



**Desenvolvimento de tecnologias para o controle de podridão olho de boi em
maçãs**

Vania Trevelin

Bento Gonçalves, 8 de dezembro de 2023.

Vania Trevelin

**Desenvolvimento de tecnologias para o controle de podridão olho de boi em
maçãs**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado
junto ao Curso de Tecnologia em Horticultura do
Instituto Federal de Educação – Campus Bento
Gonçalves.

Orientador: Prof. Dr. Marcus André Kurtz
Almança

Bento Gonçalves, 8 de dezembro de 2023.

Vania Trevelin

**Desenvolvimento de tecnologias para o controle de podridão olho de boi em
maças**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado junto ao
Curso de Tecnologia em Horticultura do Instituto Federal
de Educação – Campus Bento Gonçalves.

Orientador: Prof. Dr. Marcus André Kurtz Almança

Aprovada em dezembro de 2023.

Orientador: Prof. Dr. Marcus André Kurtz Almança Instituto Federal de Educação –
Campus Bento Gonçalves.

Coorientadora: Dra. Andréia Hansen Oster. Embrapa Uva e Vinho

Prof. Dr. Daniel Martins Ayub. Instituto Federal de Educação – Campus Bento
Gonçalves.

Prof. Dr. Luis Carlos Diel Rupp. Instituto Federal de Educação – Campus Bento
Gonçalves.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me abençoar e iluminar os caminhos por onde andei.

Ao meu marido Ismael Sebben, que esteve presente em todos os momentos dessa trajetória, me incentivando a ter força e persistência.

A todos os professores do IFRS/ BG, que sempre me orientaram e guiaram.

A Dra. Andreia Hansen Oster, pelo voto de confiança e oportunidade de realizar o estágio na EMBRAPA-Uva e Vinho.

SUMÁRIO

RESUMO	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
3. DESENVOLVIMENTO.....	14
3.1 MATERIAL E MÉTODOS	15
ENSAIO DE FORMULAÇÃO COM ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS EFEITOS NOS ISOLADOS DE <i>NEOFABRAEA SP.</i>	18
MÉTODO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>NEOFABRAEA SP.</i> COM PLACAS DE ELISA	19
3.2 RESULTADOS	20
ENSAIO SOBRE PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE <i>NEOFABRAEA SP.</i> 20	
ENSAIO 1 DE PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE <i>NEOFABRAEA SP.</i>	20
ENSAIO 2 DE PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE <i>NEOFABRAEA SP.</i>	23
ENSAIO DE FORMULAÇÃO COM ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS EFEITOS NOS ISOLADOS DE <i>NEOFABRAEA SP.</i>	24
MÉTODO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>NEOFABRAEA SP.</i> COM PLACAS DE ELISA	25
4. CONCLUSÃO.....	27
5. REFERÊNCIAS.....	27

RESUMO

As maiores perdas de maçãs armazenadas são devidas as podridões conhecidas como podridão olho de boi (POB), associada à infecção por patógenos do gênero *Neofabraea*. O desenvolvimento tecnologias de manejo para reduzir as perdas pós-colheita causadas pela POB em maçãs, nos sistemas de produção de macieiras é de extrema importância para a produção integrada da maçã. O uso de óleos essenciais, como agentes antimicrobianos, pode ser uma ótima alternativa para o manejo integrado de doenças, incorporando-os em revestimentos comestíveis podem viabilizar a manutenção da qualidade das maçãs pós-colheita e reduzir a incidência de podridões. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* (LS) e *Ocimum micranthum* (OM) na redução do crescimento micelial de isolados fúngicos, associados a POB e definir as doses letais. Os isolados de *Neofabraea sp.*, oriundos da coleção de trabalho da Embrapa Uva e Vinho foram ativados e repicados em meio batata-dextrose-agar (BDA), obtendo-se o crescimento das colônias para os experimentos. Foram realizados ensaios de patogenicidade e estabelecido a concentração de 10⁶ esporos/ml, dos isolados CP10 e 40, para os testes preliminares in vitro com os óleos essenciais de LS e de OM. Na sequência foram testados os padrões de crescimento e as taxas, segundo a metodologia de Elisa, onde foi possível avaliar os perfis de crescimento das células em cultivo. Os resultados mostraram que as concentrações a partir de 150 uL/L) do óleo essencial de LS inibiram o crescimento micelial dos isolados do patógeno. Para o óleo essencial de OM foi possível observar que concentrações a partir de 150uL/L também inibiram o crescimento micelial de isolados de *Neofabraea*. O método de inibição de crescimento micelial com placas de Elisa mostrou-se eficaz, e os resultados mostraram que as dosagens maiores dos dois óleos utilizados apresentaram uma boa porcentagem de inibição.

Palavras-chave: óleos essenciais, tecnologias, pós-colheita.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inoculação do fruto realizada em dois pontos opostos na região equatorial da maçã.

Figura 2. Os isolados de *Neofabraea* sp., oriundos da coleção de trabalho da Embrapa Uva e Vinho foram ativados e repicados em meio batata-dextrose-agar (BDA).

Figura 3. Lesão olho de boi em maçãs da cultivar Fuji causadas por *Neofabraea* sp.

Figura 4A. Teste de patogenicidade realizado na concentração 10^4 , na cultivar Fuji, com os isolados de *Neofabraea* sp. da coleção da Embrapa Uva e vinho de Vacaria.

Figura 4B. Teste de patogenicidade realizado na concentração 10^6 , na cultivar Fuji com os isolados de *Neofabraea* sp. da coleção da Embrapa Uva e vinho de Vacaria.

Figura 5A. Teste de patogenicidade realizado na concentração 10^4 , na cultivar Gala com os isolados de *Neofabraea* sp. da coleção da Embrapa Uva e vinho de Vacaria.

Figura 5B. Teste de patogenicidade realizado na concentração 10^6 , na cultivar Gala com os isolados de *Neofabraea* sp. da coleção da Embrapa Uva e vinho de Vacaria referente ao crescimento micelial.

Figura 6A. Teste de patogenicidade realizado na concentração 10^4 , na cultivar Fuji com isolados de *Neofabraea* sp. da coleção da Embrapa Uva e vinho de Bento Gonçalves.

Figura 6B. Teste de patogenicidade na concentração 10^6 , realizado na cultivar Fuji com isolados de *Neofabraea* sp. da coleção da Embrapa Uva e vinho de Bento Gonçalves.

Figura 7A. Teste de patogenicidade realizado na concentração 10^4 , na cultivar Gala com isolados de *Neofabraea* sp. da coleção da Embrapa Uva e vinho de Bento Gonçalves.

Figura 7B. Teste de patogenicidade realizado na concentração 10^6 , na cultivar Gala com isolados de *Neofabraea* sp. da coleção da Embrapa Uva e vinho de Bento Gonçalves.

Figura 6B

Figura 8. Inibição de crescimento de células em cultivo de *Neofabraea* (isolados CP10 e 40), em meio BD em função da presença de *Lippia sidoides*, 65 horas após a incubação a 25°C.

Figura 9. Inibição de crescimento de células em cultivo de *Neufabraea* (isolados CP10 e 40), em meio BD em função da presença de *Ocimum mincranthum*, 51 horas após a incubação a 25°C.

1. INTRODUÇÃO

A maçã (*Mallus doméstica*) é uma das frutas mais cultivadas e consumidas no mundo, possuindo mais de 2,5 mil espécies existentes, sendo as cultivares Gala e Fuji as mais cultivadas (SEBRAE, 2020). No Brasil a cultura da maçã se desenvolveu no sul do país, nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, onde em janeiro a fruta começa a ser colhida e fica disponível o ano todo para o consumidor, sendo armazenada em câmaras frias.

As maiores perdas de maçãs armazenadas são devido as podridões conhecidas como podridão olho de boi (POB), associada à infecção por *Neofabraea brasiliensis* e *N. actinidaeae.*, sendo responsável por perdas de até 20% no período final da armazenagem dos frutos, o que pode representar de 50 a 70 mil toneladas de maçãs por safra (EMBRAPA, 2018). Devido as perdas por doenças fúngicas, principalmente a podridão causada por *Neofabraea* sp., em maçãs durante a pós-colheita, busca-se o desenvolvimento de tecnologias alternativas, para o controle de forma biológica, de tais patógenos, para o aumento de qualidade das frutas armazenadas e posteriormente comercializadas. Sendo que o uso de produtos naturais, com princípios bioativos vegetais, pode ser uma ótima alternativa para o manejo integrado de doenças.

O objetivo do trabalho é desenvolver tecnologias para reduzir as perdas pós-colheita causadas pela podridão olho de boi em maçãs, nos sistemas de produção de macieiras de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. E ainda avaliar a atividade fungicida in vitro dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Ocimum micranthum* contra isolados fúngicos, das espécies de *Neofabraea* associadas a podridão olho de boi e definir as doses dos óleos essenciais mais eficientes para o controle da doença olho de boi em maçãs, para posterior incorporação na formulação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A macieira pertence à Família Rosaceae, Ordem Rosales, Subfamília Pomoideae, Gênero *Mallus*, abrangendo cerca de 100 gêneros e mais de duas mil espécies. A *Malus domestica* Borkh, proposta em 1803 e segundo o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, é a primeira denominação válida para a macieira cultivada (BENDER, 1986). A maçã possui sabor doce-ácido e propriedades refrescantes, adstringentes, e reguladoras, ajuda na digestão, modera o apetite, controla o colesterol, previne alergias e irritações físicas, evita a formação de cálculos, limpa o sangue, previne o câncer digestivo (ABPM, 2023) A fruta está entre as quatro mais consumidas no mundo, sendo que no Brasil, ela é comercializada os doze meses do ano e distribuída em todo o país (PETRI; LEITE, 2008).

Os principais municípios produtores de maçã no Brasil são Vacaria-RS e São Joaquim-SC, que alternam a liderança, seguidos por Fraiburgo (SC). Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Maçã (ABPM), a produção na safra 2017/18 alcançou 1,1 milhão de toneladas. A maçã é cultivada em todos os continentes e de acordo com o FAO (2018), o Brasil está entre os 12 maiores produtores de maçã do mundo.

No Brasil, as doenças pós-colheita que causam as maiores perdas são a podridão olho de boi (POB) associada recentemente à infecção por *Neofabraea brasiliensis* e *N. actinideae* e o mofo azul (*Penicillium expansum*) (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2010; MAFFIOLETI, 2007; BOGO et al., 2008; JIJAKLI, 2011). A POB, também conhecida como Pezicula, é uma das principais doenças da macieira no Sul do Brasil. Segundo estimativas do setor, é responsável por perdas de até 20% no período final da armazenagem dos frutos, o que pode representar de 50 a 70 mil toneladas de maçãs por safra. (EMBRAPA, 2018)

No que diz respeito a variabilidade dos patógenos, quatro espécies do gênero *Neofabraea* são conhecidas como causadoras da podridão olho de boi em maçãs. Observou que isolados associados à doença apresentam grande variabilidade em características morfológicas, fisiológicas e genética, sugerindo a existência de outras espécies. Em estudos de sobrevivência do patógeno em pomares no Rio Grande do Sul foi possível recuperar o patógeno em ramos e

gemas durante todo o ciclo e o crescimento da população epífita nos frutos aumenta de dezembro até colheita em pomar comercial da cv. 'Fuji' e Pink Lady indiferentemente das aplicações de fungicidas. (VALDEBENITO-SANHUEZA, et al. 2010.) O patógeno pode ainda sobreviver saprofiticamente em frutos caídos no chão ou mumificados nas plantas sintomas de POB são mais frequentemente observados na pós-colheita e raramente vistos em frutos no campo, exceto naqueles com ferimentos. (VALDEBENITO-SANHUEZA, et al. 2010). De acordo com GIRAUD e MORONVALLE (2012) a infecção ocorre no pomar, principalmente nos últimos 60 dias antes da colheita, sendo que a podridão pode se manifestar durante o período de armazenamento a $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ou mesmo no momento da comercialização.

O controle das doenças em maçãs é dependente do uso de fungicidas químicos. A estratégia da agricultura moderna é focar em métodos alternativos para o controle de doenças, que vissem causar menores danos ao ambiente e a saúde humana. O uso intensivo de produtos químicos para controlar doenças em plantas e frutos vem causando prejuízos ao meio ambiente e selecionando espécies de fungos com resistência a fungicidas. Isto justifica, portanto, a busca por métodos alternativos de controle, no qual se incluem o controle biológico e a indução de resistência em plantas pelo uso de extratos vegetais e óleos essenciais, entre outros (STANGARLIN et al., 1999; SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005).

Trabalhos desenvolvidos com extratos brutos ou óleos essenciais, obtidos a partir de plantas medicinais têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos (CUNICO et al., 2003; ANTUNES; CAVACO, 2010; NABILA e SOUFIYAN, 2019). Uma grande variedade de espécies botânicas já se mostrou capazes de promover a inibição do desenvolvimento de vários fitopatógenos de natureza fúngica. (ANTUNES; CAVACO, 2010; ZNINI et al, 2011; ZNINI et al, 2013; VIEIRA et al., 2018). SCHWAN-ESTRADA et al. (2000) relatam que tanto o extrato bruto como o óleo essencial de plantas da flora nativa apresentam potencial no controle de fitopatógenos, pela sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos. O interesse em substâncias naturais tem aumentado e alguns estudos sobre a atividade biocida de metabólitos secundários tem sido relatados, entre estes, óleos essenciais de diversas espécies (MARI; BERTOLINI; PRATELLA, 2003; NABILA E

SOUFIYAN, 2019). No entanto estudos estão sendo direcionados visando à aplicabilidade destes produtos in vivo explorando os patógenos em plantas cultivadas e em tratamentos de doenças pós-colheita.

A eficiência dos óleos essenciais de uma grande variedade de espécies botânicas que são capazes de promover a inibição do desenvolvimento de vários fitopatógenos de natureza fúngica (Znini et al, 2011; Znini et al, 2013; Vieira et al., 2018)

A espécie de *L. sidoides* Cham, pertence à família Verbenaceae é conhecida popularmente como alecrim-pimenta, é uma planta arbustiva, caducifolia, ereta, com caule quebradiço muito ramificado, com folhas aromáticas, natural da vegetação do semiárido nordestino e que tem mostrado diversas atividades biológicas, o que a tem tornado uma fonte potencial de compostos biologicamente ativos (LORENZI e MATOS, 2002; MATOS, 2007). Esta planta possui um grande potencial para a exploração comercial devido suas diversas aplicações, destacando-se pelo uso na produção de antissépticos, que têm grande importância na área da farmácia, medicina, odontologia e saúde pública (LOPES et al., 2011). Contém em sua composição um óleo essencial rico em Timol e Carvacrol, que apresenta propriedades bactericida, fungicida, moluscicida e larvicida. (CALVACANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M.; LIMA, M. A.; SANTANA, E. W. P)

A espécie de *O. micranthum* Willd, pertence à família Lamiaceae, é uma planta anual, herbácea, conhecida no Nordeste brasileiro como alfavaca-de-galinha. É uma importante fonte de óleos essenciais, presentes em folhas, inflorescência e sementes, largamente utilizados pela indústria farmacêutica, por conter eugenol, metileugenol, e linalol, também utilizados pela indústria de alimentos e perfumes (LORENZI; MATOS, 2002). Amorim (2017) constatou a atividade biológica desse óleo na inibição total do crescimento in vitro de *A. alternata*, *L. theobromae*, e *C. gloeosporioides*, isolados do mamão. O efeito dos óleos essenciais no controle de doenças em plantas pode estar relacionado a resistência, bem como pode ser devido as propriedades antimicrobianas e fungistáticas (BONALDO et al., 2004; RODRIGUES et al., 2007). Estas propriedades antimicrobianas podem ser utilizadas no manejo de fungos em frutos após a colheita.

A utilização de substâncias de origem vegetal com efeito fungicida (produtos bioativos) tem merecido destaque dentre os métodos alternativos ao controle químico convencional, pela segurança e pela conservação do equilíbrio do agro ecossistema (AVILA-SOSA et al, 2012). O uso de produtos naturais, com princípios bioativos, pode ser uma ótima alternativa para o manejo integrado de doenças, porém, para que isto se torne realidade, é necessária a realização de estudos fitoquímicos e biológicos, a fim de avaliar a sua eficiência no controle destes, para que possa ser aplicado com êxito na cultura da macieira. Desta forma o uso de óleos essenciais, como agentes antimicrobianos, pode ser uma ótima alternativa para o manejo integrado de doenças (GATTO et al, 2011)

A associação dos óleos essenciais aos revestimentos são uma das mais recentes alternativas para auxiliar na conservação de alimentos (AVILA SOSA, 2012). Assim podem viabilizar a manutenção da qualidade das maçãs pós-colheita e reduzir a incidência de podridões.

A produção de maçã no Brasil é concentrada em um curto período do ano e por esse motivo, o armazenamento dos frutos é essencial para a continuidade da comercialização durante o ano. Nesse período ocorre uma perda elevada de frutos devido ao avanço do amadurecimento, à ocorrência de desordens fisiológicas, e principalmente ao ataque por pragas e fitopatógenos (SANHUEZA, 2002; BRACKMANN et al., 2008). No período de safra, a produção é muito superior à demanda, o que torna necessário o armazenamento de parte da produção para oferta no período de entressafra. Atualmente, a maior parte da produção é armazenada em atmosfera controlada (AC) (BRACKMANN et al., 2009; KE et al., 1994; STEFFENS et al., 2007), na qual os frutos são submetidos à baixa pressão parcial de oxigênio (pO_2) e elevada de gás carbônico (pCO_2), associado à baixa temperatura e alta umidade relativa, com a qual é possível manter a qualidade durante 6 a 7 meses. No Brasil, a capacidade de armazenamento refrigerado e em atmosfera controlada passa de 80% da maçã colhida (KIST et al., 2016). Durante os últimos anos, há uma tendência da redução da pO_2 nas câmaras de armazenamento a níveis extremamente baixos (0,4 a 0,8) para melhorar a manutenção da qualidade (BOTH et al., 2014; GABIOUD; REBEAUD; GASSER, 2015; KÖPCKE, 2015; ZANELLA; CAZZANELLI; ROSSI, 2008). Entretanto, para redução da PO_2 a níveis

extremamente baixos é de suma importância o monitoramento do limite mínimo de O₂ (LMO) tolerado pelo fruto das diferentes cultivares de maçã durante todo o período de armazenamento, a fim de evitar perdas de qualidade pelo excessivo metabolismo anaeróbico, que causa a formação de etanol e outros compostos.

3. DESENVOLVIMENTO

A ocorrência de doenças reduz drasticamente o retorno econômico da cultura da macieira. Além das doenças que ocorrem no campo, existem também as podridões pós-colheita. Entre essas, a podridão olho de boi ocasiona as maiores perdas durante o armazenamento das frutas, segundo estimativas do setor é responsável por perdas de até 20 % no período final de armazenamento dos frutos, o que pode apresentar de 50 a 70 mil toneladas de maçãs por safra. (EMBRAPA,2018)

A podridão olho de boi é a principal doença pós-colheita em diversas regiões do mundo, sendo relatada na Austrália, Brasil, Chile, Estados Unidos, Itália, Polônia, e República Tcheca. (SANHUEZA et al., 2002; CUNNINGTON et al., 2004; HENRIQUEZ et al.,2005; SPOTTS et al., 2009; SOTO-ALVEAR et al., 2013; HORTOVA, et al., 2014; MICHALECKA et al., 2015; SANHUEZA et al., 2015; CAMELDI et al., 2016; PEŠICOVÁ et al., 2016; AGUILAR, et al., 2017).

A doença é causada por um complexo de espécies do gênero *Neofabraea* (MICHALECKA et al., 2015). Entre as nove espécies do gênero, somente cinco (*N. alba*, *N. brasiliensis*, *N. kienholzii*, *N. malicorticis* e *N. perennans*) causam a podridão olho de boi na maçã (KIENHOLZ et. al.,1939; JOHNSTON et al., 2004; HENRIQUEZ et al., 2005; SPOTTS et al., 2009; SANHUEZA et al., 2015). Além disso, a espécie *N. actinidiae* é comumente associada com a podridão madura da maçã (JOHNSTON et al., 2004). A ocorrência das espécies de *Neofabraea* associadas a podridão olho de boi variam em cada região produtora. Por exemplo, no Chile a doença é causada somente por *N. alba* (HENRIQUEZ et al., 2005; SOTO-ALVEAR et al., 2013). Na Itália *N. alba* e *N. malicorticis* foram relatadas enquanto que *N. alba*, *N. perennans* e *N. kienholzii* foram encontradas na Polônia (MICHALECKA et al., 2015; CAMELDI et al., 2016).

No Brasil, somente *N. perennans* é historicamente associada com a podridão olho de boi. No entanto, após a caracterização molecular dos isolados,

descobriu-se que os espécimes pertencem a uma nova espécie denominada *N. brasiliensis* (SANHUEZA et al., 2015).

A identificação das espécies do gênero foi baseada principalmente nas características morfológicas dos espécimes. A forma sexual raramente é encontrada nos campos de produção e até o momento não foi detectada no país. Portanto, a identificação das espécies é baseada principalmente nas características morfológicas da forma assexuada. Nessa fase, as espécies são reconhecidas pela presença de conidioma do tipo acérvulo e conídios unicelulares, hialinos e elipsoides (VERKLEY et al., 1999). Devido às várias espécies associadas com o sintoma e a sobreposição de características morfológicas, atualmente a identificação precisa das espécies de *Neofabraea* é feita usando um conjunto de características morfológicas em combinação com dados moleculares (CHEN et al., 2016).

Quanto aos sintomas da doença olho de boi, eles se desenvolvem lentamente quando os frutos são armazenados em baixas temperaturas, e em algumas situações, os mesmos são visíveis somente após alguns meses de armazenamento. Os sintomas iniciais são lesões circulares e planas de coloração marrom clara com centro amarelo pálido e borda marrom escura ou avermelhada que se tornam necróticas e côncavas com o apodrecimento dos frutos (ARAÚJO et al., 2016). As lesões circulares e escuras com centro marrom claro semelhantes ao “olho de boi” deram origem ao nome da doença (Figura. 3). Em condições de alta umidade relativa, os acérvulos podem ser observados no centro das lesões mais velhas (SANHUEZA et al., 2001).

Esses sintomas impedem a comercialização do fruto in natura e reduzem o lucro do produtor devido às despesas adicionais de colheita, classificação, embalagem, transporte e armazenamento (ARAÚJO et al., 2016).

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

ENSAIO SOBRE PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE
NEOFABRAEA SPP.

Frutos de maçãs, das variedades Gala e Fuji foram utilizados para testar a patogenicidade e o crescimento micelial dos isolados de *Neofabraea sp.*, da coleção de trabalho do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Uva e Vinho. (Tabela 1 e 2).

Para a realização do experimento foram adquiridos 300 frutos no mercado local de Bento Gonçalves e em seguida foram sanitizados por imersão em uma solução com hipoclorito a 0,5% por 3 minutos, secados e dispostos nas bandejas.

Para a inoculação dos isolados foram testadas duas concentrações, 10^4 e 10^6 esporos/ml, essas suspensões de conídios foram obtidas a partir de um micélio com 15 dias de crescimento. O crescimento micelial foi realizado sem fotoperíodo e em dois meios de cultura BDA e EMA (batata-dextrose-ágar), (extrato-malte-ágar) (Figura 2).

A inoculação do fruto foi feita em dois pontos opostos na região equatorial. O orifício foi feito com a ajuda da ponta da pipeta e em seguida ocorreu a inoculação da suspensão de esporos utilizando 20 μ l de suspensão de 10^4 e 10^6 de esporos/ ml. Os frutos foram acondicionados em bandejas contendo papel filtro mantidas a temperatura de 25° C, a uma umidade de 85, por um período de 14 dias, sendo que a incidência e o diâmetro das lesões foram avaliados com intervalos de dois dias (Figura 1).

O experimento foi montado em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com duas repetições por isolados, sendo cada uma composta por 3 frutos utilizando os dois lados.

Tabela 1. Identificação dos isolados utilizados no teste de patogenicidade da coleção da EMBRAPA Uva e vinho. Esses isolados pertencem ao primeiro experimento de concentração.

Identificação do Isolado	Código do Isolado	Experimentos
89	1	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais
40	2	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais
90	3	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais

25	4	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais
87	5	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais
45	6	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais
52	7	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais
47	8	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais
4	9	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais
56	10	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais
38	11	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais

Tabela 2. Isolados utilizados no segundo experimento de patogenicidade pertencentes a coleção de fungos da EMBRAPA Uva e Vinho.

Identificação do Isolado	Código do Isolado	Experimentos
Cp1	1	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais
Cp4	2	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais
Cp6	3	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais
Cp7	4	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais
Cp9	5	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais
Cp10	6	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais
Cp11	7	Patogenicidade, crescimento

		micelial, óleos essenciais
AgR R3	8	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais
AgR R4	9	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais
RASIP	10	Patogenicidade, crescimento micelial, óleos essenciais

ENSAIO DE FORMULAÇÃO COM ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS EFEITOS NOS ISOLADOS DE *NEOFABRAEA SP.*

Foram utilizados dois óleos essenciais, de *L. sidoides* e de *O. micranthum* para a realização dos primeiros ensaios *in vitro*, testados em diferentes concentrações em alguns isolados selecionados após o ensaio de patogenicidade e concentração. Para o experimento, colônias de *Neofabraea sp.* de 15 dias de crescimento foram utilizadas, e colocadas em meio BDA (batata-dextrose-ágar) contendo o óleo essencial.

Discos de micélio retirados a partir das margens da cultura pura, foram colocados no centro de cada placa para avaliação de crescimento micelial em presença das substâncias teste de *L. sidoides* e *O. micranthum*. As concentrações utilizadas foram de 0, 150, 300, 450, 600, 750, 900 e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$, que foram adicionados ao meio de BDA. A testemunha consistiu de um disco cultivado em meio BDA sem adição de óleo. Cada óleo foi misturado com o detergente Twin 20 na proporção de 1:1 que também foi adicionado ao meio de cultura BDA em temperatura máxima de 45 °C. As testemunhas consistiram de placas de petri contendo apenas o meio BDA e outra testemunha contendo BDA, mais um fungicida sintético recomendado para o controle de podridões em pós-colheita. As placas foram incubadas à temperatura de 26 °C, até que as placas controlem fossem cobertas pelo micélio. A atividade antifúngica das concentrações dos óleos essenciais foi avaliada por meio da inibição do crescimento micelial do patógeno.

MÉTODO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL DE *NEOFABRAEA SP.* COM PLACAS DE ELISA

Visando melhorar os protocolos de metodologias, buscando a eficiência e a economia para próximos ensaios, foi realizado um experimento de inibição de crescimento micelial de *Neofabraea sp* e um cálculo aproximado de doses letais aos patógenos. Com diversas diluições, em placas de Elisa, onde em cada poço, foi colocado o meio BD (batata-dextrose), suspensão conidial de *Neofabraea*, e o óleo essencial. Nos últimos poços das placas, foram o controle com apenas água, e um outro apenas com o meio BD, levados a incubação, onde as leituras foram feitas de 8 em 8 horas em espectrofotômetro SpectraMax n2®, nos comprimentos de onda 340, 405, 450, e 630 nm, por meio da espectrofotometria foi realizada a medição da intensidade da luz, nesses comprimentos de onda. Este protocolo foi indicado pelo Doutor Fábio Rossi Cavalcante, EMBRAPA 2021,



Figura 1. Inoculação do fruto realizada em dois pontos opostos na região equatorial da maçã.

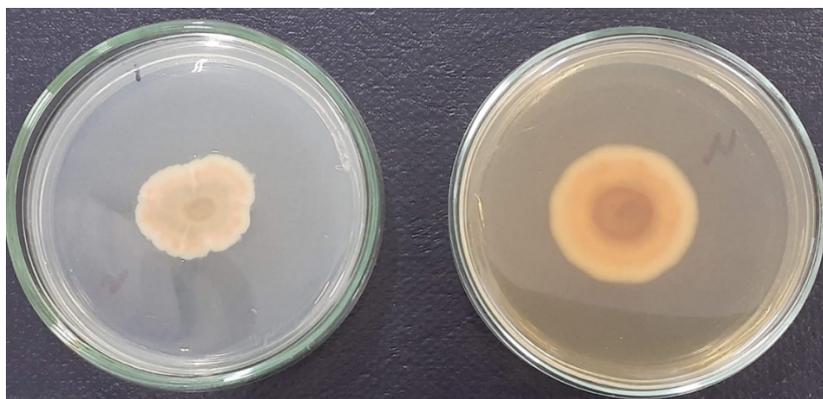


Figura 2. Os isolados de *Neofabraea sp.*, oriundos da coleção de trabalho da Embrapa Uva e Vinho foram ativados e repicados em meio batata-dextrose-agar (BDA).



Figura 3. Lesão olho de boi em maçãs da cultivar Fuji causadas por *Neofabraea sp.*

4. RESULTADOS

ENSAIO SOBRE PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE *NEOFABRAEA SP.*

Para o ensaio sobre a patogenicidade a concentração ideal de inoculação usada, foi a de 10^6 esporos/ml, levando em consideração, que na maioria dos frutos, a concentração de 10^4 não desenvolveu o crescimento do patógeno. Notou-se também que os diferentes isolados utilizados da coleção da Embrapa Uva e Vinho de Vacaria e de Bento Gonçalves tiveram diferentes comportamentos quanto ao seu crescimento micelial. Desta forma com base nos resultados obtidos demonstrados nas figuras 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 foram selecionados os isolados de *Neofabraea sp.*, que possuíram as taxas mais elevadas de crescimento micelial, para o próximo ensaio *in vitro*, com óleos essenciais de *L. sidoides* e de *O. micranthum*. Afim, de avaliar as concentrações ideais dos óleos, para a inibição do crescimento do patógeno.

ENSAIO 1 DE PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE *NEOFABRAEA SP*

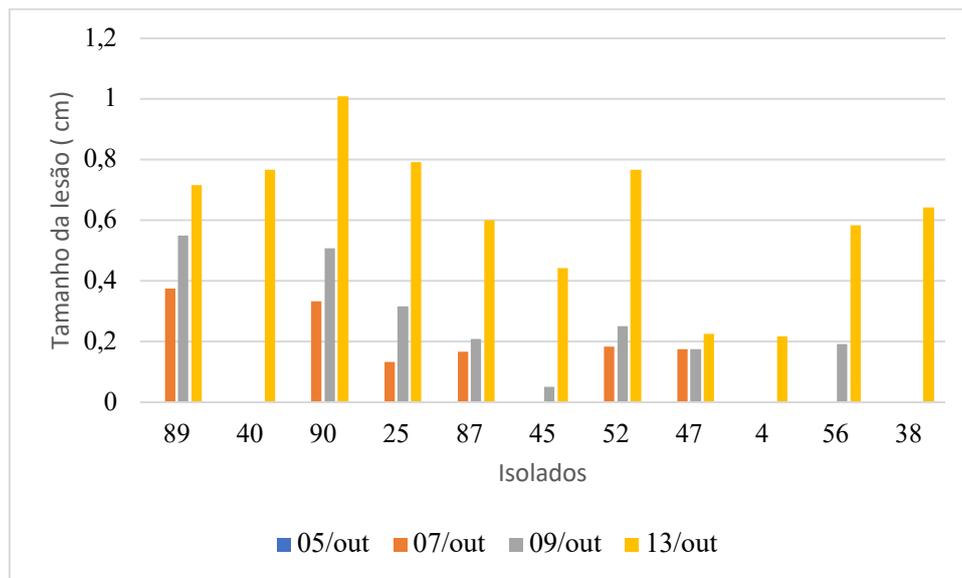


Figura 3A. Teste de patogenicidade realizado na concentração 10^4 , na cultivar Fuji, com os isolados de *Neofabraea sp.* da coleção da Embrapa Uva e vinho de Vacaria.

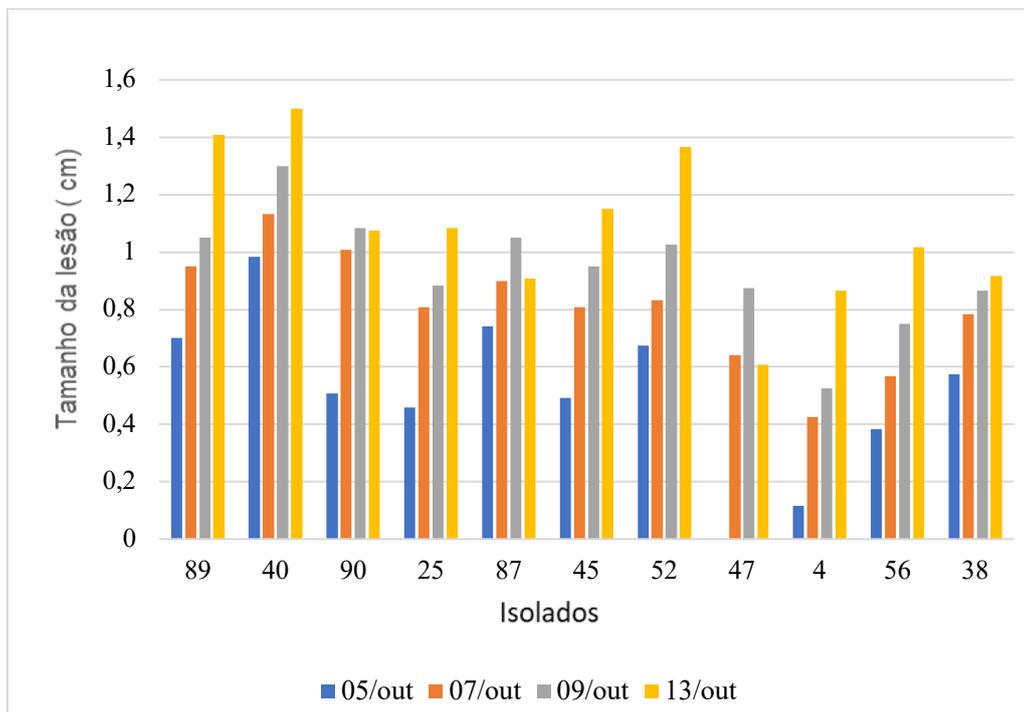


Figura 3B. Teste de patogenicidade realizado na concentração 10^6 , na cultivar Fuji com os isolados de *Neofabraea sp.* da coleção da Embrapa Uva e vinho de Vacaria.

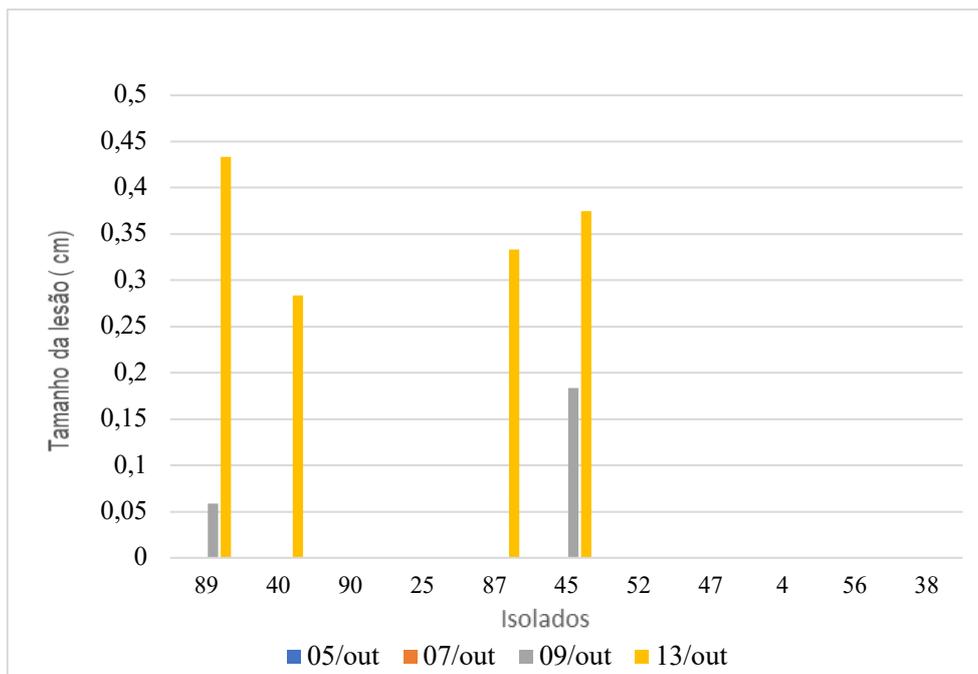


Figura 4A. Teste de patogenicidade realizado na concentração 10^4 , na cultivar Gala com os isolados de *Neofabraea* sp. da coleção da Embrapa Uva e vinho de Vacaria.

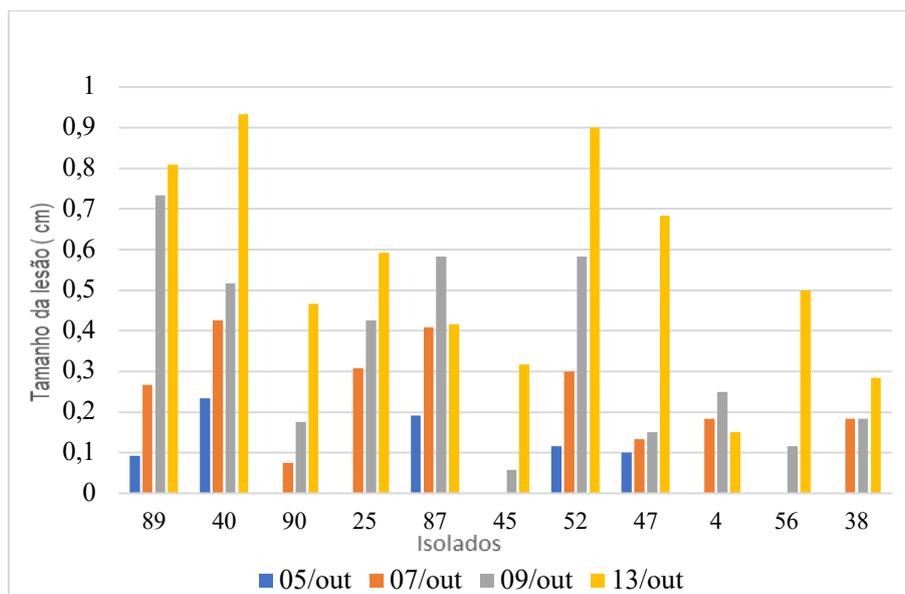


Figura 4B. Teste de patogenicidade realizado na concentração 10^6 , na cultivar Gala com os isolados de *Neofabraea* sp. da coleção da Embrapa Uva e vinho de Vacaria referente ao crescimento micelial.

Foi constatado que houve diferenças entre os isolados para o seu crescimento, sendo em que alguns tiveram taxas melhores de crescimento. Observaram-se também diferenças quanto ao crescimento diante das concentrações 10^4 e 10^6 esporos/ml. Durante as avaliações dos ensaios de

crescimento micelial do fungo *Neofabraea* sp. foi possível visualizar um desenvolvimento mais acentuado do micélio na cultivar Fuji em comparação a cultivar Gala, podendo estar relacionado a origem das frutas e genética das cultivares.

ENSAIO 2 DE PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE *NEOFABRAEA* SP.

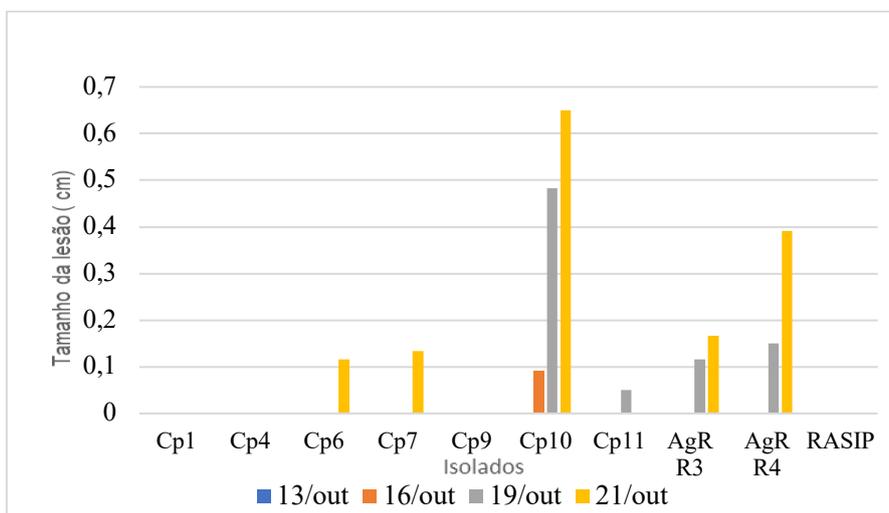


Figura 5A. Teste de patogenicidade realizado na concentração 10^4 , na cultivar Fuji com isolados de *Neofabraea* sp. da coleção da Embrapa Uva e vinho de Bento Gonçalves.

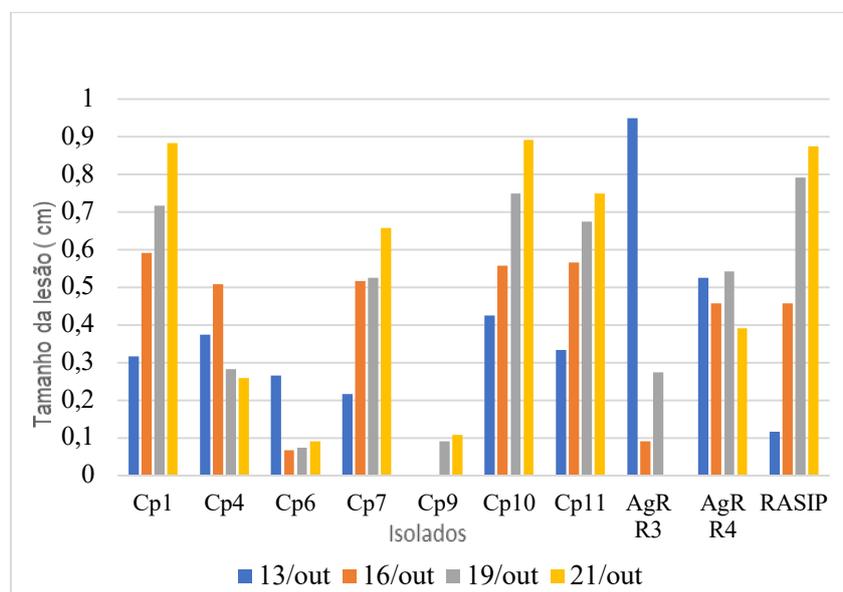


Figura 5B. Teste de patogenicidade na concentração 10^6 , realizado na cultivar Fuji com isolados de *Neofabraea* sp. da coleção da Embrapa Uva e vinho de Bento Gonçalves.

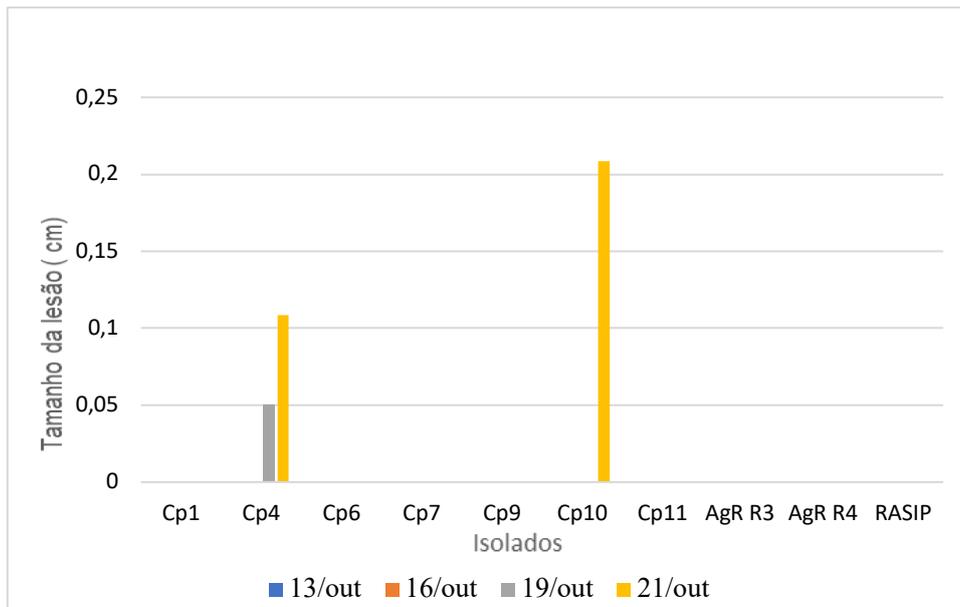


Figura 6A. Teste de patogenicidade realizado na concentração 10^4 , na cultivar Gala com isolados de *Neofabraea* sp. da coleção da Embrapa Uva e vinho de Bento Gonçalves.

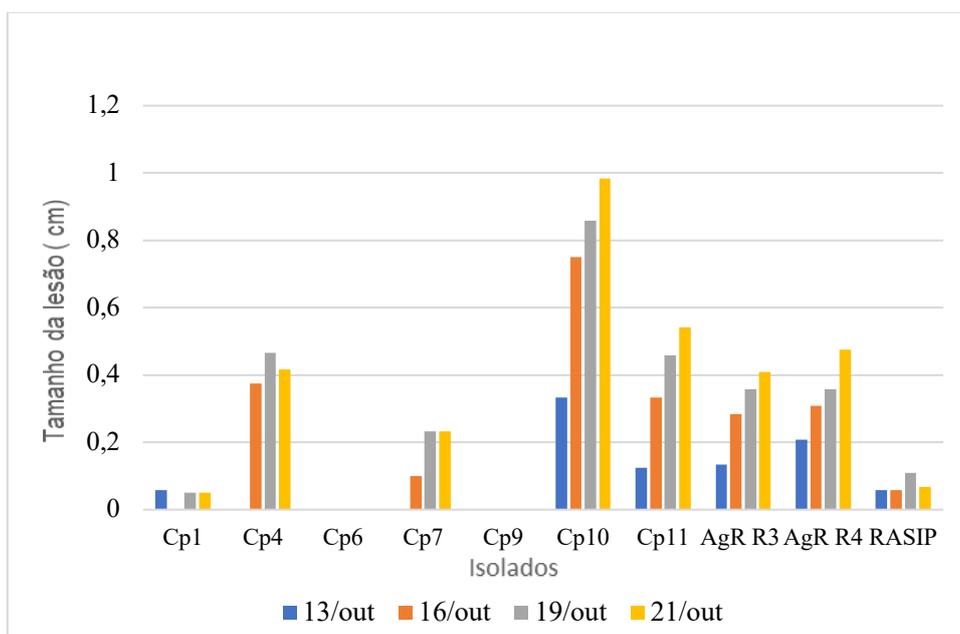


Figura 6B. Teste de patogenicidade realizado na concentração 10^6 , na cultivar Gala com isolados de *Neofabraea* sp. da coleção da Embrapa Uva e vinho de Bento Gonçalves.

5.1 ENSAIO DE FORMULAÇÃO COM ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS EFEITOS NOS ISOLADOS DE *NEOFABRAEA* SP.

Para o primeiro ensaio de formulação com os óleos essenciais, foram utilizados dois isolados, um da coleção da Embrapa de Bento Gonçalves e o

outro de Vacaria. Foram selecionados de acordo com seu crescimento nos ensaios de patogenicidade. Os isolados que apresentaram as melhores taxas de crescimento foram escolhidos para o teste preliminar *in vitro* com os dois óleos essenciais de *L. sidoides* e de *O. micranthum*.

No ensaio 2 observando o crescimento micelial, foi possível constatar que o isolado 40 pertencendo a coleção da Embrapa de Bento Gonçalves obteve um melhor crescimento comparando-se aos demais. Já quanto ao segundo isolado, referente a coleção da Embrapa de Vacaria o isolado cp10 também um dos que se destacou em relação ao seu crescimento, como é possível observar nos gráficos.

O uso do óleo essencial de *Lippia sidoides* em todas as concentrações (150; 300; 450; 600; 750; 900 e 1000 uL/L), inibiu totalmente o crescimento de *Neofabraea* sp. Já na testemunha observou-se o crescimento do fungo logo no segundo dia após a inoculação do isolado de *Neofabraea* sp para ambos os isolados cp 10 e 40.

Já para o óleo essencial de *O. micranthum* constatou-se que não foram todas as concentrações que foram eficazes para o controle do crescimento de *Neofabraea* sp. Na concentração (150 uL/L) ocorreu crescimento micelial em ambos os isolados utilizados, 40 e cp 10, apesar de que o crescimento micelial não foi tão significativo quanto ao da testemunha. Sendo assim não houve inibição total do crescimento micelial de *Neofabraea* sp. como no óleo essencial de *L. sidoides*.

MÉTODO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL DE *NEOFABRAEA* SP. COM PLACAS DE ELISA

Desta forma, a técnica foi eficaz na identificação do crescimento dos patógenos. Tendo em vista os resultados preliminares das leituras, foi constatado, que o método é eficaz, podendo ser adaptado aos próximos testes com os óleos *L. sidoides* e de *O. micranthum*, e assim obter as concentrações ótimas para o controle eficaz do patógeno.

Avaliando a figura 8, foi possível constatar que nos primeiros poços onde a concentração do óleo essencial é maior houve a inibição do patógeno, ou seja, houve baixa absorvância quando comparada com a coluna 11 que teve a maior absorvância, pois a quantidade do óleo foi menor. Na coluna 12 o valor da

absorbância foi baixo pois só tinha água sem o patógeno. A leitura 5 da placa 3 já possui valores diferentes, isso pode ter ocorrido a volatilização do óleo essencial.

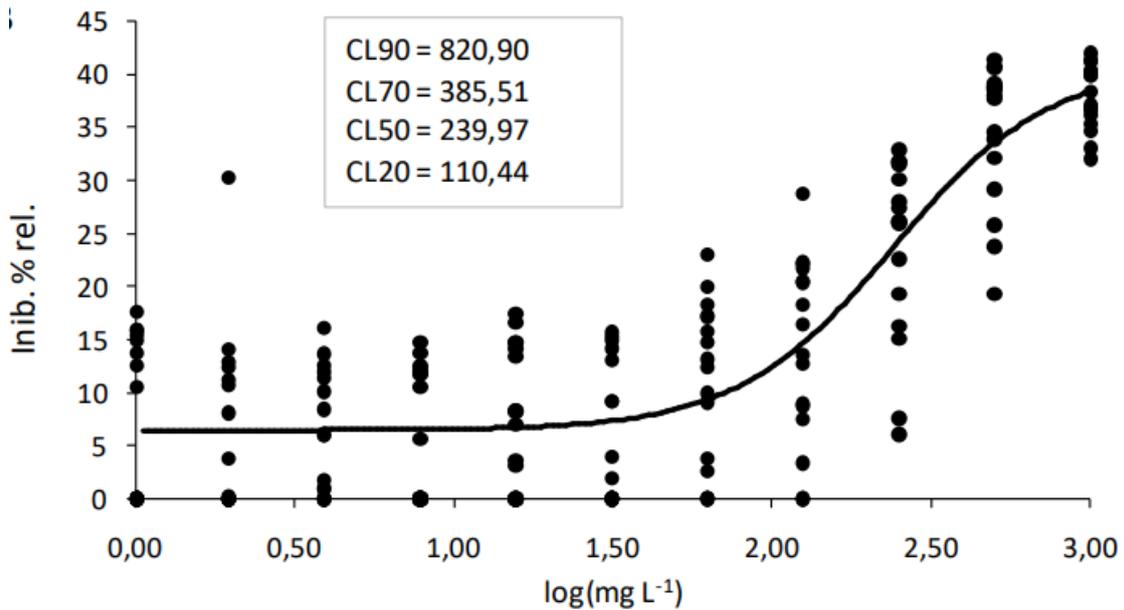


Figura 7. Inibição de crescimento de micélio em cultivo de *Neufabreaea* (isolados CP10 e 40), em meio BD em função da presença de *Lippia sidoides*, 65 horas após a incubação a 25°C.

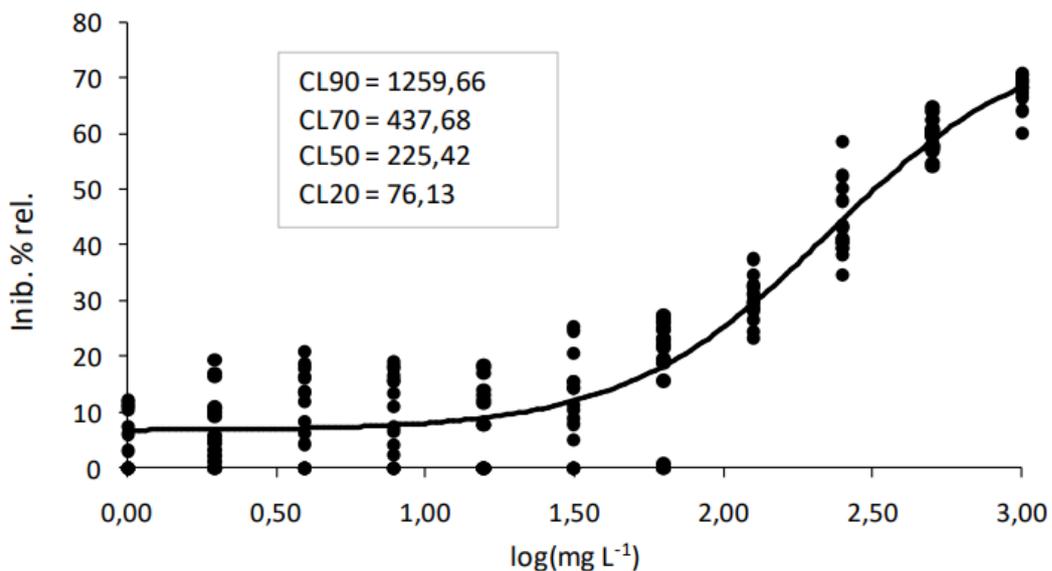


Figura 8. Inibição de crescimento de micélio em cultivo de *Neufabreaea* (isolados CP10 e 40), em meio BD em função da presença de *Ocimum mincranthum*, 51 horas após a incubação a 25°C.

Os resultados mostraram que concentrações a partir de 150 uL/L do óleo essencial de LS e OM já reduzem o crescimento micelial dos isolados de *Neofabraea*; A DL70 para óleo essencial de LS foi 385,51 µL/L; A DL70 para OM foi 437,68 µL/L

5. CONCLUSÃO

Para o ensaio de patogenicidade dos isolados de *Neofabraea sp* notou-se nos dois experimentos realizados com os isolados da coleção de Bento Gonçalves e com os isolados de Vacaria que a concentração ideal para a infecção dos frutos é a de 10⁶ esporos/ml.

Foi possível observar também que os diferentes isolados tiveram diferentes taxas de crescimento micelial e que os isolados apresentaram melhores taxas de crescimento na cultivar Fuji quanto comparada com a Gala.

Mais ainda, foi possível observar que as concentrações (150; 300; 450; 600; 750; 900 e 1000 uL/L), do óleo essencial de *L. sidoides* inibiram o crescimento micelial do patógeno já para o óleo essencial de *O. micranthum* foi possível observar que a concentração 150 uL/L não foi eficaz para o controle de *Neofabraea sp*.

Por fim, o método de Inibição de crescimento micelial de *Neofabraea sp*. com placas de Elisa se mostrou eficaz, podendo ser adaptado aos testes com os óleos essenciais de *L. sidoides* e de *O. micranthum*, e assim obter as concentrações ótimas para o controle eficaz do patógeno.

6. REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. 21^a Ed. São Paulo. FNP Consultoria & Agroinformativos, 2016.

ANTUNES, M. D.; CAVACO, A. M. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. Flavour Fragr. J., n. 25, p. 351-366, 2010.

ARAÚJO, L; MEDEIROS, H. A.; PASA, M.S.; SILVA, F.N. Doenças da macieira e da pereira. Informe agropecuário, v. 37, p. 61-74, 2016.

ASODA, T. et al. Effects of postharvest ethanol vapor treatment on ethylene responsiveness in broccoli. Postharvest Biology and Technology, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 216–220, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS. NBR 14141: Escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, jul., 1998, 3 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ. Disponível em: <https://www.abpm.org.br/sobre-a-maca>. Acesso em 10 de dezembro de 2023. AQUINO, C. et al. Ação e caracterização química de óleos essenciais no manejo da antracnose do maracujá. *Rev Bras. Fruticultura*, v. 34, p. 1056-1067, 2012.

AVILA-SOSA, R. et al. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *Int. Journal Food Microbiology*, v. 153, p. 66-72, 2012.

BENDER, J.R. Botânica e Fisiologia In: Manual da Cultura da Macieira. Florianópolis: EPAGRI, 1986. Cap 2, p. 26-47.

BESSEMANS, N. et al. A novel type of dynamic controlled atmosphere storage based on the respiratory quotient (RQDCA). *Postharvest Biology and Technology*, [s. l.], v. 115, p. 91–102, 2016.

BOERSIG, M. R.; KADER, A. A.; ROMANI, R. J. Aerobic-anaerobic respiratory transition in pear fruit and cultured pear fruit cells. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, [s. l.], v. 113, n. 6, p. 869–873, 1988.

BOGO A, MAFFIOLETTI MA, VALDEBENITO-SANHUEZA RM, CASA RT. Morphological characterization of *Cryptosporiopsis perennans* isolates in different culture media. *Tropical Plant Pathology* 33, 248–51. 2008.

BOTH, V. et al. Effect of storage under extremely low oxygen on the volatile composition of ‘Royal Gala’ apples. *Food Chemistry*, [s. l.], v. 156, p. 50–57, 2014.

BOTH, V. et al. Effects of dynamic controlled atmosphere by respiratory quotient on some quality parameters and volatile profile of ‘Royal Gala’ apple after long-term storage. *Food Chemistry*, [s. l.], v. 215, p. 483–492, 2017.

BRACKMANN, A. et al. Temperatura, umidade relativa e atraso na instalação da atmosfera controlada no armazenamento de maçã “Fuji”. *Ciência Rural*, [s. l.], v. 39, n. 8, p. 2367–2372, 2009.

BRACKMANN, A.; WEBER, A.; BOTH, V. CO₂ partial pressure for respiratory quotient and harvest watch dynamic controlled atmosphere for “galaxy” apples storage. *Acta Horticulturae*, [s. l.], n. 1079, p. 435–440, 2015.

BRAGA, L.R.; PERES, L. Novas tendências em embalagens para alimentos: revisão. *B. CEPPA*, v.28, n.1, p.69-84, 2010.

CALVACANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M.; LIMA, M. A.; SANTANA, E. W. P. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 99: 5: 541–544 (2004).

CAMELDI, I.; PIRONDI, A.; NERI, F.; COLLINA, M.; MARI, M. First report of apple bull's eye rot caused by *Neofabraea malicorticis* in Italy. Plant Disease, v.100, n.12, p. 2532, 2016.

CARNELOSSI, P. ET AL. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. Ver. Bras. Plantas Me'd., v. 11, p. 399-406, 1999.

CHEN, C.; VERKLEY, G. J.; SUN, G.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Redefining common endophytes and plant pathogens in *Neofabraea*, *Pezizula*, and related genera. Fungal Biology, v. 120, n. 11, p. 1291-1322, 2016.

CUNICO, M.M.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; CARVALHO, J.L.S.; PEITZ, C.; STANGARLIN, J.R.; SCHWANESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas Medicinais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. v. 11, p. 16 -21. 2003.

CUNNINGTON, J. H. Three *Neofabraea* species on pome fruit in Australia. Australasian Plant Pathology, v. 33, n. 03, p. 453-454, 2004.

EMBRAPA. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-projetos/-/projeto/217097/desenvolvimento-de-tecnologias-para-o-controle-de-podridao-olho-de-boi-em-macas>. Acesso em abril de 2022.

GABIOUD REBEAUD, S.; GASSER, F. Fruit quality as affected by 1-MCP treatment and DCA storage - a comparison of the two methods. European Journal of Horticultural Science, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 18–24, 2015.

GATTO A., B. IPPOLITO, et al. Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. Postharvest Biology and Technology, 2011, 61(1): 72-82

GIRAU M.; MORONVALLE, A. Post-harvest diseases of apple: biology and epidemiology of *Gloeosporium* rots, 2012.

HENRIQUEZ, J. L. First report of apple rot caused by *Neofabraea alba* in Chile. Plant Disease, v. 89, n. 12, p. 1360-1360, 2005.

HORTOVA, B.; NOVOTNY, D.; ERBAN, T. Physiological characteristics and pathogenicity of eight *Neofabraea* isolates from apples in Czechia. European Journal of Horticultural Science, v. 79, n.06, p. 327-334, 2014.

JIJAKLI, H.M. *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research and practical applications. Antonie Van Leeuwenhoek, 2011, 99: 93–105.

JIN, Y. Z. et al. Ethanol vapor treatment maintains postharvest storage quality and inhibits internal ethylene biosynthesis during storage of oriental sweet melons. *Postharvest Biology and Technology*, [s. l.], v. 86, p. 372–380, 2013.

JOHNSTON, P. R.; MANNING, M. A.; MEIER, X.; PARK, D.; FULLERTON, R. A. *Cryptosporiopsis actinidiae* sp. nov. *Mycotaxon*, v. 89, n. 1, p. 131-136, 2004.

KE, D. et al. Ethanolic Fermentation of 'Bartlett' Pears as Influenced by Ripening Stage and Atmospheric Composition. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, [s. l.], v. 119, n. 5, p. 976–982, 1994.

KIENHOLZ, J. R. Comparative study of the apple anthracnose and perennial canker fungi. *Journal of Agricultural Research*, v. 59, n. 9, p. 635-665, 1939.

KIST, B.B. et al. Anuário brasileiro da fruticultura. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2015. 108 p.

KÖPCKE, D. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) and dynamic controlled atmosphere (DCA) applications under elevated storage temperatures: Effects on fruit quality of "Elstar", "Jonagold" and "Gloster" apple (*Malus domestica* Borkh.). *European Journal of Horticultural Science*, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 25–32, 2015.

LADO, J.; VICENTE, E.; MANZZIONI, A.; ARES, G. Application of a check-all-that-apply question for the evaluation of strawberry cultivars from a breeding program. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 2268–2275, 2010.

LIU, W. W. et al. Ethanol treatment inhibits internal ethylene concentrations and enhances ethyl ester production during storage of oriental sweet melons (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino). *Postharvest Biology and Technology*, [s. l.], v. 67, p. 75–83, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

SILVA, M. G. V.; SILVA, F. O.; MATOS, F. J. A. Chemical composition of leaves essential oil of *Ocimum micranthum* Willd growing Brazil Northeast, during daytime and at different stages of development. *Journal of Essential Oil Research*, v. 16, maio/jun. 2004.

MACFIE, H.J.H. Assesment of the sensory properties of food. *Nutrition Reviews*. [S.l.], v.48, n.2, p. 87-93, 1990.

MAFFIOLETI, M.M. A. Características morfofisiológicas de *Cryptosporiopsis perennans*, agente causal da podridão "olho de boi" em maçã. 2007. 59 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2007.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. Sensory evaluation techniques. 4th Edition, Boca Raton: CRC Press, 2007. 464p.

MICHALECKA, M.; BRYK, H.; PONIATOWSKA, A.; PULAWSKA, J. Identification of *Neofabraea* species causing bull's eye rot of apple in Poland and their direct detection in apple fruit using multiplex PCR. *Plant Pathology*, p. 1-12, 2015

NABILA, A; SOUFIYAN, A. Use of Plant Extracts in the Control of Post-Harvest Fungal Rots in Apples. *Journal of Botanical Research*, 2019, 1(3):27-41.

PEŠICOVÁ, K.; KOLAŘÍK, M.; HORTOVÁ, B.; NOVOTNÝ, D. Diversity and identification of *Neofabraea* species causing bull's eye rot in the Czech Republic. *European Journal of Plant Pathology*, p. 1-11, 2016.

PETRI, J.L.; LEITE, G.B. Macieira. *Revista Brasileira de Fruticultura* v.30, n 4 875-1166, 2008.

PRANGE, R. K. et al. A review on the successful adoption of dynamic controlled-atmosphere (dca) storage as a replacement for diphenylamine (dpa), the chemical used for control of superficial scald in apples and pears. *Acta Horticulturae*, [s. l.], n. 1071, p. 389–396, 2015.

SANHUEZA, R. M. V. Ocorrência de *Cryptosporiopsis perennans* em macieiras' Fuji'no Sul do Brasil. *Summa phytopatológica*, v. 28, n. 2, p. 204-206, 2002.

SANHUEZA, R. M. V. Podridão de frutos e cancos dos ramos causados por *Cryptosporiopsis perennans* nas macieiras. *Embrapa Uva e Vinho*, 2001.

SANHUEZA, R. M. V.; BOGO, A. *Neofabraea brasiliensis*. *Persoonia*, v. 35, p. 421-433, 2015.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; MORAIS, B.B. Embalagens ativas e inteligentes para frutas e hortaliças. *Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens*, v.21, n.1, p.1-7, 2009.

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

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S. et al. *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos* Piracicaba: Fealq, 2005. p.125-32.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS(SEBRAE). O Cultivo e o Mercado da maçã. Disponível em: <www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-damaca,ea7a9e665b182410VgnVCM100000b272010aRCRD> Acesso em: 01 de abril de 2022.

SINGH, S.P. et al. Antibacterial and antifungal activities of *Mentha arvensis* essential oil. *Fitoterapia*, v.63, n.1, p.76-8, 1992.

STANGARLIN, J.R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.2, n.11, p.16-24, 1999.

STEFFENS, C. A. et al. Taxa respiratória de frutas de clima temperado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 313–321, 2007.

THEWES, F. R. et al. Effect of dynamic controlled atmosphere monitored by respiratory quotient and 1- methylcyclopropene on the metabolism and quality of ‘Galaxy’ apple harvested at three maturity stages. *Food Chemistry*, [s. l.], v. 222, p. 84–93, 2017.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; MAFFIOLETTI, M.; COMPARIN, C. C.; KRASNIAK, A.; BOGO, A.; ARCARI, R. Características e controle da podridão ‘olho-de-boi’ nas maçãs do Sul do Brasil. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 2006. (Circular Técnica 66).

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; SPOLTI, P.; DEL PONTE, E.M. Controle do inóculo inicial para redução dos danos pela podridão olho-de-boi em macieiras. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.32, n.4, p.1044-1054, 2010.

VELTMAN, R. H.; VERSCHOOR, J. A.; VAN DUGTEREN, J. H. R. Dynamic control system (DCS) for apples (*Malus domestica* Borkh. cv ‘Elstar’): optimal quality through storage based on product response. *Postharvest Biology and Technology*, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 79–86, 2003.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHIERE, F.; VAN BESST, M.; KRUIJF, N.; DEBEVERE, J. Developments in the active packaging of food. *Trends in Food Science & Technology*, v.10, p.77-86, 1999.

VIEIRA F., M. AMANDA, C. A. STEFFENS, L.C. ARGENTA, C.V. TALAMINI DO AMARANTE, A.H. OSTER, R. T. CASA, A.G.M. AMARANTE, B.P. ESPÍNDOLA. Essential oils for the postharvest control of blue mold and quality of ‘fuji’ apples. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 2018, 53(5): 547-556.

WEBER, A. et al. “Royal Gala” apple quality stored under ultralow oxygen concentration and low temperature conditions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, [s. l.], v. 46, n. 12, p. 1597–1602, 2011.

WEBER, A. et al. Dynamic controlled atmosphere (DCA): interaction between DCA methods and 1-methylcyclopropene on ‘Fuji Suprema’ apple quality. *Food Chemistry*, [s. l.], v. 235, p. 136–144, 2017. Embrapa. Disponível em: <https://sistemas.sede.embrapa.br/ideare/pages/home/principal/principalfram.esnovo.jsf> 26/26. Acesso em 24 de Agosto de 2021.

WEBER, A. et al. Respiratory quotient: innovative method for monitoring 'Royal Gala' apple storage in a dynamic controlled atmosphere. *Scientia Agricola*, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 28–33, 2015.

WRIGHT, H. et al. The effect of temperature and other factors on chlorophyll a fluorescence and the lower oxygen limit in apples (*Malus domestica*). *Postharvest Biology and Technology*, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 21–28, 2010.

ZANELLA, A. et al. Fruit fluorescence response to low oxygen stress: modern storage technologies compared to 1-mcp treatment of apple. *Acta Horticulturae*, [s. l.], n. 682, p. 1535–1542, 2005.

ZANELLA, A.; CAZZANELLI, P.; ROSSI, O. Dynamic controlled atmosphere (DCA) storage by the means of chlorophyll fluorescence response for firmness retention in apple. *Acta Horticulturae*, [s. l.], n. 796, p. 77–82, 2008.

ZILLO, R. R. Óleo essencial associado à película de carboximetilcelulose no controle da antracnose e seu efeito na vida útil de mamão (*Carica papaya* L.). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, p. 60, 2017.

ZNINI M., G. CRISTOFARI, L. MAJIDIA, H. MAZOUZ, P. TOMIB, J. PAOLINIB, J. COSTA. Antifungal activity of essential oil from *Asteriscus graveolens* against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Nat Prod Commun.* 2011, 6(11):1763-8

ZNINI M., G. CRISTOFARI, L. MAJIDIA, H. MAZOUZ, P. TOMIB, J. PAOLINIB, J. COSTA. Antifungal activity of essential oil fram *Asteriscus graveolens* against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Nat Prad Commun.* 2011, 6(11): 1763-8.

ZNINI, M., G. CRISTOFARI, L. MAJIDI, A. EL HARRAK, J. PAOLINI, J. COSTA. In vitro antifungal activity and Chemical composition of *Warionia saharae* essential oil against 3 apple phytopathogenic fungi. *Food Sci. Biotechnol*, 2013, 22(S):113-119.

ZNINI, M., G. CRISTOFARI, L. MAJIDI, A. EL HARRAK, J. PAOLINI, J. COSTA. In vitra antifungal activity and chemical composition of *Warionia saharae* essential oil against 3 apple phytopathogenic fungi. *Food Sci. Biotechnol*, 2013, 22(S): 113-119.