crescimento micelial dos patógenos *B. cinerea*, *P. expansum* e *R. stolonifer*, responsáveis por importantes doenças na pós-colheita de pêssegos (ARREBOLA et al., 2010).

Para o óleo de capim-limão a dose mínima inibitória da germinação conidial do fungo foi de 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo, a qual inibiu 85% da germinação (Figura 17A). No entanto, para o mesmo óleo, em relação ao crescimento micelial do fungo, a dose mínima inibitória foi de 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo (Figura 17B).

Os OE podem causar danos à membrana citoplasmática dos microrganismos, uma vez que atravessam sua parede celular e a membrana citoplasmática afetando suas estruturas e tornando-a mais permeável (BAKKALI et al., 2008). Esta propriedade citotóxica é muito importante na aplicação de óleos essenciais contra microrganismos patogênicos, os quais têm sido estudados na proteção de plantas e alimentos, apresentando resultados satisfatórios.

Combrinck, Regnier e Kamatou (2011) avaliaram a propriedade antifúngica de dezoito óleos essenciais *in vitro*, por adição ao meio de crescimento de cinco espécies de fungos patogênicos (*L. theobromae*, *C. gloeosporioides*, *Alternaria citrii*, *B. cinerea* e *Penicillium digitatum*) isolados de manga, abacate, citros, uva e figo-da-índia. Os autores verificaram que o óleo de tomilho na concentração de até 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ foi o mais eficaz na inibição de todos os patógenos avaliados, com exceção da estirpe resistente de *Penicillium*.

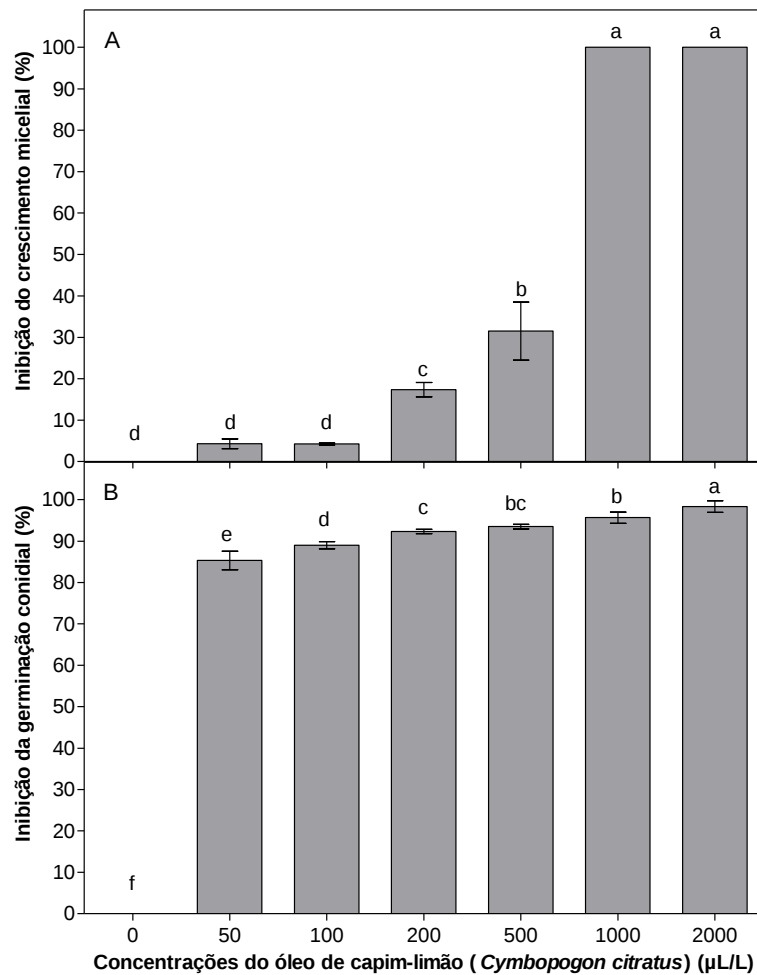


Figura 17. Efeito inibitório do óleo de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) no crescimento micelial (A) de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de abacates ‘Hass’, após 7 dias a 27 ± 1 °C, e na germinação conidial (B) de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de abacates ‘Hass’, incubado por 10 horas a 27 ± 1 °C. Médias $\pm$ erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) ($n=6$).

4.7. EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EM ABACATES ‘HASS’ INOCULADOS COM *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES*

A manifestação da doença ocorreu aos 9 dias de armazenamento dos abacates a 12 °C, sendo que os sintomas só se manifestaram nos frutos dos controles com água e com cera, e nos frutos do tratamento a $200 \mu\text{L L}^{-1}$ de óleo de tomilho associado a cera (Figura 18A).

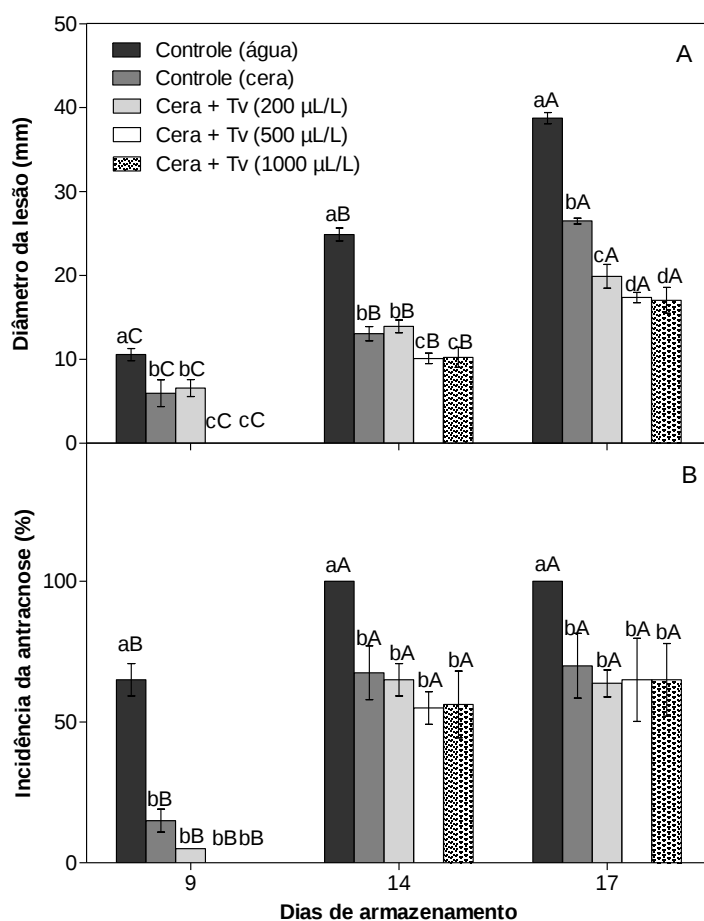


Figura 18. Efeito do óleo de tomilho (*Thymus vulgaris* - Tv) no diâmetro da lesão da antracnose (A) e na incidência da antracnose (B) em abacates 'Hass' inoculados armazenados por 7 dias a 22 ± 2 °C e $65 \pm 5\%$ UR. Médias $\pm$ erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) ($n=4$).

Aos 14 dias de armazenamento dos frutos em refrigeração, o diâmetro da lesão da antracnose era menor nos frutos dos tratamentos a 500 e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo de tomilho em cera, indicando a superioridade desses tratamentos (Figura 18A). Ao final do período de armazenamento (17 dias), o diâmetro da lesão foi maior em todos os tratamentos, como consequência do desenvolvimento do patógeno em maiores temperaturas, por 3 dias a 22 °C. No entanto, houve destaque para os tratamentos com

500 e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo de tomilho, os quais proporcionaram menor severidade da doença nos frutos tratados nestas doses.

Em relação à incidência da doença para o experimento com o óleo de tomilho, os frutos do controle, imersos em água, apresentaram maior incidência da antracnose, e não houve diferença entre os tratamentos analisados durante todo o período de armazenamento dos frutos (Figura 18B).

Para o experimento com o óleo de alecrim-pimenta ocorreu a manifestação da doença nos frutos aos 9 dias de armazenamento em refrigeração, com destaque para as maiores doses do óleo, 500 e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$, na redução do diâmetro da lesão da antracnose tanto aos 9 como aos 14 dias de avaliação (Figura 19A). Após os frutos serem transferidos para a condição ambiente, 22 °C, todas as concentrações testadas deste óleo reduziram o diâmetro da lesão da antracnose nos frutos inoculados, quando comparados aos controles com água e cera.

Para o experimento com o óleo de alecrim-pimenta quanto à incidência da antracnose, notou-se melhor resultado para o tratamento com 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo em cera, que se destacou dos demais, por proporcionar menor incidência da severidade da antracnose nos frutos armazenados a 14 e 17 dias (Figura 19B).

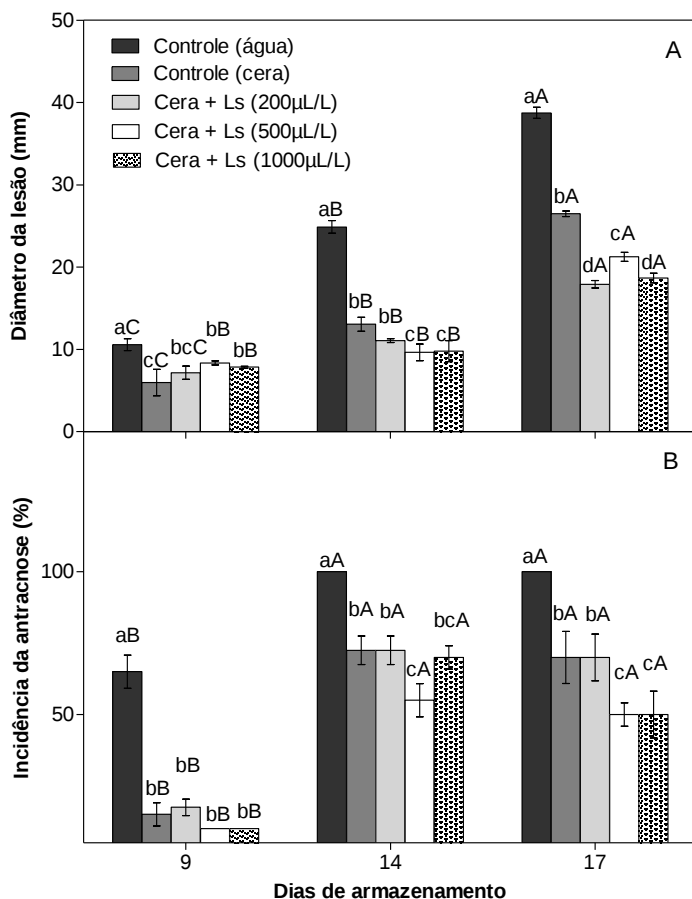


Figura 19. Efeito do óleo de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* - Ls) no diâmetro da lesão da antracnose (A) e na incidência da antracnose (B) em abacates 'Hass' inoculados armazenados por 7 dias a 22 ± 2 °C e $65 \pm 5\%$ UR. Médias $\pm$ erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) ($n=4$).

Para a avaliação do diâmetro da lesão da antracnose nos abacates tratados com o óleo de capim-limão, observou-se manifestação da doença somente aos 14 dias de armazenamento dos frutos em refrigeração, não ocorrendo diferença entre os tratamentos (Figura 20A).

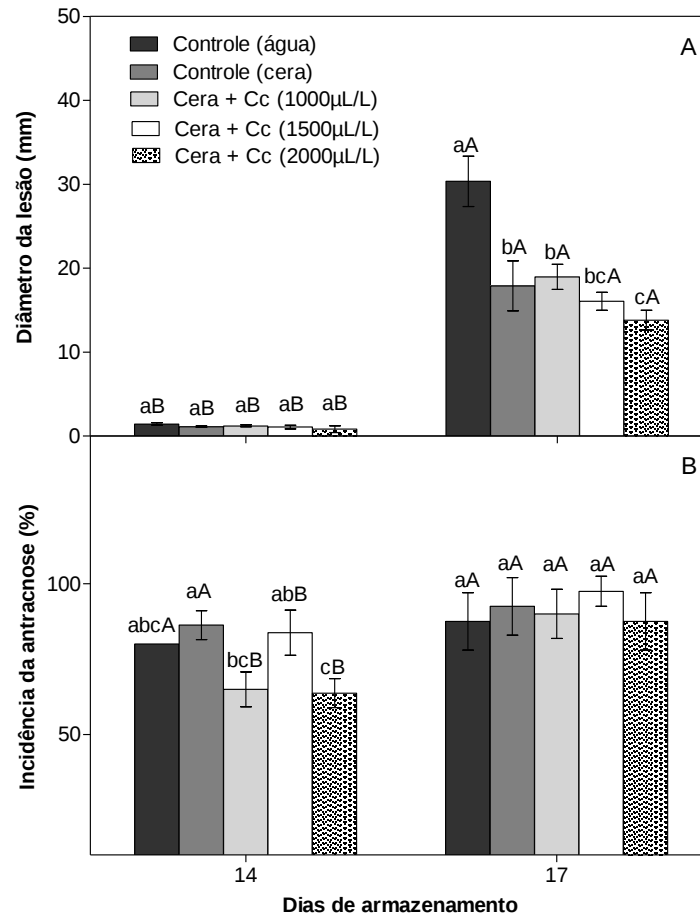


Figura 20. Efeito do óleo de capim-limão (*Cymbopogon citratus* - Cc) no diâmetro da lesão da antracnose (A) e na incidência da antracnose (B) em abacates 'Hass' inoculados armazenados por 7 dias a 22 ± 2 °C e $65 \pm 5\%$ UR. Médias $\pm$ erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) ($n=4$).

O aparecimento da doença nos frutos somente aos 14 dias de avaliação pode ser devido à maturação dos frutos, os quais estavam em um estágio mais atrasado de maturação, em comparação aos frutos dos demais experimentos, o que pode ser verificado pelos dados de taxa respiratória e produção de etileno desses frutos. Ao final do período de armazenamento o diâmetro da lesão da antracnose foi maior em todos os tratamentos, porém, houve destaque para a maior dose do óleo, de $2000 \mu\text{L L}^{-1}$, em cera, no qual reduziu o diâmetro da lesão nos frutos tratados.

Quanto ao óleo de capim-limão, os frutos dos tratamentos com o óleo nas concentrações de 1000 e 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ associados à cera, apresentaram menor incidência da antracnose aos 14 dias, comparados aos frutos dos controles, em água e cera, no entanto, aos 17 dias de armazenamento dos frutos não houve diferença entre os tratamentos (Figura 20B).

O efeito do uso de óleos essenciais foi confirmado em abacates inoculados com *C. gloeosporioides* e/ou *L. theobromae*, nos quais o óleo de *L. scaberrima*, associado ao recobrimento com cera, reduziu o desenvolvimento da doença, quando comparados aos frutos dos controles tratados somente com cera ou água (REGNIER et al., 2010).

O interesse no uso de óleos essenciais como alternativa aos fungicidas tem aumentado nos últimos anos e, de acordo com a literatura, a aplicação de cera enriquecida com estes compostos antifúngicos tem contribuído para a manutenção da qualidade de frutos (KOUASSIA; BAJJI; JIJAKLI, 2012). A principal vantagem da aplicação de óleos essenciais incorporados a revestimentos é o contato do produto com a superfície do fruto por um período de tempo maior, retardando ou inibindo o desenvolvimento do patógeno (SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014). Segundo Kouassia, Bajji e Jijakli (2012) o controle da doença por meio do uso de óleos essenciais associados a cera, depende não apenas do volume que permanece na casca do fruto, mas também da retenção dos componentes dos óleos essenciais pelo fruto.

A atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) registrada na polpa dos abacates do experimento com o óleo de tomilho, aumentou aos 14 dias de armazenamento dos frutos a 12 °C, sendo que os maiores valores foram encontrados nos frutos do controle imersos somente em água, tanto aos 14 como aos 17 dias de armazenamento (Figura 21A).

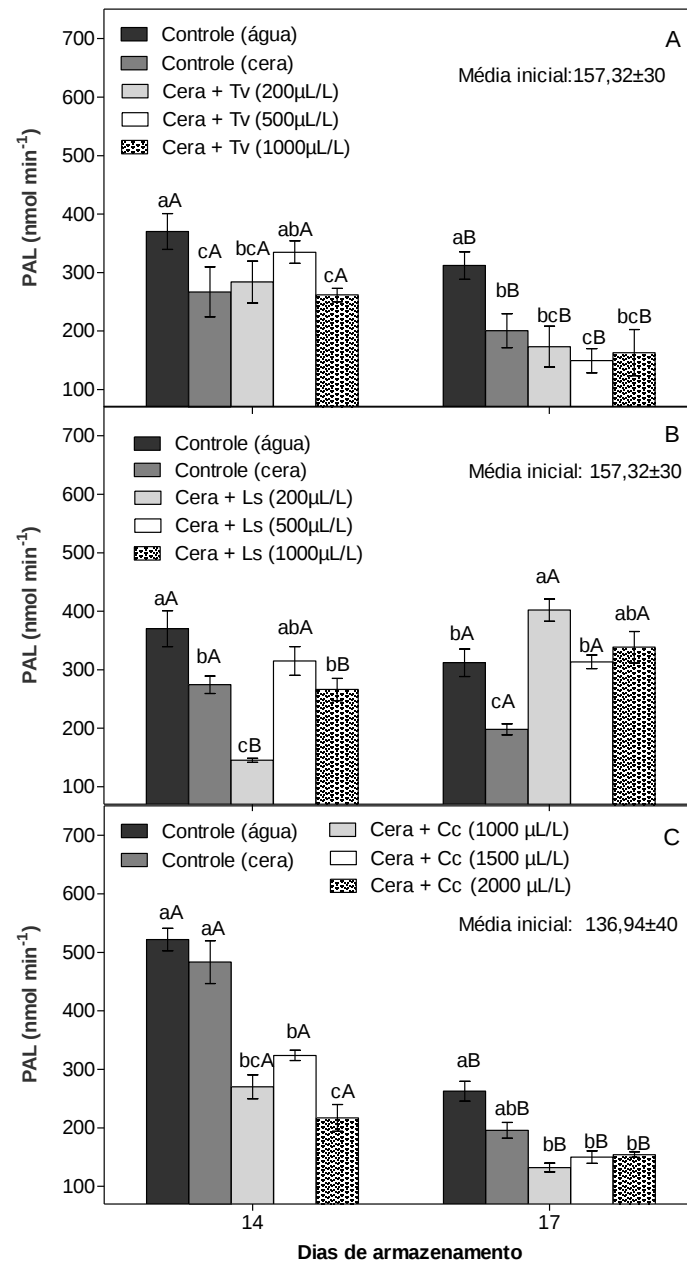


Figura 21. Efeito dos óleos de tomilho (*Thymus vulgaris* - Tv) (A), de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* - Ls) (B) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus* - Cc) (C) na atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL) em abacates 'Hass' inoculados armazenados por 7 dias a 22±2 °C e 65±5% UR. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) (n=4).

Esses resultados indicam que a infecção pelo patógeno pode ter provocado um aumento na atividade de resposta de defesa relacionado à enzima, principalmente naqueles frutos que não foram revestidos com cera e não foram tratados com o óleo essencial, uma vez que, o aumento na atividade da enzima PAL é um sinal de que o tecido vegetal está sob condição de estresse como o ataque de patógenos (RIVERO et al., 2001; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Quanto à atividade da PAL nos frutos do experimento com o óleo de alecrim-pimenta, aos 14 dias de avaliação a atividade da enzima foi maior nos frutos do controle, imersos somente em água. No entanto, observou-se aumento da atividade da enzima PAL nos frutos tratados com o óleo a $200 \mu\text{L L}^{-1}$ associado à cera, ao final do armazenamento dos abacates (Figura 21B).

Para o experimento com o óleo de capim-limão, a atividade da PAL na polpa dos abacates aumentou significativamente nos frutos dos tratamentos imersos somente em água ou em cera, comparada aos tratamentos com o óleo aos 14 dias, e nos frutos imersos em água aos 17 dias de avaliação, indicando uma relação da infecção pelo patógeno nesses frutos com o aumento da atividade desta enzima (Figura 21C). Uma vez que a indução da atividade da PAL tem sido relatada em resposta a ferimentos, como infecção por *C. gloeosporioides* em abacates descrito por Beno-Moualem e Prusky (2000).

Para a atividade da enzima peroxidase (POD) na polpa dos frutos, foi observado aumento significativo dos valores nos tratamentos controle, em água ou em cera, ao final do armazenamento, diferindo daqueles com óleo de tomilho, indicando redução da atividade dessa enzima com a aplicação do óleo essencial (Figura 22 A). O mesmo comportamento foi observado no experimento com o óleo de alecrim-pimenta, nos quais os frutos dos tratamentos controle, frutos imersos em água ou em cera, obtiveram maior valor para a atividade da enzima POD aos 17 dias de armazenamento (Figura 22 B).

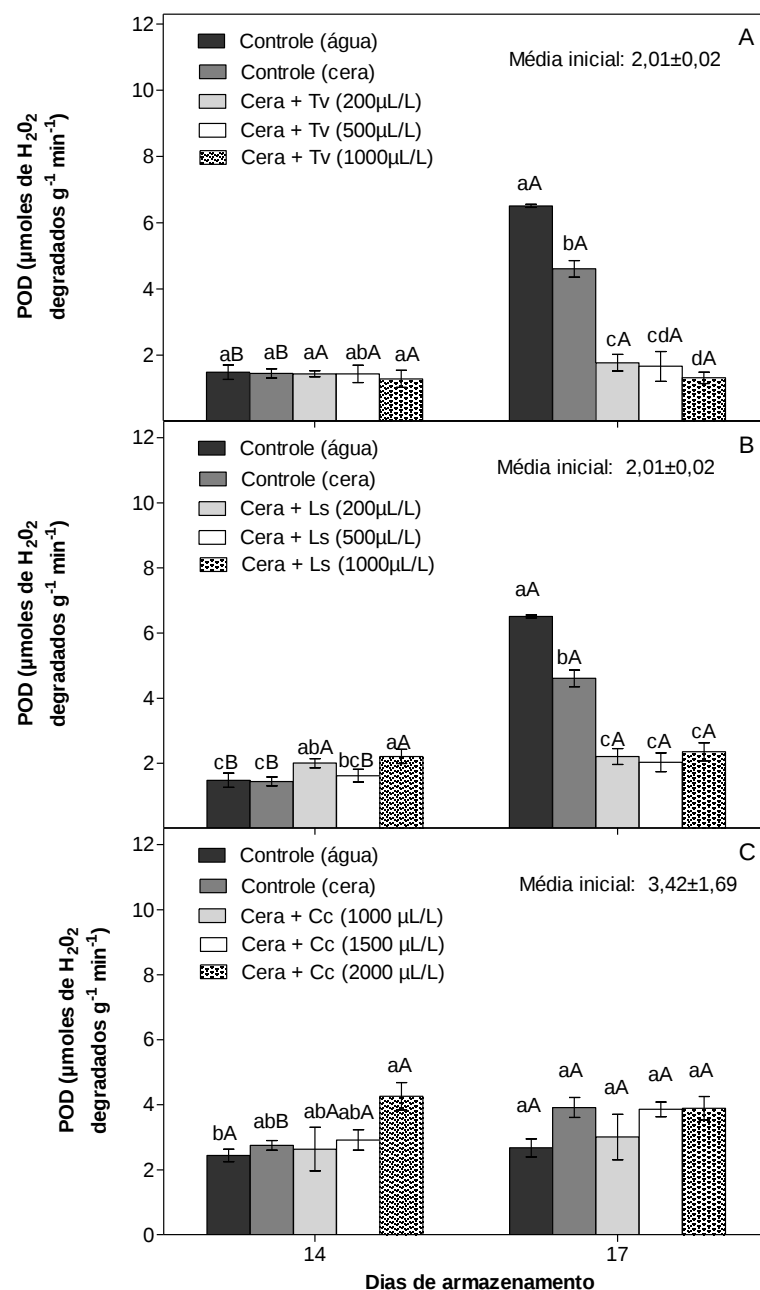


Figura 22. Efeito dos óleos de tomilho (*Thymus vulgaris* - Tv) (A), de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* - Ls) (B) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus* - Cc) (C) na atividade da peroxidase (POD) em abacates 'Hass' inoculados armazenados por 7 dias a 22±2 °C e 65±5% UR. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) (n=4).

Alguns estudos sugerem que as aplicações de produtos naturais como sais e óleos essenciais induzem a atividade de enzimas relacionadas à defesa em vegetais. Youssef et al. (2014) observaram que a atividade da POD e da PAL foram maiores em tecidos infectados de laranja 'Valência late' com *Penicillium digitatum*, agente causal do mofo verde, e tratados com carbonato e bicarbonato de sódio, em relação aos demais tratamentos. Outra pesquisa mostrou que a vaporização de óleo essencial de tomilho induziu a atividade das enzimas POD, PAL, 1,3- glucanase e quitinase em abacates 'Fuerte' e 'Hass' inoculados com *C. gloeosporioides*, patógeno responsável pela antracnose nos frutos (SELLAMUTHU; SIVAKUMAR; SOUNDY, 2013). Neste trabalho só foi observado incremento na atividade da enzima POD com a aplicação do óleo essencial de alecrim-pimenta aos 14 dias de avaliação dos frutos (Figura 22 B).

Para a avaliação da POD no experimento com o óleo de capim-limão, ocorreu aumento da atividade desta enzima somente para os frutos tratados com a maior concentração do óleo associado à cera aos 14 dias de armazenamento dos abacates (Figura 22 C).

A atividade da polifenoloxidase (PPO) foi maior para os abacates do controle com água, diferindo significativamente dos tratamentos com cera, e com cera e óleo de tomilho a 500 e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$, aos 14 dias, e dos tratamentos com cera e óleo a 200 e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ aos 17 dias (Figura 23 A). Esses resultados podem estar relacionados ao maior estresse sofrido pelos frutos, no tratamento controle com água, em decorrência do ataque do patógeno (Figura 18 A). A polifenoloxidase geralmente é elevada em tecidos injuriados, uma vez que as reações de defesa induzidas em vegetais estão relacionadas ao metabolismo antioxidante do vegetal, com o aumento da atividade de enzimas antioxidantes como a PPO (AGRIOS, 2005; MAYER, 2006).

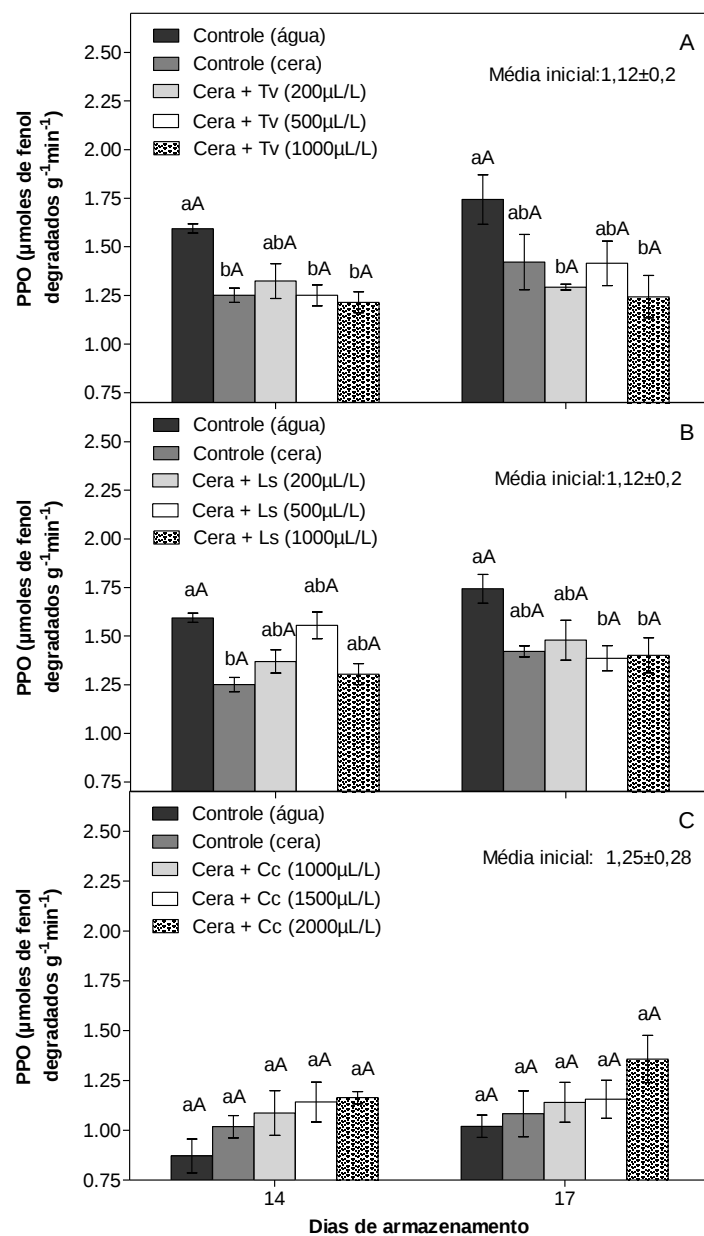


Figura 23. Efeito dos óleos de tomilho (*Thymus vulgaris* - Tv) (A), de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* - Ls) (B) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus* - Cc) (C) na atividade da polifenoloxidase (PPO) em abacates 'Hass' inoculados armazenados por 7 dias a 22±2 °C e 65±5% UR. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) (n=4).

No experimento com o óleo de alecrim-pimenta a atividade da enzima PPO também foi maior para os frutos do controle com água, nos quais os valores diferiram significativamente somente do controle com cera, aos 14 dias, e dos tratamentos com cera e óleo a 500 e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ aos 17 dias (Figura 23 B). Enquanto que para o experimento com o óleo de capim-limão, não ocorreu diferença significativa para a PPO entre os tratamentos analisados e nem em relação aos dias de avaliação (Figura 23 C).

Para a avaliação de polifenóis extraíveis totais da polpa dos abacates, ocorreu aumento desta variável nos frutos do controle imersos somente em água, ao final do período de avaliação, diferindo significativamente dos frutos do controle com cera, e daqueles tratados com óleo de tomilho a 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ em cera (Figura 24 A).

No experimento com o óleo de alecrim-pimenta os valores para polifenóis extraíveis totais também foram maiores para os frutos imersos em água, aos 17 dias de armazenamento, diferindo dos demais tratamentos (Figura 24 B).

Nos tratamentos com o óleo de capim-limão, houve diminuição nos valores de polifenóis extraíveis totais naqueles imersos somente em cera, aos 17 dias de armazenamento (Figura 24 C). Ao final do período de armazenamento em refrigeração, aos 14 dias, não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos para esta variável avaliado, e o mesmo foi observado para os demais óleos testados.

O aumento da produção de polifenóis pelos frutos está relacionado à formação de compostos fenólicos que podem ser sintetizados pelos vegetais em resposta a algum estresse, como o ataque de patógenos e insetos, podendo ser indicativo de maior condição de estresse nos frutos desse tratamento, controle em água, indicado pelo maior desenvolvimento e incidência da doença nesses frutos (Figura 24) (NACZK; SHAHIDI, 2004).

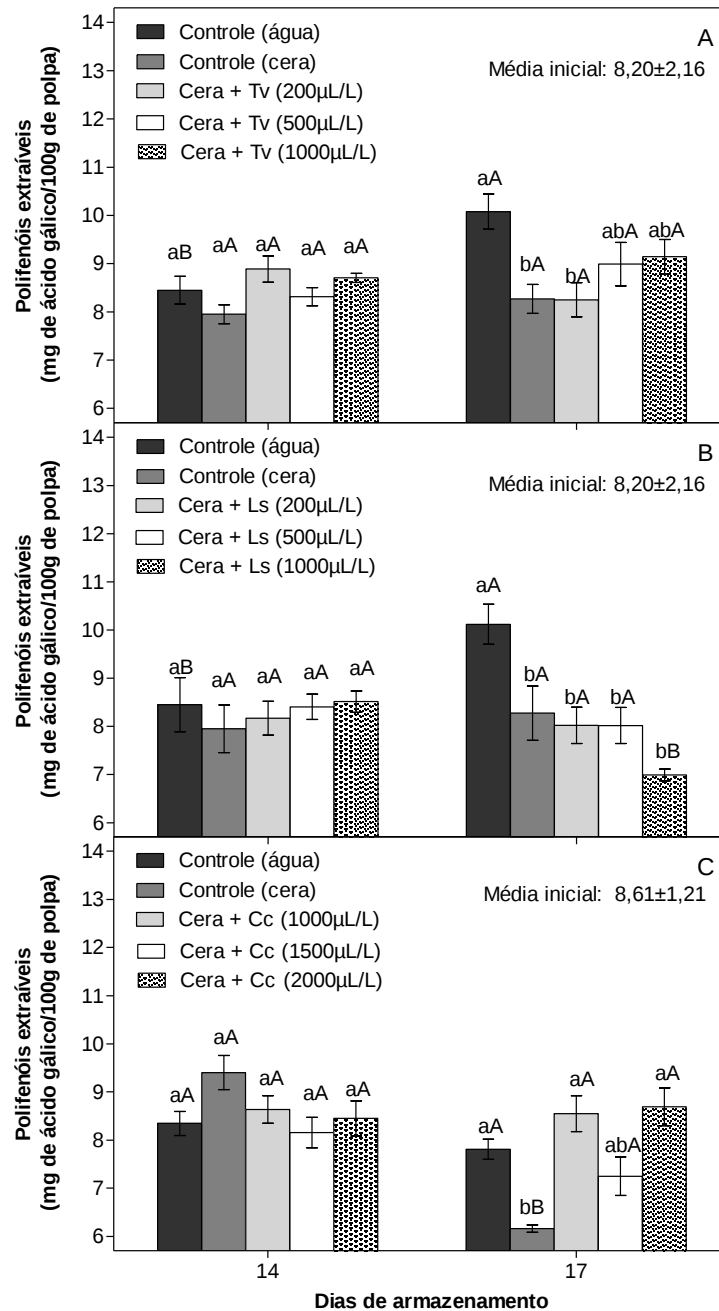


Figura 24. Efeito dos óleos de tomilho (*Thymus vulgaris* - Tv) (A), de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* - Ls) (B) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus* - Cc) (C) nos polifenóis extraíveis em abacates 'Hass' inoculados armazenados por 7 dias a 22±2 °C e 65±5% UR. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) (n=4).

A taxa respiratória dos frutos foi reduzida até o 9º dia de armazenamento, aumentando até o final do período (Figura 25 A). Essa redução se deve porque inicialmente os frutos se encontravam em temperatura elevada (22 °C) e esta foi diminuindo em consequência do armazenamento a 12 °C, reduzindo assim a taxa respiratória dos frutos. Após o 9º dia houve incremento da atividade respiratória em consequência do amadurecimento dos abacates. As doses de 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo de tomilho em cera reduziram a respiração dos frutos aos 9 dias, e ao final do armazenamento.

Para a taxa respiratória dos frutos no experimento com o óleo alecrim-pimenta, observou-se uma tendência de diminuição até o 9º dia de armazenamento, como consequência do armazenamento refrigerado a 12 °C, seguido de aumento até o final do período como resposta dos frutos ao amadurecimento (Figura 25 B). A partir dos 14 dias de armazenamento todos os tratamentos reduziram a respiração dos abacates em comparação ao controle com água, sendo que ao final do armazenamento, os tratamentos com o óleo essencial obtiveram frutos com menor taxa respiratória.

No experimento com o óleo de capim-limão, aos 9 dias de avaliação não foi possível avaliar a taxa respiratória dos frutos, uma vez que era nula ou muito baixa não apresentando diferença significativa entre os tratamentos (Figura 25 C). Tal resposta pode ter ocorrido como consequência do estágio de maturação dos frutos, os quais estavam mais imaturos. A taxa respiratória dos frutos aumentou aos 14 e 17 dias de armazenamento, em decorrência do amadurecimento dos frutos, no entanto, a respiração dos frutos tratados com o óleo de capim limão foi menor em comparação aos frutos imersos somente em água, aos 14 dias de avaliação.

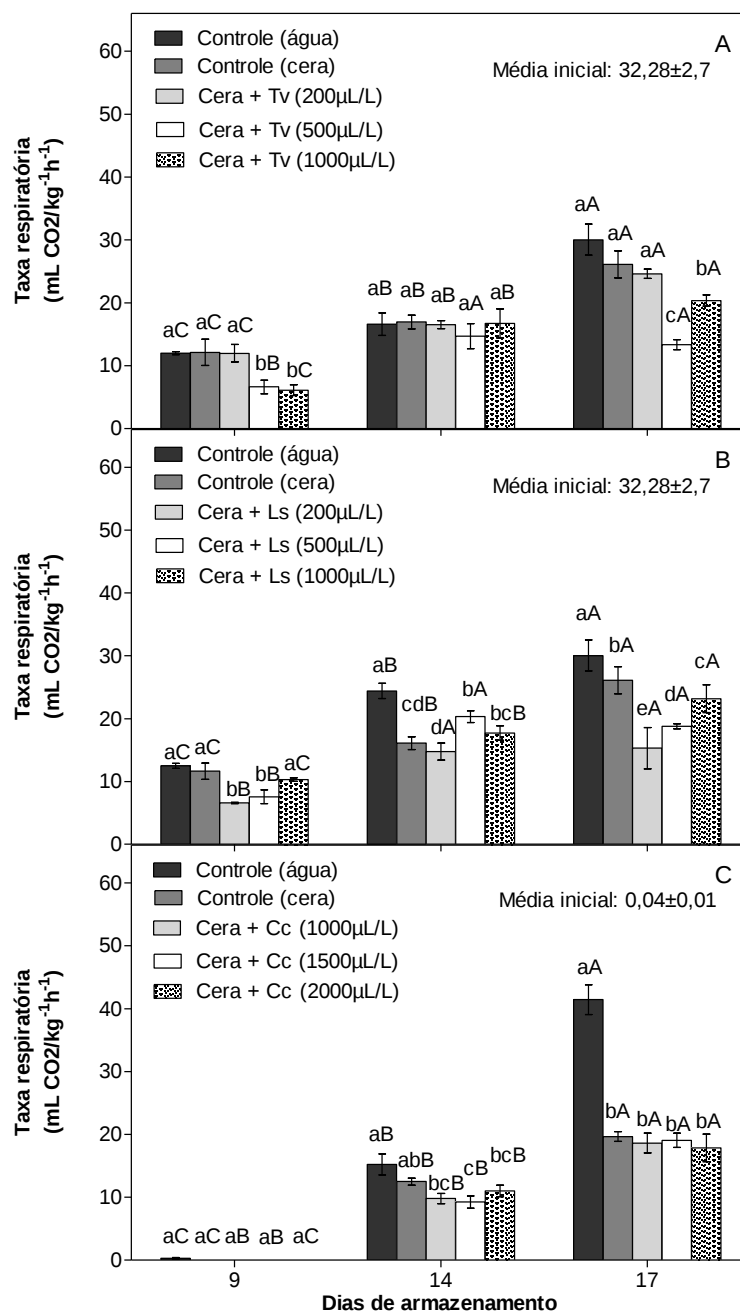


Figura 25. Efeito dos óleos de tomilho (*Thymus vulgaris* - Tv) (A), de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* - Ls) (B) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus* - Cc) (C) na taxa respiratória de abacates ‘Hass’ inoculados armazenados por 7 dias a 22±2 °C e 65±5% UR. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) (n=4).

Revestimentos contendo óleos essenciais reduzem a difusão do O_2 através do recobrimento formado nos frutos, aumentando a concentração de CO_2 ao redor do vegetal, devido principalmente a maior resistência de difusão aos gases causada pela cobertura adicionada de óleos, como resultado da natureza hidrofóbica dos óleos essenciais, afetando dessa maneira a taxa respiratória dos frutos (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011a).

Ao longo do período de armazenamento, nota-se que a produção de etileno pelos frutos foi reduzida, a partir dos 9 dias de armazenamento, proporcionalmente à concentração do óleo de tomilho aplicada, com destaque para as doses de $500 \mu L L^{-1}$ e $1000 \mu L L^{-1}$ que diferiram significativamente dos controles (Figura 26 A). A redução da produção de etileno pelos frutos tratados com as maiores concentrações do óleo aplicado a cera, pode estar relacionada à natureza hidrofóbica dos OE, na qual afeta a difusão do O_2 através da cobertura formada, afetando a produção de etileno pelos frutos, uma vez que a enzima ACC oxidase precursora imediata do etileno necessita do O_2 para a formação desse gás (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A menor produção de etileno pelos frutos também pode ser devido à associação da cera com o óleo de tomilho nas maiores concentrações que ocasionou também maior inibição do fungo *C. gloeosporioides* (Figura 18 A). Com o estabelecimento de patógenos em frutos, ocorre elicitação de respostas de defesa pelo vegetal, induzindo a produção de substâncias como o etileno, que acelera o processo de amadurecimento normal de frutos climatéricos, como o abacate (MARCOS; GONZÁLEZ-CANDELAS; ZACARÍAS, 2005).

A produção de etileno pelos frutos do experimento com o óleo de alecrim-pimenta foi maior naqueles do controle, imersos somente em água, até os 14 dias de armazenamento (Figura 26 B).

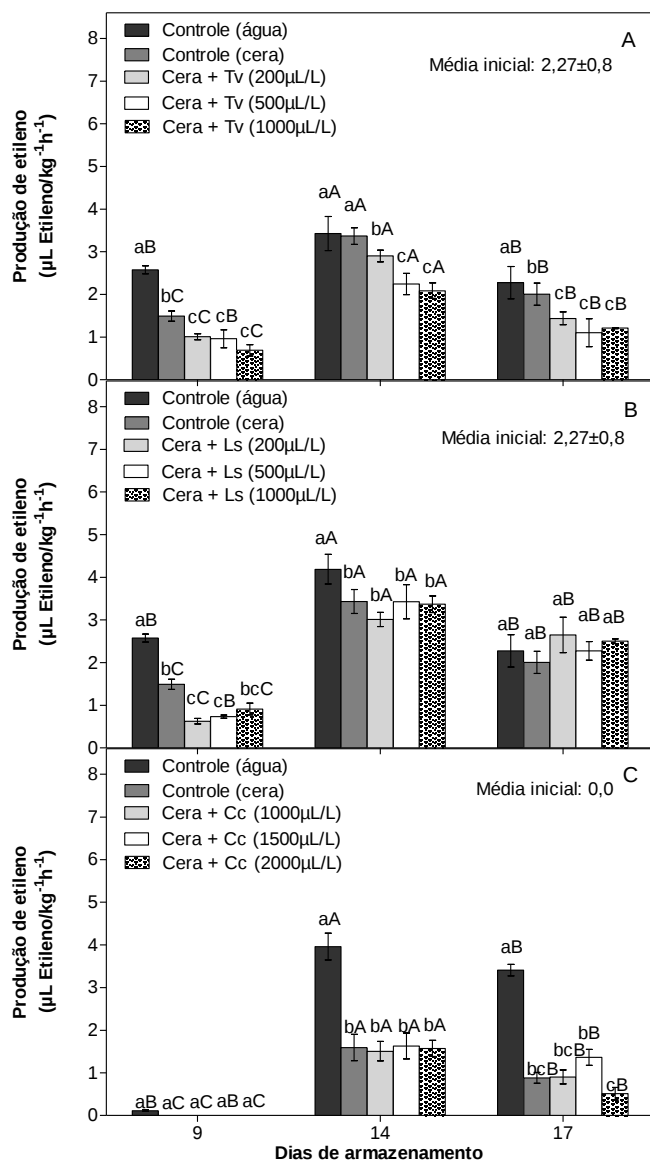


Figura 26. Efeito dos óleos de tomilho (*Thymus vulgaris* - Tv) (A), de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* - Ls) (B) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus* - Cc) (C) na produção de etileno em abacates ‘Hass’ inoculados armazenados por 7 dias a 22 ± 2 °C e $65 \pm 5\%$ UR. Médias $\pm$ erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) ($n=4$).

Este resultado mostra o efeito da cera utilizada em vegetais como revestimento, com a finalidade de regular as trocas gasosas entre o fruto e o ambiente, diminuindo

assim a atividade respiratória, a biossíntese e ação do etileno, tendo como resultado o atraso no amadurecimento de vegetais (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Ao final do armazenamento não houve diferença entre os tratamentos em relação ao etileno produzido pelos frutos. A aplicação de OE associados a revestimento naturais tem apresentado resultados promissores não somente para o controle de microrganismos patogênicos, mas também na manutenção da qualidade de frutos (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011a).

A produção de etileno pelos abacates tratados com o óleo de capim-limão, não foi significativa até os 9 dias de avaliação, assim como observado para a taxa respiratória dos frutos, ocorrendo aumento a partir dos 14 dias, principalmente nos frutos do controle em água os quais diferiram significativamente dos demais tratamentos (Figura 26 C).

A perda de massa fresca pelos frutos foi menor naqueles com revestimento de cera e cera associada aos óleos de tomilho, alecrim-pimenta e capim limão (Figura 27). Estes resultados estão coerentes com os observados para a taxa respiratória (Figura 25) e produção de etileno (Figura 26), os quais mostram o efeito do revestimento nos frutos formado pela cera, na redução da difusão de gases entre os frutos e a atmosfera, resultando na redução da perda de massa, na taxa respiratória e na produção de etileno pelos frutos.

No experimento com o óleo de tomilho, a aplicação de cera nos abacates reduziu pela metade a perda de massa dos frutos ao final do período de armazenamento, os quais obtiveram perda média de 2,5% de massa fresca, enquanto que os frutos não tratados apresentaram perda de 5% (Figura 27 A).

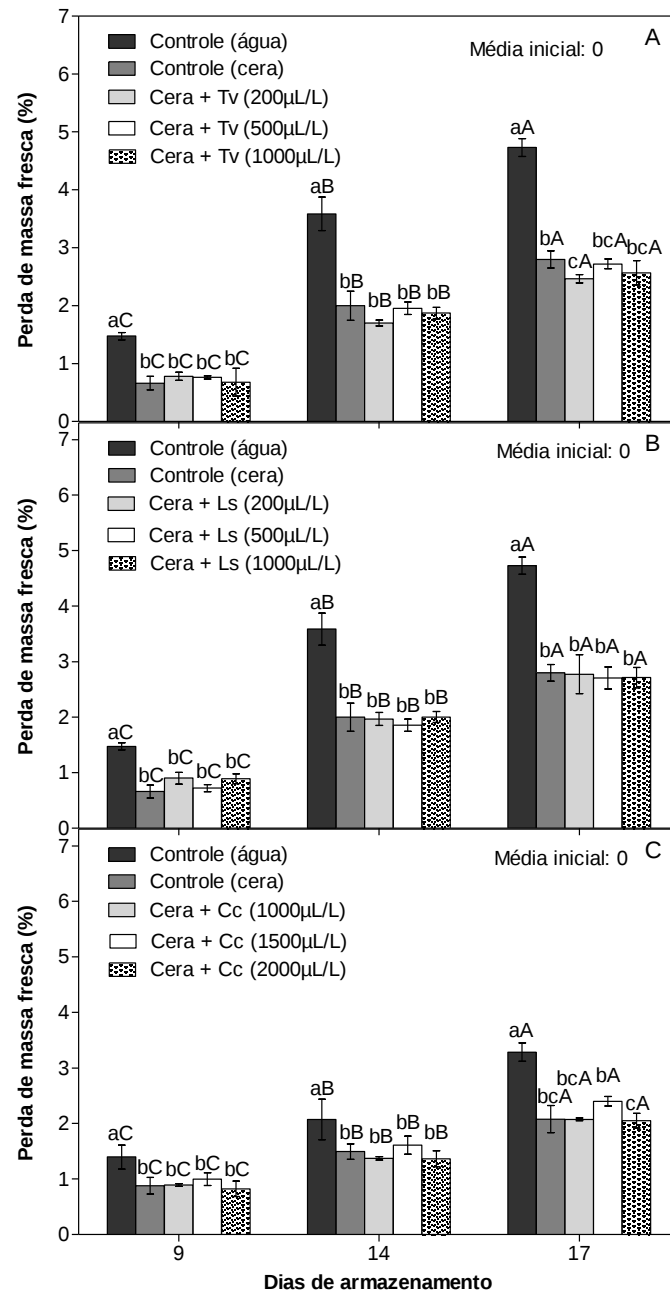


Figura 27. Efeito dos óleos de tomilho (*Thymus vulgaris* - Tv) (A), de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* - Ls) (B) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus* - Cc) (C) na perda de massa fresca de abacates 'Hass' inoculados armazenados por 7 dias a 22 ± 2 °C e $65 \pm 5\%$ UR. Médias $\pm$ erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) ($n=4$).

Esse resultado é atribuído à modificação da atmosfera ao redor do fruto proporcionada pelo recobrimento formado pela cera, que reduz a intensidade da respiração e da transpiração do produto, reduzindo a perda de água pelo vegetal e consequentemente sua perda de peso (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011b; SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014). O uso de óleo essencial de *L. scaberrima* associado a revestimentos comerciais, também promoveram melhor retenção de água em abacates (REGNIER et al., 2010) e citros (DU PLOOY; REGNIER; COMBRINCK, 2009).

Não foi observada melhoria na redução da perda de massa pelos frutos com a adição dos óleos essenciais avaliados, apesar da natureza lipofílica destes produtos proporcionarem uma maior resistência à perda de vapor de água pelos frutos (SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014).

Em relação à firmeza da polpa dos frutos, ocorreu redução nos valores durante o período de armazenamento, indicando o amadurecimento dos abacates (Figura 28). Os maiores valores de firmeza da polpa foram observados nos frutos tratados com cera, e com cera e óleos, em relação aos frutos não tratados com o recobrimento. Este resultado pode ser relacionado com o efeito da cera na perda de massa fresca (Figura 27), que reduziu a perda de água pelos frutos, contribuindo para a manutenção da firmeza dos mesmos. Aos 14 e 17 dias de armazenamento os frutos imersos somente em água não apresentaram nenhuma resistência de polpa. Esses resultados indicam o efeito da cobertura no prolongamento da vida útil dos frutos, uma vez que o amaciamento dos tecidos de frutas é consequência do processo de amadurecimento e senescência dos vegetais (TOIVONEN; BRUMMELL, 2008).

O uso de duas ou mais tecnologias combinadas, e aplicadas na pós-colheita de frutos para controlar doenças, como utilizado neste trabalho, tem mostrado resultados efetivos não apenas no controle de patógenos importantes, mas também na manutenção da qualidade dos vegetais, o que pode ser verificado em abacates 'Fuerte' e 'Hass' que foram tratados com óleo essencial de tomilho, aplicado por vaporização, e armazenados em atmosfera modificada, pelo uso de embalagens, os quais mostraram resultados no controle da antracnose apresentando redução da incidência e severidade

da doença, e na manutenção da qualidade dos frutos pela redução da perda de peso e perda de firmeza, dos frutos armazenados a 10 °C por 18 dias (SELLAMUTHU; SIVAKUMAR; SOUNDY, 2013).

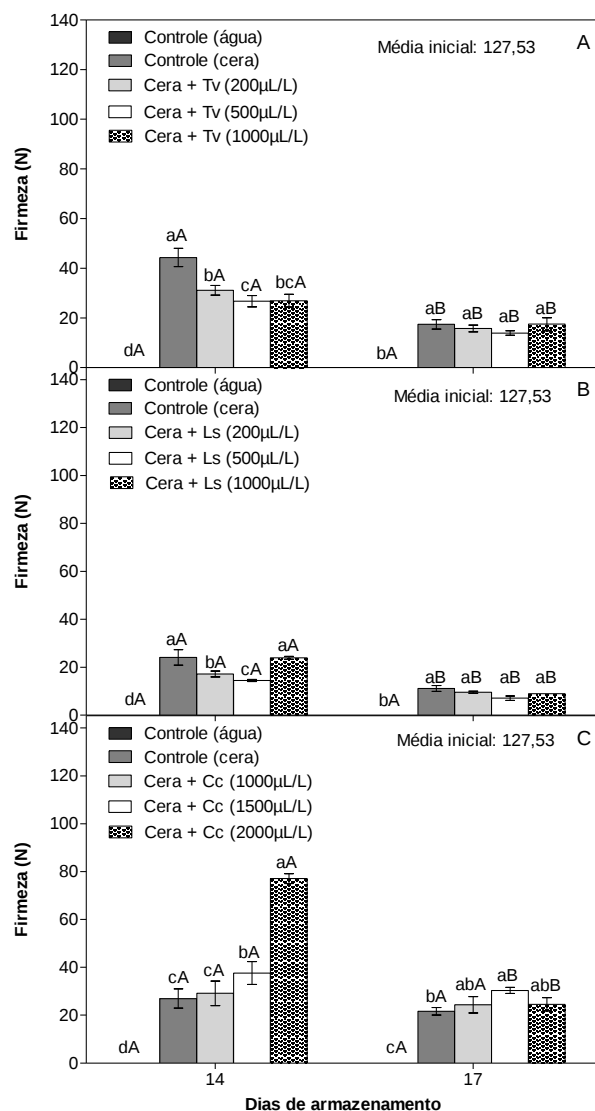


Figura 28. Efeito dos óleos de tomilho (*Thymus vulgaris* - Tv) (A), de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* - Ls) (B) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus* - Cc) (C) na firmeza de abacates 'Hass' inoculados armazenados por 7 dias a 22±2 °C e 65±5% UR. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) (n=4).

Para a luminosidade da casca dos frutos do experimento com o óleo de tomilho, observou-se que os valores reduziram com o armazenamento dos abacates, indicando o escurecimento da casca (Tabela 11).

Tabela 11. Efeito do óleo de tomilho (*Thymus vulgaris* - Tv) na coloração da casca de abacates 'Hass' inoculados armazenados por 7 dias a 22 ± 2 °C e $65\pm 5\%$ UR.

Tratamentos	Dias de armazenamento	
	14	17
----- Luminosidade casca -----		
Controle (água)	27,51 cA	25,61 cB
Controle (cera)	30,76 bA	29,52 abB
Cera + Tv (200 µL/L)	30,91 bA	30,74 aA
Cera + Tv (500 µL/L)	32,79 aA	28,50 bB
Cera + Tv (1000 µL/L)	34,04 aA	29,52 abB
----- Ângulo Hue casca -----		
Controle (água)	36,52 bA	35,90 cA
Controle (cera)	105,57 aA	93,20 aB
Cera + Tv (200 µL/L)	105,81 aA	80,91 bB
Cera + Tv (500 µL/L)	106,35 aA	82,02 bB
Cera + Tv (1000 µL/L)	103,64 aA	98,01 aA
----- Cromaticidade casca -----		
Controle (água)	8,71 bA	4,65 aB
Controle (cera)	10,19 abA	5,32 aB
Cera + Tv (200 µL/L)	8,81 bA	5,84 aB
Cera + Tv (500 µL/L)	11,77 aA	6,26 aB
Cera + Tv (1000 µL/L)	11,98 aA	7,21 aB

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

No entanto, os frutos dos tratamentos com 500 e 1000 µL L⁻¹ do óleo em cera aos 14 dias, apresentaram maiores valores de luminosidade, sugerindo a superioridade destes tratamentos no retardo do escurecimento da casca dos frutos. Aos 17 dias de armazenamento, notou-se que os frutos do controle, em água, obtiveram os menores valores comparados aos demais tratamentos.

Para o ângulo Hue da casca dos abacates, no experimento com o óleo de tomilho, os valores foram menores para os frutos do controle, imersos em água, aos 14 e 17 dias de armazenamento, devido ao avançado estado de senescência que estes frutos se encontravam, apresentando coloração escura e mais arroxeada (Tabela 11).

Aos 14 dias de armazenamento refrigerado os tratamentos com 500 e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo de tomilho em cera, proporcionaram aos abacates maiores valores de cromaticidade da casca, sugerindo atraso nas transformações dos pigmentos (Tabela 11). Esses resultados podem estar relacionados ao efeito destes tratamentos na redução da doença nos frutos, observados nos resultados do diâmetro e da incidência da antracnose (Figuras 15A e 15B), contribuindo assim para a manutenção da qualidade dos frutos. Aos 17 dias, no entanto, não houve diferença para a cromaticidade da casca entre os tratamentos.

Durante o amadurecimento do abacate 'Hass' ocorrem mudanças da coloração da casca dos frutos de verde para púrpura e de púrpura para preto, indicado pela redução na luminosidade, no ângulo Hue e na cromaticidade (COSE et al., 2004). A perda da coloração verde da casca dos frutos é devido à quebra da estrutura da clorofila, como consequência da maturação dos vegetais, ocasionada por fatores como mudanças de pH e pela atividade de enzimas, tornando aparentes pigmentos já existentes e/ou novos pigmentos sintetizados, responsáveis pela coloração característica de cada espécie (AWAD, 1993; CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Em relação à luminosidade da polpa dos frutos no experimento com o óleo de tomilho, em geral, foi observada pouca variação entre os tratamentos durante o período de armazenamento (Tabela 12). Ao final do período de avaliação, os valores de luminosidade da polpa dos frutos do controle em água, permaneceram maiores em comparação aos frutos tratados com cera e os com cera associada ao óleo de tomilho. A aplicação de revestimentos a base de cera e quitosana a 1% e 1,5% em mangas 'Tommy Atkins', não afetaram a luminosidade da polpa dos frutos (MIGUEL, 2012).

Tabela 12. Efeito do óleo de tomilho (*Thymus vulgaris* - Tv) na coloração da polpa de abacates 'Hass' inoculados armazenados por 7 dias a 22 ± 2 °C e $65\pm 5\%$ UR.

Tratamentos	Dias de armazenamento	
	14	17
----- Luminosidade polpa -----		
Controle (água)	79,12 abA	77,91 aA
Controle (cera)	77,69 bA	75,01 bB
Cera + Tv (200 µL/L)	79,29 abA	74,46 bB
Cera + Tv (500 µL/L)	80,72 aA	74,78 bB
Cera + Tv (1000 µL/L)	80,15 abA	74,75 bB
----- Ângulo Hue polpa -----		
Controle (água)	104,14 aA	96,99 bB
Controle (cera)	102,16 abA	102,52 a
Cera + Tv (200 µL/L)	99,87 bA	98,27 bA
Cera + Tv (500 µL/L)	99,79 bA	101,79 aA
Cera + Tv (1000 µL/L)	100,36 bB	104,90 aA
----- Cromaticidade polpa -----		
Controle (água)	31,77 cA	29,98 cB
Controle (cera)	33,59 bcA	32,43 bA
Cera + Tv (200 µL/L)	34,75 bA	35,51 aA
Cera + Tv (500 µL/L)	33,89 bA	35,08 aA
Cera + Tv (1000 µL/L)	36,96 aA	32,39 bB

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Em relação ao ângulo Hue da polpa dos frutos, para o experimento testando o óleo de tomilho, a maior redução nos valores (de 104° para 97°) ocorreram nos abacates do tratamento controle, indicando mudança de coloração da polpa de verde clara para amarela, como sinal de amadurecimento dos frutos (Tabelas 12). Mudança de coloração em frutos está associada ao amadurecimento ou senescência, e representa uma importante variável para a determinação da qualidade comestível do vegetal (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Para os valores de cromaticidade da polpa dos abacates, observaram-se menores valores para os frutos do controle imersos em água, aos 14 e 17 dias de avaliação, em relação aos demais tratamentos (Tabela 12).

A luminosidade da casca dos frutos, nos experimentos com o óleo de alecrim-pimenta foi reduzida a partir dos 14 dias de armazenamento dos abacates, sendo que os menores valores foram encontrados nos frutos imersos somente em água, indicando o escurecimento (Tabela 13). Portanto, o uso da cera foi eficiente pois retardou o escurecimento da casca dos abacates, não ocorrendo diferença entre os frutos tratados somente com cera daqueles com cera e o óleo de alecrim-pimenta. A associação de óleo essencial de bergamota com revestimentos naturais a base de hidroxipropilmetilcelulose e quitosana, também não foram eficientes na prevenção do escurecimento em uva ‘Moscatel’ (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011a).

Tabela 13. Efeito do óleo de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* - Ls) na coloração da casca de abacates ‘Hass’ inoculados armazenados por 7 dias a 22 ± 2 °C e $65\pm 5\%$ UR.

Tratamentos	Dias de armazenamento	
	14	17
----- Luminosidade casca -----		
Controle (água)	27,51 bA	25,61 bB
Controle (cera)	30,76 aA	29,52 aA
Cera + Ls (200 µL/L)	29,91 aA	28,53 aB
Cera + Ls (500 µL/L)	30,85 aA	29,33 aB
Cera + Ls (1000 µL/L)	30,74 aA	29,74 aA
----- Ângulo Hue casca -----		
Controle (água)	36,52 cA	35,90 dA
Controle (cera)	105,57 aA	93,20 abB
Cera + Ls (200 µL/L)	94,68 bA	98,31 aA
Cera + Ls (500 µL/L)	106,21 aA	88,70 bcB
Cera + Ls (1000 µL/L)	95,43 bA	84,10 cB
----- Cromaticidade casca -----		
Controle (água)	8,46 aA	4,65 bB
Controle (cera)	9,19 aA	5,82 abB
Cera + Ls (200 µL/L)	7,87 aA	6,31 aB
Cera + Ls (500 µL/L)	8,82 aA	6,04 abB
Cera + Ls (1000 µL/L)	7,95 aA	6,52 aB

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

No experimento com o óleo de alecrim-pimenta, o ângulo Hue da casca dos abacates diminuiu a partir dos 14 dias de armazenamento dos frutos, sendo que os frutos imersos em água apresentaram diminuição mais acentuada para esta variável (Tabela 13). Esses resultados mostram o estado avançado de maturação desses frutos, os quais apresentaram ângulo de 36° indicando uma coloração de casca mais arroxeada, em comparação aos frutos dos demais tratamentos que apresentaram ângulo médio de 91° , sugerindo uma coloração mais próxima do verde.

Os menores valores para a cromaticidade da casca dos frutos foram observados aos 17 dias de avaliação nos frutos do controle imersos em cera, com destaque para os tratamentos com cera associada às concentrações de 200 e $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ do óleo de alecrim-pimenta, os quais diferiram significativamente dos frutos do controle em água, mostrando o efeito da cera em retardar a mudança dos pigmentos presentes na casca dos frutos (Tabela 13).

A luminosidade da polpa dos frutos, para o óleo de alecrim-pimenta, não apresentou diferença estatística entre os tratamentos avaliados, aos 14 dias, no entanto, ao final do período de avaliação, os frutos do tratamento do controle em cera, apresentaram menores valores (Tabela 14).

Para o ângulo Hue da polpa dos abacates, os frutos do tratamento do controle em água apresentaram a maior redução dos valores, de $6,65^\circ$ dos 14 aos 17 dias de armazenamento, indicando maior mudança de coloração da polpa destes frutos, comparado aos frutos dos demais experimentos (Tabela 14).

Para a cromaticidade da polpa dos frutos, observou-se para o tratamento com o óleo de alecrim-pimenta na concentração de $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ associado a cera, maiores valores, o que indica atraso nas transformações dos pigmentos nos frutos deste tratamento (Tabela 14).

Tabela 14. Efeito do óleo de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* - Ls) na coloração da polpa de abacates 'Hass' inoculados armazenados por 7 dias a 22 ± 2 °C e $65\pm 5\%$ UR.

Tratamentos	Dias de armazenamento	
	14	17
----- Luminosidade polpa -----		
Controle (água)	78,12 aA	78,16 abA
Controle (cera)	77,69 aA	75,01 bA
Cera + Ls (200 µL/L)	76,92 aA	75,35 abA
Cera + Ls (500 µL/L)	76,59 aA	76,63 abA
Cera + Ls (1000 µL/L)	74,35 aB	79,62 aA
----- Ângulo Hue polpa -----		
Controle (água)	104,14 aA	97,49 bB
Controle (cera)	102,16 abA	102,52 aA
Cera + Ls (200 µL/L)	101,70 abA	98,84 bB
Cera + Ls (500 µL/L)	103,34 aA	102,69 aA
Cera + Ls (1000 µL/L)	99,34 bA	98,85 bA
----- Cromaticidade polpa -----		
Controle (água)	32,27 cA	30,73 cB
Controle (cera)	33,59 bcA	32,18 bcB
Cera + Ls (200 µL/L)	35,12 abA	33,90 aB
Cera + Ls (500 µL/L)	34,73 abA	32,98 abB
Cera + Ls (1000 µL/L)	35,27 aA	34,07 aB

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Para o experimento com o óleo de capim-limão, houve destaque para a maior concentração do óleo, de $2000 \mu\text{L L}^{-1}$ em cera, na prevenção do escurecimento da casca dos frutos, mantendo maiores os valores da luminosidade da casca dos frutos, indicando atraso no amadurecimento, e/ou na senescência dos abacates (Tabela 15).

Os resultados encontrados para o ângulo Hue neste experimento (com o óleo de capim-limão), foram parecidos aos do experimento com óleo de alecrim-pimenta (Tabela 13), onde os menores valores foram observados nos frutos imersos somente em água (Tabela 15).

Tabela 15. Efeito do óleo de capim-limão (*Cymbopogon citratus* - Cc) na coloração da casca de abacates 'Hass' inoculados armazenados por 7 dias a 22 ± 2 °C e $65\pm 5\%$ UR.

Tratamentos	Dias de armazenamento	
	14	17
----- Luminosidade casca -----		
Controle (água)	25,48 cA	25,78 bA
Controle (cera)	27,69 abA	27,40 abA
Cera + Cc (1000 µL/L)	26,42 bcA	27,72 abA
Cera + Cc (1500 µL/L)	28,24 abA	28,15 aA
Cera + Cc (2000 µL/L)	28,51 aA	28,28 aA
----- Ângulo Hue casca -----		
Controle (água)	63,06 bA	49,97 bB
Controle (cera)	77,52 aA	55,29 bB
Cera + Cc (1000 µL/L)	60,94 bB	69,18 aA
Cera + Cc (1500 µL/L)	85,35 aA	73,92 aB
Cera + Cc (2000 µL/L)	82,02 aA	74,14 aA
----- Cromaticidade casca -----		
Controle (água)	7,36 aA	4,98 aB
Controle (cera)	6,56 abA	4,00 aB
Cera + Cc (1000 µL/L)	5,29 bB	5,29 aB
Cera + Cc (1500 µL/L)	6,48 abA	5,34 aB
Cera + Cc (2000 µL/L)	5,90 bA	5,22 aA

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Em relação aos valores de cromaticidade, ao final do período de avaliação não houve destaque para a aplicação da cera nos frutos (Tabela 15).

Nos frutos do experimento com o óleo de capim-limão, verifica-se o maior escurecimento da polpa dos abacates foi observado aos 17 dias de avaliação, com redução média de 80,71 para 72,45, nos valores de luminosidade (Tabela 16). De acordo com Chitarra e Chitarra (2005) o escurecimento da polpa de frutos ocorre devido à oxidação enzimática de fenóis, resultando em formação de pigmentos escuros responsáveis pela coloração escura dos tecidos vegetais.

Tabela 16. Efeito do óleo de capim-limão (*Cymbopogon citratus* - Cc) na coloração da polpa de abacates 'Hass' inoculados armazenados por 7 dias a 22 ± 2 °C e $65\pm 5\%$ UR.

Tratamentos	Dias de armazenamento	
	14	17
----- Luminosidade polpa -----		
Controle (água)	75,86 aA	74,08 aB
Controle (cera)	74,06 abA	73,68 aA
Cera + Cc (1000 µL/L)	75,64 aA	72,95 abB
Cera + Cc (1500 µL/L)	74,48 abA	71,30 bcB
Cera + Cc (2000 µL/L)	72,23 bA	70,27 cB
----- Ângulo Hue polpa -----		
Controle (água)	101,52 bA	97,48 aB
Controle (cera)	100,50 bA	98,07 aB
Cera + Cc (1000 µL/L)	100,69 bA	98,75 aA
Cera + Cc (1500 µL/L)	102,89 abA	99,21 aB
Cera + Cc (2000 µL/L)	105,87 aA	98,74 aB
----- Cromaticidade polpa -----		
Controle (água)	75,86 aA	74,08 aB
Controle (cera)	74,06 abA	73,68 aA
Cera + Cc (1000 µL/L)	75,64 aA	72,95 abB
Cera + Cc (1500 µL/L)	74,48 abA	71,30 bcB
Cera + Cc (2000 µL/L)	72,23 bA	70,27 cB

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Os frutos tratados com a maior concentração do óleo de capim-limão, de 2000 µL L⁻¹ em cera, apresentaram maiores valores do ângulo Hue da polpa, aos 14 dias de avaliação. As médias diferiram significativamente dos controles e da menor concentração do óleo em cera, no entanto, aos 17 dias não houve variação dos resultados entre os tratamentos (Tabela 16).

Para a cromaticidade da polpa dos frutos, observou-se que houve diminuição nos valores ao final do período de avaliação, para todos os tratamento, exceto para os frutos do controle em cera (Tabela 16).

Os resultados obtidos para as análises relacionadas à cor da casca dos abacates neste trabalho, em geral, evidenciam o efeito da cera no retardo dos processos relacionados ao amadurecimento e senescência dos frutos, por meio da modificação da

composição de gás ao redor dos vegetais, resultando na diminuição da respiração dos frutos (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Para a avaliação de acidez titulável dos abacates, aos 14 dias de armazenamento os valores foram maiores para os frutos do controle imersos em água (Figura 29 A). No entanto, ao final do período, a acidez dos frutos tratados com cera associada ao óleo de tomilho permaneceu maior, apresentando diferença significativa entre os frutos do controle com água e os frutos tratados com cera e óleo de tomilho a 200 e 500 $\mu\text{L L}^{-1}$, indicando uma possível resistência desses frutos à doença devido à maior acidez encontrada. Isso pode ser verificado na Figura 18 A, que mostra menor diâmetro da lesão da antracnose nos frutos tratados com cera associado ao óleo de tomilho, uma vez que, de acordo com Fischer et al. (2009), a relação de resistência/suscetibilidade à antracnose está associado ao teor de acidez titulável em mangas, estando relacionado o aumento de infecção da doença com a diminuição da acidez dos frutos.

Quanto aos óleos essenciais de alecrim-pimenta e de capim-limão, para a variável de acidez titulável dos frutos, foi observado o mesmo comportamento verificado para o experimento com o óleo de tomilho, nos quais os valores de acidez dos frutos foram maiores nos abacates do controle, imersos em água, aos 14 dias de armazenamento, porém, aos 17 dias, a acidez dos frutos tratados com cera associado aos óleos foi significativamente maior (Figura 29 B e C).

De acordo com Chitarra e Chitarra (2005) o teor de ácidos orgânicos na maioria dos vegetais tende a diminuir com o amadurecimento, pela utilização como substrato respiratório e em reações de síntese de novos compostos, no entanto, para este trabalho foi observado diminuição da acidez titulável dos frutos, ao final do período de avaliação, somente para o experimento com o óleo de capim limão (Figura 29 C).

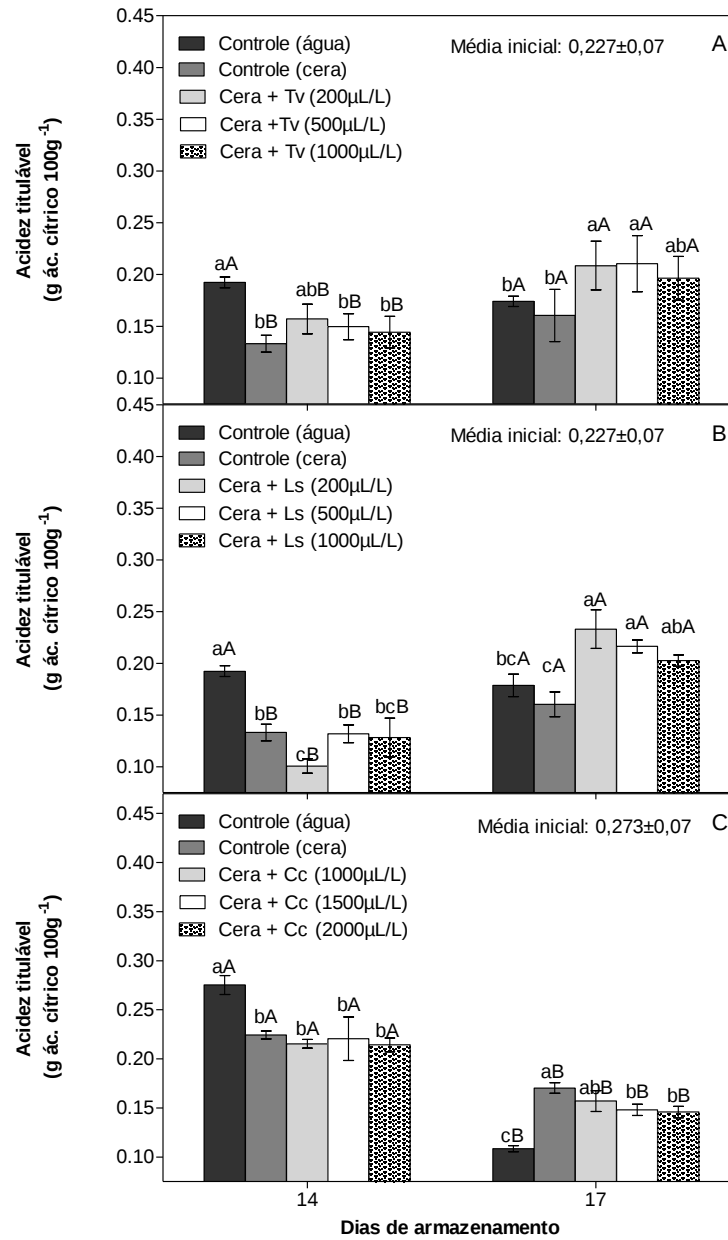


Figura 29. Efeito dos óleos de tomilho (*Thymus vulgaris* - Tv) (A), de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* - Ls) (B) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus* - Cc) (C) na acidez titulável de abacates 'Hass' inoculados armazenados por 7 dias a 22±2 °C e 65±5% UR. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) (n=4).

Os teores de sólidos solúveis dos abacates aumentaram em média de 5,2 para 6,1 °Brix aos 14 dias de armazenamento, indicando o amadurecimento dos frutos, no experimento com o óleo de tomilho (Figura 30 A). Os frutos tratados com cera associada ao óleo de tomilho permaneceram com maiores valores aos 14 dias, e aos 17 dias houve pequena variação entre os tratamentos. Em geral, os revestimentos aplicados em frutos atrasam o seu amadurecimento devido à modificação na atmosfera interna dos vegetais, no entanto, isto não foi verificado nos frutos revestidos com cera, uma vez que os frutos que não receberam a aplicação da cobertura apresentaram menores teores de sólidos solúveis, os quais tendem a aumentar durante o amadurecimento da maioria dos vegetais.

Nos experimentos com os óleos de alecrim-pimenta e de capim-limão os valores para SS dos frutos também aumentaram aos 14 dias de armazenamento dos abacates, como consequência do amadurecimento dos frutos, porém, o aumento desses teores para os frutos do experimento com o óleo de *L. sidoides* foi pouco expressivo, tendo um aumento em média de 5,2 para 5,6 °Brix, enquanto que para os frutos do experimento com o óleo de capim limão o aumento médio para os SS foi de 7,1 para 10,3 °Brix (Figura 30 B e C). Os frutos do experimento com o óleo de capim limão apresentaram médias maiores de SS nos frutos desde o início de experimento, em relação aos experimentos com os óleos de tomilho e de alecrim-pimenta (Figura 30 C).

Ao final do período de avaliação, os frutos tratados com cera associada ao óleo de alecrim-pimenta obtiveram maiores valores de SS nos frutos em comparação ao tratamento controle, frutos imersos em água (Figura 30 B). No entanto, para o experimento com o óleo de capim limão, não houve diferença entre os tratamentos analisados aos 17 dias de avaliação (Figura 30 C).

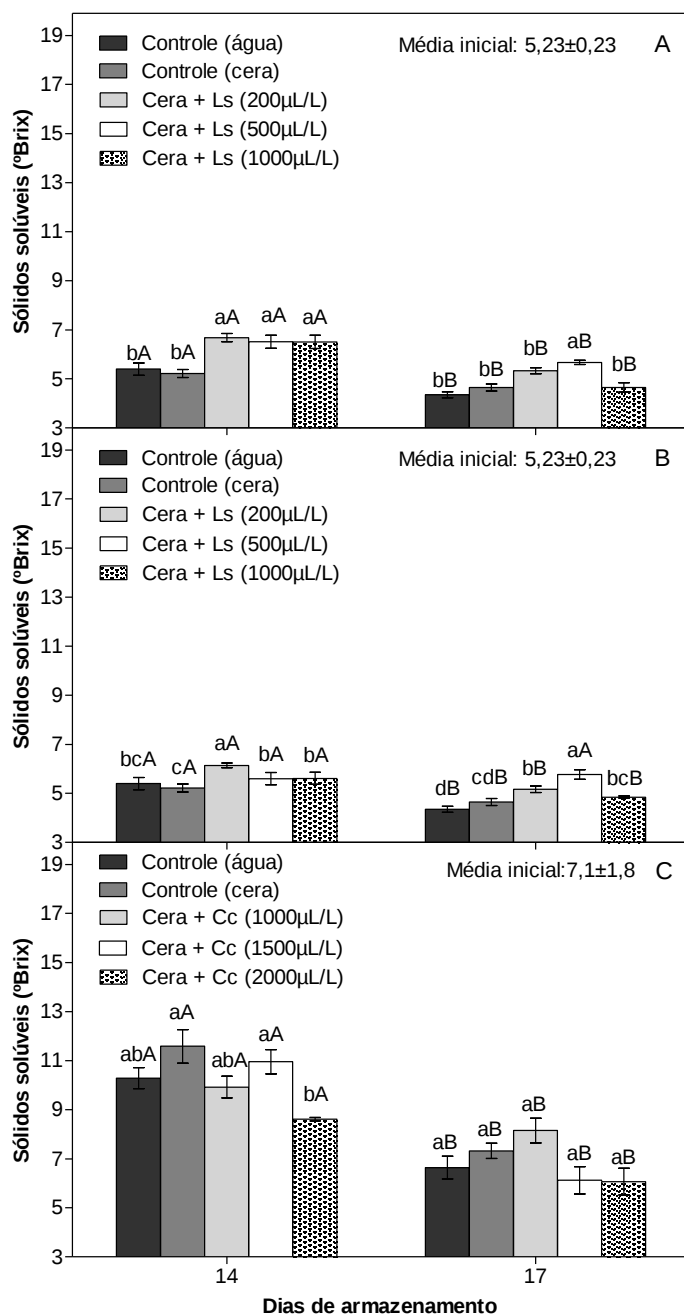


Figura 30. Efeito dos óleos de tomilho (*Thymus vulgaris* - Tv) (A), de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* - Ls) (B) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus* - Cc) (C) nos sólidos solúveis de abacates 'Hass' inoculados armazenados por 7 dias a 22 ± 2 °C e $65 \pm 5\%$ UR. Médias $\pm$ erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) ($n=4$).

Os óleos avaliados no presente trabalho, apresentaram efeito no crescimento micelial de *C. gloeosporioides in vitro* e na germinação conidial do fungo, sendo que as doses mínimas inibitórias do fungo foi dependente do óleo utilizado, sendo que para os óleos de tomilho (*T. vulgaris*) e de alecrim-pimenta (*L. sidoides*) o melhor resultado foi a partir de 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo, enquanto que para o óleo de capim-limão (*C. citratus*) foi de 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ para o crescimento micelial, e a partir de 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ para a germinação conidial do patógeno.

Os melhores resultados observados para o controle da doença nos frutos, foram com os óleos de tomilho (*T. vulgaris*) e de alecrim-pimenta (*L. sidoides*), nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo associados à cera de carnaúba, sendo mais eficientes na redução do sintoma da doença, e na manutenção da qualidade dos abacates 'Hass'.

5. CONCLUSÕES

O uso de quitosana a partir da concentração de 1,0% inibe o crescimento micelial e a germinação de conídios de *C. gloeosporioides in vitro*, e quando aplicada em abacates 'Breda' a 1,0%, e em abacates 'Hass' a 2,0%, é eficiente na redução dos sintomas e da incidência da antracnose nos frutos, e na manutenção da qualidade dos mesmos.

Os óleos de tomilho (*T. vulgaris*) e de alecrim-pimenta (*L. sidoides*), nas concentrações a partir de 200 $\mu\text{L L}^{-1}$, inibem o crescimento micelial e a germinação conidial de *C. gloeosporioides*, enquanto que as concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ dos óleos associados à cera de carnaúba são mais efetivas na redução dos sintomas da antracnose, e na manutenção da qualidade dos abacates 'Hass'.

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Na presente pesquisa, a quitosana demonstrou ser uma alternativa natural na redução dos sintomas da antracnose em abacates na pós-colheita, e para a manutenção da qualidade dos frutos, no entanto, a concentração recomendada do produto depende da variedade de abacate testada, visto que, os resultados em relação à qualidade dos frutos podem variar com a espécie utilizada.

Os óleos essenciais testados no presente trabalho, apresentaram-se como potenciais tratamentos naturais na redução dos sintomas da antracnose na pós-colheita de abacate 'Hass' e na manutenção da qualidade dos fruto, quando associados a revestimentos como a cera.

Sendo assim, os produtos naturais com propriedades antimicrobianas apresentam-se como potenciais tratamentos contra patógenos importantes em frutos na etapa de pós-colheita. Da mesma forma, a associação desses produtos a revestimentos comestíveis aplicados em frutos contribuem para a manutenção da qualidade dos mesmos, indicando a importância e a necessidade de pesquisas nessa área abrangendo também outros vegetais e suas respectivas doenças de ocorrência na pós-colheita.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007. 804 p.

AGRIANUAL: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comercio, 2015.p.114.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 4th ed. San Diego: Academic Press, 1997. p.93-114.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. San Diego: Academic Press, 2005. 922p.

AIT BARKA, E.; EULLAFFROY, P.; CLÉMENT, C.; VERNET, G. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.22, n.8, p.608-614, 2004.

ALI, A.; MUHAMMAD, M. T. M.; SIJAM, K.; SIDDIQUI, Y. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 124, n.2, p. 620-626, 2011.

ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S. G.; RICHMOND, W.; FU, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, Whashington, v. 120, p.470-475, 1974.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International**.16th ed. Washington: Ed. Patrícia Cunniff, 1997. v. 2, cap.37. método 942.15 e método 932.12.

ARFAOUI, A.; EL HADRAMI, A.; MABROUK, Y.; SIFI, B.; BOUDABOUS, A.; EL HADRAMI, I.; DAAYF, F.; CHÉRIF, M. Treatment of chickpea with *Rhizobium isolates* enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. ciceris. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 45, p. 470-479, 2007.

ARREBOLA, E.; SIVAKUMAR, D.; BACIGALUPO, R.; KORTSEN, L. Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n.4, p. 369-377, 2010.

AVILA-QUEZADA, G.; ROJAS, S. H. V.; TELIZ, O. D. First report of the anamorph of *Glomerella acutata* causing anthracnose on avocado fruits in Mexico. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 9, p. 1200, 2007.

AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de frutos**. São Paulo: Nobel, 1993. 114p.

BADAWY, M. E. I.; RABEA, E. I. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 51, n.1, p. 110-117, 2009.

BAILEY, J. A.; O'CONNELL, R. J.; PRING, R. J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, A. J.; JEGGER, J.M. **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Oxford: British Society for Plant Pathology, 1992. p. 88-120.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n.2, p.446–475, 2008.

BARKAY-GOLAN, R. **Postharvest diseases of fruits and vegetables**: development and control. Amsterdam: Elsevier, 2001. 417p.

BAUTISTA-BANÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N.; VELAZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; HERNÁNDEZ-LOPEZ, M.; BARKA, E. A.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C. L. Chitosan as a potencial natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, Guildford, v.25, n. 2, p.108-118, 2006.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C. L. Effects of chitosan and extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**, Guildford, v. 22, n.9, p. 1087-1092, 2003.

BENO-MOUALEM, D.; PRUSKY, D. Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n.5, p. 553–559, 2000.

BINYAMINI, N.; SCHIFFMANN-NADEL, M. Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 62, p. 592-594, 1972.

BONETT, L. P.; WESSLING, C. R.; GAMELO, F. P.; MÜLLER, G. M.; GIOPPO, N. M. da R. Óleo de *Baccharis dracunculifolia* DC. e seu efeito *in vitro* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* coletados em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Cultivando o saber**, Cascavel, v.3, n.4, p.24-36, 2010.

BOSSE, R. J.; BOWER, J. P.; BERTLING, I. Systemic resistance inducers applied preharvest for *Colletotrichum gloeosporioides* control in avocados. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 1007, p. 153-160, 2013.

CAMILI, E. C.; BENATO, E. A.; PASCHOLATI, S. F.; CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinérea*. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 215-221, 2007.

CARNELOSSI, P. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; ITAKO, A. T.; MESQUINI, R. M. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.11, n.4, p. 399-406, 2009.

CERQUEIRA, T.S. **Recobrimentos comestíveis em goiabas 'Kumagai'**. 2007. 69 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CHAND, S.; LUSUNZI, I.; VEAL, D. A.; WILLIAMS, L. R.; KARUSO, P. Rapid screening of the antimicrobial activity of extracts and natural products. **The journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 47, n.11, p. 1295-1304, 1994.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

CIA, P.; BENATO, E. P.; PASCHOLATI, S. F.; GARCIA, E.O. Quitosana no controle póscolheita da podridão mole em caqui 'Rama Forte'. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 745-752, 2010.

COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G. P. P. *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, Netherlands, v. 33, p. 344-349, 2011.

COSE, K. A.; MCGHIE, T. K.; WHITE, A.; WOOLF, A. B. Skin colour and pigment changes during ripening of 'Hass' avocado fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 3, n. 31, p. 287-294, 2004.

COURSEY, D.G. Postharvest losses perishable foods of the developing world. In: MORRIS, L. (Ed.). **Postharvest physiology and crops preservation**. New York: Plenum, 1983. p.485-513.

CRUZ, M. de M.; LINS, S. R. de O.; OLIVEIRA, S .M. A de.; BARBOSA, M. A. G. Efeito de óleos essenciais e revestimentos comestíveis sobre podridões pós-colheita em manga, cv. Kent. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 2, p. 1-6, 2012.

DAIUTO, E. R.; VIEITES, R. L. Atividade da peroxidase e polifenoloxidase em abacate da variedade Hass, submetidos ao tratamento térmico. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**, Hermosillo, v. 9, n. 2, p. 106-112, 2008.

DAIUTO, E. R.; VIEITES, R. L.; TREMOCOLDI, M. A.; VILEIGAS, D. F. Estabilidade físico-química de um produto de abacate acondicionado em diferentes embalagens e conservado pelo frio. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n.1, p. 97-105, 2010.

DAIUTO, E. R.; VIEITES, R. L.; VILEIGAS, D. F.; MYAKE, C. N. H. Avaliação da coloração, teor de fenóis e atividade da peroxidase no guacamole conservado pelo frio. **Agronomia Tropical**, Maracay, v. 59, n. 3, p. 331-342, 2009.

DAIUTO, E. R.; TREMOCOLDI, M. A.; ALENCAR, S. M.; VIEITES, R. L.; MINARELLI, P. H. Composição química e atividade antioxidante da polpa e resíduos de abacate 'Hass'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.36, n.2, p.417-424, 2014.

DONADIO, L. C. **Abacate para exportação**: aspectos técnicos da produção. Brasília, DF: DENACOOP, 1992. 109 p. (Série de Publicações Técnicas da FRUPEX).

DONADIO, L. C. **Abacate para exportação**: aspectos técnicos da produção. Brasília, DF: EMBRAPA, SPI, 1995. 53p.

DU PLOOY, W.; REGNIER, T.; COMBRINCK, S. Essential oil amended coatings as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 53, p.117-122, 2009.

DUTTA, P.K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G.K.; DUTTA, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, London, v. 114, p. 1173-1182, 2007.

EL GHOUTH, A.; ARUL, J.; WILSON, C.; BENHAMOU, N. Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell pepper fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 44, n. 6, p. 417-432, 1994.

EL GHOUTH, A.; PONNAMPALAM, R.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 9, p. 1016-1018, 1992.

EL GHAOUTH, A.; SMILANICK, J. L.; WILSON, C. L. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 19, n.1, p.103-110, 2000.

FAO- Food and Agriculture Organization of United Nations. Disponível: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>> Acesso em: 5 jun. 2015.

FISCHER, I. H.; ARRUDA, M. C. de; ALMEIDA, A. M. de; GALLI, J. A.; BERTANI, R. M. A.; JERÔNIMO, E. M. Doenças pós-colheita em variedades de manga cultivadas em pindorama, São Paulo. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 352-359, 2009.

FRANCISCO, V. L. F. S.; BAPTISTELLA, C. S. L. Cultura do abacate no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 27-41, 2005.

FULGONI, V. L.; DREHER, M.; DAVENPORT, A. J. Avocado consumption is associated with better diet quality and nutrient intake, and lower metabolic syndrome risk in US adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2001–2008. **Nutrition Journal**, London, v.12, p.1, 2013.

GADELHA, J. C.; INNECO, R.; ALCANFOR, D. C.; MATTOS, S. H.; MEDEIROS-FILHO, S.; VIEIRA, A. V. Defensivos naturais no tratamento pós-colheita do pedúnculo de melão. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 34, n. 1, p.86-91, 2003.

GAYET, J.P.; BLEINROTH, E.W.; MATALLO, M.; GARCIA, E.E.C.; GARCIA, A.E.; ARDITO, E.F.G.; BORDIN, M.R. **Abacate para exportação**: procedimentos de colheita e pós-colheita. Brasília: FRUPEX, 1995. 37p.

GONÇALVES, F. P.; MARTINS, M. C.; SILVA-JUNIOR, G. J.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Postharvest control of brown rot and *Rhizopus* rot in plums and nectarines using carnauba wax. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 211-217, 2006.

GOOSEN, M.F.A. **Application of chitin and chitosan**. Switzerland: Technomic Publishing AG, 1997. 336p.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, Londres, v. 11, n.3, p.137-147, 2000.

HANA, C.; ZUO, J.; WANG, Q.; XU, L.; ZHAI, B.; WANG, Z.; DONG, H.; GAO, L. Effects of chitosan coating on postharvest quality and shelf life of sponge gourd (*Luffa cylindrica*) during storage. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.166, p.1-8, 2014.

HORTIESCOLHA- HORTIPEDIA Guia de informações sobre produtos. Abacate. Disponível: <<http://www.hortiescolha.com.br/hortipedia/produto/abacate>> Acesso em: 23 set. 2015.

JEFFRIES, P., DODD, J. C., JEGER, M. J.; PLUMBLEY, R. A. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology**, London, v. 39, n. 3, p. 343-366, 1990.

JIANG, Y. M.; LI, Y. B. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. **Food Chemistry**, Chicago, v. 73, n. 1, p. 139-143, 2001.

KAYS, S.J. **Postharvest physiology of perishable plant products**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 532 p.

KOUASSIA, K. H. S.; BAJJI, M.; JIJAKLI, H. The control of postharvest blue and green molds of citrus in relation with essential oil–wax formulations, adherence and viscosity. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.73, n.3, p.122-128, 2012.

LI, H.; YU, T. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v. 81, p. 269-274, 2000.

LIMA FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização Enzimática e Patogenicidade Cruzada de *Colletotrichum spp.* Associados a Doenças de Pós-Colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.6, p.620-625, 2003.

LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G.; OLIVEIRA, A. M. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n.1, p. 21-25, 1999.

LIMA, M. A. C. de. **Alterações bioquímicas e fisiológicas durante a maturação e o armazenamento de graviola sob refrigeração associada a 1-metilciclopropeno e cera.** 2002. 208 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

MANICA, I. et al. **Fruticultura tropical:** goiaba. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2000. 373p.

MARCOS, J. F. GONZÁLEZ-CANDELAS, L. ZACARÍAS, L. Involvement of ethylene biosynthesis and perception in the susceptibility of citrus fruits to *Penicillium digitatum* infection and the accumulation of defence-related mRNAs. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 56, n. 418, p. 2183-2193, 2005.

MATTIUZ, B. H.; DUCAMP-COLLIN, M. N.; MATTIUZ, C. F. M.; VIGNEAULT, C.; MARQUES, K. M.; SAGOUA, W.; MONTET, D. Effect of propolis on postharvest control of anthracnose and quality parameters of `Kent mango. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 184, n.1, p. 160-168, 2015.

MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. **Phytochemistry**, New York, v.67, n.21, p. 2318-2331, 2006.

MENG, X. H.; LI, B. Q.; LIU, J.; TIAN, S. P. Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. **Food Chemistry**, Barking, v. 106, n.2, p.501-508, 2008.

MERCIER, J.; BAKA, M.; REDDY, B.; CORCUFF, R.; ARUL, J. Shortwave ultraviolet irradiation for control of decay caused by *Botrytis cinerea* in Bell pepper: induced resistance and germicidal effects. **Journal American Society Horticultural Science**, Alexandria, v. 126, n.1, p.128-133, 2001.

MIGUEL, A. C. A. **Tratamento térmico, radiação ultravioleta (uv), quitosana e cera na prevenção de injúrias pelo frio em mangas 'Tommy Atkins' e 'Palmer.** 2012. 200 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

MINOLTA, K. **Precise color communication**: color control from perception to instrumentation. Tokyo: Konica Minolta Sensing, 2007.

MORAES, S.R. **Infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiaba e infecção de *Colletotrichum actatum* em folhas de citros**. 2009. 114p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NIETO-ANGEL, D.; ACOSTA-RAMOS, M.; ORTIZ, D. T.; SÃO JOSÉ, A. R., Enfermedades Del Aguacate. In: OLIVEIRA, S. M. A de.; TERAQ, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. de H. (Ed.). **Patologia pós-colheita**: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. p. 473-491.

OJAGHIAN, M. R.; ALMONEAFY, A. A.; CUI, Z. Q.; XIE, G. L.; ZHANG, J.; SHANG, C. LI, B. Application of acetyl salicylic acid and chemically different chitosans against storage carrot rot. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.84, p. 51-60, 2013.

OLIVEIRA, A. L. de; BRUNINI, M. A.; VISICATO, M. L.; SIQUEIRA, A. M. F. de ; VARANDA, D. B. Atributos físicos em abacates (*Persa americana* L) provenientes da região de Ribeirão Preto – SP. **Revista Nucleus**, Ituverava, v.1, n.1, p. 1-8, 2003.

OLIVEIRA, M. A. de.; SANTOS, C. H. dos.; HENRIQUE, C. M.; RODRIGUES, J. D. Ceras para conservação pós-colheita de frutos de abacateiro cultivar Fuerte, armazenados em temperatura ambiente. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 777-780, 2000.

PALAZÓN, I; PALAZÓN, C. F. Micosis de los productos cosechados. In: LLÁCER, G.; LÓPEZ, M. M.; TRAPERO, A; BELLO, A. (Ed.). **Patologia vegetal**. 2. ed. Valencia: Phytoma-España, 2000. tomo 2, p.967 -994.

PEGG, K. G.; COATES, L. M.; KORSTEN, L.; HARDING, R. M. Foliar, fruit and soil diseases. In: WHILEY, A. W.; SCHAFFER, B.; WOLSTENHOLME, B. N. (Ed.). **The avocado: botany, production and uses**. Wallingford: CAB International Press, 2002. p.299-338.

PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminum effects of lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, n. 3, p.137-143, 1999.

PERFECT, S. E.; HUGHES, H. B.; O'CONNELL R. J.; GREEN J. R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Amsterdam, v. 27, p. 186-198, 1999.

PIATI, A.; SCHNEIDER, C. F.; NOZAKI, M. de H. Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre o crescimento e desenvolvimento de *Penicillium* sp. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 1033-1040, 2011.

PICCININ, E.; PASCHOLATI, S. F.; DI PIERO, R. M. Doenças do abacateiro. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. 4.ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, cap. 44, p. 1-7.

PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. ***Colletotrichum***: host specificity, pathology and host-pathogen interactions. St. Paul, Minnesota: APS Press; 2000. 393p.

PRUSKY, D. Reduction of the incidence of postharvest quality losses, and future prospects. **Food Security**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 463-474, 2011.

RAMOS-GARCÍA, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; HERNÁNDEZ-ROMANO, J.; ZAVALA-PADILHA, G.; TERRÉS-ROJAS, E.; ALIA-TEJACAL, I.; BARRERA-NECHA, L.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; BAUTISTA-BAÑOS, S. Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds, to control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5a in fresh tomatoes. **Crop Protection**, Guildford, v. 38, p. 1-6, 2012.

REGNIER, T.; COMBRINCK, S.; DU PLOOY, W.; BOTHA, B. Evaluation of *Lippia scaberrima* essential oil and some pure terpenoid constituents as postharvest mycobiocides for avocado fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 57, p. 176-182, 2010.

RIVERO, R. M.; RUIZ, J. M.; GARCÍA, P. C.; LÓPEZ-LEFEBRE, L. R.; SÁNCHEZ, E.; ROMERO, L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Science**, Madison, v. 160, p. 315-321, 2001.

ROMANAZZI, G.; FELIZIANI, E.; SANTINI, M. LANDI, L. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 75, p. 24-27, 2013.

ROMANAZZI, G.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; DI VENERE, D.; SALERNO, M. Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage greymould of table grapes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, p.1862-1867, 2002.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; PASTOR, C.; VARGAS, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHÁFER, M. Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 60, p. 57-63, 2011a.

SÁNCHEZ-GONZÁLES, L.; VARGAS, M.; GONZALEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A.; CHAFER, M. Use of essential oils in bioactive edible coatings. **Food Engineering Reviews**, New York, v. 3, p. 1-16, 2011b.

SELLAMUTHU, P. S.; SIVAKUMAR, D.; SOUNDY, P. Antifungal activity and chemical composition of thyme, peppermint and citronella oils in vapor phase against avocado and peach postharvest pathogens. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 33, p. 86-93, 2013.

SELLAMUTHU, P. S.; SIVAKUMAR, D.; SOUNDY, P.; LISE KORSTEN. Essential oil vapours suppress the development of anthracnose and enhance defence related and antioxidant enzyme activities in avocado fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 81, p. 66-72, 2013.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000. cap.18.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.16, p. 144- 158, 1965.

SIVAKUMAR, D.; BAUTISTA-BAÑOS, S. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. **Crop Protection**, Guildford, v. 64, p. 27-37, 2014.

SOUZA, M. L. de.; MORGADO, C. M. A.; MARQUES, K. M.; MATTIUZ, C. F. M.; MATTIUZ, B. H. Pós-colheita de mangas 'Tommy Atkins' recobertas com quitosana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.1, p. 337-343, 2011. Volume especial.

STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004. p. 45-62.

TAIZ L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 32, p. 1-13, 2003.

TOIVONEN, P. M. A.; BRUMMELL, D. A. Review Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 48, p. 1-14, 2008.

VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N.; GUERRASÁNCHEZ, M. G.; MARIACA-GASPAR, G. I. Review Chitosan as an alternative to control phytopathogenic fungi on fruits and vegetables in Mexico. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, p. 6606-6611, 2012.

WAEWTHONGRAK, W.; PISUCHPEN, S.; LEELASUPHAKUL, W. Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 99, p. 44-49, 2015.

WIN, N. K. K.; JITAREERAT, P.; KANLAYANARAT, S.; SANGCHOTE, S. Effects of cinnamon extract, chitosan coating, hot water treatment and their combinations on crown rot disease and quality of banana fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 45, p. 333-340, 2007.

XING, Y.; LI, X.; XU, Q.; YUN, J.; LU, Y. Antifungal activities of cinnamon oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* *in vitro* and *in vivo* fruit test. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 45, p.1837-1842, 2010.

XING, Y.; LI X.; XU, Q.; YUN, J.; LU, Y.; TANG, Y. Effects of chitosan coating enriched with cinnamon oil on qualitative properties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.).**Food Chemistry**, Washington, v. 124, p. 1443-1450, 2011.

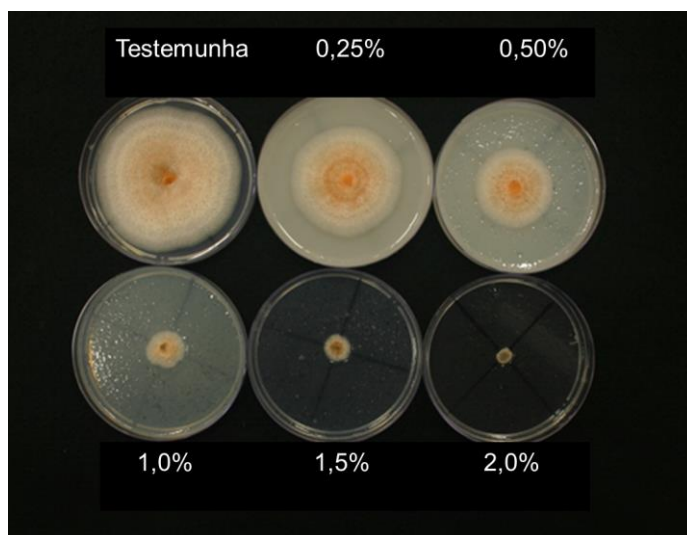
YOUSSEF, K.; LIGORIO, A.; SANZANIA, S. M.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A. Control of storage diseases of citrus by pre- and postharvest application of salts. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 72, p. 57-63, 2012.

YOUSSEF, K.; SANZANI, S. M.; LIGORIO, A.; IPPOLITO, A.; TERRY, L. A. Sodium carbonate and bicarbonate treatments induce resistance to postharvest green mould on citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 87, p. 61-69, 2014.

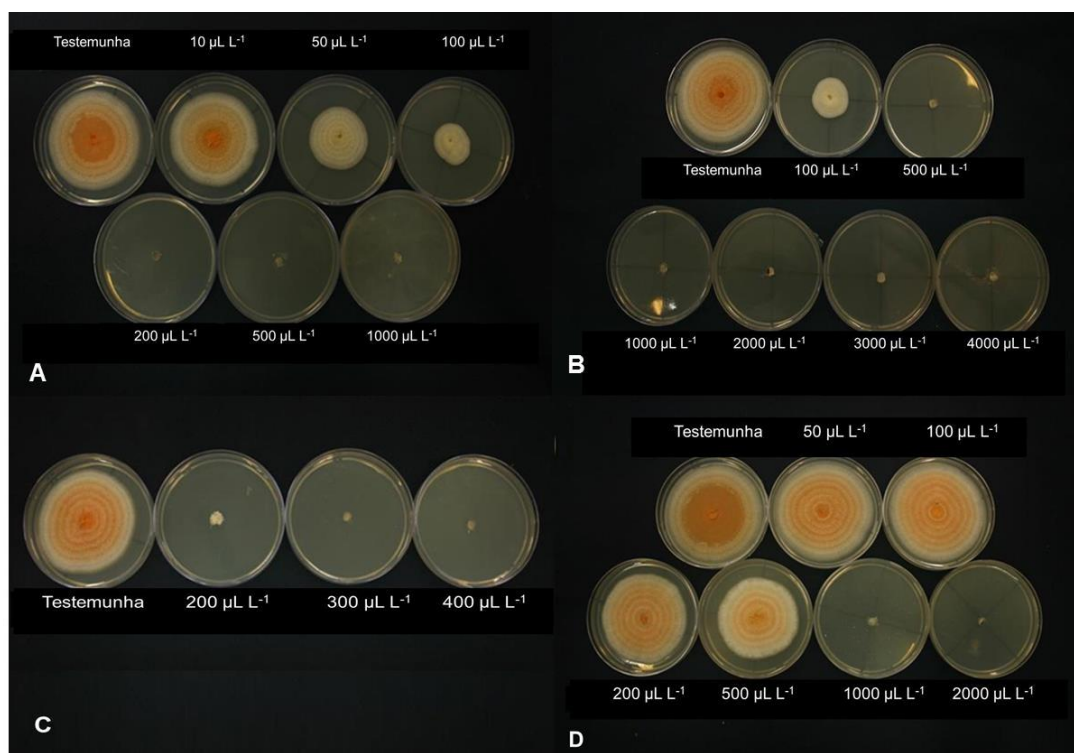
ZARDO, D. M.; DANTAS, A. P.; VANZ, R.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Intensidade de pigmentação vermelha em maçãs e sua relação com os teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidativa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 148-154, 2009.

ZHU, X.; WANG, Q.; CAO, J.; JIANG, W. Effects of chitosan coating on postharvest quality of mango (*Mangifera indica* L. cv. Tainong) fruits. **Journal of Food Processing and Preservation**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 770-784, 2008.
84, 2008.

APÊNDICE



1. Efeito inibitório de quitosana no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de abacate 'Hass', após 7 dias a 27 ± 1 °C.



2. Efeito inibitório do óleo de tomilho (*Thymus vulgaris*) (A), de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) (B e C) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) (D) no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de abacates 'Hass', após 7 dias a 27 ± 1 °C.