



**QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE MORANGOS
ORGÂNICOS TRATADOS COM ÓLEOS
ESSENCIAIS NA PRÉ-COLHEITA**

**LAVRAS – MG
2012**

DANIELA OLIVEIRA BRAGA

**QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE MORANGOS ORGÂNICOS
TRATADOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS NA PRÉ-COLHEITA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Eduardo Valério de Barros Vilas Boas

Coorientadores

Dr. Francisco Vilela Resende

Dra. Neide Botrel

**LAVRAS - MG
2012**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Braga, Daniela Oliveira.

Qualidade pós-colheita de morangos orgânicos tratados com
óleos essenciais na pré-colheita / Daniela Oliveira Braga. – Lavras :
UFLA, 2012.

74 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Eduardo Valério de Barros Vilas Boas.

Bibliografia.

1. Controle alternativo. 2. *In vivo*. 3. *In vitro*. 4. Conservação. 5.
Botrytis cinerea. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.8047568

DANIELA OLIVEIRA BRAGA

**QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE MORANGOS ORGÂNICOS
TRATADOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS NA PRÉ-COLHEITA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2012

Dra. Neide Botrel EMBRAPA/DF

Dra. Heloisa Helena de Siqueira UFLA

Dr. Eduardo Valério de Barros Vilas Boas

Orientador

**LAVRAS - MG
2012**

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Eduardo Valério de Barros Vilas Boas, pela oportunidade, orientação, confiança, paciência e dedicação.

A Dra. Ângela Pimenta do MAPA pela oportunidade e confiança.

Ao Dr. Francisco Vilela Resende e a Dra. Neide Botrel pelo espaço cedido a mim no campo e nos laboratórios da Embrapa Hortaliças.

Aos grandes amigos Abiah, Nayane, Cristiane, Luciane Rozwalka e Paulo Siriano, por dividirem comigo muitos momentos.

A todos os professores do DCA e de outros departamentos da UFLA que auxiliaram neste trabalho e acrescentaram mais conhecimento nessa longa jornada.

À UFLA e à EMBRAPA Hortaliças, por me permitirem realizar este trabalho.

E a todos que participaram desta fase!

Muito obrigada!

RESUMO

As perdas pós-colheita iniciam no campo e ocorrem em todos os pontos, da comercialização até o consumo. Portanto, a qualidade da fruta ou hortaliça está relacionada a fatores envolvidos nas fases pré-colheita e pós-colheita, ou seja, na cadeia produtiva. Os morangos são frutos muito perecíveis, portanto as perdas pós-colheita podem alcançar níveis importantes, caso não sejam utilizadas técnicas corretas de colheita e pós-colheita. Um dos principais problemas na cultura do morango é a incidência de doenças. Morangos têm uma vida útil pós-colheita muito curta, devido em parte, ao mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea*. A infecção pode ocorrer na flor, permanecer em repouso até o pseudofruto amadurecer e, em seguida, desenvolver, causando deterioração do mesmo, acompanhada de esporulação abundante do patógeno. *Botrytis sp.* infecta muitas plantas hospedeiras em todas as áreas climáticas do mundo, principalmente partes de plantas superiores em fases pré e pós-colheita. Bulbos, sementes e outros materiais de propagação também sofrem de infecção. A infecção pode ocorrer em alta umidade, na presença ou ausência de filmes de água. Propriedades antimicrobianas de óleos essenciais de várias espécies vegetais afetam o desenvolvimento de fungos, *in vitro* e *in vivo*, em vários produtos hortícolas. A busca de métodos de controle alternativo, como a exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes em plantas medicinais e a indução de resistência, torna-se necessária para atender as normas de qualidade do mercado externo, principalmente em relação à extinção e/ou substituição do uso de produtos químicos (agrotóxicos) por produtos biológicos.

Palavras-chave: Pós-colheita. Qualidade. Controle alternativo. *In vivo*. *In vitro*.

ABSTRACT

The post-harvest losses start in the field and occurring at all points of sale to the consumption. Therefore, the quality of fruit or vegetable is related to factors involved in pre- and post harvest, i.e, in the production chain. The strawberries are highly perishable fruit, so the post-harvest losses can reach significant levels, if not used correct techniques of harvesting and post harvest. One of the main problems in strawberry culture is the disease incidence. Strawberries have a shelf-life post harvest too short, due in part to the gray mold caused by *Botrytis cinerea*. Infection can occur in the flower, remain at rest until the pseudofruit mature and then develop, causing deterioration of the same accompanied by abundant sporulation of the pathogen *Botrytis sp.* infects many host plants in all the world's climate zones, mainly parts of higher plants in the pre- and post-harvest. Bulbs, seeds and other propagating material also suffer from infection. The infection can occur in high humidity, in the presence or absence of water films. Antimicrobial properties of essential oils of the several plant species affect the development of fungi, *in vitro* and *in vivo*, in various vegetable products. The search for alternative control methods, such as the exploitation of the biological activity of secondary compounds present in medicinal plants and the induction of resistance, it is necessary to meet the quality standards of the foreign market, especially in relation to extinction and/or replacement use of chemicals (pesticides) for biological products.

Keywords: Post-harvest. Quality. Alternative control. *In vivo*. *In vitro*.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	Introdução geral	9
1	INTRODUÇÃO		10
2	REFERENCIAL TEÓRICO		12
2.1	O morangueiro e seu fruto		12
2.2	Doenças pós-colheita em morangos		14
2.3	Mofa cinzento em morango		15
2.4	<i>Botrytis cinerea</i>		16
2.5	Agricultura orgânica		17
2.6	Óleos essenciais		18
2.7	Controle alternativo com utilização de óleos essenciais		20
2.8	Indução de resistência em vegetais		22
	REFERÊNCIAS		25
	CAPÍTULO 2	Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre <i>Botrytis cinerea</i>, isolados de morangos <i>in vitro</i>	29
1	INTRODUÇÃO		32
2	MATERIAL E MÉTODOS		34
2.1	Obtenção do isolado do patógeno		34
2.2	Avaliação da atividade antifúngica		34
2.3	Delineamento estatístico		35
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO		36
4	CONCLUSÕES		40
	REFERÊNCIAS		41
	CAPÍTULO 3	Qualidade pós-colheita de morangos orgânicos tratados com óleos essenciais na pré-colheita	43
1	INTRODUÇÃO		46
2	MATERIAL E MÉTODOS		48

2.1	Local, clima e solo	48
2.2	Tratamento em campo.....	48
2.3	Colheita dos frutos e armazenamento	49
2.4	Delineamento experimental.....	49
2.5	Firmeza	50
2.6	Acidez titulável (AT) e pH.....	50
2.7	Sólidos Solúveis (SS)	50
2.8	Determinação de fenólicos totais	50
2.9	Determinação de antocianinas	51
2.10	Atividade da fenilalanina amônia liase (FAL).....	51
2.11	Atividade da peroxidase (PER).....	52
2.12	Avaliação da incidência de <i>Botrytis cinerea</i> (mofo cinzento) e aparência.....	52
2.13	Avaliação microbiológica	53
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.1	Firmeza, Acidez titulável (AT), SS/AT e pH	54
3.2	Compostos fenólicos totais	60
3.3	Antocianinas	61
3.4	Fenilalanina amônia liase (FAL)	63
3.5	Peroxidase.....	64
3.6	Avaliação da incidência de <i>Botrytis cinerea</i>	66
3.7	Avaliação microbiológica	69
4	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS.....	71

CAPÍTULO 1 Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

O conceito de qualidade de frutas e hortaliças envolve vários atributos, como aparência visual (frescor, cor, defeitos e deterioração), textura (firmeza, resistência e integridade do tecido), sabor e aroma, valor nutricional e segurança do alimento. Apesar da diversidade e disponibilidade desses produtos no mercado interno, sua comercialização está limitada, principalmente por serem altamente perecíveis e, geralmente, serem manuseados sob condições ambientais que aceleram a perda de qualidade.

As perdas pós-colheita iniciam no campo e ocorrem em todos os pontos da comercialização até o consumo. Portanto, a qualidade da fruta ou hortaliça está relacionada a fatores envolvidos nas fases pré-colheita e pós-colheita, ou seja, na cadeia produtiva. Dentre eles, destaca-se o manuseio inadequado que leva a danos mecânicos, exposição dos produtos a temperaturas elevadas prejudiciais a sua conservação, o uso indiscriminado de agrotóxicos, contaminações microbiológicas dos produtos provenientes principalmente de fontes de contaminação no cultivo e da falta de higiene e sanitização no manuseio e processamento dos mesmos.

Os morangos são frutos muito perecíveis, portanto as perdas pós-colheita podem alcançar níveis importantes, caso não sejam utilizadas técnicas corretas de colheita e pós-colheita. Um dos principais problemas na cultura do morango é a incidência de doenças, que podem aparecer em várias fases do ciclo da cultura, atacando desde a muda recém-plantada até os frutos na fase final de produção. O mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea*, promove podridão dos frutos diminuindo seu tempo de vida útil prejudicando seu comércio e consumo.

A partir da última década, a conscientização química sobre o uso indiscriminado e incorreto de defensivos agrícolas no ambiente rural e urbano, causando prejuízos aos ecossistemas e ao homem, tem motivado o

desenvolvimento de métodos e produtos alternativos no controle de doenças de plantas. Logo, o óleo essencial de plantas medicinais pode constituir-se em uma forma potencial de controle alternativo de doenças de plantas cultivadas.

Em razão da rápida perda de qualidade pós-colheita e o aparecimento de doenças, o objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência de 9 óleos essenciais de plantas medicinais [canela (*Cinnamomum sp.*), erva-baleeira (*Cordia verbenaea*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), palmarosa (*Cymbopogon martinii*), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), camomila (*Matricaria recutita*), manjerição (*Ocimum basilicum*), erva-doce (*Pimpinella anisum*) e tomilho (*Thymus vulgaris*)], em 3 doses diferentes: 1,00%; 0,20% e 0,04% no controle da germinação dos esporos de *Botrytis cinerea in vitro*. Após esse teste *in vitro*, avaliar o efeito dos 4 melhores resultados *in vitro* de óleos essenciais em morangos, temperatura (5°C e 25°C) no controle de *Botrytis cinerea* e nas características físico-químicas de morangos armazenados por um período de 8 dias.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O morangueiro e seu fruto

O morangueiro, do modo como atualmente o conhece-se, é uma interessante consequência da descoberta da América. Os europeus encontraram no Novo Mundo duas espécies de morangueiros selvagens, *Fragaria chiloensis* e *Fragaria virginiana*, a primeira no Chile e a outra na América do Norte. Ambos foram levados à Europa e plantados lado a lado em jardins do Velho Mundo, assim acontecendo um cruzamento natural (PROGRAMA BRASILEIRO PARA A MODERNIZAÇÃO DA HORTICULTURA - PBMH, 2009).

O Morango (*Fragaria x ananassa Duch.*) é um dos frutos economicamente mais importantes, seja ele fresco ou processado, consumido tanto pelo seu sabor agradável, como pelo seu teor de nutrientes (HANCOCK, 1999).

As flores do morangueiro são hermafroditas e hemicíclicas. O cálice é formado por brácteas unidas na base. As pétalas são livres, lobuladas, brancas ou avermelhadas, dispostas ao redor do receptáculo proeminente, o qual, após a fecundação dos pistilos, se transforma no “morango”. Dessa forma, os “morangos” são frutos falsos, sobre os quais se encontram os aquênios, que são os frutos verdadeiros. Mas para fins comerciais se denomina fruto o conjunto formado pelos frutos verdadeiros e receptáculo carnoso (HOFFMANN; BERNARDI, 2011).

O morango é cultivado em todo o mundo. O sabor de morango é resultado de uma mistura complexa de numerosos compostos voláteis, açúcares e ácidos orgânicos, combinados com características, como a textura. A qualidade nutricional do morango está intimamente correlacionada com a presença de

açúcares solúveis, ácidos orgânicos, aminoácidos e alguns metabólitos secundários. Esses compostos desempenham um papel importante na manutenção da qualidade dos frutos e valor nutritivo; por essa razão, a análise da composição dos frutos é de interesse para os químicos de alimentos. Ácidos fenólicos e seus derivados são muitas vezes conjugados com açúcares e têm sido frequentemente relatado em frutos de morango (ZHANG et al., 2011).

Morangos têm vida útil curta, devido à elevada perecibilidade, sendo suscetíveis a danos mecânicos, fisiológicos, deterioração e a perda de água. A conservação pós-colheita de morangos frescos é muito complexa devido à sua alta atividade metabólica, em especial, sua alta taxa de respiração (50-100 mL de CO₂ por kg por hora a 20 ° C). Seu curto período de vida útil tem limitado a comercialização desse produto, e as perdas podem atingir até 40% durante o armazenamento. Métodos de conservação adequados podem minimizar as perdas e estender a vida útil (CANER; ADAY; DEMIR, 2008).

Uma das técnicas mais eficientes para aumentar a durabilidade de frutos e minimizar as perdas pós-colheita é o armazenamento à baixa temperatura. A refrigeração é utilizada para diminuir a taxa respiratória, a perda de água e retardar o amadurecimento e senescência dos frutos. O armazenamento adequado é um dos pontos críticos para o sucesso da comercialização de frutos tropicais (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

A avaliação da qualidade do morango no mercado tem se restringido a avaliações de tamanho, coloração, firmeza, acidez, doçura e aroma, embora exista um crescente interesse nos benefícios do fruto à saúde do consumidor. O ácido ascórbico contribui relativamente pouco com a atividade antioxidante em morangos, no entanto, as antocianinas, os principais determinantes de sua coloração, apresentam potentes propriedades antioxidantes. A concentração de compostos fenólicos está positivamente relacionada com o total de atividade antioxidante (SHINA et al., 2008).

As mudanças mais notáveis ao longo do desenvolvimento do morango, em especial do seu amadurecimento, dizem respeito à forma, tamanho, textura, pigmentação, que coincidem com um aumento no teor de sólidos solúveis e emanação de compostos de aroma (ZHANG et al., 2011).

2.2 Doenças pós-colheita em morangos

Um dos principais problemas na cultura do morango é a incidência de doenças, que podem aparecer em várias fases do ciclo da cultura, atacando desde a muda recém-plantada até os frutos na fase final de produção (PBMH, 2009).

Doenças de campo com evolução pós-colheita:

- a) Antracnose - *Colletotrichum spp.*
- b) Mofo Cinzento - *Botrytis cinérea.*
- c) Podridão Branca - *Sclerotinia sclerotiorum.*
- d) Podridão de *Hainesia.*
- e) Podridão de *Pestalotia.*
- f) Podridão de *Phytophthora.*

Doenças associadas a ferimentos pós-colheita:

- a) Podridão de *Alternaria.*
- b) Podridão de *Cladosporium.*
- c) Podridão Bacteriana.
- d) Podridão de Levedura.
- e) Podridão Mole - *Rhizopus spp.*
- f) Podridão de *Penicillium.*

2.3 Mofo cinzento em morango

Morangos têm uma vida útil pós-colheita muito curta, devido em parte, ao mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea*. A infecção pode ocorrer na flor, permanecer em repouso até o pseudofruto amadurecer e, em seguida, desenvolver, causando deterioração do mesmo, acompanhada de esporulação abundante do patógeno. *Botrytis cinerea* também provoca perdas significativas durante o transporte até a venda, tornando-se um dos patógenos mais importantes economicamente do morango (ZHANG et al., 2007).

O mofo cinzento representa uma importante e frequente doença do morangueiro, sob condições de alta umidade e temperaturas amenas. Causado pelo fungo *Botrytis cinerea*, caracteriza-se por ser uma doença típica de frutos, todavia pode afetar também pecíolos, folhas, botões florais, pétalas e pedúnculos, sob condições favoráveis. A infecção, geralmente, inicia-se em tecido debilitado, especialmente pétalas senescentes, para posteriormente infectar os tecidos saudáveis do fruto. A doença pode destruir botões florais e frutos verdes, no entanto, na maioria das vezes as infecções permanecem latentes e os sintomas se manifestam somente no início do amadurecimento dos frutos. Em frutos verdes, os sintomas são caracterizados pela presença de pequenas lesões marrons levemente depressivas. Em frutos maduros, essas lesões tornam-se recobertas por um crescimento acinzentado constituído por estruturas do patógeno, que rapidamente tomam toda superfície do fruto. Com a evolução dos sintomas, os frutos podem apodrecer completamente ou ainda assumir a forma de mumificados. A disseminação da doença ocorre principalmente pela ação do vento, água de chuva e irrigação, bem como durante o processo da colheita.

Controle da *Botrytis cinerea* é normalmente efetuado pela aplicação de fungicidas. Embora o uso de fungicidas reduza as perdas de rendimento em

morango, há estudos que mostram que os fungicidas disponíveis no mercado podem reduzir a polinização e causar má formação dos frutos (KOVACH; HARMAN, 2000).

A preocupação com as restrições regulatórias sobre a presença de resíduos de fungicida nas lavouras tem enfatizado a necessidade de encontrar métodos alternativos para controle da doença (SMILANICK, 1994).

2.4 *Botrytis cinereae*

As colônias de *Botrytis cinerea* a 20 °C atingem um diâmetro de 6 cm ou mais em 10 dias, hialinas em primeiro lugar, tornando-se posteriormente cinza para cinza-marrom.

Botrytis sp. infecta muitas plantas hospedeiras em todas as áreas climáticas do mundo, principalmente partes de plantas superiores em fases pré e pós-colheita. Bulbos, sementes e outros materiais de propagação também sofrem de infecção. A infecção pode ocorrer em alta umidade, na presença ou ausência de filmes de água. A infecção pode ser quieta, agressiva, ou muito restrita em desenvolvimento. A produção de um elevado número de conídios representa uma ameaça duradoura para hospedeiros suscetíveis. Mudanças nas populações em resposta à seleção por exposição aos xenobióticos, especialmente fungicidas, são bastante comuns no gênero e a resistência a fungicidas tem sido registrada em populações de *Botrytis* em toda a história da era moderna fungicida. Estudos detalhados sobre as condições precisas que promovem a infecção, o desenvolvimento da doença e a sobrevivência do inóculo tem fornecido as informações epidemiológica necessárias para a concepção de estratégias de controle. Por exemplo, métodos culturais que aumentam a aeração e secagem da copa da planta para reduzir o risco de epidemias de *Botrytis* têm sido desenvolvidos. A exigência crescente de abordagens alternativas para reduzir a

dependência dos agricultores sobre o uso de fungicidas conduz à avaliação e à exploração de potenciais agentes de biocontrole capazes de supressão da doença, importante em um contexto comercial, e no âmbito dos sistemas de gestão integrada das culturas (ELAD; KÖHL; FOKKEMA, 1994).

Esse fungo hiberna nas folhas velhas e restos vegetais. As infecções ocorrem quase que exclusivamente através das flores. É por isso que o controle deve ser centrado no período de floração. Se o período de floração é seca e / ou boa cobertura de fungicidas é mantida, a incidência do mofo cinzento na colheita deve ser baixa. Duas a três pulverizações de fungicidas durante a floração são geralmente necessárias para fornecer uma boa proteção contra a doença.

2.5 Agricultura orgânica

A demanda mundial por frutas e hortaliças vem crescendo expressivamente nos últimos anos, em virtude, principalmente, da conscientização da população acerca da importância de uma alimentação saudável e do reconhecimento de sua participação na prevenção de várias enfermidades (OLIVEIRA et al., 2006).

Agricultura orgânica é o sistema de manejo sustentável da unidade de produção com enfoque sistêmico que privilegia a preservação ambiental, a agrobiodiversidade, os ciclos biogeoquímicos e a qualidade de vida humana. A agricultura orgânica aplica os conhecimentos da ecologia no manejo da unidade de produção, baseada numa visão holística da unidade de produção. Isso significa que o todo é mais do que os diferentes elementos que o compõem. Na agricultura orgânica, a unidade de produção é tratada como um organismo integrado com a flora e a fauna (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA AGROBIOLOGIA, 2012).

A agricultura orgânica é muito mais do que uma troca de insumos químicos por insumos orgânicos/biológicos/ecológicos. O manejo orgânico privilegia o uso eficiente dos recursos naturais não renováveis, aliado ao melhor aproveitamento dos recursos naturais renováveis e dos processos biológicos, à manutenção da biodiversidade, à preservação ambiental, ao desenvolvimento econômico, bem como, à qualidade de vida humana (EMBRAPA AGROBIOLOGIA, 2012).

Sistemas orgânicos de produção podem apresentar bom nível de produtividade e qualidade comercial dos produtos. Contudo, se não for realizado um manejo adequado dos mesmos, podem apresentar elevado custo, diminuindo a rentabilidade (SOUZA, 2006).

2.6 Óleos essenciais

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. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. As denominações óleos essenciais, óleos etéreos ou essências derivam das características físico-químicas. Assim, a designação óleo é devido à aparência oleosa em temperatura ambiente dessas substâncias líquidas. A designação essência deve-se ao aroma agradável e intenso, outra característica importante. Já a designação etéreo, ou em latim *aetheroleum*, deve-se à solubilidade em solventes orgânicos apolares como éter, porém em água apresentam solubilidade limitada. Entretanto, a principal característica é a volatilidade que os difere dos óleos fixos (mistura de substâncias lipídicas), obtidos geralmente de sementes. Outras características são o sabor, geralmente acre (ácido) e picante, e a coloração, sendo poucos os óleos

que apresentam cor como o óleo volátil da camomila que é azulado, devido ao alto teor de azulenos; geralmente são ligeiramente amarelados ou incolores quando recentemente extraídos; não são muito estáveis, na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (SIMÕES; SPITZER, 2000).

De acordo com Siani et al. (2000), os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanoides. Constituem elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência.

O óleo essencial não é um produto simples de um componente, é um produto composto podendo ultrapassar 300 componentes químicos diferentes. Os componentes químicos dos óleos essenciais apresentam estruturas diversas como terpenos, sesquiterpenos, fenólicos, fenil propanoicos, alifáticos não terpênicos, heterocíclicos, álcoois, cetonas, aldeídos, ácidos carboxílicos, ésteres, acetatos, cada qual com sua característica aromática e ação bioquímica (WOLFFENBÜTTEL, 2007).

Um exemplo é o óleo de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). É uma planta aromática cultivada para produção comercial de óleo essencial, o qual geralmente apresenta como constituintes majoritários os monoterpenos citral (mistura isomérica de neral e geranial) e o mirceno (GUIMARAES et al., 2011).

Já o óleo essencial da casca de canela é rico em aldeído cinâmico, enquanto que o das folhas apresenta composição diferente, sendo fonte de eugenol. Os óleos essenciais obtidos a partir das cascas e das folhas, e também a oleoresina, são matérias-primas de amplo emprego nas indústrias de alimentos e bebidas, de perfumaria e farmacêutica (KOKETSU et al., 1997).

Segundo Rosa et al. (2010), o óleo essencial de palmarosa é rico em geraniol (70-90%), tendo como principais compostos químicos o geraniol (70-90%), o (E)- β -ocimeno, linalol, geranil acetato e β -cariofileno dependendo do

material botânico e do método de extração do óleo essencial. Os principais componentes do óleo essencial de palmarosa são registrados como geraniol e geranil acetato, apresentando menor quantidade de linalol e β -cariofileno.

O conteúdo de óleo essencial da camomila brasileira está em torno de 0,43-0,85 e sua composição é de aproximadamente 1,91-35,02% de camazuleno, 16,2% de óxido de bisabolol A, 25,83% de óxido de bisabolol B e 7,31-16,05% de alfa-bisabolol (BORSATO et al., 2008).

Os métodos de extração dos óleos essenciais variam de acordo com a parte da planta em que ele se encontra, bem como com a proposta de utilização do mesmo. Os mais comuns são: enfloração (*enfleurage*), arraste por vapor d'água, extração com solventes orgânicos, prensagem (ou expressão) e extração por CO₂ supercrítico (DI STASI, 1996).

2.7 Controle alternativo com utilização de óleos essenciais

Propriedades antimicrobianas de óleos essenciais de várias espécies vegetais têm provado afetar o desenvolvimento de fungos *in vitro* e *in vivo* em vários produtos hortícolas.

Os óleos essenciais bem como compostos derivados deles possuem uma vasta gama de atividades sobre a atividade antimicrobiana.

Ao lado da indução de resistência, a exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes no extrato bruto ou óleo essencial em plantas medicinais pode constituir-se em mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças de plantas cultivadas (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2000).

Embora o controle químico de doenças de plantas seja considerado em muitos casos, a única medida eficiente e economicamente viável de garantir

produtividade e qualidade visadas pela agricultura moderna, o uso contínuo pode promover a seleção de fungos patogênicos resistentes.

Venturini, Blanco e Oria (2002) relatam que o *timol* e *citral* foram os componentes do óleo essencial de *C. citratus* e *T. vulgaris* que apresentaram maior atividade fungicida *in vitro* contra *P. expansum*, entre muitos outros compostos antimicrobianos testados.

O mecanismo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais está relacionado principalmente, à presença de compostos fenólicos, que são capazes de dissolver na membrana microbiana e penetrar no interior da célula. As diferenças nos resultados ao testar óleos essenciais para a atividade antimicrobiana podem estar relacionadas principalmente ao ensaio técnico, o meio de crescimento, o microrganismo a ser testado, bem como a composição do óleo essencial, que depende da espécie vegetal, do clima e das condições de cultivo (IRKIN; KORUKLUOGLU, 2009).

Segundo Cakir et al. (2005) constataram efeito fungicida do óleo essencial de *Hypericum linarioides* Bosse em seis espécies do gênero *Fusarium* (*F. acuminatum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum* e *F. solani*). Bajpai, Rahman e Kang (2007), estudando o efeito fungitóxico do óleo essencial de *Metasequoia glyptostroboides*, sobre fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* e outros, observaram que esse óleo essencial na concentração de 1000 mg mL⁻¹, causou uma inibição micelial de 63% sobre *Fusarium oxysporum* e *Colletotricum capsici*, 70% sobre *Phytophthora capsici*, 56% sobre *Botrytis cinerea* e *Sclerotium sclerotiorum* e 68% sobre *Fusarium solani*, demonstrando, assim, a atividade fungitóxica desse óleo. A atividade nematostática e nematicida dos óleos essenciais de alecrim pimenta e capim citronela sobre *Meloidogyne incognita* foi demonstrada por Moreira, Santos e Inneco (2009).

Assim, a busca de métodos de controle alternativo, como a exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes em plantas medicinais e a indução de resistência, torna-se necessária para atender as normas de qualidade do mercado externo, principalmente em relação à extinção e/ou substituição do uso de produtos químicos (agrotóxicos) por produtos biológicos ou fitorreguladores (ROZWALKA, 2006).

2.8 Indução de resistência em vegetais

Segundo Chester (1933) a indução de resistência em plantas a patógenos é conhecida há mais de 50 anos, mas somente muito tempo depois, o fenômeno começou a ser investigado de forma mais direcionada para uma aplicação prática, visando aumentar a produtividade de culturas pelo controle de enfermidades de plantas.

A indução de resistência pode ser chamada de resistência sistêmica adquirida, ou de indução de proteção ou imunidade adquirida e envolve a ativação de mecanismos de defesa latente, existentes nas plantas, em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos. A importância de indução de resistência em plantas foi documentada em dois trabalhos fundamentais, os de Chester (1933) e Gaümann (1946), em que os autores demonstraram, trabalhando com sistemas diferentes, que plantas inoculadas com microrganismos atenuados ficavam protegidas contra subsequente infecções pelo mesmo microrganismo ou contra outros semelhantes.

Segundo Colson e Deverall (1996), as plantas possuem seus próprios mecanismos de defesa que são altamente eficientes, e é preciso que se aprenda a desenvolver a tecnologia específica para ativá-los.

A agricultura moderna tem aumentado tanto sua potencialidade de produção, quanto a aplicação de produtos tóxicos para o controle de pragas e

doenças de plantas. O uso indiscriminado de fungicidas tem causado danos ao meio ambiente, aos seres vivos e tem favorecido a seleção de raças resistentes de patógenos a essas substâncias químicas (GHINI; KIMATI, 2000).

Segundo Zadoks (1992), termos como “agricultura sustentável” ou “agricultura alternativa” presumem expressão política, estimulando a busca por novas medidas de proteção das plantas contra as doenças.

Um dos enfoques da agricultura alternativa é o controle alternativo de doenças, o qual inclui o controle biológico e a indução de resistência em plantas (BETTIOL, 1991).

Embora a maioria dos trabalhos enfoque a indução de resistência por agentes bióticos, microrganismos benéficos a plantas, utilizados experimentalmente e para fins práticos colimando o controle biológico de enfermidades, essa indução de resistência pode e tem sido conseguida pela exposição de plantas a certos produtos químicos sintéticos. Esses ativadores químicos de defesas de plantas, entendidos e visualizados como indutores de SAR/ISR (Resistência Sistêmica Adquirida/Resistência Sistêmica Induzida), começam, inclusive, a se constituir uma nova classe de pesticidas (KUNZ; SCHURTER; MAETZKE, 1997). Tem sido chamado de “fungicidas de quarta geração” por terem um modo de atuação completamente diferente dos pesticidas até agora desenvolvidos, posto que não exibem efeito direto sobre patógenos, mas ativam mecanismos de defesa das plantas tornando-as mais resistentes.

A indústria de defensivos tem desenvolvido moléculas capazes de protegerem uma cultura contra os patógenos causadores de doenças apenas pela indução de mecanismos de defesa da planta (ZADOKS, 1997).

Diversos trabalhos mostram o potencial de plantas medicinais no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela capacidade de

induzir o acúmulo de fitoalexinas (SCHWAN-ESTRADA et al., 1997),
indicando a presença de moléculas com característica elicitora.

REFERÊNCIAS

- BAJPAI, V. K.; RAHMAN, A.; KANG, S. C. Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. **Industrial Crops and Products**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 28-35, 2007.
- BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991.
- BORSATO, A. V. et al. Rendimento e composição química do óleo essencial da camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] extraído por arraste de vapor d'água, em escala comercial. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 129-136, jan./mar. 2008.
- CAKIR, A. et al. Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 33, p. 245-256, 2005.
- CANER, C.; ADAY, M. S.; DEMIR, M. Extending the quality of fresh strawberries by equilibrium modified atmosphere packaging. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 227, p. 1575–1583, 2008.
- CHESTER, K. S. The problem of acquired physiological immunity in plants. **Quarterly Review of Biology**, Stony, v. 8, p. 275-324, 1933.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.
- COLSON, E.; DEVERALL, B. Helping plants fight their own disease battles. **Australian Cottongrower**, Uralla, v. 17, p. 76-80, 1996.
- DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: UNESP, 1996. 231p.
- ELAD, Y.; KÖHL, J.; FOKKEMA, N. J. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 1193-1199, 1994.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. **Uva e vinho**. Lavras, 2012. Disponível em: < <http://www.cnpuv.embrapa.br/>>. Acesso em: 28 fev. 2012.

GAÜMANN, E. **Pflanzliche Infektionslehre**. Birkhäuser: Basel, 1946. 611 p.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.

GUIMARAES, L. G. L. et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 464-472, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902011000200028>>. Acesso em: 23 dez. 2011.

HANCOCK, J. F. **Strawberries**. Wallingford: CABI, 1999.

HOFFMANN, A.; BERNARDI, J. **Produção de morangos no sistema semi-hidropônico**. Lavras: Embrapa Uva e vinho, 2011. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/MorangoSemiHidroponico/introducao.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

IRKIN, R.; KORUKLUOGLU, M. Effectiveness of *Cymbopogon citratus* L. Essential Oil to Inhibit the Growth of Some Filamentous Fungi and Yeasts. **Journal of Medicinal Food**, Athens, v. 12, n. 1, p. 193–197, 2009.

KOKETSU, M. et al. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum Presl*) cultivada no Paraná. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 281-285, 1997.

KOVACH, J. P. R.; HARMAN, G. E. Use of honey bees and bumble bees to disseminate *Trichoderma harzianum* 1295–22 To strawberries for *Botrytis* control. **Biological Control**, Orlando, v. 18, p. 235–242, 2000.

KUNZ, W.; SCHURTER, R.; MAETZKE, T. The chemistry of benzothiadiazole plant activators. **Pesticide Science**, Oxford, v. 50, p. 275- 282, 1997.

MOREIRA, F. J. C.; SANTOS, C. D. G.; INNECO, R. Ecloração e mortalidade de juvenis J2 de *Meloidogyne incognita* raça 2 em óleos essenciais. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 40, n. 3, p. 441-448, 2009.

OLIVEIRA, M. A. et al. **Patologia pós-colheita: frutos, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2006. 855 p.

PROGRAMA BRASILEIRO PARA A MODERNIZAÇÃO DA HORTICULTURA. **Normas de classificação de morango**. São Paulo: CEAGESP, 2009. (Documentos, 33).

ROSA, Y. R. S. et al. Influência do horário de colheita no óleo essencial de diferentes partes da planta de dois genótipos de palmarosa (*Cymbopogon martinii*). **Scientia Plena**, Aracaju, v. 6, p. 102-103, 2010.

ROZWALKA, L. C. **Controle alternativo da antracnose em frutos de goiabeira, em laboratório**. 2006. 56 p. Dissertação (Mestrado Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. et al. Efeito do extrato bruto de plantas medicinais na indução de fitoalexinas em soja e sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 346, 1997.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, Curitiba, v. 30, n.1/2, p.129-137, jun./ dez. 2000.

SHINA, Y. et al. Harvest maturity, storage temperature and relative humidity affect fruit quality, antioxidant contents and activity, and inhibition of cell proliferation of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 49, p. 201–209, 2008.

SIANI, A. C. et al. Óleos essenciais: potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 16, p. 38-43, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2000. p. 317-416.

SMILANICK, J. L. Strategies for the isolation and testing of biocontrol agents. In: WILSON, C. L., WISNIEWSKI, M. E. (Ed.). **Biological control of Postharvest diseases: theory and practice**. Boca Raton: CRC, 1994.

SOUZA, J. L. **Manual de horticultura orgânica**. 2. ed. atual e ampl. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2006. 843p.

VENTURINI, M. E.; BLANCO, D.; ORIA, R. In vitro antifungal activity of several antimicrobial compounds against *Penicillium expansum*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, p. 834–839, 2002.

WOLFFENBÜTTEL, A. N. Mas afinal o que são óleos essenciais. **Informativo CRQ-V**, Porto Alegre, v. 11, n. 105, p. 6-7, nov./dez. 2007.

ZADOKS, J. C. Modern plant protection. Developments and perspectives. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 30., 1997, Poços de Caldas. **Resumos...** Poços de Caldas: [s. n.], 1997. p.16-26.

ZADOKS, J. C. The costs of change in plant protection. **Journal of Plant Protection**, Poznań, v. 9, p. 151-159, 1992.

ZHANG, H. et al. Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. **Biological Control**, Orlando, v. 40, p. 287–292, 2007.

ZHANG, J. et al. Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) during fruit development and maturation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 1103–1118, 2011.

CAPÍTULO 2 Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *Botrytis cinerea*, isolados de morangos *in vitro*

RESUMO

A utilização excessiva de defensivos agrícolas como controle ou prevenção de doenças e pragas nas lavouras vem sendo discutida, pelos problemas e danos à saúde do homem e ao desequilíbrio ambiental que provocam. A cada dia as pessoas procuram uma alimentação mais saudável e livre de defensivos agrícolas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de inibição da germinação de esporos de *Botrytis cinerea*, um dos principais fungos causadores de perdas pós-colheita em morangos. Foram testados os óleos essenciais de canela (*Cinnamomum sp.*), erva-baleeira (*Cordia verbenaea*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), palmarosa (*Cymbopogon martinii*), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), camomila (*Matricaria recutita*), manjerição (*Ocimum basilicum*), erva-doce (*Pimpinella anisum*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), nas concentrações de 1,00%, 0,20%, 0,04%. Foram observadas variações significativas no percentual de germinação de esporos de *Botrytis cinerea*, em função do tipo de óleo essencial utilizado e da concentração do óleo. A maioria dos óleos essenciais apresentou potencial de inibição de fungos *in vitro*. Houve diferença na germinação dos esporos de *Botrytis cinerea* para cada óleo e concentração. O único óleo que determinou inibição da germinação dos esporos em todas as concentrações foi o de *Cymbopogon citratus*, sendo que, à exceção dele, nenhum óleo foi efetivo na concentração de 0,04%.

Palavras-chave: Mofo cinzento. Concentração. Inibição.

ABSTRACT

The excessive use of pesticides as a control or prevention of diseases and pests in crops has been discussed, by problems and damage to human health and causing environmental imbalance. Every day people are looking for a healthier diet and free of pesticides. The objective of this study was to evaluate the inhibition potential of spore germination of *Botrytis cinerea*, a fungus of the main causes of post-harvest losses in strawberries. The essential oils of cinnamon were tested (*Cinnamomum sp.*), herb whaling (*Cordia verbenaea*), lemon grass (*Cymbopogon citratus*), palmarosa (*Cymbopogon martinii*), carnation of india (*Eugenia caryophyllata*), chamomile (*Matricaria recutita*), basil (*Ocimum basilicum*), fennel (*Pimpinella anisum*) e thyme (*Thymus vulgaris*), in the concentrations of 1.00%, 0.20%, 0.04%. There were significant changes in the percentage of germination from spores of *Botrytis cinerea*, according to the type of essential oil used and the concentration of oil. Most essential oils showed inhibition potential of fungi *in vitro*. There were differences in spore germination of *Botrytis cinerea* for each oil and concentration. The oil that determined inhibition of spore germination at all concentrations was of *Cymbopogon citratus*, and except for it, no oil was effective at a concentration of 0.04%.

Keywords: Gray mold. Concentration. Inhibition.

1 INTRODUÇÃO

Morango (*Fragaria x ananassa*), pseudofruto altamente perecível, deve ser colhido em plena maturidade para alcançar a máxima qualidade em termos de aparência visual (frescor, cor e ausência de deterioração ou doenças), textura (suculência, firmeza), sabor e valor nutricional (vitaminas, minerais e fibra alimentar). Mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea*, é a doença de pós-colheita mais significativa economicamente na cultura do morango (HERNÁNDEZ-MUNÓZ, 2008).

A utilização de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais, como controle alternativo de patógenos, é uma forma de prover um controle sem desencadear os problemas provocados pelos defensivos sintéticos químicos e deixar resíduos tóxicos para o ser humano.

Jacometti, Wratten e Walter (2010) citam que óleos essenciais (voláteis ou etéreos), são concentrados de plantas que contêm compostos de aroma. Esses óleos naturais contêm compostos bioativos que podem efetivamente controlar *B. cinerea*, mas nas concentrações necessárias para serem eficazes são frequentemente tóxicos para a planta ou deixam resíduos, o que pode alterar o sabor e odor dos frutos. Os óleos essenciais atuam no vegetal como um mecanismo de defesa contra microrganismos fitopatogênicos. Muitos óleos essenciais têm-se mostrado eficazes na inibição *B. cinerea in vitro* (TEGEGNE; PRETORIUS, 2007).

O objetivo do trabalho foi verificar a inibição da germinação de esporos *in vitro* de *Botrytis cinerea* isolado de frutos de morangueiro utilizando 9 óleos essenciais: *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Cymbopogon martinii* (palmarosa), *Cinnamomum sp.*(canela), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Cordia verbenacea* (erva-baleeira), *Eugenia caryophyllata* (cravo-da-índia), *Pimpinella*

anisum (erva-doce), *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Matricaria recutita* (camomila), em 3 doses diferentes: 1,00%; 0,20% e 0,04%.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do isolado do patógeno

Isolados de *Botrytis cinerea* foram obtidos de pseudofrutos de morangueiro, cultivados num plantio experimental na Universidade Federal de Lavras (UFLA). Para obtenção de isolados do patógeno, os morangos foram acondicionados individualmente em câmaras úmidas (embalagens plásticas tampadas e com algodão umedecido), mantidas à temperatura média de 25 °C. Por meio de isolamento direto, estruturas fúngicas caracterizadas por uma massa de esporos de coloração cinza, foram transferidas para placas de Petri contendo o meio de cultura Batata-dextrose-ágar (BDA), com auxílio de um estilete, em condições assépticas, sendo as placas mantidas em estufa a 25 ± 2 °C no escuro durante 7 dias.

2.2 Avaliação da atividade antifúngica

Para a avaliação do potencial de inibição e/ou ação fungicida sobre a germinação de esporos de *Botrytis cinerea*, foram selecionados 9 óleos essenciais de plantas medicinais: *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Cymbopogon martinii* (palmarosa), *Cinnamomum sp.*(canela), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Cordia verbenacea* (erva-baleeira), *Eugenia caryophyllata* (cravo-da-índia), *Pimpinella anisum* (erva-doce), *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Matricaria recutita* (camomila), utilizando 3 concentrações: 1,00%; 0,20% e 0,04%.

Para avaliação do efeito *in vitro* sobre a germinação dos esporos de *Botrytis cinerea* utilizou-se a seguinte metodologia: uma alíquota de 40µL da suspensão de esporos (1×10^2 esporos mL⁻¹) de *Botrytis cinerea* e 40µL da

solução preparada dos óleos essenciais foram colocados em células de placa ELISA e incubadas no escuro a 25°C por 24h.

Após esse período foi realizada a avaliação pela contagem dos esporos germinados ao microscópio ótico, sendo que cada célula continha cerca de 100 esporos. Foram considerados germinados os esporos que apresentaram tubo germinativo no início da emissão. Utilizou-se como controle água destilada esterilizada.

2.3 Delineamento estatístico

O experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com 3 repetições para cada um dos 10 tratamentos com óleo. Os resultados foram submetidos à análise de variância. A análise de regressão foi utilizada para avaliação das concentrações e o teste de Scott-Knott (5%) para comparação dos diferentes tratamentos com os óleos essenciais. As análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico Sisvar.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observaram-se variações significativas no percentual de germinação de esporos de *Botrytis cinerea*, em função do tipo de óleo essencial utilizado e da concentração do óleo (Tabela 1). Apenas o óleo de *Cymbopogon citratus* foi efetivo na redução da germinação de esporos na concentração de 0,04%, sendo que sua eficácia não diferiu estatisticamente em função da concentração utilizada. *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* foram os mais efetivos na concentração de 0,20%, seguidos de *Ocimum basilicum*, *Pimpinella anisum*, *Cinnamomum sp* e *Matricaria recutita*. *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* continuaram sendo os mais efetivos na concentração de 1%, juntamente com *Cinnamomum sp*, seguidos de *Ocimum basilicum* e *Cordia verbenacea*. *Thymus vulgaris* e *Eugenia caryophyllata* não apresentaram eficácia em nenhuma concentração utilizada. As concentrações de 0,20% e 1% foram mais efetivas que 0,04%, na contenção de germinação de esporos, para os óleos de *Ocimum basilicum*, *Cinnamomum sp*, e *Cymbopogon martinii*. Para *Cordia verbenacea*, apenas a concentração 1% se mostrou mais efetiva que 0,04% e para *Pimpinella anisum* e *Matricaria recutita*, apenas a concentração 0,20%. Logo, não se observou um efeito consistente e sistemático do aumento da concentração sobre a diminuição de germinação de esporos, considerando-se os diferentes óleos essenciais utilizados. Com base na análise estatística e menor concentração efetiva na contenção de germinação de esporos de *Botrytis cinerea*, destacaram-se os óleos de *Cymbopogon citratus* a 0,04%, *Cymbopogon martinii* a 0,2% e *Cinnamomum sp*, a 1%.

A maioria dos óleos essenciais apresenta potencial de inibição de fungos *in vitro*. Houve diferença na germinação dos esporos de *Botrytis cinerea* para cada óleo e concentração. Grande parte da germinação foi inibida pelas maiores concentrações de óleos (*Cinnamomum sp*. e *Ocimum basilicum*) (Tabela 1).

Tabela1 Teste de concentrações de óleos essenciais de plantas medicinais na inibição da germinação de esporos de *Botrytis cinerea* isolado de frutos de morango

Óleos	% de inibição de germinação de esporos		
	Concentração		
	1%	0,20%	0,04%
<i>Cymbopogon citratus</i> (capim-limão)	83,3 Aa	74,7 Aa	62 Aa
<i>Cymbopogon martinii</i> (palmarosa)	76,7 Aa	58,7 Aa	10 Bb
<i>Cinnamomum</i> sp.(canela)	68,7 Aa	41,3 Bb	0 Bc
<i>Ocimum basilicum</i> (manjeriço)	42 Ba	32,7 Ba	0 Bb
<i>Cordia verbenácea</i> (erva-baleeira)	36,7 Ba	0 Cb	0 Bb
<i>Eugenia caryophyllata</i> (cravo-da-índia)	10 Ca	0 Ca	0 Ba
<i>Pimpinella anisum</i> (erva-doce)	0 Cb	45,3 Ba	0 Bb
<i>Thymus vulgaris</i> (tomilho)	0 Ca	0 Ca	0 Ba
<i>Matricaria recutita</i> (camomila)	0 Cb	23,3 Ba	0 Bb
Água(test.)	0 Ca	0 Ca	0 Ba

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

De acordo com os resultados obtidos por Medeiros (2011), o óleo essencial de capim-limão foi o mais eficiente no controle do crescimento de mesófilos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras, determinando a redução de aproximadamente 2 ciclos Log em relação ao tratamento-controle.

Tzortzakis (2009) observou redução no desenvolvimento das colônias de *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger*, na presença do vapor do óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum* L.) entre 25 e 500 ppm, *in vitro*. Em comparação ao controle, a esporulação foi inibida até 63% a 25 ppm; e, completamente inibida a 500 ppm.

A inibição da germinação é fundamental no controle das doenças, pois esse tipo de propágulo geralmente é o ponto inicial da infecção propriamente dita. Para o uso efetivo dos óleos essenciais e seu sucesso é preciso que eles não apenas inibam o crescimento micelial do patógeno, mas também inibam a germinação de seus esporos (ABREU, 2006).

Tzortzakis e Economakis (2007) observaram redução significativa no desenvolvimento das colônias de *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*, entre 25 e 500 ppm (que equivale a 0,0025% e 0,05%) na presença do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), inibição completa de esporulação a 500 ppm e, reduzida até 70% a 25 ppm em comparação ao controle. Observou-se no presente estudo que as concentrações (0,04%, 0,2% e 1%) mostraram poder inibitório na germinação dos esporos fúngicos, sendo que a concentração de 1% apresentou maior poder na inibição.

Tripathi, Dubey e Shukla (2008), ao comparar a concentração mínima inibitória (MIC) dos óleos sintéticos com alguns fungicidas observaram que os óleos mostraram ser mais ativos do que os pesticidas sintéticos, como o MIC dos óleos mostraram ser menores em relação aos fungicidas sintéticos. Normalmente, agentes fungitóxicos de origem vegetal encontrados não são prejudiciais para os alimentos tratados e em alguns casos, eles têm mostrado efeito positivo no aumento na vida útil dos alimentos. Com a comprovação da inibição da germinação de esporos de *Botrytis cinerea in vitro*, sugere-se a realização de testes em campo, com os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martinii*, *Cinnamomum sp.*

Bhaskara Reddy (1998) verificou a inibição de *Botrytis cinerea* (26,5-63,5% e 36,9 a 90,5%) e *Rhizopus stolonifer* (5,5 a 50,5% e 11,5-65,8%), patógenos comuns de armazenamento de morangos (*Fragaria ananassa*) pelos compostos voláteis dos tipos clonais Laval-1 e Laval-2, nas concentrações de 50 a 200 ppm, do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho), *in vitro*. As concentrações de (0,04%, 0,2% e 1%) testadas no presente estudo não foram hábeis em inibir a germinação dos esporos de *Botrytis cinerea* tratados com *Thymus vulgaris*.

Não foi verificada a inibição da germinação dos esporos de *Botrytis cinerea* para o tratamento com *Eugenia caryophyllata*, nas concentrações a 0,2% e 0,04%. Esses resultados contrastam com avaliação feita por Amaral e Bara (2005) referente à influência da atividade antifúngica do óleo de cravo em concentrações de 0,1 a 0,5% sobre fitopatógenos presentes em sementes de arroz, feijão, soja e milho. Silva (2008) descreve ainda que houve diminuição do crescimento micelial do fungo *Rhizopus stolonifer*, em meio de cultura com óleo essencial de cravo, em concentrações de 200, 400, 600 e 800 mg mL⁻¹.

4 CONCLUSÕES

O aumento da concentração dos óleos essenciais utilizados não determina um efeito consistente e sistemático sobre a diminuição de germinação de esporos de *Botrytis cinerea*.

Os óleos de *Cymbopogon citratus* a 0,04%, *Cymbopogon martinii* a 0,2% e *Cinnamomum sp*, a 1%, destacam-se na contenção de germinação de esporos de *Botrytis cinerea*, com base na análise estatística e menor concentração efetiva.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C. L. M. **Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais**. Botucatu, 2006. 71f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.
- AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 2, n. 2, p. 5-8, 2005.
- BHASKARA REDDY, M. V. et al. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. **Phytochemistry**, New York, v. 47, p. 1515-1520, 1998.
- JACOMETTI, M. A.; WRATTEN, S. D.; WALTER, M. Review: alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 16, n. 1, p. 154-172, 2010.
- MEDEIROS, E. A. A. et al. Sachês antimicrobianos em pós-colheita de manga. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 33, p. 363-370, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011000500046>>. Acesso em: 21 dez. 2011.
- SILVA, F. C. **Efeito *in vitro* e *in vivo* dos óleos essenciais de condimentos sobre fungos que ocorrem em pós-colheita em frutos de morango e mamão**. 2008. 85 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- TEGEGNE, G.; PRETORIUS, J. C. In vitro and in vivo antifungal activity of crude extracts and powdered dry material from Ethiopian wild plants against economically important plant pathogens. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 52, p. 877-888, 2007.
- TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K.; SHUKLA, A. K. **Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea***. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 24, p. 39-46, 2008.

TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus L.*) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 8, n. 2, p. 253-258, 2007.

TZORTZAKIS, N. G. Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 10, p. 97-102, 2009.

CAPÍTULO 3 Qualidade pós-colheita de morangos orgânicos tratados com óleos essenciais na pré-colheita

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o controle de *Botrytis cinerea* as características físico-químicas de morangos tratados em pré-colheita com óleos essenciais de plantas medicinais e armazenados sob temperaturas de 5 °C e 25°C durante 8 dias. Foram feitas as seguintes análises: firmeza, acidez titulável (AT), relação SS/AT, pH, compostos fenólicos, antocianinas, fenilalanina, peroxidase, além da análise microbiológica. As variáveis firmeza, acidez titulável (AT) e pH não foram influenciadas pelas interações (Tempo x Tratamento). As variáveis compostos fenólicos e FAL (Fenilalanina Amônia Liase) foram observadas com influência significativa pela interação temperatura x tempo. Para a concentração de antocianinas foi observado que o quarto dia e o sexto apresentaram diferenças significativas para a 25°C para os tratamentos com *Cymbopogon citratus*, sendo que no sexto dia se destacaram também os tratamentos com *Ocimum basilicum* e *Eugenia caryophyllata*. Para a peroxidase houve interação significativa dos tratamentos dentro da temperatura de armazenamento, todos os 5 tratamentos apresentaram variação dentro de alguma temperatura. Quanto à avaliação microbiológica, os pseudofrutos não apresentaram níveis detectáveis de microrganismos patogênicos à saúde humana. Não foi constatado o crescimento de *Botrytis cinerea* durante o armazenamento dos frutos a 5 °C e a 25°C.

Palavras-chave: *Fragaria x ananassa*. Óleos essenciais. Armazenamento.

ABSTRACT

The present study had as objective to evaluate the control of *Botrytis cinerea* the physic-chemical characteristics of strawberries treated pre-harvest with essential oils of medicinal plants and stored at 5°C and 25°C during 8 days. There were made the following analysis: firmness, titratable acidity (TA), SS/TA, pH, phenolic compounds, anthocyanins, phenylalanine, peroxidase, and microbiological analysis. The variable firmness, titratable acidity (TA) and pH were not affected by interactions (Time x Treatment). The variables phenolic compounds and PAL were observed with significantly influenced by the interaction temperature x time. For the anthocyanins concentration was observed that the fourth and sixth days showed significant differences at 25°C for the treatment with *Cymbopogon citratus*, and on the sixth day was also highlighted the treatments with *Ocimum basilicum* and *Eugenia caryophyllata*. For peroxidase there was significant interaction of treatments within the storage temperature, all the five treatments showed variation within some temperature. As for the microbiological evaluation pseudofruits no present detected levels of microorganisms pathogens on human health. There was no growth observed of *Botrytis cinerea* during storage of fruits at 5°C and to 25°C.

Keywords: *Fragaria x ananassa*. Essencial oil. Storage.

1 INTRODUÇÃO

Morangos são altamente perecíveis, com uma vida pós-colheita curta. A preservação pós-colheita de morangos frescos é muito complexa devido a uma atividade metabólica alta, alta taxa de respiração (50-100 mL de CO₂ kg⁻¹h⁻¹ a 20°C). A curta vida pós-colheita limita sua comercialização e as perdas podem chegar a até 40% durante o armazenamento. Métodos de conservação adequados podem minimizar as perdas e prolongar a vida útil (CANER; ADAY; DEMIR, 2008).

A deterioração pós-colheita de morangos causada por *Botrytis cinerea* (podridão mofo cinzento) representa uma grande perda durante o armazenamento e transporte. O controle desse fungo durante o armazenamento pode ser alcançado por processos físicos e métodos químicos. A exposição às elevadas e baixas temperaturas de armazenamento são eficazes na redução do desenvolvimento dos fungos. Entretanto, apenas o armazenamento à baixa temperatura não é suficiente para prolongar o tempo de armazenamento para atender mercados distantes. Bhaskara Reddy et al. (1998) observaram que a aplicação de fungicidas demonstra ser o método mais eficaz na redução de doenças pós-colheita de morangos.

O mercado consumidor de morangos frescos exige, cada vez mais, pseudofrutos com excelente padrão de qualidade, valorizando os atributos sensoriais, em especial o sabor e a coloração vermelha, bem como a ausência de defeitos. O morango apresenta muitas vezes uma imagem negativa perante o consumidor, pelo fato de ser produzido às expensas de aplicações excessivas de defensivos e fertilizantes agrícolas, em função da alta suscetibilidade a patógenos e exigência nutricional.

Propriedades antimicrobianas de óleos essenciais de várias espécies vegetais têm provado afetar o desenvolvimento de fungos *in vitro* e *in vivo*, em

vários produtos hortícolas. Compostos secundários presentes em plantas medicinais podem desempenhar funções importantes em interações planta-patógeno, por meio de ação antimicrobiana direta ou ativando mecanismos de defesa de plantas que venham a ser tratadas com esses compostos (BONALDO et al., 2004).

Segundo Mazaró (2007), a indução de resistência pode induzir a formação de compostos fenólicos, ativar as enzimas fenilalanina amônia liase e peroxidase. Pode atuar ainda na inibição de enzimas de desestruturação da parede celular sintetizada por fungos, como a poligalacturonase, pectinase e celulase, e nos compostos tais como ácidos orgânicos (oxálico e fumárico).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de óleos essenciais, armazenamento e temperatura (5°C e 25°C) no controle de *Botrytis cinerea* e nas características físico-químicas de morangos armazenados por um período de 8 dias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local, clima e solo

O experimento foi conduzido na Área de Pesquisa em Produção Orgânica de Hortaliças (APPOH) da Embrapa Hortaliças em Brasília, DF, situada na BR 060, Km 09, a uma altitude de 1150m. A variedade de morango selecionada foi a Oso Grande.

2.2 Tratamento em campo

Para testes em campo foram escolhidos 4 óleos: canela (*Cinnamomum sp.*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) e manjerição (*Ocimum basilicum*), numa concentração de 0,20%. Aplicou-se a cada 15 dias até a 10ª colheita, sendo os pseudofrutos usados para montagem do experimento oriundos da 8ª colheita. A primeira aplicação em campo foi realizada 15 dias após o transplântio das mudas de morangueiro.

A pulverização de 35 a 40 mL de calda por planta foi feita com pulverizador manual, modelo “*Super Spray*” com um reservatório de capacidade útil de 5L, com uma pressão de trabalho de 7,0 a 12,6k_j/cm², sendo uma pulverização uniforme até o início do escorrimento da calda nas plantas. A calda foi preparada com água destilada, óleo e detergente neutro como agente adesivo. A testemunha foi tratada com água.

2.3 Colheita dos frutos e armazenamento

Os frutos colhidos foram acondicionados em recipientes de polietileno tereftalato (PET) e transportados para o laboratório de pós-colheita de frutas e hortaliças da Embrapa Hortaliças – DF.

Os frutos com massa entre 13-15g e 75% da superfície com coloração avermelhada foram selecionados. Os frutos com danos físicos e mecânicos foram descartados (amassamentos, com lesões causadas por insetos ou patógenos, frutos sem sépalas ou cálice).

Após seleção, os frutos foram armazenados sob temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa (UR) variando entre 80 a 85% simulando as condições de mercado e sob 5°C com 90-95% (UR), durante 8 dias.

As avaliações foram realizadas a cada 2 dias: Tempo 0: dia da colheita; Tempo 1: 2 dias após a colheita; Tempo 2: 4 dias após a colheita; Tempo 3: 6 dias após a colheita; Tempo 4: 8 dias após a colheita.

2.4 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em fatorial $5 \times 2 \times 5$, sendo os fatores cinco níveis de óleo essencial, dois níveis do fator temperatura e 5 períodos de avaliação durante o armazenamento, com três repetições. A parcela experimental consistiu de cinco morangos, que foram acondicionados em embalagens PET.

Os resultados foram submetidos à análise de variância. A análise de regressão foi utilizada para avaliação das variáveis em função do tempo de armazenamento e o teste de Tukey (5%) para comparação das diferentes temperaturas e dos diferentes tratamentos com os óleos essenciais. As análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico Sisvar.

2.5 Firmeza

A firmeza foi determinada nos frutos inteiros na região equatorial com penetrômetro manual, com sonda de 5mm de diâmetro e os resultados foram expressos em quilograma-força (kg/f).

2.6 Acidez titulável (AT) e pH

O pH foi determinado utilizando-se um pHmetro, pH metromicroprocessado Quimis[®], segundo a *Association of Oficial Analytical Chemists - AOAC* (1998).

A acidez titulável foi determinada em um titulador automático *Metrohm 655 Dosimat* com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N, até que a solução atingisse um pH de 8,2. Utilizou-se 10 g de massa fresca, diluídos em 50 mL de água destilada, em triplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico.

2.7 Sólidos Solúveis (SS)

O teor de sólidos solúveis foi determinado por refratometria, conforme as normas da AOAC (1998), utilizando-se de refratômetro digital ATAGO[®] e os resultados foram expressos em °*Brix*.

2.8 Determinação de fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado utilizando o reagente *Folin-Ciocalteu*. Cem miligramas de amostra foram agitados por 20 min. com metanol à temperatura ambiente em um agitador a 200 rpm. A mistura

foi centrifugada a 5000 rpm por 10 min. e do sobrenadante foi retirada uma alíquota de 600 μL que foi misturada com 2000 μL de carbonato de sódio a 20%, 1000 μL de *Folin-Ciocalteu* e 400 μL de etanol. A mistura foi agitada e centrifugada por mais 15 minutos e deixada em repouso por mais 20 minutos. A absorbância foi medida em 735nm com espectrofotômetro UV-Vis (Biospectro SP 220). Os resultados foram expressos em mgAG. 100g^{-1} amostra (NUUTILA et al., 2003).

2.9 Determinação de antocianinas

Para a determinação de antocianinas pesou-se 1g de amostra extraindo-as em solução etanol-HCl (1,5N). Após homogeneização as amostras ficaram em repouso por 12 h sob refrigeração e após esse período efetuou-se a leitura. As leituras espectrofotométricas foram feitas a 535nm e os resultados foram expressos em mg. 100g^{-1} de amostra fresca (FIGUEREDO et al., 2008).

2.10 Atividade da fenilalanina amônia liase (FAL)

A atividade da FAL foi estimada com base na diferença de absorbância resultante da conversão da fenilalanina em ácido transcinâmico (HYODO; KUROOA; YANG, 1978). Um grama da amostra foi macerado e acrescentado 3mL da solução-tampão TRIS, contendo 1mM de EDTA. Em seguida a mistura foi homogeneizada e centrifugada por 10 minutos a 10.000g a 4°C e do sobrenadante foi retirada uma alíquota de 0,5mL, acrescentado 2mL de tampão TRIS e 0,5mL de solução de fenilalanina. A mistura foi incubada por 30 minutos a 40°C . A absorbância das amostras foi determinada a 290 nm. A atividade enzimática foi expressa em unidade de atividade enzimática por minuto por grama de amostra ($\text{UAE. min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de amostra).

2.11 Atividade da peroxidase (PER)

A atividade da PER foi estimada com base na diferença de absorbância, produzida com a oxidação do guaiacol e concomitante redução do peróxido de hidrogênio (DANN; DEVERALL, 2000). Um grama da amostra foi pesado, macerado e acrescentado 3mL da solução-tampão de acetato de sódio contendo 1mm de EDTA. A mistura foi homogeneizada e centrifugada por 10 minutos a 10.000g a 4°C. Pipetou-se para uma cubeta espectrofotométrica 50μL de guaiacol, 0,5mL de peróxido de hidrogênio e 2 mL de tampão de sódio e por fim adicionou-se 50μL de extrato enzimático. As leituras espectrofotométricas foram feitas a 470nm. A atividade da peroxidase foi expressa em unidade de atividade enzimática por minuto por grama de amostra (UAE. min⁻¹.g⁻¹ de amostra).

2.12 Avaliação da incidência de *Botrytis cinerea* (mofo cinzento) e aparência

Para a avaliação da incidência de *Botrytis cinerea*, amostras de pseudofrutos de cada tratamento em campo foram colhidas e acondicionadas em câmara úmida.

A incidência de pseudofrutos infectados foi determinada pela análise visual diária dos sintomas e sinais típicos de *B. cinerea*, e microscópica para a confirmação mediante observação das estruturas do patógeno. Neste presente trabalho foi avaliado o patógeno *B. cinerea*, não descartando a possibilidade de se avaliar posteriores patógenos decorrentes na pós-colheita.

A avaliação da aparência foi feita de forma visual, levando em consideração os aspectos físicos dos morangos, os quais estavam aptos ou não para análise e consumo.

2.13 Avaliação microbiológica

Coletou-se as amostras dos frutos maduros e encaminhou-se para análise, sendo divididas em 2 tipos de amostras: lavadas e não lavadas para identificação de *Salmonella* e Coliformes Termotolerantes, realizadas pelo Laboratório *SabinBiotec* Biotecnologia S/A, sendo utilizada a metodologia determinada pela Instrução Normativa nº 62 de 26/08/03 (BRASIL, 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Firmeza, Acidez titulável (AT), SS/AT e pH

As variáveis firmeza, acidez titulável (AT), pH e sólidos solúveis (SS) foram influenciadas apenas pela interação tempo x temperatura de armazenamento, não tendo sido influenciadas pelo tratamento com óleos essenciais (Gráficos 1-4).

Tendência de queda na firmeza de morangos foi observada até o quarto dia (0,24 e 0,50 kgf) de armazenamento, independente da temperatura, embora mais acentuada nos pseudofrutos armazenados a 25°C. Morangos armazenados a 5°C mostraram-se mais firmes que aqueles armazenados a 25°C.

A queda da firmeza representa o amaciamento do fruto. Logo, a manutenção da firmeza da polpa dos morangos é importante para o prolongamento de sua vida pós-colheita. Os resultados demonstrados na Figura 1 confirmam o efeito positivo da refrigeração na contenção do amaciamento e consequentemente, no prolongamento da vida útil de morangos. Frutos mais firmes, em geral, estão associados à melhor conservação e aspecto visual, sendo, portanto, preferidos pelos consumidores (CALEGARO; PEZZI; BENDER, 2002). Em geral, o teor de ácidos orgânicos diminui com o amadurecimento de frutos, tal como eles são utilizados como substrato ou são convertidos em açúcares (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Além disso, os compostos fenólicos também têm um caráter ácido e podem de alguma forma contribuir para a acidez na polpa.

A natural perda da firmeza nos pseudofrutos pode estar relacionada com a solubilização das pectinas, uma vez que o processo de solubilização das substâncias pécticas contribui para o amaciamento dos tecidos das frutas em

decorrência da redução da força de coesão entre as células (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

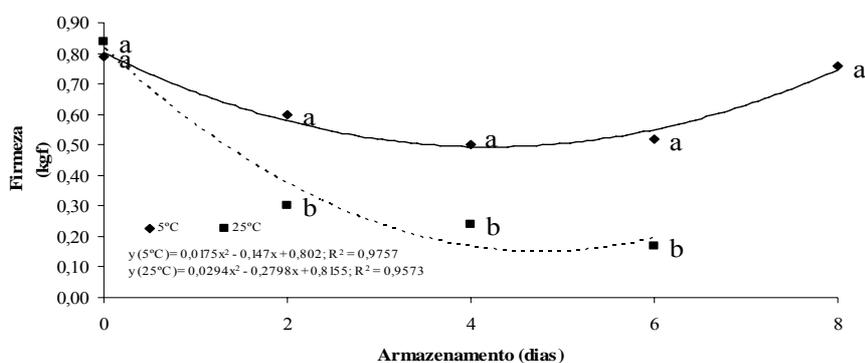


Gráfico 1 Valores médios de firmeza em morangos orgânicos armazenados durante 8 dias a 5°C e 25°C. Brasília, DF, 2010

Observou-se elevação do pH de morangos armazenados a 25°C, ao longo do armazenamento, enquanto o pH de morangos armazenados a 5°C manteve-se estável, elevando-se apenas a partir do 6º dia. A temperatura não determinou variações significativas no pH dos pseudofrutos, durante o armazenamento (Gráfico 2).

Os valores de pH foram similares aos observados por Pádua et al. (2006); o pH do morango é ácido e variável de acordo com o estágio de desenvolvimento do fruto. Os frutos verdes possuem pH de 3,5 a 4,6, que reduz até 3,1 a 3,3 quando os frutos atingem o estágio branco, provavelmente como resultado do aumento da síntese de ácidos orgânicos, porém quando os frutos amadurecem e os ácidos orgânicos são metabolizados ou diluídos, pelo aumento do volume celular, o pH aumenta para 3,5 a 3,7.

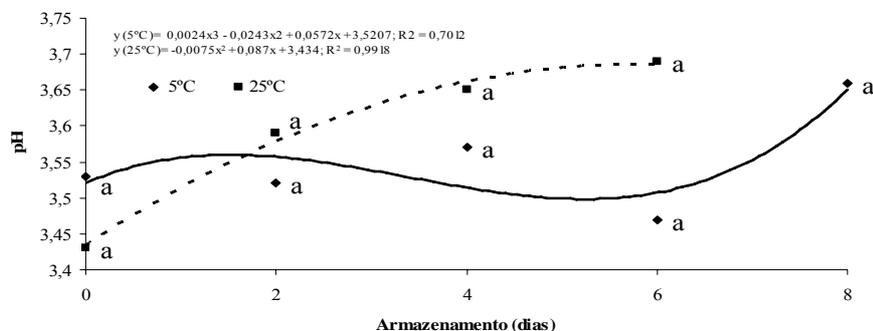


Gráfico 2 Valores médios de pH em morangos orgânicos armazenados durante 8 dias a 5°C e 25°C. Brasília, DF, 2010

As temperaturas de armazenamento não determinaram diferenças significativas, ao longo do período de armazenamento, para a variável AT, sendo que a AT oscilou ligeiramente (0,12 a 0,16%), independente da temperatura ao longo do armazenamento (Gráfico 3). De acordo com Calegari, Pezzi e Bender (2002), os ácidos orgânicos tendem a diminuir durante o amadurecimento dos frutos, em virtude de sua utilização como substrato respiratório, o que não foi observado nos morangos armazenados por até oito dias, no presente experimento.

Em geral, o teor de ácidos orgânicos diminui com o amadurecimento de frutos, tal como eles são utilizados como substrato ou são convertidos em açúcares (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Além disso, os compostos fenólicos também têm um caráter ácido e podem de alguma forma contribuir para a acidez na polpa.

Os valores de AT observados no Gráfico 3, entre 0,12 e 0,16 %, são inferiores aos descritos por Domingues (2000), entre 0,85 e 0,99 e por Campos, Kwiatkowski e Clemente (2011), que foi de 1,03 % considerando-se o ácido cítrico como predominante.

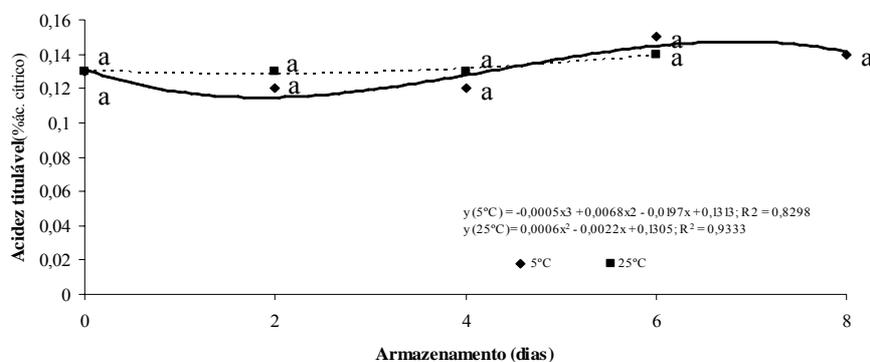


Gráfico 3 Valores médios de acidez titulável em morangos orgânicos armazenados durante 8 dias a 5°C e 25°C. Brasília, DF, 2010

De acordo com o Gráfico 4, houve um aumento na concentração de SS ao final do armazenamento dos morangos para ambas as temperaturas.

Galletta et al. (1995) relataram que o teor de SS em morangos situa-se, geralmente na faixa de 7-12%, dependendo do genótipo. Braga et al. (2011) observaram, em morangos cultivados sob sistema orgânico, SS de 10,9% em Camarosa, 9,3% em Festival; 7,9% em Oso Grande e 8,9% em Camino Real. Observou-se no presente estudo que as médias de SS estão abaixo dos valores verificados pelos autores citados acima.

Segundo Kallio et al. (2000), os teores de açúcares em morangos, principais representantes dos SS, são considerados importantes fatores de qualidade tanto pelos consumidores e pela indústria de alimentos. Alguns fatores podem afetar a quantidade de açúcar nos frutos, como, estágio de maturação, idade das plantas, a qualidade de solo e genótipo da variedade.

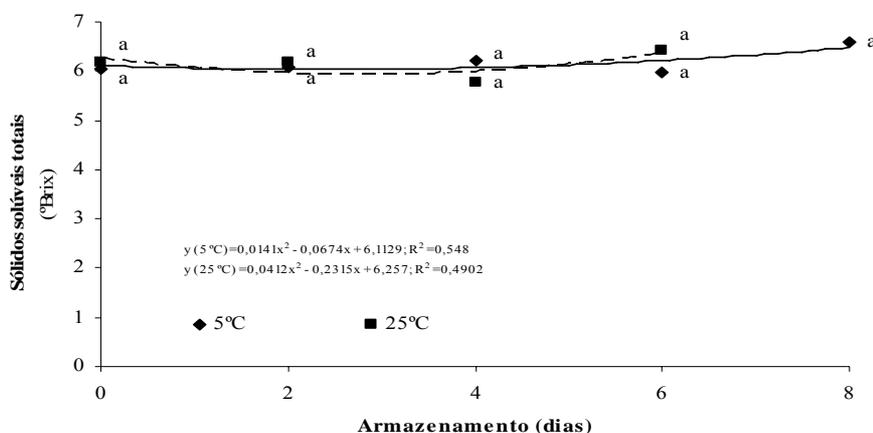


Gráfico 4 Valores médios de sólidos solúveis totais em morangos orgânicos armazenados durante 8 dias a 5°C e 25°C. Brasília, DF, 2010

A variável SS/AT foi influenciada pelas interações tempo x óleo (Gráfico 5) e tempo x temperatura (Gráfico 6).

Independentemente dos óleos essenciais utilizados, observou-se comportamento quadrático da variável SS/AT, com elevação, nos primeiros dias de armazenamento, seguida de queda, sendo os menores valores observados ao final do armazenamento (Gráfico 5). Três tratamentos apresentaram valores significativos, foram eles *Eugenia caryophyllata*, *Cymbopogon citratus* e a Testemunha.

Observou-se oscilação da relação SS/AT, ao longo do armazenamento, sendo que essa variável não foi afetada pela temperatura de armazenamento (Gráfico 6).

Cantillano et al. (2008) encontraram valores de SST/ ATT entre 8 e 9,5, para os cultivares Camino Real, Aromas e Ventana, submetidos ao armazenamento refrigerado. Os valores obtidos no presente trabalho são superiores aos encontrados por este autor, apresentando um potencial mais ácido para a cultivar Oso Grande.

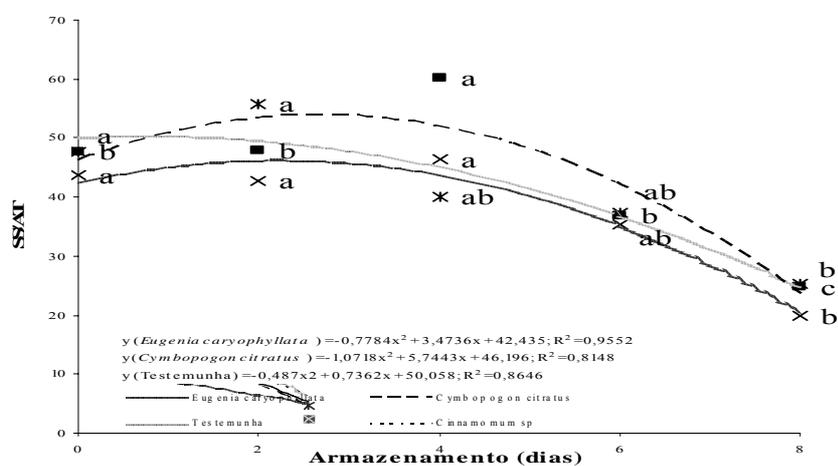


Gráfico 5 Valores médios de SS/AT em morangos orgânicos armazenados durante 8 dias e tratados com óleos essenciais em pré-colheita. Brasília, DF, 2010

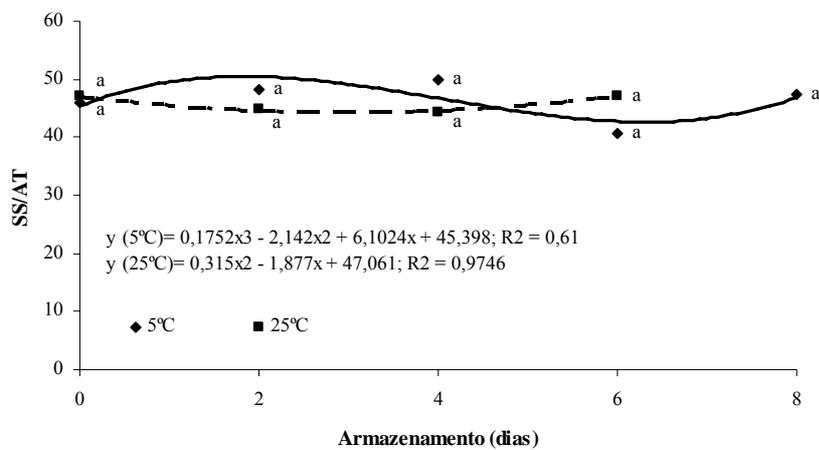


Gráfico 6 Valores médios de SS/AT em morangos orgânicos armazenados durante 8 dias a 5°C e 25°C. Brasília, DF, 2010

3.2 Compostos fenólicos totais

A variável composto fenólicos foi influenciada significativamente pela interação temperatura x tempo (Gráfico 7), não tendo sido influenciada pelos tratamentos com óleos essenciais. Ocorreu diminuição dos compostos fenólicos a partir do 2º e 4º dias de armazenamento dos morangos submetidos a 25º e 5ºC, respectivamente, embora nenhuma diferença tenha sido detectada para essa variável, em função da temperatura, ao longo do armazenamento.

Cordenunsi et al. (2005) estudaram o efeito da temperatura na composição química e capacidade antioxidante de três cultivares de morango, observando que em baixas temperaturas os teores de antocianinas e vitamina C foram afetados negativamente, enquanto os teores de fenólicos totais não foram afetados.

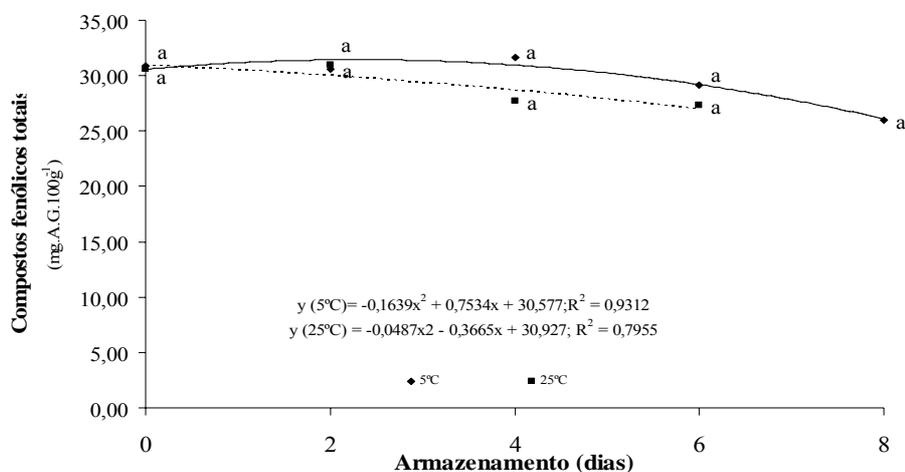


Gráfico 7 Valores médios de compostos fenólicos totais em morangos orgânicos armazenados durante 8 dias a 5°C e 25°C. Brasília, DF, 2010

Os teores de compostos fenólicos totais dos pseudofrutos armazenados a 5°C e 25°C foram inferiores aos relatados por Kuskoski et al. (2006), que avaliaram o teor de compostos fenólicos em frutos de clima temperado, como maçã (321-474 mg.100g⁻¹), pera (271-408 mg.100g⁻¹), kiwi (274,4 mg.100g⁻¹), ameixa (471,4 mg.100g⁻¹), uva (117,1 mg.100g⁻¹), amora (118,1 mg.100g⁻¹) e morango (132,1 mg.100g⁻¹).

3.3 Antocianinas

As antocianinas foram afetadas significativamente pela interação tripla dos fatores tempo de armazenamento, temperatura e tratamento. O tratamento com óleos essenciais determinou diferenças significativas nas antocianinas de morangos, apenas no quarto e sexto dias, para os pseudofrutos armazenados a 25°C e no sexto dia, para aqueles armazenados a 5°C (Tabela 1). O tratamento com óleo de *Cymbopogon citratus* determinou maiores teores de antocianinas em morangos armazenados a 25°C, em comparação à testemunha, no quarto dia, o mesmo acontecendo ao sexto dia, com relação ao mesmo óleo, bem como aos óleos de *Ocimum basilicum* e *Eugenia caryophyllata*. Já para os pseudofrutos armazenados por 6 dias a 5°C, notou-se que o óleo de *Cinnamomum sp* determinou maiores concentrações de antocianinas em comparação ao óleo de *Eugenia caryophyllata*, sendo que nenhuma diferença foi detectada entre morangos testemunha e aqueles tratados com óleos essenciais.

O teor de antocianinas nos pseudofrutos de morangos tende a se acumular durante o amadurecimento (Nunes et al. 2006), sendo a pelargonidina-3-glicosídica, a antocianina mais comum encontrada em morango (HOLCROFT; KADER, 1999)

A temperatura de 25°C determinou maior concentração de antocianinas, no segundo dia de armazenamento, nos pseudofrutos tratados com *Cymbopogon*

citratum, no quarto dia, naqueles tratados com *Cymbopogon* e Testemunha e no sexto dia, naqueles tratados com *Ocimum basilicum*, *Cymbopogon citratus* e *Eugenia caryophyllata*. Logo, observou-se uma tendência de contenção do acúmulo de antocianinas pela refrigeração. Os morangos armazenados a 25°C apresentaram maior coloração avermelhada no momento das análises. Gross (1973) cita que o maior teor de antocianinas no estágio maduro é justificado pela síntese desses pigmentos que ocorre durante o seu amadurecimento, atingindo o valor máximo no fruto completamente maduro.

Valores semelhantes do teor de antocianinas foram encontrados por Calvete et al. (2008) para as cultivares Camarosa (38,01 mg 100 g⁻¹), Serrano (56 mg 100 g⁻¹) e Comander (54 mg 100 g⁻¹).

Tabela 1 Pigmentos de antocianina em morangos orgânicos armazenados durante 8 dias a 5°C e 25°C e tratados com óleos essenciais em pré-colheita. Brasília, DF, 2010

Temperatura	Antocianinas (mg100g ⁻¹)				
	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Cinnamomum sp</i>	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Testemunha
0 dias					
5°C	17.46 Aa	31.30 Aa	26.96 Aa	18.18 Aa	39.39 Aa
25°C	24.96 Aa	25.02 Aa	27.67 Aa	20.38 Aa	35.59 Aa
2 dias					
5°C	20.89 Aa	15.68 Ba	24.34 Aa	35.73 Aa	32.58 Aa
25°C	30.94 Aa	53.44 Aa	29.04 Aa	39.51 Aa	36.86 Aa
4 dias					
5°C	41.18 Aa	34.87 Ba	41.95 Aa	31.72 Aa	28.21 Ba
25°C	41.51 Abc	83.91 Aa	60.67 Abc	31.66 Ac	64.27 Ab
6 dias					
5°C	24.99 Bab	27.91Bab	54.36 Aa	22.16 Bb	32.97 Aab
25°C	66.95 Aa	62.43 Aa	47.07 Aab	64.93 Aa	30.00 Ab
8 dias					
5°C	29.13 Aa	28.83 Aa	35.02 Aa	29.37 Aa	29.63 Aa
25°C	-	-	-	-	-

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, dentro de cada tempo de armazenamento, não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Ayala-Zavala et al. (2004) relataram que as antocianinas diminuíram em morangos armazenados a 0°C e 5°C durante os primeiros 5 dias, enquanto, os teores de antocianinas em frutos armazenados a 10°C aumentaram progressivamente durante o período de armazenamento e atingiram seu maior valor próximo ao final do armazenamento período.

O pH destaca-se como o mais importante fator que afeta a coloração das antocianinas (MAZZA; BROUILLARD, 1987).

3.4 Fenilalanina amônia liase (FAL)

A atividade da fenilalanina amônia liase (FAL) foi influenciada apenas pela interação entre os fatores tempo x temperatura, não tendo sido afetada pelo tratamento com óleos essenciais, seja isolada, seja interativamente. Ao longo do armazenamento a 5°C e 25°C, foi observada uma tendência linear de aumento da atividade da FAL. As temperaturas de armazenamento não interferiram diferentemente na atividade da FAL dos morangos, em nenhum dos tempos de análise (Gráfico 8).

O aumento na atividade da FAL pode ser associado ao acúmulo de antocianinas, visto que a FAL é uma enzima-chave na rota de síntese desses compostos. Entretanto, o acúmulo de antocianinas nos pseudofrutos armazenados a 25°C, se deu, em geral, até o quarto dia de armazenamento. O posterior aumento da atividade da FAL pode, então, ser associado, a uma reação natural do órgão vegetal ao ataque de patógenos, observado ao final do armazenamento.

Taiz e Zeiger (2004) relataram que a atividade da FAL pode ser aumentada por fatores ambientais, tais como baixos níveis de nutrientes, luz e infecção por fungos.

Os compostos fenólicos de vegetais são biossintetizados de várias maneiras; nas plantas superiores a maioria dos fenóis é derivada, pelo menos em parte, da fenilalanina, o que indica que o teor de fenólicos aumenta de acordo com a FAL, mas isso não foi constatado no presente trabalho, pois a medida em que a FAL aumentou ao longo do armazenamento os compostos fenólicos totais tenderam a diminuir sua concentração.

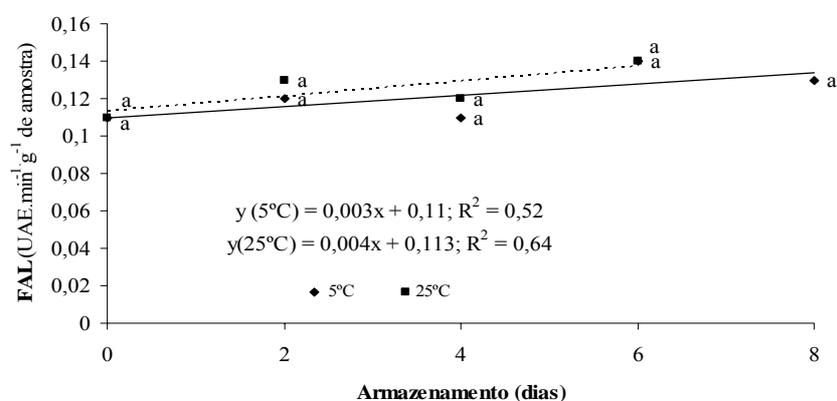


Gráfico 8 Valores médios da atividade da FAL em morangos orgânicos armazenados durante 8 dias a 5°C e 25°C. Brasília, DF, 2010

3.5 Peroxidase

A variável peroxidase foi influenciada pela interação tempo x tratamento x temperatura (Tabela 2). Os óleos essenciais pouco interferiram na atividade da PER, em comparação à testemunha. Maior atividade de PER foi observada nos pseudofrutos provenientes de plantas tratadas com *Ocimum basilicum*, aos 4 e 6 dias de armazenamento a 5°C e aos 4 dias de armazenamento a 25°C e tratadas com *Cinamomum sp.* e *Eugenia caryophyllata*, aos 2 dias a 5°C e 25°C, respectivamente.

Peroxidase é uma enzima relacionada com o mecanismo de defesa da planta e um aumento na atividade está frequentemente associado à incorporação progressiva de compostos fenólicos na parede celular durante interações planta-

patógeno (BARBOSA; LARANJEIRA; RILDO, 2008). Logo, a maior atividade da PER pode estar relacionada ao estímulo dos óleos essenciais aos mecanismos de defesa do morangueiro, em especial *Ocimum basilicum*.

Tabela 2 Peroxidase em morangos orgânicos armazenados durante 8 dias a 5°C e 25°C e tratados com óleos essenciais em pré-colheita. Brasília, DF, 2010

Temperatura	Peroxidase (UAE.min ⁻¹ .g ⁻¹ de amostra)				
	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Cinnamomum sp</i>	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Testemunha
0 dias					
5°C	0.000123 Aa	0.000083 Aa	0.000170 Aa	0.000143 Aa	0.000203 Aa
25°C	0.000143 Aa	0.000097 Aa	0.000130 Aa	0.000130 Aa	0.000163 Aa
2 dias					
5°C	0.000210Abc	0.000090 Bc	0.000447 Aa	0.000277 Bbc	0.000290 Ab
25°C	0.000123Ab	0.000243 Ab	0.000087 Bb	0.000683 Aa	0.000150 Ab
4 dias					
5°C	0.000487 Aa	0.000250 Ab	0.000190 Ab	0.000117 Ab	0.000087 Bb
25°C	0.000467 Aa	0.000227 Abc	0.000053 Ac	0.000097 Abc	0.000263 Ab
6 dias					
5°C	0.000340 Aa	0.000157 Abc	0.000117 Abc	0.000067 Bc	0.000277 Ab
25°C	0.000080 Bb	0.000190 Aab	0.000137 Ab	0.000230 Aab	0.000373 Aa
8 dias					
5°C	0.000220 Aa	0.000230 Aa	0.000230 Aa	0.000363 Aa	0.000320 Aa
25°C	-	-	-	-	-

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

A peroxidase é uma importante enzima das plantas, está envolvida em diversas reações, ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol 3 acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos, regulação da alongação de células e outras (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Segundo Boava et al. (2010), embora as peroxidases não possam ser utilizadas como marcadores de resistência, a alteração na sua atividade é um indício de metabolismo alterado. Uma das funções das peroxidases é a formação

da lignina pela polimerização de fenóis. Assim sendo, é esperado que alterações na atividade de peroxidases envolvam também alteração na atividade de outras enzimas presentes na mesma rota metabólica. Devido a esses fatos, as peroxidases são usadas em estudos de indução de resistência, não como um marcador, mas sim como uma das muitas respostas de defesa manifestadas pelas plantas.

3.6 Avaliação da incidência de *Botrytis cinerea*

A avaliação, para verificar a incidência de *Botrytis cinerea* nos pseudofrutos de morango, foi feita coletando-se frutos de cada tratamento no campo e acondicionando-os em câmaras úmidas, observando-se após 3 dias estruturas miceliais características do fungo, visualmente e em microscópio.

No presente estudo não foi constatado o crescimento de *Botrytis cinerea* a 5 °C e 25 °C durante o período de 8 dias de armazenamento. Visto que o fungo não se desenvolveu nem mesmo nos frutos testemunha, não foi possível avaliar o efeito dos óleos essenciais sobre o seu desenvolvimento. O fungo *Botrytis cinerea* desenvolve sob temperaturas relativamente baixas, em torno de 5 °C a 10 °C (RIBEIRO JÚNIOR; DIAS, 2005).

Segundo Almeida e Camargo (2009), os patógenos identificados em pós-colheita em morangos foram *Rhizopus sp.*, *Penicillium sp.* e *Botrytis sp.*. Analisados isoladamente, os extratos de *Ruta graveolens*, *Zinziber officinales*, *Cymbopogon citratus*, *Catharanthus raseus*, *Artemísia absinthium*, *Nicotiana tabacum*, *Curcuma longa*, *Solidago chilensis*, *Azadirachta indica*, *Allium sativum* e *A. cepa*, não foram eficientes no controle de *Botrytis sp.* e *Penicillium sp.*, havendo diferença significativa apenas para *Rhizopus sp.*. Os extratos de arruda, gengibre e fumo controlaram em 100% *Rhizopus sp.* e apenas o extrato de vinca apresentou controle sobre a incidência de *Penicillium sp.*.

Observou-se no presente estudo, o crescimento do fungo *Rhizopus nigricans*, que manifesta-se durante o transporte e armazenamento do pseudofruto, e pode ser identificado visualmente e também ao microscópio (Figura 1).

Os pseudofrutos armazenados à temperatura ambiente apresentaram alta incidência de *Rhizopus nigricans*, em comparação aos armazenados a 5°C, a despeito da aplicação de óleos essenciais, que aparentemente não influenciaram no desenvolvimento do fungo (Figura 1). *Rhizopus nigricans* se desenvolve em temperaturas superiores a 10 °C e umidade alta (RIBEIRO JÚNIOR; DIAS, 2005). Esse fungo tem um crescimento muito rápido, levando o fruto à podridão em questão de horas.

De acordo com Boro, Beriam e Guzzo (2011), o tratamento de plantas com indutores de resistência pode promover uma supressão ocasional, resultando em maior susceptibilidade dos hospedeiros ao agente patogênico.

A rápida deterioração deve ser também atribuída ao manejo da temperatura de armazenagem. Temperaturas acima de 0°C permitem um metabolismo mais acelerado, contribuindo para uma senescência mais rápida.

As análises subjetivas dos pseudofrutos indicam que eles mantiveram qualidade de comercialização até o oitavo dia, mas apenas os armazenados a 5°C. Com oito dias de armazenagem, os morangos a 25°C não apresentaram boa qualidade (Figura 1).

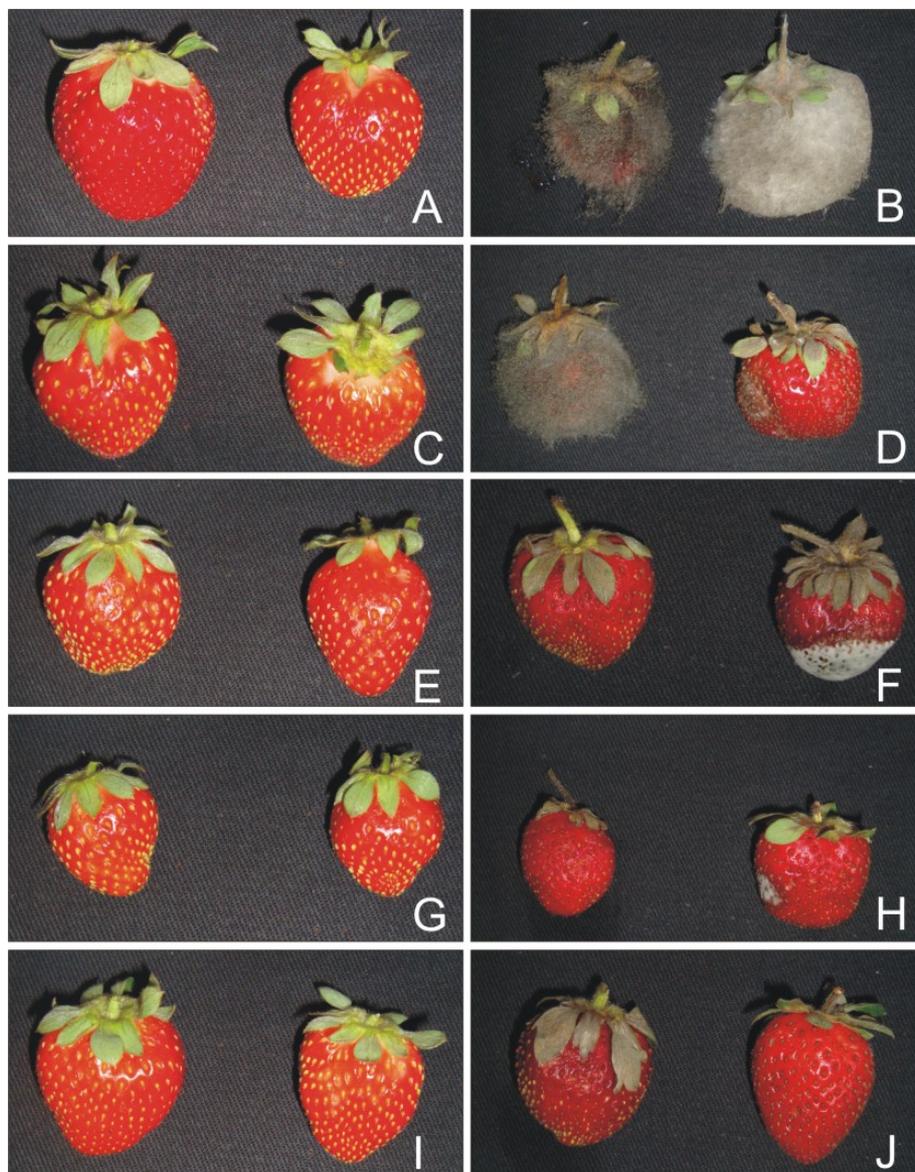


Figura 1 Morangos tratados com óleos essenciais de *Ocimum basilicum* (A e B), *Cymbopogon citratus* (C e D), *Cinnamomum sp.* (E e F), *Eugenia caryophyllata* (G e H), e Testemunhas (I e J) no 8º dia de armazenamento a 5 °C (coluna da esquerda) e em temperatura ambiente (coluna da direita)

3.7 Avaliação microbiológica

Avaliou-se microbiologicamente os morangos orgânicos oriundos de plantas submetidas ao tratamento com os diferentes óleos essenciais. A presença de *Salmonella* não foi verificada nos morangos analisados, a despeito da aplicação de óleos essenciais. A contagem de coliformes termotolerantes situou-se abaixo do valor máximo permitido, para todas as amostras, independente da aplicação de óleos essenciais, exceto nos morangos não tratados com óleos e não lavados (Tabela 3). A amostra de morango que não foi lavada e que corresponde a testemunha, onde utilizou-se apenas água na aplicação em campo, apresentou um elevado número de Coliformes Termotolerantes ($2,2 \times 10^4$ UFC/g). Logo, os óleos essenciais se mostraram efetivos no controle de coliformes termotolerantes, embora tal efetividade possa ser compensada por uma simples lavagem dos morangos após a colheita. Práticas higiênicas e sanitárias dos funcionários durante o processo de produção, colheita, classificação, empacotamento e transporte, além do controle de qualidade da água e dos insumos tem um papel crítico na minimização do potencial de contaminação microbiana de morangos (MATTOS; CANTILLANO, 2009).

Tabela 3 Parâmetros microbiológicos analisados de frutos de morango cultivados em sistema orgânico com aplicação de óleos essenciais

Tratamentos	<i>Salmonella</i> (VMP*: AUSÊNCIA/25g)		Coliformes Termotolerantes (VMP*: 100 UFC/g)	
	Amostra Lavada	Amostra não lavada	Amostra Lavada	Amostra não lavada
<i>Ocimum basilicum</i>	Ausência	Ausência	<1x10	<1x10
<i>Cymbopogon citratus</i>	Ausência	Ausência	<1x10	<1x10
<i>Cinnamomum</i> sp.	Ausência	Ausência	<1x10	<1x10
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Ausência	Ausência	<1x10	<1x10
Testemunha (Água)	Ausência	Ausência	<1x10	$2,2 \times 10^4$

*VMP: Valor Máximo Permitido

4 CONCLUSÕES

As variáveis firmeza, sólidos solúveis, pH, acidez titulável, fenólicos e atividade da fenilalanina amônia liase não foram influenciadas pelos tratamentos com óleos essenciais.

A refrigeração foi efetiva na contenção do amaciamento de morangos, ao longo do armazenamento, embora não tenha interferido nas variáveis, pH, AT,SS, fenólicos e atividade da fenilalanina amônia liase.

O tratamento com óleos essenciais não interferiu no teor de antocianinas de morangos armazenados a 5°C, em comparação à testemunha.

O tratamento com *Cymbopogon citratus* determinou maiores concentrações de antocianinas em morangos armazenados por 4 e 6 dias a 25°C e os tratamentos com *Ocimum basilicum* e *Eugenia caryophyllata*, em morangos armazenados por 6 dias a 25°C, em comparação à testemunha.

O tratamento com *Ocimum basilicum* foi o mais efetivo no aumento da atividade de peroxidase, enzima associada à resistência vegetal.

Os morangos analisados, provenientes ou não de plantas tratadas com óleos essenciais, não foram acometidos por *Botrytis cinerea*.

Os morangos orgânicos produzidos foram considerados seguros microbiologicamente, independente da utilização de óleos essenciais, desde que lavados antes do consumo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, T. F. A.; CAMARGO, M. P. R. C. Efeito de estratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 3, p. 196-201, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-54052009000300006>>. Acesso em 22 nov. 2011.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Washington, 1998. p. 3-120.
- AYALA-ZAVALA, J. F. et al. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 37, p. 687-695, 2004.
- BARBOSA, M. A. G.; LARANJEIRA, D. C.; RILDO S. B. Physiological cost of induced resistance in cotton plants at different nitrogen levels. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 34, n. 4, p. 338-341, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-54052008000400007>>. Acesso em: 23 dez. 2011.
- BHASKARA REDDY, M. V. et al. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. **Phytochemistry**, New York, v. 47, p. 1515-1520, 1998.
- BOAVA, L. P. et al. Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 36, n. 2, p. 168-172, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-54052010000200012>>. Acesso em: 21 dez. 2011.
- BONALDO, S. M. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 128-134, 2004.
- BORO, M. C.; BERIAM, L. O. S.; GUZZO, S. D. Induced resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in passion fruit plants. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 74-80, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762011000200002>>. Acesso em: 26 nov. 2011.

BRAGA, D. O. et al. Armazenamento de quatro cultivares de morangos cultivados em sistema orgânico. In: SIMPÓSIO DE ALIMENTOS, 1., 2011, Rio Paranaíba. **Anais...** Rio Paranaíba: UFV, 2011. p. 8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, de 18 de set. 2003. Seção 1, p. 14.

CALEGARO, J. M.; PEZZI, E.; BENDER, R. J. Utilização de atmosfera modificada na conservação de morangos em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 8, p. 1049-1055, ago. 2002.

CALVETE, E. O. et al. Fenologia, produção e teor de antocianinas de cultivares de morangueiro em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 30, n. 2, p. 396-401, 2008. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452008000200022>>. Acesso em: 22 nov. 2011.

CAMPOS, R. P.; KWIATKOWSKI, A.; CLEMENTE, E. Post-harvest conservation of organic strawberries coated with cassava starch and chitosan. **Revista Ceres**, Lavras, v. 58, n. 5, p. 554-560, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2011000500004>>. Acesso em: 22 dez. 2011.

CANER, C.; ADAY, M. S.; DEMIR, M. Extending the quality of fresh strawberries by equilibrium modified atmosphere packaging. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 227, p. 1575-1583, 2008.

CANTILLANO, R. F. F. et al. **Qualidade físico-química e sensorial de cultivares de morango durante o armazenamento refrigerado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 29 p.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/FAEPE, 2005. 735 p.

CORDENUNSI, B. R. et al. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. **Food Chemistry**, Oxford, v. 91, p. 113-121, 2005.

DANN, E. K.; DEVERALL, B. J. Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. **Plant Pathology**, London, v. 49, p. 324-333, 2000.

DOMINGUES, D. M. **Efeito da radiação gama e embalagem na conservação de morangos "Toyonoka" armazenados sob refrigeração**. 2000. 58 p. Dissertação - (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

FIGUEREDO, M. J. M. et al. **Metodologia para obtenção de antocianinas de frutos de Juçara (*Euterpe edulis*)**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. Comunicado Técnico, 20.

GALLETTA, G. J. et al. 'Mohawk' strawberry. **HortScience**, Alexandria, v. 30, p. 631-634, 1995.

GROSS, J. et al. Carotenoids in pulp, peel and leaves of *Persea americana*. **Phytochemistry**, New York, v. 12, p. 2259-2263, 1973.

HOLCROFT, D. M.; KADER, A. A. Controlled atmosphere - induced changes in pH and organic acid metabolism may affect color of stored strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 17, n. 14, p. 19-32, 1999.

HYODO, H.; KUROO, H.; YANG, S.F. Induction of phenylalanine ammonia lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 62, p. 31-35, 1978.

KALLIO, H. et al. Sugars and acids of strawberry varieties. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 212, p. 81-85, 2000.

KUSKOSKI, E. M. et al. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

MATTOS, M. L. T.; CANTILLANO, R. F. F. **Riscos microbianos na produção integrada de morango**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009.

MAZARO, S. M. **Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores**. 2007. 105 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. **Food Chemistry**, London, v. 25, p. 207-225, 1987.

NUUTILA, A. M. et al. Comparison of antioxidante activities of onion and garlic by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. **Food Chemistry**, London, v. 81, p. 485-93, 2003.

PÁDUA, J. G. et al. Características físico-química de frutos de cultivares de morangueiro. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 3., 2006, Pelotas; ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 2., 2006, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 1 CD ROM.

RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; DIAS, M. S. C. Doenças do maracujá. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 228, p. 36-39, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre. Artmed, 2004.