

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**VOLATILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS PARA  
CONTROLE DE *Botrytis cinerea* EM MORANGOS**

**Ariadne Kaleda Marino**

Engenheira agrônoma

**2020**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**VOLATILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS PARA  
CONTROLE DE *Botrytis cinerea* EM MORANGOS**

**Discente: Ariadne Kaleda Marino  
Orientador: Prof. Dr. Ben-Hur Mattiuz**

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

**2020**

M339v Marino, Ariadne Kaleda  
Volatilização de óleos essenciais para controle de Botrytis cinerea em morangos / Ariadne Kaleda Marino. -- Jaboticabal, 2019  
39 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal  
Orientador: Ben-Hur Mattiuz

1. Rosacea (Botânica). 2. Botrytis cinerea. 3. Essências e óleos essenciais. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,  
Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

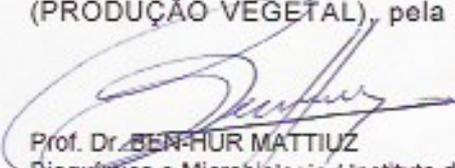
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: VOLATILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS PARA CONTROLE DE *Botrytis cinerea* EM MORANGOS

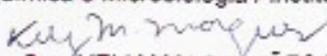
AUTORA: ARIADNE KALEDA MARINO

ORIENTADOR: BEN-HUR MATTIUZ

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

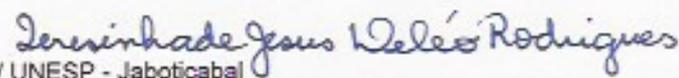
  
Prof. Dr. BEN-HUR MATTIUZ

Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências - Unesp - Rio Claro

  
Profa. Dra. KELLY MAGALHÃES MARQUES

Departamento de Agronomia / Centro Universitário Moura Lacerda - Ribeirão Preto/SP

Profa. Dra. TERESINHA DE JESUS DELEO RODRIGUES

  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 06 de janeiro de 2020

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Ariadne Kaleda Marino, nascida em São Carlos, no Estado de São Paulo, aos 20 dias do mês de junho de 1991. Filha de Francisco Marino e Luzia Miriani Aparecida Kaleda. Em 2011, ingressou no curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Estadual Paulista - UNESP, câmpus de Jaboticabal. A partir do 2º ano do curso fez parte do programa PET – Agronomia, fez parte de projetos de pesquisa e extensão sendo bolsista, também participou e organizou cursos e congressos na área para formação complementar. Com a defesa da monografia em setembro de 2015, intitulada “Associação de própolis e quitosana no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* e na qualidade de abacates ‘Hass’”, recebeu o título de Engenheira Agrônoma em março de 2016. Em agosto de 2017, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) da Universidade Estadual Paulista - UNESP, em Jaboticabal – SP, com área de concentração em tecnologia pós-colheita de frutos e hortaliças e sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) a partir do terceiro semestre. Durante o mestrado apresentou trabalhos em congressos e recebeu prêmio de melhor trabalho apresentado em um evento internacional. Durante essa jornada acadêmica publicou artigos científicos, sendo dois em primeira autoria.

## **DEDICO**

Aos meus pais, por toda dedicação na minha criação, por não medirem esforços em me educar para que eu chegasse até aqui e por me apoiarem em todas minhas decisões.

Aos meus avós, que são fundamentais para que tudo isso se tornasse possível.

À minha família pelo constante incentivo, amor e carinho.

Aos meus amigos, que acreditaram em mim, me apoiaram e me incentivaram para a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho, sinto o dever pessoal de fazer alguns agradecimentos às pessoas e a instituição que, de forma direta ou indireta, tornaram possível a realização de mais uma etapa de minha vida acadêmica e também de minhas conquistas pessoais e profissionais. Nesse sentido, antes de tudo, agradeço primeiramente a Deus, por ser presença constante em minha vida, me proteger, me guardar e guiar todos meus passos.

Aos meus pais, por terem me dado a vida, me educado e me ajudado a seguir em frente com meus sonhos, em especial minha mãe, a qual se desdobra em mil para me ver feliz.

Aos meus avós, sem os quais nada disso seria possível, em especial meu avô que tem sempre o discurso que “aprender não ocupa espaço” e que é necessário “estudar, estudar e estudar” e minha avó, que está sempre em meu coração me iluminando.

A minha família, pelos incentivos que me motivavam nas horas difíceis e turbulentas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ben-Hur Mattiuz, pela oportunidade, por todo o apoio, conhecimento transmitido e orientações dadas.

A todos os colegas de laboratório, em especial, José, Isa, Karol, Ellen, por sempre estarem dispostos a me ajudar em tudo que fosse necessário e pelas contribuições para a realização desse trabalho.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, juntamente com a Comissão do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), pela realização do curso de mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Aline, que chegou no período mais crítico dessa etapa e mesmo assim teve paciência e compreensão para me ajudar a terminar tudo e me deu apoio e incentivo que foram fundamentais nesse período tão difícil.

Aos meus amigos, em especial Jéssica, Juliana e Raquel que são meu ponto de apoio e ombro amigo pra todas as horas, além do Clebson, Danilo e Juliana que foram os amigos que o mestrado me deu de presente pra levar pra vida toda.

Enfim, agradeço sinceramente a todos que de alguma forma estiveram envolvidos nessa jornada e que contribuíram para que essa etapa se concluísse. Toda confiança, todo apoio e todo incentivo foram essenciais.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	ii
ABSTRACT .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Morango.....	4
2.2. <i>Botrytis cinerea</i> .....	5
2.3. Óleos essenciais.....	8
3. OBJETIVO .....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
4.1. Obtenção do patógeno .....	12
4.2. Óleos essenciais.....	12
4.3. Material vegetal .....	12
4.4. PRIMEIRA ETAPA: efeito de óleos essenciais aplicados por volatilização no controle <i>in vitro</i> de <i>Botrytis cinerea</i> .....	13
4.5. SEGUNDA ETAPA: efeito de óleos essenciais aplicados por volatilização no controle <i>in vivo</i> de <i>Botrytis cinerea</i> .....	13
4.6. TERCEIRA ETAPA: efeito de óleos essenciais aplicados por volatilização na qualidade de morangos .....	14
4.7. Análise dos resultados .....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	17
5.1. Efeito da volatilização de óleos essenciais no crescimento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> 17	
5.2. Efeito da volatilização de óleos essenciais em morangos inoculados com <i>Botrytis cinerea</i> 18	
5.3. Efeito da volatilização de óleos essenciais na qualidade de morangos .....	20
5.3.1. Evolução da perda de massa fresca .....	20
5.3.2. Firmeza .....	22
5.3.3. Teor de acidez titulável (AT) .....	23
5.3.4. Teor de sólidos solúveis (SS).....	23
5.3.5. Teor de ácido ascórbico (AA).....	24
5.3.6. Coloração.....	26
6. CONCLUSÕES.....	28
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
8. REFERÊNCIAS .....	30

## VOLATILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS PARA CONTROLE DE *Botrytis cinerea* EM MORANGOS

**RESUMO** – A vida útil pós-colheita de frutas e hortaliças pode ser ampliada com adoção de técnicas adequadas de conservação que permitam manter por mais tempo a qualidade e reduzir as perdas. O morango se destaca por apresentar grande aceitação para consumo *in natura*, isso se atribui as suas características de sabor, aroma e valor nutricional, entretanto apresenta curta vida de prateleira. Esse fruto apresenta problemas pós-colheita, devido a sua alta perecibilidade, perdas por doenças, principalmente o mofo cinzento, e por isso torna-se impróprio para comercialização. Tais características tem dificultado a ampliação do mercado e consequentemente dificultado o aumento do valor agregado do produto. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da volatilização de óleos essenciais de eucalipto citriodora, alecrim e canela cássia sobre o controle do mofo cinzento e a qualidade do morango. No primeiro experimento foram selecionadas as melhores concentrações dos óleos, *in vitro*, para controle do *Botrytis cinerea*, agente causal do mofo cinzento. No segundo experimento foi testado o efeito da volatilização dos três óleos para controle *in vivo* do *Botrytis cinerea* e no terceiro experimento foi testado o efeito do melhor óleo e das melhores concentrações na qualidade dos morangos. Os morangos foram acondicionados em bandejas de isopor e armazenados a 20 °C. Determinou-se a severidade e incidência da doença, perda de massa fresca, teor de acidez titulável, firmeza, coloração, teor de sólidos solúveis e teor de ácido ascórbico. A volatilização de óleos essenciais de canela cássia e alecrim nas concentrações a partir de 100 ppm com tempo de volatilização a partir de 6h inibiram 100% o crescimento micelial de *B. cinerea*. Os tempos menores (1h, 2h e 3h) de exposição a volatilização retardaram o crescimento micelial de *B. cinerea* para a volatilização dos três óleos. A redução da severidade da doença causada pelo mofo cinzento pode ser observada nos frutos de morango quando tratados com volatilização dos óleos essenciais, porém a manutenção da qualidade dos mesmos pode ser comprometida devido ao morango não ficar com textura e aspecto visual comercial.

**Palavras-chave:** *Cinnamomum cassia*, *Eucalyptus citriodora*, *Fragaria ananassa* Duch, mofo cinzento, *Rosmarinus officinalis*, voláteis

## VOLATILIZATION OF ESSENTIAL OILS TO CONTROL *Botrytis cinerea* IN STRAWBERRIES

**ABSTRACT** - The postharvest shelf life of fruits and vegetables can be extended by adopting appropriate conservation techniques to maintain quality longer and reduce losses. The strawberry stands out for having great acceptance for fresh consumption, this is attributed to its characteristics of flavor, aroma and nutritional value, however has a short shelf life. This fruit presents postharvest problems, due to its high perishability, disease losses, mainly gray mold, and therefore it is unsuitable for commercialization. Such characteristics have hindered the expansion of the market and consequently hindered the increase of the added value of the product. The objective of this work was to study the effects of volatilization of eucalyptus, rosemary and cinnamon essential oils on the control of gray mold and strawberry quality. In the first experiment, the best in vitro oil concentrations were selected to control *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. In the second experiment the effect of the volatilization of the 3 oils for in vivo control of *Botrytis cinerea* was tested and in the third experiment the effect of the best oil and the best concentrations on strawberry quality was tested. Strawberries were placed in Styrofoam trays and stored at 20 °C. Disease severity and incidence, loss of fresh mass, titratable acidity, firmness, coloration, soluble solids content and ascorbic acid content were determined. Volatilization of essential oils of cinnamon cassia and rosemary in concentrations from 100 ppm with time of volatilization from 6 hours inhibited the mycelial growth of *B. cinerea* 100%. The shorter times (1h, 2h and 3h) of exposure to volatilization delayed the mycelial growth of *B. cinerea* for the volatilization of the 3 oils. The reduction of the disease severity caused by gray mold can be observed in strawberry fruits when treated with volatilization of essential oils, but their quality maintenance may be compromised due to the strawberry not having a texture and commercial visual aspect.

**Keywords:** *Cinnamomum cassia*, *Eucalyptus citriodora*, *Fragaria ananassa* Duch, gray mold, *Rosmarinus officinalis*, volatile

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida do *Botrytis cinerea*. Adaptado de <<https://core.ac.uk/download/pdf/61915897.pdf>> ..... **7**
- Figura 2.** Efeito inibitório da volatilização de óleos essenciais no crescimento micelial *in vitro* de *Botrytis cinerea* após 7 dias a 20 °C. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais dentro do grupo e maiúsculas entre os grupos não diferem entre si, pelo teste Tukey (P<0,05) (n=6). ..... **17**
- Figura 3.** Efeito da volatilização dos óleos essenciais na severidade do mofo cinzento em morangos inoculados com *Botrytis cinerea* e armazenados a 20 °C por 4 dias. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais dentro do grupo e maiúsculas entre os grupos não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05) (n=10). ..... **19**
- Figura 4.** Efeito da volatilização do óleo essencial de alecrim na perda de massa fresca de morangos armazenados a 20 °C por 4 dias. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05) (n=20). ..... **21**
- Figura 5.** Efeito da volatilização do óleo essencial de alecrim na firmeza de morangos armazenados a 20 °C por 4 dias. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05) (n=20). ..... **22**
- Figura 6.** Efeito da volatilização do óleo essencial de alecrim no teor da acidez titulável de morangos armazenados a 20 °C por 4 dias. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05) (n=20). ..... **23**
- Figura 7.** Efeito da volatilização do óleo essencial de alecrim nos teores de sólidos solúveis de morangos armazenados a 20 °C por 4 dias. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05) (n=20). ..... **24**
- Figura 8.** Efeito da volatilização do óleo essencial de alecrim no teor de ácido ascórbico de morangos armazenados a 20 °C por 4 dias. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05) (n=20). ..... **25**

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Efeito da volatilização do óleo essencial de alecrim na luminosidade, ângulo Hue e cromaticidade interna e externa de morangos armazenados a 20 °C por 4 dias. **26**

## 1. INTRODUÇÃO

Os morangos são muito procurados pelo mercado consumidor devido ao seu sabor delicioso e valor nutricional, mas muitas vezes se tornam não comercializáveis devido a lesões mecânicas e contaminação por fungos. O mofo cinzento, causado pelo fungo *Botrytis cinerea*, é uma das principais causas para a redução da vida útil dos morangos após a colheita (Lazar et al., 2010).

Nas últimas décadas, os fungicidas químicos foram amplamente utilizados no controle de doenças fúngicas pós-colheita em frutas. No entanto, o uso indiscriminado e excessivo de fungicidas sintéticos tem sido uma das principais causas para o desenvolvimento de populações de patógenos fúngicos resistentes, resultando no uso de quantidades ainda maiores de compostos antifúngicos na agricultura e no aparecimento de níveis aumentados de resíduos tóxicos em produtos alimentícios (Da Cruz Cabral et al., 2013).

O fungo *B. cinerea* pode causar até 50% de perdas pré-colheita em morangos em condições ambientais minimamente favoráveis, ou seja, com temperatura e umidade relativa adequadas, podendo chegar até a 90% dessas perdas. A capacidade de se adaptar a diferentes condições ambientais e a produção maciça de conídios tornou esse fungo muito destrutivo e com alto risco de desenvolvimento de resistência (Xiang et al. 2015).

A aplicação de agroquímicos tem sido considerada a maneira mais eficiente de controlar *B. cinerea*. Mais de meio bilhão de dólares gastos em fungicidas são pulverizados anualmente. Vários grupos de fungicidas, incluindo benzimidazóis (MBCs), N-fenilcarbamatos (NPCs), dicarboximidas (DCFs), anilino-pirimidinas (APs), inibidores externos à quinona (Qols), inibidores da succinato desidrogenase (SDHIs) e fenilpirróis (PPs) são principalmente usados no controle de *B. cinerea*. No entanto, sua eficácia diminuiu acentuadamente pelo surgimento de isolados resistentes. Apesar da pulverização semanal de fungicidas, as perdas pré-colheita causadas por *B. cinerea* ainda podem atingir 15% da produção total de morangos (Sukorini et al., 2013).

Dessa forma métodos de controle alternativos são, portanto, necessários (Sukorini et al., 2013). Os óleos essenciais de plantas (OEs) e extratos têm sido

utilizados há milhares de anos em preservação de alimentos, produtos farmacêuticos, medicina alternativa e terapias naturais (Prabuseenivasan et al., 2006).

Os OEs, que são naturalmente sintetizados em diferentes órgãos das plantas como metabólitos secundários, ou seja, são compostos orgânicos que não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos, apenas desempenham papel importante nas defesas vegetais e interação com o meio ambiente, sendo assim, são caracterizados como líquidos oleosos e perfumados extraídos de materiais vegetais aromáticos (El Asbahani et al., 2015). Os OEs tem atraído interesse como agentes de controle de doenças pós-colheita devido à sua volatilidade, segurança relativa, ampla aceitação pelos consumidores e propriedades ecologicamente corretas e biodegradáveis (Tzortzakis e Economakis, 2007).

Numerosos estudos documentaram efeitos antifúngicos para diferentes OEs usados para controlar a deterioração de frutas pós-colheita, como citros (Shao et al., 2015), morango (Shao et al., 2013), mirtilo (Mehra et al., 2013), pêssego (Elshafie et al., 2015) e tomate cereja (Guerra et al., 2015).

Os óleos essenciais de várias plantas mostraram atividade contra os patógenos do morango. Por exemplo, o de eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hook) melhora a qualidade dos frutos e reduz sua deterioração (Guerra et al., 2015). O uso do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) tem uma ação antifúngica, que além de auxiliar no combate ao mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) também auxilia na diminuição da deterioração pós-colheita em morangos armazenados (Guerra et al., 2015). Dessa mesma forma, a canela cássia (*Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl) também possui atividade antifúngica nos seus extratos e pode inibir significativamente o crescimento de *B. cinerea* (Guerra et al., 2015).

Diante disso, 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 produtos químicos.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia da volatilização dos óleos essenciais de eucalipto citriodora (*Eucalyptus citriodora*),

alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e canela cássia (*Cinnamomum cassia*) sobre o controle de *Botrytis cinerea* e na qualidade do morango.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Morango

O morango é uma importante cultura que é plantada em todo o mundo e, somente para o Brasil a produção é de 8.926 kg/ha. Já para os Estados Unidos, a produção de morango ultrapassa 65.000 kg/ha (FAO Stat, 2018). A produção de morangos no Brasil está concentrada nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina que são regiões de clima temperado e subtropical propícias para o morango (Oliveira e Scivittaro, 2009). Os morangos são benéficos para a dieta humana como fonte de macro e micronutrientes, vitaminas e antioxidantes promotores de saúde (Giampieri et al., 2015).

O morango pertence à família das Rosaceae e ao gênero *Fragaria*, tendo por origem o Chile e a América do Norte. É uma planta herbácea perene, com caules curtos (coroas) e folhas densamente espaçadas. O morango produz frutas acessórias e agregadas complexas compostas por aquênios e um receptáculo. Os aquênios são pequenos frutos secos, de semente única, enquanto o receptáculo é considerado anatomicamente equivalente ao tecido do meristema floral (Hollender et al., 2012).

Assim como a framboesa, mirtilo e goji berry, o morango pertence ao grupo das frutas vermelhas, também conhecido por “berries”. Esse grupo se caracteriza por frutas ricas em vitaminas (A, C, E e do complexo B), minerais, compostos fenólicos (ácido elágico e gálico) e flavonoides (catequinas, quercetinas e antocianinas), sendo atribuídas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes nessas frutas (Cardozo e Mafra, 2015).

É classificado como fruto não-climatérico e possui alta taxa respiratória, sendo assim, tem curto tempo de vida pós-colheita. O ponto de maturação do fruto durante a colheita é de essencial importância, pois influencia diretamente na palatabilidade e aparência do fruto e, conseqüentemente, na aceitação pelo consumidor (Gonçalves et al., 2012).

Uma das características naturais do morango é ser muito perecível, Chitarra e Chitarra (1990) citam que o período máximo de vida pós-colheita é de 10 dias, sob condições específicas de armazenamento, sendo assim, essa vida de prateleira só é

atingida se os frutos forem mantidos em temperaturas entre 0-5 °C, com 10% de Oxigênio e 15-20% de CO<sub>2</sub>. Esse armazenamento nem sempre é obtido com excelência e, portanto, a vida de prateleira é bem mais curta devido a sua intensa atividade metabólica e grande suscetibilidade ao ataque de agentes patogênicos causadores de podridões. A perecibilidade dos morangos é tanta que normalmente os morangos apresentam uma taxa respiratória de aproximadamente de 6 mg a 10 mg de CO<sub>2</sub>/kg.hr a 0 °C, a qual aumenta de quatro a cinco vezes quando a temperatura sobe para 10 °C, e até dez vezes se a temperatura alcança 20 °C (Mitcham et al., 2003).

As embalagens utilizadas para comercialização são recipientes de polietileno tereftalato (PET), geralmente transparentes, ou então bandejas de poliestireno expandido (isopor), cobertas com filme de polivinil cloreto (PVC) esticável ou com tampas perfuradas. Normalmente a capacidade é de 250 a 500 gramas de morangos, distribuídas em uma ou duas camadas. Durante o armazenamento recomenda-se manter a temperatura da câmara fria de 0 a 1 °C e a umidade relativa entre 90-95% (Embrapa, 2005).

O morango é afetado por vários patógenos, incluindo fungos, bactérias, vírus e nematoides. Os patógenos economicamente mais impactantes do morango são os fungos, principalmente *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum* e *Botrytis cinerea*, que podem infectar todas as partes da planta e causar danos graves ou a morte do fruto (Garrido et al., 2011).

## **2.2. *Botrytis cinerea***

Entre os patógenos fúngicos, o fungo *Botrytis cinerea* é considerado o patógeno primário na pós-colheita dos morangos, levando a perdas econômicas impactantes para a indústria de morangos. É um ascomiceto (Ascomycota), que causa a doença conhecida como mofo cinzento, pode infectar mais de 200 espécies, manifestando-se em todas as partes da planta, desde frutos, hastes, folhas e flores. Os tecidos senescentes servem como meio de desenvolvimento do patógeno e assim colaboram com o aumento do inóculo (Costa, 2014).

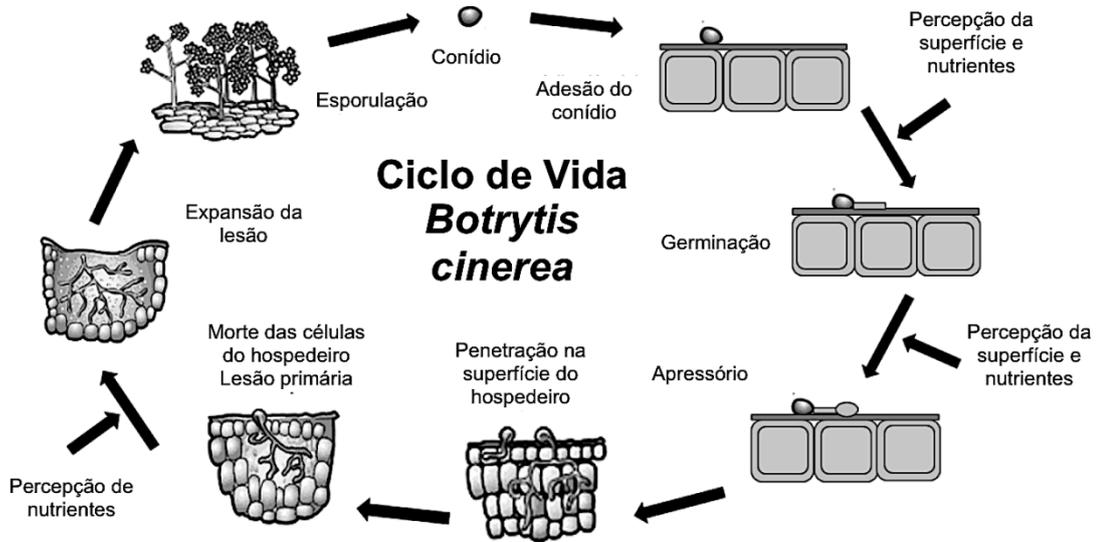
Na fruta a infecção se inicia, geralmente, durante a época de florescimento onde conídios do patógeno (esporos assexuais) infectam o tecido causando uma infecção latente que se expressará durante o amadurecimento do fruto. A hifa do fungo pode penetrar diretamente no tecido vegetal, entretanto, ferimentos de qualquer natureza favorecem a infecção (Costa, 2014). Sob condições úmidas, mais de 80% das flores e frutos de morango podem ser perdidos se as plantas não forem pulverizadas com fungicidas (Garrido et al., 2011).

Temperaturas moderadas (15 °C a 25 °C) são favoráveis ao desenvolvimento do fungo. Em temperaturas próximas de 0 °C também é possível haver crescimento fúngico, bem como, em morangos embalados e armazenados sob refrigeração. A umidade é o principal fator regulatório para o desenvolvimento da doença e a germinação de esporos.

Em todo o mundo, o *Botrytis cinerea* causa perdas anuais de 10 a 100 bilhões de dólares para a cultura do morango. Sua elevada agressividade e especialidade como fungo, permite neutralizar uma ampla gama de produtos químicos de defesa de plantas, sendo um dos patógenos vegetais mais estudados (Guerra et al., 2015).

O fungo *Botrytis cinerea* produz grandes quantidades de esporos assexuais, conhecidos por conídios, que apresentam formato arredondado. O ciclo começa quando os conídios entram em contato com um hospedeiro suscetível, pois os mesmos germinam formando um tubo germinativo que segue para a formação de estruturas de penetração, conhecidas como apressórios (Caires, 2013), como demonstra a figura 1.

Em relação ao modo de penetração de *B. cinerea* nas plantas hospedeiras, pode ser pela penetração direta através da cutícula, penetração do tubo germinativo ou ainda penetração por aberturas naturais, como lenticelas e estômatos (Caires, 2013).



**Figura 1.** Ciclo de vida do *Botrytis cinerea*. Adaptado de <https://core.ac.uk/download/pdf/61915897.pdf>

O *Botrytis cinerea* produz um amplo conjunto de substâncias químicas que causam a morte do hospedeiro, incluindo um espectro de metabólitos de baixo peso molecular (por exemplo, botridial, ácido oxálico e HSTs). Durante a penetração da cutícula e a formação de lesões primárias, o fungo desencadeia uma reação oxidativa da planta, acumulando radicais livres que causam morte celular na planta (Shao et al., 2015).

Enquanto isso confere resistência aos patógenos biotróficos, a morte celular das plantas é benéfica para os necrotróficos, incluindo *Botrytis cinerea*, uma vez que se alimentam de células mortas. O fungo também é capaz de suprimir a imunidade do hospedeiro produzindo pequenas moléculas de RNA (sRNA) que causam silenciamento genético. Além das pectinases, o *B. cinerea* produz celulases e hemicelulases para decompor as paredes celulares das plantas para se nutrir (De Cruz Cabral et al., 2013).

O mofo cinzento pode ser parcialmente controlado no campo por combinações de fungicidas. O controle biológico desse mofo em flores e frutos utilizando microrganismos antagônicos tem potencial futuro. A remoção do material vegetal

infectado e a redução da umidade durante o armazenamento de frutas e a redução da umidade em estufas são medidas importantes de controle (Xiang et al., 2015).

Uso intensivo de produtos químicos no controle de podridões, causadas por esse patógeno, tem gerado problemas de ordem ambiental, produção de alto custo, resistência dos patógenos aos fungicidas e por esse motivo, o desenvolvimento de alternativas novas, assim como a utilização de produtos naturais e biodegradáveis na conservação dos frutos, e o estudo de materiais são tendências atuais.

### **2.3. Óleos essenciais**

A International Standard Organization (ISO) define os produtos obtidos por meio de partes de plantas, através de destilação por arraste de vapor d'água ou por prensagem de pericarpos de frutos cítricos, como sendo óleos voláteis. 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 diferencia dos óleos fixos (mistura de substâncias lipídicas), obtidos geralmente de sementes (Simões e Spitzer, 2000).

As plantas têm propriedades morfológicas e bioquímicas individuais, como estrutura das folhas, compostos de óleo, etc., que as protegem de várias doenças e pragas. Os pesquisadores se concentram no potencial efeito e uso do óleo essencial de planta (OE) para a etapa alternativa do gerenciamento de pragas. Muitos OEs são neurotóxicos para insetos e ácaros devido aos seus constituintes terpenóides e causam consequências letais aos mesmos (Shao et al., 2015).

Os OEs, que são naturalmente sintetizados em diferentes órgãos das plantas como metabólitos secundários, são caracterizados como líquidos oleosos e perfumados extraídos de materiais vegetais aromáticos (El Asbahani et al., 2015). Os OEs atraíram recentemente interesse como agentes de controle de doenças pós-colheita devido à sua volatilidade, segurança relativa, ampla aceitação pelos

consumidores e propriedades ecologicamente corretas e biodegradáveis (Tzortzakis e Economakis, 2007).

Numerosos estudos documentaram efeitos antifúngicos para diferentes OEs usados para controlar a deterioração de frutas pós-colheita, como citros, onde o óleo essencial de cravo-da-índia foi utilizado em conjunto com quitosana para controlar o *Penicillium digitatum* (Shao et al., 2015). Em mirtilos, foram utilizados vários óleos essenciais, entre eles o de canela cássia e alecrim para gerenciar o controle de *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum* (Mehra et al., 2013). Em abacates 'Hass' também foram utilizados diversos óleos essenciais para avaliar a inibição do *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e *in vivo*, com destaque para o óleo de tomilho (Muniz et al., 2016). Para pêssego, os óleos essenciais de tomilho e verbena foram utilizados contra *Monilinia spp.* (Elshafie et al., 2015). E para tomate cereja, o óleo essencial de menta foi testado juntamente com quitosana para combater *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Rhizopus stolonifer* (Guerra et al., 2015).

Em morango, foi utilizado óleo da árvore do chá como agente antifúngico natural para controlar *B. cinerea* (Shao et al., 2013). Outro estudo em morango, mostra a utilização de óleo essencial de sálvia para aumento da vida de prateleira (Borges et al., 2013). Existe ainda estudo com óleo essencial de capim-limão, palma rosa, citronela, cravo, canela, menta, lavanda, tangerina, eucalipto, melaleuca, alecrim e laranja para controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro (Lorenzetti et al., 2011). Também foi avaliado o efeito do extrato de canola no controle de *Botrytis cinerea in vitro* e em pós colheita de morangos (Cuzzi, 2013).

Os óleos essenciais de várias plantas mostraram atividade contra os patógenos do morango, dentre eles os óleos de canela cássia, alecrim e eucalipto citriodora. Os três óleos possuem diferentes substâncias como componente majoritário, por exemplo, o eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hook), pertencente a família Myrtaceae, possui 72% de citronelal e estudos mostram que melhora a qualidade dos frutos e reduz sua deterioração. O óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), pertencente a família Lamiaceae, possui 45% de 1,8 cineol, 12% de cânfora, 12% de  $\alpha$ -pineno, 8% de  $\beta$ -pineno e 2% de limoneno, demonstrando uma ação antifúngica,

que além de auxiliar no combate ao mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) também auxilia na diminuição da deterioração pós-colheita em morangos armazenados. Dessa mesma forma, a canela cássia (*Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl), pertencente a família Lauraceae, tem 85% de aldeído cinâmico, 2% de cumarina, 2% de benzaldeído, 1% de álcool cinâmico e 1% de borneol que também possui atividade antifúngica nos seus extratos e pode inibir significativamente o crescimento de *B. cinerea* (Guerra et al., 2015).

### 3. OBJETIVO

Os presentes experimentos tiveram por objetivo geral estudar a eficácia da volatilização dos óleos essenciais de eucalipto citriodora (*Eucalyptus citriodora*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e canela cássia (*Cinnamomum cassia*) no controle de *Botrytis cinerea* e na qualidade de morangos.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Obtenção do patógeno**

O fungo *Botrytis cinerea* foi adquirido da micoteca do Instituto Biológico de São Paulo, número do acesso 14/11-29/01/18. Deste tubo original foram feitas repicagens para reproduzir o fungo, transferindo-os para placas de Petri, contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA – Difco™). Foram incubadas em câmara de crescimento ajustada à temperatura de  $20\pm 1$  °C e fotoperíodo de 12 horas, até o surgimento da estrutura reprodutiva do fungo, que ocorre, geralmente, após 4 dias.

### **4.2. Óleos essenciais**

Os óleos essenciais utilizados para a volatilização foram os óleos de eucalipto citriodora (*Eucalyptus citriodora*) que pertence a família Myrtaceae, alecrim (*Rosmarinus officinalis*), pertencente a família Lamiaceae, e canela cássia (*Cinnamomum cassia*), que pertence a família Lauraceae, adquiridos da Ferquima Indústria e Comércio Ltda.

### **4.3. Material vegetal**

Foram selecionados morangos sadios, procedente de produções comerciais de Coluci Frutas, localizada no sul de Minas Gerais, distante 400 km de Jaboticabal - SP. No Laboratório de Tecnologia de Pós-colheita da FCAV-UNESP, câmpus de Jaboticabal, os morangos foram novamente selecionados para melhor homogeneidade no tamanho e coloração e separados em lotes, correspondentes aos tratamentos.

#### **4.4. PRIMEIRA ETAPA: efeito de óleos essenciais aplicados por volatilização no controle *in vitro* de *Botrytis cinerea***

Inicialmente, preparou-se meio BDA conforme instruções do rótulo da embalagem. O meio de cultura foi vertido, em temperatura fundente e sob condições assépticas (câmara de fluxo laminar), em placas de Petri de 8 cm de diâmetro, esterilizadas. Após a solidificação do meio, foram transferidos discos de micélio do fungo de 6 mm de diâmetro, retirados da borda das colônias, para o centro das placas. Essas placas sem tampa foram colocadas em caixas plásticas de 46 L acopladas com mini ventilador do tipo 'cooler', seguido do óleo essencial, que foi aplicado em papel filtro, ficando homogeneamente distribuído para melhor volatilização do mesmo. As caixas foram imediatamente lacradas e os tratamentos consistiram na aplicação dos óleos, por volatilização, nas concentrações de 0 ppm (controle com água destilada); 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, por períodos de 1, 2, 3, 6 e 24 horas. Foram realizadas seis repetições por tratamento.

Após o período determinado, as placas foram tampadas, lacradas com parafilm M e armazenadas em câmara de crescimento a  $20 \pm 1$  °C e fotoperíodo de 12h.

O crescimento micelial do fungo, foi medido diariamente até que o micélio de um dos tratamentos atingisse a borda da placa. Para calcular a porcentagem de inibição do crescimento micelial, foi aplicada a equação de Edington et al. (1971):

$$I = \left[ \frac{(CFC - CFT)}{CFC} \right] \times 100$$

onde:  $I$  = porcentagem de inibição;  $CFC$  = crescimento do fungo no controle;  $CFT$  = crescimento do fungo no tratamento.

#### **4.5. SEGUNDA ETAPA: efeito de óleos essenciais aplicados por volatilização no controle *in vivo* de *Botrytis cinerea***

A suspensão de conídios de *Botrytis cinerea* foi obtida pela raspagem superficial das colônias (obtidas conforme procedimento descrito no item 4.1) em presença de água destilada e esterilizada, e Tween 80 a 0,01%. Após, foi feita a

filtragem em gaze esterilizada, obtendo-se, por meio de contagem em hemacitômetro, uma suspensão conidial do patógeno na concentração de  $2 \times 10^5$  conídios mL<sup>-1</sup>.

Os morangos foram inoculados por meio de um ferimento, na região equatorial, com o auxílio de uma seringa de cromatografia. O volume inoculado foi de 20 µL da suspensão conidial de *B. cinerea* ( $2 \times 10^5$  conídios mL<sup>-1</sup>), e em seguida armazenados por 24h a 20 °C, para estabelecimento do fungo. Após esse período, os frutos foram submetidos aos voláteis dos óleos essenciais de eucalipto citriodora, alecrim e canela cássia (conforme descrito no item 4.4), nas concentrações de 0 ppm (controle com água destilada); 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm pelos tempos de 1, 2, 3 e 6 horas, com base nos melhores resultados obtidos na etapa *in vitro*.

Após o período de exposição ao vapor dos óleos, os frutos foram armazenados a  $20 \pm 0,2$  °C, por quatro dias, e avaliados diariamente. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 4 x 4 (óleo essencial, concentração e tempo de volatilização) com 10 frutos por repetição.

A severidade da doença foi medida pelo tamanho da área da lesão no fruto. Essa medida foi feita através da segmentação manual de fotos desses frutos, ou seja, a área da lesão assim como o fruto foram selecionados manualmente e de posse dessas medidas foi possível calcular a severidade. Essas mensurações nas fotos foram feitas durante o período de 4 dias, com auxílio do software Paint.net versão 4.1.6.

A incidência da doença foi determinada de acordo com Xing et al. (2010) utilizando a seguinte equação:

$$\text{Incidência da doença (\%)} = \left( \frac{\text{Número de ferimentos infectados}}{\text{Número total de frutos inoculados}} \right) \times 100$$

#### **4.6. TERCEIRA ETAPA: efeito de óleos essenciais aplicados por volatilização na qualidade de morangos**

Nesse experimento, os frutos foram submetidos aos tratamentos de volatilização nas concentrações definidas na segunda etapa a partir dos melhores resultados obtidos no controle do fungo. Sendo assim, os tratamentos foram feitos

apenas com o óleo de alecrim, nas seguintes concentrações: controle (água destilada); 250 ppm por 3 h; 250 ppm por 6 h; 500 ppm por 1h.

Após a aplicação dos tratamentos, os frutos foram armazenados em bandeja de isopor num ambiente com temperatura monitorada a  $20\pm 2$  °C. Os frutos foram avaliados após 4 dias de armazenamento.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por 4 tratamentos (3 concentrações + controle). Foram feitas 3 repetições com 20 frutos cada.

As avaliações feitas nessa etapa foram:

A perda de massa fresca foi quantificada pesando os morangos em balança semi-analítica de 0,5 a 1000 g  $\pm$  0,01 g (Bel, modelo Mark L 1002, Brasil). A perda de massa foi calculada como sendo a diferença entre a massa inicial e a massa do produto em cada avaliação, dividida pela massa inicial. A perda acumulada de massa foi expressa em porcentagem.

A firmeza dos frutos foi medida utilizando-se penetrômetro digital com a faixa de leitura entre 5 e 200 Newton (N) (Impac, modelo IP-90DI, Brasil), com ponteira de 8 mm. Foi realizada 1 leitura por fruto na região equatorial, sendo os resultados expressos em Newtons/mm.

A coloração interna e externa dos frutos foi medida utilizando um colorímetro portátil (Minolta Corp, modelo CR-400, Japão) com iluminante padrão D65, um ângulo observador de 0° e calibrado com uma cor padrão (branco), usando o sistema CIELab. Foram avaliadas a luminosidade ( $L^*$ ; 0=preto, 100=branco), a cromaticidade ( $C^*$ ) e o ângulo Hue ( $h_o$ ). Uma leitura por fruto foi feita na região equatorial. (Minolta, 2007).

O conteúdo de acidez titulável (AT) foi determinado conforme metodologia descrita por Ryan e Dupont (1973) por meio de titulação, sendo 1 g das amostras em 50 mL de água destilada, com solução de NaOH 0,1 N até o pH=8,1. Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico.

Os teores de sólidos solúveis (SS) foram determinados após o processamento do fruto, com auxílio de gaze para leitura em um refratômetro manual digital (Atago

Palette, modelo PR-101, USA). Os resultados foram expressos em porcentagem (Zenebon et al., 2008).

O teor de ácido ascórbico (AA) foi determinado mediante análise de 1 g do extrato celular diluído em 50 mL de ácido oxálico, utilizando o reativo de Tillmans, conforme método descrito por Zenebon et al. (2008). Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico  $100 \text{ g}^{-1}$  MF.

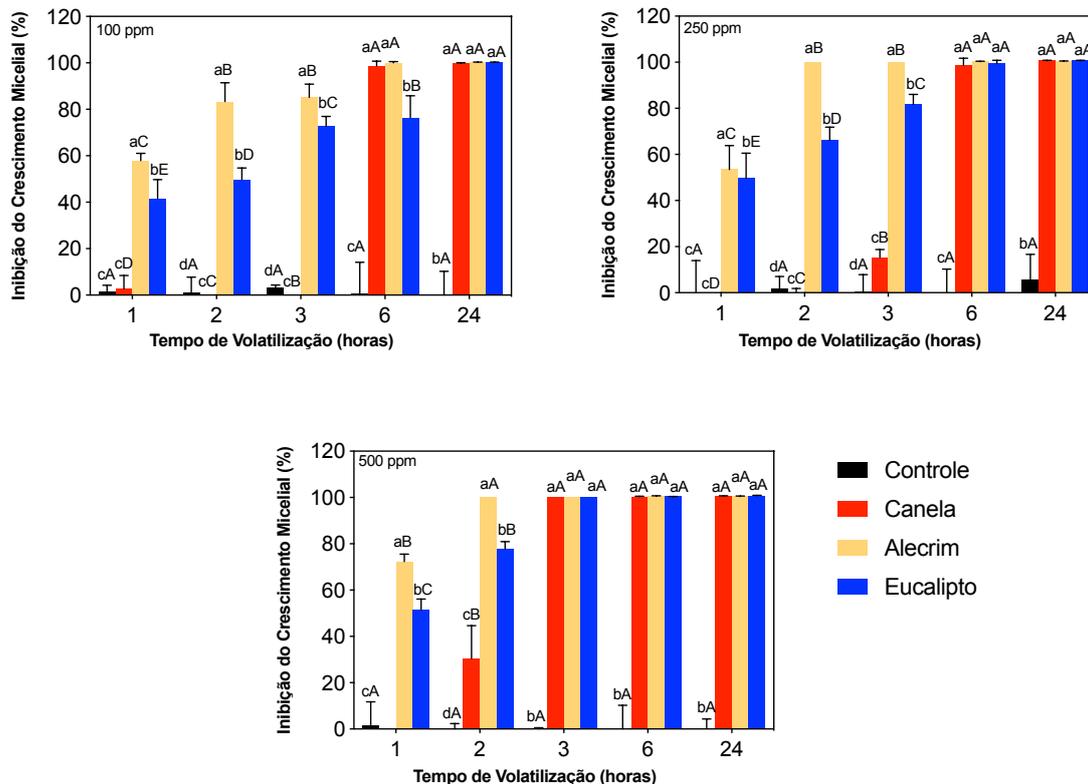
#### **4.7. Análise dos resultados**

Os dados 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 ( $P \leq 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Efeito da volatilização de óleos essenciais no crescimento micelial de *Botrytis cinerea*

Pode-se observar na Figura 2 o efeito do tempo de exposição à volatilização e das concentrações dos óleos essenciais de canela (barra vermelha), alecrim (barra amarela) e eucalipto (barra azul) na inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea in vitro*. Nota-se que na concentração de 500 ppm, a partir de 3h de volatilização, os 3 óleos inibiram o crescimento do fungo em 100%. Efeito semelhante pode ser observado a partir do período de 6h de volatilização na concentração de 250 ppm, demonstrando que os óleos essenciais de canela, alecrim e eucalipto podem inibir ou retardar o crescimento do patógeno.



**Figura 2.** Efeito inibitório da volatilização de óleos essenciais no crescimento micelial *in vitro* de *Botrytis cinerea* após 7 dias a 20 °C. Médias  $\pm$  erro padrão com letras minúsculas iguais dentro do grupo e maiúsculas entre os grupos não diferem entre si, pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ) ( $n=6$ ).

Borges et al. (2013), encontraram resultados semelhantes de inibição de crescimento micelial de *B. cinerea in vitro* utilizando óleo essencial de sálvia em conjunto com goma xantana, e o efeito observado foi explicado devido a formação de uma barreira à perda de massa e ao oxigênio, inibindo desta forma o crescimento de fungos.

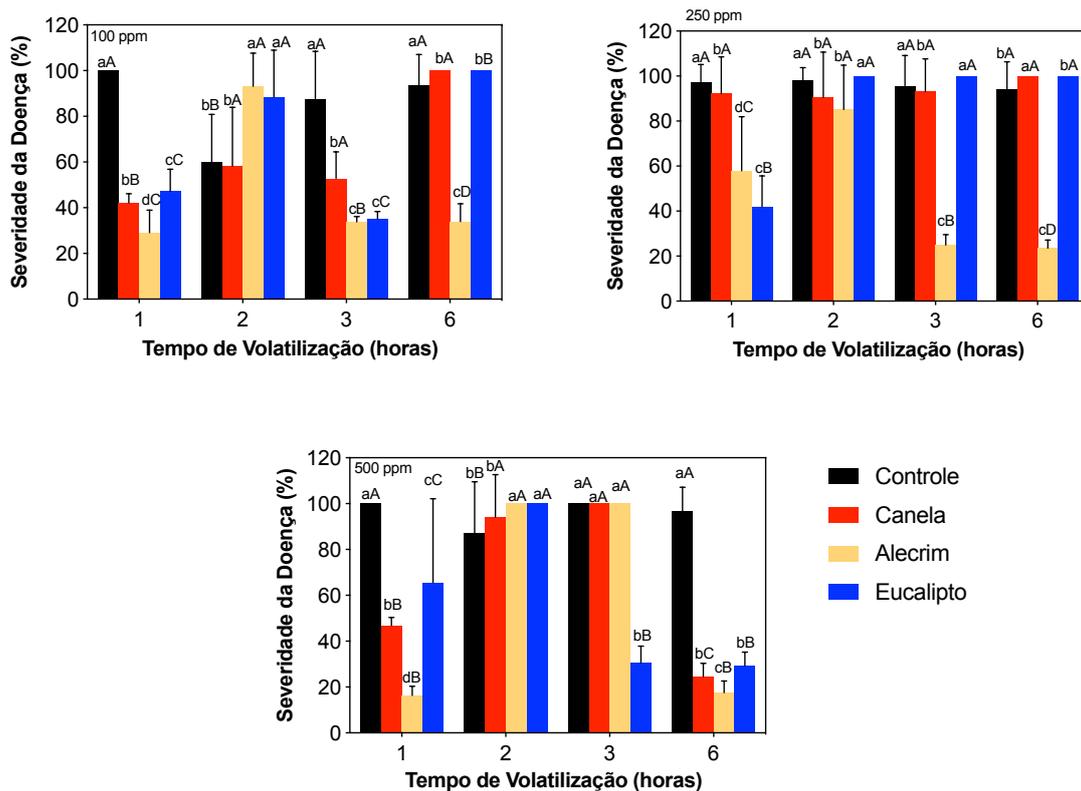
Da mesma forma, Lorenzetti et al. (2011) verificaram que o óleo essencial de canela e de capim limão são óleos com efeito fungicida eficiente no controle do mofo cinzento do morangueiro, devido aos componentes majoritários de suas constituições.

Neste sentido, Zeidman (2008) afirma que a vantagem dos óleos essenciais é sua bioatividade na fase de vapor, tornando-as úteis como possíveis fumigantes para a proteção de produtos armazenados. Além disso, as fases voláteis dos óleos essenciais foram consideradas mais tóxicas, para o patógeno, e eficazes do que a fase de contato.

Sendo assim, a volatilização de óleos essenciais de canela cássia (*Cinnamomum cassia*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) nas concentrações a partir de 100 ppm com tempo de volatilização a partir de 6h inibiram 100% o crescimento micelial de *B. cinerea*. Os tempos menores (1h, 2h e 3h) de exposição a volatilização retardaram o crescimento micelial de *B. cinerea* para a volatilização dos 3 óleos.

## **5.2. Efeito da volatilização de óleos essenciais em morangos inoculados com *Botrytis cinerea***

A severidade dos danos causados pelo mofo cinzento foi menor nos morangos tratados com óleo essencial de alecrim a partir de 3h de exposição à volatilização nas concentrações de 100 e 250 ppm (Figuras 3).



**Figura 3.** Efeito da volatilização dos óleos essenciais na severidade do mofo cinzento em morangos inoculados com *Botrytis cinerea* e armazenados a 20 °C por 4 dias. Médias  $\pm$  erro padrão com letras minúsculas iguais dentro do grupo e maiúsculas entre os grupos não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) ( $n = 10$ ).

Efeito semelhante foi observado nos outros dois óleos (canela e eucalipto) na concentração de 500 ppm submetido por 6 horas à volatilização. Também foi possível observar efeito parecido para o óleo de alecrim volatilizado por 1 hora na concentração de 100 ppm. Ainda podemos verificar efeito semelhante para o óleo de eucalipto volatilizado por 1 hora na concentração de 100 ppm e 250 ppm e ainda por 3 horas na concentração de 100 ppm.

Em contrapartida, trabalhos que utilizaram óleo essencial diretamente em contato com o fruto, por infusão, obtiveram resultados mais satisfatórios com relação a severidade da doença, reduzindo em praticamente 100% (Cuzzi, 2013).

Não foi observado efeito significativo do controle do patógeno *in vivo* com o aumento das concentrações dos tratamentos, como o relatado nos testes *in vitro*. Tal fato pode ter ocorrido devido aos óleos não terem contato direto com os pseudofrutos

e, portanto, não formarem uma barreira que dificultasse a penetração dos conídios do fungo nos tecidos do hospedeiro, e conseqüentemente, não retarde o processo infeccioso nos morangos.

A tendência de redução da severidade da doença à medida que se aumenta a concentração e o tempo de exposição aos voláteis, sinaliza a necessidade da utilização de concentrações maiores dos óleos essenciais, porém com esse método de volatilização e a delicadeza do morango, um aspecto visual de cozimento pode ser encontrado.

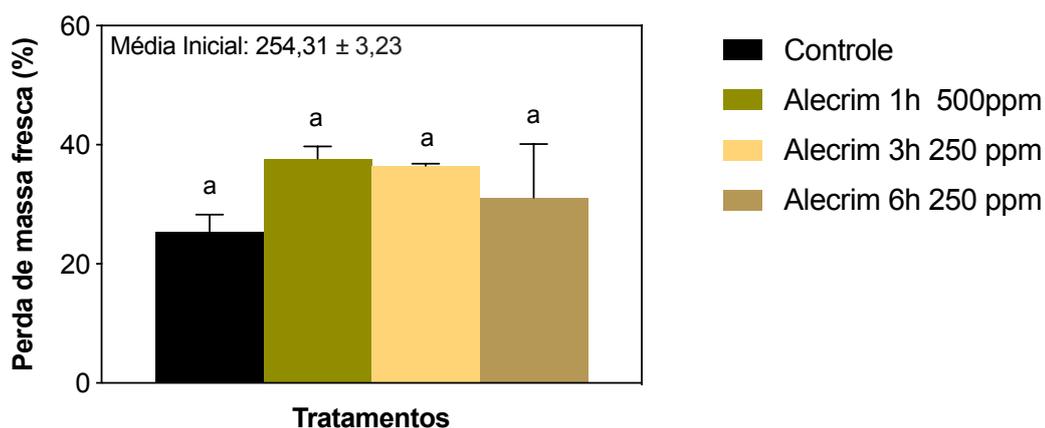
Os dados de incidência da doença não foram contemplados nesse trabalho uma vez que devido a fragilidade do morango e a necessidade de inoculação do fungo nos mesmos para aplicação dos tratamentos, todos os frutos apresentaram incidência da doença.

### **5.3. Efeito da volatilização de óleos essenciais na qualidade de morangos**

#### **5.3.1. Evolução da perda de massa fresca**

Nota-se que não teve diferença significativa na perda de massa fresca dos frutos tratados quando comparados com os frutos do controle (Figura 4). Essa ineficiência em reduzir a perda de água pode ser explicada pelo morango não possuir uma proteção espessa e o mesmo estar acondicionado em um ambiente com baixa umidade relativa e temperatura de ambiente, ou seja, não sob refrigeração.

A velocidade com que um vegetal perde água (massa) é controlada principalmente pela diferença entre a pressão de vapor do ar úmido nos espaços intercelulares do tecido vegetal e do ar que o circunda (Kader, 2002).



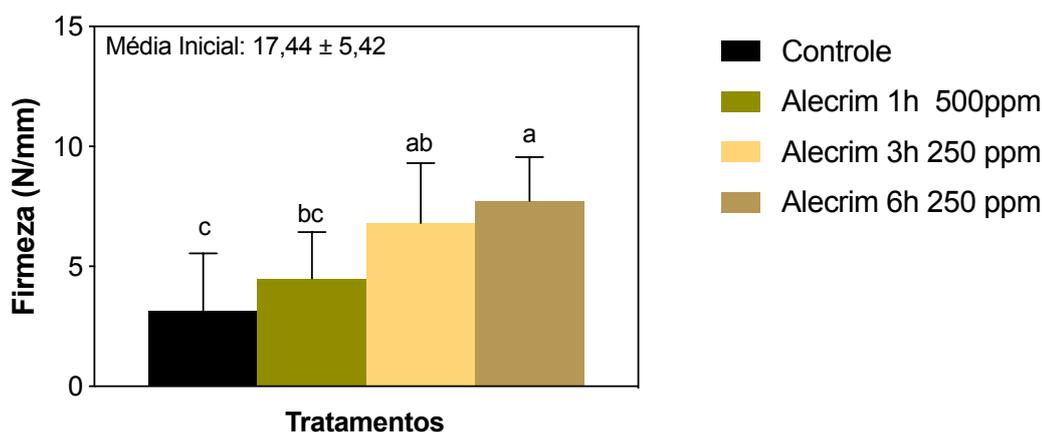
**Figura 4.** Efeito da volatilização do óleo essencial de alecrim na perda de massa fresca de morangos armazenados a 20 °C por 4 dias. Médias  $\pm$  erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) ( $n = 20$ ).

Manenoi et al. (2007) afirmam que o óleo de canela e o óleo de alecrim apresentam-se como fortes inibidores de *B. cinerea*, uma vez que suprimiram completamente o crescimento micelial do fungo a 15  $\mu\text{L}$  (MIQ = 15  $\mu\text{L}$ ). Contudo, os vapores do óleo de eucalipto exibiram efeito inibitório mais fraco (MIQ = 25  $\mu\text{L}$ ). O óleo de alecrim, segundo os mesmos autores em seu estudo, possui menor atividade antifúngica contra *B. cinerea*, uma vez que permite apenas o crescimento mínimo dos fungos a 10  $\mu\text{L}$  e o crescimento a 5  $\mu\text{L}$ /dose, no período de 6 horas. Lee et al. (2007) testaram o óleo de eucalipto como fumigante contra *B. cinerea*, mas, em contraste com este estudo, seus resultados foram negativos. Isso pode ser porque Lee et al. (2007) aplicaram apenas 1  $\mu\text{L}$  de óleo para cada tratamento, menor que o nível de MIQ encontrado neste estudo.

Embora o óleo de canela tenha menor atividade antifúngica, seus óleos essenciais podem ser usados em misturas para melhorar sua eficácia. Pereira et al. (2009) mostraram anteriormente que a mistura de óleo de cravo e canela em proporções apropriadas resultam em uma melhoria da eficácia contra os fungos encontrados em mamão.

### 5.3.2. Firmeza

A firmeza dos frutos foi reduzida ao final dos 4 dias de armazenamento, sendo que os morangos tratados com o óleo essencial de Alecrim, nos respectivos tempos e concentrações de 6h 250 ppm e 3h 250 ppm, apresentaram valores maiores de firmeza quando comparados aos demais tratamentos (Figura 5).



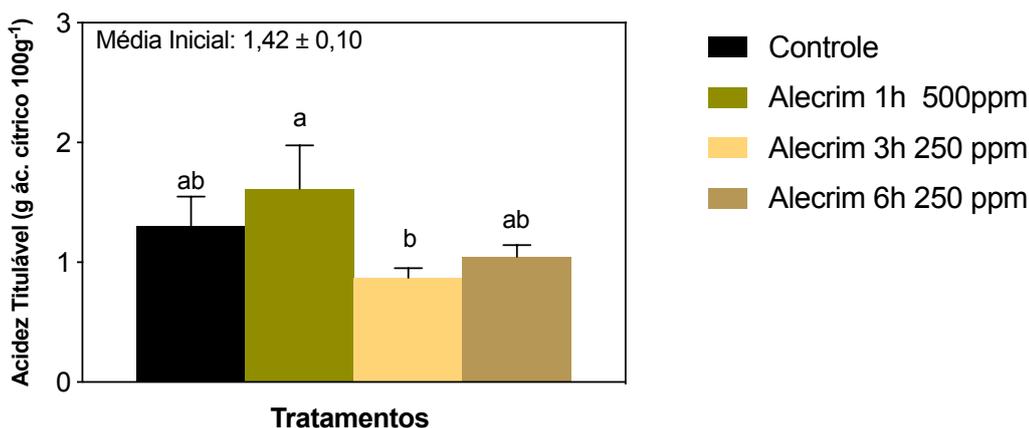
**Figura 5.** Efeito da volatilização do óleo essencial de alecrim na firmeza de morangos armazenados a 20 °C por 4 dias. Médias  $\pm$  erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) ( $n=20$ ).

A firmeza está relacionada à vida útil dos frutos e, portanto, é um atributo muito importante da qualidade. O amaciamento dos tecidos das frutas é devido a ação de diversas enzimas responsáveis pela degradação e solubilização de pectinas, e por modificações da composição da parede celular, ou seja, durante a maturação ocorre um incremento de enzimas, principalmente a poligalacturonase, a pectinase e a celulase, que degradam os principais constituintes da parede celular, como a transformação de protopectinas em pectinas solúveis (Cuzzi, 2013; Toivonen e Brummell, 2008).

Os óleos essenciais compreendem um grande número de componentes e seus modos de ações envolvem vários alvos no patógeno (Paviani et al., 2006). Algumas pesquisas sugeriram que a hidrofobicidade dos óleos essenciais lhes permitia particionar os lipídios da membrana celular dos patógenos, tornando-os permeáveis e levando ao extravasamento do conteúdo das células (Burt 2004; Paul et al. 2011) e interferindo em muitos fatores biológicos (Paviani et al., 2006).

### 5.3.3. Teor de acidez titulável (AT)

O teor de acidez titulável dos frutos foi numericamente maior no tratamento com óleo essencial de Alecrim exposto à volatilização por 1h e 500 ppm, diferindo estatisticamente do tratado por 3h a 250 ppm. (Figura 6).



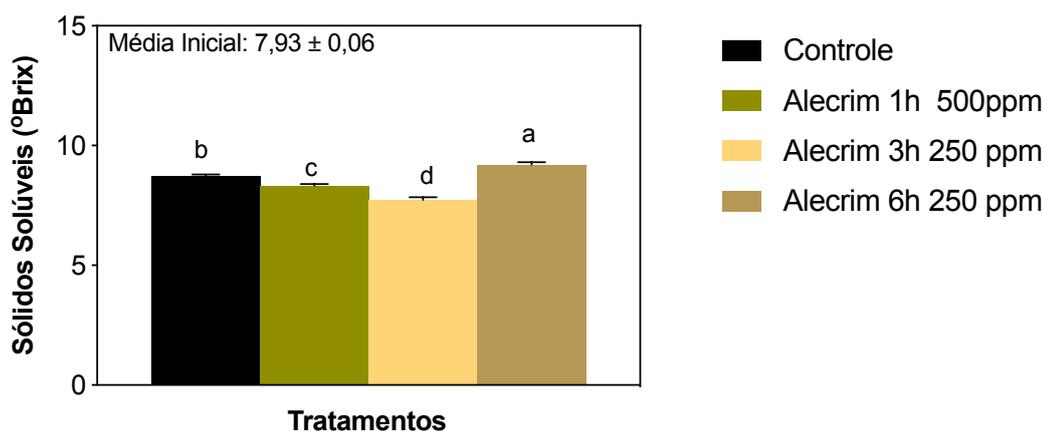
**Figura 6.** Efeito da volatilização do óleo essencial de alecrim no teor da acidez titulável de morangos armazenados a 20 °C por 4 dias. Médias ± erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) ( $n = 20$ ).

A redução da acidez durante a pós-colheita está relacionada com o amadurecimento e/ou a senescência devido ao maior consumo dos ácidos orgânicos no metabolismo dos frutos no processo respiratório devido a conversão de ácidos em açúcares na glicogênese.

É possível que os óleos essenciais não tenham exercido efeito tão satisfatório sobre a acidez titulável devido ao comportamento não climatérico do morango, associado à temperatura de armazenamento, o que fez com que o metabolismo dos frutos tenha sido lento, dificultando a observação do efeito dos óleos.

### 5.3.4. Teor de sólidos solúveis (SS)

Os teores de SS dos morangos aumentaram com o período de armazenamento, como consequência da senescência dos mesmos. (Figura 7).



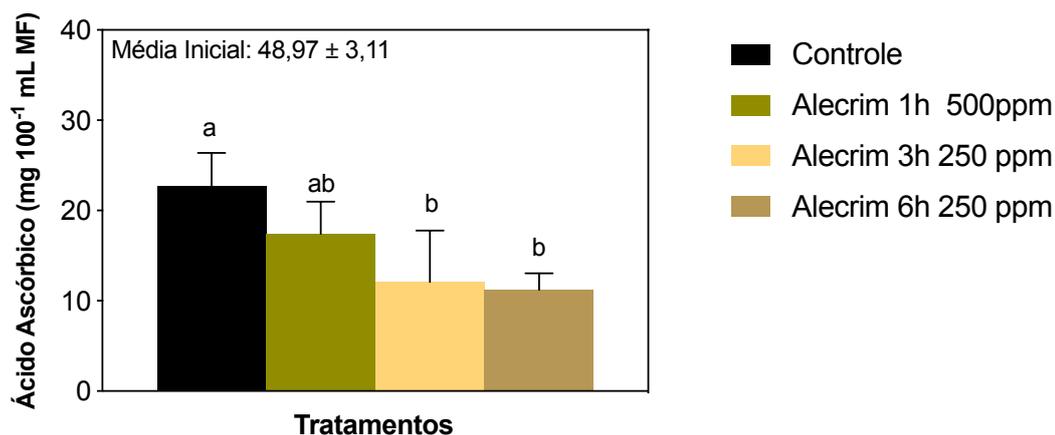
**Figura 7.** Efeito da volatilização do óleo essencial de alecrim nos teores de sólidos solúveis de morangos armazenados a 20 °C por 4 dias. Médias  $\pm$  erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) ( $n=20$ ).

A variação no teor de sólidos solúveis entre os tratamentos pode ser explicada devido ao fato de que os morangos não são frutos climatéricos e os resultados vão de encontro com os de acidez titulável, os quais foram utilizados durante o processo respiratório (Vieites et al., 2006).

Os sólidos solúveis são substâncias dissolvidas por um solvente, formados principalmente por açúcares, onde a maturação dos frutos gera uma tendência no aumento dos mesmos (Chitarra e Chitarra, 2006), devido à degradação de polissacarídeos (Mangnabosco et al., 2008).

### 5.3.5. Teor de ácido ascórbico (AA)

É possível que o AA tenha sido consumido em reações metabólicas no processo de senescência dos morangos dos tratamentos de 3h 250 ppm e 6h 250 ppm quando comparados com os do controle e por isso ocorreu a redução dos valores de acordo com os tratamentos com os óleos essenciais (Figura 8).



**Figura 8.** Efeito da volatilização do óleo essencial de alecrim no teor de ácido ascórbico de morangos armazenados a 20 °C por 4 dias. Médias  $\pm$  erro padrão com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) ( $n=20$ ).

Segundo Chitarra e Chitarra (2005), o conteúdo de ácido ascórbico tende a diminuir com a maturação e com o armazenamento. Essa redução no teor de ácido ascórbico é esperada durante o período de armazenamento, devido à elevada atividade da enzima ácido ascórbico oxidase, que atua na oxidação do ácido ascórbico a ácido L-ascórbico (forma principal e biologicamente ativa da vitamina C), de forma irreversível. E que este, por ser extremamente termolábil, é rapidamente hidrolisado ao ácido 2,3-diceto-L-gulônico, por meio de uma abertura no anel da lactona, perdendo a atividade vitamínica (Dantas et al., 2017).

Seu metabolismo está associado com a defesa ao estresse oxidativo, portanto quanto maior o estresse, menor será a concentração de ácido ascórbico no vegetal (Tsaniklidis et al., 2014). Esse ácido é um composto antioxidante que tem importante papel na supressão dos radicais livres (Gill e Tujela, 2010; Kaur et al., 2013), com capacidade de doar elétrons a ampla gama de reações enzimáticas e não enzimáticas (Das e Roychoudhury, 2014).

### 5.3.6. Coloração

Para a luminosidade externa dos frutos, aqueles tratados com Alecrim 3h 250 ppm diferiram do tratamento Alecrim 1h 500 ppm, apresentando valores maiores (Tabela 1).

Já para a luminosidade interna, não houve diferença significativa entre os frutos do controle com aqueles dos tratamentos com óleos essenciais volatilizados (Tabela 1).

**Tabela 1.** Efeito da volatilização do óleo essencial de alecrim na luminosidade, ângulo Hue e cromaticidade interna e externa de morangos armazenados a 20 °C por 4 dias.

Tratamentos	Luminosidade	Cromaticidade	Ângulo Hue
----- Externa -----			
Controle	33,850 ab	40,586 a	30,603 c
Alecrim 1h 500 ppm	32,590 b	29,455 c	34,954 a
Alecrim 3h 250 ppm	35,995 a	33,060 b	32,191 b
Alecrim 6h 250 ppm	34,032 ab	31,118 b	30,846 c
F	**	**	**
CV	10,080	14,485	20,560
----- Interna -----			
Controle	45,648 a	39,327 a	43,983 b
Alecrim 1h 500 ppm	44,384 a	25,088 b	46,518 a
Alecrim 3h 250 ppm	48,178 a	24,349 b	42,813 c
Alecrim 6h 250 ppm	44,226 a	24,897 b	43,369 b
F	NS	**	**
CV	17,101	31,763	18,04

Médias seguidas de mesma letra, em cada variável, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). NS, \*\*, \*. Não significativo e significativo a 1% e 5%, respectivamente.

Os frutos dos tratamentos com óleo essencial apresentaram as menores médias em relação ao controle para a cromaticidade, tanto interna quanto externa (Tabela 1). Isso significa que os morangos do controle estavam menos escuros, provavelmente por estes já terem iniciado o processo de senescência.

O ângulo Hue externo dos morangos mantiveram os maiores valores nos frutos dos tratamentos de 1h e 3h, sugerindo para esses tratamentos melhor manutenção da cor (Tabela 1).

Os valores de cromaticidade semelhantes na parte interna dos morangos tratados mostraram que não houve escurecimento acentuado dos frutos, enquanto

os valores do ângulo Hue, ou seja, a intensidade da cor, indicaram que a cor vermelha dos frutos não se manteve a mesma em relação ao início do experimento.

A volatilização do óleo essencial de alecrim pode ter influenciado na manutenção da cor dos morangos do mesmo modo que o *Botrytis cinerea* também pode ter afetado. A manutenção da cor durante o armazenamento dos morangos é um atributo desejado entre as características de qualidade, já que o escurecimento excessivo compromete o aspecto visual dos frutos e, portanto, a aceitação pelo consumidor.

## 6. CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de canela cássia, alecrim e eucalipto, aplicados por volatilização no *Botrytis cinerea in vitro*, possuem efeito fungicida e foram eficientes no controle do mesmo, nas concentrações a partir de 100 ppm e 6h de volatilização.

A redução da severidade da doença causada pelo mofo cinzento pode ser observada nos frutos de morango quando tratados com volatilização de óleos essenciais de canela cássia, alecrim e eucalipto citriodora, porém a manutenção da qualidade dos mesmos pode ser comprometida devido ao morango não ficar com textura e aspecto visual comercial.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Testes para determinação do tempo e concentração a serem usados nos experimentos foram realizados preliminarmente.

Os resultados obtidos no experimento *in vitro* foram totalmente satisfatórios, sendo possível um controle total do *B. cinerea*, com concentrações e tempos de volatilização relativamente baixos.

Já no experimento *in vivo*, apesar da severidade da doença ter sido reduzida, a volatilização dos óleos essenciais sobre o morango causou um aspecto de “cozido” nos mesmos, isso afetou tanto as características físicas quanto as físico-químicas, inviabilizando assim a comercialização e consumo.

## 8. REFERÊNCIAS

Borges, Caroline Dellinghausen; Mendonça, Carla Rosane Barboza; Zambiasi, Rui Carlos; Nogueira, Daiane; Pinto, Evelize Maia; Paiva, Flávia Fernandes. Conservação de morangos com revestimentos à base de goma xantana e óleo essencial de sálvia. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, ed. 5, p. 1071-1083, 2013.

Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**. v. 94, n. 03, p. 223-253, 2004.

Caires, Nilmara Pereira. Processo infeccioso de *Botrytis cinerea* em folhas de eucalipto. **Tese** (Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 2013.

Cardozo, Ludmila; Mafra, Denise. Alimentação Pode Levar a Benefícios para o Sistema Cardiovascular: Fato ou Ficção?. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 28, n. 2, p. 87-88, 2015.

Chitarra, M. I. F.; Chitarra, A. B. Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2005.783p.

Chitarra, M. I. F.; Chitarra, A. B. Pós-colheita de frutas e hortaliças: glossário. Lavras: UFLA, p.256, 2006.

Chitarra, M.I.F.; Chitarra, A. B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: ESAL: FAEPE, 1990. 320p.

Costa, Lúcio Bertoldo. Efeito da radiação UV-B na interação *Botrytis cinerea* – *Clonostachys rosea* em morangueiro e do ácido 4-aminobenzóico no controle do patógeno em tabaco. **Tese** (Agronomia (Proteção de Plantas) - UNESP - FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS, 2014.

Cuzzi, Claucia. Extratos de canola no controle de *Botrytis cinerea in vitro* e do mofo cinzento em pós-colheita de morangos. **Dissertação** (Produção Vegetal) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013.

Da Cruz Cabral, L.; Fernández, V. P.; Patriarca A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. **International Journal of Food Microbiology**. 166 1–14. 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.026, 2013.

Dantas, E.S.; Rebouças, T.N.H.; Luz, J.M.Q.; Amaral, C.L.F. Frutos de cultivares de morangueiros submetidos ao 1-MCP. **Scientia Plena**, v. 13, ed. 9, 2017.

Das K, Roychoudhury A (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Environmental Science**, 2:53. Doi: 10.3389/fenvs.2014.00053

Edington, L.V.; Khen, K.L.; Barron, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v.61, p.42-44, 1971.

El Asbahani, A.; Miladi, K.; Badri, W.; Sala, M.; Aït Addi, E.H.; Casabianca, H.; El Mousadik, A.; Hartmann, D.; Jilale, A.; Renaud, F.N.; Elaissari, A. Essential oils: from extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**. 483 220–243. 10.1016/j.ijpharm.2014.12.069, 2015.

Elshafie, H. S.; Mancini, E.; Camele, I.; De Martino, L.; De Feo, V. *In vivo* antifungal activity of two essential oils from Mediterranean plants against postharvest brown rot disease of peach fruit. **Industrial Crops and Products**. 66 11–15. 10.1016/j.indcrop.2014.12.031, 2015.

FAO STAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSTAT Database**. Rome, Italy: FAO, 2018.

Galegário, F. F.; Amaro, M.; Weihmann, C. R.; Sanhueza, R. M. V.; freire, J. M.; Amarante, C. V. T.; Dos Santos, H. P.; Bender, R. J.; Palombini, M. C.; Protas, J. F. S.; Coutinho, E. F. Colheita e pós-colheita. In: **Sistema de Produção de Morango para Mesa na Região da Serra Gaúcha e Encosta Superior do Nordeste**. 2005. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MesaSerraGaucha/colheita.htm>>. Acesso em: 21 out. 2019.

Garrido, C.; Carbú M.; Fernández-Acero, F. J.; González-Rodríguez, V. E.; Cantoral, J. M. New insights in the study of strawberry fungal pathogens. In: **Genomics, Transgenics, Molecular Breeding and Biotechnology of Strawberry**, Vol. 5. (Husaini, A.M. and Mercado, J.A., eds), pp. 24–39. Genes, Genomes and Genomics. Japan: Global Science Books, Miki cho, 2011.

Giampieri, F.; Forbes-Hernandez, T.Y.; Gasparrini, M.; Alvarez-Suarez, J.M.; Afrin, S.; Bompadre, S.; Quiles, J.L.; Mezzetti, B.; Battino, M. Strawberry as a Health Promoter: An Evidence Based Review. **Food & Function**. 6(5), 1386– 1398, 2015.

Gill SS, Tujela N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, New York, v.48, p.909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>

Gonçalves, Emerson Dias; Pimentel, Rodrigo Meirelles de Azevedo; Lima, Luis Carlos de Oliveira; Castricini, Ariane; Zambon, Carolina Ruiz; Antunes, Luís Eduardo Corrêa; Trevisan, Renato. Pequenas frutas: tecnologias de produção. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 33, ed. 268, p. 89-95, 2012.

Guerra, I.C.D.; de Oliveira, P.D.L.; de Souza Pontes, A.L.; Lúcio, A.S.S.C.; Tavares, J.F.; Barbosa-Filho, J.M.; Madruga, M.S.; de Souza, E.L. Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha × villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. **International Journal of Food Microbiology**. 214 168–178. [10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.009](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.009), 2015.

Hollender, C.A.; Geretz, A.C.; Slovin, J.P.; Liu, Z. Flower and early fruit development in a diploid strawberry, *Fragaria vesca*. **Planta**, 235(6), 1123–1139, 2012.

Kader AA. Postharvest biology and technology: na overview. In. **Postharvest technology of horticultural crops**. 2002. 3. ed. Davis: University of California, 4;39-47.

Kaur C, Walia S, Nagal S, Walia S, Singh J, Singh BB, Saha S, Singh B, Kalia P, Jaggi S, Sarika (2013) Functional quality and antioxidant composition of selected tomato (*Solanum lycopersicon* L) cultivars grown in Northern India. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, 50, 139-145. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.06.013>

Lazar, E. E.; Jobling, J. J.; Benkeblia, N. Postharvest disease management of horticultural produce using essential oils: today's prospects. **Stewart Postharvest Rev.** 6 1–9. 10.2212/spr.2010.3.15, 2010.

Lee, S.O., Choi, G.J., Jang, K.S. Lim, H. K., Cho, K.Y., Kim, J.C. (2007). Atividade antifúngica de cinco óleos essenciais de plantas como fumigante contra fungos patogênicos pós-colheita e doenças transmitidas pelo solo. **Plant Pathology Journal**, vol. 23 (2), pp. 97-102.

Lorenzetti, E.R.; Monteiro, F.P.; Souza, P.E.; Souza, R.J.; Scalice, H.K.; Diogo Jr, R.; Pires, M.S.O. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, p. 619-627, 2011.

Manenoi A, Bayogan ERV, Thumdee S, Paull RE (2007) Utility of 1-methylcyclopropene as a papaya postharvest treatment. **Postharvest Biology and Technology**. 44:55-62

Mangnabosco, M. C.; Godoy, W. I.; Mazzaro, S.; Citadin, I. Farinacio, D.; Borsatti, F.; Borsatti, Flávia. Avaliação das características químicas de seis cultivares de morangueiro na região Sudoeste do Paraná. **Horticultura Brasileira**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 5456 - 5461, 2008.

Mehra, L. K.; MacLean, D. D.; Shewfelt, R. L.; Smith, K. C.; Scherm, H. Effect of postharvest biofumigation on fungal decay, sensory quality, and antioxidant levels of blueberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**. 85 109–115. 10.1016/j.postharvbio.2013.05.007, 2013.

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

Mitcham, E. J.; Crisosto, C. H.; Kader, A. A. Strawberry: recommendations for maintaining postharvest quality. Davis: **UCDavis Postharvest Technology**, 2003. 3 p. Disponível em: <<http://postharvest.ucdavis.edu/PFfruits/Strawberry>>. Acesso em: 17 fev. 2020.

Muniz, A. C. C.; Marques, K. M.; Galati, V. C.; Pereira, F. D.; Mattiuz, B. H.; Glória, E. M.; Mattiuz, C. F. M. Evaluation of essential oil on the growth in vitro and in vivo of anthracnose in 'Hass' avocados. **Acta Horticulturae**. 2016. 10.17660/ActaHortic.2016.1120.31

Oliveira, R. P.; Scivittaro, W. B. Produção de frutos de morango em função de diferentes períodos de vernalização das mudas. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 91 - 95, 2009.

Paviani, L.; Pergher, S. B. C.; Dariva, C. Aplicação de peneiras moleculares no fracionamento do óleo de capim-limão da extração a alta pressão de dióxido de carbono. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, São Paulo, v. 23, p. 219-225, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-66322006000200009>

Pereira, T.; De Almeida, P. S. G.; De Azevedo, I. G.; Da Cunha, M.; De Oliveira, J. G.; Da Silva, M. G.; Vargas, H. Difusão de gás em mamão 'Golden' em diferentes estádios de maturidade. **Biologia e Tecnologia Pós-colheita, Amsterdã**, v. 54, n. 3, p. 123-130, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.07.010>

Prabuseenivasan, S.; Jayakumar, M.; Ignacimuthu, S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 6:39 10.1186/1472-6882-6-39, 2006.

Ryan, J.J., Dupont, J.A. (1973) Identification and Analysis of the Major Acids from Fruit Juices and Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 21: 45–49.

Shao, X., Cao, B., Xu, F., Xie, S., Yu, D., Wang, H. Effect of postharvest application of chitosan combined with clove oil against citrus green mold. **Postharvest Biology and Technology**. 99 37–43. 10.1016/j.postharvbio.2014.07.014, 2015

Shao, X., Cheng, S., Wang, H., Yu, D., Mungai, C. The possible mechanism of antifungal action of tea tree oil on *Botrytis cinerea*. **Journal Applied Microbiology**. 114 1642–1649. 10.1111/jam.12193, 2013.

Simões, C. M. O.; Spitzer, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000. cap.18.

Sukorini, H., Sangchote, S., Khewkhomc, N. Control of postharvest green mold of citrus fruit with yeasts, medicinal plants, and their combination. **Postharvest Biology and Technology**. 79 24–31. 10.1016/j.postharvbio.2013.01.001, 2013.

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.

Tsaniklidis G, Delis C, Nikoloudakis N, Katinakis P, Aivalakis G (2014) Low temperature storage affects the ascorbic acid metabolism of cherry tomato fruits. **Plant physiology and biochemistry**, 84, 149-157.

Tzortzakis, N. G.; Economakis, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. 8 253–258. 10.1016/j.ifset.2007.01.002, 2007.

USDA. Non citrus Fruits and Nuts 2016 Summary, 2016.

Vieites RL, Evangelista RM, Silva CS, Martins ML. Conservação do morango armazenado em atmosfera modificada. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina. 2006 Abr;27(2):243-252.

Xiang, F.Y., Han, Y.C., Zeng, X.G., Gu, Y.C., Chen, F.Y. The development situation and prospect of strawberry industry in western Hubei mountain districts. **Hubei Agricultural Sciences**. 2015;54:5930.

Xing, J., Watkins, W.S., Shlien, A., Walker, E., Huff, C.D., Witherspoon, D.J., Zhang, Y., Simonson, T.S., Weiss, R.B., Schiffman, J.D., Malkin, D., Woodward, S.R., Jorde, L.B. Toward a more Uniform Sampling of Human Genetic Diversity: A Survey of Worldwide Populations by High-density Genotyping. **Genomics**. 96. 199-210. 10.1016/j.ygeno.2010.07.004, 2010.