



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ALESSANDRA MACEDO BARROS

**CONTROLE PREVENTIVO DE DOENÇAS PÓS-COLHEITA EM
CITROS (Laranja, Mexerica e Limão) UTILIZANDO ÓLEO
ESSENCIAL DE NONI e *Saccharomyces cerevisiae***

**GURUPI (TO)
2022**

ALESSANDRA MACEDO BARROS

**CONTROLE PREVENTIVO DE DOENÇAS PÓS-COLHEITA EM
CITROS (Laranja, Mexerica e Limão) UTILIZANDO ÓLEO
ESSENCIAL DE NONI e *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Talita Pereira de Souza Ferreira

**GURUPI (TO)
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

B277c Barros, Alessandra Macedo.

CONTROLE PREVENTIVO DE DOENÇAS PÓS-COLHEITA EM CITROS
(Laranja, Mexerica e Limão) UTILIZANDO ÓLEO ESSENCIAL DE NONI e
Saccharomyces cerevisiae. / Alessandra Macedo Barros. – Gurupi, TO, 2022.

68 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em
Biotecnologia, 2022.

Orientador: Talita Pereira de Souza Ferreira

Coorientador: Gil Rodrigues dos Santos

1. *Morinda citrifolia*. 2. Controle biológico. 3. Levedura. 4. Frutos cítricos.
I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

ALESSANDRA MACEDO BARROS

CONTROLE PREVENTIVO DE DOENÇAS PÓS-COLHEITA EM CITROS
(Laranja, Mexerica e Limão) UTILIZANDO ÓLEO ESSENCIAL DE NONI e
Saccharomyces cerevisiae

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em 18/03/2022 foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data da aprovação: 18 / 03 / 2022.

Banca Examinadora:



Dr^a. Talita Pereira de Souza Ferreira – Orientadora – UFT



Dr. Gil Rodrigues dos Santos – Examinador – UFT



Dr^a. Michele da Cunha Abreu Xavier – Examinadora – UFT



Dr^a. Dalmarcia de Souza Carlos Mourão – Examinadora – UFT

Gurupi (TO)
2022

AGRADECIMENTOS

Agradecer primeiramente a Deus por seus cuidados e maravilhas quanto a mim e aos meus sonhos. Cada conquista até aqui, incluindo está atual, teve, tem e sempre terá o cuidado de Deus em cada detalhe. Pois, até aqui me ajudou o Senhor.

Agradecer a minha Família, ao meu pai minha mãe e meus irmãos, por sempre estarem comigo e me apoiando.

Agradecer a Professora Talita pelo acompanhamento durante todo o desenvolvimento da pesquisa e a sua contribuição em mais uma etapa importante para o meu sucesso profissional.

Agradecer ao Professor Gil, a Dalmarcia e a Professora Michelle por aceitar o meu convite e participarem como banca de um momento tão importante na minha vida pessoal e profissional. Obrigada a todos vocês pela contribuição!

Não poderia deixar de agradecer também ao Dr. Luís Vitteri pela contribuição na parte da estatística. Sua participação foi de grande importância Luís. Obrigada.

Agradecer a CAPES pelo apoio com a Bolsa. Gostaria de ressaltar que, a Bolsa foi peça fundamental no decorrer e concretização do meu mestrado. Pois sem o auxílio da bolsa não seria possível continuar no programa de Mestrado. Agradecer a UFT pela disponibilidade do espaço possibilitando assim a realização dos experimentos.

A todos, meu muito obrigada!

RESUMO

Controle preventivo de doenças pós-colheita em citros (laranja, mexerica e limão) utilizando óleo essencial de noni e *Saccharomyces cerevisiae*

As frutas cítricas (*Citrus*) são de grande importância na cadeia produtiva de frutas no Brasil. Com contribuição significativa para a economia do país. Contudo, doenças pós-colheita afetam negativamente a qualidade e quantidade dos frutos que seriam comercializados. Desta forma, o objetivo principal do trabalho foi avaliar o efeito do óleo essencial de noni (*Morinda citrifolia*) e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de doenças pós-colheita em citros. Os isolados patogênicos foram obtidos a partir de frutas cítricas doente coletadas no mercado local da cidade de Gurupi-TO. O óleo essencial de noni foi extraído utilizando o método de hidrodestilação. Os testes *in vitro* com óleo essencial de noni foi realizado nas concentrações de 1,25; 2,5; 5; 10 e 30 mg mL⁻¹ e para a levedura foi preparada uma solução a base de água destilada esterilizada nas concentrações de 1%, 2%, 3%, 4% e 5% avaliados por 10 dias com intervalos de 48h mantidos a 25 ± 1 °C. O teste de fitotoxidez foi avaliado nas mesmas concentrações. Para os testes *in vivo* foram utilizadas as mesmas concentrações dos testes *in vitro*. Os patógenos isolados que atacam os frutos na pós-colheita são *Penicillium* sp., *Guignardia* sp. e *Aspergillus* sp. Etiologia confirmada por meio do teste de patogenicidade. Por meio de Cromatografia gasosa (CG/MS) o composto majoritário identificado no óleo essencial de noni foi o ácido octanóico (92,02%). A melhor atividade fungitástica *in vitro* do óleo essencial de noni foi alcançada na concentração de 30 mg mL⁻¹ inibindo o crescimento micelial dos patógenos *Penicillium* sp. e *Guignardia* sp. em 100%. A *S. cerevisiae* apresentou melhor atividade fungitástica a partir da concentração de 3%, 4% e 5% para o patógeno *Penicillium* sp. com inibição de 76%, 87% e 88% e *Aspergillus* sp. com inibição de 100% nas duas concentrações (4% e 5%). O óleo essencial de noni não apresentou fitotoxidez nos frutos. Os dois tratamentos *in vivo* apresentaram ação protetiva, sendo destaque a levedura *S. cerevisiae*. Com base nos resultados podemos concluir que o óleo essencial de noni e a levedura *S. cerevisiae* se apresentam como uma boa alternativa no controle biológico de patógenos característicos da pós-colheita em frutas cítricas.

Palavras-chave: *Morinda citrifolia*; Controle biológico; Levedura; Frutos cítricos.

ABSTRACT

Preventive control of post-harvest diseases in citrus (orange, tangerine and lemon) using essential oil of noni and *Saccharomyces cerevisiae*

Citrus fruits (*Citrus*) are of great importance in the fruit production chain in Brazil. With a significant contribution to the country's economy. However, post-harvest diseases negatively affect the quality and quantity of fruits that would be marketed. Thus, the main objective of this work was to evaluate the effect of noni (*Morinda citrifolia*) and *Saccharomyces cerevisiae* essential oil in the control of post-harvest diseases in citrus. The pathogenic isolates were obtained from diseased citrus fruits collected at the local market in the city of Gurupi-TO. Noni essential oil was extracted using the hydrodistillation method. *In vitro* tests with noni essential oil were performed at concentrations of 1.25; 2.5; 5; 10 and 30 mg mL⁻¹ and a solution based on sterilized distilled water was prepared for the yeast at concentrations of 1%, 2%, 3%, 4% and 5% evaluated for 10 days with intervals of 48 hours maintained at 25 ± 1°C. The phytotoxicity test was evaluated at the same concentrations. For *in vivo* tests, the same concentrations as *in vitro* tests were used. The isolated pathogens that attack the fruits in the post-harvest are *Penicillium* sp., *Guignardia* sp. and *Aspergillus* sp. Etiology confirmed by pathogenicity test. By means of gas chromatography (GC/MS) the major compound identified in noni essential oil was octanoic acid (92.02%). The best *in vitro* fungitastic activity of noni essential oil was achieved at a concentration of 30 mg mL⁻¹, inhibiting the mycelial growth of the pathogens *Penicillium* sp. and *Guignardia* sp. at 100%. *S. cerevisiae* showed better fungitastic activity from the concentration of 3%, 4% and 5% for the pathogen *Penicillium* sp. with inhibition of 76%, 87% and 88% and *Aspergillus* sp. with 100% inhibition at both concentrations (4% and 5%). The noni essential oil did not show phytotoxicity in the fruits. The two *in vivo* treatments showed protective action, especially the yeast *S. cerevisiae*. Based on the results we can conclude that the essential oil of noni and the yeast *S. cerevisiae* present themselves as a good alternative in the biological control of pathogens characteristic of post-harvest in citrus fruits.

Keywords: *Morinda citrifolia*; Biological control; Yeast; Citrus fruits.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação dos fitopatógenos isolados de citros.....31

Tabela 2: Constituintes químicos identificados na composição do óleo essencial de noni (*Morinda citrifolia*) extraído dos frutos.....34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fruto de laranja infectado por <i>Penicillium</i> sp. e morfologia macroscópica da parte superior da placa (A). Fruto de mexerica infectado por <i>Guignardia</i> sp. e morfologia macroscópica da parte superior da placa (B). Fruto de limão infectado por <i>Aspergillus</i> sp. e morfologia macroscópica da parte superior da placa (C)	19
Figura 2: Processo de infecção do fungo <i>Penicillium</i> sp. no fruto de laranja.....	23
Figura 3: Frutos maduros de noni (<i>Morinda citrifolia</i>)	25
Figura 4: Estrutura Morfológica do fungo <i>Penicillium</i> sp. (A) e laranja infectada pelo patógeno (B)	30
Figura 5: Estrutura morfológica do fungo <i>Guignardia</i> sp. (A) e mexerica infectada pelo patógeno (B)	31
Figura 6: Estrutura morfológica do fungo <i>Aspergillus</i> sp. (A) e limão infectado pelo patógeno (B)	32
Figura 7: Atividade fungistática do óleo essencial de noni (<i>Morinda citrifolia</i>) frente ao fungo patogênico <i>Penicillium</i> sp.....	35
Figura 8: Atividade fungistática do óleo essencial de noni (<i>Morinda citrifolia</i>) frente ao fungo patogênico <i>Guignardia</i> sp.....	35
Figura 9: Atividade fungistática do óleo essencial de noni (<i>Morinda citrifolia</i>) frente ao fungo patogênico <i>Aspergillus</i> sp.....	36
Figura 10: Comparação entre as médias dos tratamentos: controle negativo e maior concentração do óleo de noni (30 mg mL ⁻¹) pelo teste t ($P < 0,05$). (A) <i>Penicillium</i> sp.; (B) <i>Guignardia</i> sp. e (C) <i>Aspergillus</i> sp.....	39
Figura 11: Atividade fungistática da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> frente ao fungo patogênico <i>Penicillium</i> sp.....	38

Figura 12: Atividade fungistática da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> frente ao fungo patogênico <i>Guignardia</i> sp.	38
Figura 13: Atividade fungistática da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> frente ao fungo patogênico <i>Aspergillus</i> sp.....	39
Figura 14: Comparação entre as médias dos tratamentos: controle negativo e solução de <i>S. cerevisiae</i> (3%) pelo teste t ($P < 0,05$). (A) <i>Penicillium</i> sp.; (B) <i>Guignardia</i> sp. e (C) <i>Aspergillus</i> sp.....	42
Figura 15: Frutos de laranja (A) mexerica (B) e limão (C) submetidos ao teste de fitotoxidez do óleo essencial de noni.....	43
Figura 16: Área abaixo da curva de progresso da doença em citros. Tratamento preventivo óleo essencial de noni (<i>M. citrifolia</i>) na Laranja (<i>Penicillium</i> sp.) (A); mexerica (<i>Guignardia</i> sp.) (B) e Limão (<i>Aspergillus</i> sp.)	46
Figura 17: Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença em citros. Tratamento preventivo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>S. cerevisiae</i>) na Laranja (<i>Penicillium</i> sp.) (A); mexerica (<i>Guignardia</i> sp.) (B) e Limão (<i>Aspergillus</i> sp.)	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CN	Tiofanato metílico (Controle negativo)
CP	Água destilada estéril (Controle positivo)
COV's	Compostos Orgânicos voláteis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBETIVOS.....	15
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	15
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 <i>A citricultura no Brasil</i>	16
3.2 <i>Laranja (Citrus sinensis)</i>	16
3.3 <i>Mexerica (Citrus reticulata)</i>	17
3.4 <i>Limão (Citrus limon)</i>	18
3.5 <i>Doenças cítricas comum na pós colheita: Bolor verde; Bolor Azul; Mancha preta ou podridão dos citros</i>	19
3.6 <i>Processo de infecção do fungo no fruto</i>	22
3.7 <i>Controle biológico e Óleos essenciais</i>	23
3.8 <i>O gênero Morinda citrifolia (noni)</i>	24
3.9 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 <i>Isolamento e identificação morfológica dos fitopatógenos</i>	27
4.2 <i>Extração do óleo essencial de noni e identificação dos compostos orgânicos voláteis</i>	27
4.3 <i>Atividade fungistática do óleo essencial de noni in vitro</i>	28
4.4 <i>Atividade fungistática da Saccharomces cerevisiae in vitro</i>	29
4.5 <i>Teste de fitotoxidez do óleo essencial de noni em citros</i>	29
4.6 <i>Efeito preventivo do óleo essencial de noni e solução de S. cerevisiae nos teste in vivo</i>	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 <i>Isolamento e identificação morfológica dos fitopatógenos</i>	31
5.2 <i>Extração do óleo essencial de noni e identificação dos compostos orgânicos voláteis</i>	34
5.3 <i>Atividade fungistática do óleo essencial de noni in vitro</i>	35
5.4 <i>Atividade fungistática da Saccharomces cerevisiae in vitro</i>	40
5.5 <i>Teste de fitotoxidez do óleo essencial de noni em citros</i>	44
5.6 <i>Efeito preventivo do óleo essencial de noni e solução de S. cerevisiae nos teste in vivo</i>	45
6 CONCLUSÃO.....	51
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
8 ANEXOS.....	61

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem cultivado culturas agrícolas de grande importância econômica para o país, tal como os citros, que englobam a produção de laranja, laranja lima, limão e tangerina. Segundo a Conab, a produção de laranja deverá passar de 15,8 milhões de toneladas na safra 2018/19 para 16,8 milhões de toneladas nos próximos anos. A expectativa é que a produção anual tenha um crescimento de 0,5% no próximo decênio (CONAB, 2019).

Os citros são grupos de plantas pertencentes à família Rutaceae, fazem parte dessa família, as laranjas (*Citrus sinensis* Osbeck), tangerinas (*C. reticulata* Blanco; *C. deliciosa* Tenore), limões (*C. limon* Burn), limas ácidas (*C. latifolia* Tan), limas doces (*C. limettioides* Tanaka) e laranja azeda (*C. aurantium* Linnaeus) (LOPES *et al.*, 2011).

A produção de frutas cítricas registradas anualmente no mundo ultrapassa 88 milhões de toneladas e 50 % dessa produção é destinada à produção de suco. O Brasil é considerado um dos maiores exportadores de frutas cítricas processadas. Além disso, o país é considerado um dos maiores produtores de laranja do mundo (39%), participando com uma área plantada de 800 mil hectares. Seguido da China com 68,2% da produção mundial de tangerina, México, Argentina e União Europeia são considerados os maiores produtores mundiais de limão e lima (SILVA, 2019; VIDAL, 2018).

Entretanto, a área plantada deve sofrer uma redução nos próximos anos de cerca de 24,4%. Isso porque, apesar da importância econômica da citricultura para o país, o setor tem enfrentado diversos problemas fitossanitários ocasionados por pragas e fungos patogênicos que limitam a produção, pois atuam provocando doenças severas nos frutos gerando perdas significativas na produtividade. Os fungos patogênicos são os principais agentes causadores da diminuição de produtividade das culturas cítricas no Brasil e no mundo (MOURA *et al.*, 2019).

Dentre as possíveis doenças que podem afetar os citros na pós-colheita, a literatura relata os bolores verde e azul causados por *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum* respectivamente, e a podridão azeda causada principalmente por *Geotrichum citri-aurantii*. São as doenças consideradas mais importantes, em termos de economia, pois além de afetar a qualidade afeta também a quantidade dos frutos cítricos os desvalorizando para o comércio *in natura* (MOURA *et al.*, 2019).

Portanto, a utilização de produtos naturais como alternativa no controle de doenças fúngicas é uma escolha promissora. Nos últimos anos, alguns trabalhos foram publicados, relatando a eficácia dos óleos essenciais como medida no controle de doenças causadas por patógenos. Pois, além de diminuir o uso de agrotóxicos contribuem para um meio ambiente sustentável, e

economicamente viável, visto que os produtos de origem biológica são considerados de baixo custo, atendendo tanto o pequeno como o grande produtor (COSTA, 2017).

Os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário das plantas, e podem ser extraídos de folhas, flores, ramos, cascas, sementes e frutos. Além de apresentarem em sua composição, compostos aromáticos voláteis como terpenos e seus derivados, sendo estes, os principais responsáveis por sua atividade antimicrobiana. Assim sendo, o óleo essencial de noni (*Morinda citrifolia*) é uma alternativa sustentável e de baixo custo, sendo economicamente viável (SARTO *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2011).

A importância biotecnológica da pesquisa consistiu na busca por novos produtos de interesse agrícola e novas medidas alternativas de controle ambientalmente sustentáveis. Apresentando baixo custo e diminuindo o uso de produtos químicos na pós-colheita, por meio da utilização do óleo essencial de noni (*Morinda citrifolia*) e da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do óleo essencial de noni (*Morinda citrifolia*) e da solução a base de *Saccharomyces cerevisiae* no controle de doenças pós-colheita em citros.

2.2 Objetivos Específicos

Isolar e identificar morfologicamente os fungos fitopatogênicos que atacam os citros na pós-colheita;

Extrair o óleo essencial de noni e identificar a composição química;

Avaliar a potencial atividade fungistática do óleo essencial de noni e da levedura *S. cerevisiae* no controle *in vitro* dos patógenos isolados;

Avaliar a fitotoxidez do óleo essencial de noni nos frutos de laranja, limão e mexerica;

Avaliar a eficácia do óleo essencial de noni e da *S. cerevisiae* no controle preventivo de doenças pós-colheita em citros.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A citricultura no Brasil

A citricultura é uma das atividades agrícolas de maior relevância no mundo. E dentre os países que lideram a produção de citros, o Brasil é considerado o maior produtor de laranja no mundo, seguido da China, União Europeia e Estados Unidos (FEITOZA & GASPAROTTO, 2020). O país conta com a maior plantação, sendo destaque principalmente na produção de laranja.

Todos os estados brasileiros participam na produção de frutos de laranja, limão e mexerica. Os frutos podem ser cultivados em temperatura que varia de 23°C a 32°C, fator este que possibilita o cultivo dos frutos nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-oeste. Contudo, embora todos os estados tenham participação no cultivo dos frutos, o estado de São Paulo (79%) e Minas Gerais ocupam posição de destaque no ranking nacional na produtividade de laranja, seguido das regiões nordeste e sudoeste (VIDAL, 2018).

A laranja especificamente, é uma das principais frutas que movimenta a economia do mercado de exportação do agronegócio brasileiro. A colheita dos frutos se dá praticamente o ano todo. É considerada uma atividade agrícola de grande importância econômica não só no Brasil, mas em todo o mundo (OSORIO *et al.*, 2017; CASERTA *et al.*, 2019).

Segundo Neves *et al.* (2020) o setor agroindustrial de frutas cítricas é responsável por movimentar mais de 9 bilhões de reais ao ano, além de gerar mais de 400 mil empregos de forma direta e indireta, sendo este um ramo que tem grande influência na movimentação da economia brasileira (FEITOZA & GASPAROTTO, 2020).

3.2 Laranja (*Citrus sinensis*)

A *Citrus sinensis* (Laranja doce) é nativa da Ásia e representa os maiores grupos de cultivares de citros cultivados no mundo. A *Citrus sinensis* pertence à família Rutaceae que abrange pouco mais de 150 gêneros e cerca de 1600 espécies que são cultivadas largamente pelo mundo em regiões temperadas, tropicais e subtropicais. A planta é um arbusto com característica aromática cítrica, isso porque a planta produz metabólitos secundários que são moléculas orgânicas responsáveis por esse aroma característico (MELO, 2021)

A laranja doce (*Citrus sinensis*) é um fruto consumido no mundo inteiro. É uma fruta rica em vitamina C, um importante antioxidante natural que atua fortalecendo o sistema

imunológico humano, sobretudo na prevenção e tratamento de gripes e resfriados. Na medicina popular, a planta apresenta inúmeros benefícios à saúde, sendo utilizado no tratamento de bronquite, cólicas, tosses, resfriados, prisão de ventre, estresse, ansiedade dentre outras indicações (FAVELA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2016).

Segundo dados da Conab (2020) o estado de São Paulo produziu 14.491.376 toneladas de laranja nesse ano, seguido do estado de Minas Gerais com 936.039 toneladas, o estado do Paraná produziu 804.492 toneladas e a Bahia apresentou produtividade de 633.000 toneladas. O estado de Sergipe colheu 364.000 e Rio Grande do Sul 357.820 toneladas de laranja. Com isso o Brasil contribuiu com 18.385.967 toneladas de laranjas produzidas no país.

Embora o Brasil seja o maior produtor de laranja, essa produção é afetada por diversas doenças fúngicas sobretudo na pós-colheita, afetando diretamente na qualidade e quantidade de frutos que seriam comercializados. Assim sendo, a cultura dos citros enfrenta perdas expressivas acarretadas por doenças fúngicas e mudanças climáticas.

Castro (2020) afirma que as doenças pós-colheita afetam diretamente na qualidade e diminui significativamente a quantidade dos frutos que seriam entregues ao consumidor final. Na laranja, a principal doença é o bolor verde, geralmente ocorre na pós-colheita e estão diretamente relacionadas às condições climáticas e a manipulação dos frutos desde a colheita até o consumidor. A infecção fúngica ocorre durante o transporte e armazenamento dos frutos.

3.3 Mexerica (*Citrus reticulata*)

A mexerica é a segunda fruta mais importante do gênero *Citrus* pertencente à família Rutaceae. A origem da fruta vem do nordeste da Ásia e sudoeste da China. O nome popular da fruta varia de região para região, desta forma os nomes predominantes são, tangerina, mexerica, Pokan, laranja mimosa e bergamota. A fruta é cultivada no Brasil devido ao clima tropical e subtropical, além de ser um fruto bastante apreciado pelo consumidor brasileiro, a fruta é consumida fresca, geleia ou suco (SOUZA, 2020).

O Brasil é o quinto maior produtor de mexerica, ficando atrás somente da China, Espanha, Marrocos e Turquia. São considerados os maiores produtores nacionais de mexerica, o estado do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Minas Gerais, que em conjunto são responsáveis por 87% da produção total de mexerica. O Nordeste também participa no quesito produção de mexerica, entretanto, é uma área percentual (7,1%) considerada baixa. Em 2019 a produção de mexerica foi de 984.897 toneladas (IBGE 2019; MELO, 2021; VIDAL, 2018).

Segundo Da Silva (2020) a cultivar predominante no Brasil é a Pokan. Em termos de qualidade, a fruta é bastante apreciada por apresentar em sua composição nutricional o cálcio, potássio, fósforo e fonte de vitaminas B1 e B2, além de ser rica em betacaroteno, fibras e sais minerais. São propriedades nutritivas que auxiliam no bom funcionamento e defesa do sistema imunológico, contribuindo assim, para uma dieta saudável (NOGUEIRA, 2016).

Embora a fruta apresente-se como um produto de grande relevância na economia do país, enfrenta problemas fitossanitários que influenciam diretamente na perda de qualidade e quantidade do fruto a ser comercializado. Pois, há o surgimento de várias doenças durante todo o processo de cultivo do fruto, doenças geradas por fungos, vírus e bactérias. Dentre as doenças, a podridão dos frutos é destaque na pós-colheita gerando grandes perdas econômicas (NOGUEIRA, 2016).

O controle de doenças cítricas é realizado por meio de pulverização. São aplicações preventivas realizadas ainda na fase inicial de florescimento da planta. Para citros usam-se os Benomyl, Tiofanato Metílico, Carbendazim e Folpet, mesmo adotando estes métodos de controle da doença, ocorre o surgimento de linhagens resistentes ao produto aplicado. Uma vez expressa a resistência ao uso do produto, o controle perde a eficácia máxima e diminui o fator de proteção oferecido à planta e aos frutos, ou seja, a qualidade do produto é reduzida frente a resistência patogênica, em termos de proteção e cuidados antes ofertados a cultivar pelo produto (SALGADO, 2021).

3.4 Limão (*Citrus limon*)

O limão (*Citrus limon*) é a terceira espécie cítrica mais importante no mundo. A espécie cultivada no Brasil é de origem da Florida, pertencente à família Rutaceae, tem como principal característica propriedades nutricionais, farmacêuticas e cosméticas, assim, como todos os frutos cítricos pertencentes ao gênero *Citrus*. A espécie não tolera temperaturas baixas, sendo, portanto, cultivar de clima tropical (KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ *et al.*, 2020).

A última atualização dos dados de produção do fruto no Brasil foi estimada em 1.511.185 toneladas. Todos os estados brasileiros exceto Amapá, participam na produção do fruto, variando somente a área plantada (IBGE, 2019). O limão siciliano é a cultivar predominante no Brasil. Estudos científicos relatam ações farmacológicas consideradas valiosas, sobre o uso do extrato, suco e óleo essencial do limão. O fruto é caracterizado por apresentar propriedades anti-inflamatória, anticâncer, cardioprotetora e hepatogenerativa (KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ *et al.*, 2020).

Os citros são frutos de alta suculência e sabor cítrico característico. As plantas de limão têm crescimento rápido e são consideradas produtivas. Contudo, como toda cultivar, a espécie também sofre com ataque de diversas doenças. Doenças como antracnose, mancha marrom e podridão dos citros e tristeza. Diante da severidade de tantas doenças na cultura citrícola, o conhecimento a respeito de métodos biológicos no controle dos fitopatógenos é fundamental para a proposição de novos modelos alternativos visando estratégias de controle (DALIO *et al.*, 2017).

O consumo do limão é destaque na mesa do consumidor brasileiro e estrangeiro. O fruto é bastante apreciado, não somente por apresentar propriedades medicinais, mas como um excelente acompanhante na culinária tradicional. Contudo, um fator que determina essa apreciação, está na qualidade que o fruto apresenta, pois é a aparência do fruto que determina a escolha do consumidor. Por esta razão, faz-se necessária a busca por estudos que visem o controle de doenças principalmente na pós-colheita, pois uma vez contaminados, os frutos perdem valor qualitativo e quantitativo.

3.5 Doenças cítricas comuns na pós-colheita: Bolor verde, Bolor Azul, Mancha preta ou Podridão dos citros

A produção de citros no Brasil é considerada um percentual elevado e significativo como já visto anteriormente. No entanto, a grande problemática está no enfrentamento da família Rutaceae com doenças fúngica, principalmente na pós-colheita. Doenças estas que afetam diretamente a qualidade e redução da quantidade dos frutos ofertados ao consumidor final (RODRIGUES *et al.*, 2020).

O processamento dos frutos consiste, desde a etapa de colheita, embalagem, transporte e armazenamento até o consumidor final. A fruta pode ser entregue na forma *in natura*, ou o suco como subproduto. No entanto, durante o manejo “grosseiro” os frutos são levemente lesionados, sendo muitos esmagados e amassados durante o processo. As lesões facilitam a contaminação por microrganismos, acelerando assim, o processo de deterioração dos frutos. Embora se faça o uso de tecnologia avançada são estragos fisiológicos decorrentes do manuseio e que refletem diretamente na qualidade do fruto (ANDRADE & DE ALMEIDA, 2020).

Dentre as doenças que são evidentes em acometer as frutas cítricas na pós-colheita a literatura relata a mancha marrom ou podridão dos citros, bolor azul e bolor verde. São doenças acarretadas por meio do processo de colheita e transporte dos frutos, visto que, é imprescindível que os frutos não sofram pequenas lesões durante o manuseio. Doenças que no estágio avançado

de contaminação causam o apodrecimento dos frutos, gerando perdas expressivas que acabam refletindo na economia do país (CHAGAS *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2020).

Segundo Moraes *et al.* (2019) são relatados mais de 20 tipos diferentes de doenças que acometem os citros na pós-colheita. De acordo com o autor, essas doenças são as principais causas de deterioração dos frutos. Os frutos são infectados por meio das lesões geradas na casca durante o manuseio pós-colheita. Com base nisso, as doenças pós-colheita mais relatadas na literatura pesquisada são o mofo azul, mofo verde e podridão azeda. Devido à grande ocorrência dessas doenças, estudam-se cada vez mais alternativas promissoras, a fim de obter melhor controle.

O bolor verde ou mofo verde, é uma doença cítrica caracterizada pelo fungo *Penicillium digitatum*, sendo o patógeno responsável por cerca de 90% das perdas na pós-colheita. Os conídios do patógeno ficam dispersos no ambiente de cultivo dos frutos e podem ser lançados no fruto por meio de fatores ambientais. E, uma vez em contato com o ferimento na casca do fruto, este torna-se uma oportunidade para o processo de infecção (MORAIS *et al.*, 2019).

Cheng *et al.* (2020) afirmam que os conídios que caem diretamente na lesão, tem um ótimo índice de germinação, enquanto que esporos que caem longe da casca lesionada, dificilmente germinam. Os autores expõem que, o fruto quando lesionado libera compostos orgânicos voláteis, como limoneno, mirceno, α -pineno e β -pineno, compostos que favorecem a germinação dos conídios, além dos açúcares e ácidos orgânicos presentes no suco do fruto.

Já o bolor azul é causado pelo patógeno *Penicillium italicum*, que também é considerado um patógeno quando se trata de doenças de grande importância na pós-colheita. A doença é caracterizada por se desenvolver de forma mais lenta, e diferente do *Penicillium digitatum*, o *Penicillium italicum* possui maior resistência ao frio, e a baixa disponibilidade de água, o que facilita a contaminação de um maior número de frutas. No campo, o processo de contaminação ocorre pela dispersão de esporos fúngico por meio do ar, sendo estes esporos lançados em frutos sadios, e/ou com ferimentos antes ou após a colheita. E de acordo com a maturação do fruto, a gravidade da doença tende a aumentar (KANASHIRO *et al.*, 2020).

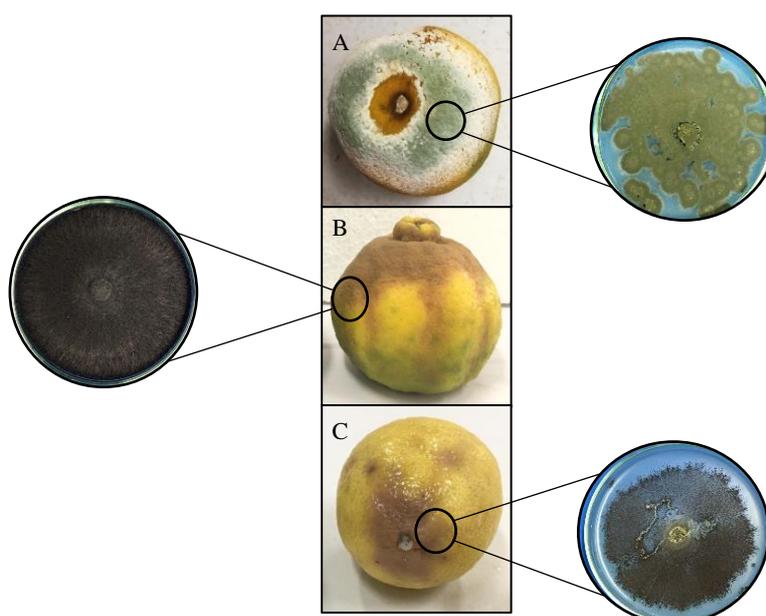
A terceira doença também considerada uma problemática na pós-colheita de citros é a doença mancha marrom/preta ou podridão dos citros. Tendo como principal agente causal o fungo *Guignardia citricarpa*. É um patógeno específico da cultura de citros, causando lesões no caule, folhas e frutos da planta, mesmo assim, os sintomas mais graves são vistos nos frutos. A doença é expressa por meio de lesões na casca dos frutos, principalmente durante o processo de maturação. O fungo pode apresentar seis diferentes tipos de sintomas nos frutos,

denominadas manchas sardentas, falsa melanose, manchas amareladas, mancha dura, mancha virulenta e salpicadas. (MOYO *et al.*, 2020 & AGUIAR, 2011).

No entanto, existem outros fitopatógenos responsáveis por causar a podridão azeda dos citros. O *Colletotrichum gloeosporioides* é uma outra espécie fúngica responsável pela podridão e decomposição de diferentes frutas na pós-colheita, dentre eles as frutas cítricas. Outro patógeno causador da doença podridão azeda na pré e pós-colheita dos frutos é o fungo *Geotrichum citri-aurantii*. Semelhante aos bolores, os frutos infectados pelo patógeno *Geotrichum citri-aurantii* apresentam inicialmente uma lesão de cor amarelo escuro e posterior aparência de encharcamento. Essa aparência é devido a produção de enzimas extracelulares que atuam na degradação da casca do fruto (GUARNACCIA *et al.*, 2017 & MACHADO, 2018).

A figura 1 reporta frutos de laranja (Figura A), mexerica (Figura B) e limão (Figura C) com sintomas de doenças como o bolor verde (Figura A) e podridão azeda (Figura A e B) principais doenças que afetam frutos cítricos nas pós-colheita. O patógeno causal da doença bolor verde no fruto de laranja apresenta aspecto aveludado e cor verde. Já o agente causal da mancha preta no fruto de mexerica tem aparência globulosa e aveludado de coloração preta, para o agente causal da doença mancha preta no limão, o fungo apresenta esporos aveludados e coloração preta, como demonstrado na figura 1.

Figura 1 – Fruto de laranja infectado por *Penicillium* sp. e morfologia macroscópica da parte superior da placa (A). Fruto de mexerica infectado por *Guignardia* sp. e morfologia macroscópica da parte superior da placa (B). Fruto de limão infectado por *Aspergillus* sp. e morfologia macroscópica da parte superior da placa (C).



Fonte: Autora

Diferentes estudos têm avaliado a eficácia no uso do controle biológico por meio de leveduras. As leveduras são consideradas uma excelente alternativa como agente de biocontrole devido a sua característica em produzir β -1,3-glucanase, enzima responsável por degradar a parede celular de fungos fitopatogênicos. Um produto de base biológica hoje empregado no controle de podridão pós-colheita é o Aspire a base de *Candida oleophila*. Assim sendo, diferentes estudos já foram realizados avaliando o potencial de outras leveduras como *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida stellimalicola*, *Candida saitoana*, *Metschnikowia pulcherrima* como agente de biocontrole, visando minimizar problemas fitossanitários (RODRIGUES *et al.*, 2020).

3.6 Processo de infecção do fungo no fruto

O processo de infecção se dá por meio da interação patógeno-hospedeiro. No caso específico dos frutos cítricos, o patógeno infecciona os frutos por meio de feridas resultantes de fatores ambientais, como chuva, vento e danos decorrentes da ação de insetos ou lesões ocasionadas durante o processo de colheita. Uma vez em contato com o ferimento, inicia-se o processo de germinação dos conídios, produzindo tubos germinativos. Por meio destes, o patógeno invade o tecido hospedeiro e inicialmente atinge as células do pericarpo seguido das células que compõem o mesocarpo (CHENG *et al.*, 2020).

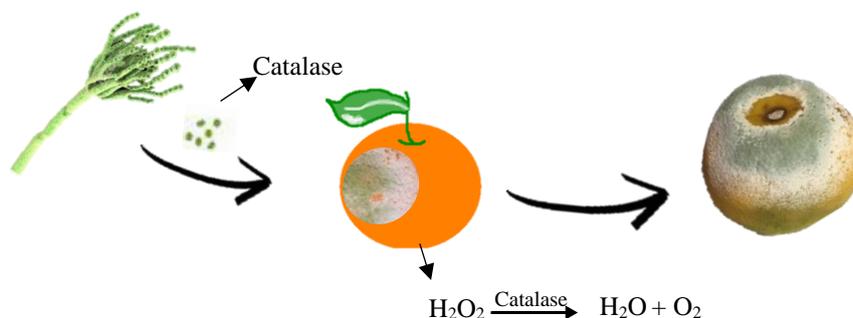
Durante o processo de infecção o fruto também produz uma elevada quantidade de peróxido de hidrogênio, molécula que atua como mecanismo de defesa do fruto. O peróxido de hidrogênio se apresenta como uma molécula de sinalização, é a principal molécula de resposta como defesa da planta/fruto produzida logo na etapa inicial do processo de infecção. A molécula atua realizando explosões oxidativas que inibem o crescimento do patógeno e conseqüentemente age na defesa da planta (COSTA *et al.*, 2019).

Entretanto, uma das enzimas produzidas por fungos fitopatogênicos como o fungo *Penicillium italicum* e *digitatum* é a catalase, enzima que tem ação oxidante e atua diretamente na decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio sendo esse processo considerado uma estratégia de infecção do patógeno ao hospedeiro (COSTA *et al.*, 2019).

Após infectado, o fruto aparenta-se encharcado com aspecto de podre devido a ação de enzimas hidrolíticas patogênicas que auxiliaram nesse processo de podridão do fruto. Nota-se a presença de micélios brancos seguidos de conídios esverdeados ou azul a depender do agente causal.

A figura 2 ilustra o processo de infecção mediado por *Penicillium* sp. no fruto de laranja. Inicialmente, nota-se uma estrutura morfológica do fungo *Penicillium* sp. seguido de conídios sendo liberados a partir da estrutura e entrando em contato com o fruto, iniciando o processo de infecção. Como defesa o fruto produz peróxido de hidrogênio, entretanto, a catalase enzima produzida pelo patógeno o converte em água e O₂ causando o encharcamento do fruto. Após a infecção e degradação da matéria orgânica do fruto, tem-se um fruto com aparência exterior aveludada e aparência interior encharcada.

Figura 2 - Processo de infecção do fungo *Penicillium* sp. no fruto de laranja.



Fonte: Autora

3.7 Controle biológico e Óleos essenciais

Devido ao uso intensivo de agroquímicos no controle de doenças de plantas, e ao surgimento de linhagens resistentes, diferentes estudos buscam por novos métodos alternativos de controle. O controle biológico é considerado uma alternativa promissora e complementar ao uso dos agrotóxicos, principalmente por se apresentar como um método de baixo custo, ambientalmente sustentável e ecologicamente correto. Estudos definem o controle biológico como sendo o uso de agentes biológicos não patogênicos no controle de microrganismos patogênicos (PAPPAS *et al.*, 2017).

Com base nisso, a literatura relata o controle biológico e o processo de indução de resistência em frutos e plantas por meio da ação de óleos essenciais e extratos vegetais. Os produtos naturais são bem-vistos, pois apresentam ação antimicrobiana, antifúngica e parasitária, além de serem moléculas biodegradáveis, característica que contribui com a sustentabilidade ecológica do meio ambiente, visto que são moléculas que não se acumulam no meio ambiente (KASPER *et al.*, 2020).

Os compostos químicos produzidos pelos vegetais são classificados em metabólitos primários e metabólitos secundários, sendo essenciais para a planta. Os metabólitos primários são compostos responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento da planta. Já os metabólitos secundários atuam no mecanismo de defesa das plantas e são classificados de acordo com sua rota metabólica, sendo estes divididos em três grupos, compostos fenólicos (flavonoides), nitrogenados (alcaloides) e terpenoides (óleos essenciais) (BORGES, 2020).

Assim sendo, os óleos essenciais (OE) são produtos de origem vegetal, sintetizados por plantas aromáticas, medicinais e/ou condimentares. Os compostos orgânicos voláteis produzidos agem na defesa da planta e podem ser extraídos de flores, folhas, caule, raiz, frutos e sementes. Apresentam atividade antifúngica, antibacteriana, inseticida e antiviral. Por apresentar aroma característico e agradável, é bastante utilizado na indústria de cosméticos e farmacêutica. O método de extração mais empregado é o de hidrodestilação (PORTELLA *et al.*, 2021).

Diversos trabalhos relatam o potencial da atividade biológica dos óleos essenciais como biofungicidas. Miranda (2020) testou o óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) e capim citronela (*Cymbopogon winterianus*) no controle de *Fusarium guttiforme* agente causal de fusariose na cultura do abacaxi. Segundo o autor o potencial fungicida dos óleos essenciais foi eficaz na inibição do crescimento micelial do patógeno. São inúmeros os trabalhos científicos que comprovam a ação de diferentes óleos essenciais no controle de diversas linhagens de patógenos de importância agrícola.

Segundo Muñoz *et al.* (2020), a característica antimicrobiana atribuída aos óleos essenciais está diretamente associada aos constituintes bioativos, bem como os ácidos, ésteres, aldeídos, cetonas, aminas e álcoois, além dos compostos terpênicos. Já a atividade antifúngica é vista no potencial em que os óleos essenciais apresentam em danificar a parede celular e a membrana celular por meio do rompimento de camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidios, resultando na completa degradação/desorganização da membrana citoplasmática.

3.8 Noni (*Morinda citrifolia*)

O noni (*Morinda citrifolia*) é uma planta de origem asiática e australiana pertencente à família das Rubiaceae. Várias partes da planta como folhas, frutos, cascas, sementes e raízes tem sido relatada por suas propriedades medicinais. Apresentando ação anti-inflamatórias, antibacterianas e anticâncer (TANIKAWA *et al.*, 2021; VELOSO *et al.*, 2020).

Na medicina popular o noni é usado no tratamento de doenças como, hipertensão, diabetes, alteração menstrual, câncer e na melhoria e estímulo do sistema imunológico, além de auxiliar no tratamento de infecções fúngicas, bacterianas e virais. Os frutos são ricos em compostos bioativos como o ácido ascórbico, carotenoides, flavonoides, compostos fenólicos e antioxidantes, o que o caracteriza como um bom antioxidante de origem natural com alto valor nutricional e funcional para o organismo (DA SILVA *et al.*, 2021; DO REGÔ *et al.*, 2020; JAMALUDIN *et al.*, 2021).

O óleo essencial de noni é extraído em maior quantidade dos frutos. O aroma é considerado desagradável, porém, é rico em moléculas voláteis de grande potencial biotecnológico visto que, os constituintes químicos do óleo essencial apresentam características fitotóxicas no controle de doenças patogênicas. Veloso *et al.* (2020) relata que os principais constituintes do óleo essencial de noni são os ácidos octanóico e hexanóico.

A literatura relata alguns estudos já realizados avaliando o potencial da atividade fúngica do óleo essencial de noni. Segundo relatos de Barros *et al.* (2021) o óleo apresentou ação inibitória de 100% do patógeno *Rhizoctonia solani*, agente causal da antracnose na cultura da soja. Dalcin *et al.* (2017) também constatou a eficácia do óleo essencial de noni ao testá-lo no controle da doença gomosa causada na cultura do melão pelo patógeno *Didymella bryoniae* os autores descreveram que o óleo essencial de noni apresentou eficácia na inibição do patógeno.

Outros trabalhos relatando a potencial atividade antifúngica do óleo essencial de noni são descritos na literatura, contudo, ainda é considerada pouco explorada a atividade. Os estudos mais avançados em relação ao uso do fruto e extrato do noni são para fins terapêuticos e medicinais. A figura 3 exibe a característica física do fruto de noni, os frutos quando maduro apresentam cor amarelo esbranquiçado, é um fruto cheio de pigmentos em tons escuro na superfície da casca, as folhas da planta noni são grandes verde escuro e lisas.

Figura 3 – Frutos maduros de noni (*Morinda citrifolia*)



Fonte: Autora

3.9 *Saccharomyces cerevisiae*

A *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo unicelular pertencente ao Reino Fungi; Filo ascomycota; Classe Saccharomycetes; Ordem Saccharomycetales; Família Saccharomycetaceae e Gênero *Saccharomyces*. A forma de reprodução se dá por meio do brotamento (DE FREITAS, 2015; PARAPOULI *et al.*, 2020)

Na Biotecnologia, a *S. cerevisiae* é considerada uma levedura modelo de grande importância para a economia do país. Visto que é empregada em diversos setores industriais, desde a produção de pães, bebidas fermentadas como a cerveja e na produção de biocombustíveis dentre outras aplicações. A característica biológica da levedura consiste basicamente na conversão de açúcares simples como a glicose em álcool e dióxido de carbono. É um microrganismo de importância tanto a nível industrial, quanto a nível laboratorial quando se refere a pesquisas, principalmente por não apresentar patogenicidade. A principal atividade da levedura é a fermentação. No entanto, estudos tem avaliado a potencialidade da levedura em atuar como alternativa de biocontrole de doenças fitopatogênicas (DE ALCÂNTARA, 2019).

Uma característica comum das leveduras de biocontrole é a formação de biofilme. Expressa atividade de biocontrole por meio dos mecanismos de competição por espaço e nutrientes, produção de compostos orgânicos voláteis, secreção de enzimas como a quitinase, que atua na degradação da parede celular dos fungos, micoparasitismo e outros. Com base nisso, alguns estudos expõem a eficácia da *S. cerevisiae* e seu potencial biocontrole. Corrêa (2020) avaliou o potencial da *S. cerevisiae* no controle de doenças pós-colheita em uvas, causado por *Rhizopus stolonifer* e constatou que a levedura foi eficaz em reduzir significativamente a severidade da doença (FREIMOSER *et al.*, 2019).

Já Calixto *et al.* (2020) avaliou em campo, a ação da levedura *S. cerevisiae* no controle de *Colletotrichum truncatum* causador da antracnose na cultura da soja. A levedura demonstrou resultado eficaz no controle da doença, quando comparado a testemunha, e ainda influenciou no aumento de produção de grãos.

É com base nesses resultados que o interesse em testar a levedura em novas linhagens de fungos se faz necessário. Ampliando cada vez mais a aplicação da Biotecnologia e contribuindo para um meio ambiente sustentável.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento e identificação morfológica dos fitopatógenos

Os fitopatógenos foram isolados de frutos de laranja apresentando sintomas de bolor verde, e mexerica com lesões típicas da doença mancha preta dos citros e limão com sintomas da doença podridão dos citros. Os frutos foram obtidos em supermercados localizados na cidade de Gurupi-TO. Após obtenção, foram levados ao Laboratório de Biotecnologia de Alimentos e Bebidas, da Universidade Federal do Tocantins para a realização das análises microbiológicas. As partes dos frutos que apresentavam sintomas da doença foram cortadas em fragmentos de 8 mm e lavadas em água corrente. Em seguida, estas partes foram desinfetadas superficialmente pela imersão consecutiva em álcool 70 % por 30 min, solução de hipoclorito a 1 % por 40 min e três vezes em água destilada estéril. Após as lavagens, com o auxílio de pinça estéril os fragmentos higienizados foram transferidos para placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura BDA preparado com adição do antibiótico amoxicilina (500 mg) e então, foram vedadas com plástico filme. Posterior a 10 dias de incubação sob fotoperíodo (12 horas luz e 12 horas escuro) e temperatura a 25°C em BOD, foi analisada a coloração das colônias na parte superior e anverso das placas e presença ou ausência de clamidósporos. Após supervisão, as placas de Petri contendo colônias fúngicas foram repicadas por meio de discos de 5 mm de diâmetro contendo micélio do fungo em novas placas com o mesmo meio de cultura, a fim de obter uma colônia pura (VALADARES *et al.*, 2008).

Após o crescimento das colônias foi realizada a identificação do patógeno conforme sua morfologia. Para isto mediu-se o crescimento radial da colônia com o auxílio de um paquímetro, e foi analisada a estrutura reprodutiva do fungo, a coloração e presença de clamidósporos das colônias por meio de microscopia óptica (Biofoccus equipamentos).

Em seguida foi realizado o teste de patogenicidade (Postulado de Koch) para os patógenos obtidos. A inoculação nos frutos foi realizada com uma suspensão de 10^5 conídios/mL⁻¹ para os três patógenos isolados (MOURA, 2015, adaptado).

4.2 Extração do óleo essencial de noni e identificação dos compostos orgânicos voláteis

A extração do óleo essencial foi realizada pelo método de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado. Os frutos de noni maduro, foram coletados no período da manhã e no laboratório foram pesados (1 Kg) e lavados em água corrente sendo posteriormente

cortados em pequenos cubos e adicionados em um balão de fundo redondo com volume de 3 litros, em seguida como solvente foi adicionado água destilada até cobrir os frutos. O processo de extração foi realizado em um período de 2 horas, mantendo a solução em ebulição (SEIXAS *et al.*, 2011, adaptado). Após 2 horas, o óleo essencial foi coletado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e armazenado a 10°C em frasco de vidro âmbar envolto com papel alumínio ao abrigo da luz até a sua utilização em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

A determinação da composição do óleo essencial de noni, foi realizado por meio de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG/MS) (Modelo GC-2010) [Programa GCMS-QP2020]. Os parâmetros adotados no equipamento durante a identificação dos compostos foram, temperatura da coluna a 50°C e temperatura de injeção de 280°C (modo de injeção: dividido) o controle do fluxo foi mantido em velocidade linear. Pressão de 107,4 kPa, com fluxo total de 13,9 mL/min, fluxo da coluna de 1,82 mL/min e velocidade linear de 48,9 cm/s. O fluxo de purga foi de 3,0 mL/min e proporção de divisão de 5,0.

4.3 Atividade fungistática do óleo essencial de noni *in vitro*

Os isolados patogênicos de citros, após 7 dias de incubação foram submetidos a avaliação da atividade fungistática. Os bioensaios foram realizados adicionando-se ao meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) concentrações de 1.25, 2.5, 5, 10, 30 mg/mL⁻¹ de óleo essencial de noni preparado com Tween 80. Como controle positivo foi montado um bioensaio com água destilada estéril e um bioensaio com fungicida Tiofanato Metílico a 2% como controle negativo. Após o preparo das concentrações, com o auxílio de uma pipeta, foram adicionados 200 µL de cada concentração na placa contendo meio de cultura BDA, as concentrações foram distribuídas sobre o meio com auxílio de alça de Drigalski. Em seguida, discos de micélio-ágar de 5 mm de diâmetro obtidos de culturas puras dos fungos foram inoculados no centro da placa com os respectivos tratamentos. Posteriormente, as placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em câmara BOD (25 ± 1 °C) e fotoperíodo (12 horas luz e 12 horas escuro). O crescimento radial foi avaliado por meio de medição do halo fúngico por um período de 10 dias com intervalos de 48 horas e medição com paquímetro em dois eixos ortogonais entre si calculando-se uma média por placa. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em triplicata (BARROS *et al.*, 2019, adaptado). Posterior a obtenção dos dados, a análise estatística foi realizada por meio do ANOVA utilizando os programas Sigma Plot 11.0 e Excell 2010.

4.4 Atividade Fungistática da *Saccharomyces cerevisiae* *in vitro*

Para a avaliação da atividade fungistática da levedura comercial *S. cerevisiae* (Fleischmann) foram preparados bioensaios no qual diluiu-se a levedura em água destilada estéril nas concentrações de 1%, 2%, 3%, 4% e 5%, posterior foram adicionados em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) 200 µL de cada suspensão da levedura *S. cerevisiae* (HENRIQUE *et al.*, 1999 adaptado). Como controle positivo foi montado um bioensaio com água destilada estéril e um bioensaio com fungicida Tiofanato Metílico a 2% como controle negativo. Com os meios já vertidos em placas de Petri, discos de micélio-ágar de 5 mm de diâmetro obtidos de culturas puras dos fungos, foram inoculados no centro da superfície das mesmas com os respectivos tratamentos. Posteriormente, as placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em câmara BOD (25 ± 1 °C) e fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro. O crescimento radial foi medido por 10 dias com intervalos de 48 horas, ao final foi calculado uma média por placa. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. Os tratamentos foram preparados no esquema fatorial de 15 x 1 x 5 seguindo a combinação de um fungo fitopatogênico e cinco concentrações da levedura *S. cerevisiae* (BARROS *et al.*, 2019, adaptado). Após a obtenção dos dados, a análise estatística foi realizada por meio do ANOVA utilizando os programas Sigma Plot 11.0 e Excell 2010.

4.5 Teste de fitotoxidez do óleo essencial de noni em citros

Para o teste de fitotoxidez foram realizadas avaliações preliminares de fitotoxidez nas concentrações 1,25; 2,5; 5; 10 e 30 mg mL⁻¹ de óleo essencial de noni diluídos em Tween 80. Os frutos submetidos ao tratamento foram: laranja, mexerica e limão. As diferentes concentrações foram adicionadas na superfície dos frutos com auxílio de hastes flexíveis estéreis. Como testemunha foram utilizados frutos sem a aplicação do tratamento. Todo o experimento foi realizado em triplicata para cada concentração. A avaliação de fitotoxidez foi realizada durante o período de 10 dias com intervalos de 48 horas. Após os 10 dias de avaliações todos os frutos foram descartados. O método de avaliação utilizado seguiu uma escala de notas proposta por Goes (2004), que tem por característica avaliar a porcentagem de danos sucedidos na parte externa dos frutos, em que:

0 (zero) = frutos com ausência de sintomas de fitotoxicidez;

1 = frutos com sintomas leves (frutos com leves pontuações diminutas, pouco perceptíveis, sem restrição ao mercado de frutas frescas 1-10%);

2 = frutos com sintomas moderados (frutas com pontuações pequenas e visíveis, localizadas, às vezes em confluência, porém aceitas com restrição para o mercado de frutas frescas 11-20%);
3 = frutos com sintomas severos (pontuações escuras bem visíveis, ocupando espaços variáveis no fruto, rejeitados para mercado de frutas frescas >20%).

4.6 Efeito preventivo do óleo essencial de noni e solução de *S. cerevisiae* nos testes *in vivo*

Com base nos testes *in vitro* e de fitotoxidez, foram testadas as concentrações do óleo essencial de noni e da solução de levedura *S. cerevisiae* nos testes *in vivo*, para avaliar o controle preventivo das doenças causadas na cultura dos citros. Como controle positivo foi preparado um bioensaio com água destilada estéril, já para o controle negativo foi usado Tiofanato metílico (2%). A metodologia de preparo das soluções utilizada nesta etapa foi a mesma utilizada nos testes *in vitro*, variando apenas os volumes a serem aplicados. As soluções de conídios de cada fungo foram preparadas adicionando-se 10 mL de água destilada estéril em placas de Petri contendo o fitopatógeno, utilizou-se um pincel de cerdas macias para o desprendimento dos conídios, a solução obtida foi filtrada em gaze e efetuada a quantificação dos conídios em câmara de Newbauer, ajustando-se a concentração para 10^5 conídios mL^{-1} .

As diferentes concentrações de óleo essencial de noni e da solução de *S. cerevisiae* preparadas para o controle preventivo, foram aplicadas nos frutos com o auxílio de uma haste flexível. Cerca de duas horas decorridas da aplicação das soluções (200 μL), o patógeno foi inoculado (100 μL) nos frutos com auxílio de uma pipeta e em seguida os frutos foram mantidos em câmara úmida e escura por 48 horas. Posteriormente, os frutos foram colocados em ambiente natural com temperatura variando de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ para o desenvolvimento da doença. Transcorridos quatro dias após a inoculação foram realizadas cinco avaliações (visual) da severidade da doença com intervalo de dois dias por meio da escala de notas adotada por Costa (2017): **0** = fruta sadia; **1** = menos de 1% da área da fruta doente; **3** = 1 a 5 % da área do fruto doente; **5** = 6 a 25 % da área do fruto doente; **7** = 26 a 50 % da área do fruto doente; **9** = mais que 50% da área do fruto doente.

A partir dos valores de notas obtido nas avaliações, foi calculada a área sob a curva da progressão da doença (AACPD) segundo (DE SOUZA *et al.*, 2018).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e identificação morfológica dos fitopatógenos

A tabela 1 apresenta os fitopatógenos identificados em cada fruto cítrico e a sua característica visual.

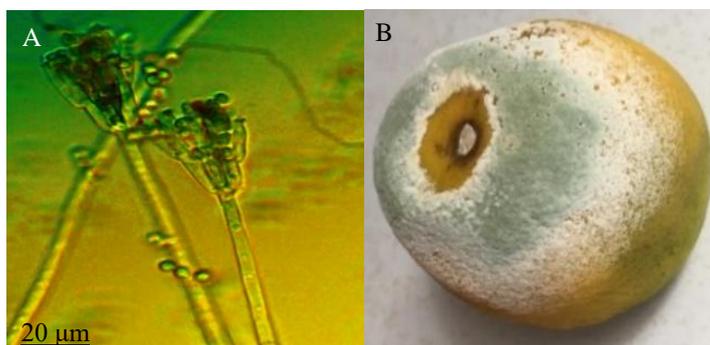
Tabela 1- Identificação dos fitopatógenos isolados de citros

Fungos Fitopatogênicos identificados				
Frutos	Nome Científico	Fungo	Doença	Literatura
Laranja	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Penicillium</i> sp.	Bolor verde	Benato <i>et al.</i> , 2018
Mexerica	<i>Citrus reticulata</i>	<i>Guignardia</i> sp.	Mancha Preta	Wickert <i>et al.</i> , 2012
Limão	<i>Citrus limon</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	Podridão	Da Silva (2009)

Fonte: Autora

Os microrganismos isolados de frutas cítricas foram: o fungo do gênero *Penicillium* sp. identificado no fruto da laranja (Figura 4), *Guignardia* sp. isolado do fruto de mexerica (Figura 5) e *Aspergillus* sp. isolado do fruto limão (Figura 6). São agentes patogênicos característicos de doenças pós-colheita na cultura dos citros, com exceção do *Aspergillus* sp. que atinge outras culturas na pós-colheita. A patogenicidade dos fungos pôde ser confirmada por meio dos postulados de Koch.

Figura 4 - Estrutura Morfológica do fungo *Penicillium* sp. (A) e laranja infectada pelo patógeno (B).



Fonte: Autora

Com base nas estruturas morfológicas identificadas e expressas na Figura 4 e os sintomas da doença no fruto (Figura 4B) é possível realizar a identificação e morfologia do fungo isolado. A Figura 4A apresenta morfologia que caracteriza a espécie de fungo *Penicillium*

sp., essa espécie de fungo exibe produção de conídios que formam colônias circulares de coloração verde oliva com borda branca. Responsável por causar nos frutos de laranja o bolor verde, doença que afeta diretamente a qualidade do fruto impossibilitando-o de ser comercializado. A estrutura morfológica dos conidióforos do patógeno é similar ao formato de uma vassoura com ramificações (LA SPADA *et al.*, 2021).

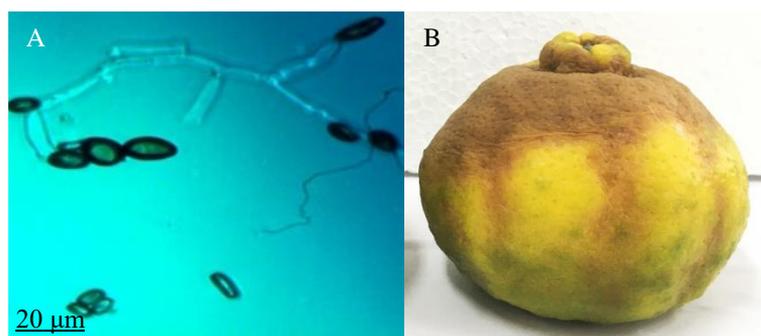
A identificação morfológica obtida para o fungo patogênico *Penicillium* sp., está de acordo com a descrita por Costa *et al.* (2019). Segundo o autor, inicialmente a infecção surge na casca do fruto no formato de uma mancha considerada aquosa, esta que, em condições apropriadas de crescimento possibilita o desenvolvimento de micélios de cor branca, seguido de conídios que apresentam a cor verde oliva caracterizando então, o bolor verde, doença que influencia diretamente na qualidade dos frutos de laranja.

Ghooshkhaneh *et al.* (2018) relatam que, se o ambiente apresenta temperatura e umidade adequada ao fungo, o mesmo provoca lesão na casca do fruto causando mancha com aspecto aquoso, e posteriormente formando micélios de cor branca. Ressalvam ainda que, após a lesão atingir um diâmetro de 2,5 a 5 cm inicia-se a produção de esporos de cor verde oliva, uma característica que define o patógeno.

Segundo Cheng *et al.* (2020) a infecção ao fruto pelo fungo *Penicillium digitatum*, está diretamente relacionada aos fenômenos ambientais como o vento e aos danos mecânicos. De acordo com o autor, os conídios levados pelo vento quando em condições adequadas de crescimento produzem tubos germinativos, infectando assim o fruto. Durante o processo de infecção, nota-se a presença de micélios brancos e posteriormente conídios de cor verde oliva, o que é caracterizado como um sintoma comum do mofo verde.

Na figura 5 nota-se que a estrutura morfológica (A) é característica do patógeno causador da doença mancha preta em mexerica (B).

Figura 5 - Estrutura morfológica do fungo *Guignardia* sp. (A) e mexerica infectada pelo patógeno (B).



Fonte: Autora

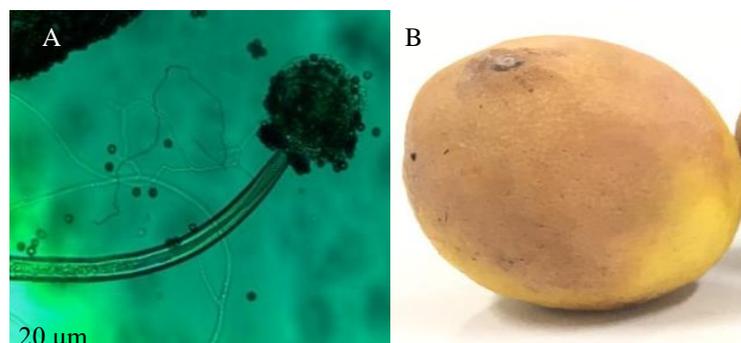
Em relação a estrutura morfológica apresentada na Figura 5A e os sintomas no fruto (Figura 5B) e com base na literatura examinada, a estrutura acima identificada caracteriza o fungo patogênico *Guignardia* sp., principal agente causal da doença mancha preta em citros, especificamente na mexerica. O fungo apresenta estruturas circulares denominados ascos em formato cilíndrico de cor escura e ligadas a septos translúcidos. A doença tem grande influência na aparência do fruto, pois apresenta lesões irreversíveis na superfície do fruto deixando-o com aspecto indesejável a comercialização (TRAN *et al.*, 2018).

Da Silva-Pinhati *et al.* (2017) relatam que é característico do fungo *Guignardia* sp. a causa de manchas sardentas em frutas cítricas. Conforme descrito, o patógeno causa lesão na casca do fruto, deixando-o com aparência necrosada e presença de picnídios no centro dessas lesões. Em estudo, os autores afirmam que, as manchas não afetam a parte interna do fruto, entretanto, tem influência direta na aparência do fruto o que resulta na perda do valor comercial.

Wickert *et al.* (2012) descrevem que, frutas cítricas contaminadas pelo fungo *Guignardia* sp. após o processo de infecção apresentam manchas sardentas com aspecto duro. Em seu trabalho os autores descrevem que, a propagação do fungo se dá por meio de estruturas conhecidas como ascósporos formados de forma sexuada, ou picnídios assexuados. Segundo os autores, o conídio, estrutura formada dentro de um órgão especializado denominado picnídio, só é comumente encontrado em frutos com lesões no estágio de maturação.

A figura 6 a seguir refere-se a estrutura morfológica do fungo *Aspergillus* sp. (A) e o sintoma da doença podridão no fruto de limão (B).

Figura 6 - Estrutura morfológica do fungo *Aspergillus* sp. (A) e Limão infectado pelo patógeno (B).



Fonte: Autora

Na Figura 6A o patógeno tem morfologia característica do fungo patogênico *Aspergillus* sp. O *Aspergillus* sp. é responsável por grandes perdas em diferentes alimentos com elevado índice de contaminação devido a esporulação excessiva do patógeno, causa impacto direto na

produtividade dos frutos por ser uma doença pré e pós-colheita, influenciando diretamente na economia do país. Em sua estrutura morfológica, o fungo apresenta um estipe ligada a uma vesícula globosa, caracterizada por métulas e fiálides conectada a conídios na área superficial. Neste caso, o fruto contaminado pelo patógeno *Aspergillus* sp. se torna um fruto totalmente descartável, devido à perda de qualidade.

Já Da Silva (2009) confirma em seu trabalho que, o gênero *Aspergillus* engloba um número de 132 espécies divididas em 18 grupos. A diferenciação dos fungos deste gênero é identificada de acordo com a sua característica morfológica. Dentre as espécies, há uma variação na cor (marrom, preto, cinza, verde e amarelo) do patógeno, sendo este um excelente atributo a ser avaliado, facilitando assim a identificação do microrganismo.

É importante ressaltar que o *Aspergillus* sp. não é o principal agente causal da podridão em citros. Contudo, o patógeno foi identificado como sendo um dos contaminantes em frutos de limão coletados no mercado local da cidade.

5.2 Extração do óleo essencial de noni e identificação dos compostos orgânicos voláteis

O método de hidrodestilação adotado na extração do óleo essencial de noni foi eficiente com um rendimento de aproximadamente 1,8 mL por extração.

De acordo com o resultado obtido na análise cromatográfica (Tabela 2), o constituinte majoritário identificado na composição química do óleo essencial de noni foi o ácido octanóico (92,02 %).

Tabela 2 – Constituintes químicos identificados na composição do óleo essencial de noni (*Morinda citrifolia*) extraído dos frutos.

Óleo essencial de Noni (<i>Morinda citrifolia</i>)			
Composto	TR (min)	IR (min)	Área (%)
Ácido butanóico, éster metílico	6,385	6,340	0,30
Ácido hexanóico, éster etílico	9,029	8,950	0,09
Ácido octanóico, éster metílico	14,293	14,185	1,21
Ácido octanóico, éster etílico	17,555	17,410	1,51
Ácido octanóico	21,582	18,820	92,02
Ácido n-decanóico	26,247	25,555	3,66
Carbonato de isobutil 3-metilbut-3-enil	28,795	28,585	1,22

TR = Tempo de retenção por minuto; IR = Índice de retenção; % = Área de retenção

Fonte: Autora

Dalcin *et al.* (2017) em análise química do óleo essencial de noni, também relatou o ácido octanóico como composto majoritário com teor de 82,24%. Resultados semelhantes foram obtidos por Costa (2017), em sua pesquisa o autor encontrou a mesma quantidade de ácido octanóico (82,24%).

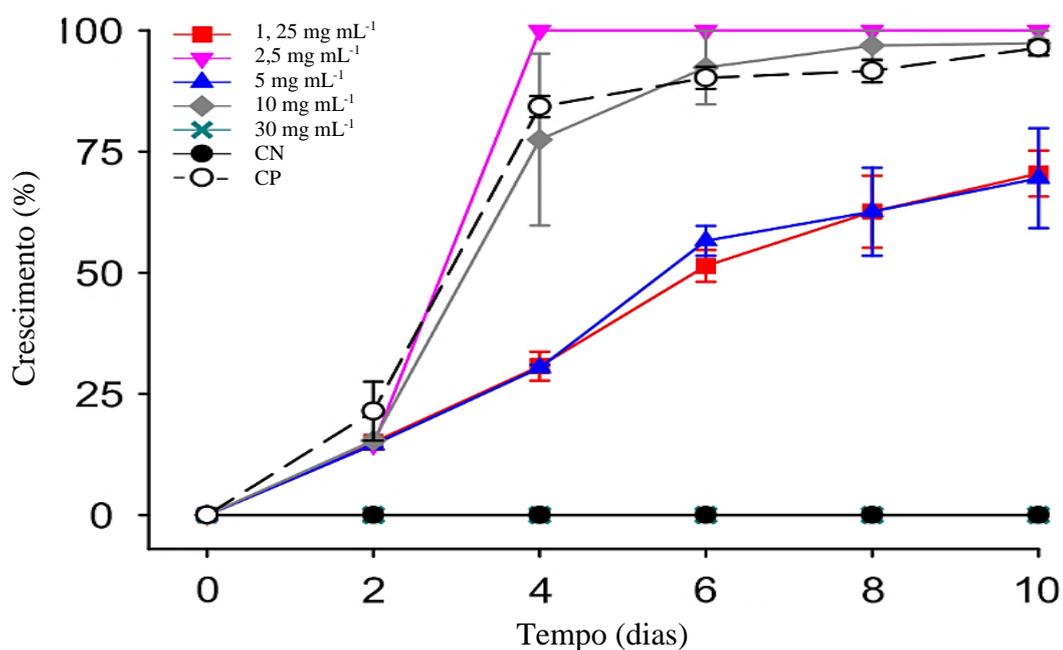
Osorio *et al.* (2016) identificou ácido octanóico com teor de 64,03% ao analisar a composição química do óleo essencial de noni. São poucos os resultados envolvendo análises da composição química do óleo essencial desse fruto.

Pode-se concluir que o composto é identificado em todas as análises como composto majoritário, diferindo somente na concentração encontrada em cada composição. Essa característica provavelmente deve estar relacionada a fatores ambientais que influenciam diretamente na espécie.

5.3 Atividade fungistática do óleo essencial de noni *in vitro*

A atividade fungistática do óleo essencial de noni frente aos três isolados patogênicos, denotou que o óleo essencial apresentou atividade inibitória eficaz na maior concentração de 30 mg mL⁻¹ (Figura 7, 8 e 9). Os gráficos a seguir permitem observar a porcentagem de crescimento dos patógenos frente ao tratamento recebido.

Figura 7 - Atividade fungistática do óleo essencial de noni (*Morinda citrifolia*) frente ao fungo patogênico *Penicillium* sp.



Fonte: Autora

O fungo *Penicillium* sp. apresentou porcentagem de crescimento zero na maior concentração do óleo de noni (30 mg mL⁻¹), proporcionando 100% de inibição do patógeno nesta concentração. Não diferindo estatisticamente do controle negativo Tiofanato metílico (CN) (2%). As demais concentrações do óleo não apresentaram resultados significativos, com índice de crescimento acima de 50 % sendo estatisticamente igual ou semelhante ao controle positivo (CP). O resultado alcançado comprova que, o óleo de noni em baixas concentrações não apresenta ação fitotóxica considerada eficaz na inibição do patógeno *Penicillium* sp.

A inibição do patógeno induzida na maior concentração do tratamento, pode estar relacionada com os compostos orgânicos voláteis identificados no óleo de noni. São compostos que tem ação fitotóxica para o patógeno no qual podem atuar na oxidação de lipídios que compõem a membrana plasmática, inibindo assim a germinação dos conídios e impedindo então o crescimento do patógeno (RUSSIANO *et al.*, 2019).

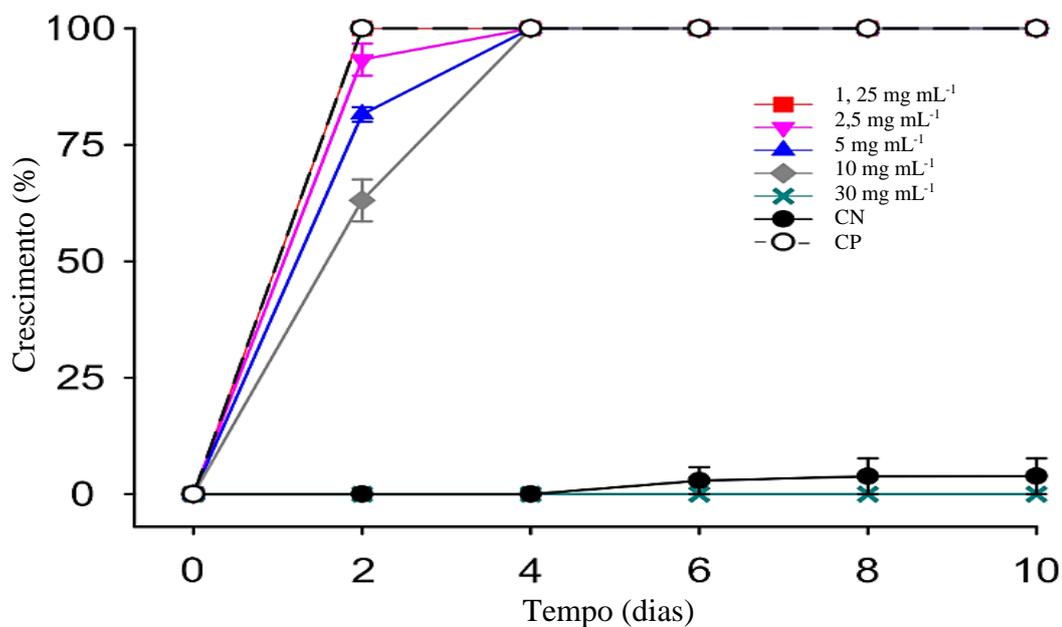
Costa (2017) comprovou por meio de seu trabalho a eficácia do óleo essencial de noni no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causador de antracnose na pós-colheita do mamão. O autor verificou que o óleo essencial foi um excelente inibidor do crescimento micelial do patógeno a partir da concentração de 3000 ppm, comprovando assim o seu potencial fungitóxico contra patógenos de pós-colheita. Não há muitos relatos na literatura correlacionando a aplicação do óleo de noni no controle de agentes patogênicos que atuam na pós-colheita em frutas. Entretanto, diferentes trabalhos como o de Fonseca *et al.* (2019), Barros *et al.* (2021) e Dalcin *et al.* (2017) comprovaram a eficácia do óleo de noni em patógenos que causam doença em mangueira, na cultura da soja e na cultura do melão.

Russiano *et al.* (2019) estudaram a ação do óleo essencial de citronela no controle do patógeno *Penicillium* sp. causador da doença bolor azul em frutos de maçã na pós-colheita. Os autores confirmaram em seu trabalho que o óleo essencial de citronela inibiu em 100% o crescimento micelial do patógeno nas duas doses testadas (5 µL e 10 µL). O resultado demonstra que os óleos essenciais são compostos que apresentam potencial, bem como sendo uma fonte promissora e se classificando como uma opção de controle alternativo na proteção de frutas na pós-colheita.

Embora sejam compostos orgânicos voláteis os óleos essenciais são moléculas com alto potencial de controle de microrganismos patogênicos. Assim sendo, mais estudos devem investigar a ação fungistática do óleo de noni no controle de outros fungos patogênicos, a fim de averiguar sua eficácia em uma ampla variedade de espécies fúngicas.

A seguir, a figura 8 evidencia os resultados do óleo de noni no controle do crescimento do patógeno *Guignardia* sp.

Figura 8 - Atividade fungistática do óleo essencial de noni (*Morinda citrifolia*) frente ao fungo patogênico *Guignardia* sp.



Fonte: Autora

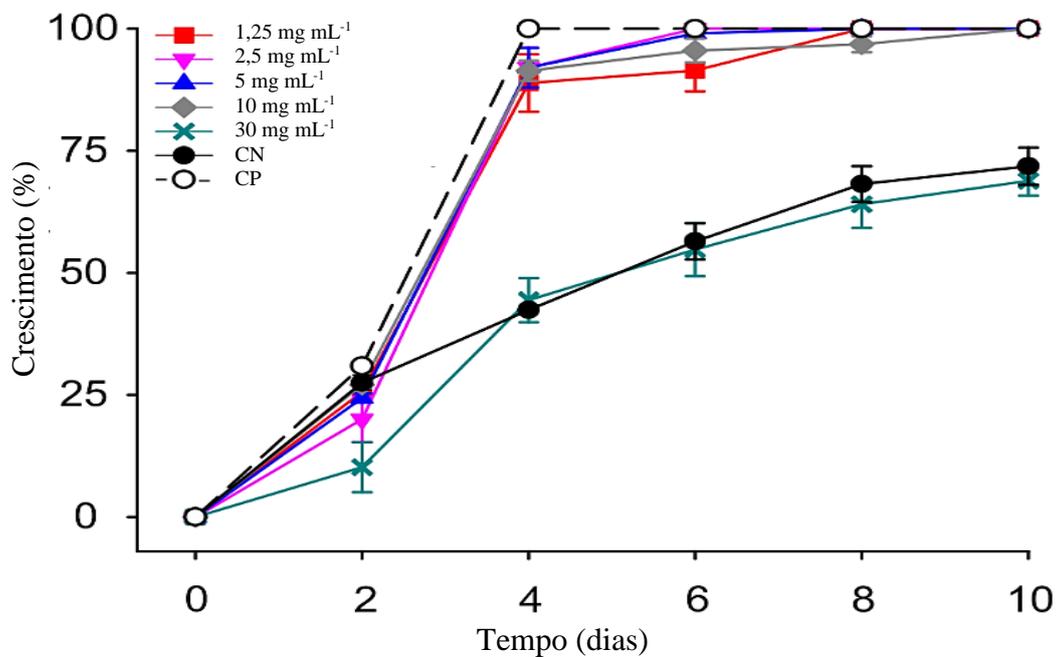
O fungo *Guignardia* sp. submetido a ação fungistática do óleo essencial de noni, apresentou zero de crescimento na concentração de 30 mg mL⁻¹ com inibição de 100% do fungo. Enquanto que, o controle negativo exibiu crescimento de 4% com inibição significativa de 96% sendo o resultado estatisticamente similar a maior concentração do óleo. As concentrações abaixo de 30 mg mL⁻¹ não apresentaram eficácia significativa na inibição do crescimento micelial do patógeno. Nota-se, que para este patógeno ao terceiro dia de avaliação nas concentrações de 1,25; 2,5; 5 e 10 mg mL⁻¹ o fungo *Guignardia* sp. já havia se desenvolvido em 100% em todo o meio de cultivo. Estas concentrações não apresentaram potencial inibitório para este patógeno sendo estatisticamente análogo ao controle positivo (CP).

Com base no resultado obtido para o fungo *Guignardia* sp. a não inibição do mesmo pode ser explicada pelo fato do óleo não apresentar ação fitotóxica para este patógeno em concentrações inferiores a 30 mg mL⁻¹. Logo, para que o patógeno tenha seu processo de germinação interrompido o ideal é testar concentrações acima de 30 mg mL⁻¹. A literatura não relata o uso do óleo de noni no controle do fungo *Guignardia* sp. o que torna o atual trabalho uma novidade em relação ao uso do tratamento frente ao patógeno.

Entretanto, diferentes óleos essenciais foram testados por Mattos (2010) no controle do fungo *Guignardia citricarpa*. O autor avaliou o óleo essencial de menta, citronela, alecrim, eucalipto, e gengibre, nas concentrações de 10.000 e 100.000 mL. L⁻¹. Contudo, nenhum dos óleos apresentaram propriedade antifúngica para o fungo *Guignardia citricarpa*. Desta forma, o resultado do atual trabalho no controle do fungo *Guignardia* sp. é visto como um resultado de caráter promissor no controle do patógeno na maior concentração do óleo de noni.

Na figura 9 observa se a ação fungistática das diferentes concentrações do óleo de noni no controle do fungo *Aspergillus* sp.

Figura 9 - Atividade fungistática do óleo essencial de noni (*Morinda citrifolia*) frente ao fungo patogênico *Aspergillus* sp.



Fonte: Autora

Já a ação fungistática do óleo de noni frente ao crescimento do fungo *Aspergillus* sp. apresentou resultados com baixo índice de significância, apresentando porcentagem de inibição relativamente baixa. Na maior concentração (30 mg mL⁻¹) do tratamento houve inibição de 31% com crescimento micelial de 69% sendo semelhante ao controle negativo (CN) que apresentou crescimento de 72% e inibição de 28% sendo estes considerados resultados estatisticamente não satisfatórios.

Para o controle do fungo *Aspergillus* sp. o óleo de noni não apresentou interferência fitotóxica no crescimento do patógeno, mesmo na maior concentração. O fungo também

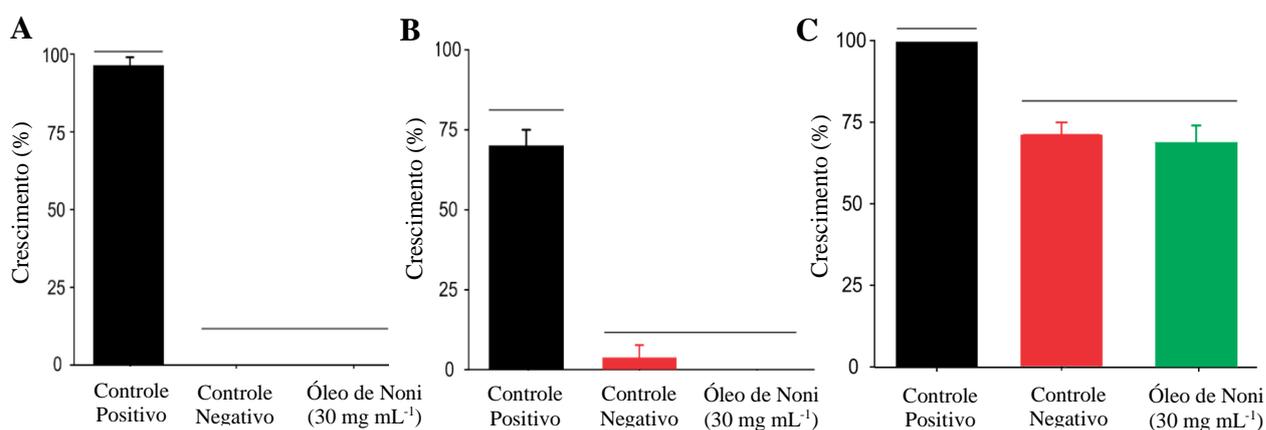
demonstrou resistência ao tratamento com o fungicida. Logo, pode-se inferir que para este patógeno os fitoconstituintes do óleo de noni não demonstraram ação antifúngica.

Contudo Nunes *et al.* (2021) testaram a eficácia do óleo essencial de tomilho no controle de *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* e *Sclerotinia sclerotiorum* e o mesmo apresentou inibição de 100% nas concentrações de 0,01%; 0,02% e 0,05%. Os autores relatam que são patógenos que causam doenças na pós - colheita de grãos, frutos como a maçã e a laranja, verdura e legumes como a cenoura e alface.

De acordo com os resultados obtidos pelo ANOVA a maior concentração indica que o óleo de noni apresenta potencial no controle da doença mofo verde e mancha preta em citros. Alguns estudos descrevem que o mecanismo de ação dos óleos essenciais está diretamente relacionado com o vazamento do conteúdo celular que compõe a parede celular dos fungos. Isso porque os constituintes do óleo essencial atuam no processo de oxidação dos lipídios que compõem a membrana celular (RUSSIANO *et al.*, 2019).

A figura 10 demonstra a comparação entre médias obtida pelo ANOVA. As médias comparadas entre si consiste na concentração de 30 mg mL⁻¹ sendo comparada com o controle positivo e controle negativo.

Figura 10 – Crescimento dos fungos *Penicillium* sp. (A), *Guignardia* sp. (B) e *Aspergillus* sp. (C), após dez dias exposto a 30 mg/mL de óleo essencial de noni; Tratamentos sob a mesma linha horizontal não diferem estatisticamente ANOVA ($P < 0,05$).



Fonte: Autora

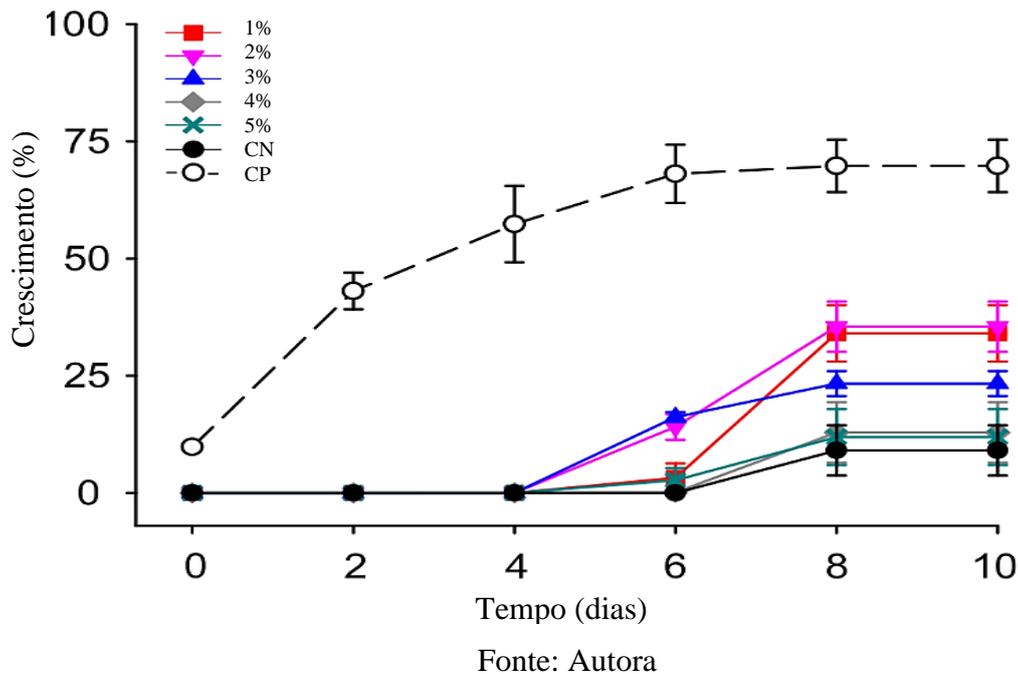
De acordo com os resultados de comparação de médias pelo ANOVA houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre as médias do controle positivo e do tratamento com o óleo (30 mg mL⁻¹). No entanto, o óleo foi estatisticamente similar ao controle negativo para os três patógenos. O resultado emitido pelo ANOVA demonstrou que houve inibição na maior concentração do óleo para os dois patógenos *Penicillium* sp. e *Guignardia* sp. (A e B) sendo

análogo ao controle negativo, diferindo estatisticamente do controle positivo. Apesar de não apresentar inibição eficaz para o *Aspergillus* sp. (C) na maior concentração do óleo e pelo controle negativo, nota-se que houve diferença estatística ao compará-lo com o controle positivo.

5.4 Atividade Fungistática da *Saccharomyces cerevisiae* in vitro

Os resultados a seguir evidenciam a eficácia de ação fungistática da solução de levedura *Saccharomyces cerevisiae* como agente de biocontrole dos fitopatógenos representados nos gráficos a seguir (Figuras 11, 12 e 13).

Figura 11 - Atividade fungistática da *Saccharomyces cerevisiae* frente ao fungo patogênico *Penicillium* sp.



A levedura exibiu atividade fungistática em todas as concentrações testadas para o fungo *Penicillium* sp. Os melhores efeitos fungistáticos do óleo de noni foram notados a partir da concentração de 3%. Nesta concentração, o patógeno cresceu somente 24% resultando numa inibição de 76%. Na concentração de 4% o patógeno apresentou crescimento de 13% exibindo inibição de 87% de *Penicillium* sp., análogo a concentração de 5% no qual o fungo teve crescimento de apenas 12% apresentando 88% de inibição. Dentre todas as concentrações, a menor porcentagem de inibição foi constatada pela concentração de 1% pois o patógeno cresceu 36% com 64% de inibição do patógeno, ainda assim, sendo um resultado estatisticamente

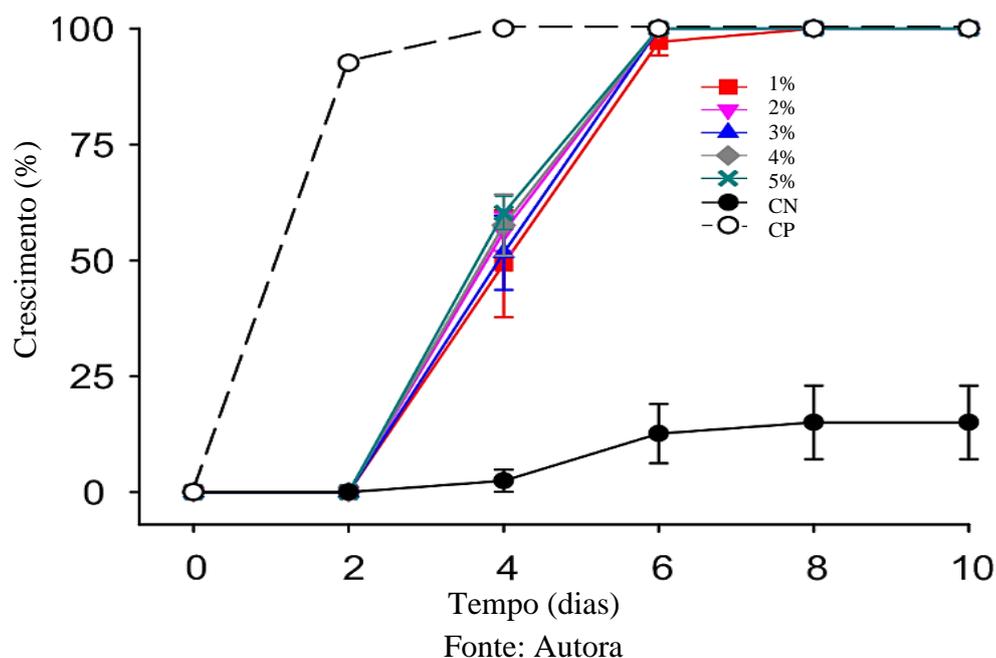
significativo. Logo, para todas as concentrações da solução de *S. cerevisiae* foi notado potencial fungistático.

Contudo, a porcentagem de inibição do óleo de noni foi similar a inibição induzida pelo controle negativo (CN), o qual proporcionou crescimento de 10% apesar de algumas espécies de fungos já apresentarem resistência a esse fungicida. Vale ressaltar que, na placa controle positivo (CP) o fungo apresentou crescimento de 70%. Tal resultado comprova cientificamente a eficácia do tratamento (solução de *S. cerevisiae*) como uma possível alternativa no controle de doenças causadas em citros pelo patógeno *Penicillium* sp.

Os resultados da pesquisa corroboram com os resultados obtidos por Da Cunha *et al.* (2020), os autores observaram a atividade fungitástica da levedura *Candida stellimalicola* e *Saccharomyces cerevisiae* no controle no patógeno *Penicillium italicum* agente causal do mofo azul em frutos de laranjas na pós-colheita. E constataram inibição acima de 90% por meio da levedura *C. stellimalicola* e 86% de inibição do crescimento micelial do patógeno mediado pela ação da *S. cerevisiae*. O que denota promessa no uso de leveduras como fonte alternativa ao uso de produtos químicos.

A figura 12 a seguir expõe a aplicação da solução de *Saccharomyces cerevisiae* no controle do fungo patogênico *Guignardia* sp.

Figura 12 - Atividade fungistática da *Saccharomyces cerevisiae* frente ao fungo patogênico *Guignardia* sp.

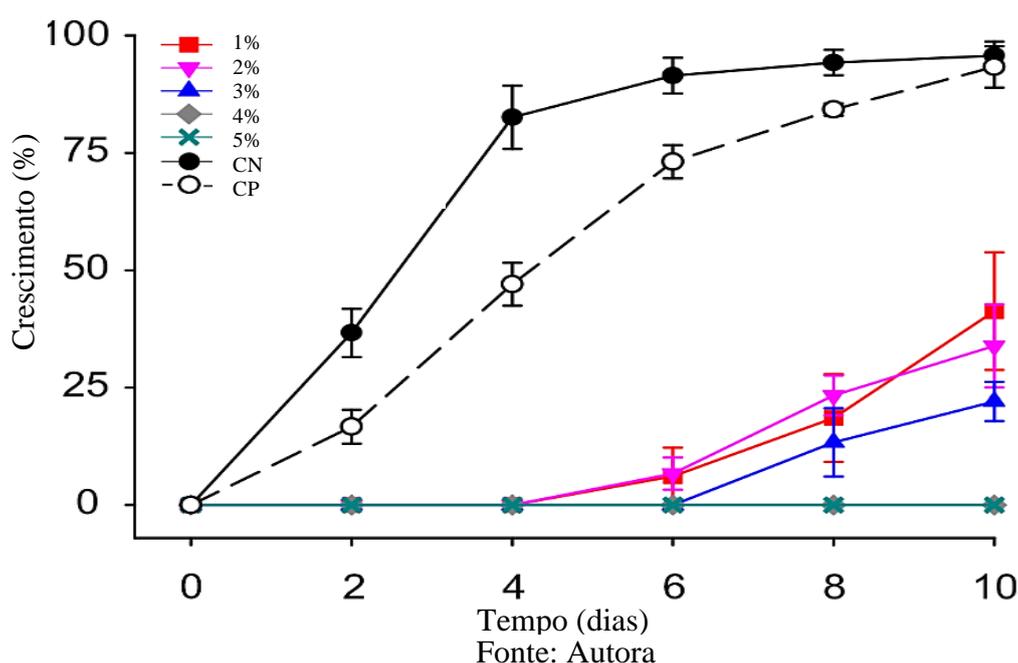


Para o fungo *Guignardia* sp. a solução de levedura *Saccharomyces cerevisiae* não foi eficaz em inibir o crescimento micelial do fungo, o patógeno apresentou resistência a todas as concentrações testadas. Verificou-se que no tempo de quatro dias o patógeno já havia tomado toda a placa, o que resultou em zero por cento de inibição, inviabilizando assim o uso da *Saccharomyces cerevisiae* como fonte de tratamento para este patógeno. Porém, o controle negativo (CN) inibiu 85% o crescimento do fungo *Guignardia* sp. comprovando que esta linhagem não apresentou resistência ao fungicida. O resultado também comprova que, os compostos orgânicos voláteis e as enzimas degradantes produzidas pela levedura, não apresentam efeito tóxico ao fungo *Guignardia* sp.

A literatura não relata o uso da levedura *S. cerevisiae* no controle de *Guignardia* sp. No entanto, Toffano *et al.* (2017) avaliaram o efeito dos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por *S. cerevisiae* no controle de *Guignardia citricarpa* e relataram que, ao final de 12 dias os compostos orgânicos voláteis (COVs) reduziram em 64% o crescimento micelial e a germinação do patógeno. Tal ação foi mediada por álcoois 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol. Segundo os autores, os álcoois têm a característica de danificar a membrana plasmática ao afetar a estrutura e estabilidade da bicamada lipídica, impactando diretamente a permeabilidade do meio celular.

Contudo, a figura 13 diferente da figura anterior, exhibe os resultados da ação fungistática da solução de *S. cerevisiae* no controle *in vitro* do patógeno *Aspergillus* sp.

Figura 13 - Atividade fungistática da *Saccharomyces cerevisiae* frente ao fungo patogênico *Aspergillus* sp.



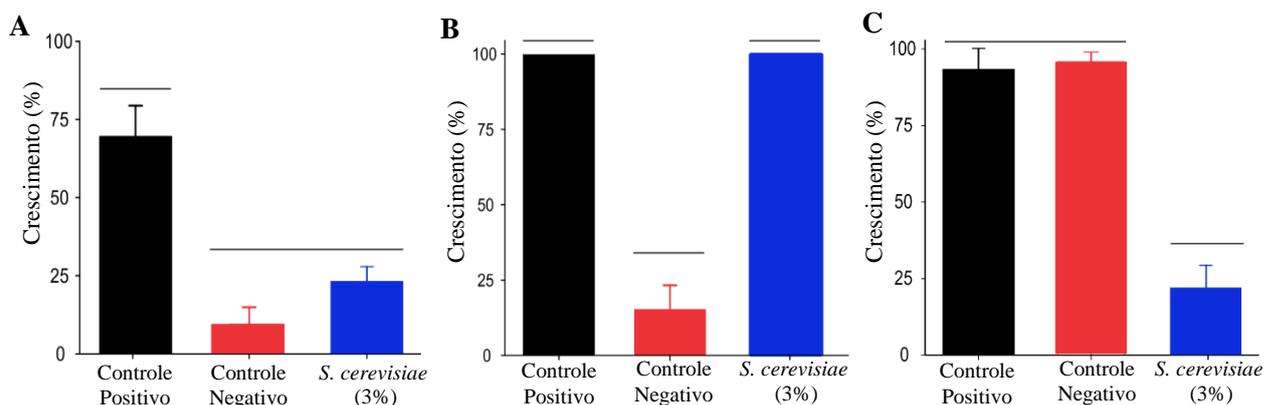
A solução de levedura *S. cerevisiae* foi eficaz na inibição do fungo *Aspergillus* sp. apresentando resultados estatísticos satisfatórios em todas as concentrações testadas. O tratamento foi um ótimo agente biológico na inativação do crescimento fúngico. A concentração de 5% e 4% apresentaram melhor atividade fungistática, inibindo 100% o crescimento do fungo *Aspergillus* sp. A concentração de 3% apresentou inibição de 77% resultando num crescimento micelial de apenas 23%. As demais concentrações (1% e 2%) do tratamento apresentaram crescimento de 42% e 34% com inibição significativa de 58% e 66% respectivamente, sendo estatisticamente um resultado que conferiu ação fungistática ao patógeno estudado.

Para a espécie de fungo *Aspergillus* sp. o tratamento aplicado apresentou-se como uma excelente alternativa, visto que, exibiu eficácia de inibição melhor que o controle negativo (CN). O fungicida não apresentou eficácia significativa no controle do patógeno, já que o mesmo teve um crescimento micelial de 96 % com apenas 4% de inibição do fungo *Aspergillus* sp. Outros estudos exibem avaliação do uso de *S. cerevisiae* no controle de *Aspergillus flavus*, porém, todos são isolados a partir de grãos como o milho, amendoim e café dentre outros grãos.

Assim sendo, no estudo de Abdel-Kareem *et al.* (2019) foram testadas células vivas de *S. cerevisiae* no controle de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxinas em grãos de café. De acordo com o autor, a inibição máxima do crescimento micelial foi de 85%, sendo um resultado considerado estatisticamente significativo. Deste modo, com base nos resultados do atual estudo realizado pode-se afirmar que a levedura *S. cerevisiae* se apresenta como uma excelente alternativa no controle biológico dos patógenos acima avaliados.

A figura 14 é resultado do teste ANOVA com finalidade de comparar as médias obtidas no controle positivo, controle negativo e na concentração de 3% da solução de *S. cerevisiae*.

Figura 14 – Crescimento dos fungos *Penicillium* sp. (A), *Guignardia* sp. (B) e *Aspergillus* sp. (C), após dez dias exposto a *S. Cerevisiae* (3%); Tratamentos sob a mesma linha horizontal não diferem estatisticamente ANOVA ($P < 0,05$).



Fonte: Autora

Dentre os testes de média os melhores resultados foram obtidos para o patógeno *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. (A, C). No qual observa-se que os melhores resultados foram estatisticamente notáveis com melhor índice de significância ($P < 0,05$) a partir da concentração de 3%. Nota-se, que em comparação com o controle positivo a concentração (3%) foi melhor para o fungo *Penicillium* sp. (A) entretanto, quando comparado com o controle negativo o mesmo se mostrou estatisticamente melhor que 3%. Para o fungo *Guignardia* sp. (B) não houve diferença significativa na concentração de 3% em relação ao controle positivo. No entanto, o controle negativo se mostrou melhor que o tratamento na concentração de 3%. Já para o fungo *Aspergillus* sp. (C) a concentração de 3% foi melhor que os dois controles positivo e negativo, sendo estatisticamente um resultado significativo.

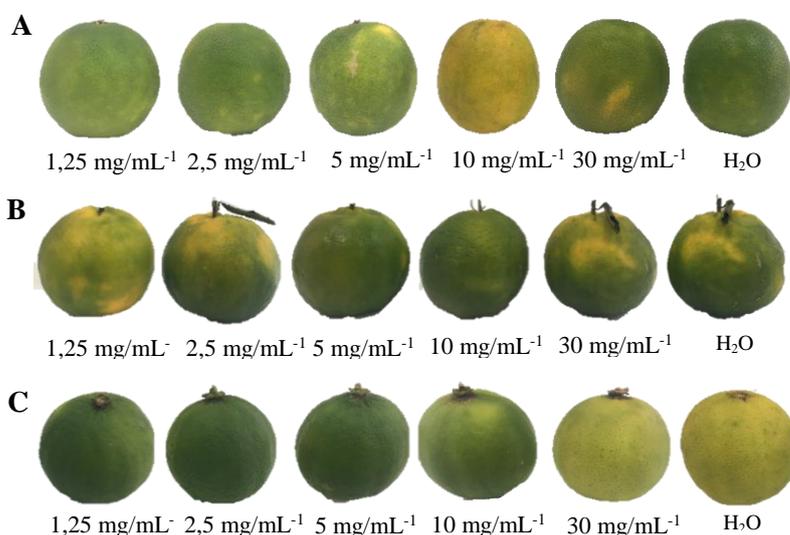
Os resultados de comparação entre médias apenas confirmam de modo isolado o que já foi demonstrado pela análise de variância (ANOVA) nos gráficos anteriores.

5.5 Teste de fitotoxidez do óleo essencial de noni em citros

O óleo essencial de noni não apresentou fitotoxidez nos frutos de laranja, mexerica e limão, não influenciando de forma negativa na aparência dos frutos uma característica exigida pelo consumidor na hora da compra. Não há relatos na literatura sobre a ação fitotóxica do óleo essencial de noni em frutos cítricos.

Assim, a figura a seguir (Figura 15) permite observar a ação do óleo de noni na superfície dos frutos cítricos. Observe que em nenhum dos tratamentos houve efeito de fitotoxidez nos frutos.

Figura 15 – Frutos de laranja (A) mexerica (B) e limão (C) submetidos ao teste de fitotoxidez do óleo de noni.



Fonte: Autora

Desta forma, o óleo de noni se apresentou como um bom agente biológico a ser usado na proteção de frutos cítricos visto que não ocorreu ação fitotóxica nos frutos.

Resultados diferentes foram obtidos por Costa (2017) ao testar o óleo essencial de noni em frutos de mamão, o autor descreveu que o óleo essencial nas concentrações de 5 a 20% causou elevado índice de fitotoxidez nos frutos. Destacou ainda que, a concentração de 20% gerou fitotoxidez de até 90% de lesão nos frutos de mamão. Contudo o autor relata que, a concentração de 3% causou lesões consideradas leves, não influenciando na não comercialização dos frutos visto que, estão dentro dos padrões de aceitação do mercado de frutas frescas.

Isso comprova que, o óleo essencial de noni em altas concentrações dependendo da variedade frutífera pode apresenta ação fitotóxica para o fruto. Impedindo assim, a sua comercialização pois, a aparência do fruto é a principal característica avaliada pelo consumidor na hora da compra. Por esta razão se faz necessário a realização de diferentes testes com diferentes concentrações em diversas variedades frutíferas, ampliando assim, mais informações sobre a atividade antifúngica e protetiva proporcionada pelo óleo essencial de noni.

5.6 Efeito preventivo do óleo essencial de noni e solução de *S. cerevisiae* nos testes *in vivo*

A figura 16 a seguir é resultado do teste de avaliação do efeito protetivo do óleo essencial nos frutos *in natura*. Ao avaliar os gráficos observar-se a Área Abaixo do Progresso da Doença (AACPD) em frutos de laranja (Gráfico A), frutos de mexerica (Gráfico B) e frutos de limão (Gráfico C).

O tratamento preventivo com o óleo de noni mostrou se como uma boa alternativa biológica na ação protetiva contra doenças causadas em frutos cítricos por fungos patogênicos como *Penicillium* sp. (A), *Guignardia* sp. (B) e *Aspergillus* sp. (C).

No gráfico 16A todas as concentrações do óleo apresentaram ação protetiva no controle da doença mofo verde em frutos de laranja, visto que, o desenvolvimento dos sintomas se manteve abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). Estas concentrações se mostraram estatisticamente melhor que o fungicida comercial Tiofanato metílico (CN). Nota-se também, que o melhor efeito protetivo foi constatado na concentração de 30 mg/mL⁻¹.

Já no gráfico 16B ao contrário do resultado que foi obtido nos testes *in vitro* o óleo *in vivo* demonstrou um excelente potencial de ação protetiva frente aos frutos de mexerica no controle da doença macha preta, o efeito foi observado a partir da concentração de 2,5; 10 e 30 mg/mL⁻¹. A menor concentração (1,25 mg/mL⁻¹) apresentou resultado semelhante ao fungicida

comercial Tiofanato metílico (CN) e o controle positivo (CP) não diferindo estatisticamente entre si.

Contudo, para o fungo *Aspergillus* sp. (16C) o melhor efeito protetivo do óleo foi notado na maior concentração (30 mg/mL⁻¹) seguido da concentração de 10 mg/mL⁻¹ sendo estas melhores que o fungicida comercial Tiofanato metílico (CN). As demais concentrações não apresentaram diferença estatística do controle positivo.

Com base no atual resultado pode se afirmar que o óleo de noni se apresenta como uma boa alternativa e com um ótimo potencial de ação protetiva frente a doenças que ocorrem na pós colheita de citros. É importante ressaltar que, o ideal é testar esse composto orgânico nos frutos ainda na pré colheita, pois isso pode favorecer uma proteção ainda mais significativa.

Vale salientar que, esse efeito protetivo está diretamente relacionado aos compostos fitoquímicos presentes no óleo de noni. Os compostos têm ação de induzir o efeito fungistático na estrutura do fungo impedindo assim o progresso da doença, como também a ação de induzir o mecanismo de defesa das plantas e frutos.

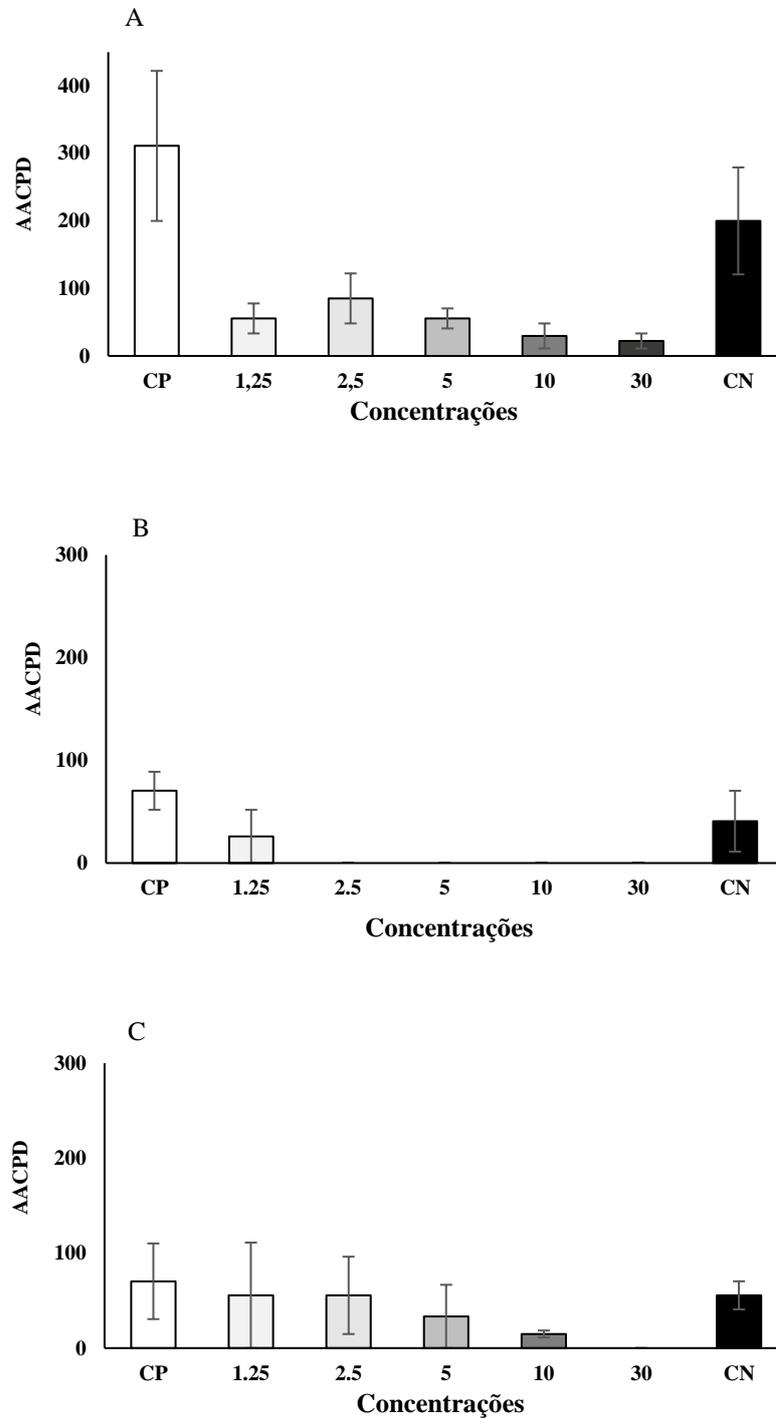
São escassos os relatos na literatura pesquisada sobre a ação preventiva do óleo essencial de noni (*M. citrifolia*) em frutas cítricas e outras. Entretanto, há registro da aplicação do óleo essencial de noni no controle preventivo de doenças foliares em cultivares de grande importância econômica para o país, como por exemplo o milho o melão a mangueira dentre outras espécies (DALCIN *et al.*, 2017; FONSECA *et al.*, 2019; SILVA, 2016).

Porém, Benato *et al.* (2018) observou o efeito preventivo do óleo essencial de canela e capim-limão no controle da doença bolor verde em laranjas. O mesmo constatou que o capim limão na concentração de 0,5 g L⁻¹ apresentou redução no valor da AACPD em 53% quando comparado a testemunha. Isso confirma que os óleos essenciais são compostos fitoquímicos com um grande potencial de ação protetiva e preventiva de determinadas doenças fúngicas.

Estudos da severidade da doença em frutos ou em qualquer outra cultivar são de fundamental importância, pois, permite visualizar e identificar qual o melhor tratamento que auxilie no controle e prevenção de determinada doença. Possibilitando assim, por meio da AACPD (Área abaixo do progresso da doença) uma conclusão mais direta sobre a efetiva proteção do bioproduto estudado.

Assim sendo, observe a Área Abaixo do Progresso da Doença (AACPD) nos gráficos a seguir e sua representatividade em termos de prevenção e controle da doença nos frutos de laranja (A), mexerica (B) e limão (C).

Figura 16 - Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) em citros. Tratamento preventivo com óleo de noni no fruto de Laranja (*Penicillium* sp.) (A); mexerica (*Guignardia* sp.) (B) e Limão (*Aspergillus* sp.) (C).



Fonte: Autora

Contudo, Costa (2017) avaliou o efeito protetivo do óleo essencial em frutos de mamão. O autor testou o óleo de noni combinado com outros compostos como o óleo de girassol

e lippia, e afirma que os compostos do óleo de noni combinado com outros, promoveram ação inibitória do patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* reduzindo a AACPD.

Barros (2019) constatou o efeito preventivo do óleo essencial de citronela no controle de podridão peduncular da manga causada por *Lasiodiplodia theobromae*, na pós-colheita. Todos os resultados do autor foram expressos em porcentagem, assim sendo, descreve que o óleo essencial de citronela apresentou efeito protetivo de 91,6% de proteção do fruto no controle da doença.

O atual resultado comprovou que o óleo de noni se apresenta como um bom agente biológico na ação protetiva de frutos cítricos, o mesmo proporcionou resultados significativos na proteção dos frutos que são altamente consumidos no país.

Já a figura 17 evidencia o efeito preventivo da solução de *Saccharomyces cerevisiae* na proteção dos frutos *in vivo*. É possível avaliar os gráficos com base na análise da Área Abaixo do Progresso da Doença (AACPD) apresentado pelos frutos avaliados, laranja (Gráfico A), mexerica (Gráfico B) e limão (Gráfico C).

A levedura *S. cerevisiae* proporcionou uma excelente atividade de proteção aos frutos tratados. Todas as concentrações testadas (1%, 2%, 3%, 4% e 5%) demonstraram potencial preventivo no controle das doenças que atacam os frutos de laranja (A), mexerica (B) e limão (C) na pós colheita. O tratamento protegeu em 100% os frutos contra a ação dos fungos patogênicos, sendo este melhor que o fungicida comercial. Diante do exposto, nota-se no gráfico somente a AACPD referente ao controle negativo (CN) e o controle positivo (CP).

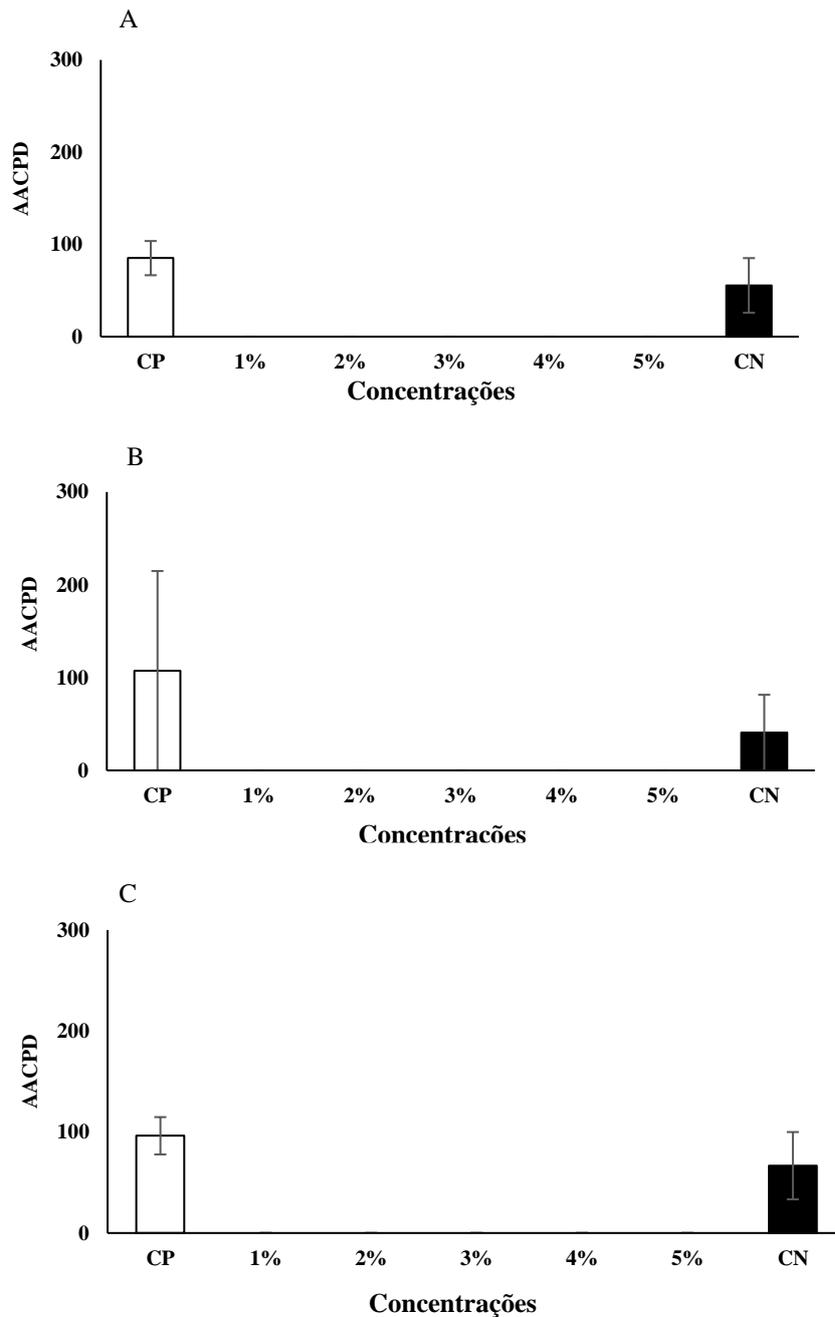
O efeito de proteção encontrado em microrganismos como a levedura *S. cerevisiae* pode estar relacionado a sua capacidade de produzir compostos orgânicos voláteis que podem auxiliar nessa proteção aos frutos, também existe a possibilidade de competição por espaço dentre outros fatores que devem ser melhores estudados.

Um exemplo dessa característica presente nas leveduras está no trabalho de Ferreira (2020), o qual verificou a ação de um composto antifúngico (não identificado) produzido pela levedura *Hansenula wingei* no controle da doença podridão azul em frutos de maçã. O autor confirmou a eficácia preventiva do composto nos frutos, o qual controlou significativamente em 61,52% a severidade da doença nos frutos pós-colheita.

A literatura relata ainda diversos trabalhos no meio científico confirmando o potencial protetivo da *S. cerevisiae* em outros frutos acometidos por doenças fúngicas. Bem como o potencial protetivo apresentado por outras espécies de leveduras.

Logo, observe os resultados alcançados com o tratamento à base de *S. cerevisiae* na Figura 17 (A, B e C). E a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para todas as concentrações e tratamentos avaliados.

Figura 17 - Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) em citros. Tratamento preventivo solução de *S. cerevisiae* na Laranja (*Penicillium* sp.) (A); mexerica (*Guignardia* sp.) (B) e Limão (*Aspergillus* sp.).



Fonte: Autora

Cunha *et al.* (2018) estudaram o potencial curativo e preventivo da levedura *Candida stellimalicola* na proteção de frutos de laranja contra o bolor azul. E concluíram que, o controle

preventivo foi melhor do que o controle curativo. Segundo os autores, quando aplicada preventivamente a levedura reduz a severidade da doença acima de 90%, controlando o mofo azul em frutos de laranja. Além disso, os autores acrescentam que o ideal seria realizar a aplicação da levedura na pré- colheita, desta forma, a mesma pode oferecer melhor proteção aos frutos em relação a ação dos patógenos que ocorrem na pós-colheita.

Heling *et al.* (2017) avaliaram o potencial da *S. cerevisiae* no controle de *Colletotrichum musae* em bananas. Satisfatoriamente os autores relatam que a levedura como tratamento reduziu o progresso da doença em 48% e afirma que, o microrganismo é um potencial agente no controle de *Colletotrichum musae*.

Os resultados obtidos no trabalho atual sobre a ação preventiva do óleo essencial de noni e *S. cerevisiae* são de grande relevância e contribuição para a pesquisa científica e para a agricultura do País. Embora já se tenham estudos relacionados ao uso do óleo essencial de noni, estes são considerados poucos, pois é um composto que tem muito a ser investigado. Visto que, a partir dos vegetais e suas moléculas pode ser gerado um produto de baixo custo, ambientalmente seguro e suprimindo as necessidades do pequeno e grande produtor.

Já a *S. cerevisiae* é uma levedura modelo, pois existem uma variedade enorme de trabalhos correlacionando a aplicação da levedura em diferentes finalidades, essa característica enriquece cada vez mais a ideia em pesquisar e realizar mais e mais estudos com essa variedade de microrganismo.

6 CONCLUSÕES

A partir do exposto pode-se concluir que, dentre os principais agentes causais de doenças na pós-colheita de citros estão os fungos *Penicillium* sp, *Guignardia* sp e *Aspergillus* sp. Constatou-se que o composto majoritário presente no óleo essencial de noni é o ácido octanóico. Verificou-se que o óleo essencial de noni apresentou atividade fungitástica na maior concentração de 30 mg mL⁻¹ apenas para o fungo *Penicillium* sp, *Guignardia* sp. Em contrapartida o potencial fungitástico da levedura *S. cerevisiae* foi observado para os patógenos *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. com inibição de 88% e 100% na maior concentração (5%). O óleo essencial de noni não apresentou fitotoxidez nos frutos cítricos. E o potencial preventivo do óleo de noni e *S. cerevisiae* foi alcançado nos dois tratamentos, sendo destaque a levedura *S. cerevisiae*, que apresentou 100% de proteção em todos os frutos testados. O estudo comprovou o potencial fúngico de *Morinda citrifolia* e *S. cerevisiae* no controle de fungos patogênicos na pós-colheita de citros. O mesmo objetivou estudar um novo bioproduto a fim de contribuir com um meio ambiente sustentável e biologicamente correto em termos de qualidade alimentar e controle alternativo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-KAREEM, M. MARWA; RASMEY, A.M.; ZOHRI, A.A. Mecanismo de ação e potencialidade de biocontrole de novos isolados de *Saccharomyces cerevisiae* contra o *Aspergillus flavus* aflatoxigênico. **Cartas em microbiologia aplicada**, v. 68, n. 2, pág. 104-111, 2019.

AGUIAR, Ronilda Lana. Período de incubação de *Guignardia citricarpa* em frutos de laranja 'Valência' e importância das pulverizações de cobre no controle da mancha preta. 2011. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/11449/105281> >. Acesso em 28 fev. 2011.

ANDRADE, V. J. S.; DE ALMEIDA, M. M.Y. DESPERDÍCIO DA LARANJA NA CADEIA PRODUTIVA. **Revista Interface Tecnológica**, v. 17, n. 1, p. 401-408, 2020.

BARROS, Alessandra Macedo et al. Levantamento e uso de plantas medicinais do cerrado tocaninense para o controle alternativo de fitopatógenos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 7, n. 3, p. 336-346, 2019.

BARROS, Antonio Lindraz de et al. Controle da podridão peduncular em pós-colheita em manga com produtos naturais. 2019. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufal.br/jspui/handle/riufal/6156>>. Acesso em 2 agost. 2019.

BARROS, Alessandra Macedo et al. Utilização da farinha e óleo de noni no controle alternativo de *Rhizoctonia solani* em soja. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 36069-36079, 2021.

BENATO, Eliane Aparecida et al. Óleos essenciais e tratamento térmico no controle pós-colheita de bolor verde em laranja. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 1, p. 65-71, 2018.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas metabólitos de planta secundária. **Revista Agrotecnologia**, v.11, n.1, p.54-67, 2020.

CASERTA, R. et al. Biotecnologia cítrica: o que tem sido feito para melhorar a resistência a doenças em uma cultura tão importante. **Pesquisa e Inovação em Biotecnologia**, v. 3, p. 95-109, 2019.

CASTRO, Natália de. **Busca de uma estratégia de controle para bolores em frutos de laranja**. 2020. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/193125>>. Acesso em 24 jul. 2020.

CHAGAS, Thais Lumi Kajihara et al. Avaliação de conservação da laranja pêra em pós-colheita sob condições em ambiente e refrigeração. **Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa**, v. 34, n. esp., p. 95-102, 2018.

CHENG, Yulin et al. Mofo verde pós-colheita dos citros: Avanços recentes na patogenicidade fúngica e resistência dos frutos. **Microorganismos**, v. 8, n. 3, pág. 449, 2020.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **12º Levantamento da safra 2019/20**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-laranja>>. Acesso em 23 nov. 2020.

CORRÊA, T. M. Estratégia de controle de podridão mole (*Rhizopus Stolonifer*) em uva (*Vitis Vinifera* brs Carmem). 2020. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11612/2698>>. Acesso em 17 dez. 2020.

COSTA, Priscila Fonseca. Efeito de diferentes qualidades associadas a biofilmes no controle da antracnose em frutos do mamoeiro. 2017. Disponível: <<http://hdl.handle.net/11612/963>>. Acesso em 19 out. 2017.

COSTA, Jonas Henrique et al. Mecanismos de infecção por *Penicillium digitatum* em citros: o que sabemos até agora? **Biologia fúngica**, v. 123, n. 8, pág. 584-593, 2019.

DA CUNHA, Tatiane et al. Atividade antifúngica e mecanismos de ação de isolados de leveduras de citros contra *Penicillium italicum*. **Jornal Internacional de Microbiologia Alimentar**, v. 276, p. 20-27, 2018.

DA CUNHA, Tatiane et al. Ação de linhagens de leveduras como agentes de biocontrole contra *Penicillium digitatum* em laranjas doces de Lima. **Citrus Research & Technology**, v. 41, p. 1 a 9 de 2020.

SILVA, D.M da. **Identificação de espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* por taxonomia polifásica e descrição de duas novas espécies do gênero**. 2009. Tese de Doutorado. Dissertação (Pós-graduação em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

DA SILVA MARQUES, Mônica Lau et al. Antracnose em Noni (*Morinda citrifolia* L.) no Estado de Goiás. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. 32, 2021.

DA SILVA, G. A.; LANDAU, E. C. Evolução da produção de tangerina (*Citrus reticulata*, Rutaceae). **Embrapa Milho e Sorgo-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2020. v. 2, cap. 39, p. 1273 - 1300.

DA SILVA-PINHATI, Ana Carla Oliveira et al. Mancha Preta dos Citros: epidemiologia e manejo. **Citrus Research & Technology**, v. 30, n. 1-2, p. 45-64, 2017.

DALCIN, Mateus Sunti et al. Avaliação de óleos essenciais para o manejo preventivo ou curativo da gomosa do caule do melão e toxicidade vegetal. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 11, n. 26, pág. 426-432, 2017.

DALIO, Ronaldo J.D et al. PAMPs, PRRs, efetores e R-genes associados às interações citros-patógenos. **Annals of Botany**, v. 119, n. 5, pág. 749-774, 2017.

DE ALCÂNTARA CORRÊA, Edailson. Identificação e ensaio de ativação bioquímica de cepas *gras* de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial biotecnológico. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 6, n. 2, p. 237-243, 2019.

DE FREITAS TEIXEIRA, Juliana. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*: caracterização do gênero, domesticação e importância na composição de vinhos. 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1843/icbb-bdapaw>>. Acesso em 18 dez. 2015.

DE SOUZA FERREIRA, Talita Pereira et al. Atividade fungistática do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. contra *Curvularia lunata*. **Jornal Africano de Pesquisa Agrícola**, v. 13, n. 14, pág. 704-713, 2018.

DO RÊGO FARIAS, Emanuel Tarcísio et al. Compostos bioativos e capacidade antioxidante em frutos de noni, *Morinda citrifolia* Linn. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 15, n. 1, p. 6-13, 2020.

DE SOUZA OLIVEIRA, Jéssica et al. Rentabilidade Das Empresas Listadas Na Carteira Ise–Índice De Sustentabilidade Empresarial Da B3–Brasil Bolsa Balcão. **Research, Society and Development**, v. 8, n. 8, p. e08881178, 2019.

FAVELA-HERNÁNDEZ, JUAN MANUEL J et al. “Química e Farmacologia de *Citrus sinensis*.” “*Molecules*” (Basel, Suíça) vol. 21, n.2, p. 247.

FERREIRA, Fabiana Fiusa et al. **Controle da podridão azul em maçãs utilizando revestimento comestível elaborado com composto antifúngico de levedura antagonista**. 2020. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Disponível: <<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/4860>>. Acesso: 28 fev. 2020.

FONSECA, Ana Clara Carneiro et al. Potencial do óleo essencial de noni no controle preventivo e curativo da antracnose da mangueira. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 7, n. 3, p. 356-362, 2019.

FREIMOSER, Florian M. et al. Biocontrole de leveduras: mecanismos e aplicações. **Revista Mundial de Microbiologia e Biotecnologia**, v. 35, n. 10, pág. 1-19, 2019.

GUARNACCIA, Vladimiro et al. Alta diversidade de espécies em *Colletotrichum* associadas a doenças dos citros na Europa. **Personia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 39, p. 32, 2017.

GUILHERME, Eduardo Oliveira et al. Óleos essenciais de plantas medicinais associados a biofilmes para proteção de frutos de mamoeiro. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos** – Vol. 2, p. 307-319, 2017.

HELING, Anderson Luis et al. Controle biológico da antracnose na pós-colheita de banana manzano utilizando *Saccharomyces* spp. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 1, pág. 49-51, 2017.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal 2018**. 2019. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html>>. Acesso em set. 2019.

KANASHIRO, Aline Midori et al. *Penicillium italicum*: um patógeno pós-colheita pouco explorado. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

KASPER, Aline Aparecida Munchen et al. Aproveitamento dos resíduos de pripioca (*Cyperus articulatus* L.) no controle alternativo de fungos fitopatogênicos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 1, p. 80-88, 2020.

KELLERMAN, Mareli et al. Aplicação de pirimetanil em frutas cítricas por imersão, rega e revestimento de cera pós-colheita: carregamento de resíduos e controle de mofo verde. **Crop Protection**, v. 103, p. 115-129, 2018.

KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ, M.; SZOPA, A.; EKIERT, H. Fenômeno do *Citrus limon* (*Lemon*) - uma revisão da química, propriedades farmacológicas, aplicações nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e cosméticas modernas e estudos biotecnológicos. **Plantas**, v. 9, n. 1, pág. 119, 2020.

KUPPER, K.C et al. Doenças dos citros. **Informe Agropecuario**, v. 37, n. 291, pág. 36-53, 2016.

LOPES, Jan Marcel S. et al. Importância econômica do citros no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 20, n. 1, 2011.

MACHADO, Bianca Ikari. Controle da podridão azeda em frutos cítricos através de métodos alternativos. 2018. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/9608>>. Acesso em 20 fev. 2018.

MATTOS, Liliana Patrícia Vital de. Controle de *Guignardia citricarpa* e *Penicillium digitatum* em laranja com óleos essenciais e agentes de biocontrole. 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/106632>>. Acesso em 10 dez. 2010.

MELO, Jardel de Mesquita. Qualidade e compostos bioativos de cultivares de laranjas e tangerinas introduzidas no território da borborema paraibano. 2021. Disponível em: <<https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/20599>>. Acesso em 19 jul. 2021.

MIRANDA, Thayane Ferreira. Uso de óleos essenciais no controle da fusariose do abacaxi. 2021. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/60199>>. Acesso em 2021.

MOYO, PROVIDENCE et al. “Os efeitos dos tratamentos pós-colheita e da exposição à luz solar na capacidade reprodutiva e na viabilidade de *Phyllosticta citricarpa* em lesões de manchas pretas em citros”. **Plantas**, vol. 9, n. 12, pág. 1813, 2020.

MORAES BAZIOLI, Jaqueline et al. Controle biológico de fitopatógenos pós-colheita de citros. **Toxinas**, v. 11, n. 8, pág. 460, 2019.

MOURA, Vanessa Santos et al. Alternativas de controle de doenças de pós-colheita em citros. **Citrus Research & Technology**, v. 40, p. 1-11, 2019.

MOURA, Vanessa Santos. Atividade antagônica de compostos de *Piper aduncum* L. na germinação de fungos fitopatogênicos de hortaliças. 2015. Disponível: <<http://riu.ufam.edu.br/handle/prefix/4929>>. Acesso em 31 jul. 2015.

MUÑOZ CASTELLANOS, Laila et al. “Atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de cravo (*Eugenia caryophyllata*) e pimenta (*Piper nigrum* L.) óleos essenciais e extratos funcionais contra *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger* em tomate *Solanum lycopersicum* L.)”. **Jornal internacional de microbiologia**. vol. 2020, 30 abr. 2020.

NEVES, MARCOS FAVA et al. Ações para aumentar a competitividade da cadeia da laranja no Brasil. **Citrus Research & Technology**, v. 27, n. 2, p. 0-0, 2020.

NOGUEIRA, M. N. T. Determinação de macronutrientes na tangerina (*Citrus reticulata* Blanco): ponkan e cravo, comercializadas em feiras de São Luís - MA. 2016. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/123456789/1508>>. Acesso em 1 set. 2016.

NUNES, Cinthya Roberta et al. Composição química e atividade antifúngica do óleo essencial de *Thymus Vulgaris* sobre *Aspergillus Niger*, *Penicillium Expansum*, *Sclerotinia Sclerotiorum* e *Sclerotium Rolfsii*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 14250-14260, 2021.

OSORIO, Raissa Macedo Lacerda et al. Demandas tecnológicas da cadeia produtiva de laranja no Brasil. **Latin American Journal of Business Management**, v. 8, n. 2, 2017.

OSORIO, Pedro Raymundo Argüelles et al. Caracterização morfológica, molecular e controle alternativo da ferrugem da teca (*Olivea neotectonae*) com óleos essenciais. 2016. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11612/310>>. Acesso em 29 jul. 2016.

PARAPOULI, Maria et al. *Saccharomyces cerevisiae* e suas aplicações industriais. **Microbiologia AIMS**, v. 6, n. 1, pág. 1, 2020.

PAPPAS, MARIA L et al. “Defesas de plantas induzidas no controle biológico de pragas de artrópodes: uma espada de dois gumes”. **Pest management science**. vol. 73, n. 9, p.1780-1788, 2017.

PORTELLA, Julia et al. Óleos essenciais no controle *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Thema**, v. 19, n. 3, p. 615-622, 2021.

RODRIGUES, Pablo Leal et al. Potencial de biocontrole das leveduras em pós-colheita de citros pela produção da enzima β -1, 3-glucanase e atividade killer: uma revisão. **Citrus Research & Technology**, v. 41, p. 1-18, 2020.

ROMANAZZI, Gian Franco et al. Prolongamento da vida útil de frutas e vegetais frescos por tratamento com quitosana. **Revisões críticas em ciência de alimentos e nutrição**, v. 57, n. 3, pág. 579-601, 2017.

RUSSIANO, Maira Cristina Schuster et al. Óleos essenciais de citronela, melaleuca e guaçatonga no controle de *Penicillium expansum*. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 21277-21283, 2019.

SALGADO, Gabriel Henrique dos Santos Silva. Sensibilidade in vitro de *Colletotrichum* spp. associados a *Citrus sinensis* a fungicidas triazóis (DMI) e suas combinações às estrobilurinas (QoI). 2021. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/202855>>. Acesso em 23 fev. 2021

SANTOS, G. G. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjerição frente a bactérias de carnes bovinas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n. 4, p. 529-536, 2011.

SARTO, MARCELLA PAULA MANSANO; JUNIOR, GERSON ZANUSSO. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. **Uningá Review Journal**, v. 20, n. 1, 2014.

SEIXAS, P. T. L. et al. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. SPE, p. 523-526, 2011.

SILVA, Janaína Costa. Controle de doenças foliares remediados por fungos no milho por meio da aplicação de óleos essenciais. 2016. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11612/1985>>. Acesso em 2016.

SILVA, Gabriela Fiori. Avaliação do potencial de ensacamento industrial de laranja peletizado para produção de butanol por *Clostridium beijerinckii* via fermentação de acetona-butanol-etanol. 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/11216>>. Acesso em 12 março 2019.

SOUZA, Ana Maura Machado de. Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* de um bioproduto contendo óleo essencial de bergamota (*Citrus reticulata* b.). No tratamento de onicomicoses. 2020. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11624/2966>>. Acesso em 2020.

TALIBI, I. et al. Atividade antifúngica de algumas plantas marroquinas contra *Geotrichum candidum*, o agente causal da podridão ácida pós-colheita dos citros. **Proteção da colheita**, v. 35, p. 41-46, 2012.

TANIKAWA, Takashi et al. Efeitos antiinflamatórios do extrato de *Morinda citrifolia* contra a inflamação induzida por lipopolissacarídeos em células RAW264. **Medicamentos**, v. 8, n. 8, pág. 43, 2021.

TOFFANO, Leonardo; FIALHO, Maurício Batista; PASCHOLATI, Sérgio Florentino. Potencial da fumigação de frutos de laranjeira com compostos orgânicos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* no controle da mancha preta dos citros na pós-colheita. **Controle Biológico**, v. 108, p. 77-82, 2017.

VALADARES, Rafael Borges da Silva. **Diversidade micorrízica em *Coppensia doniana* (Orchidaceae) e filogenia de fungos micorrízicos associados à subtribo Oncidiinae**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

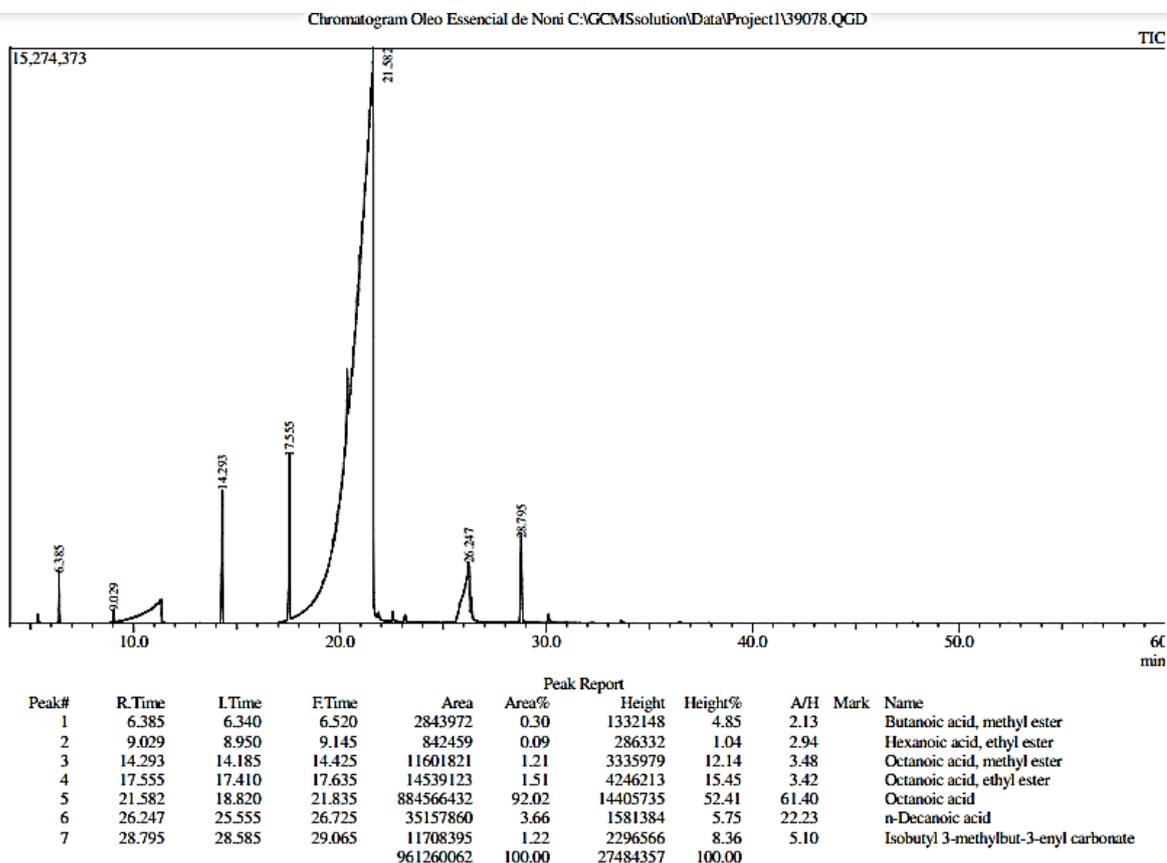
VELOSO, Ronice Alves et al. Composição química e bioatividade do óleo essencial da fruta *Morinda citrifolia* L. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 14, n. 5, pág. 208-214, 2020.

VIDAL, Maria de Fátima. Citricultura na área de atuação do BNB. 2018. Disponível em: <s1dsp01.dmz.bnb:8443/s482-dspace/handle/123456789/1027>. Acesso em set. 2018

WICKERT, Ester et al. "Diversidade genética e diferenciação populacional de *Guignardia mangiferae* da lima ácida" Tahiti "" **The Scientific World Journal**", vol. 2012, 2012.

WOO, Sheridan L. et al. Produtos à base de *Trichoderma* e seu amplo uso na agricultura. **The Open Mycology Journal**, v. 8, n. 1, 2014.

8 ANEXOS

ANEXO A – Análise cromatográfica do óleo essencial de noni (*Morinda citrifolia*)

ANEXO B – Análise de variância com medidas repetidas ao longo do tempo para o crescimento de *Penicillium* sp, *Guignardia* sp. e *Aspergillus* sp. fungos expostos a diferentes concentrações de óleo essencial de *Morinda citrifolia* (Tabela 1)

Origem da variação	df	F	P
Parâmetros			
Concentração (C)	6	558.81	<0.0001*
Espécie (E)	2	271.14	<0.0001*
C vs E	12	58.24	<0.0001*
Erro	42	-	-
Dentro dos efeitos do sujeito			
Tempo (T)	39	4	0.011
T vs C	137.26	24	0.009
T vs E	78	8	0.024
T vs C vs E	152.27	48	0.003

*Significância em $P < 0.05$

ANEXO C – Análise de variância com medidas repetidas ao longo do tempo para o crescimento de *Penicillium* sp, *Guignardia* sp. e *Aspergillus* sp. fungos expostos a diferentes concentrações de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Tabela 2).

Origen da variação	df	F	P		
Parâmetros					
Concentração (C)	6	150.31	<0.0001*		
Espécie (E)	2	1079.74	<0.0001*		
C vs E	12	126.06	<0.0001*		
Erro	42	-	-		
Dentro dos efeitos do sujeito	df _{den}	df _{num}	Wilks' lambda	F	P
Tempo (T)	39	4	0.013	724.82	<0.0001*
T vs C	137.26	24	0.133	4.47	<0.0001*
T vs E	78	8	0.018	61.36	<0.0001*
T vs C vs E	152.27	48	0.006	8.70	<0.0001*

*Significância em $P < 0.05$