

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO



ANA JÚLIA ALVES AGUIAR ATHAYDE

**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO COMBINADA DE QUITOSANA E
ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* DC. Ex Nees PARA
CONTROLE PÓS-COLHEITA DE *Rhizopus stolonifer* EM TOMATES**

**RECIFE-PE
2015**

ANA JÚLIA A. A. ATHAYDE

**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO COMBINADA DE QUITOSANA E
ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* DC. Ex Nees PARA
CONTROLE PÓS-COLHEITA DE *Rhizopus stolonifer* EM TOMATES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de mestre em nutrição com ênfase na área de ciência dos alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

Co-orientadora: Dra. Lúcia Raquel Ramos Berger

**RECIFE-PE
2015**

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4-1662

- A865a Athayde, Ana Júlia A. A.
Avaliação da aplicação combinada de Quitosana e óleo essencial de *Cymbopogon citratus* DC. Ex Nees para controle pós-colheita de *Rhizopus stolonifer* em tomates / Ana Júlia A. A. Athayde. – Recife: O autor, 2015.
92 folhas : il. ; 30 cm.
- Orientador: Evandro Leite de Souza.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2015.
Inclui referências e apêndices.
1. Nutrição. 2. *Cymbopogon*. 3. *Lycopersicon esculentum*. I. Souza, Evandro Leite de (Orientador). II. Título.
- 612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2015-176)

ANA JÚLIA ALVES AGUIAR ATHAYDE

**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO COMBINADA DE QUITOSANA E
ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* DC. Ex Nees PARA
CONTROLE PÓS-COLHEITA DE *Rhizopus stolonifer* EM TOMATES**

Dissertação defendida e aprovada em 25/02/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Evandro Leite de
Souza Departamento de
nutrição/UFPB Orientador

Profa. Dra Thayza Christina Montenegro Stamford
Departamento de nutrição/UFPE
Membro Interno

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de
Lima Departamento de
biologia/UFRPE Membro Exteno

A minha família,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora por tudo que consegui, pela coragem que me foi concedida e pela superação a cada dia.

Agradeço a minha mãe e minhas irmãs e meu irmão pelo amor a mim depositado e por terem sempre acreditado em mim, até mesmo quando eu mesma não acreditava mais. A paião por todo orgulho, por todos os exageros sobre minhas conquistas acadêmicas. Eu amo muito vocês!

Agradeço a toda a minha família, em especial a minha avó, por todo amor e carinho, tia Graça (*in memoriam*) que mesmo não estando mais conosco, foi a minha fonte de inspiração, a quem eu me apeguei nas lembranças para me tornar uma profissional tal qual ela era. Tia se não fosse por você eu não seria quem eu sou hoje. Muito obrigada!

Agradeço a Sandir, por ter depositado toda a confiança no meu futuro acadêmico, por ter ido comigo às pesquisas nos dias mais difíceis, por todo amor e estímulo para eu não desistir, e pelos sonhos sonhados comigo. Agradeço também a toda a sua família que sempre acreditou em mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr Evandro Leite de Souza, sem o qual eu não estaria onde estou. Obrigada pela oportunidade e pela confiança a mim depositada para ingressar tão cedo no meio científico. À professora Maria Lúcia da Conceição, por todo carinho, paciência e dedicação. Aos professores Marcos Antônio Barbosa de Lima e Thayza Stamford por toda disponibilidade, ajuda e paciência. Obrigada por serem para mim, exemplos os quais eu pretendo seguir, vocês me fazem sentir o desejo de crescer a cada dia.

A Thaís, Carlinha, Karla e Polyana por serem minhas eternas amigas, dando força e não me deixando desistir. Polys, te dedico em especial essa conquista, sem você o mestrado não seria o mesmo.

Aos meus companheiros da turma de mestrado, Rafa, Taci e Marcela, por todos os momentos e conhecimentos compartilhados.

Aos meus cunhados, Ronaldinho e Daniel. Meus primos Andrei, Germana, Gustavo e minhas tias que sempre estiveram torcendo por mim, me ajudando a alcançar meus objetivos.

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica dos Alimentos, Jossana, Nelson, Carol, Katy, Priscila Dinah, Eduardo, Vanessa, Geany, Raíssa Raquel (minha querida co-orientadora), pelo tempo dedicado, pelos ensinamentos, pelos fins de semana e feriados compartilhados no laboratório, enfim, pela amizade e confiança que vocês compartilharam comigo. Agradeço a todos, por terem tornado os meus dias mais felizes em meio a tantas preocupações! Vocês são demais!

Aos meus irmãos da Comunidade Fraterno amor por toda compreensão da minha ausência e por terem sido meu suporte espiritual nos momentos mais difíceis.

A pós-graduação em nutrição-UFPE, em especial Cecília e Neci, por terem me ajudado com dedicação e paciência ao longo desse caminho.

Ao CNPQ por ter financiado a pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

“ Demore na dúvida... E descubra a sabedoria que insiste em se esconder na ausência de palavras. ”

Padre Fábio de Melo

RESUMO

O tomate (*Lycopersicon esculentum*) é uma das frutas mais populares do mundo, porém, 21% de sua produção é perdida devido a doenças pós-colheita, especialmente causadas por fungos patogênicos, como a podridão causada por *Rhizopus stolonifer*. Para controle de doenças pós-colheita, antimicrobianos naturais, como a quitosana (QUI) e óleos essenciais (OE), vêm sendo utilizados. Tais compostos apresentam comprovada ação antimicrobiana, além de baixa toxicidade. Este estudo avaliou a eficácia da aplicação combinada de quitosana (QUI) e óleo essencial de *Cymbopogon citratus* Dc. Ex Nees (OECC) para controle de *Rhizopus stolonifer* (*R. stolonifer*) URM 3728 em meio laboratorial e em tomates frescos (*Lycopersicon esculentum* Mill.) em temperatura ambiente ao longo de 12 dias. A concentração inibitória mínima (CIM) da quitosana e do óleo, foi realizada pela técnica de diluição seriada em caldo. A partir da CIM, diferentes concentrações subinibitórias foram utilizadas nos experimentos 'in vitro' para determinação da influência sobre a germinação dos esporos fúngicos (18 horas de incubação), efeito na integridade de membrana dos esporos fúngicos, crescimento micelial radial (3 dias de incubação) e efeito na morfologia de hifas fúngicas. Para a aplicação dos compostos nos frutos, foram determinados o crescimento fúngico superficial e em frutos artificialmente feridos. Além disso, durante o período de armazenamento avaliou-se também os efeitos dos tratamentos (QUI e OECC) sobre a microbiota autóctone, bem como sobre algumas características físico-químicas dos frutos determinantes da qualidade do fruto, tais como perda de peso, sólidos solúveis, acidez titulável, pH e ácido ascórbico. A concentração inibitória mínima (CIM) da QUI e OECC contra *R. stolonifer* foi de 8 mg / mL e 5 µL/mL, respectivamente. Concentrações subinibitórias de QUI e OECC (QUI: 4 mg / mL; OECC: 1,25 µL / mL) inibiram a germinação de esporos de fungos em até 97,7% e o crescimento micelial foi completamente inibido. O revestimento composto pelas combinações de QUI e OECC foram eficazes na prevenção da colonização (infecção) por *R. stolonifer* em tomates, entretanto, apresentou baixo efeito curativo da infecção por *R. stolonifer* nos frutos. O revestimento também foi eficaz na inibição da microbiota fúngica autóctone durante o armazenamento. Em geral, a aplicação de QUI e OECC como revestimento, preserva a qualidade dos frutos do tomateiro, conforme medido por alguns atributos físico-químicos. A partir destes resultados, os revestimentos compostos de QUI e OECC podem ser utilizados como o tratamento pós-colheita promissor para prevenir a infecção por *R. stolonifer* em tomates.

Palavras-chave: capim-limão; *Lycopersicon esculentum*; tratamento pós-colheita

ABSTRACT

Tomato (*Lycopersicon esculentum*) is one of the most popular fruits in the world. However, 21% of the annual production of tomato fruits is lost due to postharvest diseases, especially caused by pathogenic fungi as the rot caused by *Rhizopus stolonifer*. To control of postharvest diseases, natural antimicrobials have been used, such as chitosan (CHI) and essential oils (EO). These compounds have proven antimicrobial activity, and low toxicity. This study evaluated the efficacy of the combined application of chitosan (CHI) and *Cymbopogon citratus* Dc. Ex Nees (lemongrass) essential oil (CCEO) to control *Rhizopus stolonifer* URM 3728 (*R. stolonifer*) in synthetic media and when inoculated in fresh tomatoes fruits at room temperature along 12 days. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the chitosan and the essential oil, was performed by the serial dilution technique. From the MIC, subinibitory different concentrations were used in “*in vitro*” experiments to determine the influence on the germination of fungal spores (18 hours incubation), effect on membrane integrity of fungal spores, radial mycelial growth (90 hours of incubation) and effect on the morphology of fungal hyphae. On the application in the fruits they were determined superficial fungal growth and artificially wounded fruits. Furthermore, during the storage period was also evaluated the effects of treatments (CHI and CCEO) on autochthonous microflora as well as some physico-chemical characteristics of fruits determining the quality of the fruit, such as weight loss, soluble solids, titratable acidity, pH and ascorbic acid. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of CHI and CCEO against *R. stolonifer* was 8 mg/mL and 5 µL/mL, respectively. Sub-inhibitory concentrations of CHI and CCEO (CHI: 4 mg/mL; CCEO: 1.25 µL/mL) inhibited fungi spore germination up to 97.7% and completely inhibited mycelial growth. The coating composed of the combinations of CHI and CCEO were effective to prevent colonization (infection) of *R. stolonifer* on tomatoes, otherwise, presented weak curative effect of the *R. stolonifer* infection in fruits. The coating also controlled the autochthonous mycoflora in fruits during storage. In general, the application of CHI and CCEO as a coating preserved the quality of tomato fruits as measured by some physicochemical attributes. From these results, the coatings composed of CHI and CCEO could be a promising post-harvest treatment to prevent *R. stolonifer* infection in tomatoes fruits.

Keywords: lemongrass; *Lycopersicon esculentum*; post-harvest treatment

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1	Estudos recentes sobre a aplicação combinada de quitosana (QUI) e óleos essenciais (OEs) no controle de fungos patógenos e microbiota autóctone em alimentos ou em meio laboratorial.	32
-----------------	---	----

Artigo científico

Table 1	GC-MS analysis of <i>C. citratus</i> essential oil (constituents detected in concentration $\geq 1\%$).	85
Table 2	Inhibition percent (mean values \pm standard deviation) of <i>R. stolonifer</i> URM 3728 spore germination in liquid medium containing chitosan and/or <i>C. citratus</i> essential oil at different concentrations alone or in combination (18 h of incubation, 28 °C). Results expressed as the percent inhibition rates of spore germination in relation to the control assay.	86
Table 3	Mean values (\pm standard deviation) for physicochemical quality parameters in tomato fruits uncoated and coated with chitosan (CHI, 4000 ppm) and <i>C. citratus</i> essential oil (CCEO, 1250 ppm) and stored at room temperature (28 °C) for 8 days.	87
Table 4	Mean values (\pm standard deviation) for color parameters in tomato fruit uncoated and coated with chitosan (CHI, 4000 ppm) and <i>C. citratus</i> essential oil (CCEO, 1250 ppm) and stored at room temperature (28 °C) during 8 days.	88
Table 5	Mean values (\pm standard deviation) for sensory parameters in tomato fruit uncoated and coated with chitosan (CHI, 4000 ppm) and <i>C. citratus</i> essential oil (CCEO, 1250 ppm) and stored at room temperature (28 °C) for 4 days.	89

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1	Esporangiósforo de <i>R. stolonifer</i> visto por microscopia óptica.	23
Figura 2	Esquema de aplicações da quitosana na indústria de alimentos	26
Figura 3	Desacetilação da quitina em quitosana	27
Figura 4	Planta produtora do óleo de <i>C. citratus</i>	31

Artigo científico

Figure 1	Effects of chitosan (CHI, 4000 ppm) and <i>C. citratus</i> essential oil (CCEO, 1250 ppm) on the plasma membrane integrity of the spores of <i>R. stolonifer</i> URM 3728 in combination or not for different exposure durations (0, 2, 4 and 6 h) at 28 °C.	90
Figure 2	Effects of chitosan (CHI, 4 mg/mL) and <i>C. citratus</i> essential oil (CCEO, 1.25 µL/mL) alone or in combination on <i>R. stolonifer</i> URM 3728 mycelial growth over 90 h (28 °C).	91
Figure 3	Disease severity caused by <i>R. stolonifer</i> URM 3728 and by native mycoflora on tomato fruits coated and uncoated with chitosan (CHI 4000 ppm) and <i>C. citratus</i> essential oil (CCEO 1250 ppm) and stored at room temperature (28 °C) for 8 days. The disease severity is expressed as the severity index in preventive and curative assays.	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT	Acidez titulável
°C	Graus Celsius
CIM	Concentração Inibitória Mínima
cm	Centímetros
g	Grama
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
mg	Miligramas
mL	Mililitros
µL	Microlitros
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
OE	Óleo essencial
OECC	Óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i>
pH	Potencial Hidrogenionico
QUI	Quitosana
S/S	Sólidos solúveis
v/v	Volume por volume
%	Percentual

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 FRUTICULTURA NO BRASIL	17
2.2 FUNGOS PATÓGENOS PÓS-COLHEITA	19
2.3 USO DE AGROTÓXICOS	23
2.4 QUITOSANA COMO REVESTIMENTO ANTIMICROBIANO	25
2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 MATERIAIS	35
3.2 MÉTODOS	35
3.2.1 Preparo da solução de QUI e OECC e revestimentos	35
3.2.2 Identificação dos constituintes do OECC	36
3.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima	36
3.2.4 Efeito na germinação de esporos fúngicos	37
3.2.5 Efeito na integridade da membrana plasmática de esporos	37
3.2.6 Efeito no crescimento micelial fúngico	38
3.2.7 Efeito da infecção de <i>R. stolonifer</i> em tomates	38
3.2.8 Análises físico-químicas	39

3.2.9 Análise Sensorial	40
3.2.10 Análises estatísticas	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERÊNCIAS	44
APÊNDICE	58

1 APRESENTAÇÃO

A agricultura brasileira tem apresentado uma crescente importância na economia mundial com a produção contínua de cereais, oleaginosas, hortaliças, frutas e derivados na sua forma *in natura* ou processada. O Tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) é uma das frutas mais populares entre os consumidores, apresentando a segunda maior produção mundial. No entanto, 21% da sua produção anual é perdida devido a doenças pós-colheita, principalmente causadas por fungos patogênicos (FAO, 2014). A podridão mole de *Rhizopus*, causada pelo fungo *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. Ex Fr.) é uma doença pós-colheita comum e destrutiva em frutos de tomate frescos, o que limita o prazo de validade e o valor de mercado do produto (STEVENSON et al., 2004). Este patógeno é adquirido durante a colheita, manuseio e transporte dos tomates e pode infectar e destruir frutos sadios rapidamente (RAMOS-GARCÍA et al., 2012).

Nos últimos anos, o uso indiscriminado de fungicidas sintéticos para controle de doenças pós-colheita tem gerado preocupação internacional sobre os inconvenientes efeitos significativos deste tratamento sobre a saúde humana, meio ambiente e no surgimento de cepas resistentes aos fungicidas. Nos seres humanos, os fungicidas sintéticos podem causar danos a diversos órgãos como fígado, baço, rins, órgãos genitais e pulmões (PIRES; CALDAS; RECENA, 2005). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), também podem ocorrer manifestações menos graves como vômito, diarreia, sudorese excessiva, salivação, broncoconstrição, cólicas abdominais, bradicardia, taquicardia, dor de cabeça, tontura e cansaço (BRASIL, 2012).

Desse modo, muitos pesquisadores têm se interessado em substâncias alternativas seguras para substituir ou mesmo diminuir o uso de pesticidas em alimentos (LIU et al., 2007; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011.), pois, apesar da grande importância nas atividades agrícolas, ainda não há um controle rigoroso do uso de agrotóxicos no que diz respeito à saúde e segurança dos consumidores (FRANK et al., 2004). A busca dos consumidores por alimentos naturais com vida útil prolongada impulsionaram a pesquisa de novos compostos ou substâncias antimicrobianas para uso em alimentos (FAI; STAMFORD; STAMFORD, 2008), a exemplo da quitosana (QUI) (ALI; NOH; MUSTAFA, 2015), óleos essenciais (OEs) e seus constituintes (SHAO et al., 2015; SUN et al., 2014), glucosinolatos (MARI et al., 2002), própolis (VARGAS-SÁNCHEZ et al., 2014) e extratos vegetais (MICELI et al., 2014).

A QUI é comumente obtida a partir da carapaça de crustáceos, de onde a quitina é extraída e submetida a vários processos até se transformar na molécula de QUI. A QUI é um composto biodegradável que, além da reconhecida ação antimicrobiana, tem apresentado propriedades de formação de gel, o que possibilita a sua aplicação como envoltório de superfícies de frutos e vegetais, bem como propriedades elicitoras de mecanismos de defesa naturais de plantas (e frutos), retardando, assim, a sua senescência (CÉ, 2009).

Os OEs são compostos aromáticos extraídos de diversas plantas, apresentando constituintes reconhecidos por possuir propriedades antimicrobianas e baixa toxicidade. Atualmente, os OEs estão sendo estudados, devido a sua efetividade na inibição de fungos patogênicos pós-colheita associados a perdas de frutos e vegetais. O óleo essencial obtido a partir do *Cymbopogon citratus* Dc. Ex Nees (capim santo - OECC) tem apresentado resultados positivos na inibição de bactérias e fungos que acometem frutos e vegetais, principalmente devido ao constituinte citral (SUHR; NIELSEN, 2003; WILKINSON; CAVANAGH, 2005).

Revestimentos de QUI enriquecidos com OEs de orégano (SANTOS et al., 2012), cravo (SHAO et al., 2015), limão (PERDONES et al., 2012), bergamota, tomilho, árvore do chá (CHAFER et al., 2012 .), canela (HERNÁNDEZ et al., 2011; XING et al., 2011) e anis estrelado (WANG et al., 2011) têm se mostrado eficazes na inibição do crescimento de fungos patogênicos e bactérias em diferentes frutas e legumes. No entanto, apenas um estudo anterior relatou a eficácia de um revestimento com QUI e OECC para controle da antracnose causada por *Colletotrichum capsici* em pimentões (ALI et al., 2015). Nenhum estudo foi realizado até o momento para avaliar a eficácia da aplicação combinada de CHI e OECC como tratamento pós-colheita no controle de *R. stolonifer* em tomate fresco.

Frente ao reconhecido potencial biológico dos compostos antimicrobianos naturais, este estudo avaliou a eficácia da aplicação combinada de QUI e OECC como tratamento pós-colheita de *R. stolonifer* em frutos de tomate. Para isso, foram realizados ensaios de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de QUI e OECC contra *R. stolonifer*. Para avaliar os efeitos inibidores destas substâncias, combinadas ou não, utilizou-se concentrações subinibitórias em meio laboratorial e como um revestimento sobre tomates a fim de verificar a ação dos tratamentos no efeito preventivo e curativo contra *R. stolonifer*. Observou-se também a influência dos revestimentos nos parâmetros de qualidade físico-química dos frutos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FRUTICULTURA NO BRASIL

A quantidade de frutas frescas produzidas no Brasil por ano representa aproximadamente 42 milhões de toneladas (KIST, 2012). A grande produção de frutas no Brasil tem como razão a atenção dada pelos produtores para as diversidades de espécies, o crescimento populacional e a crescente participação no mercado internacional, que representa o principal centro para a compra de muitas das frutas produzidas no país. Do total de frutas produzidas, 47% são consumidas *in natura* e 53% na forma de produtos processados. No entanto, desse total de frutas frescas produzidas, apenas 2% são exportados, enquanto 29% do total de frutas processadas são exportadas (BRAZILIAN FRUIT, 2008; MOURA; OLIVEIRA, 2013).

A região Nordeste apresenta condições ideais de cultivo, o que contribui para o desenvolvimento socioeconômico, assim como para o desenvolvimento de agroindústrias. Esse desenvolvimento possibilita a geração de empregos e renda para a população local, como também incremento na economia brasileira, em razão da considerável exportação de algumas espécies de frutas produzidas (LESSA et al., 2009). Porém, os índices de perdas pós-colheita de frutas no Brasil são elevados, em função de uma série de fatores, tais como as distâncias existentes entre as regiões produtoras e os mercados distribuidores, e os custos adicionais da implantação de uma infraestrutura de pós-colheita adequada. Na cadeia de frutos para exportação, a qualidade alcançada para o consumidor final é resultado da qualidade do gerenciamento de cada elo da cadeia, incluindo a produção, exportação, importação, mercado de atacadistas e varejistas (CARVALHO, 2003; NEVES, 2009).

Durante o período denominado pós-colheita, os produtos que não são manipulados adequadamente e/ou tratados com inibidores microbianos eficientes, podem perder a qualidade para o consumo. O declínio da resistência natural das frutas facilita a ocorrência de infecções quiescentes e aumenta a incidência de doenças nos produtos (TERRY; JOYCE, 2004). Dessa forma, o controle das doenças no período pós-colheita é uma atividade imprescindível para manter a qualidade e aumentar a vida de prateleira dos frutos, especialmente quando o período entre a colheita e o consumo é amplo (LINS et al., 2011). Diante disso, observa-se que a possibilidade de conservação de frutos está diretamente relacionada não só ao manejo adequado, mas também ao seu ponto de colheita e aos

tratamentos fitossanitários e de campo, os quais podem interferir no seu processo de deterioração (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

A colonização de frutas por fungos pode determinar perdas quantitativas, principalmente quando ocorre o rápido ataque dos patógenos aos tecidos sadios; ou perdas qualitativas, que são decorrentes de alterações como descolorações, manchas e produção de odores desagradáveis (BENATO, 2002). As doenças pós-colheita são de extrema importância na segurança alimentar, em termos de segurança sanitária do consumidor, visto que alguns fungos contaminantes de frutas podem produzir metabólitos tóxicos durante a colonização do substrato e ao longo da vida de prateleira dos produtos colhidos (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Segundo Gutierrez; Barry-Ryan; Bourke (2005), as doenças dos frutos e vegetais são os principais danos pós-colheita, uma vez que impedem o consumo e a comercialização do produto. Além disso, um fruto deteriorado serve como fonte de contaminação para outros frutos, ou seja, provocam danos indiretos nas plantações pela introdução rápida em novas áreas onde anteriormente não existia a doença (NÓBREGA, 2004). Isto ocorre, em grande parte, devido à ação de fungos que produzem esporos ou fragmentos de hifas, os quais são espalhados pelo vento ou por respingos de água de chuva e de irrigação. Outras estruturas dos fungos permitem a disseminação e sobrevivência de diversas espécies na ausência da planta hospedeira e, desta forma, esses patógenos podem sobreviver de uma estação para outra, associados a plantas (vivas ou mortas), ao solo (em restos de lavoura em decomposição), a sementes ou a insetos. (LOPES; ÁVILA, 2005).

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) é uma das frutas mais populares do mundo, sendo consumido em grandes quantidades. As espécies silvestres do gênero *Lycopersicon* se distribuem principalmente ao longo de uma faixa que abrange desde a cordilheira andina até a costa oeste da América do Sul, desde o sul do Equador até o norte do Chile. Esta região, considerada como o centro de origem do gênero, constitui o ponto de partida da história do tomate. Nesta região crescem espontaneamente as diversas espécies do gênero e, também, se apresenta a maior variação de *L. esculentum* (NUEZ et al., 1996). O tomate, como um alimento fresco ou processado, possui alto valor nutricional, devido a sua diversidade em micronutrientes como carotenóides, compostos fenólicos e vitaminas C e E. Estudos epidemiológicos recentes sugerem que o consumo regular de tomate pode desempenhar um papel importante na prevenção do câncer e problemas cardiovasculares; assim, muita atenção tem sido dada aos fitoquímicos com atividades antioxidantes presentes em tomates (GUILLERRO; REBOLLOSO-FUENTES, 2009; FRIEDMAN, 2002).

Segundo dados de 2012, o tomate para consumo *in natura* é a segunda principal hortaliça produzida no mundo (FAO, 2014). Em praticamente todas as regiões do Brasil, esse fruto é cultivado sob diversos sistemas de manejo e em diferentes épocas do ano, sendo que sua produção em 2010 atingiu 145,6 milhões de toneladas (IBGE, 2011). Por causa de seu enorme potencial de produção, pode ser cultivada em grande variedade de climas e solos (ALCÁZAR; NUEZ, 2001; NUEZ, 2001).

Globalmente, a produção anual de tomates é de aproximadamente 160 milhões de toneladas, sendo 21% perdido devido a doenças biológicas, principalmente de origem fúngica, o que ocasiona grande perda econômica para os produtores e comerciantes (FAO, 2012). O tomate apresenta vida útil curta, de modo que sua produção pode ser afetada pelo cultivo e técnicas de colheita inadequadas e por vários fatores ambientais, tais como temperatura e umidade (FAO, 1997). Os principais fungos que afetam os tomates incluem *Fusarium oxysporium*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* (ONUEGBU, 2002; SOYLO; KURT; SOYLO 2010).

Devido a isso, o uso de agrotóxicos para controle de doenças no tomate ainda é muito elevado, porém, frutos de tomate produzidos convencionalmente retêm alto teor dos pesticidas aplicados durante o cultivo, muitos desses inclusive proibidos (ANVISA, 2013). A aplicação indiscriminada de agrotóxicos na cultura do tomate tem sido reconhecida como causadora de potencial prejuízo para a saúde dos agricultores e consumidores (PREZA; AUGUSTO, 2012).

2.2 FUNGOS PATÓGENOS PÓS-COLHEITA

As doenças ocasionadas por fungos são àquelas que ocorrem com maior frequência durante a fase pós-colheita dos vegetais (CHITARRA; CHITARRA, 2005), sendo responsáveis por 80 a 90% do total de perdas causadas por fitopatógenos (DANTAS et al., 2003). Aproximadamente cem mil espécies fúngicas são reconhecidas, dentre essas, menos de 10% são fitopatógenos e em torno de cem espécies são responsáveis pela maioria das doenças pós-colheita (TRIPATHI; DUBEY; PANDEY, 2004; NGUEFACK et al., 2004). Destacam-se como fungos patógenos pós-colheita, *Penicillium digitatum*, *P. expansum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus flavus* e *A. niger* (DAFERERA et al., 2003; TZORTZAKIS; EKONOMAKIS, 2007). O ataque destes micro-organismos aos vegetais e frutas ocasiona a ocorrência de doenças superficiais, destruição dos tecidos, levando a perda da qualidade sensorial do fruto, com consequente diminuição da vida de prateleira, tornando-os menos atrativos ou não comercializáveis (MOSS, 2002).

Os fungos apresentam grande versatilidade para crescerem em substratos e em condições que outros micro-organismos não são capazes de se reproduzir, tais como: crescimento em condições de atividade de água (a_w) reduzida; pH reduzido ($< 4,00$); crescimento em uma ampla faixa de temperatura ($< 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$); utilização de uma grande versatilidade de substratos, como fontes de carbono, nitrogênio e energia; capacidade de esporulação e disseminação em diferentes condições (TANIWAKI; SILVA, 2001). Um fator agravante que contribui para o desenvolvimento desses micro-organismos é a característica de, na ausência de um ambiente favorável, oxidar glicose formando água para criar o ambiente propício ao seu desenvolvimento. Isso significa que, mesmo com baixas condições de umidade, pode haver crescimento e desenvolvimento de fungos (JONES, 2005).

Mesmo na ausência de sinais claros de infestação, a exemplo da visualização de esporos, pode haver infestação imperceptível (LUBULWA; DAVIS, 1994), e, mesmo sob processos onde esses esporos são destruídos, as toxinas que alguns fungos podem produzir, permanecem, uma vez que são bastante resistentes aos tratamentos térmicos e químicos. Tais toxinas são denominadas micotoxinas, as quais em frutas colonizadas por fungos têm despertado preocupações, por serem tóxicas para animais e causarem mutagênese e carcinogênese em células humanas (DRUSCH; AGAB, 2003; YIANNIKOURIS; JOUANY, 2002). Outros fatores ambientais, tais como estresse oxidativo, injúrias causadas por insetos e as condições do plantio também podem influenciar na formação de micotoxinas nos produtos agrícolas (BAYMAN; BAKER; MAHONEY, 2002; JAYASHREE; SUBRASMANYAM, 2000).

As espécies de fungos patógenos pós-colheita, *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* em particular, estão relacionados com grandes perdas de frutas, e podem apresentar resistência a diversas condições ambientais. *B. cinerea* é o agente causal do mofo cinzento (BULIT; DUBOS, 1990), que causa perdas de importância econômica, não apenas na pré-colheita, mas também durante o transporte e armazenamento. Alguns pesquisadores relatam que, por mais eficiente que seja o tratamento fitossanitário efetuado no campo, não é suficiente para dispensá-lo na pós-colheita (LICHTER et al., 2002). Geralmente as características deixadas no fruto por esse fungo são lesões e presença de um crescimento cottonoso acinzentado (conídios e conidióforos), descoloração dos tecidos e aspecto úmido e necrótico das lesões. Os principais frutos acometidos por esse fungo são: uva, goiaba, maçã, manga e kiwi. Sua germinação é favorecida por temperaturas de 22 a 25°C e esse patógeno pode sobreviver no solo associado à matéria orgânica. *B. cinerea* coloniza primeiramente

tecidos mortos, senescentes ou enfraquecidos para que, após o estabelecimento na lesão, ele possa iniciar a colonização em tecidos sadios (TÖFOLI et al., 2011).

P. expansum apresenta-se como o principal agente causal do mofo azul (BAERT et al., 2008), encontrando-se difundido de forma ubíqua. Seus esporos podem permanecer viáveis de uma safra para outra, em sacolas de colheita, caixas de madeira e em câmaras de armazenamento (SANHUEZA, 2004; CANAVER; PIERO, 2011). Além da infecção de frutas, esse fungo é também responsável pela produção de patulina (COELHO et al., 2011; LIMA et al., 2011; PITT, 1997), uma micotoxina que apresenta genotoxicidade em células de mamíferos (MOSS; LONGO, 2002). *P. expansum* é o fungo psicotrófico toxigênico de maior incidência em maçãs, considerado um parasita facultativo se instalando em frutas danificadas mecanicamente ou por pragas, causando podridão. Seu crescimento se dá em aw entre 0,83 a 0,99 e tem a capacidade de tolerar até 80% de sacarose (p/v) no meio de crescimento, causando podridão de coloração azul na parte externa da maçã e bege ou marrom-clara no tecido, deixando o fruto aguado e mole (PITTET, 2001; HEFNAWY; ABOU-ZEID, 2003).

A micotoxina produzida por *P. expansum*, a patulina, pode ser detectada em frutas visivelmente sadias (JACKSON et al., 2003), sendo normalmente encontrada em altas concentrações na parte da fruta onde há presença de esporos (93 a 95% de toda toxina), difundindo-se para outras partes sadias do fruto devido a sua hidrossolubilidade, até 4 cm além da lesão (LAIDOU; THANASSOULOPOULOS; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2001). Embora *P. expansum* prefira aw em torno de 0,95 e temperatura ideal na faixa de 20 a 25°C para o crescimento e produção de toxina (NORTHOLT; VAN EGMOND.; PAULSCH, 1978; ROLAND; BEUCHAT, 1984), o fungo é capaz de produzir patulina em temperatura de refrigeração comumente empregadas na armazenagem de frutas (ROSS; HIROOKA, 1996). Pesquisas apontam que maçãs orgânicas apresentam maiores níveis de patulina que maçãs convencionais, sendo que essa maior contaminação se deve ao não tratamento com fungicidas, o que provavelmente resulta em maior incidência de fungos toxigênicos e, consequentemente, de patulina nessas frutas (PIEMONTESE; SOLFRIZZO; VISCONTI, 2005).

Aspergillus spp. têm sido referidos como sendo as espécies fúngicas mais comuns que infectam frutas (AHMED et al., 1997). Sob condições de elevada umidade e temperatura moderada, estes fungos podem ter potencial para produzir micotoxinas (SHENASI et al., 2002). Entre estas micotoxinas, as aflatoxinas produzidas por linhagens de *A. flavus* toxigênicos e *A. parasiticus* têm sido relatados por sua toxicidade, sendo reconhecidos como

compostos hepatotóxicos, teratogênicos, mutagênicos e imunossupressores para os seres humanos e outros animais (ARRUS et al., 2005).

C. gloeosporioides é o fungo causador da antracnose, doença muito comum em frutas como mamão e manga (DANTAS et al., 2003; BONETT et al., 2010). A doença se manifesta principalmente na fase de amadurecimento do fruto, durante o transporte, armazenamento e comercialização. Os sintomas dessa doença se caracterizam por lesões deprimidas medindo até 5 cm de diâmetro, em torno das quais se forma um tecido aquoso. No centro deste formam-se pontuações alaranjadas que correspondem às massas de conídios produzidos pelo fungo (BONETT et al., 2010). A infecção pode iniciar ainda na floração, permanecendo latente, ou seja, sem o aparecimento dos sintomas, até a colheita, por ocasião do amadurecimento do fruto. Esta e outras peculiaridades no ciclo das relações patógeno-hospedeiro tornam a antracnose uma doença de difícil controle (AGROFIT, 2012).

O fungo *A. alternata* causa uma doença em tomates frescos chamada podridão de *Alternaria*, que é uma das principais doenças de pós-colheita, especialmente em ambientes quentes e úmidos. A elevada umidade é a condição externa que mais promove o crescimento da maioria dos fungos patogênicos (ANTUNES; CAVACO, 2010).

A espécie do fungo patógeno pós-colheita *R. stolonifer* também está relacionado com grandes perdas de frutas e pode apresentar resistência a diversas condições ambientais. *R. stolonifer* o agente causal da podridão de Rhizopus ou podridão mole em várias frutas e legumes (STEVENS et al., 2004, ZHANG, WANG ZHENG, DONG, 2007), sendo o fungo mais predominante de frutos de tomate, provocando a podridão mole no fruto. Coloniza os frutos principalmente durante a colheita, manuseio e transporte, podendo espalhar seus esporos (Figura 1) para as frutas adjacentes (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2008; CASTRO-ROSAS et al., 2006; BADAWY; RABEA 2009). Pode crescer e se desenvolver a temperaturas de 10°C a 33°C, com temperatura ótima de 25°C e umidades relativas variáveis, porém são inibidos em temperaturas menores que 5°C (PONTÓN, 2002).

R. stolonifer é um fungo saprófita, que se desenvolve em pedaços de fruta ou material orgânico, seu micélio aéreo pode se reproduzir sexuada ou assexuadamente. O resultado da reprodução sexuada é a formação de uma zigospora, que tem paredes espessas que conferem resistência para que o fungo se mantenha latente em solo por vários meses, suportando condições extremas de falta de água e altas temperaturas, até que encontre condições ótimas para seu crescimento e desenvolvimento (ADASKAVEG et al., 2002; RIVERA, 1999).

Após a colheita, esse fungo infecta frutos maduros; enquanto no campo, os frutos podem ser infectados quando apresentam lesões graves em sua epiderme (FORSTER,

DRIEVER, THOMPSON, ADASKAVEG, 2007). *R. stolonifer* aproveita as feridas, contusões ou aberturas naturais do fruto para infectar tecidos vegetais. Em seguida as hifas secretam enzimas pectinolíticas que degradam as substâncias de pectina na lamela média de células, resultando em perda de coesão entre as células, as quais, sob tensão pode ser movidas, caracterizando a chamada "podridão mole" (AGRIOS, 2001).

Para o controle de fungos em tomates, o uso de agrotóxicos tem se tornado cada vez maior. O tomate produzido em escala comercial retém alto teor dos pesticidas aplicados durante o cultivo, sendo muitos desses proibidos pela legislação vigente (ANVISA, 2012). A aplicação indiscriminada de agrotóxicos na cultura do tomate acarreta prejuízo para a saúde dos agricultores e consumidores (PREZA; AUGUSTO, 2012). Nesse contexto, o uso de antimicrobianos naturais em tomates torna-se uma alternativa mais saudável para produtores e consumidores (SANTOS et al., 2012).

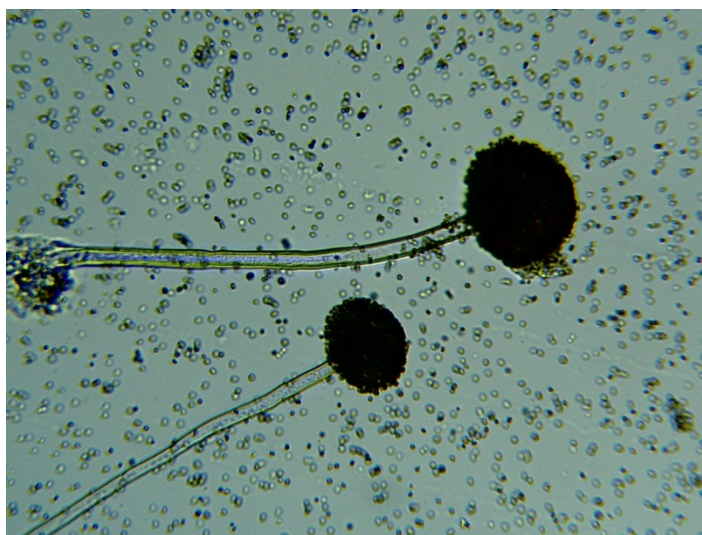


Figura 1- Esporangióforo de *R. stolonifer* visto por microscopia óptica.

Disponível em: <<http://worldundermicroscope.wordpress.com/2013/01/17/rhizopus-bread-mold-under-microscope/>>

2.3 USO DE AGROTÓXICOS

O crescimento da demanda por alimentos que acompanhou a explosão demográfica resultou, em um primeiro momento, na intensificação da cultura em terras mais férteis e, em um segundo momento, na expansão dessas fronteiras agrícolas para áreas menos produtivas. Desse uso intensivo e impróprio do solo, aliado à adoção de métodos e técnicas inadequadas

de manejo e conservação da terra, decorreu uma forte degradação nos ecossistemas, que favoreceu processos erosivos, empobrecendo o solo e reduzindo sua produtividade. O resultado desse conjunto de aspectos negativos foi um aumento da incidência e da severidade das pragas e doenças. Devido às necessidades do solo, o uso de agrotóxicos tomou proporções enormes, levando o Brasil a lista de maiores usuários de agrotóxicos do mundo (VEIGA, 2007).

Para o combate às doenças de origem microbiana, o uso de produtos químicos é a tecnologia mais empregada até o momento, sendo o surgimento de estirpes de fungos fitopatogênicos resistentes, um dos sérios problemas que o controle de doenças pelo emprego de fungicidas enfrenta (GHINI; KIMATI, 2000). Assim como outros organismos vivos, quando ameaçados, os fungos podem desenvolver mecanismos que lhes confirmam resistência a produtos tóxicos para que se perpetue a sobrevivência da espécie (PARREIRA et al., 2009). Em consequência da grande maleabilidade genética, podem tornar-se resistentes a esses agentes de ação específica (SILVA; COELHO, 2003).

Nos últimos 10 anos, a população brasileira vem se deparando com uma situação paradoxal. Por um lado, têm sido apresentados, por órgãos governamentais competentes, os resultados das safras agrícolas que alcançam patamares produtivos cada vez mais elevados com a inclusão do uso de agrotóxicos entre as práticas agrícolas. O equilíbrio entre o custo e o benefício da utilização de agrotóxicos vem sendo discutido há vários anos, e sua utilização no controle de vetores causadores das mais variadas doenças aos seres humanos é considerada de extrema utilidade pública. (AZEVEDO, 2010).

A relação entre agricultura e saúde pública sempre foi muito estreita, seja na função de supridora de alimentos, seja pelos riscos à saúde humana e ao meio ambiente, causados pela utilização de agrotóxicos (VEIGA, 2007). Segundo Miranda (2006), há possibilidade de associação entre exposição a agrotóxicos e aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis, como cânceres, endocrinopatias, neuropatias e outras. A prevalência de algumas destas afecções tem se elevado e contaminantes ambientais, como é o caso dos agrotóxicos, podem estar associados às suas gêneses muitas vezes multifatoriais. Walssmann (2007) complementa que pode haver sequelas tanto sensitivas quanto motoras, além de déficits cognitivos transitórios ou permanentes. Exposições crônicas a baixas doses também têm sido associadas à presença de sintomas neuropsíquicos, assim como cabe destaque à possível inter-relação entre exposição crônica a agrotóxicos e o desenvolvimento de doenças degenerativas do sistema nervoso central, como o mal de Parkinson.

Apesar do conhecimento sobre os danos causados pelos fungicidas, muitos produtores ainda têm dado maior importância às questões socioeconômicas, desconsiderando os problemas à saúde (MOREIRA et al., 2002). Os fatos discutidos explicam o aumento do interesse atual em compostos antimicrobianos naturais, que se dá graças às mudanças nas atitudes dos consumidores em relação ao uso de agentes conservantes sintéticos nos alimentos, tendo em vista o seu impacto negativo sobre o meio ambiente e a saúde humana (LEBERT et al., 2007). Na busca por métodos alternativos de controle de fungos fitopatogênicos, vêm sendo pesquisados produtos como os compostos polímeros biodegradáveis, a exemplo da QUI (SHAO et al., 2015), e os óleos essenciais (ALI; NOH; MUSTAFA., 2015).

2.4 QUITOSANA COMO REVESTIMENTO ANTIMICROBIANO

A QUI tem atraído interesse considerável em diversas áreas de estudo devido a atividades biológicas únicas, como biocompatibilidade (MI et al., 2002; HSU et al., 2011), biodegradabilidade (KIM et al., 2011), atividade antimicrobiana (LI et al., 2008; RABEA et al., 2009), atividade antitumoral (TOSHKOVA et al., 2010), e efeito imunológico de reforço (ZAHAROFF et al., 2007; LI et al., 2013). As propriedades singulares da QUI fazem com que esta seja bastante versátil quanto à sua aplicabilidade na área de alimentos, pois oferece amplo espectro de possibilidades de uso, como fabricação de suplementos nutricionais, emulsificantes, conservantes, fibras em biscoitos dietéticos, estabilizantes de alimentos em conservas e clarificantes de bebidas (BORDERÍAS; ALONZO; MATEO, 2005; GRACY, 2003; COSTA; SANTOS; FERREIRA, 2006; LI, CHEN; LIU, 2007). No entanto, apesar da vasta gama de possíveis aplicações da QUI em produtos alimentícios, destaca-se, seu uso como agente conservante no sentido de impossibilitar ou retardar a deterioração microbiana ou enzimática dos alimentos, considerando-se suas propriedades físico-químicas e seu reconhecido potencial antimicrobiano e antioxidante (Figura 2) (ALBUQUERQUE et al., 2009).

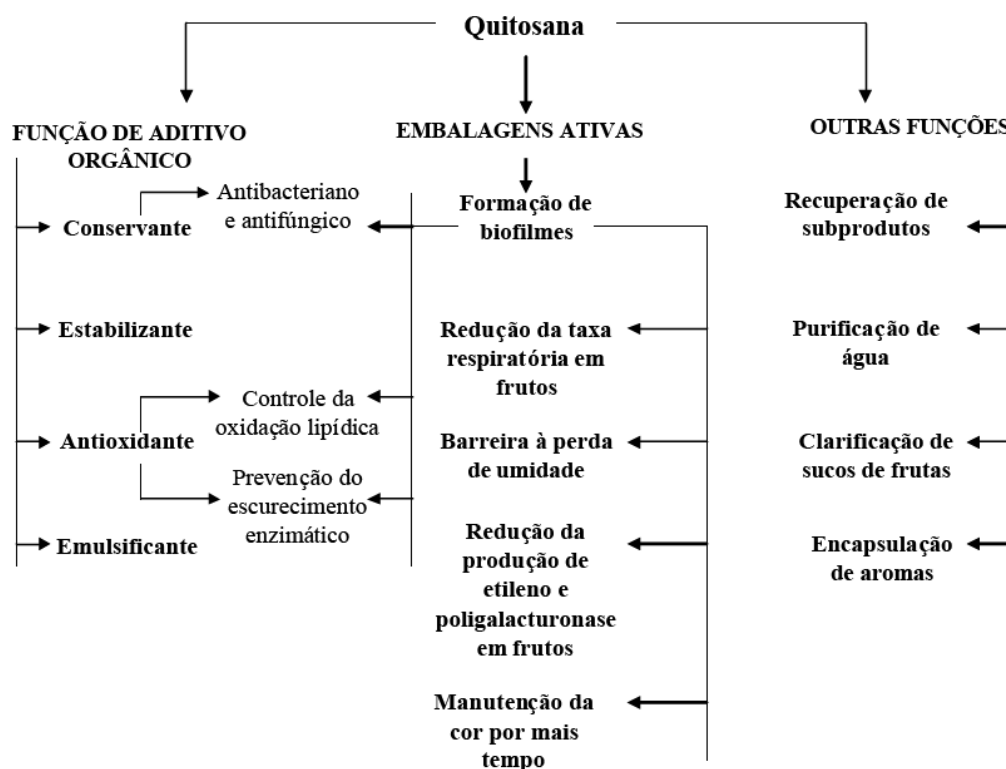


Figura 2- Esquema de aplicações da quitosana na indústria de alimentos

Fonte: Fai; Stamford; Stamford, (2008).

A QUI é um heteropolímero extremamente abundante, biodegradável de baixa toxicidade, produzida a partir da carapaça de crustáceos e alguns fungos. A toxicidade da QUI se mostra menor do que a glicose ou sacarose, visto que a dose letal de glicose em mamíferos é da ordem de 8 a 12 gramas por Kg de peso corporal (YADAV; BHISE, 2004; BORDERÍAS; ALONZO; MATEO, 2005). Estudos indicam que a QUI é benéfica e segura para o consumo humano, entretanto, como qualquer outra substância, se utilizada de forma inadequada ou em excesso pode ser nociva ao organismo (QIN; LI; XIAO, 2006). Os problemas referidos, decorrentes de doses excessivas da QUI, foram causados por desidratação gástrica e pelo impacto em decorrência do aumento do seu volume, uma vez que consiste em uma fibra natural que, em meio ácido, expande-se para formar um gel no estômago (COSTA; SANTOS; FERREIRA, 2006). A QUI é biodegradada pela enzima lisoizima, gerando compostos aminados atóxicos, não imunogênicos e não carcinogênicos, que são completamente eliminados pelo organismo (BALDRICK, 2009; KEAN; THANOU, 2010).

Apesar da sua procedência a partir de carapaça de crustáceos, a relação com alergias alimentares ainda não está clara. Ressalta-se que, uma vez que a QUI passa por um processo de purificação, o polímero obtido não é mais considerado um resíduo de camarão, pois os procedimentos para a sua obtenção retiram as proteínas, lipídeos e outros contaminantes da matéria bruta, reduzindo ou extinguindo seu potencial alergênico (MUZZARELLI, 2010).

Durante o processo de obtenção da QUI, a quitina é separada de outros componentes da carapaça por um processo químico que envolve as etapas de desmineralização, desproteinização e desacetilação (AZEVEDO et. al, 2007). Durante a reação de desacetilação, os grupamentos acetoamido ($-\text{NHCOCH}_3$) da quitina são transformados, em graus variados, em grupos amino ($-\text{NH}_2$), dando origem a QUI (Figura 3). A QUI, quando diluída em ácidos orgânicos (ácido acético, fórmico, cítrico) e inorgânicos (ácido clorídrico), resulta em uma solução viscosa capaz de formar envoltórios ou películas de revestimento (DENKBAS et al., 2002).

A desacetilação da quitina com formação de QUI também ocorre na natureza por meio da ação de enzimas específicas como a quitinase ou pela ação de micro-organismos. Essa ação de desacetilação é incompleta, formando um copolímero constituído de repetições de unidades de 2-acetamida-2-deoxi-D-glucopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glucopirranose, associadas a ligações glicosídicas β (1-4). A QUI assemelha-se quimicamente ao biopolímero original quitina, tendo no carbono 2 uma amina primária ($-\text{NH}_2$). O produto totalmente desacetilado é raramente obtido, pois pode sofrer despolimerização de sua cadeia, devido ao tempo de reação necessária para a completa desacetilação (CANELLA; GARCIA, 2001).

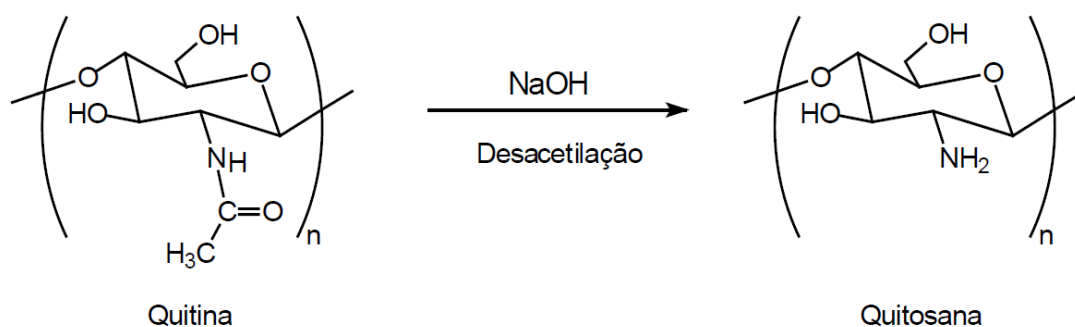


Figura 3- Desacetilação da quitina em quitosana

Com relação à sua aplicação em frutos, a QUI pode atuar no controle da transferência de umidade entre o alimento e o meio, da taxa respiratória, da temperatura e escurecimento enzimático, além de diminuir a severidade de doenças pós-colheita (DE CAPDEVILLE et al.;

2002; CIA, 2005; BAUTISTA-BANOS; LOPES; MOLINA, 2004). A síntese de etileno e sua ação poderão ser minimizadas provocando o retardamento da senescência (VILA, 2004), desta forma facilitando o transporte a longas distâncias e amplia o período de comercialização (JACOMINO; BRACKMANN; CASTRO, 2002).

Foi sugerido que a QUI pode apresentar dupla função na interação patógeno-hospedeiro, apresentando atividade antifúngica e induzindo a ativação de defesa da planta, com a produção de enzimas e compostos antioxidantes. Por exercer essa dupla função, acredita-se que a QUI interfere diretamente no desenvolvimento do patógeno e ativa várias respostas de defesa no tecido vegetal (CAMILI et al., 2007), como retardar o crescimento micelial, diminuir a germinação de conídios e causa alterações morfológicas no tubo germinativo de algumas espécies de fitopatógenos (LIU et al., 2007).

O mecanismo de ação da QUI sobre os micro-organismos não está completamente elucidado, porém diversas hipóteses têm emergido. Alguns pesquisadores correlacionam a atividade antimicrobiana da QUI à formação de complexos polieletrólíticos, uma vez que seus grupos amínicos protonados, provavelmente, ligam-se à superfície celular, carregada negativamente, interferindo na atividade celular e na permeabilidade da membrana, com consequente perda de componentes intracelulares (AVADI et al., 2004; TSAI; HWANG, 2004; YADAV; BHISE, 2004). Outra ação seria a penetração da QUI em células vivas, causando inibição de várias enzimas e da síntese de mRNA e proteínas (RABEA et al., 2003; ZHENG; ZHU, 2003). García- Rincón et al. (2010) sugerem efeito inibidor importante da QUI na atividade H^+ ATPase na membrana plasmática de *Rhizopus stolonifer*. A diminuição da atividade da H^+ ATPase pode provocar a acumulação de prótons no interior da célula, o que resultaria na inibição do transporte quimiosmótico que permite a troca de H^+/K^+ .

Em estudos com ênfase na verificação da ação antimicrobiana da QUI, Li; Yu (2000) constataram que o tratamento com o polímero (5 ou 10 mg/mL) foi efetivo na redução da podridão marrom em pêssegos, e também apresentou efeito benéfico na manutenção da firmeza dos frutos após 12 dias de armazenamento a 23°C. Bassetto (2006), em estudo com pêssegos ‘Tropic Beauty’ tratados com QUI a 1%, observou-se que os frutos que sofreram aplicação do polímero apresentaram menor severidade e incidência de doenças quando comparado com os frutos submetidos ao tratamento com sanitizantes clássicos.

O nível de inibição fúngica da QUI tem sido relatado por apresentar-se diretamente relacionado à concentração do polímero (RAHMAN et al., 2008). No entanto, Sebti et al. (2005) relataram que envoltórios de QUI se mostraram bastante eficazes no controle do desenvolvimento superficial de *Aspergillus niger in vitro*, mesmo quando presente em baixas

concentrações no envoltório. Liu; Yu (2007) relataram que a aplicação de QUI (0,5 e 1%) em tomates armazenados a 25 °C e a 2 °C foi efetiva no controle da podridão cinza e azul, causadas por *B. cinerea* e *P. expansum*, respectivamente, em tomates.

Estudo realizado por Chien; Sheu; Yang (2007) avaliou a qualidade de fatias de mangas submersas em solução de QUI (0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%), ao longo de 7 dias de armazenamentos a 6 °C. Os autores verificaram que até o sétimo dia de armazenamento, não houve crescimento de micro-organismos, como também foram mantidas a coloração e o sabor característico dos frutos, revelando-se como um aspecto importante para uma satisfatória aceitação do produto. O exposto acima, demonstra o potencial da quitosana como composto antimicrobiano natural no controle de patógenos pós-colheita em frutos.

2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

A atividade antibacteriana e antifúngica dos OEs foi há muito tempo reconhecida. Atualmente, em decorrência dos grandes prejuízos enfrentados pelo setor de alimentos, devido às perdas pós-colheita causadas por doenças de origem microbiana, a indústria de alimentos tem dado atenção à aplicação desses compostos como agentes antimicrobianos (PLOOY; REGNIER; COMBRINCK, 2009).

A denominação óleo essencial (OE) define um grupo de substâncias naturais de variável poder aromatizante e composição mais ou menos complexa que faz parte do organismo de diversas espécies vegetais, das quais é extraído segundo processamento específico. De modo geral, são misturas de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas (DE LA ROSA; ALVAREZ-PARRILLA; GONZALEZ-AGUILAR, 2010; BAKALI et al., 2008). Dependendo da família vegetal da qual é extraído, os OEs podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pelos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Laureaceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae), podendo ser estocados em diversos órgãos vegetais, tais como flores, folhas, cascas, madeira, raízes, rizomas, frutos e sementes (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Todo metabolismo vegetal é produzido por duas rotas metabólicas, a primária e a secundária. A partir do metabolismo da glicose são formados praticamente todos os metabólitos primários e secundários, sendo o metabolismo primário responsável pela formação de macromoléculas (proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos). No metabolismo secundário são produzidos muitos dos compostos que garantem a proteção da

planta, incluindo os OEs (CSEKE et al., 2006). As rotas dos metabólitos secundários são ativadas durante alguns estágios de maturação particulares de crescimento e desenvolvimento da planta, ou ainda em períodos de estresse causados por limitações de recursos e ataque microbiano (SOUZA, 2008).

Os OEs são constituídos, principalmente, por fenilpropanoides e terpenoides. Essas classes de substâncias são frequentemente alvos de interesse de pesquisadores que reconhecem neles uma fonte promissora de princípios ativos diretos ou precursores na síntese de outros compostos de maior importância e valor agregado, como o safrol, eugenol, citral e citronelal (DE LA ROSA; ALVAREZ-PARRILLA; GONZALEZ-AGUILAR, 2010).

Os compostos ativos dos OEs apresentam baixo risco para a saúde dos consumidores, quando considerado a dose possível de uso em alimentos, o que inclui o carvacrol, carvona, cinamaldeído, citral, eugenol, mentol, timol, p-cimeno e limoneno (LAMBERT et al., 2001). Esses compostos são hidrofóbicos e acredita-se que têm a membrana celular microbiana como principal sítio de ação, onde se acumulam na bicamada lipídica resultando em desarranjo na sua função e estrutura. Ainda, esses compostos podem penetrar na membrana celular bacteriana, onde provocam lise e liberação de ATP intracelular, e outros constituintes intracelulares vitais, bem como danos em seus sistemas enzimáticos (TURINA et al., 2006).

Os OEs têm apresentado resultados satisfatórios na inibição de uma variedade de fungos fitopatogênicos (TZORTZAKKIS; ECONOMAKIS, 2007). Além disso, essas substâncias têm atraído interesse científico pelo fato de se caracterizarem como produtos naturais reconhecidos como GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguros), possuírem amplo espectro de atividade antimicrobiana e apresentarem eficácia no controle de micro-organismos patogênicos e deteriorantes de importância em vegetais (BURT, 2004; ALOUI et al., 2014; SHAO et al., 2015).

Pesquisadores destacaram propriedades antibacterianas e antifúngicas no OE do *C. citratus* (vulgarmente conhecido como capim-santo) (MISHRA; DUBEY, 1995; ALI; NOH; MUSTAFA, 2015), sendo também verificadas propriedades pesticida, larvicida e repelente de insetos (SOUZA; ARAÚJO; NASCIMENTO, 2007). O capim santo pertence à família Poaceae, tem origem no Sudoeste Asiático e é internacionalmente conhecida pelo nome de “lemongrass”. Possui hábito herbáceo, apresenta longas folhas aromáticas, estreitas, agudas e ásperas com nervura central proeminente. Cresce em touceiras de mais de 1 m, sendo as folhas ricas em óleos essenciais (MARTINS et al., 2004). É uma planta aromática cultivada para produção comercial de OE, o qual geralmente apresenta como constituintes majoritários os monoterpenos citral (mistura isomérica de neral e geranial) e o mirceno (PRINS et al.,

2008). Apresenta resistência às variações do solo e clima (AKISUE et al., 1996 apud SANTOS et al., 2009), e suas condições climáticas apropriadas para o desenvolvimento ideal são calor e clima úmido, com plena exposição solar e chuvas uniformemente distribuídas (ORTIZ et al., 2002).

No Brasil, as folhas do *C. citratus* são usadas popularmente na preparação de chás, aos quais são relacionados efeitos sedativo, diurético, antipirético, antirreumático e anti-inflamatório (Figura 4) (BLANCO et al., 2009). O OECC apresenta uma elevada quantidade de aldeídos citral e/ou citronelal, que são reconhecidos por possuírem propriedades antibacterianas e antifúngicas (WILKINSON; CAVANAGH, 2005; SUHR; NIELSEN, 2003). Ainda, esses compostos apresentaram alta estabilidade térmica (BANKOLE; JODA; ASHIDI, 2005).



Figura 4- Planta produtora do óleo de *C. citratus*

Irkin; Korukluoglu (2008), em estudo para avaliação da inibição do crescimento de fungos filamentosos e leveduras pelo OECC, observaram que houve uma forte inibição do crescimento de *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, e *Penicillium roquefortii* e leveduras *Candida albicans*, *Candida oleophila*, *Hansenula anomala*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, e *Metschnikowia fructicola*, quando o OE foi ensaiado em concentrações variando de 0,5 $\mu\text{L/mL}$ a 3,0 $\mu\text{L/mL}$. Outro estudo avaliando o efeito do mesmo OE sobre o crescimento micelial de fungos, observaram a redução de 64% do desenvolvimento de *Fusarium moniliforme* na concentração de 200 ppm, *Aspergillus flavus* em 48% e *Aspergillus fumigatus*

em 77% na concentração de 500 ppm, além de inibição total em 300 ppm para *F.moniliforme* e 1200 ppm para *A. flavus* e *A. fumigatus* (NGUEFACK et al., 2004).

Pesquisa feita por Singh et al. (2010) com relação ao efeito dos OE de *Citrus reticulata* e OECC, sobre o crescimento de *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxina em Aspargos, mostrou que, em concentrações de 750 ppm de ambos os OEs ensaiados, houve inibição de 100% do crescimento de *A. flavus*, além de uma significativa redução da microflora autóctone do produto. Quanto à inibição da produção de aflatoxinas, houve inibição da produção da aflatoxina B1 na concentração de 750 ppm para OE de *C. reticulata* e 500 ppm para o OE de *C. citratus*. O OE de *C. citratus* mostrou-se eficaz ao inibir totalmente a aflatoxina B1.

Quanto à toxicidade do OECC, Fandohan et al. (2008), em um estudo experimental feito em ratos, mostraram que não houve anormalidade no comportamento geral do primeiro ao décimo quarto dia de experimento, quando os animais receberam dosagem de 5-1500 mg / kg de peso corporal do OECC. Com essas dosagens não foi verificada nenhuma alteração morfológica ao ser realizado o exame histológico. Anormalidades ocorreram quando os ratos receberam doses de 2000 e 3000 mg / kg de peso corporal. Nessas dosagens, os sintomas apresentados pelos animais foram torpor, sangramento do nariz e da pálpebra. A mortalidade dos animais só ocorreu, quando o nível da dose foi aumentada para > 3000 mg / kg de peso corporal, sendo definida a dose letal média (DL50) como 3250 mg / kg de peso corporal. O autor concluiu que, em doses normais recomendadas, não há prejuízo algum para os seres humanos, porém, como todas as substâncias, quando administrado doses muito elevadas, pode causar danos a órgãos vitais.

Ressalta-se que, ao se decidir pela aplicação de OE em alimentos, é fundamental se considerar o impacto sobre as características sensoriais dos produtos durante o armazenamento, uma vez que a concentração do OE necessária para o estabelecimento da eficácia antimicrobiana pode resultar em características organolépticas desagradáveis ao consumo (HSIEH; MAU; HUANG, 2001; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009). Considerando estes aspectos, o uso dos OE na inibição do crescimento microbiano em alimentos tem sido objeto de investigação e aperfeiçoamento, visto que estes compostos também podem, quando aplicados em doses excessivas, exceder os limites da aceitação pelo consumidor, com implicações tanto no sabor como no odor dos produtos (SOUZA et al., 2007).

Como alternativa para otimizar o uso de antimicrobianos naturais, a aplicação combinada de QUI com outros compostos ou substâncias, vêm sendo bastante pesquisada.

Na tabela 1, abaixo, são apresentados estudos recentes sobre a aplicação combinada de QUI com OEs como antimicrobianos na inibição do crescimento de fungos patógenos, tanto ‘*in vitro*’ como em matrizes alimentares. Os estudos apresentados mostram a efetividade da aplicação combinada de QUI com OEs na inibição de diversos fungos patógenos quando expostos a baixas concentrações dos compostos em diferentes matrizes alimentares.

Tabela 1- Estudos recentes sobre a aplicação combinada de quitosana (QUI) e óleos essenciais (OEs) no controle de fungos patógenos e microbiota autóctone em alimentos ou em meio laboratorial.

MATRIZ	MICRO-ORGANISMOS	QUI + OE	CONCENTRAÇÕES	REFERÊNCIAS
‘IN VITRO’	<i>Penicillium italicum</i>	Árvore chá	QUI 1% OE 0%, 0.5%, 1% e 2%	Sanchez-Gonzalez et al. (2010)
		Bergamota	QUI 1% OE 0.5%, 1%, 2% e 3%	
Laranja	<i>Penicillium italicum</i>	Bergamota; tomilho; árvore chá	QUI 1% OE 2%	Cháfer et al. (2012)
Blueberries frescos	<i>Penicillium digitatum</i>	Carvacrol; Cinamaldeido; trans-cinamaldeido; benzaldeido; eugenol; eucalyptol	QUI 1% OE 0,5%	Sun et al. (2014)
Tâmaras	<i>Aspergillus flavus</i>	Bergamota; laranja amarga; laranja doce; tangerina e limão	QUI 1% OE 2%	Aloui et al. (2014)
Tomates	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Canela; cravo e tomilho	QUI 1% OE 0,1% e 0,3%	Hernández et al. (2011)
Tangerina	<i>Penicillium digitatum</i>	Cravo	QUI 0,25% OE 0,6% Utilizou-se no experimento ¼ e 1/8 dos valores acima para OE.	Shao et al. (2015)
Pimentão	<i>Colletotrichum capsici</i>	Capim-limão	QUI 0,5% e 1% OE 0,5% e 1%	Ali; Noh; Mustafa (2015)
Fruta jujube	<i>Penicillium citrinum</i>	Canela	QUI 0.5%, 0.75%, e 1.0% OE 0.5%, 0.75%, 1.0%, e 2.0%	Xing et al. (2011)

Uvas	<i>Rhizopus stolonifer</i> e <i>Aspergillus niger</i>	Oregano	QUI 1% OE 0,005% Utilizou-se nesse experimento ½ e ¼ dos valores acima para o OE e ½ para a QUI.	Santos et al. (2012)
Morango	<i>Microbiota</i> <i>autóctone</i>	Limão	QUI 1% OE 3%	Perdones et al. (2012)
Cogumelo "shiitake"	Microbiota autóctone	Tomilho	QUI 2% OE 1,5%	Jiang; Feng, Zheng (2012)
Pimentão	Microbiota autóctone	Canela	QUI 1% OE 0,25%	Xing et al. (2011)

A grande variação na concentração dos compostos se deve a matriz alimentar utilizada e aos patógenos-alvo ensaiados. Os estudos citados sugerem efetividade na aplicação combinada de QUI com OEs, com concentrações de QUI variando de 0,25% a 1%, enquanto para os OEs variaram de 0,005% a 3%.

Shao et al. (2015) demonstraram que QUI combinada com OE de cravo exibiram propriedades antifúngicas mais elevadas sobre *P. digitatum* em tangerina do que os tratamentos individuais de QUI e OE. Estudo semelhante utilizando-se laranjas demonstrou maior efeito antifúngico de revestimentos contendo QUI e OE de árvore do chá contra *P. italicum* para efeito preventivo, enquanto que para efeito curativo, os tratamentos foram menos eficazes, não mostrando nenhum efeito fungicida significativo (CHAFER et al., 2012). Santos et al. (2012) demonstram que a aplicação combinada de QUI e OE de orégano em diferentes concentrações subinibitórias podem inibir significativamente os patógenos pós-colheita *R. stolonifer* e *A. niger*, bem como a microbiota fúngica autóctone em uvas de mesa armazenados em temperatura ambiente e refrigerada.

Cháfer et al., (2012) observaram que a eficiência antifúngica *in vitro* nem sempre tem sido observado em ensaios 'in situ', provavelmente devido à alta volatilidade dos componentes do OE e as possíveis interações entre os componentes de revestimento e o tecido vegetativo. Além disso, os OEs devem ser incorporados em concentrações menores no filme para minimizar seu impacto sobre a percepção olfativa (PERDONES et al., 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

A QUI de médio peso molecular, (desacetilação grau 75-85%) foi obtida da Sigma-Aldrich Co. (St Louis, EUA). O OE de *C. citratus* DC. ex Nees (capim-santo- OECC) foi obtido através de uma empresa nacional produtora de óleos essenciais, a qual extrai o produto através de processo de arraste por vapor d'água (hidrodestilação) em escala industrial. O OE utilizado no estudo atendeu todas as especificações exigidas concernentes a seu controle de qualidade (aparência, cor, impurezas, odor, densidade – 20°C, índice de refração – 20°C) sendo tais informações fornecidas pelo fornecedor do produto através de laudo técnico.

Rhizopus stolonifer URM 3728 foi obtida na micoteca do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. Para os ensaios, culturas de fungos foram repicadas em ágar batata (BDA) (Himedia, Índia) a 28 °C por sete dias para permitir a esporulação suficiente. Os esporos dos fungos foram recolhidos numa solução salina estéril (0,85 g / 100 ml de NaCl) e a suspensão resultante foi filtrada através de uma camada tripla de gaze estéril para manter os fragmentos de hifas. Foi quantificado o número de esporos presentes na suspensão com um hemocitometro. A concentração de esporos foi ajustada com solução salina estéril para obter um inóculo de cerca de 10^6 esporos / mL (Rasooli; Abyaneh, 2004; Rasooli; Owlia, 2005).

Os tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill) foram adquiridos a partir de um distribuidor local, no estágio de maturação comercial (com a cor vermelha), e selecionado com uniformidade de tamanho, forma, aparência, e ausência de dano mecânico ou infecção fúngica visível. Antes dos ensaios, os frutos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio para desinfecção da superfície (1 mL / 100 mL, pH 7,2 ajustado com NaOH a 1 M) durante 15 min, lavadas com água destilada estéril e secos durante 2 horas em câmara de segurança.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparo da solução de QUI e OECC e revestimentos

Soluções de QUI foram obtidas por dissolução do polímero (de 16 mg / ml) em ácido acético (1 mL / 100 mL) durante 24 h à temperatura ambiente (28 ° C) com agitação (120 rpm) (SANCHEZ-GONZALES et al., 2011). As sucessivas diluições em série (1:1) foram

realizadas em caldo Sabouraud (Himedia, Índia) para se obter soluções de diferentes concentrações (16, 8, 4, 2, e 1 mg / mL). Para assegurar que a atividade anti-fúngica não foi devido ao ácido acético e sim a QUI, ajustou-se o pH (para 5,0 por adição de NaOH 1 M) de todas as soluções de QUI utilizadas nos ensaios antifúngicos. Soluções de OECC foram obtidas por dissolução da substância (80 uL / mL) em caldo de Sabouraud contendo Tween 80 [2%, v / v (Himedia, Índia)] como um agente de estabilização (SANTOS et al, 2012;.. SOUSA et al, 2013) com diluições sucessivas (1: 1) no mesmo caldo para se obter soluções de diferentes concentrações (20, 10, 5, 2,5, 1,25, e 0,06 uL / mL). Tween 80, na sua concentração mais elevada final, após diluição em caldo Sabouraud (2%, v / v) não causou inibição do crescimento de fungos. Para a aplicação combinada de QUI e OECC, QUI (8 mg / mL) foi inicialmente diluído em ácido acético (1 ml / 100 ml) com agitação constante (120 rpm) durante 6 h à temperatura ambiente. Em seguida, diferentes concentrações OECC foram adicionadas (5, 2,5, e 1,25 mL / mL), seguido por agitação adicional de 18 h à temperatura ambiente (OJAGH et al., 2010).

3.2.2 Identificação dos constituintes do OECC

A avaliação fitoquímica do OECC foi realizada no Núcleo de Caracterização e Análise da UFPB, Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA). A composição fitoquímica do OECC foi determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS), modelo QP2010 Ultra (SHIMADZU, Kioto, Japão), com detector seletivo de massa, injetor capilar Split/Splitless e controlador de fluxo e pressão automático, operando com energia de 0,70 eV. Foi usada coluna capilar OV (diâmetro interno - filme - 30 m × 0.25 mm × 0.25 mm) com as seguintes especificações: temperatura de injeção - 250 °C e 290 °C no detector, fluxo de gás (hélio) na coluna - 1,0 mL/min, velocidade linear - 36,4 cm/s, fluxo total - 302,4 mL/min, pressão de 57 kPa, temperatura inicial da coluna - 60 °C (por 2 min.) até 180 °C (por 1 min) a 4 °C/min, e 180 até 260 °C a 10 °C/ min (por 10 min). A concentração dos seus componentes foi calculada usando as áreas de pico individuais para cada uma das substâncias. Os dados gerados foram analisados utilizando o software MSD Chemstation acoplado com espectro de massa NIST/2002 (WANG; CHEN; CHANG, 2005).

3.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Os valores CIM da QUI e OECC foram determinados utilizando-se a técnica de macrodiluição em caldo. Inicialmente, 1 ml de suspensão fúngica foi inoculada em 4 mL de caldo Sabouraud (com uma concentração ajustada para 10 mL), e 5 ml de soluções contendo as diferentes concentrações de QUI ou OECC (com concentrações ajustadas para 10 mL) foram adicionados. O sistema foi incubado a 28 ° C durante 7 dias, e no final do período de incubação, a menor concentração QUI ou OECC (diluição mais elevada) que não exibiu crescimento do fungo visível foi considerado a CIM (SANTOS et al., 2012).

3.2.4 Efeito na germinação de esporos fúngicos

A suspensão de esporos (0,1 ml) de *R. stolonifer*, obtido a partir de uma cultura de 7 dias de idade, cultivadas em BDA (Himedia, Índia) a 28 ° C, foram colocados em tubos Eppendorf contendo 0,1 ml de QUI e diferentes concentrações OECC (QUI 4 mg / ml; OECC 1,25 mL / mL) isoladamente ou em combinação. Os sistemas foram incubados a 28 ° C durante 18 h. Após o período de incubação, a germinação de esporos (200 por amostra) foi observada por meio de microscopia de luz (40X). Sistemas sem QUI ou OECC foram analisados de forma semelhante. A eficácia de inibição da germinação de esporos foi avaliada por comparação do número de esporos germinados no meio suplementado com QUI e/ou OECC com que no ensaio de controle (SOUSA et al., 2013).

3.2.5 Efeito na integridade da membrana plasmática de esporos

O estudo das alterações na integridade da membrana (lesão) dos esporos fúngicos induzidas por QUI e/ou OECC foi realizada de acordo com um método previamente descrito (LIU, 2007). Para isso, aliquotas de 1 ml da suspensão de esporos foram colhidos e inoculados em frascos contendo meio Sabouraud (Himedia, Índia) suplementado com QUI (4 mg / ml) ou OECC (1,25 mL / mL) isoladamente ou em combinação, e incubou-se a 28 ° C sob agitação orbital (150 rpm) em diferentes tempos de exposição (2, 4 ou 6 h). Os sistemas sem QUI ou OECC foram ensaiados de forma semelhante. Após cada intervalo de tempo de exposição, os sistemas foram submetidos a centrifugação (14.000 xg durante 10 min), lavadas duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (pH 7,0) para remover o meio residual e coradas com iodeto de propídio (IP) (1 ug / mL) durante 5 min a 28 ° C. IP é um corante fluorescente de células-impermeabilizante que se intercala no DNA de esporos em que a integridade da membrana plasmática foi perdida. Se o IP penetrar na célula, a

integridade da membrana foi perdida e uma coloração vermelha ocorre (SANDES et al., 2014). Os esporos foram então recolhidas através de centrifugação (14.000 xg durante 10 min) e lavadas duas vezes com PBS para remover o corante residual. Finalmente, os esporos foram montadas em lâminas de microscópio e observado com um microscópio de fluorescência (Zeiss Axioskop 40 microscópio, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) equipado com um conjunto de filtros rhodamine fluoresceína indivíduo (Zeiss N° 15: excitação BP 546/12 nm, emissão. LP 590 nm). Três campos de visão de cada slide foram selecionados aleatoriamente para observações. O número de esporos no campo brilhante foi definido como o número total, e a integridade da membrana de esporos foi calculado de acordo com a percentagem de esporos que não foram coradas de acordo com a seguinte fórmula:

$$IM (\%) = N^{\circ} \text{ total de esporos} - N^{\circ} \text{ de esporos corados} / N^{\circ} \text{ total de esporos} \times 100$$

3.2.6 Efeito no crescimento micelial radial fúngico

A inibição provocada pela QUI (4 mg / ml) e OECC (1,25 mL / mL) no crescimento micelial radial de *R. stolonifer* foi determinada utilizando-se a técnica de substrato envenenado (diluição em meio sólido). Para isso, discos de 2 mm, retirados de uma cultura de *R. stolonifer* de 7 dias de idade, cultivada em batata dextrose agar (BDA) (Himedia, Índia) a 28 ° C foram colocados no centro de PDA. Para os tratamentos ajustou-se as concentrações de QUI ou OECC isoladamente ou em combinação e adicionou-se ao BDA e incubou-se a 28 °C. O crescimento micelial radial (cm) foi medido utilizando paquímetro, e a leitura foi realizada a cada 18 h durante um período de 90 h. O meio de crescimento sem QUI ou OECC foi testado de forma semelhante e foi tido como experimento controle (OLIVEIRA et al., 2014).

3.2.7 Efeito da infecção de *R. stolonifer* em tomates

A eficácia dos revestimentos compostos de QUI e OECC na inibição da infecção causada por *R. stolonifer* em frutos de tomate foi ensaiada utilizando-se dois ensaios “*in situ*” para simular um efeito preventivo ou curativo. Nos ensaios de prevenção, os frutos de tomate foram mergulhados durante 1 min nos revestimentos ensaiados (QUI 4 mg / mL + OECC 1,25 mL / mL), secou-se completamente (2 h, 28 ° C) numa câmara de segurança biológica e, em seguida foram inoculados artificialmente através de imersão em 200 ml de uma suspensão de esporos *R. stolonifer* (aprox. 10⁶ esporos / mL). Nos ensaios para efeito curativo, os frutos foram inoculados em primeiro lugar através de imersão em 200 ml de uma suspensão de

esporos de *R. stolonifer* (aprox. 10^6 esporos / mL), armazenado em uma cabine de segurança biológica (2 h, 28 ° C), e então revestidas através de imersão nas soluções contendo QUI e OECC durante 1 min. Secagem da superfície dos frutos também foi realizada durante 2 h à temperatura ambiente (28 ° C) numa câmara de biossegurança. Além disso, o experimento controle para cada efeito testada foi realizado em soluções de revestimento que foram substituídos por água destilada estéril. Os frutos foram embalados em um recipiente de polietileno com uma tampa e armazenados à temperatura ambiente (28 °C) (VALENCIA-CHAMORRO et al, 2009). Cada tratamento incluiu 12 frutas e diferentes intervalos de tempo de armazenamento (2, 4, 6 e 8 dias). O percentual de inibição e a severidade da lesão foram determinados de acordo com um método previamente descrito (HERNÁNDEZ et al., 2011). Foram quantificados os frutos de tomate com sintomas da podridão de *R. stolonifer* durante o período de armazenamento (12 dias). O índice de severidade da lesão na superfície do fruto foi determinado considerando vários graus de danos de acordo com uma escala já estabelecidos como se segue: 0 = 0%; 1 = 1-5%; 2 = 6-15%; 3 = 16-45%; 4 = 46-75%; 5 = 76-100% dos frutos danificados visualmente, e o índice de gravidade foi calculado usando a equação:

$$\text{ÍNDICE DE SEVERIDADE} = \frac{X_i(0) + X_i(1) + X_i(2) + X_i(3) + X_i(4) + X_i(5)}{N}$$

Onde X_i = número de frutos enfermos por cada grau de dano (0, 1, 2, 3, 4, 5) e N = número total de frutos por unidade experimental.

3.2.8 Análises físico-químicas

Durante os mesmos intervalos de tempo utilizados na observação da presença de infecção fúngica os frutos serão avaliados quanto aos seguintes aspectos:

Perda de Massa: Os frutos foram distribuídos em bandejas em iguais proporções (controle e QUI) para acompanhamento da diferença de peso do início do experimento até o final, obtida por meio da diferença entre as pesagens dos frutos em balança analítica em cada intervalo de tempo e o tempo zero, sendo o resultado expresso em porcentagem (IAL, 2005).

pH: Foi determinado utilizando-se um pHmetro digital (DIGIMED, modelo pH 300M, São Paulo, Brasil), provido de um eletrodo de vidro (ANALYSER, modelo 2ª13-HG, São Paulo), calibrado com solução tampão pH 7,0 e 4,0, seguindo os parâmetros descritos pelo (IAL, 2005).

Acidez titulável: Determinada por titulometria com NaOH 0,1 N na presença de fenoftaleína como indicador (IAL, 2005).

Sólidos solúveis: Determinados por meio da leitura em refratômetro de bancada com os resultados expressos em °Brix (IAL, 2005).

Vitamina C: A vitamina C foi determinada pelo método oficial titulométrico AOAC (2002).

Cor: A cor da casca foi medida em três diferentes posições equatoriais do fruto, através do Sistema CIELab ($L^*a^*b^*$); ângulo Hue (h^*_{ab}) e croma (C^*_{ab}) em colorímetro Minolta Modelo CR-300 (Osaka, Japão), de acordo a Comissão Internacional de Iluminação (CIE, 1986).

Firmeza: A determinação da firmeza foi realizada utilizando-se probe (1/8) de 3 mm de diâmetro acoplado ao texturômetro TA-XT2 Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Haslemere, Inglaterra), sendo os resultados expressos em N/mm (CHIEN et al., 2007).

3.9 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada após aprovação pelo Comitê de Ética (protocolo nº 712.884/2014), utilizando-se testes afetivos de aceitação, intenção de compra e teste de ordenação-preferência com 60 provadores não treinados. A análise foi realizada sob condições controladas de temperatura e iluminação em cabines individuais. Cada provador recebeu uma amostra dos tomates previamente higienizados, submetidas aos diferentes tratamentos, as quais foram servidas em pratos brancos descartáveis codificados com um número de três dígitos aleatórios. Foram servidas três amostras do tomate (controle; QUI + OECC; tomate inteiro para observação da aparência do fruto) simultaneamente, utilizando um método cego de sequência aleatória, imediatamente após ser retirado do armazenamento refrigerado. Os provadores foram orientados a provar biscoito e água entre as amostras para limpar o paladar. Para a aceitabilidade da aparência, cor, sabor, textura, sabor residual e avaliação global foi utilizada a escala hedônica estruturada mista de nove pontos variando de um (desgostei muito) a nove (gostei muito). A intenção de compra foi avaliada usando a escala estruturada mista de cinco pontos variando de um (certamente não compraria) a nove (certamente compraria). Para o teste de ordenação-preferência, os provadores foram

convidados a escolher a amostra mais e menos apreciada com base em sua avaliação global.

3.2.10 Análise estatística

Os dados foram processados pelo programa estatístico SPSS 22 (Statistical Package for the Social Sciences). Inicialmente foram procedidas análises descritivas (medidas de tendência central, distribuição de frequência) com o intuito de descrição das variáveis observadas. Posteriormente, foram feitos testes paramétricos (análise de variância-ANOVA) para estatística descritiva e inferencial para determinação de diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) através do teste de Tukey entre os tratamentos aplicados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram expressos em forma de artigo científico (APÊNDICE), submetido para Food Research International.

Pode-se perceber de acordo com os resultados apresentados (APÊNDICE), um efeito antifúngico satisfatório do revestimento contra *R. stolonifer*, medida através da inibição da germinação de esporos e crescimento micelial, quando utilizada a aplicação combinada do revestimento a base de QUI e OECC em concentrações subinibitórias. Os resultados expressos demonstram uma inibição quase complete do crescimento fúngico quando comparados ao experiment controle. A combinação de QUI e OECC também causou alterações graves na integridade de membrana dos esporos, mostrando mais uma vez a forte atividade antimicrobiana contra o fungo utilizado no estudo.

A aplicação de QUI e OECC como revestimento de frutos de tomate fresco infectados artificialmente inibiu significativamente a infecção por *R. stolonifer*, podendo ser observada a diminuição na severidade da lesão nos frutos revestidos ao longo do periodo de armazenamento quando comparados ao experimento controle. O revestimento testado também manteve as características de qualidade físico-químicas e sensorial dos frutos de tomate durante o armazenamento.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou fortes efeitos antifúngicos contra *R. stolonifer*, medida através da inibição da germinação de esporos e crescimento micelial, quando utilizada a aplicação combinada de QUI e OECC em concentrações subinibitórias. A combinação de QUI e OECC causou alterações graves na integridade de membrana dos esporos. A aplicação de QUI e OECC como revestimento de frutos de tomate fresco infectados artificialmente inibiu significativamente a infecção por *R. stolonifer*, podendo ser observada a diminuição na severidade da lesão nos frutos revestidos. O revestimento testado manteve as características de qualidade físico-químicas e sensorial dos frutos de tomate durante o armazenamento. Com base nestes resultados, a aplicação de revestimentos constituídos por uma combinação de QUI e OECC podem ser alternativas úteis para o controle da podridão mole causada por *R. stolonifer* em frutos de tomate fresco, porém, a eficácia antifúngica destes tratamentos depende se o revestimentos será aplicado com um efeito curativo ou preventivo.

REFERÊNCIAS

- ALI, A.; NOH, N.M.; MUSTAFA, M.A. Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. **Food packaging and shelf life**, v.3, [SN], p.56–61, 2015.
- ALOUI, H.; KHWALDIA, K.; LICCIARDELLO, F.; MAZZAGLIA, A.; MURATORE, G.; HAMDI, M.; RESTUCCIA, C. Efficacy of the combined application of chitosan and Locust Bean Gum with different citrus essential oils to control postharvest spoilage caused by *Aspergillus flavus* in dates. **International Journal of Food Microbiology**, v.170, [SN], p.21–28, 2014.
- AGRIOS, G.N. 2008. **Fitopatología**. 2ª ed. México, Limusa. 856p.
- AGROFIT - **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Agrotóxicos. Ministério da Agricultura. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/agrotóxicos>>. Acesso em: 13 jan. 2015.
- AHMED, I.A.; AHMED, A.; ROBINSON, R.K. Susceptibility of date fruits (*Phoenix dactylifera*) to aflatoxin production. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.74, n.1, p.64–68, 1997.
- ADAM, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.5, p.1739-1745, 1998.
- ADASKAVEG, J.E., FÖRSTER, H., Y SOMMER, N.F. 2002. **Principles of postharvest pathology and management of decays of edible horticultural crops**. In: A. Kader (ed) Postharvest Technology of horticultural Crops. 4 ed. University of California. Oakland, California, USA. p. 163-195.
- ALBUQUERQUE, R. B.; SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, T. C. M. Perspectiva e potencial aplicação de quitosana como inibidor de *listeria monocytogenes* em produtos cárneos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 10, n. 5, p. 260-274, 2009.
- ALCÁZAR, J.E.; NUEZ, F. **Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate**. In: NUEZ F (Coord.). El cultivo del tomate. Ediciones Mundi-Prensa, 2001. 793 p
- ANTUNES, M.D.C.; CAVACO, A.M. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v.25, n.5, p.351–366, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resultado do monitoramentode agrotóxicos em alimentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d480f50041ebb7a09db8bd3e2b7e7e4d/Relat%C3%B3rio%20PARA%202011-12%20-%2030_10_13_1.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 09 fev. 2013.

ARRUS, K.; BLANK, G.; ABRAMSON, D.; CLEAR, R.; HOLLEY, R.A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, v.41, n.5, p.513–527, 2005.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização estrutural e da Capacidade de absorção de água em envoltórios de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros**, v.13, n.4, p.223-228, 2003.

AVADI, M. R.; SADEGHI, A. M. M.; TAHZIBI, A.; BAYATI, K. H.; POULADZADEH, M.; ZOHURIAAN-MEHR, M. J.; RAFIEE-TEHRANI, M. Diethylmethyl chitosan as an antimicrobial agent: Synthesis, characterization and antibacterial effects. **European Polymer Journal**, v.40, n.7, p.1355-1361, 2004.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2, n.3, p.27-34, 2007.

AZEVEDO, M.F. Initial approach to outpatient treatment of neurotoxicological disorders. Part II – pesticides. **Revista Brasileira de Neurologia**, v.46, n.4, p.21-28, 2010.

BADAWY, M.E.I.; RABEA, E.I. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.51, n.1, p.110–117, 2009.

BAERT, K.; DEVLIEGHERE, F.; BO, L.; DEBEVERE, J.; MEULENAER, B.D. The effect of inoculum size on the growth of *Penicillium expansum* in apples. **Food Microbiology**, v.25, n.1, p.212-217, 2008.

BAKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils. A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.256, n.2, p.2166-2174, 2008.

BANKOLE, S.A.; JODA, A.O.; ASHIDI, J.S. The use of powder and essential oil of *Cymbopogon citratus* against mould deterioration and aflatoxin contamination of egusi melon seeds. **Journal of Basic Microbiology**, v.45, n.1, p.20–30, 2005.

BASSETTO, E. **Quantificação de danos ao longo da cadeia produtiva de pêssegos e avaliação de métodos alternativos de controle de doenças pós-colheita**. Piracicaba. 2006. 126f. Tese (Doutorado em fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; LOPES, M. H.; MOLINA, E. B. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya. **Crop protection**, v.22, n.9, p. 1087-1092, 2004.

BAUTISTA-BAÑOS, S., VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M.G., HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N., AIT BARKA, E., 2008. The Rhizopus stolonifer e tomato interaction. In: BARKA, E.A., CLÉMENT, C. (Eds.), Plant Microbe Interaction. Research Signpost, Kerala, India, pp. 269-289.

BAYMAN, P.; BAKER, J.; MAHONEY, N. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. **Mycopathologia**, v. 155, n.3, p. 161-169, 2002.

BENATO, E. A. Principais doenças em frutas pós-colheita e métodos alternativos de controle com potencial de indução de resistência. In: Simpósio de Controle de Doenças de Plantas, 2, 2002, Lavras - MG. **Anais**. Lavras: NEFIT/UFLA, 2002. p.139-182.

BLANCO, M.M.; COSTA, C.A.; FREIRE, A.O.; SANTOS, J.G.; COSTA, M. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Phytomedicine**, v.16, n.2-3, p.265-70, 2009.

BORDERÍAS, A. J.; ALONZO, I.; MATEOS, M. New applications of fibres in foods: Addition to fishery products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n.10, p.458, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica reavaliação toxicológica do ingrediente ativo Metamidofós. Gerencia geral de toxicologia. ANVISA, 2012. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 12 de agosto de 2014.

BRAZILIAN FRUIT. Disponível em: <<http://www.brazilianfruit.org/>>. Acesso em: 30 de agosto de 2014.

BONETT, L. P.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, R. G. A.; AQUINO, T. F. de; BERNARDI-WENZEL, J. Caracterização morfo cultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose em frutas e hortaliças em pós.colheita. **Ambiência**, v.6, n.3, p.451-463, 2010.

BULIT, J.; DUBOS, B. Botrytis bunch rot and blight. In: PEARSON, R. C.; GOHEEN, A. C. (Ed.). Compendium of grape diseases. St. Paul: APS Press, 1990. p. 13-15.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p.223-253, 2004.

CAMILI, E. C.; BENATO, E. A.; PASCHOLATI, S. F., CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva ‘Itália’ contra *Botrytis cinérea*. **Summa Phytopathol**, v. 33, n. 3, p. 215-221, 2007.

CANAVER, B. S.; PIERO, R. M. Di. Quitosana e adjuvantes para o controle preventivo do mofo azul da macieira. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 6, p. 419-423, 2011.

CANELLA, K.M.N.C.; GARCIA, R.B. Caracterização de quitosana por Cromatografia de Permeação em Gel – Influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v.24, n.1, p.13, 2001.

CARVALHO, J. M. **British Importers of Brazilian Fruit: Transaction Characteristics**. In: IV International Conference on Agri-Food Chain/Networks Economics and Management. Ribeirão Preto : USP, 2003.

CASTRO-ROSAS, J., ROJAS-OLVERA, M., NOGUERA-UGALDE, Y., SANTOS-LÓPEZ, E.M., ZÚÑIGA-ESTRADA, A., GÓMEZ-ALDAPA, C.A. Calidad sanitaria de ensaladas de verduras crudas, listas para su consumo. **Industria Alimentaria**, v.28, [SN], p.9-21, 2006.

CÉ, N. **Utilização de envoltórios de quitosana contendo nisina e natamicina para cobertura de kiwis e morangos minimamente processados**. 2009. 95p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Ciência e Tecnologia de alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

CHÁFER, M.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.H.; CHIRALT, A. Fungal Decay and Shelf Life of Oranges Coated With Chitosan and Bergamot, Thyme, and Tea Tree Essential Oils. **Journal of Food Science** , v.77, n.8, p.182-187, 2012

CHIEN, P.; SHEU, F.; YANG, F. Effects of edible coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. **Journal of Food Engineering**, v.78, n.1, p.225-229, 2007.

CHITARRA, A. B.; CHITARRA, M. I. F. Pós-colheita de frutas e hortaliças: Fisiologia e Manuseio. Lavras: FAEPE, 2005. 783 p.

CIA, P. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita de antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*)**. 2005. 197 f. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

COELHO, A. R.; NÓBREGA, G.M.A.; PAGNOCCA, F.C.; HOFFMANN, F.L.; HARADA, K.; HIROOKA, E.Y. Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. **Semina Ciências Agrárias**, v. 32, n.1, p. 1879-1892, 2011.

COSTA, H. S. R.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p.776-785, 2006.

CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural Products from Plants**, 2 ed., CRC Press: Florida, 2006.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v.22, n.1, p.39-44, 2003.

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; MICHEREFF, S. J.; NASCIMENTO, L. C.; GURGEL, L. M. S.; PESSOA, W. L. R. S. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.5, p.528 – 533, 2003.

DE CAPDEVILLE, G.; WILSON, C.L.; BEER, S.V.; AIST, J.R. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvest ‘Red Delicious’ apple fruit. **Phytopathology**, v.92, n.2, p.900-908, 2002.

DE LA ROSA, L. A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A. **Fruit and vegetable phytochemicals : chemistry, nutritional value and stability**. 1ªed. Wiley-Blackwell. Iowa, USA. 2010. p. 382.

DENKBAS E. B.; KILICAY, E.; BIRLIKSEVEN, C.; ÖZTÜRK, E. Magnetic chitosan microspheres: preparation and characterizations. **Reactive & Functional Polymers**, v.50, n.3, p. 225, 2002.

DRUSCH, S.; RAGAB, W. Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. **Journal Food Protection**, v.66, n.8, p.1514-1527, 2003.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.9, [SN], p.435-451, 2008.

FANDOHAN, P.; GNONLONFIN, B.; LALEYE, A.; GBENOU, J. D.; DARBOUX, R.; MOUDACHIROU, M. Toxicity and gastric tolerance of essential oils from. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.7, p.2493–2497, 2008.

FAO- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (1997). Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/x5056s/x5056S07.htm>>. Acesso em 10 de outubro de 2014.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em 10 jan. 2014.

FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. **Food Control**, v.18, n.9, p.1126-1130, 2007.

FORSTER, H.; DRIEVER, G. F.; THOMPSON, D. C.; ADASKAVEG, J. E. Postharvest decay management for stone fruit crops in California using the “reduced-risk” fungicides fludioxonil and fenhexamid. **Plant Disease**, v.91, n.2, p.209–215, 2007.

FRANK, A. L.; MCKNIGHT, R.; KIRKHORN, S. R.; GUNDERSON, P. Issues of agricultural safety and health. Annual. **Review of Public Health**. v. 25, [SN], p. 25-45, 2004.

FRIEDMAN, M. Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.50, n.21, p.5751–5780, 2002.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2000, 78p.

GUIL-GUERRERO, J. L.; REBOLLOSO-FUENTES, M. M. Nutrient composition and antioxidant activity of eight tomato (*Lycopersicon esculentum*) varieties. **Journal of food composition and analysis**, v.22, n.2, p.123–129, 2009.

GRACY R. W. Chitosan and glucosamine derivatives in the treatment of osteoarthritis. **American Journal of Orthopedics**, v.14, [SN], p.53-59, 2003.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, v. 26, n.2, p. 142-150, 2009.

HEFNAWY, M. A.; ABOU-ZEID, A. M. Differential adaptation of membranes of two osmotolerant fungi, *Aspergillus chevalieri* and *Penicillium expansum* to high sucrose concentrations. **Acta Microbiologica Polonica**, v. 52, n. 1, p. 53-64, 2003.

HERNÁNDEZ, A. M.A.; NECHA, L.L.B.; LAUZARDO, A.N.H.; DEL VALLE, M.G.V. Actividad antifúngica del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill., agente causal de la pudrición blanda del tomate. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 13, n. 2, p.1 27-134, 2011.

HSIEH, P. C.; MAU, J. L.; HUANG, S. H. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. **Food Microbiology**, v.22, n.1, p.35-43, 2001.

HSU, S.H.; CHANG, Y.B.; TSAI, C.L.; FU, K.Y.; WANG, S.H.; TSENG, H.J. Characterization and biocompatibility of chitosan nanocomposites. **Colloid Surface B Biointerfaces**, v.85, n.2, p.198–206, 2011.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201111.pdf> Acesso: 15 de dez. 2014

JACKSON, L. S.; BEACHAM-BOWDEN, T.; KELLER, S. E.; ADHIKARI, C.; TAYLOR, K. T.; CHIRTEL, S. J.; MERKER, R. I. Apple quality, storage, and washing treatments affect patulin levels in apple cider. **Journal of Food Protection**, v.66, n.4, p.618-624, 2003.

JACOMINO, R. A. K.; BRACKMANN, A.; CASTRO, P. R. Amadurecimento e senescência de mamão com 1- metilciclopropeno. **Scientia Agricola**, v.59, n.2, p.303-308, 2002.

JAYASHREE, T.; SUBRASMANYAM, C. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 10, p. 981-985, 2000.

JIANG, T.; FENG, L.; ZHENG, X. Effect of Chitosan Coating Enriched with Thyme Oil on Postharvest Quality and Shelf Life of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.1, p.188-196, 2012

JONES, F. T. Is Mold Growth Hurting your Performance. **Avian Advice**, v.7, n.1, p. 8-11, 2005.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n.1, p. 3-11, 2010.

KISHORE, N.; MISHRA, A. K.; CHANSOURIA, J. P. Fungitoxicity of essential oils against dermatophytes. **Mycoses**, v.36, n.5, p.211-215, 1993.

KIM, H.; TATOR, C.H.; SHOICHET, M.S. Chitosan implants in the rat spinal cord: biocompatibility and biodegradation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.97, n.4, p.395–404, 2011.

KIST, B. B. et al.. **Anuário brasileiro da fruticultura 2012**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2012.

LAIDOU, A.; THANASSOULOPOULOS, C. C.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Diffusion of patulin in the flesh of pears inoculated with four post-harvest pathogens. **Journal of Phytopathology**, v. 149, n. 7-8, p. 457-461, 2001.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of oregano essential oil, thymol and carvacol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p.453-462, 2001.

LEBERT, I.; LEROY, S.; TALON, R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. **Food Microbiology**, v.24, n.3,p.281-287, 2007.

LESSA, L. S.; LEDO, C.A.S.; SILVA, S.O.; PEIXOTO, C.P. Avaliação agronômica em Híbridos diplóides (AA) de bananeira. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.2, p.1716-1721, 2009.

LI, H.; YU, T. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.81, [SN], p. 269-274, 2000.

LI, Y.; CHEN, X.G.; LIU, N. Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. **Carbohydrate Polymers**, v.67, n.2, p.227-232, 2007.

LI, X.S.; MIN, M.; DU, N.; GU, Y.; HODE, T.; NAYLOR, M.; CHEN, D.; NORDQUIST, R.E.; CHEN, W.R. Chitin, chitosan, and glycated chitosan regulate immune responses: the novel adjuvants for cancer vaccine. **Clinical and Developmental Immunology**, v.1, n.1, p.1–8, 2013.

LICHTER, A.; ZUTKHY, Y.; SONEGO, L.; DVIR, O.; KAPLUNOV, T.; SARIG, P.; BEN-ARIE, R. Ethanol controls postharvest decay of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, n. 3, p. 301-308, 2002.

LIMA, E. O.; GOMPERTZ, O. F.; GIESBRECHT, A. M.; PAULO, M. Q. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, v.36, n.9, p.333-336, 1993.

LIMA, G.; CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; RAIOLA, A.; RITIENI, A.; DE CICCO, V. Integrated control of blue mould using new fungicides and biocontrol yeasts lowers levels of fungicide residues and patulin contamination in apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 60, n. 2, p. 164-172, 2011.

- LI, B.; WANG, X.; CHEN, R.X.; HUANGFU, W.G.; XIE, G.L. Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. **Carbohydrate Polymer**, v.72, n.2, p.287–292, 2008.
- LINS, S. R. O.; OLIVEIRA, S. M. A.; ALEXANDRE, E.M.; SANTOS, A.M.G.; OLIVEIRA, T.A.S. Controle alternativo da podridão peduncular em manga. **Summa phytopathology**, v.37, n.3, p.121-126, 2011.
- LIU, J.; TIA N, S.; MENG , X.; XU , Y . Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.44, n.3, p.300-306, 2007.
- LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. **Doenças do Tomateiro**. Brasília: EMBRAPA HORTALIÇAS. 151p. 2005.
- LUBULWA, A.S.G.; DAVIS, J.S. 1994. **Estimating the social costs of the impacts of fungi and aflatoxins in maize and peanuts**. In: HIGHLY, E.J.; BANKS, H.J.; CHAMP, B.R., editors. *Stored Product Protection: Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-product Protection*. Wallingford, UK: CAB International; 1994. P.1017–1042
- MARI, M.; LEONI, O.; LORI, R.; CEMBALI, T. Antifungal vapour-phase activity of allyl isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. **Plant Pathology**, v.51, n.2, p.231–236, 2002.
- MARTINS, M.B.G., MARTINS, A.R., TELASCRÊA, M., CAVALHEIRO, A.J. Caracterização anatômica da folha de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Poaceae) e perfil químico do OE. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.3, p. 20 – 29, 2004.
- MIRANDA A.C. MOREIRA, J.C; CARVALHO, R.; PERES, F. Neoliberalismo- Uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, v.12, n.1, p.7-14, 2006.
- MI, F.L.; TAN, Y.C.; LIANG, H.F.; SUNG, H.W. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. **Biomaterials**, v.23, n.1, p.181–191, 2002.
- MISHRA, A.K.; DUBEY, N.K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, n.4, p.1101-1105, 1994.
- MOSS, M. O.; LONG, M. T. Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n. 4, p. 387-399, 2002.
- MOURA, M.C.F.; OLIVEIRA, L.C.S. Atividade agrícola: produção, impacto e sustentabilidade. **Revista Iberoamericana de Ciências Ambientais**, v. 4, n. 1, p. 6-14, 2013.
- MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. **Marine Drugs**, v. 8, n.2, p.392-312, 2010.
- NEVES, L.C.: Manual pós-colheita da fruticultura brasileira. Londrina: EDUEL, 494p. 2009.

NGUEFACK, J. BUDDE, B. B.; JAKOBSEN, M.. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, n.3, p. 329-34, 2004.

NÓBREGA, F. V. A.; SUASSUNA, N. D. Análise sanitária de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) armazenadas em algumas áreas do estado da Paraíba. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.4, n. 02, p. 66-72, 2004.

NORTHOLT, M. D.; VAN EGMOND, H. P.; PAULSCH, W.E. Patulin production by some fungal species in relation to water activity and temperature. **Journal of Food Protection**, v.41, n.11, p.885-890, 1978.

NUEZ, F. **El cultivo del tomate**. Madrid: Mundi Prensa, 2001. 793p.

NUEZ, F.; DIEZ, M.J.; PICO, B.; CORDOVA, P.F. Catalogo de semillas de tomate. Madrid: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, 1996. 177 p.

OMIDBEYGI, M.; BARZEGAR, M.; HAMIDI, Z.; NAGHDIBADI, H. Antifungal activity of thyme, summer savory and cloves essential oil against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. **Food Control**, v.18, n.12, p.1518-1523, 2007.

ONUEGBU, B.A. (2002) Fundamentals of Crop Protection, ASCEU, RSUST, Port Harcourt, Niger, p. 204-208.

ORTIZ, R. S.; MARRERO, G. V.; NAVARRO, A. L. T. Instructivo técnico para el cultivo de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Caña Santa). **Revista Cubana Plantas Medicinai**, v.7, n.2, p.89-95, 2002.

PARANAGAMA, P. A.; ABEYSEKERA, K. H.; ABEYWICKRAMA, K.; UGALIYADDE, L. Fungicidal and antiaflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Isolated from stored rice. **Letters in Applied Microbiology**, v.37, n.1, p.86-90, 2003.

PARREIRA, D. F.; NEVES, W. S.; ZAMBOLIM, L. Resistência de Fungos a Fungicidas Inibidores de Quinona. **Revista Trópica de Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 3, n. 2, p. 24-31, 2009.

PERDONES, A.; SANCHEZ-GONZALEZ, L.; CHIRALT A.; VARGASA, M. Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of Strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, v.70, [SN], p.32–41, 2012.

PEREIRA, M. C. **Efeito da adição de condimentos no controle de micro-organismos, na conservação de produtos de panificação e na inibição de metabólitos produzidos por fungos associados ao café**. 2001. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, 2001.

PÉREZ, M. N.; FLORES, P. J.; GARCÍA, V. L.; LOZANO V. C. Factores genéticos y ambientales relacionados con la dinámica temporal y efecto de las enfermedades en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) em Marín, Nuevo León, México. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v.13, n.1, p.1-9, 1995.

PIEMONTESE, L.; SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A. Occurrence of patulin in conventional e organic fruit producing in Italy and subsequent exposure assessment. **Food Additives & Contaminants**, v. 22, n. 5, p. 437-442, 2005.

PIRES, D.X.; CALDAS, E.D.; RECENA, M.C.P. Intoxicações provocadas por agrotóxicos de uso agrícola na microrregião de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, no período de 1992 a 2002. **Cadernos de saúde pública**, v.21, n.3, p.804-814, 2005.

PITT, J. I. **Toxigenic *Penicillium* species**. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. B.; MONTVILLE, T. J. (Eds.). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington: ASM Press, 1997. p. 411.

PITTET, A. **Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: a decade in review**. In: KOE, W.J.; SAMSON, R. A.; VAN EGMOND, H. P.; GILBERT, J.; SABINO, M. *Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millenium*. Wageningen: Ponsen e Looyen, 2001. p.159.

PLOOY, W.; REGNIER, T.; COMBRINCK, S. Essential oil amended coatings as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management. **Postharvest Biology and Technology**, v.53, n.3, p.117-122, 2009.

PONTÓN, J. Diagnostico microbiológico de las micosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, 19, [SN], 25-29, 2002.

PREZA, D. L. C.; AUGUSTO, L. G. S. Vulnerabilidades de trabalhadores rurais frente ao uso de agrotóxicos na produção de hortaliças em região do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Saúde ocupacional**, v. 37, n.125, p. 89-98, 2012.

PRINS, C. L. et al. Efeitos de confinamento do sistema radicular sobre capim-limão (*Cymbopogon citratus*). **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n.3, p. 416-421, 2008.

QIN, C.; LI, H.; XIAO, Q. Water-soluble of chitosan and its antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v.63, n.3, p.367-374, 2006.

RABEA, E. I.; BADAWY, M. E. T.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v.4, n.6, p.1457-1465, 2003.

RABEA, E.I.; BADAWY, M.E.I.; STEURBAUT, W.; STEVENS, C.V. In vitro assessment of N-(benzyl) chitosan derivatives against some plant pathogenic bacteria and fungi. **European Polymer Journal**, v.45, n.1, p.237-245, 2009.

RAHMAN, M. A.; MAHMUD, T. M. M.; KADIR, J.; ABDUL RAHMAN, R.; BEGUM, M.M. Antimicrobial activities of chitosan and calcium chloride on *in vitro* growth of *C. Gloeosporioides* from papaya. **Journal of Tropical Agricultural Science**, v.31, n.2, p. 223-232, 2008.

RAMOS-GARCÍA, M., BOSQUEZ-MOLINA, E., HERNÁNDEZ-ROMANO, J., ZAVALA-PADILLA, G., TERRÉS-ROJAS, E., ALIA-TEJACAL, I., BARRERA-NECHA, L.,

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M., BAUTISTA-BAÑOS, S. Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds, to control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5 α in fresh tomatoes. **Crop protection**, v.38, [SN], p.1-6, 2012.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effect of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v.15, n.6, p.79-83, 2004.

RASOOLI, I.; OWLIA, P. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. **Phytochemistry**, v.66, n.24, p.2851-2856, 2005.

RIVERA COTO German. 1999. Conceptos introductorios a la fitopatología. Primera reimpressão: editorial universidad estatal a distancia san José Costa Rica, 2007. p 44-45.

ROLAND, J. O.; BEUCHAT, L. R. Biomass and patulin production by *Byssoschlamys nivea* in apple juice affected by sorbate, benzoate, SO₂ and temperature. **Journal of Food Science**, v.49, [SN], p.402-406, 1984.

ROSS, G.; HIROOKA, E.Y. PATULIN: **Factors affecting production and risk of contamination through consume of apple (*Malus domestica* B.) cultivar Gala and Fuji**. IUPAC, p.296, Rome, 1996.

SANHUEZA, R.M.V. **Podridões de maçãs frigorificadas**. In: GIRARDI, C.L. (Ed.). Frutas do Brasil, Maçã: pós-colheita. Brasília DF. Embrapa Informação Tecnológica.2004. p.35-44.

SANTOS, A.; PADUAN, R. H.; GAZIN, Z. C.; JACOMASSI, E.; D' OLIVEIRA, P. S.; CORTEZ, D. A. G.; CORTEZ, L. E. R. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do OE de *Cymbopogon citratus* (DC.). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.2, p.436-441, 2009.

SANTOS, N.S.T.; AGUIAR, A.J.A.A.; OLIVEIRA, C.E.V.; SALES, C.V.; SILVA, S.M.; SILVA, R.S.; STAMFORD, T.C.M.; SOUZA, E.L. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L). **Food Microbiology**, v.32, n.2, p.345-353, 2012.

SANCHEZ-GONZALEZ, L.; CHAFER, M.; CHIRALT, A.; GONZALEZ-MARTINEZ, C. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. **Carbohydrate Polymers**, v.82, n.2, p.277-283, 2010

SANCHEZ-GONZALEZ, L.; PASTOR, C.; VARGAS, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHÁFER, M. Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v.60, n.1, p.57-63, 2011.

SEBTI, I.; MARTIAL-GROS, A.; CARNET-PANTIEZ, A.; GRELIER, S.; COMA. V. Chitosan Polymer as Bioactive Coating and Film against *Aspergillus niger* contamination. **Journal of Food Science**, v.70, n.2, p.100-104, 2005.

Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas - SEBRAE. Exportações de frutas. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/setor/fruticultura>> . Acesso em: 24 set. 2013.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Isbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Microbiological Research**, v.167, n.3, p.337-344, 2007.

SHAO, X.F.; CAO, B.; XU, F.; XIE, S.; YU, D.; WANG, H. Effect of postharvest application of chitosan combined with clove oil against citrus green mold. **Postharvest Biology and Technology**, v.99, [SN], p.37-43, 2015.

SHENASI, M.; CANDLISH, A.A.G.; AIDOO, K.O. The production of aflatoxins in fresh date fruits and under simulated storage conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.82, n.8, p.848-853, 2002.

SILVA, J.C.M.; COELHO L. Resistência a fungicidas de *Botrytis cinerea* persoon ex fries, fungo causador de tombamento em mudas de *Eucalyptus* sp. em viveiros florestais. **Ciência Florestal**, v. 13, n. 2, p. 27-36, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, p. 467-469, 2004.

SINGH, P.; SHUKLA, R.; KUMAR, A.; PRAKASH, B.; SINGH, S.; DUBEY, N.K. Effect of *Citrus reticulata* and *Cymbopogon citratus* Essential Oils on *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin Production on *Asparagus racemosus*. **Mycopathologia**, v.170, n.3, p.195-202, 2010.

SOUZA, A.E.F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L.C. Antifungal activity of garlic and lemon Grass extracts on the development of *Fusarium proliferatum* isolated from maize grain. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n.6, p.465-471, 2007.

SOUZA, R.R. S. **Caracterização anatômica quantitativa e composição de OE em três estágios foliares de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem**. 2008. 104f. Dissertação (Mestrado em agronomia).Faculdade de Ciências Agronomicas, 2008.

STEVENS, C.; LIU, J.; KHAN, V. A.; LU, J. Y.; KABWE, M. K.; WILSON, C. L. The effects of low-dose ultraviolet light-C treatment on polygalacturonase activity, delay ripening and *Rhizopus* soft rot development of tomatoes. **Crop Protection**, v.23, n.6, p.551-554, 2004.

SUHR, K.I.; NIELSEN, P.V. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, n.4, p.665-674, 2003.

TANIWAKI, M. H., SILVA, N. Fungos em alimentos: ocorrência e detecção . Campinas: ITAL, 2001.

TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in posharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, v.32, n.1, p.1-13, 2004.

TÖFOLI, J.G.; FERRARI, J.T.; DOMINGUES, R.J.; NOGUEIRA, E.M.C. Divulgação técnica - *Botrytis* sp. em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo. **Biológico**, v.73, n.1, p.11-20, 2011.

TOSHKOVA, R.; MANOLOVA, N.; GARDEVA, E.; IGNATOVA, M.; YOSSIFOVA, L.; RASHKOV, I.; ALEXANDROV, M. Antitumor activity of quaternized chitosan-based electrospun implants against Graffi myeloid tumor. **International Journal of Pharmaceutics**, v.400, n.1-2, p.221-233, 2010.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N.K.; PANDEY, V.B. Kaempferol: the antifungal principle of *Acacia nilotica* Linn. Del. **Journal of Indian Botanic Society**, v.81, n.1, p.51-54, 2002.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N.K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v.31, n.3, p.235-245, 2004.

TSAI, G.J.; HUANG, S.P. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. **Fisheries Science**, v.70, n. 4, p.675-681, 2004.

TURINA, A. V.; NOLAN, M. V.; ZYGADLO, J. A.; PERILLO, M. A. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v.122, n.2, p.101-113, 2006.

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

VEIGA, M. M. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 145-152, 2007

VILA, M. T. R. **Qualidade pós-colheita de goiabas ‘Pedro Sato’ armazenadas sob refrigeração e atmosfera modificada por bioenvoltório de fécula de mandioca**. 2004. 66f. Dissertação (mestrado em Ciência e Agrotecnologia). UFLA/Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2004.

WALSSMANN, W. Agrotóxicos e doenças não transmissíveis. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.12, n.1, p.15-24, 2007

WANG, S.Y.; CHEN, P.F.; CHANG, S.T. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. **Bioresource Technology**, v.96, n.7, p.813-818, 2005.

WILKINSON, J.M.; CAVANAGH, M.A. Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. **Phytotherapy Research**, v.19, n.7, p.643-646, 2005.

XING, Y.; QINGLIAN, X.; ZHENMING, C.; XIHONG, L.; WENTING, L. Effects of chitosan-oil coating on blue mold disease and quality attributes of jujube fruits. **Food & Function**, v.2, n.8, p.466–474, 2011.

YADAV, A. V.; BHISE, S. B. Chitosan: a potential biomaterial effective against typhoid. **Current Science**, v. 87, n.9, p.1176-1178, 2004.

YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J. P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. **Animal Research**, v.51, [SN], p.81-99, 2002.

ZAHAROFF, D.A.; ROGERS, C.J.; HANCE, K.W.; SCHLOM, J.; GREINER, J.W. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. **Vaccine**, v.25, n.11, p.2085–2094, 2007.

ZHANG, H.; WANG, L.; ZHENG, X.; DONG, Y. Effect of yeast antagonist with heat treatment on postharvest blue mold decay and *Rhizopus* decay of peaches. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, n.1, p.53–58, 2007.

ZHENG, L.Y.; ZHU, J.F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrates Polymers**, v.54, n.4, p.527-530, 2003.

APÊNDICE

ARTIGO CIENTÍFICO

Preventive treatment with a coating composed of chitosan and *Cymbopogon citratus* (Dc. Ex Nees) essential oil to control *Rhizopus* soft rot and quality of tomato fruit

Ana Júlia Alves Athayde Aguiar¹, Priscila Dinah Lima de Oliveira¹, Maria Lúcia da Conceição¹, Ingrid Conceição Dantas Guerra¹, Marcos Antônio Barbosa de Lima³, Narciza Maria de Oliveria Arcanjo⁴, Marta Suely Madruga⁴, Lúcia Raquel Ramos Berger¹, Evandro Leite de Souza^{1*}

Submetido em 25/08/2015 para Food Research International

Qualis A1- Área de Nutrição- CAPES

Qualis A2- Ciência dos alimentos- CAPES

Preventive treatment with a coating composed of chitosan and *Cymbopogon citratus* (Dc. Ex Nees) essential oil to control *Rhizopus* soft rot and quality of tomato fruit

Running title: Chitosan and lemongrass to control soft rot

Ana Júlia Alves Athayde Aguiar¹, Priscila Dinah Lima de Oliveira¹, Maria Lúcia da Conceição¹, Ingrid Conceição Dantas Guerra¹, Marcos Antônio Barbosa de Lima³, Narciza Maria de Oliveira Arcanjo⁴, Marta Suely Madruga⁴, Lúcia Raquel Ramos Berger¹, Evandro Leite de Souza^{1*}

¹ *Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Science Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

² *Laboratory of Microbiology, Department of Tropical Medicine, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil*

³ *Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brazil*

⁴ *Laboratory of Quality Control of Foods, Department of Food Engineering, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

* Author for correspondence: Evandro Leite de Souza

Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Nutrição

Campus I, 58051-900, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

E-mail: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Phone: + 55 83 3216 7807; Fax number: + 55 83 3216 7094

Abstract

This study evaluated the efficacy of the combined application of chitosan (CHI) and *Cymbopogon citratus* (Dc. Ex Nees) (lemongrass) essential oil (CCEO) to control *Rhizopus stolonifer* URM 3728 (*R. stolonifer*) in fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits at room temperature storage. The effects of the treatment (CHI and CCEO) on some quality characteristics of the fruits, namely weight loss, firmness, soluble solids, titratable acidity, pH, ascorbic acid, color and sensory acceptance were also assessed. The values of minimum inhibitory concentration (MIC) of CHI and CCEO against *R. stolonifer* were 8000 ppm and 5000 ppm, respectively. Subinhibitory concentrations of CHI and CCEO (CHI: 4000 ppm; CCEO: 1250 ppm), alone and in combination inhibited fungal spore germination and damaged membrane integrity. CHI (4000 ppm) and CCEO (1250 ppm) prevented the colonization (infection) of *R. stolonifer* in tomato fruit. Thus, the application of CHI and CCEO as a coating preserved the general quality of tomato fruits as measured using a variety of physicochemical and sensory attributes. These results indicate that coatings composed of CHI and CCEO could represent promising postharvest treatments to inhibit *Rhizopus* soft rot in tomato fruits.

Keywords: lemongrass, biopolymer, film, tomato, postharvest treatment.

1. Introduction

The tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is a popular consumer fruit and is the second most produced fruit in the world. However, approximately 20% of the annual world production of tomato fruit is lost due to postharvest diseases, particularly those caused by pathogenic fungi (FAO, 2014). *Rhizopus* soft rot, caused by *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb). (Ex Fr.) Lind is a common and destructive postharvest storage disease in fresh tomato fruit that limits its shelf life and market value. The contamination of tomato fruit by *R. stolonifer* occurs during harvest, handling and transportation and can rapidly infect adjacent fruits (Stevens et al., 2004).

To minimize the effects of *Rhizopus* soft rot, some fungicides, such as iprodione and dichloran, are applied to tomato fruit. However, some countries have avoided the use of these fungicides (Ramos-García et al., 2012). In recent years, the indiscriminate use of synthetic fungicides to control postharvest diseases in tomato fruit has attracted international concern about significant negative impacts on human health and the environment, as well as the emergence of fungicide-resistant strains (Lira-De León et al., 2014). Thus, many researchers have been investigating safe alternative substances to reduce or even replace the use of synthetic fungicides in fruit (Liu et al., 2007; Sánchez-González et al., 2011).

Essential oils (EOs) have received attention as inhibitors of a wide variety of phytopathogenic fungi and are GRAS (Generally Recognized as Safe) in the dose typically used in foods. These EOs also present low resistance-inducing effects in a range of microorganisms (Burt, 2004; Marinelli et al., 2012). The essential oil (EO) obtained from *Cymbopogon citratus* (Dc. Ex Nees) - lemongrass (CCEO) has shown promising results in the inhibition of food-related bacteria and fungi (Suhr & Nielsen, 2003; Wilkinson & Cavanagh, 2005).

Chitosan (CHI) is a deacetylated derivative of chitin. Both CHI and chitin are natural co-polymers, comprising units of 2-amino-2-desoxy-D-glycopyranose and 2-acetamide-2-

desoxy-D-glycopyranose interconnected by glycosidic β -1,4 bonds in variable proportions (Berger et al., 2014; Oliveira et al., 2014). CHI shows antimicrobial effects, the ability to form coating films, hypoallergenicity, biodegradability and emulsifying properties (Cháfer et al., 2012). These characteristics enable the homogeneous distribution of EOs in CHI solutions with the formation of a thin and translucent coating (Sánchez-González et al., 2010).

Edible coatings composed of CHI and EOs are considered an environmentally friendly technology to control postharvest decay in fruit due to their biodegradability and lack of phytotoxicity (Beyki et al., 2014; Santos et al., 2012). CHI coatings enriched with EOs from oregano (Santos et al., 2012), clove (Shao et al., 2015), lemon (Perdones et al., 2012), bergamot, thyme, tea tree (Cháfer et al., 2012), cinnamon (Hernández et al., 2011; Xing et al., 2011) and star anise (Wang et al., 2011) are effective in inhibiting the growth of pathogenic fungi in a variety of fruits and vegetables. However, only one previous study assessed the efficacy of a coating with both CHI and CCEO. This combination was used to control the anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in bell peppers during storage, as well as the maintenance of fruit quality (Ali et al., 2015).

Thus, this study assessed the efficacy of the combined application of CHI and CCEO as a postharvest treatment to control *R. stolonifer* in fresh tomato fruit. Assays were performed to (1) determine the minimum inhibitory concentration of CHI and CCEO against *R. stolonifer*, (2) evaluate the inhibitory effects of different combinations of these substances at subinhibitory concentrations against *R. stolonifer* in laboratory media and as a coating on tomato fruits and (3) verify the effects of the coating on the physicochemical and sensory characteristics of tomato fruits.

2. Materials and methods

2.1 Raw materials

Chitosan (CHI) of medium molecular weight (deacetylation degree 75-85%, batch 03318AJ) was obtained from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA). CCEO was supplied by Aromalândia Ind. Com. Ltda. (Minas Gerais, Brazil); its quality parameters (density at 20 °C, 0.90; refractive index at 20 °C, 1.47) are described in a technical report issued by the supplier.

Tomato fruits (*L. esculentum*) in the commercial maturation stage (with red color) were purchased from a local wholesale distributor and selected for uniformity in size, form, appearance and the absence of mechanical injuries or visible fungal infections. Prior to the assays, the fruits were always surface-disinfected via immersion in a sodium hypochlorite solution (150 ppm, pH 7.2 adjusted using 1 M NaOH) for 15 min, washed with sterile distilled water and dried for 2 h in a safety cabinet.

Rhizopus stolonifer URM 3728 was obtained from the University Recife Mycology Culture Collection (Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil). For assays, fungi stock cultures were subcultured in Sabouraud agar (Himedia, India) at 28 °C for seven days to allow sufficient sporulation. The fungal spores were collected in a sterile saline solution (0.85 g/100 mL NaCl) in fungal growth medium, and the resulting suspension was filtered through a triple layer of sterile gauze to retain hyphal fragments. The number of spores present in the suspension was quantified with a hemocytometer. The spore concentration was adjusted with a sterile saline solution to yield an inoculum of approximately 10^6 spores/mL. The test fungi were verified for their ability to cause characteristic symptoms of *Rhizopus* soft rot in tomato fruits (virulence), including watery areas quickly covered by coarse, gray hairy mycelia forming a mass of black sporangia at their tips (Bautista-Baños et al., 2014).

2.2 Preparation of CHI and CCEO solutions and coatings

CHI solutions were obtained by dissolving the polymer (16000 ppm) in acetic acid (1 mL/100 mL) for 24 h at room temperature (25 °C) with stirring (120 rpm) (Sánchez-González et al., 2011). Successive serial dilutions (1:1) were performed in Sabouraud broth (Himedia, India) to obtain solutions of different concentrations (8000, 4000, 2000, 1000, 500 and 250 ppm). To ensure that the antifungal activity was due to the assayed CHI and not acetic acid, the pH of all CHI solutions used in the antifungal assays was adjusted to 5.0 by adding 1 M NaOH. CCEO emulsion were obtained by dissolving the EO (80000 ppm) in Sabouraud broth containing Tween 80 [1.0%, v/v (Himedia, India)] as a stabilizing agent (Santos et al., 2012; Sousa et al., 2013) with successive dilutions (1:1) in the same broth to obtain solutions of different concentrations (40000, 20000, 10000, 5000, 2500, 12500 and 600 ppm). Tween 80 at its highest tested final concentration after dilution in the Sabouraud broth (1%, v/v) caused no inhibition of the fungal growth. For the combined application of CHI and CCEO, CHI (4000 ppm) was initially diluted in acetic acid (1 mL/100 mL) with constant stirring (120 rpm) for 6 h at room temperature. Then, the CCEO was added (1250 ppm) to the CHI dispersion, followed by stirring for an additional 18 h at room temperature (Ojagh et al., 2010).

2.3 Identification of CCEO constituents

The CCEO constituent identification was performed using a gas chromatography coupled mass spectrometer (GC-MS) model QP2010 Ultra (Shimadzu, Kyoto, Japan) with a selective mass detector, split/splitless capillary injector, flow controller and automatic pressure operating with an energy of 0.70 eV. For analysis, a capillary column OV (30-m column, internal diameter: 0.25 mm, film thickness: 0.25 mm) with the following specifications was used: injection temperatures of 250 °C and 290 °C in the detector, gas stream (helium) column: 1.0 mL/min, linear velocity: 36.4 cm/s, total flow: 302.4 mL/min,

pressure: 57 kPa. The initial column temperature was 60 °C (for 2 min). This was increased to 180 °C (for 1 min) at 4 °C/min, and further increased from 180 to 260 °C at 10 °C/min (for 10 min). The concentration of the constituents was calculated using the individual peak areas for each compound. The data generated were analyzed using the MSD Chemstation software coupled with mass spectrum NIST/2002 (Wang et al., 2011).

2.4 Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC)

The MIC of CHI and CCEO was determined using the macrodilution in broth technique. Initially, 1 mL of fungal suspension was inoculated in 4 mL of Sabouraud broth (with a concentration adjusted to 10 mL), and 5 mL of the solutions containing different concentrations of CHI or CCEO (with concentrations adjusted to 10 mL) were added. The system was incubated at 28 °C for 7 days, and at the end of the incubation period, the lowest CHI or CCEO concentration (highest dilution) that exhibited no visible fungal growth was considered the MIC (Santos et al., 2012).

2.5 Effects on fungal spore germination

The spore suspension (0.1 mL) of *R. stolonifer* obtained from a 7-day-old culture grown on PDA (Himedia, India) at 28 °C was placed in Eppendorf tubes containing 0.1 mL of different CHI and/or CCEO concentrations (CHI 4000 ppm; CCEO 1250 ppm) alone or in combination. The systems were incubated statically at 28 °C for 18 h. After the incubation period, the germination of 200 spores per sample was observed using light microscopy (40x). Systems without CHI or CCEO were assayed similarly as control. The efficacy of spore germination inhibition was evaluated by comparing the number of the germinated spores observed in the media supplemented with CHI and/or CCEO with that observed in the control assay (Sousa et al., 2013).

2.6 Effects on the plasma membrane integrity of fungal spores

The study of the changes in membrane integrity (MI) of the fungal spores induced by CHI and/or CCEO (CHI 4000 ppm; CCEO 1250 ppm) was carried out according to a previously described method (Liu, 2007). For this, 1-mL aliquots of the spore suspension were collected and inoculated into flasks containing Sabouraud broth (Himedia, India) supplemented with CHI (4000 ppm) or CCEO (1250 ppm) alone or in combination and incubated at 28 °C under orbital stirring (150 rpm) for different exposure times (2, 4 and 6 h). Systems without CHI or CCEO were assayed similarly as control. After each exposure time interval, the systems were submitted to centrifugation (14.000 x g for 10 min), washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.0) to remove residual medium and debris and stained with propidium iodide (PI) (1 µg/mL) for 5 min at 28 °C. PI is a cell-impermeant fluorescent dye that intercalates into the DNA of spores in which plasma membrane integrity has been lost. If the PI penetrates the cell, membrane integrity has been lost and a red staining occurs (Sandes et al., 2014). After the staining step, the spores were collected via centrifugation (14,000 x g for 10 min) and washed twice with PBS to remove residual dye. Finally, the spores were mounted on microscope slides and observed with a fluorescence microscope (Zeiss Axioskop 40 microscope, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with an individual fluorescein rhodamine filter set (Zeiss no. 15: excitation BP 546/12 nm, emission LP 590 nm). Three fields of view of each slide were randomly selected for observations. The number of spores in the bright field was defined as the total number, and the loss of integrity of the spore membrane was calculated according to the percentage of spores that have been stained according to the following formula:

$$\text{MI (\%)} = (\text{N}^{\circ} \text{ of total spores} - \text{N}^{\circ} \text{ of not stained spores} / \text{N}^{\circ} \text{ of total spores}) \times 100$$

2.7 Effects on fungal mycelial growth

The effects of CHI (4000 ppm) and/or CCEO (1250 ppm) on the radial mycelial growth of *R. stolonifer* were determined using the poisoned substrate technique (dilution in solid medium). For this, 2-mm plugs taken from a 7-day-old culture grown on potato dextrose agar (PDA) (Himedia, India) at 28 °C were placed on the center of a Petri dish containing PDA supplemented with CHI or CCEO alone or in combination and incubated at 28 °C. The radial mycelial growth (cm) was measured using calipers every 18 h of incubation over a period of 90 h. The growth media without CHI or CCEO was similarly tested as control (Oliveira et al., 2014).

2.8 Effects on severity of *R. stolonifer* infection in tomato fruit

The effect of a coating composed of CHI and CCEO on the severity of infection caused by *R. stolonifer* on tomato fruits was assayed using two *in situ* assays to simulate a preventive or curative effect. In the preventive assays, the fruits were dipped for 1 min in the assayed coating (CHI 4000 ppm; CCEO 1250 ppm), completely dried (2 h, 28 °C) on a nylon filter to drain the excess liquid in a biosafety cabinet, and then artificially inoculated via immersion in 200 mL of a *R. stolonifer* spore suspension (approximately 10^6 spores/mL). In the curative assays, the fruits were first inoculated via immersion in 200 mL with a spore suspension of *R. stolonifer* (approximately 10^6 spores/mL), stored in a biosafety cabinet (2 h, 28 °C), coated via dipping in the same film-forming dispersion containing CHI and CCEO for 1 min and completely dried (2 h, 25 °C) on a nylon filter to drain the excess liquid in a biosafety cabinet. Additionally, a control experiment for each preventive or curative effect was performed in which the coating solution was replaced with sterile distilled water. The fruits were packed in a polyethylene container with a lid (without contact among fruits) and stored at room temperature (28 °C) (Valencia-Chamorro et al, 2009). Each treatment included

12 fruits and varying storage time intervals (2, 4, 6 and 8 days), and all fruits were maintained in the experiment unit until the end of the assessed storage period. The percentage of injury severity index was determined according to a previously described method (Hernández et al., 2011). The tomato fruits with symptoms of *R. stolonifer* soft rot were quantified during the storage period (12 days). Symptoms were assessed as a percentage of the total area of fruits presenting characteristic *Rhizopus* soft rot symptoms. The severity index was determined on the surface of the fruit considering varying degrees of damage according to an already established scale as follows: 0 = 0%; 1 = 1-5% ; 2 = 6-15%; 3 = 16-45%; 4 = 46-75%; 5 = 76-100% of the visually damaged fruit, and the severity index was calculated using the equation

$$\text{Severity index} = \{[X_i(0) + X_i(1) + X_i(2) + X_i(3) + X_i(4) + X_i(5)]\} / N$$

Where 'Xi' is the number of fruits presenting *Rhizopus* soft rot symptoms per each degree of damage (0, 1, 2, 3, 4 and 5) at each of the assessed storage periods (0, 2, 4 and 8 days) and 'N' is total number of fruits per experimental unit (treatment) (Perez et al., 1995). The higher is the value of the calculated severity index, the higher is the mold infection severity.

2.9 Physicochemical analyses

The fruits were evaluated for weight loss, firmness, color and general quality parameters, such as soluble solids, titratable acidity, ascorbic acid at time zero (immediately after application of the coatings), as well as 4 and 8 days of storage at room temperature (five fruits from each group were randomly chosen and submitted for analyses at each pre-established storage period). To determine the weight loss during storage, the weight of the fruit was monitored at different storage time intervals, and the fruit weight loss in each assessed period was calculated as a percentage of the initial weight. The firmness was determined using a 3-mm diameter probe (1/8) coupled to a TA-XT2 Texture Analyzer

(Stable Micro Systems, Haslemere, UK), and the results were expressed as N/mm (Ali et al., 2010). The titratable acidity was determined with phenolphthalein as an indicator with 0.1 N NaOH, and the results were expressed as mmol H⁺/100 g of fruit (citric acid equivalent) (Meng et al., 2008). The pH values were determined using a digital potentiometer according to the method described by AOAC (2005). The soluble solids content (in a drop taken from a 5g-macerated fruit sample) was determined with a digital refractometer (Model HI 96801, Hanna Instruments, São Paulo, Brazil), and the results were expressed as °Brix (Meng et al., 2008). The ascorbic acid content (g/100 g) was determined using an official titration method (AOAC, 2005). The skin color was measured at three different equatorial positions of the fruit using the CIE*Lab* system ($L^* a^* b^*$). The hue angle (h^*_{ab}) and chroma (C^*_{ab}) were measured in a CR-300 colorimeter (MINOLTA Co., Osaka, Japan) using a 10-mm quartz cuvette, consistent with the International Commission on Illumination (CIE, 1986). The CIE*Lab* color scale ($L^*a^*b^*$) was used with a D⁶⁵ illuminant (standard daylight) at a 10° angle. Using reference plates, the apparatus was calibrated in the reflectance mode, and the specular reflection was excluded.

2.10 Sensory analysis of tomato fruit

Tomato fruits (not artificially contaminated with *R. stolonifer*) coated and uncoated with CHI and CCEO in combination (CHI 4000 ppm; CCEO 1250 ppm) were subjected to acceptance and preference tests on the 4th day of storage at room temperature. Sixty untrained tasters participated in the acceptance and preference tests. The sensory analyses were performed after approval through an Ethics Research Committee (protocol 712.884/2014). The analysis was performed under controlled temperature and lighting conditions in individual booths. Each panelist received one unit of tomato fruit treated or not-treated with the CHI-CCEO coating served on disposable white plates coded with a random three-digit

number. The fruit samples were simultaneously served in a blinded and random sequence immediately after their removal from low temperature storage. The tasters were asked to eat a salty biscuit and drink water between samples to avoid aftertaste effects. For the acceptability of appearance, color, flavor, taste, aftertaste, texture and overall assessment, a nine-point structured hedonic scale was used, ranging from one (dislike very much) to nine (like very much) (Santos et al., 2012). For the preference test, the tasters were asked to select the most and least appreciated samples based on overall evaluation. The intent to purchase was assessed on a five-point structured hedonic scale ranging from one (certainly would not buy) to five (certainly would buy) (Oliveira et al., 2014).

2.10 Statistical analysis

All assays were performed in triplicate in two independent experiments, and the results were expressed as the average. Initially, the data were assessed via descriptive analysis (means and standard deviation) to obtain the description order of the variables. Subsequently, inferential analyses were performed to determine significant differences ($p \leq 0.05$) between the results obtained from different treatments (ANOVA followed by post hoc Tukey test or Kruskal-Wallis test). For this, the computational software SPSS 22 (Statistical Package for Social Sciences) was used.

3. Results and discussion

3.1 Identification of CCEO constituents

The GC-MS analysis of CCEO showed the presence of seven different constituents in amounts higher than one percent of the CCEO total mass (Table 1). The monoterpenes geranial (β -citral isomer) (29.2%) and neral (α -citral isomer) (27.0%) were found to be majority constituents of CCEO. Geranial (*trans*-citral; termed citral A) and neral (*cis*-citral;

termed citral B) are two geometric isomers of citral (3,7-dimethyl-2-6-octadienal) that are characterized as acyclic α,β -unsaturated monoterpenes. Early studies also found geranial and neral to be majority constituents of CCEO with amounts in a range of 35.1% - 52.8% for geranial and 30.9% - 41.9% for citral (Carmo et al., 2012; Lucena et al., 2013; Valeriano et al., 2012). Overall, the composition of the EOs obtained from the same vegetal species can vary in number and types of individual constituents primarily due to plant genetic diversity, seasonality, geographical location, extraction technique and time and condition of storage (Burt, 2004; Kumar et al., 2012).

3.2 *In vitro* assays

CHI and CCEO exhibited MIC of 8000 ppm and 5000 ppm, respectively, against *R. stolonifer*. These MICs are lower than those previously reported for CHI (10 and 20 mg/mL), oregano (10 μ L/mL), cinnamon (30 μ L/mL), clove (30 μ L/mL) and thyme (30 μ L/mL) EOs against *R. stolonifer* (Hernández et al., 2011; Santos et al., 2012). In light of the obtained MICs, CHI at 4000 ppm and CCEO at 1250 ppm were tested in further assays. The CHI concentration was set at 4000 ppm (1/2 x MIC) because it was the lowest tested concentration that was capable of forming a viscous solution with coating features to permit its application as a coating for tomato fruits. The CCEO concentration was set at 1250 ppm (1/4 x MIC) because researchers have stated that EOs could be incorporated at low concentrations in coating-forming solutions to minimize their impact on olfactory perception by consumers (Perdones et al., 2012).

The incorporation of CHI (4000 ppm) and CCEO (1250 ppm) alone or in combination in cultivation media resulted in a strong inhibition of *R. stolonifer* spore germination (85.9% - 97.8% inhibition) (Table 2). Although the incorporation of CHI or CCEO alone induced strong spore germination inhibition, the highest inhibition rates ($p \leq 0.05$) were noted when CHI and CCEO were assayed in combination. This suggests an enhanced inhibitory effect

against spore germination resulting from the combined application of these substances. The exposure of *R. stolonifer* spores to a mixture of CCEO (4000 ppm) and CHI (1250 ppm) at subinhibitory concentrations strongly affected the plasmatic membrane integrity (MI) of the spores over time (Fig. 1). The effects of CHI and CCEO on MI occurred in a time-dependent manner because the percentage of spores presenting damage in MI (as observed by the presence of red fluorescence) increased from approximately 8% (initial percent) to 47% at the end of the assessed exposure period. Overall, a linear and steady increase in the percent of spores presenting no damage in MI was observed over time. Otherwise, spores not exposed to CHI and CCEO did not present significant damage in MI overtime. A previous study detected damage of MI in 62% of the spores of *R. stolonifer* submitted to a 6-h treatment with CHI (2000 ppm) (Hernandez-Lauzardo et al., 2011). Changes in the MI of spores of *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola* were also induced by CHI (5000 ppm) (Liu et al., 2007). The rapid and severe effects of CHI and CCEO in combination against spore MI could explain the observed high rates of spore germination inhibition caused by these substances when assessed over a longer exposure time. The inhibition of spore germination is an important property of CHI and CCEO because the spores are essential structures for the survival and spread of pathogenic fungi in horticultural products, causing postharvest disease and losses (Sousa et al., 2013).

The incorporation of CHI (4000 ppm) and CCEO (1250 ppm) in combination in growth media resulted in a fungicidal effect toward *R. stolonifer* with the complete inhibition of fungal mycelial growth throughout the 90-h assessed exposure time (Fig. 2). CHI and CCEO assayed alone induced a similar ($p > 0.05$) inhibition of mycelial growth over time and demonstrated a clear fungistatic effect. *R. stolonifer* presented a normal and expected growth curve shape in control assays during the assessed incubation period. These results indicating rapid and steady inhibitory effects toward *R. stolonifer* mycelial growth (including

reproductive and vegetative structures) when CHI and CCEO were tested in combination are in accordance with the findings of the spore germination assays. In a previous study, the mixture of CHI (5000 ppm) and CCEO (10000 ppm) were similarly more effective in inhibiting the mycelial growth of *C. capsici* than CHI alone (Ali et al., 2015).

3.3 “*In situ*” assays

Due to the strong inhibition of spore germination and mycelial growth, CHI and CCEO were tested only in combinations at subinhibitory concentrations (CHI, 4000 ppm; CCEO, 1250 ppm) in assays to evaluate the effects of the coating on the severity of infection caused by *R. stolonifer* in fresh tomato fruit. Similar to *in vitro* assays, the coating composed of CHI (4000 ppm) and CCEO (1250 ppm) inhibited the growth of *R. stolonifer* in artificially inoculated tomato fruits in both curative and preventive testing (Fig. 3). However, in curative assays the inhibitory effect of the CHI-CCEO coating on the severity of disease caused by *R. stolonifer* in tomato fruit decreased over time, with no significant decrease ($p > 0.05$) in the development of infection in fruits compared with the control assays (uncoated fruit) at the end of the assessed storage period. In the preventive assays, the CHI-CCEO coating totally inhibited the appearance of visible signs of *R. stolonifer* infection until the 6th day of fruit storage, and from this time on the disease severity index was significantly lower ($p \leq 0.05$) than those observed for control assays. The lesion severity in the fruits infected with *R. stolonifer* was lower ($p \leq 0.05$) in the preventive assays than in the curative assays. Thus, the coating with CHI and CCEO more strongly delayed the onset of the disease (soft rot) caused by *R. stolonifer* in tomato fruit when the fruit were artificially contaminated after coating application. Likewise, a coating composed of CHI (10000 ppm) and tea tree EO (20000 ppm) more thoroughly inhibited *Penicillium italicum* infection on oranges in preventive assays than curative assays (Cháfer et al., 2012).

The delayed appearance of injuries due to *R. stolonifer* in tomato fruit coated with CHI and CCEO in preventive assays is noteworthy because the antifungal effects of potential synthetic fungicide replacers observed in *in vitro* studies have not always been confirmed in *in situ* studies. These differences are primarily attributed to the potential high volatility of the individual constituents of EOs and interactions between coating-forming components and vegetative tissue (Cháfer et al., 2012). The incorporation of EOs in CHI edible coatings is proposed to extend the shelf life of foods rather than the application of EOs individually because EOs constituents are continuously released over time on the food surface while maintaining a suitable concentration of antimicrobial components during storage (Outtara et al., 2000; Sousa et al., 2013). Researchers have stated that the individual constituents of EOs (e.g., citral) can penetrate the cell membrane of pathogenic fungi to induce a disturbance of several biological processes and ultimately delay or inhibit fungal colonization in fruits and the development of related diseases (Bakkali et al., 2008).

The tomato fruits were also evaluated for physicochemical quality aspects, namely weight loss, firmness, color, titratable acidity, pH, soluble solids and ascorbic acid, at the same intervals as those used to assess fungal infection (Table 3 and 4). The tomato fruits that were coated vs uncoated with CHI (4000 ppm) and CCEO (1250 ppm) showed no difference ($p > 0.05$) in the evaluated physicochemical quality parameters at all of the assessed storage time intervals, with exception of the color parameters L^* and b^* on the 4th and 8th day of storage. CHI-CCEO coated fruits presented greater lightness (L^* value) and smaller opacity (b^* value) than uncoated fruits. The uncoated and coated tomato fruits were predominantly red throughout storage, and under all experimental conditions, a decrease ($p \leq 0.05$) in the h^* value with concomitant increase in the C^* value provoked expected changes in color from red/orange to red over time (Table 4). This suggest that the coating composite of CHI-CCEO displayed no negative impact on lycopene formation in fruit, as the color changed from

orange-red to darker red during storage (Guerra et al., 2015). Still, the higher luminosity detected in CHI-CCEO coated tomato fruit may be associated with the luminosity and high transparency of CHI films (Ali et al., 2010).

Notably, the results of the physicochemical quality parameters in tomato fruit assessed in this study are in agreement with data from previous studies on healthy tomato fruit (Cramer et al., 2001; Tigist et al., 2013). Consistent weight loss and decreased firmness throughout the storage period is a normal physiological event in tomato fruit and could be related to the reduction of the water driving force during storage (Sánchez-González et al., 2011). However, the detected weight loss in coated and uncoated tomato fruit was lower than the maximum acceptable limit before a tomato fruit become unsalable, i.e. 6 - 7% (Nunes et al., 2008). The results for coated and uncoated tomato fruit showed an initial increase in titratable acidity, pH, ascorbic acid and soluble solids but a decrease in the later time intervals. These changes in pH values and titratable acidity could be because citric acid is the predominant organic acid in tomato fruits and accounts for 90% of acidity. During the maturation period, tomato fruits undergo an initial increase in the amount of citric acid with an expected decrease over time until full maturity (Thybo et al., 2006). Ascorbic acid content increases in tomato fruits with ripening and storage time; however, once the fruits are fully ripe, the ascorbic acid content begins to decrease (Tigist et al., 2013). For soluble solids, the values commonly obtained for different varieties of tomato fruit range from 4 to 6 °Brix and similarly present an initial increase during maturation period followed by a decrease over time (Cramer et al., 2001; Tigist et al., 2013).

The tomato fruits uncoated or coated with CHI-CCEO were subjected to acceptance, purchase intention and preference tests after 4 days of storage at room temperature (Table 5). The uncoated and CHI-CCEO coated tomato fruits received similar scores ($p > 0.05$) for appearance, texture, aftertaste and overall assessment. The fruit coated with CHI-CCEO

received higher scores ($p \leq 0.05$) for color than uncoated fruit; while the uncoated fruit received higher scores ($p \leq 0.05$) for aroma. However, for all assessed sensory parameters both uncoated and coated fruit received scores that fell in “liked slightly” or “liked moderately” categories. When the panelists were asked to indicate the intent to purchase, the responses were generally “possibly purchase” for both uncoated and coated fruit. Similarly, there was no difference ($p > 0.05$) in preference between the uncoated and coated fruits. Overall, these data indicate that although the uncoated and coated fruits received the lowest scores to color and aroma, respectively, these specific attributes did not impact negatively their purchase intention and preference by panelists. Similarly, a previous study found that the application of coatings composed of CHI and *Mentha* spp. essential oils did not impact negatively the general sensory acceptance of cherry tomato fruits (Guerra et al., 2015).

4. Conclusions

This study showed that the combined application of CHI and CCEO at subinhibitory concentrations exhibited strong antifungal effects against *R. stolonifer* as measured via the inhibition of the mycelial growth, spore germination and changes in spores membrane integrity. The application of CHI and CCEO as a coating prior to the contamination of fresh tomato fruit with *R. stolonifer* inhibited the severity of *Rhizopus* soft rot infection during storage. The tested coating maintained the general physicochemical and sensory quality characteristics of tomato fruits. Based on these results, the application of coatings composed of a combination of CHI and CCEO could be useful alternatives for controlling the soft rot caused by *R. stolonifer* in fresh tomato fruit. However, the anti-*R. stolonifer* efficacy of these treatments depends on whether the coatings are applied with a curative or preventive purpose on tomato fruit.

Acknowledgments

The authors are grateful to CNPq (Brazil) for financial support and CAPES for scholarships to the authors A.J.A. Athayde (master scholarship) and L.R.R. Berger (postdoctoral scholarship).

References

- Ali, A., Maqbool, M., Ramachandran, S., & Alderson, P.G. (2010). Gum arabic as a novel edible coating for enhancing shelf-life and improving postharvest quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 58, 42–47.
- Ali, A., Noh, N.M., & Mustafa, M.A. (2015). Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. *Food Packaging and Shelf-life*, 3, 56–61.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis*. (2005). Washington, DC.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology*, 256, 2166-2174.
- Bautista-Baños, S.B., Molina, E.B., & Barrera-Necha, L.L. (2014). *Botrytis cinerea* (gray mold). In: Bautista-Baños, S. (Ed.), *Postharvest decay*, pp.131-144.
- Berger, L.R.R., Stamford, T.C.M., Stamford-Arnaud, T.M., Alcântara, S.R.P., Silva, A.C., Silva, A.M., Nascimento, A.E., & Campos-Takaki, G.M. (2014). Green conversion of agroindustrial wastes into chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* Strains. *International Journal of Molecular Science*, 15, 9082-9102.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.

- Carmo, E. S., Pereira, F. O., Moreira, A. C. P., Brito, L. L., Gayoso, C. W., Costa, J. G. M., & Lima, E. O. (2012). Óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: um produto natural promissor contra *Malassezia* spp. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 71, 91-386.
- Cháfer, M., Sanchez-Gonzalez, L., González-Martínez, C.H., & Chiralt, A. (2012). Fungal decay and shelf-life of oranges coated with chitosan and bergamot, thyme, and tea tree essential oils. *Journal of Food Science*, 77, 182-187.
- Cramer, M.D., Oberholzer, J.A., & Combrink, N.J. (2001). The effect of supplementation of root zone dissolved inorganic carbon on fruit yield and quality of tomatoes (cv 'Daniela') grown with salinity. *Scientia Horticulturae*, 89, 269–289
- FAO - Food and agriculture organization of the united nations. FAOSTAT. (2014). Available in: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Access: 07 january 2015.
- Guerra, I.C.D., de Oliveira, P.D.L., Pontes, A.L.S., Lúcio, A.S.S.C, Tavares, J.F., Barvosa-Filho, J.M., Madruga, M.S., & Souza, E.L. (2015). Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha x villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruits. *International Journal of Food Microbiology*, in press.
- Hernández, A. M.A., Necha, L.L.B., Lauzardo, A.N.H., & Del Valle, M.G.V. (2011). Actividad antifúngica del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill., agente causal de la pudrición blanda del tomate. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13, 127-134.
- Hernández-Lauzardo, A.N., Vega-Pérez, J., Valle, M.G.V., Sánchez, N.S., Peña, A., & Guerra-Sánchez, G. (2011). Changes in the functionality of plasma membrane of *Rhizopus stolonifer* by addition of chitosan. *Journal of Phytopathology*, 159, 563–568.

- Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., & Satya, S. (2012). Efficacy of *Mentha piperita* and *Mentha citrate* essential oils against housefly *Musca domestica* L. *Industrial Crops and Products*, 39, 106-112.
- Liu, J., Tia, N, S., Meng, X., & Xu , Y. (2007). Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 300-306.
- Lira-De León, K.I., Ramírez-Mares, M.V., Sánchez-López, V., Ramírez-Lepe, M., Salas-Coronado, R., Santos-Sánchez, N.F., Valadez-Blanco, R., & Hernández-Carlos, B. (2014). Effect of crude plant extracts from some Oaxacan flora on two deleterious fungal phytopathogens and extract compatibility with a biofertilizer strain. *Frontiers in Microbiology*, 5, 383-393.
- Lucena, Y.B., Leite, A.C.A.S, Oliveira, K.A., Garino Junior, F.; Rodrigues, O.G., & Queiroga Neto, V. (2013). Avaliação da atividade do óleo essencial do capim santo (*Cymbopogon citratus* DC, Stapf) em bactérias cariogênicas. *Revista Brasileira de Biologia e Farmácia*, 9, 114-129.
- Marinelli, E., Orzali, L., Lotti, E., & Riccioni, L. (2012). Activity of some essential oils against pathogenic seed borne fungi on legumes. *Asian Journal of Plant Pathology*, 6, 66-67.
- Meng, X., Li, B., Liu, J., & Tian, S., (2008). Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan pre-harvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry*, 106, 501-508.
- Nunes, M.C.N. (2008). Nunes, M.C.N. (ed). Solanaceous and other fruit vegetables. Tomato. In: *Color atlas of postharvest quality of fruits and vegetables*. Blackwell Publishing, Iowa, p.239.

- Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., & Hosseini, S.M.H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 120, 193-198.
- Oliveira, C.E.V., Magnani, M., Sales, C.V., Pontes, A.L.S., Campos-Takaki, G.M., Stamford, T.C.M., & Souza, E.L. (2014). Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 171, 54–61.
- Outtara, B., Simard, R. E., Piette, G., Begin, A., & Holley, R. A. (2000). Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. *Journal of Food Science*, 65, 768-773.
- Perdones, A., Sanchez-Gonzalez, L., Chiralt, A., & Vargas, M. (2012). Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of Strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70, 32–41.
- Ramos-García, M., Bosquez-Molina, E., Hernández-Romano, J., Zavala-Padilla, G., Terrés-Rojas, E., Alia-Tejacal, I., Barrera-Necha, L., Hernández-López, M., & Bautista-Baños, S. (2012). Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds, to control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5 α in fresh tomatoes. *Crop Protection*, 38, 1-6.
- Sánchez-González, L., Chafer, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C., (2010). Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate Polymers*, 82, 277-283.
- Sánchez-González, L., Pastor, C., Vargas, M., Chiralt, A., González-Martínez, C., & Cháfer, M. (2011). Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 60, 57–63.

- Sandes, J.M., Fontes, A., Silva, C.G.R., Castro, M.C.A.B., Lima-Junior, C.G., Silva, F.P.L., Vasconcellos, M.L.A.A., & Figueiredo, R.C.B.Q. (2014). *Trypanosoma cruzi* Cell Death Induced by the Morita-Baylis-Hillman Adduct 3-Hydroxy-2-Methylene-3-(4-Nitrophenylpropanenitrile). *Plos One*, 9, e93936.
- Santos, N.S.T., Aguiar, A.J.A.A., Oliveira, C.E.V.; Sales, C.V.; Silva, S.M.; Silva, R.S.; Stamford, T.C.M.; & Souza, E.L. (2012). Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L). *Food Microbiology*, 32, 345-353.
- Shao, X.F. Cao, B., Xu, F., Xie, S., Yu, D., & Wang, H. (2015). Effect of postharvest application of chitosan combined with clove oil against citrus green mold. *Postharvest Biology and Technology*, 99, 37–43.
- Sousa, L.L., Andrade, S.C.A., Athayde, A.J.A.A., Oliveira, C.E.V., Sales, C.V., Madruga, M.S., & Souza, E.L. (2013). Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic *Aspergillus flavus* and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes). *International Journal of Food Microbiology*, 165, 312–318.
- Stevens, C., Liu, J., Khan, V.A., Lu, J.Y., Kabwe, M.K., Wilson, C.L., Igwegbe, E.C.K., Chalutz, E. , & Droby, S. (2004). The effects of low-dose ultraviolet light-C treatment on polygalacturonase activity, delay ripening and *Rhizopus* soft rot development of tomatoes. *Crop Protection*, 23, 551-554.
- Suhr, K.I., & Nielsen, P.V. (2003). Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 665-674.

- Thybo, A.K., Edelenbos, M., Christensen, L. P., Sorensen, J.N.; & Thorupkristensen, K. (2006). Effect of organic growing systems on sensory quality and chemical composition of tomatoes. *LWT- Food Science and Technology*, 39, 835-843.
- Tigist, M., Workneh, T., & Woldetsadik, K. (2013). Effects of variety on the quality of tomato stored under ambient conditions. *Journal of Food Science and Technology*, 50, 477-486.
- Valencia-Chamorro, S.A., Pérez-Gago, M.B., Del Rio, M.A., & Palou, L.L. (2009). Curative and preventive activity of hydroxypropylmethylcellulose-lipid edible composite coatings containing antifungal food additives to control citrus postharvest green and blue moulds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2770–2777.
- Valeriano, C.I., Piccoli, R.H., Cardoso, M.G., & Alves, E. (2012). Antimicrobial activity of essential oils against sessile and planktonic pathogens of food source. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14, 57-67.
- Wang, L., Liu, F., Jiang, Y., Chai, Z., Li, P., Cheng, Y., Jing, H., & Leng, X. (2011). Synergistic antimicrobial activities of natural essential oils with chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12411–12419
- Wilkinson, J.M., & Cavanagh, M.A. (2005). Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. *Phytotherapy Research*, 19, 643–646.
- Xing,Y., Xu, Q., Che, Z., Li, X., & Li, W. (2011). Effects of chitosan-oil coating on blue mold disease and quality attributes of jujube fruits. *Food & Functional*, 2, 466–474.

Figure 1. Effects of chitosan (CHI, 4000 ppm) and *C. citratus* essential oil (CCEO, 1250 ppm) on the plasma membrane integrity of the spores of *R. stolonifer* URM 3728 in combination or not for different exposure durations (0, 2, 4 and 6 h) at 28 °C. (♦): CHI 0 ppm and CCEO 0 ppm (control). (■): CHI at 4000 ppm and CCEO at 1250 ppm.

Figure 2. Effects of chitosan (CHI, 4 mg/mL) and *C. citratus* essential oil (CCEO, 1.25 µL/mL) alone or in combination on *R. stolonifer* URM 3728 mycelial growth over 90 h (28 °C). (♦): CHI 0 ppm and CCEO 0 ppm (control). (■): CHI at 4000 ppm. (▲): CCEO at 1250 ppm. (●): CHI at 4000 ppm and CCEO 1250 ppm.

Figure 3. Disease severity caused by *R. stolonifer* URM 3728 and by native mycoflora on tomato fruits coated and uncoated with chitosan (CHI 4000 ppm) and *C. citratus* essential oil (CCEO 1250 ppm) and stored at room temperature (28 °C) for 8 days. The disease severity is expressed as the severity index in preventive and curative assays. (+): Control preventive effect. (■): Control curative effect. (●): CHI 4000 ppm and CCEO 1250 ppm curative effect. (▲): CHI 4000 ppm and CCEO 1250 ppm preventive effect.

Table 1. GC-MS analysis of *C. citratus* essential oil (constituents detected in concentration \geq 1%).

Constituents	Percent of essential oil total mas
camphene	1.41
sulcatol	2.10
4-nonanona	1.31
linalool	1.21
geranial (α -citral)	29.2
nerol	5.6
neral (β -citral)	27.0

Table 2. Inhibition percent (mean values \pm standard deviation) of *R. stolonifer* URM 3728 spore germination in liquid medium containing chitosan and/or *C. citratus* essential oil at different concentrations alone or in combination (18 h of incubation, 28 °C). Results expressed as the percent inhibition rates of spore germination in relation to the control assay.

Treatments	Inhibition of spore germination
Control	0.0% (\pm 0.0%) ^a
Chitosan - 4000 ppm	91.5% (\pm 2.1%) ^b
<i>C. citratus</i> essential oil - 1250 ppm	85.9% (\pm 2.3%) ^b
Chitosan (4000 ppm) + <i>C. citratus</i> essential oil (1250 ppm)	97.8% (\pm 2.5%) ^c

^{a-c}: For each assay, different superscript uppercase letters in the same and column denote differences ($p \leq 0.05$) between the mean values based on Kruskal-Wallis test

Table 3. Mean values (\pm standard deviation) for physicochemical quality parameters in tomato fruits uncoated and coated with chitosan (CHI, 4000 ppm) and *C. citratus* essential oil (CCEO, 1250 ppm) and stored at room temperature (28 °C) for 8 days.

Treatments	Days of storage		
	0	4	8
Weight loss (g)			
Control	0.0 (\pm 0.0) ^a	1.3 (\pm 0.2) ^b	4.2 (\pm 0.7) ^c
CHI 4000 ppm+ CCEO 1250 ppm	0.0 (\pm 0.0) ^a	1.3 (\pm 0.1) ^b	4.2 (\pm 0.2) ^c
Firmness (N/mm)			
Control	8.7 (\pm 1.8) ^a	7.5 (\pm 1.2) ^b	6.3 (\pm 0.9) ^c
CHI 4000 ppm+ CCEO 1250 ppm	8.3 (\pm 2.1) ^a	7.6 (\pm 2.2) ^b	6.1 (\pm 1.4) ^c
Titrateable acidity (mmol H⁺/100 g of fruit)			
Control	0.3 (\pm 0.0) ^a	0.5 (\pm 0.0) ^c	0.4 (\pm 0.0) ^b
CHI 4000 ppm+ CCEO 1250 ppm	0.4 (\pm 0.1) ^a	0.4 (\pm 0.1) ^b	0.3 (\pm 0.0) ^a
pH			
Control	4.8 (\pm 0.1) ^a	5.0 (\pm 0.0) ^b	4.6 (\pm 0.0) ^a
CHI 4000 ppm+ CCEO 1250 ppm	5.0 (\pm 0.0) ^b	5.3 (\pm 0.0) ^c	4.8 (\pm 0.0) ^a
Soluble solids (°Brix)			
Control	4.8 (\pm 0.1) ^a	5.3 (\pm 0.1) ^b	4.5 (\pm 0.1) ^a
CHI 4000 ppm+ CCEO 1250 ppm	4.7 (\pm 0.0) ^b	5.2 (\pm 0.1) ^c	4.3 (\pm 0.0) ^a
Ascorbic acid C (g/100 g)			
Control	6.4 (\pm 0.2) ^a	9.2 (\pm 0.4) ^b	7.2 (\pm 0.3) ^c
CHI 4000 ppm+ CCEO 1250 ppm	6.5 (\pm 0.7) ^a	8.8 (\pm 0.5) ^b	6.2 (\pm 0.3) ^a

Control: CHI 0 ppm + CCEO: 0 ppm

^{a-c} For each treatment, different superscript lowercase letters in the same row denote differences ($p \leq 0.05$) between the mean values based on Tukey's test

Superscript capital letters were not presented in the same column because no differences between mean values (for each storage period) were detected based on Student t test ($p \leq 0.05$)

Table 4. Mean values (\pm standard deviation) for color parameters in tomato fruit uncoated and coated with chitosan (CHI, 4000 ppm) and *C. citratus* essential oil (CCEO, 1250 ppm) and stored at room temperature (28 °C) during 8 days.

Treatments	Days of storage		
	0	4	8
	L*		
Control	39.5 (\pm 1.6) ^{aA}	40.5 (\pm 1.2) ^{aB}	41.8 (\pm 1.4) ^{aA}
CHI 4000 ppm+ CCEO 1250 ppm	39.9 (\pm 1.2) ^{bA}	42.3 (\pm 1.5) ^{aA}	41.0 (\pm 1.8) ^{aA}
	a*		
Control	23.3 (\pm 1.6) ^{aA}	24.9 (\pm 1.3) ^{aA}	31.9 (\pm 1.0) ^{bB}
CHI 4000 ppm+ CCEO 1250 ppm	23.6 (\pm 1.3) ^{aA}	25.6 (\pm 0.5) ^{bA}	27.8 (\pm 1.4) ^{cA}
	b*		
Control	23.9 (\pm 0.7) ^{aA}	27.6 (\pm 2.1) ^{bA}	29.4 (\pm 1.9) ^{bB}
CHI 4000 ppm+ CCEO 1250 ppm	27.8 (\pm 1.5) ^{bB}	24.8 (\pm 2.0) ^{aB}	27.0 (\pm 1.5) ^{bA}
	C*ab		
Control	34.1 (\pm 1.7) ^{aA}	37.5 (\pm 2.7) ^{bA}	43.6 (\pm 1.9) ^{cA}
CHI 4000 ppm+ CCEO 1250 ppm	35.4 (\pm 1.0) ^{aA}	36.9 (\pm 1.3) ^{bA}	42.5 (\pm 1.8) ^{cA}
	h ab*		
Control	44.2 (\pm 1.6) ^{aA}	43.9 (\pm 2.7) ^{aA}	42.6 (\pm 1.6) ^{aA}
CHI 4000 ppm+ CCEO 1250 ppm	46.0 (\pm 1.9) ^{bA}	45.4 (\pm 2.6) ^{bA}	42.7 (\pm 1.1) ^{aA}

Control: CHI 0 ppm + CCEO: 0 ppm

^{a-c} For each treatment, different superscript lowercase letters in the same row denote differences ($p \leq 0.05$) between the mean values according to Tukey's test

^{A-B} For each storage period, different superscript capital letters in the same column denote differences ($p \leq 0.05$) between the mean values based on the Student t test

Table 5. Mean values (\pm standard deviation) for sensory parameters in tomato fruit uncoated and coated with chitosan (CHI, 4000 ppm) and *C. citratus* essential oil (CCEO, 1250 ppm) and stored at room temperature (28 °C) for 4 days.

Parameters	Treatments	
	CHI 4000 ppm + CCEO1250 ppm	Control
Appearance	7.5 (\pm 1.4) ^a	7.5 (\pm 1.3) ^a
Color	7.9 (\pm 0.9) ^b	7.2 (\pm 1.7) ^a
Flavor	6.7 (\pm 2.2) ^a	7.3 (\pm 1.8) ^b
Taste	7.3 (\pm 1.6) ^a	7.6 (\pm 1.4) ^a
Aftertaste	6.9 (\pm 1.7) ^a	7.1 (\pm 1.4) ^a
Texture	7.3 (\pm 1.7) ^a	7.7 (\pm 1.2) ^a
Overall acceptance	7.4 (\pm 1.5) ^a	7.7 (\pm 1.0) ^a

Control: CHI 0 ppm + CCEO: 0 ppm

^{a-c} For each assessed attribute, different superscript letters in the same row denote differences ($p \leq 0.05$) between the mean values based on the Student t test

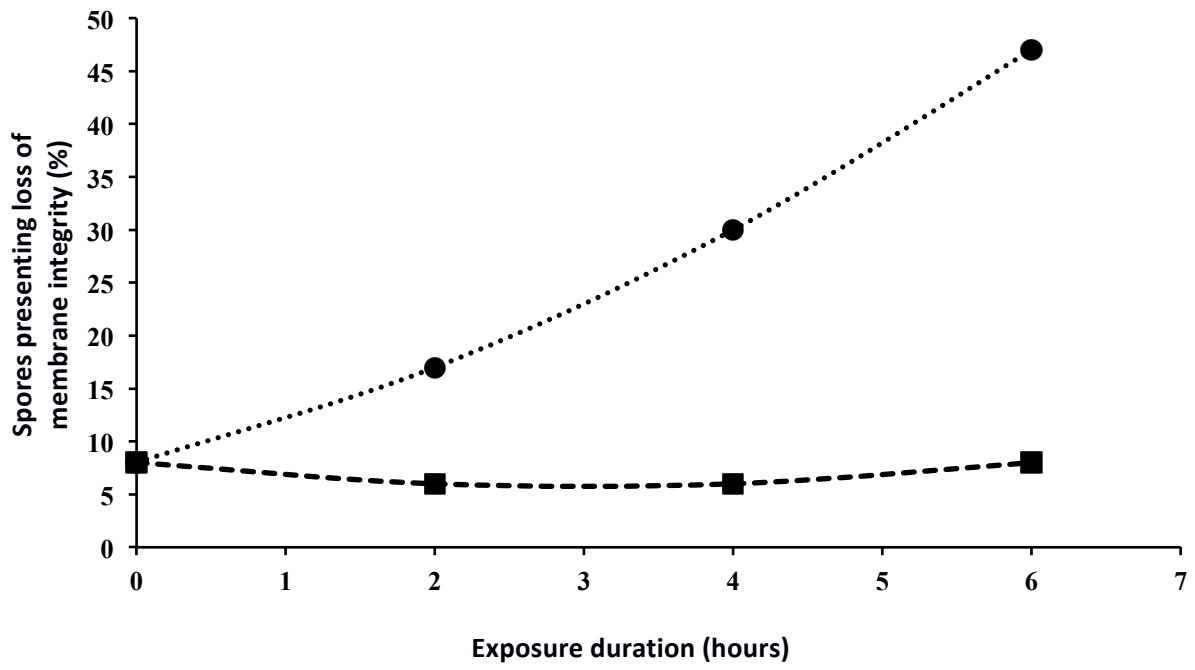


Figure 1.

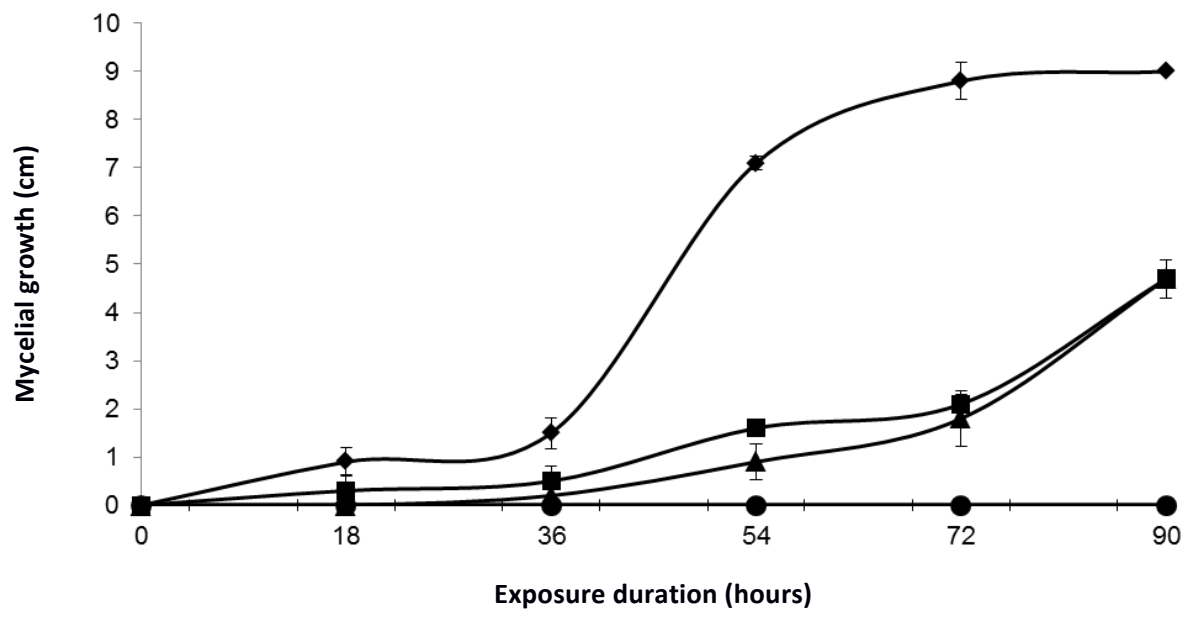


Figure 2.

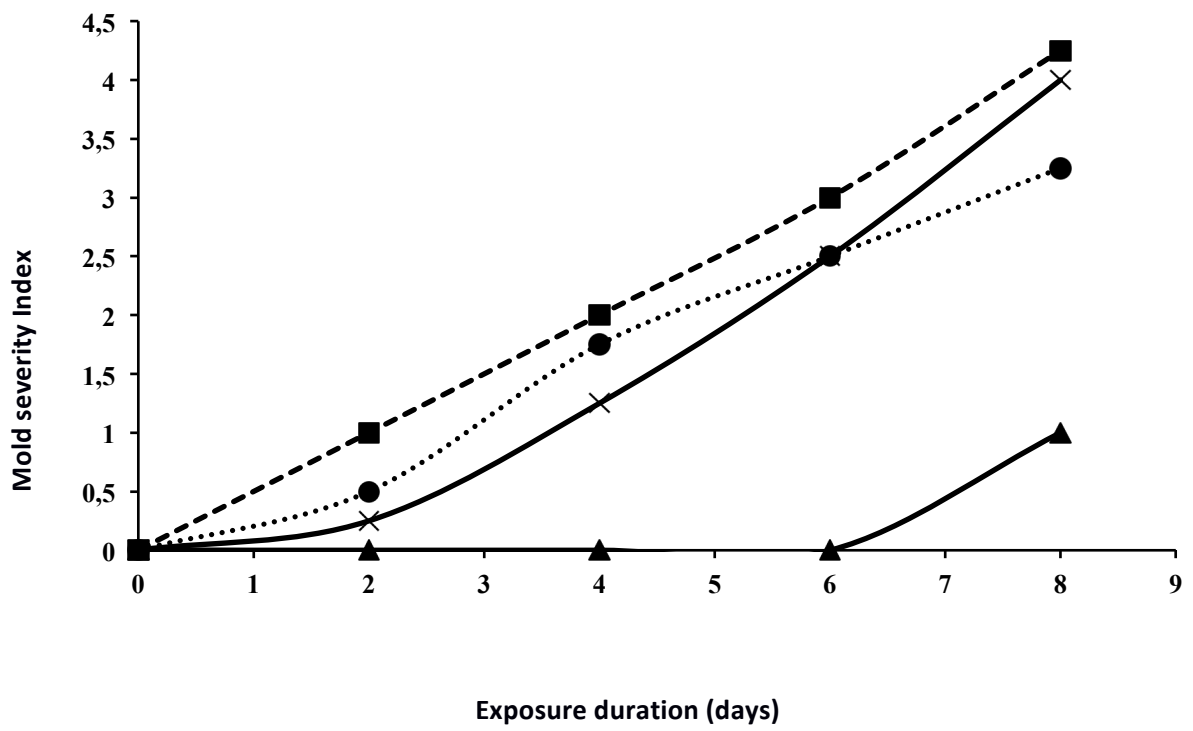


Figure 3.