

# CONTROLE DA PODRIDÃO AZEDA EM LARANJAS PELA APLICAÇÃO DE NANOEMULSÃO DE $\alpha$ - TERPINEOL

Palavras-Chave: PODRIDÃO AZEDA,  $\alpha$ -TERPINEOL, NANOEMULSÃO

Autores:

GUSTAVO APARECIDO MARTINS [FEA]

Prof. Dr. JULIANO LEMOS BICAS (orientador) [FEA]

RAFAEL CHELALA MOREIRA (doutorando) [FEA]

## INTRODUÇÃO

A laranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) é o fruto da laranjeira, uma árvore da família Rutaceae, originária da Ásia. Esse fruto é um dos principais citros da dieta dos brasileiros, sendo uma reconhecida fonte de vitaminas, fibras, antioxidantes como a ácido ascórbico, compostos fenólicos, flavonoides e limonóides (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010).

No Brasil, a laranja se destaca como a principal cultura entre as espécies frutíferas. Além disso, o país é o maior produtor mundial de laranja, sendo responsável por cerca de 37% da produção mundial do fruto e por 64% da produção global de suco de laranja (USDA, 2019). Em 2019, a produção brasileira foi de 17,6 milhões de toneladas, crescimento de 5,6% em relação ao ano anterior. O Estado de São Paulo é o principal produtor, sendo responsável por 77,5% da produção nacional (IBGE, 2019).



Figura 1 - Laranja infectada com *Geotrichum citri-aurantii*  
fonte: adaptado de MORAES BAZIOLI et al., 2019.

As doenças pós-colheita, como as causadas por fungos patogênicos, são responsáveis por significativas perdas econômicas. Dentre essas doenças, a podridão azeda, causada pelo fungo filamentosso *Geotrichum citri-aurantii* se destaca, mesmo sendo menos comum que o mofo azul (*P. italicum* Wehmer) e verde (*Penicillium digitatum*). Em temperaturas favoráveis, entre 25 e 30°C, a fruta apodrece completamente dentro de quatro ou cinco dias, sendo ainda um agravante a capacidade da doença se espalhar pelo contato (FENG et al., 2011; TALIBI et al., 2012).

Atualmente, a podridão azeda não tem sido controlada de forma eficiente por fungicidas registrados. Os fungicidas guazatina, propiconazol e O-fenilfenato de sódio (SOPP) podem controlar a doença, contudo não são registrados em muitos países, como é o caso do Brasil, o último, ainda, consta na lista nacional de agentes carcinogênicos para humanos (KLEIN; KUPPER, 2018; FENG *et al.*, 2011).

A ineficiência dos fungicidas registrados contra essa doença torna necessário buscar formas alternativas de tratamento, o que nos últimos anos incitou o desenvolvimento de muitas pesquisas, como é o caso de Zhou, Tao e Jia (2014) relataram em seu estudo que o  $\alpha$ -terpineol foi capaz de inibir o crescimento micelial do *Geotrichum citri-aurantii* na concentração de 2,00  $\mu$ L/mL. E atribuíram sua atividade antifúngica a sua capacidade de causar alterações na morfologia das hifas, o que causa rompimento da membrana celular e vazamento de componentes celulares.

Outros estudos também denotam a atividade antifúngica do  $\alpha$ -terpineol contra diferentes fungos, como no estudo de Kong *et al.* (2019), em que identificaram esse monoterpeneo como principal componente responsável pelos efeitos antifúngicos do *Melaleuca alternifolia oil* contra o *Aspergillus ochraceus*. An *et al.* (2019) também apontam o  $\alpha$ -terpineol como um dos principais componentes do tea tree oil no controle do *Aspergillus niger*, sendo sua ação antifúngica relacionada ao rompimento das paredes celulares, membranas e afetar o metabolismo.

## OBJETIVO

O objetivo deste projeto foi testar a aplicação de nanoemulsão de  $\alpha$ -terpineol em laranjas comerciais frente a inibição do *Geotrichum citri-aurantii*, causador da podridão azeda em citrus.

## METODOLOGIA

As nanoemulsões formuladas seriam compostas por R-(+)- $\alpha$ -terpineol, surfactante não-iônico Tween 20 e água deionizada. Sua preparação se iniciaria pela formação de uma emulsão primária em um misturador ultra-turrax digital T25, sendo posteriormente a nanoemulsão preparada utilizando uma probe de ultrassom, com diâmetro de 13 mm (Q500 Sonicator, Qsonica),

Uma amostra de 15 mL de cada nanoemulsão seria acondicionada em frascos de vidro transparente e armazenados a temperatura de 30 °C durante 30 dias. Periodicamente seriam avaliadas a ocorrência de mudanças visíveis na estabilidade, como sedimentação e creaming, além de avaliadas as perdas de R-(+)- $\alpha$ -terpineol no sistema. A nanoemulsão que apresentasse a melhor relação entre estabilidade e viabilidade de produção, seguiria para as análises seguintes, como o teste de susceptibilidade antifúngica, que seria realizado utilizando a técnica de microdiluição em caldo seguindo o protocolo M38 para fungos filamentosos (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2017) que retornaria os valores concentração inibitória mínima (CIM). Também seria determinada a concentração fungicida mínima (CFM).

As laranjas maduras obtidas comercialmente seriam lavadas, sanitizadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio, enxaguadas com água destilada estéril e secas à temperatura

ambiente. Uma alíquota de 20 µL da nanoemulsão de α-terpineol a uma concentração conhecida seria aplicada em um corte de 2 mm de profundidade por 2 mm de largura por 5 mm de comprimento feito na casca dos frutos. Em seguida uma alíquota de 15 µL de solução de esporos (1x10<sup>6</sup> esporos/mL) de *Geotrichum citri-aurantii* seria inoculada.

Para o controle, os frutos receberiam água destilada estéril ao invés da solução do princípio ativo. Todos os frutos seriam armazenados em béquer estéreis e incubados a 25 °C durante 7 dias. Ao fim desse período, seriam determinados o número de frutos infectados e o diâmetro das lesões.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em razão da pandemia da COVID 19 e da impossibilidade do desenvolvimento das atividades em laboratório não foi possível conduzir este projeto conforme o planejado. Contudo o avanço da vacinação e redução no número de casos, está tornando possível o retorno, gradual, às atividades em laboratório, com isso, um novo projeto fundamentado neste foi proposto e terá início no segundo semestre de 2021.

Vale ressaltar que no período de impossibilidade de desenvolvimento do projeto a cepa de *Geotrichum citri-aurantii* vem sendo mantida ativa por meio de repiques a cada 10 dias por alunos do laboratório que possuem autorização para desenvolver suas atividades. Também foram produzidos protocolos sobre equipamentos e técnicas que seriam utilizados no decorrer desse projeto e que serão aproveitados no novo projeto, além disso, foi realizado um planejamento de experimentos que também será aproveitado no novo projeto.

## BIBLIOGRAFIA

AN, Peipei *et al.* α-terpineol and terpene-4-ol, the critical components of tea tree oil, exert antifungal activities in vitro and in vivo against *Aspergillus niger* in grapes by inducing morphous damage and metabolic changes of fungus. **Food Control**, [S.L.], v. 98, p. 42-53, abr. 2019. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.013>

COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S.L.], v. 30, p. 15-19, maio 2010. DOI: <http://doi.org/10.1590/s0101-20612010000500003>

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M38 - Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**. 3. ed., 2017.

FENG, L. *et al.* Antifungal activities of polyhexamethylene biguanide and polyhexamethylene guanide against the citrus sour rot pathogen *Geotrichum citri-aurantii* in vitro and in vivo. **Postharvest Biology And Technology**, [S.L.], v. 61, n. 2-3, p. 160-164, ago. 2011. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.03.002>

**IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola.** Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag\\_2019\\_dez.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2019_dez.pdf)>. Acesso em: 20 out. 2020.

KLEIN, M. N.; KUPPER, K. C. Biofilm production by *Aureobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. **Food Microbiology**, v. 69, p. 1–10, 2018. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.008>

KONG, Q. *et al.* Antifungal mechanisms of  $\alpha$ -terpineol and terpen-4-ol as the critical components of *Melaleuca alternifolia* oil in the inhibition of rot disease caused by *Aspergillus ochraceus* in postharvest grapes. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 126, n. 4, p. 1161-1174, 14 fev. 2019. DOI: <http://doi.org/10.1111/jam.14193>

MORAES BAZIOLI, J., BELINATO, J. R., COSTA, J. H., AKIYAMA, D. Y., PONTES, J.G. DE M., KUPPER, K. C., ... FILL, T. P. (2019). Biological Control of Citrus Postharvest Phytopathogens. **Toxins**, 11(8), 460. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins11080460>

TALIBI, I. *et al.* Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. **Crop Protection**, [S.L.], v. 35, p. 41-46, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2011.12.016>

USDA – United States Department of Agriculture. **Citrus: world markets and trade**. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>. Acesso em: 29 out. 2020.

ZHOU, H.; TAO, N.; JIA, L. Antifungal activity of citral, octanal and  $\alpha$ -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*. **Food Control**, [S.L.], v. 37, p. 277-283, mar. 2014. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.057>