

PRISCILA DINAH LIMA OLIVEIRA

APLICAÇÃO DE REVESTIMENTOS DE QUITOSANA
INCORPORADOS DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon*
citratatus (D. C.) Stapf. PARA O CONTROLE DE ANTRACNOSE
EM FRUTOS

JOÃO PESSOA - PB

2017

O48a Oliveira, Priscila Dinah Lima.
Aplicação de revestimentos de quitosana incorporados de
óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf. Para o
controle de antracnose em frutos / Priscila Dinah Lima Oliveira.
- João Pessoa, 2017.
81 f.: il. -

Orientador: Evandro Leite de Souza.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/ CCS

1. Nutrição. 2. Doenças pós-colheita. 3. *Colletotrichum*.
4. Cultivo de Frutas. 5. Capim-limão. 6. Quitosana.
7. Coberturas Comestíveis. I. Título.

UFPB/BC

CDU: 612.39(043)

PRISCILA DINAH LIMA OLIVEIRA

APLICAÇÃO DE REVESTIMENTOS DE QUITOSANA
INCORPORADOS DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon*
citratatus (D. C.) Stapf. PARA O CONTROLE DE ANTRACNOSE
EM FRUTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Área de Concentração: Ciências da Nutrição
Linha de Pesquisa: Análise e Controle de Qualidade de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

JOÃO PESSOA - PB
2017

PRISCILA DINAH LIMA OLIVEIRA

APLICAÇÃO DE REVESTIMENTOS DE QUITOSANA INCORPORADOS DE ÓLEO
ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. PARA O CONTROLE DE
ANTRACNOSE EM FRUTOS

Dissertação aprovada em 28 / 06 /2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Evandro Leite de Souza – PPGCN/CCS/UFPB

Coordenador da Banca Examinadora



Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira – PPGCN/CCS/UFPB

Examinador Interno



Profa. Dra. Ingrid Conceição Dantas Guerra

Examinador Externo



Profa. Dra. Jailane de Souza Aquino – PPGCN/CCS/UFPB

Examinador Suplente Interno



Prof. Dr. Carlos Eduardo Vasconcelos de Oliveira

Examinador Suplente Externo

*Aos meus Pais Nelson e Jane,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Eterno e Triúno, Deus de toda providência, pela doce salvação em Cristo, por Sua inescrutável soberania, por Sua boa, perfeita e agradável vontade e graça infinita em todo o período de Mestrado e em cada detalhe dos meus dias. Mil graças!

Ao meu pai, Nelson, pela companhia e auxílio na compra dos materiais do presente trabalho, mesmo, tantas vezes, pelas madrugadas; pelas inúmeras idas e vindas, e por toda disposição. À minha mãe, Jane, por ser um exemplo de piedade e dedicação; pelas ricas instruções, por todos os mimos, e apoio em qualquer tempo. Aos dois, pelo amor incondicional, por todo investimento e abnegação. À minha irmã, Rebeca, pela inabalável amizade e por ter segurado as pontas tantas vezes, a fim de que me dedicasse com mais afinco a este trabalho. A toda minha família, muito obrigada.

Ao meu noivo Arlley, pelo amor, cuidado, atenção e paciência irrestritos; por atravessar os dias dessa jornada da vida ao meu lado, se alegrando comigo nas alegrias e aquietando meu coração nos dias gris. Grata por sempre me conduzir a Cristo e por tudo até aqui.

Às minhas amigas, em especial a Andreza, Maria Eunice, Céu e Lycia por serem como óleo e perfume que alegram o coração e, especialmente, ferros que afiam este ferro. Obrigada por tornarem meus dias mais leves!

Ao Professor Evandro Leite de Souza, por todo investimento e anos de orientação. Obrigada pela paciência, pelas correções e pelo suporte, não apenas neste trabalho, mas em toda minha vida acadêmica. Sou muito grata. À Professora Maria Lúcia, pelo enorme coração e pelas oportunidades ofertadas a mim. Jamais esquecerei.

À Professora Ingrid Dantas, por, mais uma vez, se fazer presente em minha vida acadêmica, e juntamente à Professora Elieidy Gomes, trazer ricas contribuições a este trabalho. Aos Professores Carlos Eduardo e Jailane Aquino, por aceitarem o convite de compor a banca.

Ao Professor Marcos Câmara, pela disponibilidade, tanto na obtenção de materiais como em contribuições a este trabalho.

À Kataryne, por ter sido o meu braço direito; pela atenção, pela prontidão em me ajudar e tornar mais simples as etapas deste trabalho. À Raquel Berger, pelas dúvidas sanadas e por todo apoio. À Selma, pelo auxílio nas análises e pela boa companhia.

Ao Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos, por ter sido minha casa durante anos de pesquisa, em especial aos meus colegas de “Labinho” deste período de Mestrado, Maiara, Sônia, Thaty, Andréa, Isabella, Fernanda, Jossana, e os já supracitados aqui. Aos meus colegas de Mestrado, em especial à turma de Alimentos, pelo compartilhar nos conhecimentos no dia a dia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, nas pessoas de Sr. Carlos e Sr. Marcos, pelo trabalho desempenhado.

À Unidade de Caracterização e Análise - Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos – UFPB e ao Professor Josean Fachine Tavares, pelo suporte na análise de caracterização do óleo essencial.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

A todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho,

Muito obrigada.

RESUMO

Diversas desordens podem acometer frutos, especialmente na fase de pós-colheita, destacando-se a antracnose, causada por fungos pertencentes ao gênero *Colletotrichum*. O controle da antracnose tem sido feito basicamente por meio do uso de fungicidas sintéticos, os quais acarretam impactos negativos ao meio ambiente e à saúde dos consumidores. Nesse sentido, outros métodos têm sido estudados como alternativas a esses compostos, incluindo os óleos essenciais (OEs), a exemplo do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf (OECC), e de polímeros com capacidade de formar revestimentos comestíveis, como a quitosana (QUI), os quais possuem reconhecidas propriedades antifúngicas. Nesse estudo, o objetivo foi avaliar a eficácia da aplicação de revestimento a base de QUI e OECC no controle de antracnose em goiaba cultivar (cv.) Paluma, manga cv. Tommy Atkins e mamão cv. Papaya causada por *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. siamense* e *C. karstii*. Foram realizadas análises de identificação dos constituintes do OECC; avaliação dos efeitos *in vitro* da QUI e do OECC isolados e em combinação sobre o crescimento micelial radial e do tipo de interação (aditiva, sinérgica ou antagônica) estabelecida por estas substâncias em combinação; e ensaios para verificação do efeito de revestimentos a base de QUI e OECC sobre o desenvolvimento de antracnose causadas pelas diferentes espécies de *Colletotrichum* testadas em goiaba, manga e mamão armazenados a 25 °C durante 12 dias. Um total de 30 constituintes ($\geq 0,1\%$ da massa total) foram identificados no OECC. Geranial (51,39%) e neral (29,29%) foram encontrados como constituintes majoritários do OECC. O OECC (2,5; 1,5; 0,6; 0,3 ou 0,15 $\mu\text{L/mL}$) inibiu o crescimento micelial fúngico (3 – 100%) de todas as cepas de *Colletotrichum* testadas em meio laboratorial (Ágar Batata Dextrose). Diferentes combinações de QUI (7,5; 5 ou 2,5 mg/mL) e OECC (1,25; 0,6; 0,3 ou 0,15 $\mu\text{L/mL}$) apresentaram efeito fungicida (inibição 100%) frente às cepas fúngicas testadas. As diferentes combinações de QUI e OECC exibiram interações de efeito aditivo ou sinérgico. A aplicação de revestimentos a base de QUI (5 mg/mL) e OECC (0,6; 0,3 ou 0,15 $\mu\text{L/mL}$) causou redução do desenvolvimento de lesões típicas de antracnose em goiaba (33 – 100%), manga (63 – 100%) e mamão (28 – 100%) artificialmente contaminados com qualquer uma das espécies de *Colletotrichum* testadas durante todo o período de armazenamento, sendo a combinação QUI 5 mg/mL + OECC 0,6 $\mu\text{L/mL}$ aquela que apresentou os efeitos mais expressivos. O percentual de redução do diâmetro da lesão de antracnose (PRLA%) nos frutos revestidos com as combinações de QUI e OECC foi similar ou maior àquele observado quando os frutos foram tratados com os fungicidas sintéticos tiofanato-metílico e difenoconazol. Estes resultados indicam que a aplicação de revestimentos contendo combinações sinérgicas de QUI e OECC pode ser considerada uma tecnologia alternativa para o controle de antracnose em frutos, em especial em goiaba cv. Paluma, manga cv. Tommy Atkins e mamão cv. Papaya.

Palavras-chave: doenças pós-colheita, *Colletotrichum*, capim-limão, quitosana, coberturas comestíveis.

ABSTRACT

Several disorders can affect the fruits, especially in the postharvest phase, highlighting a cause of anthracnose by fungi belonging to the genus *Colletotrichum*. The control of anthracnose has been done basically through the use of synthetic fungicides, which have negative impacts on the environment and the health of consumers. In this sense, other methods have been studied as alternatives to these compounds, including essential oils (EOs), such as essential oil of *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf (CCEO), and polymers with ability to form edible coatings, such as chitosan (CHI), which are recognized as antifungal properties. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of the application of the coating based on CHI and CCEO in the control of anthracnose in guava cultivar (cv.) Paluma, manga cv. Tommy Atkins and papaya cv. Papaya caused by *C. asianum*, *C. fruticola*, *C. tropicale*, *C. siamense* and *C. karstii*. Analysis were performed to identify the constituents of the CCEO; evaluation of the *in vitro* effects of CHI and OECC alone and in combination on radial mycelial growth and the type of interaction established by these combination substances (additive, synergistic or antagonistic); and assays to verify the effect of coatings based on CHI and CCEO on the development of anthracnose caused by different species of *Colletotrichum* tested in guava, mango and papaya stored at 25 ° C for 12 days. CCEO (0.15, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5 L/mL) inhibited fungal mycelial growth (3 - 100%) of all *Colletotrichum* strains tested in laboratory medium (Potato Dextrose Agar). Different combinations of CHI (2.5, 5 or 7.5 mg / mL) and CCEO (0.15, 0.3, 0.6 or 1.25 µL / mL) had a fungicidal effect (100% inhibition) against all fungal strains. A total of 30 constituents ($\geq 0.1\%$ of the total mass) were identified in the CCEO. Geranial (51.39%) and neral (29.29%) were found as major constituents of the CCEO. CCEO (2.5, 1.5, 0.6, 0.3 or 0.15 µL / mL) inhibited fungal mycelial growth (3 - 100%) of all *Colletotrichum* strains tested in laboratory medium (Potato Dextrose Agar). Different combinations of CHI (7.5, 5 or 2.5 mg / mL) and CCEO (1.25, 0.6, 0.3 or 0.15 µL / mL) showed a fungicidal effect (100% inhibition). Application of CHI (5 mg / mL) and CCEO (0.6, 0.3 or 0.15 µL / mL) coatings resulted in reduced development of typical anthracnose lesions in guava (33 - 100%), mango (63 - 100%) and papaya (28 - 100%) artificially contaminated with any of the *Colletotrichum* species tested during the entire storage period. The CHI 5 mg / mL + CCEO 0.6 µL / mL combination was the most expressive. The percent reduction in the diameter of the anthracnose lesion (PRAL%) in the fruits coated with the combinations of CHI and CCEO was similar to or greater than that observed when the fruits were treated with the synthetic thiophanate-methyl fungicides and difenoconazole. These results indicate that the application of coatings contains synergistic combinations of CHI and CCEO may be considered an alternative technology for the control of anthracnose in fruits, especially in guava cv. Paluma, mango cv. Tommy Atkins and papaya cv. Papaya.

Keywords: postharvest diseases, *Colletotrichum*, lemon grass, chitosan, edible coatings.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos que abordam o controle de fungos patógenos pós-colheita por meio da aplicação de óleos essenciais.....26

Tabela 2 - Estudo que avaliaram o controle de patógenos pós-colheita por meio da aplicação combinada de óleos essenciais e quitosana em frutos.....30

APÊNDICE A – ARTIGO I

Table 1 - Constituents identified in *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. essential oil (constituents detected at a concentration $\geq 0.1\%$).....72

Table 2 - Effects of chitosan (CHI) and *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. essential oil (CCEO) alone or in combinations on mycelial growth inhibition (MGI%) of different *Colletotrichum* species and their kind of interaction, as measured by Abbott method.....73

Table 3 - Percentage (average; $\pm$ standard deviation) of anthracnose lesion diameter reduction in guava cv. Paluma coated with combinations of chitosan (CHI) and *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. essential oil (CCEO) or treated with synthetic fungicides (thiophanate-methyl or difenoconazole) and inoculated with different pathogenic *Colletotrichum* species stored at 25 °C during 12 d.....75

Table 4 - Percentage (average; $\pm$ standard deviation) of anthracnose lesion diameter reduction in mango cv. Tommy Atkins coated with combinations of chitosan (CHI) and *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. essential oil (CCEO) or treated with synthetic fungicides (thiophanate-methyl or difenoconazole) and inoculated with different pathogenic *Colletotrichum* species stored at 25 °C during 12 d.....76

Table 5 - Percentage (average; $\pm$ standard deviation) of anthracnose lesion diameter reduction in papaya cv. Papaya coated with combinations of chitosan (CHI) and *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. essential oil (CCEO) or treated with synthetic fungicides (thiophanate-methyl or difenoconazole) and inoculated with different pathogenic *Colletotrichum* species stored at 25 °C during 12 d.....77

S1 - Percent of radial mycelial growth inhibition (MGI%) of different *Colletotrichum* species after a 7-d exposure period to different concentrations of *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. essential oil (CCEO) in solid medium (25 °C).....78

S2 - Effects of chitosan (CHI) and *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. essential oil (CCEO) alone or in combination on different on mycelial growth inhibition (MGI%) of different *Colletotrichum* species and their kind of interaction, as measured by Abbott method.....79

S3 - Anthracnose lesion inhibition in mango cv. Tommy Atkins, papaya cv. Papaya and guava cv. Paluma coated with the combination of chitosan (Chi) and *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf. essential oil (CCEO) and inoculated with different *Colletotrichum* species stored at 25 °C for 12 d. (A) negative control - lesion severity (uncoated fruit) in guava cv. Paluma;

(AA) guava cv. Paluma coated with the combination of Chi 5 mg/mL and CCEO 0.6 µL/mL.;
(B) negative control - lesion severity (uncoated fruit) in mango cv. Tommy Atkins; (BB)
mango cv. Tommy Atkins coated with the combination of Chi 5 mg/mL + CCEO 0.6 µL/mL;
(C) negative control - lesion severity (uncoated fruit) in papaya cv. Papaya; (CC) papaya cv.
Papaya coated with the combination of Chi 5 mg/mL and CCEO 0.6 µL/mL.....80

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Características das lesões de antracnose desenvolvidas em mangas.....	19
Figura 2 - Características das lesões de antracnose desenvolvidas em mamão.....	19
Figura 3 - Características das lesões de antracnose desenvolvidas em goiaba.....	19
Figura 4 - Estrutura química da quitosana.....	21
Figura 5 - Planta de <i>Cymbopogon citratus</i>	27
Figura 6 - Estrutura química do citral. Isômero geranial à esquerda e neral à direita.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABD - Ágar Batata Dextrose

CG/MS - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa

cv. - Cultivar

DMSO - Dimetil-sulfóxido

EMPASA - Empresa Paraibana de Abastecimentos e Serviços

FDA - Food and Drug Administration

GRAS - Geralmente Reconhecidos como Seguros

HCl a 0,1M- Ácido clorídrico a 0,1 molar

IA - Índice Abbott

i.a. - ingrediente ativo

ICM% - Percentual de inibição do crescimento micelial

Ltda - Limitada

NaOH a 3M- Hidróxido de Sódio a 3 molar

OEes - Óleos essenciais

OECC - Óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf.

pH – Potencial hidrogeniônico

PRLA% – Percentual de redução do diâmetro da lesão de antracnose

QUI - Quitosana

USDA - United States Department of Agriculture

v/v – volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 ASPECTOS MERCADOLÓGICOS E DE CULTIVO DE FRUTOS.....	16
2.2 ANTRACNOSE EM FRUTOS.....	18
2.3 POTENCIALIDADE ANTIFÚNGICA DA QUITOSANA E DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	21
2.3.1 Óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (D. C.) Stapf.....	26
2.4 INCORPORAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM REVESTIMENTOS DE FRUTOS..	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO.....	32
3.2 OBTENÇÃO DOS MATERIAIS.....	32
3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL de <i>Cymbopogon</i> <i>citratus</i> (D. C.) Stapf.....	33
3.4 PRODUÇÃO DAS SOLUÇÕES DE ÓLEO ESSENCIAL E QUITOSANA E REVESTIMENTO COM INCORPORAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	34
3.5 EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Cymbopogon citratus</i> (D. C.) Stapf SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL RADIAL FÚNGICO.....	34
3.6 DETERMINAÇÃO DO TIPO DE INTERAÇÕES ENTRE QUITOSANA E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Cymbopogon citratus</i> (D. C.) Stapf.....	35
3.7 EFEITO DA APLICAÇÃO DO REVESTIMENTO DE QUITOSANA E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Cymbopogon citratus</i> (D. C.) Stapf. NO DESENVOLVIMENTO DE ANTRACNOSE EM FRUTOS.....	36
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	37
REFERÊNCIAS.....	39
APÊNDICE A – ARTIGO I.....	48

1 INTRODUÇÃO

O Brasil alcança o terceiro lugar no *ranking* dos países produtores de frutos no mundo, seguindo a China e Índia (SILVA et al., 2014). Uma ampla variedade de frutos produzidos no Brasil encontra áreas e condições propícias ao seu desenvolvimento, sendo o Nordeste uma região eminente no cultivo desses produtos (EMBRAPA, 2004; TREICHEL et al., 2016). O total de frutos destinados aos consumidores internos e estrangeiros abrange variadas espécies, e, dentre estes, alguns se destacam na lista dos mais exportados e com maior aceitação pelos consumidores, a exemplo da manga (*Mangifera indica* L.) e mamão (*Carica papaya* L.), bem como outros frutos que tem ganhado expressão no cenário internacional, como a goiaba (*Psidium guajava* L.) (TREICHEL et al., 2016).

Diversas desordens podem acometer os frutos durante seu desenvolvimento e maturação, especialmente na fase de pós-colheita (SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014), dentre elas, uma das doenças de maior destaque é a antracnose (LIMA et al., 2013; KAMLE et al., 2013). O fungo *Colletotrichum gloesporioides* tem sido amplamente relatado como o principal agente causal da antracnose (ALI; NOH; MUSTAFA, 2015; LIMA et al., 2015). O efeito dessa espécie na formação de lesões tem sido bem descrito, as quais comprometem a aparência e qualidade dos frutos, sua produtividade e comercialização. Entretanto, novos achados de identificação molecular de cepas fúngicas isoladas de lesões de antracnose de mangas do Nordeste brasileiro têm revelado diferentes espécies do gênero *Colletotrichum* associadas à esta doença, a saber: *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. karstii* e *C. siamense* (LIMA et al., 2013).

O controle da antracnose tem sido feito basicamente pelo uso de fungicidas sintéticos, os quais acarretam impactos negativos ao meio ambiente e à saúde humana, relacionados a consideráveis graus de toxicidade e geração de resíduos (KEFIALEW; AYALEW, 2008; ZHENG, et al., 2013; HU et al., 2014). Além disso, há a procura de um novo mercado de consumidores por produtos menos agressivos, com menores quantidades de agentes químicos e de menores impactos negativos à saúde. Neste contexto, outros métodos têm sido estudados como alternativas a esses compostos, os quais devem manter a qualidade do fruto e apresentar efetividade na inibição do desenvolvimento de desordens pós-colheita, relacionadas à ação de fungos patogênicos. O biocontrole, a exemplo da utilização de polímeros com capacidade de formar revestimentos comestíveis em frutos, como a quitosana (QUI); bem como do uso de óleos essenciais (OEs), tem se apresentado como alternativa emergente aos fungicidas sintéticos (SANTOS et al., 2012; GUERRA et al., 2015).

A QUI é um biopolímero obtido da desacetilação da quitina, e apresenta aplicações em diversas áreas, tais como farmacêutica, biotecnológica e alimentícia (ELSABEE; ABDOL, 2013; GUERRA et al., 2015; ATHAYDE et al., 2016). Trata-se de um polímero biodegradável, com capacidade de formação de gel em meio ácido, possibilitando sua aplicação como revestimento (ELSABEE; ABDOL, 2013) com propriedades antifúngicas (ALI et al., 2010; ZAHID et al., 2014; LI et al., 2015). A QUI apresenta baixa toxicidade, tendo sido enquadrada na categoria de produtos naturais GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros) (USFDA, 2001; GUERRA et al., 2015).

Os OEs são compostos extraídos de diferentes partes de plantas aromáticas, formados por uma grande variedade de compostos voláteis e caracterizam-se por apresentar forte aroma, solubilidade em lipídeos e solventes orgânicos (AKHTAR; DEGAGA, AZAM, 2014; SOUZA, 2016). Apresentam expressiva propriedade antimicrobiana, e têm sido amplamente estudados como compostos de preservação em alimentos (SOUZA, 2016). Quando incorporados em revestimentos, a exemplo da QUI, os OEs podem repercutir em potencialização das propriedades antifúngicas destas substâncias (SANTOS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2017).

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. (OECC), espécie vegetal conhecida popularmente como capim-limão, tem como constituintes majoritários os isômeros do citral geranial e neral. Estes constituintes têm sido relacionados às propriedades antifúngicas deste óleo essencial (TZORTZAKIS; ECONOMAKIS, 2007; PRINS et al., 2008; ANARUMA et al., 2010; ATHAYDE et al., 2016; MUNHUWEYI, et al., 2017). A aplicação combinada de OECC e QUI tem sido relatada para fins de inibição de deterioração fúngica em alguns tipos de frutos (PERDONES et al., 2012; ALI; NOH; MUSTAFA, 2015; EL-MOHAMEDY; EL-GAMAL; BAKEER, 2015; ATHAYDE et al., 2016; MUNHUWEYI, et al., 2017). Frente à antracnose, o estudo desenvolvido por Ali, Noh e Mustafa (2015) avaliou a eficácia desta combinação para o controle da doença em pimentões. Nenhum estudo anterior avaliou a aplicação combinada da QUI e OECC para a inibição de *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. siamense* e *C. karstii* em frutos.

Frente ao reconhecido potencial antifúngico da QUI e dos OEs, o presente estudo teve por objetivo avaliar a eficácia da aplicação de revestimento formulados com a combinação de QUI e OECC no controle pós-colheita de antracnose causada por *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. siamense* e *C. karstii* em goiaba cv. Paluma, manga cv. Tommy Atkins e mamão cv. Papaya.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS MERCADOLÓGICOS E DE CULTIVO DE FRUTOS

Estima-se que no mundo sejam produzidas cerca de 800 milhões de toneladas de frutos, numa área de, aproximadamente, 61,4 milhões de hectares (TREICHEL et al., 2016). Os frutos são apreciados pelos consumidores devido à sua variedade de sabores, estabelecendo elevada demanda de comercialização. O consumo desses produtos não está somente associado ao sabor e preferências pessoais dos consumidores, mas também aos aspectos de composição nutricional e promoção da saúde e, especialmente, pelo seu alto teor de vitaminas, minerais, fibras e compostos antioxidantes (EMBRAPA, 2009; SILVA et al., 2014).

Os frutos produzidos no Brasil, especialmente na região Nordeste, desempenham um importante papel econômico no cenário local, além da marcante participação no mercado internacional (SILVA et al., 2014). O Brasil se destaca como maior produtor mundial de frutos tropicais, com pleno potencial para aumentar sua produção atual. Atualmente, a demanda interna de frutas frescas, incluindo a produção própria e as importações, está estimada em cerca de 18,5 milhões de toneladas por ano. Nos últimos cinco anos, esse consumo tem evoluído entre 1,9% e 2,1%. A União Europeia continua sendo a principal via de comércio dos frutos frescos e processados produzidos no Brasil, importando em 2015, quase 80% do total embarcado (735 mil toneladas). O total de frutos destinados aos consumidores estrangeiros abrange várias espécies, contudo algumas delas continuam a se destacar na lista das mais exportadas, a exemplo da manga (*Mangifera indica* L.), mamão (*Carica papaya* L.) e goiaba (*Psidium guajava* L.) (TREICHEL et al., 2016; CARVALHO et al., 2017).

Nos últimos anos, a manga tem liderado o *ranking* da receita dos frutos destinados ao comércio externo, tendo sido vendidas mais de 156 mil toneladas, chegando ao montante de US\$ 184.342.375,00 em 2015. A região do Vale do São Francisco, neste mesmo ano, representou 84% das exportações brasileiras da manga, ao embarcar 131,5 mil toneladas do total, com faturamento de R\$ 147 milhões (TREICHEL et al., 2016). Em 2016, as vendas para exportação chegaram a mais de 154 mil toneladas, com previsão de crescimento para o ano de 2017 (CARVALHO et al., 2017).

A manga (*Mangifera indica* L.) é apreciada e valorizada por seu sabor agradável, por seu alto valor nutricional, sendo fonte de vitamina C, fibra dietética e, especialmente, alto teor de carotenoides, e outras fontes de pró-vitamina A (ZHENG et al., 2013; HU et al., 2014). Apesar de ter seu cultivo ao redor do mundo (LIMA et al., 2007; MATTIUZ et al., 2015), a manga tem expressivos alcances nos países tropicais, onde tem sido denominada comumente de “a rainha dos frutos tropicais”, referente à alta produção, comércio e aceitação, por parte dos consumidores (KAMLE et al., 2013).

A região do Vale do São Francisco, situada na fronteira entre os Estados de Bahia e Pernambuco, destaca-se no cenário nacional com os maiores rendimentos alcançados na produção e comercialização do fruto (EMBRAPA, 2004; TREICHEL et al., 2016). A variedade Tommy Atkins representa o cultivar de maior produção no Brasil. Mesmo no mercado interno, representou, no ano de 2015, excelentes condições de venda. As características de coloração intensa, produções elevadas, bem como a resistência ao transporte a longas distâncias, são os principais fatores responsáveis pelo destaque da variedade Tommy Atkins na maior participação do volume comercializado de manga (SEBRAE, 2016a).

O Brasil também se destaca no mercado de mamão (*Carica papaya* L.), liderando o *ranking* de produção do fruto no cenário internacional. Os frutos destinados à exportação têm sua colheita no estágio 2 (até 25% da fruta amarela), principalmente aqueles destinados para os Estados Unidos, e até o estágio 4 (50 a 75% da fruta amarela) para a União Europeia. Quanto ao mercado interno, o estágio de maturação do fruto varia de acordo com a distância do mercado consumidor, bem como do tempo para comercialização (SEBRAE, 2016b).

Os cultivares de mamão mais explorados no Brasil são classificados em dois grupos: ‘Solo’ e ‘Formosa’. Cultivares do grupo ‘Solo’ são menores ($\approx 0,35$ a $0,70$ kg), destinam-se ao mercado interno e, principalmente, à exportação (SERRANO; CATTANEO, 2010). Dentro desse grupo, a variedade Papaya, também conhecida como Havaí ou Amazônia, que ganha destaque por sua polpa vermelho-alaranjado, alcançou US\$ 43,675 milhões do montante dos frutos exportados no ano de 2015 e US\$ 43,088 milhões em 2016. Ceará e Rio Grande do Norte ainda estão entre os cinco Estados tidos como expoentes da produção nacional de mamão e ganham espaço na venda externa (TREICHEL et al., 2016; CARVALHO et al., 2017).

Além da manga e mamão, outros frutos têm ganhado espaço junto ao mercado consumidor, a exemplo da goiaba (*Psidium guajava* L.). Esta fruta, apesar de ter um consumo interno relativamente pequeno, com cerca de 300g/habitante/ano, tem crescido nas vendas de mercado internacional (SEBRAE, 2016c). Entre os anos de 2014 e 2015, a goiaba apresentou

um aumento de 19,42% no volume de exportação, representando um crescimento de 12,39% na receita do fruto (TREICHEL et al., 2016). Em 2016, apesar de leve queda em relação a 2015, foram exportadas mais de 172 toneladas do fruto (CARVALHO et al., 2017).

Os frutos da goiabeira são bagas com tamanho, forma e coloração de polpa variável em função do cultivar. A goiaba possui um dos maiores teores de vitamina C entre os frutos tropicais, superada apenas pela acerola (SEBRAE, 2016c), além dos altos teores de licopeno e fibras. Dentre as cultivares de maior apelo no mercado consumidor, está a variedade híbrida ‘Paluma’, que produz frutos de tamanho grande e polpa vermelha, os quais servem tanto para o consumo *in natura* quanto para o processamento (EMBRAPA, 2011).

Frutos como goiaba, manga e mamão podem ser infectados por fungos fitopatogênicos de forma semelhante durante a fase de pós-colheita, sendo a antracnose a principal desordem que acomete essas matrizes (LIMA et al., 2015).

2.2 ANTRACNOSE EM FRUTOS

Os frutos frescos são organismos vivos que, mesmo após a colheita, continuam a respirar, amadurecer, chegando à senescência e deterioração. A maioria desses frutos possuem alta perecibilidade devido às suas estruturas, alto conteúdo de água, aparência e características fisiológicas (YAHIA, 2011). Efeitos fisiológicos, químicos, físicos, danos mecânicos e ação por agentes patogênicos estão entre as principais desordens capazes de acometer frutos durante seu desenvolvimento e maturação, especialmente na fase de pós-colheita (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Mais de 70% das doenças que acometem os frutos são causadas por uma diversidade de fungos patógenos, que causam disrupturas nos sistemas de defesa e estruturais dos frutos, comprometendo sua integridade e qualidade (LEMOS et al., 2013; IRIEDA; TAKANO, 2016).

As perdas pós-colheita podem chegar à ordem de 25-50% da produção mundial, e dependem do tipo de cultivar, do estágio de maturação, armazenamento, condições de transporte e distribuição (SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014). Deste modo, as perdas nesta fase são consideradas elevadas, especialmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde a vida de prateleira desses frutos pode ser bem reduzida (YAHIA, 2011).

Uma das eminentes desordens fúngicas pós-colheita é a antracnose. Dentre os principais hospedeiros acometidos pela doença estão especialmente os frutos tropicais, a saber, manga, banana, caju, mamão e goiaba. Os sintomas de antracnose são caracterizados por lesões escuras, subcirculares ou angulares, afundadas, com massa viscosa de esporos na

fruta madura (**Figuras 1 a 3**) (SIVAKUMAR; JIANG; YAHIA, 2011; KAMLE et al., 2013). O centro da lesão pode ainda apresentar pontuações alaranjadas, que correspondem às massas de conídios produzidos pelos fungos, como ocorre normalmente no mamão (MAEDA; NELSON, 2014; AYÓN-REYNA et al., 2017). No fruto ainda verde, a antracnose atua como uma infecção de repouso, e pode vir a manifestar seus sintomas somente durante o amadurecimento (KAMLE et al., 2013; MATTIUZ et al., 2015).

Figura 1. Características das lesões de antracnose desenvolvidas em mangas.



Fonte: Imagem do autor.

Figura 2. Características das lesões de antracnose desenvolvidas em mamão.



Fonte: Imagem do autor.

Figura 3. Características das lesões de antracnose desenvolvidas em goiaba.



Fonte: Imagem do autor.

O principal gênero de fungos associado à antracnose é o *Colletotrichum*, que compreende mais de 600 espécies, responsáveis por causar antracnose típica em uma ampla variedade de espécies vegetais. A maioria das espécies de *Colletotrichum* exibe um estilo de vida nos frutos conhecido como hemibiotrofia, referente a duas fases de infecção: fase biotrófica, onde os patógenos sintetizam um arsenal de mecanismos que suprimem a imunidade dos frutos e viabilizam sua estadia no hospedeiro; e a fase necrotrófica, onde os fungos destroem os tecidos do fruto e outros mecanismos, como toxinas e enzimas líticas, que destroem a matriz colonizada. *Colletotrichum* é capaz de invadir os frutos com penetração nos tecidos, onde produz pigmentos escuros, como a melanina, um dos sinais característicos da doença (IRIEDA; TAKANO, 2016).

Colletotrichum gloesporioides tem sido vastamente reportado como o principal agente causal da antracnose de frutos, e seu efeito na formação de lesões características da doença tem sido bem descrito (LEMOS et al., 2013; SILVA; MICHEREFF, 2013; HU et al., 2014; ALI; NOH; MUSTAFA, 2015). Entretanto, novos achados de identificação molecular de cepas isoladas da antracnose de mangas no Nordeste do Brasil reportaram novas espécies correlatas a esta desordem. Quatro dessas espécies do gênero *Colletotrichum* foram previamente descritas, a saber: *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. karstii*, e uma nova espécie foi introduzida como *C. dianesei* (LIMA et al., 2013), recentemente renomeada como *C. siamense* (LIU et al., 2016). Estas espécies apresentam o potencial de lesionarem, em conjunto, um mesmo fruto (LIMA et al., 2013). Lima et al. (2015) verificaram que as cinco novas espécies isoladas de manga causaram virulência em hospedeiros alternativos, como mamão, goiaba, banana e pimentão.

A antracnose tem sido controlada tradicionalmente por meio do uso de fungicidas sintéticos, a exemplo do tiofanato-metílico e demais componentes do grupo dos benzimidazoles, ditiocarbamatos, bem como por inibidores da síntese do ergosterol, como difenoconalozes, miclobutanil e procloraz (KEFIALEW; AYALEW, 2008; ZHENG et al., 2013; HU et al., 2014).

Estes fungicidas suprimem de forma eficiente o desenvolvimento dos sintomas de antracnose, e são amplamente utilizados, em geral, devido a satisfatória relação custo-benefício para os produtores (LIMA et al., 2015).

A seleção de formas resistentes do patógeno é frequentemente associada ao uso de longo prazo desses compostos (ZHENG et al., 2013), demandando progressivos aumentos na quantidade de aplicação. Além disso, ocorrem efeitos associados à toxicidade destes fungicidas, contaminação ambiental e riscos diretamente interferentes na saúde humana. No

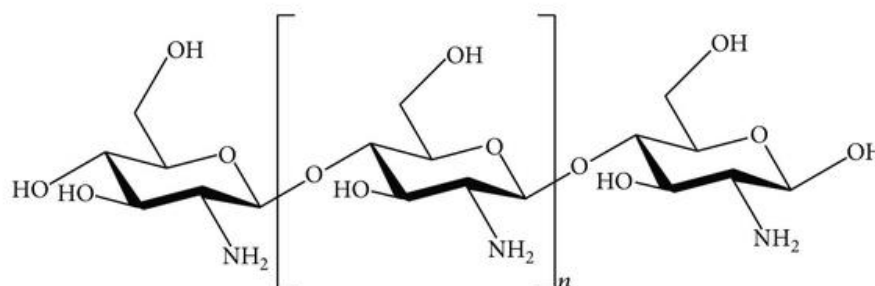
Brasil, o mercado de agrotóxicos, nos quais estão inseridos os fungicidas, apresentou crescimento exacerbado de aproximadamente 190%, especialmente na última década, categorizando o país como líder no *ranking* mundial do uso desses produtos desde 2008 (RIGOTTO; VASCONCELOS; ROCHA, 2014).

Estes aspectos têm impulsionado a busca e realização de pesquisas por estratégias alternativas aos fungicidas sintéticos, as quais devem manter a qualidade do fruto, apresentar efetividade frente aos agentes causadores da antracnose na pós-colheita (HU et al., 2014; ALI; NOH; MUSTAFA, 2015) e representar uma tecnologia de emprego segura quando considerado aspectos ambientais e da saúde humana (SANTOS et al., 2012; GUERRA et al., 2015).

2.3 POTENCIALIDADE ANTIFÚNGICA DA QUITOSANA E DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A QUI é um biopolímero natural, obtido da desacetilação da quitina em meio alcalino, formado por unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glicose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose, unidas por ligações β (1 $\rightarrow$ 4) (**Figura 4**). Grupos acetamida, presentes na quitina são removidos parcialmente pela reação de desacetilação, dando origem ao polímero de QUI, rico em grupos amina. Quando esta desacetilação supera o valor de 50%, o biopolímero torna-se solúvel em soluções aquosas ácidas e se comporta como um polieletrólito catiônico, devido à protonação dos grupos amina em presença de íons H^+ , caracterizando este material como QUI (TOLAIMATEA et al., 2003; BOF et al., 2015). A QUI pode ter sua extração advinda de diferentes invertebrados, a exemplo da carapaça de crustáceos, como o camarão e lagosta (ELSABEE; ABDOL, 2013; GUERRA et al., 2015; ATHAYDE et al., 2016), ou mesmo de biomassa fúngica (OLIVEIRA et al., 2014).

Figura 4. Estrutura química da quitosana.



Em decorrência da sua capacidade de formar géis quando dispersa em meio ácido, a QUI tem sido estudada na elaboração de revestimentos de frutos (ELSABEE; ABDOL, 2013; OLIVEIRA et al., 2014). Tais géis, quando aplicados sobre frutos, formam filmes protetores comestíveis, invisíveis, com aderência suficiente para não serem facilmente removidos no manuseio, e não conferem modificações no gosto e *flavour* dos produtos (CHIEN et al., 2007; AIDER, 2010). Ainda, pode atuar como uma barreira à perda de umidade e como proteção à colonização e infecção por parte de microrganismos (AIDER et al., 2010). O impacto positivo da aplicação de revestimento de QUI no prolongamento da vida de prateleira, bem como na qualidade microbiológica durante a pós-colheita de frutas e hortaliças, tem sido descrita (KERCH et al., 2015; ATHAYDE et al., 2016; GUERRA et al., 2016).

Dentre as diversas propriedades e aplicação de revestimentos de QUI, destaca-se a sua potencialidade antifúngica. Os mecanismos de ação da QUI frente a patógenos ainda não estão bem elucidados. Acredita-se, que a atividade antifúngica da QUI está associada à sua natureza policatiónica. A hipótese é que a ação frente a patógenos possa ser mediada pelas forças eletrostáticas entre o grupo amino-protonado (NH_2^+) da QUI e os resíduos negativos na superfície celular. A presença do grupo amino-protonado na QUI aumenta com seu grau de desacetilação e apresenta grande influência em sua ação antimicrobiana (ELSABEE; ABDOL, 2013).

Outros fatores podem estar relacionados à variação e atuação da propriedade antifúngica da QUI, a exemplo da concentração, peso molecular, da fonte de extração, dos componentes da matriz alimentar de aplicação, bem como do tipo de microrganismo alvo (HOSSEINNEJAD; JAFARI, 2016). Outros mecanismos sugerem que a QUI pode atuar como agente quelante de nutrientes e metais essenciais; ou ainda agir na inibição de síntese proteica e de RNAm. (DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004; HOSSEINNEJAD; JAFARI, 2016; YUAN; TANG; ZHANG, 2016). Em matrizes vegetais, a atividade antifúngica da quitosana pode ser atribuída à manutenção e indução da atividade das enzimas de defesa dos frutos, tais como peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase (HEWAJULIGE et al., 2009; ALI; MOHAMED; SIDDIQUI, 2012).

Vários estudos têm relatado a atividade antifúngica da QUI. Camili et al. (2007) verificaram uma supressão do crescimento micelial com retardamento da germinação dos conídios de *Botrytis cinerea* “*in vitro*”, e uma redução da doença causada pelo fungo em uvas Itália. Li et al. (2015) observaram efeito inibitório da QUI frente a infecção por mofo-azul, causado por *Penicillium expansum*, em maçãs. Shao et al. (2015) encontraram que

revestimento contendo 1% (p/v) de QUI contribuiu efetivamente para o controle de mofo-verde causado por *Penicillium digitatum* em frutos cítricos. Dotto, Vieira e Pinto (2015) verificaram o efeito da solução de QUI frente à bolores e leveduras em mamão.

Quanto aos efeitos inibitórios da QUI frente ao desenvolvimento de antracnose, estudos foram executados *in vitro*, bem como em frutos acometidos pela doença na pós-colheita. Jitareerat et al. (2007) relataram o controle de *Colletotrichum gloesporioides* em ABD adicionado de QUI. Concentrações de 1,5% e 2,0% foram mais eficazes no controle do fungo, em um efeito dependente de concentração. A QUI (0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%), quando aplicada em mangas, resultou em diminuição da taxa de progressão da antracnose, comparada ao experimento controle.

Zhu et al. (2008) também avaliaram a efetividade da aplicação da QUI no controle da antracnose em mangas. QUI a 2,0% reduziu o diâmetro das lesões de antracnose e a incidência da doença, em relação ao controle, até o 16º dia de armazenamento.

Ali et al. (2010) verificaram efeito antifúngico da QUI frente a *C. gloesporioides in vitro* e em mamão. Concentrações de 1,5% a 2,0% (p/v) de QUI mostraram efeito fungistático frente o crescimento micelial radial. No fruto, tais concentrações não somente controlaram a antracnose, como reduziram os sintomas da doença por 3 a 4 semanas de estocagem a 12 °C. À temperatura ambiente (28° C), a concentração mais efetiva de QUI foi de 1,5%. O revestimento ainda contribuiu para a manutenção dos parâmetros de firmeza, sólidos solúveis e acidez titulável durante o período de armazenamento. Bautista-Baños et al. (2003) também verificaram controle de *C. gloesporioides* causado por QUI, tanto *in vitro* como em mamão. Concentrações de 1,5% de QUI causaram alterações dos conídios do fungo e retardaram a doença no fruto.

Outros compostos podem ser combinados à QUI a fim de potencializar o efeito mantenedor da qualidade de frutos, bem como suas propriedades antimicrobianas (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003; ZHOU; ZANG; ZENG, 2016), dentre os quais, estão os óleos essenciais (SÁNCHEZ-GONZALEZ et al, 2011; SANTOS et al, 2012; GUERRA et al, 2015; GUERRA et al, 2016).

Assim como a QUI, os OEs estão enquadrados pela FDA na categoria GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) e aprovados para o consumo humano em quantidades adequadas (USFDA, 2001; SHAO et al., 2015; ATHAYDE et al., 2016; GUERRA et al., 2016; HOSSEINNEJAD; JAFARI, 2016). O reconhecimento na categoria de produtos naturais (USFDA, 2001) reforça a atenção dos pesquisadores e da indústria para a aplicação dos OEs como biopesticidas no controle de pragas e doenças pós-colheita. Soma-se

a estas características, o fato de serem biodegradáveis, ecologicamente viáveis e livres de resíduos quando aplicados em matrizes hortícolas frescas (FAGUNDES et al, 2014; SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014).

Os OEs são substâncias originárias do metabolismo secundário e sintetizados por várias porções das plantas aromáticas, desde brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeiras ou cascas (AKHTAR; DEGAGA; AZAM, 2014; SOUZA, 2016.) São formados por um conjunto de compostos, como: terpenos, sesquiterpenos, aldeídos, cetonas e componentes fenólicos (SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014).

A composição dos OEs pode variar na quantidade e nos tipos de compostos encontrados, visto que a síntese desses constituintes sofre a influência de fatores como clima, diversidade genética do vegetal, sazonalidade, fotoperiodismo, horário de colheita, localização geográfica, uso de agroquímicos e procedimentos de extração (BAKKALI et al., 2008). Na natureza, as propriedades dos OEs exercem papel fundamental de proteção das plantas, sendo associados aos mecanismos de defesa (BAKKALI et al, 2008; SOUZA, 2016).

Até o momento, são conhecidos aproximadamente 3000 OEs, sendo aproximadamente 300 deles de maior importância para a indústria farmacêutica, agrônômica e sanitária, especialmente devido às propriedades aromáticas e medicinais, tais como sedativa, anti-inflamatória e analgésica. Os OEs têm sido, ainda, objeto de estudo com variadas aplicações e de grande relevância na preservação em alimentos em decorrência das suas conhecidas propriedades antimicrobianas (BAKKALI et al, 2008; AKHTAR; DEGAGA; AZAM, 2014; SOUZA, 2016). Os OEs são considerados antimicrobianos naturais para uso em alimentos, juntamente com outros compostos de origem microbiana, vegetal ou de fonte animal (BAKKALI et al, 2008; SOUZA, 2016).

Dentro de seu amplo espectro de atividade antimicrobiana, os OEs destacam-se no controle de micro-organismos patogênicos e deteriorantes contaminantes de vegetais. A grande variedade de constituintes dos OEs propicia diferentes mecanismos da atividade antimicrobiana, dificultando a adaptação dos micro-organismos da matriz vegetal à sua ação. Em comparação aos fungicidas sintéticos, os OEs são menos susceptíveis a causarem resistência por parte dos fungos patógenos, também devido à ampla variedade de constituintes que formam a sua composição (KOUL et al., 2013; SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014).

A ação dos OEs pode ser fungitóxica direta, fungistática e fungicida, inibindo o crescimento micelial e germinação de esporos (OOTANI, 2013). Acredita-se, que dentre os possíveis mecanismos que utilizam para agir como antifúngico, está a presença dos compostos

fenólicos em sua composição, os quais alterariam a bicamada lipídica da membrana celular microbiana, aumentando a sua permeabilidade, seguida da liberação de constituintes intracelulares vitais, ou ainda por causar danos nos sistemas enzimáticos (TURINA et al., 2006; ATHAYDE et al., 2016).

Os compostos lipofílicos presentes nos OEs são absorvidos com eficiência pelas células fúngicas (REGNIER et al., 2008). O mecanismo subjacente à ação antifúngica de OEs funciona como interruptor entre a fase vegetativa e reprodutiva do desenvolvimento fúngico, já que são citados por causar impacto negativo na esporulação, dado o impedimento do desenvolvimento micelial e da percepção de diferentes sinais fisiológicos envolvidos na síntese de moléculas do funcionamento da forma vegetativa, com vistas ao desenvolvimento da forma reprodutiva. Em consequência da supressão da produção esporica, ocorre a limitação da propagação do patógeno (TZORTZAKIS; ECONOMAKIS, 2007).

Resultados expressivos têm sido obtidos no controle de crescimento de fungos patógenos pós-colheita quando tratados com OEs (**Tabela 1**), reportando-se a supressão do crescimento fúngico *in vitro*, bem como em diferentes frutos. Dentre os estudos da ação dos OEs e de seus constituintes frente a desordens fúngicas, destaca-se a inibição e controle da antracnose e seus agentes causais, a exemplo do *C. gloesporioides* em abacate e em manga (REGNIER et al., 2008; REGNIER et al., 2010; SELLAMUTHU et al., 2013).

Regnier et al. (2008) observaram que a aplicação do óleo essencial de *Lippia scaberrima* na forma de vapor causou inibição do crescimento micelial de *C. gloesporioides* e *Botryosphaeria parva* isolados de manga.

Sellamuthu et al. (2013) avaliaram a aplicação combinada de óleo essencial de tomilho e atmosfera modificada frente a *C. gloesporioides*, bem como nos parâmetros de qualidade de abacate. Os autores verificaram que a combinação reduziu a severidade da antracnose, incluindo diminuição da intensidade da ocorrência de polpa cinzenta, escurecimento vascular, perda de peso e perda de firmeza dos frutos. Ainda, ocorreu aumento do teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante nos frutos após a maturação a 25 °C, seguido de armazenamento a 10 °C.

Tabela 1. Estudos que abordam o controle de fungos patógenos pós-colheita por meio da aplicação de óleos essenciais.

Fruto	Patógeno	Óleo essencial	Referência
Abacate	<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	<i>Thymus vulgaris</i> L. (Tomilho)	Sellamuthu et al. (2013)
Abacate	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> <i>Lasiosplodia theobromae</i> <i>Alternaria spp.</i>	<i>Lippia scaberrima</i> (Lipia) <i>Mentha spicata</i> L. (Hortelã-verde)	Regnier et al. (2010)
Maçã	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Cinnamoum verum</i> L. (Canela) <i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano) <i>Syngium aromaticum</i> L. (Cravo) <i>Cymbopogon citratus</i> (D. C.) Stapf. (Capim-limão)	Frankova et al. (2016)
Manga	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> <i>Botryosphaeria parva</i>	<i>Lippia scaberrima</i> (Lipia)	Regnier et al. (2008)
Mamão	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> <i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Thymus vulgaris</i> L. (Tomilho) <i>Citrus aurantiifolia</i> (Lima)	Bosquez-Molina et al. (2010)
Morango	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Cymbopogon citratus</i> (D. C.) Stapf. (Capim-limão)	Vitoratos et al. (2013)
Pêssego	<i>Monilinia laxa</i> <i>M. fructigena</i> <i>M. fructicola</i>	<i>Thymus vulgaris</i> L. (Tomilho) <i>Verbena officinalis</i> L. (Verbena)	Elshafie et al. (2015)
Pêssego	<i>Rhizopus stolonifer</i> <i>Botrytis cinerea</i>	<i>Cymbopogon citratus</i> (D. C.) Stapf. (Capim-limão)	Arrebola et al. (2010)
Uvas	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano) <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Alecrim)	Sousa et al. (2013)

2.3.1 Óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf.

Dentre os óleos essenciais relatados por sua expressiva atividade antifúngica, destaca-se o OECC. *C. citratus* é uma planta aromática originária do Sul da Índia, pertencente à família Poaceae. Caracteriza-se botanicamente como uma grama alta, largamente cultivada em climas tropicais e subtropicais. Suas folhas são lineares e laminadas, afilada em ambas as extremidades, podendo crescer até 50 cm de comprimento e 1,5cm de largura (NAIK et al.,

2010; TAJIDIN et al., 2012) (**Figura 5**). Por meio de um corte típico em suas folhas, juntamente aos colmos da planta, pode ser extraído um teor de óleo essencial com rendimento entre 0,25 a 0,6%.

Figura 5. Planta de *Cymbopogon citratus*.



Fonte: Silva, Santos e Rabelo (2010).

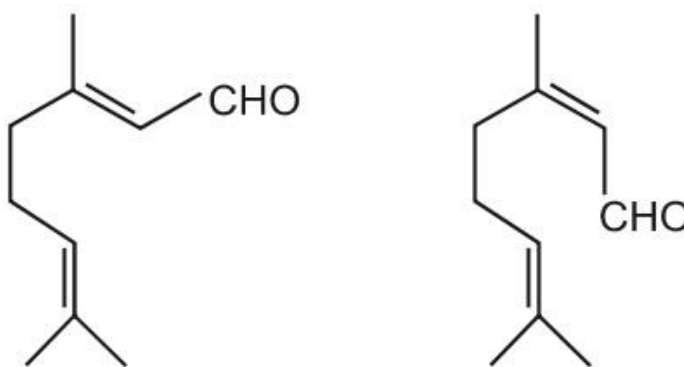
No Brasil, e ao redor do mundo, os chás e extratos das folhas de *C. citratus* são amplamente difundidos e usados na medicina popular como digestivos, antigripais, analgésicos, antitérmicos, anti-inflamatórios das vias urinárias, diuréticos, antiespasmódicos e antialérgicos (VILLAYERDE et al., 2013; COSTA et al., 2016). *C. citratus* é reportado, ainda, por suas propriedades antidepressiva, antioxidante, antiséptica, sedativa, anticarcinogênica, antidiabética, antimutagênica e, com destaque, relatado por suas propriedades antimicrobianas (GUFFIN; HOBBS; UPTON, 1997; COSTA et al., 2016). O OECC tem atraído interesse de pesquisadores para sua aplicação em produtos vegetais, especialmente por suas propriedades antimicrobianas (ATHAYDE et al., 2016).

O OECC geralmente apresenta como constituintes majoritários os monoterpenos citral e mirceno (PRINS et al., 2008). O citral é o composto predominante, podendo representar de 65 a 85% da composição do produto, conferindo um forte aroma de limão. Trata-se de uma mistura isomérica de geranial (isômero trans, α -citral) e neral (isômero cis, β -citral) (**Figura 6**) (VILLAYERDE et al., 2013; ATHAYDE et al., 2016). Ao citral tem sido atribuída a capacidade de romper irreversivelmente a membrana celular fúngica por meio da reação de ligação transversal, causando perdas de eletrólitos e subsequente esgotamento de ácidos e açúcares aminados (REGNIER et al., 2008; ALI et al., 2016). A proporção de citral encontrada no OECC, assim como de outros compostos minoritários, pode variar de acordo

com a temperatura, intensidade da luz, umidade do solo e do ar e estágio de maturação da planta (TAJIDIN et al., 2012).

Estudos têm sido conduzidos quanto às propriedades antifúngicas do OECC, especialmente na inibição de desordens pós-colheita em frutos, tais como a podridão causada por *Rhizopus* spp. em pêssegos (SALEM; YOUSEFF; SANZANI, 2016); por *Penicillium expansum* em maçãs (FRANKOVA et al., 2016); e causada por *Geotrichum citri-aurantii*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* em frutos cítricos (REGNIER et al., 2014).

Figura 6. Estrutura química do citral. Isômero geranial à esquerda e neral à direita.



Fonte: Silva et al. (2008).

Outros estudos têm revelado o efeito do OECC na inibição de agentes causadores de antracnose, como citados abaixo:

- Tzortzakis e Ekonomakis (2007): efeito inibitório na produção e germinação de esporos de *Colletotrichum coccodes* e *Colletotrichum herbarum*.
- Duamkhanmanee (2008): eficácia no controle da antracnose em mangas.
- Anaruma et al. (2010): efeito inibitório “*in vitro*” frente a *Colletotrichum gloesporioides*, e, em seguida no controle da antracnose, por esse agente, em melão.

2.4 INCORPORAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM REVESTIMENTOS DE FRUTOS

Embora os OEs sejam reconhecidos como efetivos agentes antifúngicos, a sua utilização para a manutenção e redução do desenvolvimento de deterioração fúngica em frutos é, muitas vezes, limitada por causa de seus custos de aplicação, alta volatilidade e impactos sobre os aspectos sensoriais destes produtos (BAKKALI et al., 2008; SHAO et al., 2015). A

incorporação de OEs em um revestimento comestível pode ser um método eficaz para diminuir algumas destas desvantagens, bem como no controle de doenças fúngicas em frutos por meio da redução dos processos de difusão e manutenção das concentrações elevadas de moléculas ativas na superfície do fruto por maior período de tempo (SÁNCHEZ-GONZALES et al., 2011; ALOUI et al., 2014; SHAO et al., 2015; ATARÉS; CHIRALT, 2016).

Os revestimentos comestíveis têm geralmente sua base composta por materiais hidrofílicos, tais como proteínas ou polissacarídeos, a exemplo da QUI, que são obtidos por dispersão aquosa e subsequente secagem. A incorporação de OEs na dispersão de QUI é possível devido às propriedades emulsificantes do polímero, obtida por meio da aplicação de técnicas de emulsificação ou homogeneização, onde as emulsões com os OEs são obtidas contendo o polímero na fase aquosa contínua. Quando o filme seca, as gotículas dos OEs permanecem incorporados na matriz do polímero, o qual forma um revestimento translúcido, e ocorre a distribuição homogênea das partículas no sistema (SANTOS et al., 2012; SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014; ATÁRES; CHIRALT, 2016).

Este método de formação e aplicação de revestimento por imersão é mais benéfico que a pulverização dos compostos, uma vez que a imersão das frutas na dispersão de QUI e OEs garante que toda a superfície entre em contato com o filme e que uma leve agitação permita o desprendimento de bolhas, possibilitando uma deposição mais homogênea em toda a matriz. Além disso, a incorporação de OEs nas coberturas é mais eficaz na redução da resistência do inóculo do patógenos pós-colheita presentes na superfície do fruto (SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014). Alguns estudos têm relatado que esta combinação pode, ainda, otimizar a atividade antifúngica por meio da interação sinérgica entre os compostos (PERDONES et al., 2012; SHAO et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017).

Achados da literatura têm mostrado a eficácia de diversos OEs combinados ao revestimento de QUI frente a fungos patógenos pós-colheita, conforme demonstrado na Tabela 2. Alguns estudos correlacionaram a aplicação de revestimento de QUI e óleos essenciais frente à antracnose (BILL et al., 2014; ALI; NOH; MUSTAFA, 2015), alguns destes, avaliaram os efeitos da combinação de QUI e OECC no controle de desordens fúngicas em frutos (PERDONES et al., 2012; ALI; NOH; MUSTAFA, 2015; EL-MOHAMEDY et al., 2015; ATHAYDE et al., 2016; MUNHUNWEYI et al., 2017).

Perdones et al. (2012) avaliaram o efeito do revestimento de QUI a 1% e OECC a 3% frente a *Botrytis cinerea*, bem como aspectos de qualidade de morangos, durante todo o período de armazenamento sob refrigeração.

Tabela 2. Estudos que avaliaram o controle de patógenos pós-colheita por meio da aplicação combinada de óleos essenciais e quitosana em frutos.

Fruto	Patógeno	Óleo essencial em combinação com quitosana	Referência
Abacate	<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Bill et al. (2014)
Frutas cítricas	<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.)	El-Mohamedy, El-Gamal e Bakeer (2015)
	<i>Penicillium italicum</i>	Stapf.	
Jujuba	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Cinnamomum verum</i> L.	Xing et al. (2011)
Laranja	<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Citrus bergamia</i> Risso	Cháfer et al. (2012)
		<i>Thymus vulgaris</i> L.	
		<i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel	
Limão	<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Syzygium aromaticum</i> L.	Shao et al. (2015)
Morango	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Thymus zygis</i> L.	Sangsuwan et al. (2016)
		<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	
Morango	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.)	Perdones et al. (2012)
		Stapf.	
Pêssego	<i>Monilinia laxa</i>	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Cindi et al. (2015)
Pimentão	<i>Colletotrichum capsici</i>	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.)	Ali; Noh; Mustafa, (2015)
		Stapf.	
Romã	<i>Botrytis</i> sp., <i>Penicillium</i> sp. e <i>Pilidiella granat</i>	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.)	Munhunweyi et al. (2017)
		Stapf.	
		<i>Cinnamomum verum</i> L.	
		<i>Origanum vulgare</i> L.	
Tâmara	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Citrus bergamia</i> Risso	Aloui et al. (2014)
		<i>Citrus sinensis</i> L.	
		<i>Citrus aurantium</i> L.	
		<i>Citrus reticulata</i> Blanco	
		<i>Citrus x limon</i> L.	
Tomate	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.)	Athayde et al. (2016)
		Stapf.	
Tomate-cereja	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Mentha piperita</i> L.	Guerra et al. (2015)
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Mentha x villosa</i> Huds.	
	<i>Penicillium expansum</i>		
	<i>Rhizopus stolonifer</i>		
Uva	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Mentha piperita</i> L.	Guerra et al. (2016)
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Mentha x villosa</i> Huds.	
	<i>Penicillium expansum</i>		
	<i>Rhizopus stolonifer</i>		
Uva	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Origanum vulgare</i> L.	Santos et al. (2012)
	<i>Rhizopus stolonifer</i>		

A aplicação do revestimento de quitosana em morangos reduziu consideravelmente o número de frutos infectados em relação ao controle. Adicionalmente, o OECC melhorou a atividade antifúngica da QUI.

El-Mohamedy, El-Gamal e Bakeer (2015) avaliaram o efeito da QUI e OECC, bem como de seu constituinte majoritário citral frente *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum* em frutas cítricas e verificaram efeito protetor do revestimento frente a mofo-verde e mofo-azul durante 40 dias de armazenamento à 20 °C. Athayde et al. (2016) avaliaram o efeito *in vitro* da combinação de QUI e OECC, bem como no efeito do revestimento no controle da podridão por *Rhizopus stolonifer*, e nos aspectos de qualidade de tomates. Concentrações de 4 mg/mL de QUI e de 1,25 mL/mL de OECC inibiram a germinação de esporos fúngicos e causou redução da severidade da podridão-de-Rhizopus nos tomates. Munhunweyi et al. (2017) verificaram que QUI combinada aos OEs de capim-limão (OECC), canela e orégano foram eficazes na inibição de *Botrytis* sp., *Penicillium* sp. e *Pilidiella granat* *in vitro* (crescimento micelial radial) e quando inoculados em romãs.

Ali, Noh e Mustafa (2015) verificaram o efeito da QUI e OECC no controle de antracnose por *Colletotrichum capsii* em pimentões. Nenhum dos estudos anteriores avaliaram a eficácia da combinação desses compostos no controle da antracnose causado por *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. siamense* or *C. karstii* em goiaba, manga e mamão.

Diante do amplo espectro de atividade antifúngica da QUI e os OEs, bem como das características de manutenção e prolongamento da vida de prateleira dos frutos, a aplicação combinada desses compostos como revestimentos em frutos pode representar um avanço na tecnologia de preservação destes produtos destinados ao comércio e consumo do mercado interno e de exportação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO

As análises *in vitro* e de aplicação nos frutos foram conduzidas no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos pertencentes ao Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba. A análise de composição dos óleos essenciais foi realizada no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba (IpeFarM/UFPB).

3.2 OBTENÇÃO DOS MATERIAIS

As goiabas (cv. Paluma), mangas (cv. Tommy Atkins), mamões (cv. Papaya), selecionados de acordo com a cor da casca, nos estádios de maturação 2 (até 80% da casca verde) (HONG et al., 2012; BOTELHO et al., 2016), 3 (até 50% da casca verde) (ASSIS, 2010; OLIVEIRA et al., 2017) e 2 (MAQBOOL et al., 2011), respectivamente, foram obtidas na Empresa Paraibana de Serviços Agrícolas (EMPASA), localizada no município de João Pessoa – PB. Os frutos foram selecionados considerando padrões satisfatórios de qualidade, sem sinais visíveis de dano mecânico ou infecção fúngica e padronizados de acordo com o tamanho, aparência e cor. Os frutos foram acondicionados e transportados em caixas isotérmicas ao Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos, Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, onde foram conduzidos os experimentos.

As cepas de *C. asianum* CMM 4057, *C. fructicola* CMM 4069, *C. tropicale* CMM 4071, *C. siamense* CMM 4077 e *C. karstii* CMM 4101 foram obtidas da Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos "Profa. Maria Menezes" (Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - Brasil). Estas cepas foram isoladas de lesões de antracnose em mangas tipo Tommy Atkins cultivadas na região Nordeste do Brasil e identificadas por meio de inferência filogenética (LIMA et al., 2013; VIEIRA et al., 2014).

As cinco cepas foram capazes de desenvolver sintomas característicos de antracnose em manga Tommy Atkins, e em hospedeiros alternativos, a saber: mamão (cv. Golden), goiaba (cv. Paluma), pimentão (cv. Atlante) e banana (cv. Pacovan) (LIMA et al., 2015). As cepas-estoque foram mantidos em discos de 5 mm de ágar batata dextrose (ABD) (HiMedia, Índia) em microtubos contendo 1,5 mL de solução salina (NaCl 1g/100 mL) esterilizada,

sendo mantidos a 5 °C no escuro. Para os ensaios de atividade antifúngica, foram utilizadas culturas subcultivadas em ABD a 25 °C durante sete dias.

As lesões de infecção (características de antracnose) do fruto induzidas por todas as cepas apresentaram-se semelhantes em cada fruto, incluindo manchas irregulares de cor marrom, em alguns casos deprimidas e embebidas, na goiaba (GOMES-MORAES; TANAKA; MASSOLA JÚNIOR, 2013); lesões deprimidas, proeminentes e, normalmente, arredondadas e de cor variando de marrom-escuro a preto na manga (VIEIRA et al., 2014; SAKAR, 2016; OLIVEIRA et al., 2017); e manchas de cores variadas, primeiramente, e tornando-se uma grande mancha de conídios embebidos em água, apresentando ou não a cor salmão, em mamão (MAEDA; NELSON, 2015; AYÓN-REYNA et al., 2017).

A QUI de médio peso molecular ($5,6 \times 10^5$ g/mol; grau de desacetilação de 75-85%) foi obtida da empresa Sigma-Aldrich Co. (St Louis, USA). O OECC foi fornecido pela empresa LAZLO Ltda. (Minas Gerais, Brasil), a qual extraiu o óleo essencial das folhas da espécie vegetal pelo emprego de processo de destilação a vapor em escala industrial (hidrodestilação). O óleo essencial atendeu a todas as especificações de qualidade (aparência, cor, impurezas, odor, densidade – 20 °C, índice de refração – 20 °C), e seus parâmetros foram descritos em um laudo técnico emitido pelo fornecedor.

As formulações comerciais de tiofanato-metílico (Cercobin 700 WP, 700 g kg⁻¹ do ingrediente ativo (ia), Iharabras, São Paulo, SP, Brasil) e difenoconazol (Score EC, 250 g l⁻¹ ia, Syngenta, São Paulo, SP, Brasil) foram utilizadas como fungicidas sintéticos (controle positivo), os quais são convencionalmente aplicados no controle da antracnose em frutos. Tiofanato-metílico e difenoconazol foram dissolvidos em água estéril adicionada de dimetil-sulfóxido (DMSO, concentração final de 1%, v/v, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), a fim de obter concentração final de 10 µg i.a./mL e 5 µg i.a./mL, respectivamente (LIMA et al., 2015).

3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL de *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf.

Os constituintes do OECC foram identificados por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG/EM), utilizando cromatógrafo modelo CGMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Kyoto, Japão). A análise foi conduzida sob as seguintes condições analíticas: coluna capilar RTX- 5MS (30 m Comprimento x 0.25 mm diâmetro interno x 0.25 µm espessura do filme); temperatura programada de 60 – 240 °C a 3 °C/min;

temperatura do injetor, 250 °C; temperatura do detector, 220 °C; impacto de elétrons, 70 eV; transporte de gás hélio 0,99 mL/min de fluxo; velocidade linear - 36,4 cm/s, pressão de 57 kPa e escala de massa (m/z), 40 a 500. O volume de 0,1mL do OECC foi injetado numa solução de 1,0mL de acetato de etila. Os componentes foram identificados após a comparação dos espectros de massa de cada constituinte com a base de dados de CG/EM (NIST/EPA/NIH de Massa Espectral Database Versão 1.7). Os constituintes foram quantificados depois das áreas serem normalizadas, sendo expressos em percentagem total de área (%) (ADAMS, 2001).

3.4 PRODUÇÃO DAS SOLUÇÕES DE ÓLEO ESSENCIAL E QUITOSANA E REVESTIMENTO COM INCORPORAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

As emulsões do OECC em diferentes concentrações (2,5; 1,25; 0,6; 0,3 e 0,15 $\mu\text{L/mL}$) foram obtidas por dissolução do óleo essencial em água destilada estéril, contendo Tween 80 (1%, v/v; Sigma- Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) como agente estabilizante (MAQBOOL et al., 2011). As dispersões de QUI foram preparadas em diferentes concentrações (2,5; 5 e 7,5 mg/mL) após dissolução do polímero em ácido acético 0,1 M (1 mL/100 mL, pH 5,6; Química Moderna, São Paulo, Brasil) por 24 h a temperatura ambiente sob agitação (120 rpm).

As concentrações de QUI foram selecionadas considerando resultados de um estudo prévio que mostrou a eficácia de inibição do crescimento das cepas de *Colletotrichum* utilizadas no presente estudo (OLIVEIRA et al., 2017). A fim de garantir que o ácido acético não foi interferente na atividade antifúngica dos compostos, o pH da solução foi ajustado a 5,6, pela adição de NaOH a 3M (Química Moderna, São Paulo, Brasil) ou HCl a 0,1 M (Química Moderna, São Paulo, Brasil) (ALI; NOH; MUSTAFA, 2015; GUERRA et al., 2015). Para os ensaios de aplicação do revestimento contendo as combinações de QUI e OECC em frutos, glicerol (2,5 mL/100mL) foi adicionado a mistura como agente plastificante, o que ocorreu imediatamente após a incorporação do OECC na dispersão de QUI (MAQBOOL et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2017).

3.5 EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL RADIAL FÚNGICO

O efeito do OECC sobre o crescimento micelial radial de cada espécie fúngica ensaiada foi determinado pelo emprego da técnica do envenenamento do substrato de crescimento (ATHAYDE et al., 2016). Diferentes concentrações de OECC (2,5; 1,25; 0,6; 0,3; ou 0,15 µL/mL) foram adicionadas em ABD ainda em estado líquido e acondicionadas em placas de Petri esterilizadas. Após a solidificação do meio de cultura adicionado do OECC, um disco de 5 mm de diâmetro da cepa fúngica cultivada por 7 dias em ABD a temperatura de 25-28 °C foi inoculado. ABD sem adição do OECC foi similarmente testado como controle negativo. ABD contendo uma solução de ácido acético a 0,1 M (1 mL/100 mL) (pH 5,6) foi testada como um controle adicional e não exibiu efeito inibitório do crescimento micelial radial das cepas de *Colletotrichum* testadas.

O crescimento micelial radial foi medido diariamente durante 10 dias ou até que a placa de Petri contendo o controle negativo apresentasse completamente coberta de micélios. O diâmetro de crescimento micelial radial (mm) de cada cepa testada foi medido em duas direções perpendiculares a fim de obter-se o diâmetro médio do crescimento da colônia. O percentual de inibição do crescimento micelial (ICM%) foi calculado utilizando a fórmula: $ICM\% = [(C-T) / C] \times 100$, onde C é o diâmetro da colônia no ensaio controle e T é o diâmetro da colônia crescido em ABD suplementado com o OECC (CAMILETTI et al., 2014; LIMA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017).

As concentrações de OECC que causaram inibição <100% foram selecionadas nos ensaios para verificar o tipo de interação, quando usado em combinação com concentrações de QUI (inibição <100%) para inibir as espécies de *Colletotrichum*.

3.6 DETERMINAÇÃO DO TIPO DE INTERAÇÕES ENTRE QUITOSANA E ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf.

Para determinar o tipo de interação estabelecida pelas diferentes combinações de QUI e OECC, o ICM% causado pelo OECC (1,25; 0,6; 0,3 ou 0,15 µL/mL) isoladamente, e em combinação com QUI (QUI: 7,5; 5 ou 2,5 mg/ mL + OECC: 1,25; 0,6; 0,3 ou 0,15 µL/mL), frente a cada cepa de *Colletotrichum* testada, foi determinado, denominado ICM% observado (ICM% obs). Para realização destes ensaios foram utilizados os mesmos procedimentos descritos na seção 3.4. Ainda nestes ensaios, foram considerados os valores de ICM% obs para QUI isoladamente (7,5; 5 ou 2,5 mg/mL) verificado em estudo anterior utilizando as mesmas cepas teste (OLIVEIRA et al., 2017).

O tipo de interação da QUI e do OECC em combinação foi determinado por meio do método de Abbott (KOSMAN; COHEN, 1996; CAMILETTI et al., 2016). Primeiramente, o ICM% esperado para cada combinação de CHI e OECC foi calculado, usando a seguinte fórmula:

$$\text{ICM\%}_{\text{esp}} = \text{ICMQUI\%}_{\text{obs}} + \text{ICMOECC}_{\text{obs}}\% - \frac{(\text{ICMQUI\%} \times \text{ICMOECC\%})}{100}$$

onde, $\text{ICMQUI\%}_{\text{obs}}$ e $\text{ICMOECC}_{\text{obs}}\%$ são os valores individuais de ICM% observados para QUI e OECC nas diferentes concentrações ensaiadas, respectivamente.

Subsequentemente, o tipo de interação das diferentes combinações de QUI e OECC sobre o crescimento micelial fúngico foi determinado por meio do Índice de Abbott (IA), como segue: $\text{IA} = \text{ICM\% obs} / \text{ICM\% esp}$. A determinação do efeito sinérgico foi designado quando observado $\text{IA} \geq 1,5$; efeito aditivo, $\text{IA} \geq 0,5 - 1,5$ e antagonista quando $\text{IA} \leq 0,5$ (KOSMAN; COHEN, 1996; CAMILETTI et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017).

3.7 EFEITO DA APLICAÇÃO DO REVESTIMENTO DE QUITOSANA E ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. NO DESENVOLVIMENTO DE ANTRACNOSE EM FRUTOS

As goiabas, mangas e mamões selecionados foram higienizados com água e detergente, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio (150ppm) por 5 minutos e lavagem em água destilada. Os frutos foram dispostos em câmara de segurança a 25 °C até total secagem (OLIVEIRA et al., 2017). Para os ensaios, os frutos foram previamente feridos com o auxílio de cinco agulhas estéreis (3 mm de profundidade e 2 mm de largura) na região média, resultando em cinco furos por lado do fruto (LIMA et al., 2015).

Subsequentemente, os frutos foram imersos em 500 mL da dispersão de QUI (5 mg/mL) contendo diferentes concentrações do OECC (0,6; 0,3 e 0,15 µL/mL), com suave agitação durante um minuto. Em seguida, foram submetidos à secagem ao ar sobre papel filtro absorvente e mantidos em uma cabine de biossegurança por 2 horas. Após o procedimento de secagem, um disco de ágar (5 mm) contendo micélios das cepas fúngicas testadas, removidos a partir da margem da cepa cultivada em ABD durante 7 dias, foi transferido sobre cada ferimento. O disco foi fixado com o auxílio de uma fita-cola na superfície dos frutos (LIMA et al., 2015).

Todos os frutos foram acondicionados individualmente sobre papel toalha umedecido com água destilada esterilizada e acondicionados em recipientes de polietileno estéreis recobertos com saco plástico, com a finalidade de manter uma satisfatória umidade relativa do ar (câmara de umidade). Os recipientes foram acondicionados a temperatura ambiente (25 °C). Após 48 horas de acondicionamento, os sacos de plástico e as toalhas de papel foram retirados (LIMA et al., 2015), mantendo-se os frutos armazenados a temperatura ambiente durante 12 dias. Em diferentes intervalos de tempo de armazenamento (6, 8, 10 e 12 dias), os frutos foram examinados quanto ao aparecimento de sintomas característicos de antracnose e medição do diâmetro da lesão desenvolvida. Paralelamente, controles negativo e positivo foram incluídos e ensaiados de forma semelhante. Para o controle negativo utilizou-se água destilada estéril contendo glicerol (2,5 mL/100 mL; pH 5,6) em substituição ao revestimento de QUI e OECC. O controle positivo consistiu da aplicação substitutiva de formulações comerciais dos fungicidas tiofanato-metílico (10 µg a.i./mL) e difenoconazol (0,5 µg a.i./mL) (LIMA et al., 2015).

Os resultados foram expressos em percentual de redução do diâmetro da lesão de antracnose (PRLA%), determinado pela diferença no diâmetro da lesão nos frutos revestidos com a combinação de QUI e OECC ou tratado com cada um dos fungicidas sintéticos em relação ao diâmetro da lesão nos frutos não tratados (MUNHUWEYI et al., 2017), de acordo com a fórmula: $PRLA\% = [(N - F / N) \times 100]$, onde N é o diâmetro da lesão de antracnose nos frutos do controle negativo e F é o diâmetro da lesão de antracnose nos frutos revestidos com as combinações de QUI e OECC ou tratados com os fungicidas sintéticos. Os frutos foram avaliados do 6º ao 12º dia de armazenamento porque os primeiros sinais visíveis de lesão de antracnose em todos os frutos não revestidos surgiram apenas a partir do 6º dia de armazenamento.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises dos efeitos sobre o crescimento micelial fúngico foram realizadas em triplicata em três experimentos independentes. As análises de desenvolvimento de antracnose em frutos foram realizadas utilizando-se um delineamento completamente aleatório, que consistia em três repetições para cada grupo experimental (tratamentos) e quatro frutos por repetição em três experimentos independentes. Todos os resultados foram expressos como a média dos dados obtidos em cada repetição. Inicialmente, os dados foram avaliados de forma a obter a ordem de descrição das variáveis (média e desvio padrão). Posteriormente, foram

realizadas análises inferenciais (ANOVA seguida de teste de Tukey) para determinar diferenças ($p \leq 0,05$) entre os resultados obtidos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software computacional Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San José, CA).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois (USA), 2001, 456p.
- AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 837-842, 2010.
- AKHTAR, M. S.; DEGAGA, B.; AZAM, T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. **Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, v. 2, p. 1-7, 2014.
- ALI, A. et al. Post-harvest development of anthracnose in pepper (*Capsicum* spp): Etiology and management strategies. **Crop protection**, v. 90, p. 132-141, 2016.
- ALI, A. et al. Potential of chitosan coating in delaying the postharvest anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of *Eksoitika II papaya*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 2134-2140, 2010.
- ALI, A.; MOHAMED, M. T. M.; SIDIQI, Y. Control of anthracnose by chitosan through stimulation of defence-related enzymes in *Eksoitika II Papaya (Carica papaya* L.) fruit. **Journal of Biology and Life Science**, 2012. DOI: 10.5296/jbls.v3i1.1306
- 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, p. 56-61, 2015.
- ALLOUI, H. et al. 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, p. 21-28, 2014.
- ANARUMA, N. D. et al. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Sacc. in yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus* essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 66-73, 2010.
- ARREBOLA, E. et al. Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. **Crop Protection**, v. 29, p. 369-377, 2010.
- ASSIS, J. S. Cultivo da mangueira: Colheita e pós-colheita. Resource document. 2010. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira_2ed/colheita.htm. Acesso em: 20/06/17
- ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 51-62, 2016.
- ATHAYDE, A. J. A. A. et al. A coating composed of chitosan and *Cymbopogon citratus* (Dc. Ex Nees) essential oil to control Rhizopus soft rot and quality in tomato fruit stored at room

temperature. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 2016. DOI: 10.1080/14620316.2016.1193428

AYÓN-REYNA, L. E. et al. Application of a hydrothermal-calcium chloride treatment to inhibit postharvest anthracnose development in papaya. **Postharvest Biology and Technology**, v. 124, p. 85-90, 2017.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BAUTISTA-BAÑOS, S. et al. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 22, p. 1087-1092, 2003.

BILL, M. et al. The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea Americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. **Crop Protection**, v. 64, p. 159-167, 2014.

BOF, M. J. et al. Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 281-294, 2015.

BOSQUEZ-MOLINA, E. et al. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. **Postharvest Biology and Technology**, v. 57, p. 132-137, 2010.

BOTELHO, L. N. S. et al. Quality of guava cv. ‘Pedro Sato’ treated with cassava starch and cinnamon essential oil. **Scientia Horticulturae**, v. 209, p. 214-220, 2016.

CAMILI, E. C. et al. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva “Ítália” contra *Botrytis cinerea*. **Summa Phytopathology**, v. 33, p. 215-221, 2007.

CAMILETTI, B. X. et al. Natural control of corn postharvest fungi *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp. using essential oils from plants grown in Argentina. **Journal of Food Science**, v.79, p. 2499-2506, 2014.

CAMILETTI, B. X. et al. Essential oils and their combinations with iprodione fungicide as potential antifungal agents against withe rot (*Sclerotium cepivorum* Berk) in garlic (*Allium sativum* L.) crops. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 117-124, 2016.

CARVALHO, C. et al. Anuário Brasileiro da Fruticultura. **Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz**, 2017, 88p.

CHÁFER, M. et al. Fungal decay and shelf life of oranges coated with chitosan and bergamot, thyme, and tea tree essential oils. **Journal of Food Science**, v.77, 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, p. 225-229, 2007.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças**. Editora UFLA, Lavras, 2005, 783p.

CINDI, M. D. et al. Chitosan boehmite-alumina nanocomposite films and thyme oil vapour control brown rot in peaches (*Prunus persica* L.) during postharvest storage. **Crop Protection**, v. 72, p. 127-131, 2015.

COSTA, G. et al. Polyphenols from *Cymbopogon citratus* leaves as a topical anti-inflammatory agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 222-228, 2016.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v. 21, p. 703-714, 2004.

DOTTO, G. L.; VIEIRA, M. L. G.; PINTO, L. A. A. Use of chitosan solutions for the microbiological shelf life extension of papaya fruits during storage at room temperature. **LWT – Food Science and Technology**, v. 64, p. 126-130, 2015.

DUAMKHANMANEE, R. Natural essential oils from lemon grass (*Cymbopogon citratus*) to control postharvest anthracnose of mango fruit. **International Journal of Biotechnology**, 2008. DOI: 10.1504/IJBT.2008.017971

EL-MOHAMEDY, R. S.; EL-GAMAL, N. G.; BAKEER, A. R. T. Application of Chitosan and essential oils as alternatives fungicides to control green and blue molds of citrus fruits. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, p. 629-643, 2015.

ELSABEE, M. Z.; ABDOL, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Material Science and Engineering**, v. 33, p. 1819-1841, 2013.

ELSHAFIE, H. S. et al. *In vivo* antifungal activity of two essential oils from Mediterranean plants against postharvest brown rot disease of peach fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 11-15, 2015.

EMBRAPA. Adubando para Alta Produtividade e Qualidade: fruteiras Tropicais do Brasil. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2009, 283p.

_____. Circular Técnica: Recomendações para o Cultivo da Goiabeira no Rio Grande do Sul. Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, 2011, 8p.

_____. Cultivo da Mangueira. Sistemas de Produção 2 – Versão Eletrônica, Julho/2004. Disponível em:

<<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/cultivares.htm>> Acesso em: 17 de agosto de 2016.

FAGUNDES, C. et al. Effect of antifungal hydroxipropyl methylcellulose-beewax edible coatings on gray mold development and quality attributes of cold-stored cherry tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 92, p. 1–8, 2014.

FRANKOVA, A. et al. The antifungal activity of essential oils in combination with warm air flow against postharvest phytopathogenic fungi in apples. **Food Control**, v. 68, p. 62-68, 2016.

GOMES-MORAES, S. R. et al. Histopathology of *Colletotrichum gloesporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 657-664, 2013.

GUERRA, I. C. D. et al. 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 fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p. 168-178, 2015.

GUERRA, I. C. D. et al. The effects of composite coatings containing chitosan and *Mentha piperita* L. or *villosa* Huds essential oil on postharvest mold occurrence and quality of table grape cv. Isabella. **Innovate Food Science and Emerging Technologies**, v. 34, p. 112-121, 2016.

GUFFIN, M.; HOBBS, M.; UPTON, R. **American herbal products association botanical safety handbook**. Boca Raton: CRC press, 1997.

HEWAJULIGE, I. G. N. et al. Mode of action of chitosan coating on anthracnose disease control in papaya. **Phytoparasitica**, v. 37, p. 447-444, 2009.

HONG, K. et al. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) fruit during cold storage. **Scientia Horticulturae**, v. 144, p. 172-178, 2012.

HOSSEINNEJAD, M.; JAFARI, S. M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 467-475, 2016.

HU, M. et al. Reduction of postharvest anthracnose and enhancement of disease resistance in ripening mango fruit by nitric oxide treatment. **Postharvest Biology and Technology**, v. 97, p. 115-122, 2014.

IRIEDA, H.; TAKANO, Y. Identification and characterization of virulence-related effectors in the cucumber anthracnose fungus *Colletotrichum orbiculare*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 95, p. 87-92, 2016.

JITAREERAT, P. et al. Effect of chitosan on ripening, enzymatic activity, and disease development in mango (*Mangifera indica*) fruit. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 35, p. 211-218, 2007.

KAMLE, M. et al. Identification and phylogenetic correlation among *Colletotrichum gloesporioides* pathogen of anthracnose for mango. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 285-287, 2013.

KEFIALEW, Y.; AYALEW, A. Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloesporioides*) on mango (*Mangifera indica*). **Postharvest Biology and Technology**, v. 50, p. 8-11, 2008.

KERCH, G. Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, p. 159-166, 2015.

KOSMAN, E.; COHEN, Y. Procedures for calculating and differentiating synergism and antagonism in action of fungicide mixtures. **Phytopathology**, v. 86, p. 1263-1272, 1996.

KOUL, O. et al. Comparative study on the behavioral response and acute toxicity of some essential oils compounds and their binary mixtures to larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura* and *Chilo partellus*. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 428-436, 2013.

LEMOS, L. M. C. et al. Controle da antracnose na pós-colheita de manga 'Ubá' com o uso de produtos alternativos. **Rev. Bras. Frutic**, v. 35, n. 4, p. 962-970, 2013.

LI, H. et al. Effects of chitosan on control of postharvest blue mold decay of apple fruit and the possible mechanisms involved. **Scientia Horticulturae**, v. 186, p. 77-83, 2015.

LI, X. et al. Chitin, chitosan and glycated chitosan regulate immune responses: The novel adjuvants for cancer vaccine. **Clinical and Developmental Immunology**, 2013.

LIMA, L. C. et al. Controle da antracnose e qualidade de mangas (*Mangifera indica* L.) cv. Haden, após tratamento hidrotérmico e armazenamento refrigerado em atmosfera modificada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 298-304, 2007.

LIMA, N. B. et al. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 75-88, 2013.

LIMA, N. B. et al. Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in northeastern Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, p. 679-688, 2015.

LIU, F. et al. Species boundaries in plant pathogenic fungi: a *Colletotrichum* case study. **BMC Evolutionary Biology**, n. 16, p. 81-95, 2016.

MAEDA, C.; NELSON, S. Anthracnose of Papaya in Hawai'i. **Plant Disease**, v. 103, 2014. Disponível em: <https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-103.pdf> (Acesso em 26/04/17).

MATTIUZ, B. et al. Effect of propolis on postharvest control of anthracnose and quality parameters of 'Kent' mango. **Scientia Horticulturae**, v. 184, p. 160-168, 2015.

MAQBOOL, M. et al. Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 62, p. 71-76, 2011.

MUNHUWEYI, K. et al. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of chitosan-essential oils against pomegranate fruit pathogens. **Postharvest Biology and Technology**, v. 129, p. 9-22, 2017.

NAIK, M. I. et al. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some select pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 7, p. 535-538, 2010.

OLIVEIRA, C. E. V. et al. Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca*). **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, p. 54-61, 2014.

OLIVEIRA, K. A. R. et al. Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. **Food Microbiology**, v. 66, p. 96-103, 2017.

OOTANI, M. A. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oil on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:h7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 14-20, 2013.

PERDONES, A. et al. Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage- keeping quality of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, v. 70, p. 32-41, 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.

REGNIER, T. et al. Fungitocity of *Lippia scaberrima* essential oil and select terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 254-258, 2008.

REGNIER, T. et al. Evaluation of *Lippia scaberrima* essential oil and some pure terpenoid constituents as postharvest mycobiocides for avocado fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 57, p. 176-182, 2010.

REGNIER, T. et al. Application of essential oils as multi-target fungicides for the control of *Geotrichum citri-aurantii* and other postharvest pathogens of citrus. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 151–159, 2014.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, v. 30, p. 1-3, 2014.

SAKAR, A. K. Anthracnose diseases of some common medicinally important fruit plants. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 4, p. 233–236, 2016.

SALEM, E. A.; YOUSSEF, K.; SANZANI, S. M.; Evaluation of alternative means to control postharvest Rhizopus rot of peaches. **Scientia Horticulturae**, v. 198, p. 86-90, 2016.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. et al. Use of essential oils in bioactive edible coatings. **Food Engineering Reviews**, v. 3, p. 1-16, 2011.

SANGSUWAN, J.; PONGSAPAKWORAWAT, T. BANGMO, P. Effect of chitosan beads incorporated with lavender or red thyme essential oils in inhibiting *Botrytis cinerea* and their application in strawberry packaging system. **LWT – Food Science and Technology**, v. 74, p. 14-20, 2016.

SANTOS, N. S. T. et al. 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, p. 345-353, 2012.

SEBRAEa. O cultivo e o mercado da manga. **Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas**, 2016. Disponível em:

<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-da-manga,90f5438af1c92410VgnVCM100000b272010aRCRD>. Acesso em: 16 de agosto de 2016.

SEBRAEb. O cultivo e mercado do mamão. **Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas**, 2016. Disponível em:

<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-do-mamao,937a9e665b182410VgnVCM100000b272010aRCRD>. Acesso em: 12 de dezembro de 2016.

SEBRAEc. O cultivo e mercado da goiaba. **Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas**, 2016. Disponível em:

<https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-da-goiaba,d3aa9e665b182410VgnVCM100000b272010aRCRD>. Acesso em: 12 de dezembro de 2016.

SHAO, X. et al. Effect of postharvest application of chitosan combined with clove oil against citrus green mold. **Postharvest Biology and Technology**, v. 99, p. 37-43, 2015.

SELLAMUTHU, P. S. et al. Thyme oil vapour and modified atmosphere packaging reduce anthracnose incidence and maintain fruit quality in avocado. **Journal Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 3024-3031, 2013.

SERRANO, L. A. L.; CATTANEO, L. F. O cultivo do mamoeiro no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, s/p., 2010.

SILVA, A. F.; SANTOS, A. P.; RABELO, M. Identificação botânica das plantas medicinais. **Informe Agropecuário**, v. 31, p. 77-85, 2010.

SILVA, C. B. et al. Antifungal activity of the Lemongrass oil and citral against *Candida* spp. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 63-66, 2008.

SILVA, C. F. B.; MICHEREFF, S. J. Biology of *Colletotrichum* spp. and epidemiology of the anthracnose in tropical fruit trees. **Revista Caatinga**, v. 26, p. 13-138, 2013.

SILVA, L. M. R. et al. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 143, p. 398-404, 2014.

SIVAKUMAR, D.; JIANG, Y.; YAHIA, E. M.; Maintaining mango (*Mangifera indica* L.) fruit quality during the export chain. **Food Research International**, v. 44, p. 1254-1263, 2011.

SIVAKUMAR, D.; BAUTISTA-BAÑOS, S. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. **Crop Protection**, v. 64, p. 27-37, 2014.

- SOUSA, L. L. et al. Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic *Aspergilli* and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes). **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, p. 312-318, 2013.
- SOUZA, E. L. The effects of sublethal doses of essential oils and their constituents on antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance among food-related bacteria: A review. **Trends in Food Science & Technology**. v. 56, p. 1-12, 2016.
- SIGMASTAT. Version 3.5. Systat software. Jandel Scientific, San Jose, California, USA. Integrated with SigmaPlot 10.0 for Windows [Computer program], 2007.
- TAJIDIN, N. E. et al. Chemical composition and citral contents in lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil at three maturity stages. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 2685-2693, 2012.
- TOLAIMATEA, A. et al. Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. **Polymer**, v. 44, p. 7939-793, 2003.
- TREICHEL, M. et al. Anuário Brasileiro da Fruticultura. Santa Cruz do Sul: **Editora Gazeta Santa Cruz**, 2016, 88p.
- TURINA, A. V. et al. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, 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 Emerging Technology**, v. 8, p. 253-258, 2007.
- USFDA. Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Premarket Approval GRAS notices received in 2001. **American Society for Microbiology**: Washington, DC, 2001.
- VIEIRA, J. M. et al. Effect of chitosan-*Aloe vera* coating on postharvest quality of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.116, p. 88-97, 2014.
- VILLAYERDE, J. M. et al. Efeitos do óleo essencial do capim-limão (*Cymbopogon citratus* Stapf) sobre células humanas de melanoma (SK-MEL 147) e queratinócitos (HaCaT). *Biosaúde*, v. 15, n. 1, 2013.
- VITORATOS, A. et al. Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, v. 41, p. 86-92, 2013.
- XING, Y. et al. Effects of chitosan-oil coating on blue mold disease and quality attributes of jujube fruits. **Food & Functional**, v. 2, p. 466–474, 2011.
- YAHIA, E. Postharvest Biology and Technology and Tropical and Subtropical Fruits. **Woodhead Publishing**, 2011, 534p.

YUAN, G.; TANG, W.; ZHANG, X. Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage. **Food Control**, v. 59, p. 818-823, 2016.

ZAHID, N. et al. Induction of lignin and pathogenesis related proteins in dragon fruit plants in response to submicron chitosan dispersions. **Crop Protection**, v. 62, p. 129-134, 2014.

ZHENG, M. et al. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. **Biological Control**, v. 65, p. 200-206, 2013.

ZHOU, Y.; ZHANG, L.; ZENG, K.; Efficacy of *Pichia membranaefaciens* combined with chitosan against *Colletotrichum gloesporioides* in citrus fruits and possible modes of action. **Biological Control**, v. 96, p. 39-47, 2016.

ZHU, X. et al. Effects of chitosan coating on postharvest quality of mango (*Mangifera indica* L. cv. Tainong) fruits. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 32, p. 770-784, 2008.

APÊNDICE A – ARTIGO I

Control of anthracnose caused by *Colletotrichum* species in guava, mango and papaya using synergistic combinations of chitosan and *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. essential oil

Control of anthracnose caused by *Colletotrichum* species in guava, mango and papaya using synergistic combinations of chitosan and *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. essential oil

Running title: Control of fruit anthracnose using edible coatings

Abstract

This study assessed the efficacy of chitosan (Chi) and *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. essential oil (CCEO) combinations to control the mycelial growth of five pathogenic *Colletotrichum* species (*C. asianum*, *C. siamense*, *C. fructicola*, *C. tropicale* and *C. karstii*), as well as the anthracnose development in guava (*Psidium guajava* L.) cultivar (cv.) Paluma, mango (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins and papaya (*Carica papaya* L.) cv. Papaya artificially inoculated with these species. Combinations of Chi (2.5, 5 or 7.5 mg/mL) and CCEO (0.15, 0.3, 0.6 or 1.25 μ L/mL) inhibited the mycelial growth of all tested fungal species. Examined Chi-CCEO combinations showed additive or synergistic inhibitory effects on the target *Colletotrichum* species based on the Abbott index. Coatings formed by synergistic Chi (5 mg/mL) and CCEO (0.15, 0.3 or 0.6 μ L/mL) combinations decreased anthracnose lesion development in guava, mango and papaya inoculated with any of the tested *Colletotrichum* species during 12 d of storage at 25 °C. Overall, anthracnose lesion development inhibition in fruit coated with synergistic Chi-CCEO combinations was higher than that observed in fruit treated with synthetic fungicides. Application of coatings formed by Chi-CCEO synergistic combinations could be effective for controlling postharvest anthracnose development in fruit, particularly in guava, mango and papaya.

Keywords: chitosan, lemongrass, edible coating, *Colletotrichum*, fruit decay, postharvest treatment.

1. Introduction

Guava (*Psidium guajava* L.), mango (*Mangifera indica* L.) and papaya (*Carica papaya* L.) are among the fruit most appreciated worldwide (Kamle et al., 2013). In Brazil, significant amounts of these fruit pass through the domestic and export markets, mainly guava cultivar (cv.) Paluma, mango cv. Tommy Atkins and papaya cv. Papaya (Silva et al., 2014; Treichel et al., 2016). Considering data of the Brazilian horticultural sector, mango ranked the most exported fruit in 2016, accounting for approximately 154,000 tones, while guava and papaya accounted for approximately 170 and 38,000 tones, respectively (Carvalho et al., 2017).

Guava, mango and papaya are climacteric fruit highly perishable and susceptible to postharvest fungal infections, which negatively affect their quality, shelf life and market value (Ayón-Reyna et al., 2017; Botelho et al., 2016; Oliveira et al., 2017). Anthracnose is among the most common postharvest fungal infections affecting guava, mango and papaya (Kamle et al., 2013; Lima et al., 2013; Lima et al., 2015), as well as a variety of other fruit and vegetables (Ali et al., 2015; Maqbool et al., 2011). *Colletotrichum gloesporioides* has been typically reported as the main anthracnose causative agent in different economically important fruit (Ali et al., 2015; Hu et al., 2014). However, a recent phylogenetic study characterized the species *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. siamense* and *C. karstii* as etiological agents of anthracnose in mango cultivated in Northeastern Brazil (Lima et al., 2015). Additionally, isolates of these species have shown capable of inducing the development of anthracnose in alternative hosts, including papaya and guava (Lima et al., 2015).

Anthracnose development in fruit has been traditionally controlled by the application of synthetic fungicides, such as thiophanate-methyl and other components of benzimidazoles

and dithiocarbamates group (e.g., mancozeb) and inhibitors of ergosterol synthesis (e.g., difenoconazole, myclobutanil and prochloraz) (Hu et al., 2014; Zheng et al., 2013). Although these synthetic fungicides effectively suppress the development of anthracnose in fruit, their resistance inductive effects on pathogenic fungi, which cause progressive increase in their effective antifungal doses in fruit, is a concern (Zheng et al., 2013). Use of synthetic fungicides in fruit is also associated with increased risks to human health and environmental contamination (Santos et al., 2012; Shao et al., 2015).

Use of edible coatings presenting antifungal properties have emerged as alternative technology to protect fruit from external factors, including the action of postharvest pathogenic fungi (Guerra et al., 2015; Guerra et al., 2016). Chitosan (Chi) is a natural biopolymer obtained through the deacetylation of chitin in alkaline medium, consisting of 2-amino-2-deoxy-D-glucose and 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose units linked by β (1 $\rightarrow$ 4). Although Chi can be extracted from different invertebrates, the main Chi commercial sources are crustacean shells (Elsabee and Abdou, 2013; Guerra et al., 2015) and of minor importance, fungal biomass (Oliveira et al., 2014). In addition to its film-forming property, Chi exerts inhibitory effects against a range of postharvest pathogenic fungi (Guerra et al., 2015; Santos et al., 2012).

Researchers have indicated the use of edible coatings composed of Chi and essential oils (EOs) to prolong and enhance their efficacy in inhibiting postharvest pathogenic fungi in fruit (Aloui et al., 2014; Santos et al., 2012). EOs are substances naturally synthesized in different organs of aromatic plants as secondary metabolites, with a fundamental role in plant defense (El Asbahania et al., 2015). The essential oil from *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. (CCEO) has shown wide-spectrum antimicrobial activity, including the inhibition of fungi involved in fruit postharvest infections (Prins et al., 2008; Suhr and Nielsen, 2003; Tzortzakis and Economakis, 2007). *C. citratus* is an indigenous herb in tropical and semi-

tropical areas of Asia and is widely cultivated in South and Central America, Africa and other tropical countries, where it is used in folk medicine for a variety of therapeutic purposes (Shah et al., 2011). Previous studies have reported the effects of the combined use of Chi and CCEO to control fungal decay in fruit (Ali et al., 2015; Athayde et al., 2016; Muhunweyi et al., 2017), but none of them have assessed the efficacy of Chi and CCEO combinations to control anthracnose caused by *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. siamense* or *C. karstii* in guava, mango or papaya.

This study assessed the efficacy of Chi-CCEO combinations to control the growth of five *Colletotrichum* species capable of developing anthracnose in fruit. The efficacy of coatings formed by synergistic Chi-CCEO combinations to control the development of anthracnose lesions induced by these *Colletotrichum* species in guava cv. Paluma, mango cv. Tommy Atkins and papaya cv. Papaya was also evaluated.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Guava cv. Paluma, mango cv. Tommy Atkins and papaya cv. Papaya fruit in second (Hong et al., 2012; Botelho et al., 2016), third (Assis, 2010; Oliveira et al., 2017) and second maturation stage, respectively, were obtained from EMPASA, a Supplies and Services Company of Paraíba State (João Pessoa, Brazil). Fruit maturation stages were classified based on fruit peel color (Maqbool et al., 2011). Fruit with no visible signs of mechanical damage or fungal infection were selected and standardized based on size, appearance, color and shape. Prior to assays, fruit were washed using domestic detergent and running water, surface disinfected by immersion in a sodium hypochlorite solution (150 ppm, pH 7.2 adjusted using 1 M NaOH) for 5 min, washed with sterile distilled water and dried for 2 h in a safety cabinet (Oliveira et al., 2017).

Chi (medium molecular weight, deacetylation degree 75 – 85%, batch MKBH1108V) was obtained from Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA). CCEO was obtained from Lazlo Aromaterapia Ltda. (Belo Horizonte, Brazil), and its quality parameters (appearance, color, odor, density and refractive index) were described in a technical accompanying report issued by the supplier. Commercial formulations of thiophanate-methyl (Cercobin 700 WP, 700 g/kg of active ingredient (a.i.), Iharabras, São Paulo, Brazil) and difenoconazole (Score EC, 250 g/L a.i., Syngenta, São Paulo, Brazil) were used as standard synthetic antifungals. Thiophanate-methyl and difenoconazole formulations were dissolved in a mixture of sterile distilled water and dimethyl sulphoxide (DMSO; final concentration 1%, v/v, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) to obtain final concentrations of 10 µg a.i./mL and 0.5 µg a.i./mL, respectively. These thiophanate-methyl and difenoconazole concentrations are usually used to control the development of anthracnose in fruit orchards in Northeastern Brazil (Lima et al., 2015).

Five different *Colletotrichum* strains (*C. asianum* CMM 4057, *C. siamense* CMM 4077, *C. fructicola* CMM 4069, *C. karstii* CMM 4101 and *C. tropicale* CMM 4071) provided by Culture Collection of Phytopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes” (Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brazil) were used as target organisms in antifungal assays. All *Colletotrichum* strains used in this study were previously identified using multilocus phylogeny (Lima et al., 2013) and were capable of developing characteristic symptoms of anthracnose in guava cv. Paluma, mango cv. Tommy Atkins and papaya cv. Papaya (Lima et al., 2013; Lima et al., 2015). Stocks were maintained in potato dextrose agar (PDA; HiMedia, Mumbai, India) at 5 °C in the dark. For the antifungal assays, working cultures were grown on PDA for seven days at 25 °C. Before the assays, each strain was inoculated in one guava cv. Paluma, mango cv. Tommy Atkins and papaya cv. Papaya, and after the development of characteristic anthracnose lesions, the strains were re-isolated and cultured on PDA at 25 °C

for seven days. Symptoms induced by all tested *Colletotrichum* species were similar in each fruit and comprised irregular brown spots, depressed and, in some cases, soaked areas for guava (Gomes-Moraes et al., 2013); sunken, prominent and generally rounded dark brown to black spots for mango (Sarkar, 2016; Vieira et al., 2014); and colored spots, first becoming a large, sunken and water-soaked area, possibly presenting salmon-colored conidial masses spots for papaya (Ayón-Reyna et al., 2017).

2.2 Identification of CCEO constituents

Individual constituents of CCEO were identified by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) using a gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) model CGMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Kyoto, Japan). GC-MS analysis was performed under the following conditions: capillary column RTX-5MS (30-m column, internal diameter: 0.25 mm, film thickness: 0.25 μ m); temperature programmed from 60 to 240 °C at 3 °C/min; injector temperature, 250 °C; detector temperature, 220 °C; electron impact, 70 eV; carrier gas, helium adjusted to 0.99 mL/min speed; linear velocity, 36.4 cm/s; pressure, 57 kPa; and mass range (m/z), 40 to 500. The injected volume was 1.0 mL of a solution containing 0.1 mL CCEO in 1.0 mL ethyl acetate. The components were identified after comparing the mass spectra of each compound with the GC/MS database (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database Version 1.7). The components were quantified after normalizing the areas and expressed as a percentage of the total area (%; relative abundance) (Adams, 2001).

2.3 Preparation of chitosan and CCEO dispersions and coatings

CCEO emulsions at different concentrations (2.5, 1.25, 0.6, 0.3 and 0.15 μ L/mL) were obtained after dissolving the essential oil in sterile distilled water ($\sim$ 45 °C) containing Tween 80 (1%, v/v; Sigma- Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) as a stabilizing agent (Maqbool et

al., 2011). Chi dispersions were prepared at different concentrations (2.5, 5 and 7.5 mg/mL) after dissolving the polymer in an aqueous 0.1 M acetic acid (1 mL/100 mL, pH 5.6; Química Moderna, São Paulo, Brazil) solution for 24 h at room temperature under stirring (120 rpm). These Chi concentrations were selected considering the results of previous studies that showed their efficacy to inhibit the growth of the *Colletotrichum* strains used in this study (Oliveira et al., 2017). To ensure that the antifungal effects were due to the assayed Chi and not acetic acid, the pH values of all solutions used in control assays were adjusted to 5.6 by adding 3 M NaOH (Química Moderna, São Paulo, Brazil) or 0.1 M HCl (Química Moderna, São Paulo, Brazil).

For the application of Chi and CCEO in combination, the CCEO was incorporated (final concentration 0.15, 0.3 or 0.6 $\mu\text{L/mL}$) directly into the Chi dispersion (5 mg/mL) followed by stirring (120 rpm) for 18 h at room temperature. To assay the application of the coatings formed by Chi-CCEO combinations, glycerol was added (2.5 mL/100 mL) as a plasticizer immediately after the CCEO was incorporated into the Chi dispersions (Oliveira et al., 2017).

2.4 Effects of CCEO on fungal mycelial growth

The effects of CCEO on the radial mycelial growth of the tested *Colletotrichum* species were assessed using a dilution in solid media procedure (Guerra et al., 2015). One agar plug (5 mm diameter) containing mycelia from the tested *Colletotrichum* species was obtained from the margin of a seven-day-old culture grown on PDA at 25 °C, transferred to the center of a Petri dish containing PDA supplemented with CCEO at the desired final concentration (0.15, 0.3, 0.6, 1.25 or 2.5 $\mu\text{L/mL}$) and incubated at 25 °C. PDA without CCEO was similarly tested as a first negative control. PDA containing aqueous 0.1 M acetic acid (1

mL/100 mL) solution (pH 5.6) was tested as an additional negative control and exhibited no inhibitory effects on the radial mycelial growth of the tested *Colletotrichum* species.

The radial mycelial growth was measured daily for 10 d or when the negative control Petri dish was fully covered with mycelia. The radial mycelial growth diameter (mm) of each fungal colony was measured in two perpendicular directions, and the colony mean diameter was obtained. The percentage of mycelial growth inhibition (MGI%) was calculated using the formula: $MGI\% = [(C - T)/C] \times 100$, where C is the colony diameter in the control assay, and T is the diameter of the colony growing in PDA supplemented with CCEO (Camiletti et al., 2014; Oliveira et al., 2017).

2.5 Interactions of Chi and CCEO in combination

To evaluate the type of interaction from the different combinations of Chi and CCEO, first the MGI% caused by CCEO alone (0.15, 0.3, 0.6 or 1.25 $\mu\text{L/mL}$) and in combination with Chi (Chi: 2.5, 5 or 7.5 mg/mL + CCEO: 0.15, 0.3, 0.6 or 1.25 $\mu\text{L/mL}$) on each *Colletotrichum* species, named MGI% observed ($MGI\%_{\text{obs}}$), was determined using the same procedures described in section 2.4. For these assays, the values of $MGI\%_{\text{obs}}$ for Chi alone (2.5, 5 and 7.5 mg/mL) verified in our previous studies were considered (Oliveira et al., 2017). The type of interaction from Chi and CCEO in combination was determined using the Abbott method (Camiletti et al., 2016; Kosman and Cohen, 1996). Firstly, the expected MGI% ($MGI\%_{\text{exp}}$) for each Chi-CCEO combination was calculated using the formula:

$$MGI\%_{\text{exp}} = MGI\text{Chi}\%_{\text{obs}} + MGI\text{CCEO}\%_{\text{obs}} - (\underline{MGI\text{Chi}\%_{\text{obs}} \times MGI\text{CCEO}\%_{\text{obs}}}),$$

100

where $MGI\text{Chi}\%_{\text{obs}}$ and $MGI\text{CCEO}\%_{\text{obs}}$ are the individual values of MGI% caused by Chi and CCEO alone at the given concentrations, respectively. Subsequently, the effects of the

Chi-CCEO combinations on fungal mycelial growth were designated through determination of the Abbott index (AI) as follows: $AI = MGI\%_{obs} / MGI\%_{exp}$.

A synergistic effect was assigned for $AI \geq 1.5$, additive effect for $AI \geq 0.5$ to 1.5 and antagonistic effect for $AI \leq 0.5$ (Camiletti et al., 2016; Kosman and Cohen, 1996; Oliveira et al., 2017).

2.6 Effect of Chi-CCEO combinations on anthracnose lesion development in fruit

For these assays, the surface (epidermis) of each guava, mango or papaya was wounded using a sterilized needle (3 mm-deep and 2 mm-wide) in the middle fruit region, totaling five wounds per fruit side. Subsequently, each fruit was carefully immersed in 500 mL of the coating-forming dispersions containing combinations of different Chi and CCEO concentrations (Chi 5 mg/mL; CCEO 0.15, 0.3 or 0.6 μ L/mL) for 1 min. The fruit were air-dried on absorbent filter papers and kept in a biosafety cabinet for 2 h for drying. Afterwards, for the tested *Colletotrichum* species, an agar plug (5 mm diameter) containing mycelia obtained from the margin of a seven-day-old colony grown on PDA at 25 °C was transferred using sterilized stainless-steel tweezers to a puncture point of an individual fruit. The agar plug was fixed with the aid of a tape on the fruit surface. The fruit were inoculated using the colonized agar plug method because the tested *Colletotrichum* strains do not produce conidia in culture (Lima et al., 2015; Vieira et al., 2014). The fruit were individually wrapped in paper towels moistened with sterile distilled water (forming a humid chamber) to avoid direct contact and packed in polyethylene containers covered with a plastic bag to maintain satisfactory relative humidity. The containers were maintained at room temperature (25 ± 0.5 °C), and the humidity chambers were removed after 48 h (Lima et al., 2015; Oliveira et al., 2017). During different storage time intervals (6, 8, 10 and 12 d), the fruit were examined for visible characteristic symptoms of anthracnose and anthracnose lesion diameter measurement.

Negative and positive controls were included in experiments and assayed similarly. For the negative control, sterile distilled water containing glycerol (2.5 mL/100 mL; pH 5.6), replacing the Chi-CCEO coating was used. For positive controls, commercial formulations of the fungicides thiophanate-methyl (10 µg a.i./mL) and difenoconazole (0.5 µg a.i./mL) were used (Lima et al., 2015).

The results were expressed as percentage of anthracnose lesion diameter reduction (%ALDR), determined by the difference in lesion diameter in fruit coated with the Chi-CCEO combination or treated with each of the synthetic fungicides compared to lesion diameter in uncoated/untreated fruit (negative control) (Munhuweyi et al., 2017), calculated using the formula: $\%ALDR = [(N - F/N) \times 100]$, where N is the anthracnose lesion diameter in negative control fruit, and F is the anthracnose lesion diameter in fruit coated with Chi-CCEO combinations or treated with the synthetic fungicides. Fruit were evaluated from the 6th to 12th d of storage because the first visible signs of anthracnose lesions in all of the uncoated/untreated fruit only arose from the 6th d of storage onward.

2.7 Statistical analysis

Analyses of the effects on fungal mycelial growth were performed in triplicate in three independent experiments. Analyses of anthracnose development in fruit were performed using a completely randomized experimental design that comprised three replicates for each experimental group (treatments) and four fruit per replicate in three independent experiments. All results were expressed as the average of the data obtained in each replicate. Initially, the data were assessed by descriptive analysis (average and standard deviation) to obtain the description order of the variables. Subsequently, inferential analyses (ANOVA followed by post hoc Tukey test) were performed to determine differences ($p \leq 0.05$) between the obtained

results. The statistical analyses were performed using the computational Sigma Stat 3.5 software (Jandel Scientific Software, San Jose, CA).

3. Results

3.1 Identification of CCEO constituents

A total of 30 different constituents were identified in CCEO in amounts $\geq 0.1\%$ (Table 1), resulting in 97.84% of CCEO total mass. Geranial (51.39%) and neral (29.29%) were the majority constituents in CCEO, while geranyl acetate (3.91%), geraniol (3.06%) and methyl heptanone (1.01%) were identified in lower amounts. The other identified constituents were in the range of 0.11 - 0.79%.

3.2 Effects of CCEO on mycelial growth of *Colletotrichum* species

2.5 $\mu\text{L/mL}$ CCEO caused 100% MGI on *C. asianum* CMM 4057 (*C. asianum*), *C. siamense* CMM 4077 (*C. siamense*), *C. fructicola* CMM 4069 (*C. fructicola*), *C. karstii* CMM 4101 (*C. karstii*) and *C. tropicale* CMM 4071 (*C. tropicale*), while 0.15, 0.3, 0.6 and 1.25 $\mu\text{L/mL}$ CCEO caused MGI in the range of 3.0 - 90.3%. For all the tested concentrations, the highest MGI% values (19.5 - 90.3%; $p \leq 0.05$) were observed on *C. karstii*, while the lowest MGI% values ($p \leq 0.05$) were observed on *C. asianum* (5.0 - 37.0%) and *C. fructicola* (3.0 - 37.8%). Overall, 0.15, 0.3 and 0.6 $\mu\text{L/mL}$ CCEO caused similar MGI% values ($p > 0.05$) on *C. asianum* and *C. siamense*. For all the tested target *Colletotrichum* species, the MGI% increased when the CCEO concentrations in cultivation media increased (data in the supplementary material, S1).

The CCEO concentrations that caused MGI below $< 100\%$, i.e., 0.15, 0.3, 0.6 and 1.25 $\mu\text{L/mL}$, were selected to use in assays to verify the type of interaction when they were used in combination with Chi to inhibit the tested *Colletotrichum* species. These assays aimed to

exploit the possibility of reducing the effective antifungal inhibitory doses of CCEO and Chi when applied in combination.

3.3 Effects of Chi-CCEO combinations on *Colletotrichum* species

A total of 12 different combinations of Chi (2.5, 5 or 7.5 mg/mL) and CCEO (0.15, 0.3, 0.6 or 1.25 μ L/mL) were tested to determine their type of interaction against *C. asianum*, *C. siamense*, *C. fructicola*, *C. karstii* and *C. tropicale*. The different examined Chi-CCEO combinations presented synergistic or additive effect against the tested *Colletotrichum* species based on the AI (Table 2 and supplementary material data, S2) and caused total mycelial growth inhibition ($MGI\%_{obs}$: 100) on the target strains.

The examined Chi-CCEO combinations presented an additive effect against *C. asianum*, with the exception of 2.5 mg/mL Chi + 0.15 or 0.3 μ L/mL CCEO (data in the supplementary material, S2), which presented a synergistic effect. However, most of the examined Chi-CCEO combinations presented synergistic effects on *C. tropicale*, *C. siamense* and *C. karstii*. Additive effects were observed for the combinations of 5 or 7.5 mg/mL Chi + 1.25 μ L/mL CCEO on *C. tropicale*; 5 or 2.5 mg/mL Chi + 1.25 μ L/mL CCEO on *C. siamense* and *C. karstii*; and 7.5 mg/mL Chi + 1.25 μ L/mL CCEO on *C. karstii*.

The combinations of 5 mg/mL Chi + 0.15, 0.3 or 0.6 μ L/mL CCEO were selected for use in assays to evaluate their efficacy in controlling anthracnose lesion development in guava, mango and papaya because they were the lowest combined Chi-CCEO concentrations that achieved synergistic effects on at least four of the five tested *Colletotrichum* species.

3.4 Inhibitory effects of coatings formed by Chi-CCEO synergistic combinations on anthracnose lesion development in mango, papaya and guava

The inhibitory effects of coatings formed by Chi-CCEO combinations and treatments with the synthetic fungicides thiophanate-methyl and difenoconazole on anthracnose lesion development induced by *C. asianum*, *C. siamense*, *C. fructicola*, *C. karstii* or *C. tropicale* in guava cv. Paluma, mango cv. Tommy Atkins and papaya cv. Papaya during 12 d of storage at 25 °C are presented in Tables 3, 4 and 5, respectively. In general, the coatings formed by the examined Chi-CCEO synergistic combinations presented remarkable inhibitory effects on development of anthracnose lesion (expressed as percentage of anthracnose lesion diameter reduction, i.e., %ALR) induced by all the tested *Colletotrichum* species regardless the tested fruit during the monitored storage time interval.

The coating formed by 5 mg/mL Chi + 0.6 µL/mL CCEO caused the highest reductions ($p \leq 0.05$) in anthracnose lesion development in guava (%ALDR: 33 – 100), mango (%ALDR: 63 – 100) and papaya (%ALDR: 28 – 100) until the 12th d of storage (data in the supplementary material, S3), even when compared to thiophanate-methyl (%ALDR: 0 – 90.1) and difenoconazole (%ALDR: 0 – 79.4), which were used as positive controls. The coatings formed by 5 mg/mL Chi + 0.3 µL/mL CCEO or 5 mg/mL Chi + 0.15 µL/mL CCEO caused higher or similar reductions in anthracnose lesion development (%ALDR: 18.7 – 100 and 10.1 – 100, respectively) induced by all the tested *Colletotrichum* species in guava, mango and papaya compared to thiophanate-methyl or difenoconazole, with the exception of *C. tropicale* in papaya, where both thiophanate-methyl and difenoconazole presented higher reductions. For all the tested Chi-CCEO coatings, the highest %ALDR values were mostly observed on the 6th and 8th d of storage.

Total inhibition of anthracnose lesion development during the monitored storage time period was observed in guava and mango coated with 5 mg/mL Chi + 0.6 µL/mL CCEO and inoculated with *C. karstii* and until the 6th and 8th d of storage in papaya coated with 5 mg/mL Chi + 0.6 or 0.3 µL/mL CCEO and inoculated with *C. karstii*, respectively. All the tested Chi-

CCEO coatings caused total inhibition of anthracnose lesion development in guava inoculated with *C. asianum* or *C. fructicola* until the 6th d of storage. Thiophanate-methyl was not capable of causing any inhibition on anthracnose lesion development in guava and papaya inoculated with *C. siamense* and *C. fructicola*, respectively, during the monitored storage period, as well as in guava inoculated with *C. tropicale* until the 8th day of storage. Difenoconazole was not capable of causing any inhibition on anthracnose lesion development in guava inoculated with *C. siamense* or *C. asianum*, as well as in mango inoculated with *C. fructicola* until the 6th d of storage period.

4. Discussion

CCEO is composed of a variety of constituents, but the citral isomers geranial (*trans*-citral) and neral (*cis*-citral) have been typically identified as its majority constituent, as observed in CCEO tested in this study (Athayde et al., 2016; Munhuweyi et al., 2017). Citral is an unsaturated monoterpene associated with the antifungal properties of CCEO (Hylgaard et al., 2012; Munhuweyi et al., 2017). Citral causes the irreversible rupture of fungal cell membrane through transverse bonding reactions, inducing electrolyte losses and subsequent depletion of amino acids and sugars (Ali et al., 2016; Regnier et al., 2008). Other monoterpenes (e.g., geranyl acetate, geraniol, neral, nerol and limonene) found in CCEO have shown ability to coagulate microbial cytoplasm and enhance the antifungal properties of the majority constituents (Ali et al., 2015). The antifungal properties of Chi could be mediated by electrostatic forces between its amino-protonated (NH₂⁺) groups and negative residues on fungal cell surfaces (Aloi et al., 2014; Elsabee et al., 2013). Through this interaction, Chi acts by permeabilizing the membrane and causing structural damages in fungal cells (Romanazzi et al., 2017; Yuan et al., 2016).

Most of the examined Chi-CCEO combinations displayed synergistic interactions to inhibit *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. siamense* and *C. karstii* in laboratory media, with the exception of *C. asianum*, which was the species most sensitive to the examined Chi concentrations when assayed alone (MGI% > 70%; Oliveira et al., 2017). This high inhibition rate increases the possibility to reach an additive interaction rather than a synergistic interaction when Chi is tested in combination with other antifungal substances and when the type of interaction is assessed using the AI (Kosmann and Cohen, 1996). Accordingly, the examined Chi-CCEO combinations that did not display synergistic interactions were able to establish additive interactions against the target fungal species. A previous study also found *C. asianum* as the species most sensitive to the synthetic fungicide azoxystrobin compared to *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. siamense* and *C. karstii* (Lima et al., 2015).

Enhanced antifungal effects from the combined use of Chi and EOs, as observed in additive or synergistic interactions, could be reached because Chi disturbs the permeability of fungal membranes and reduces the synthesis of cell wall components, causing decreased ability of the target fungi to tolerate the disturbing effects of the EOs' constituents on surface characteristics and fungal cell structure (Mohammadi et al., 2016; Yuan et al., 2016). Still, the disturbing effects of Chi on fungal cell structure may increase the partition of the EOs' constituents into fungal cells, where they can act on target structures (Athayde et al., 2016; Santos et al., 2012).

Coatings formed by Chi-CCEO combinations that exhibited synergistic effects on most of tested *Colletotrichum* species in laboratory media were also effective in decreasing the anthracnose lesion development in guava cv. Paluma, papaya cv. Papaya and mango cv. Tommy Atkins artificially inoculated with *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. siamense* or *C. karstii* during storage. These findings are in accordance with a previous study that observed the efficacy of synergistic combinations of Chi and *Mentha piperita* L. essential

oil to reduce the severity of anthracnose lesions in mango cv. Tommy Atkins contaminated with different pathogenic *Colletotrichum* species during storage (Oliveira et al., 2017).

In general, the examined Chi-CCEO synergistic combinations exhibited higher inhibitory effects on anthracnose lesion development in fruit than the synthetic fungicides thiophanate-methyl and difenoconazole. Higher inhibitory effects of these synthetic fungicides on anthracnose development were only observed in relation to the combination 5 mg/mL Chi + 0.3 and 0.15 μ L/mL CCEO when applied on papaya that was inoculated with *C. tropicale*. This specific behavior could be associated with the influence of fruit structure characteristics and composition on fungal-host interaction in each fruit and, consequently, on fungal pathogenicity, which directly affect the efficacy of antifungal substances to inhibit fruit colonizing fungi (Lima et al., 2015).

The inhibitory effects of the examined Chi-CCEO combinations on anthracnose lesion development in guava, mango and papaya decreased when the storage time increased. These results could be associated with the fruit ripening over the monitored storage period, increasing their susceptibility to pathogenic fungi (Yahia, 2011). Moreover, losses by volatilization of CCEO constituents incorporated into Chi-based coatings over time could also negatively affect the efficacy of the examined Chi-CCEO coatings to inhibit anthracnose development in fruit (Bakkali et al., 2008; Sivakumar and Bautista-Baños, 2014). The possible association of the CCEO constituents volatilization with decreased efficacy to inhibit anthracnose development in fruit is reinforced when considering that the inhibitory effects of the examined Chi-CCEO combinations on the target *Colletotrichum* species increased when the CCEO concentrations increased rather than when the Chi concentration increased. However, the incorporation of EOs into Chi-based coatings has shown effective to maintain higher amounts of these substances on fruit surface over time compared to the use of EOs alone. Chi, acting as a film-forming component in edible coatings formulation, is capable of

lowering the diffusion process of EOs constituents on fruit surface, prolonging their efficacy to inhibit fungal pathogens and fruit decay (Sivakumar and Bautista-Baños, 2014; Yuan et al., 2016).

The results of this study showed that the use of Chi and CCEO in combination causes a strong inhibition of *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. siamense* and *C. karstii*. Different Chi-CCEO combinations displayed additive or synergistic inhibitory effects on the five tested *Colletotrichum* species. The application of coatings formed by Chi-CCEO synergistic combinations on guava cv. Paluma, mango cv. Tommy Atkins and papaya cv. Papaya caused partial or total inhibition of anthracnose lesion development when these fruit were inoculated with the tested *Colletotrichum* species over a 12-d storage period. The inhibitory effects caused by Chi-CCEO coatings were similar to or higher than those caused by the application of synthetic fungicides used to control anthracnose in fruit. The application of coatings formed by Chi-CCEO synergistic combinations could be an effective alternative for inhibiting the postharvest development of anthracnose in fruit, particularly in guava, mango and papaya.

Acknowledgments

The authors are grateful to the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (Brazil) for the financial support, the Coordination of Higher Personnel Improvement – CAPES (Brazil) for the scholarship awarded to P.D.L. Oliveira, and the Unity for Characterization and Analysis - Institute for Research in Drugs and Medicines (Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil) for support in GC-MS analysis for identification of CCEO constituents.

References

- Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois (USA), 2001. 456p.
- Ali, A., Bordoh, P.K., Singh, A., Siddiqui, Y., Droby, S. 2016. Post-harvest development of anthracnose in pepper (*Capsicum* spp.): Etiology and management strategies. Crop Prot. 90, 132-141.
- Ali, A., Noh, N.M., Mustafa, M.A. 2015. Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. Food Pack. Shelf Life 3, 56-61.
- Aloui, H., Khwaldia K., Licciardello, F., Mazzaglia, A., Muratore, G., Hamd, M., Restuccia, C. 2014. 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. Int. J. Food Microbiol. 170, 21–28.
- Assis, J.S. 2010. Cultivation of mango tree: Harvest and post-harvest. Resource document. http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira_2ed/colheita.htm (Accessed 12.05.17). [In Portuguese]
- Athayde, A.J.A.A., Oliveira, P.D.L., Guerra, I.C.D., Conceição, M.L., Lima, M.A.B., Arcanjo, N.M.O., Madruga, M.S., Berger, L.R.R., Souza, E.L. 2016. A coating composed of chitosan and *Cymbopogon citratus* (Dc. Ex Nees) essential oil to control Rhizopus soft rot and quality in tomato fruit stored at room temperature. J. Hort. Sci. Biotechnol. 91, 582-591.
- Ayón-Reyna, L.E., González-Robles, A., Rendón-Maldonado, J.G., Báez-Flores, M.E., López-López, M.E., Vega-Garcia, M.O. 2017. Application of a hydrothermal-calcium chloride treatment to inhibit postharvest anthracnose development in papaya. Postharvest Biol. Technol. 124, 85-90.

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, I. 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.
- Botelho, L.N.S., Rocha, D.A., Braga, M.A., Silva, A., Abreu, C.M.P., 2016. Quality of guava cv. ‘Pedro Sato’ treated with cassava starch and cinnamon essential oil. *Sci. Hort.* 209, 214–220.
- Camiletti, B.X., Asensio, C.M., Pecci, M.D.L.P.G., Lucini, E.I. 2014. Natural control of corn postharvest fungi *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp. using essential oils from plants grown in Argentina. *J. Food Sci.* 79, M2499–M2506.
- Camiletti, B.X.; Ansensio, C.M.; Gadbane L.C.; Peccid M.P.; Conlesc M.Y.; Lucinia, E.I. 2016. Essential oils and their combinations with iprodione fungicide as potential antifungal agents against withe rot (*Sclerotium cepivorum* Berk) in garlic (*Allium sativum* L.) crops. *Ind. Crops Prod.* 85, 117–124.
- Carvalho, C., Kist, B.B., Santos, C.E., Treichel, M., Filter, C.F. 2017. Brazilian Horticultural Directory. 1st ed. Gazeta Santa Cruz, Santa Cruz do Sul. [In Portuguese]
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Aït Addi, E.H., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N., Elaissari, A. 2015. Essential oils: from extraction to encapsulation. *Int. J. Pharm.* 483, 220–243.
- Elsabee, M.Z., Abdou, E.S. 2013. Chitosan based edible films and coatings: A review. *Mater. Sci. Eng.* 33, 1819–1841.
- Gomes-Moraes, S.R., Asama Tanaka, F.A., Massola Júnior, N.S. 2013. Histopathology of *Colletotrichum gloesporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). *Rev. Bras. Frut.* 35, 657–664.
- Guerra, I.C.D., de Oliveira, P.D.L., Pontes, A.L.S., Lúcio, A.S.S.C., Tavares, J.F., Barbosa-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 fruit. *Int. J. Food Microbiol.* 214, 168–178.

Guerra, I.C.D., Oliveira, P.D.L., Fernandes, M.M.S. Lúcio, A.S.S.C., Tavares, J.F., Barbosa-Filho, J.M., Madruga, M.S., Souza, E. L. 2016. The effects of composite coatings containing chitosan and *Mentha (piperita* L. or *x villosa* Huds) essential oil on postharvest mold occurrence and quality of table grape cv. Isabella. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 34, 112–121.

Hong, K., Xie, J., Zhang L., Sun, D., Gong, D., 2012. Effects of chitosan on postharvest life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) fruit during cold storage. *Sci. Hort.* 144, 172-178.

Hu, M., Yang, D., Huber, D.J., Jiang, Y., Li, M., Gao, Z., Zhang, Z. 2014. Reduction of postharvest anthracnose and enhancement of disease resistance in ripening mango fruit by nitric oxide treatment. *Postharvest Biol. Technol.* 97, 115-122.

Hylgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 25, 3-12.

Kamle, M., Kumar, P., Gupta, V.K., Tiwari, A.K., Misra, A.K., Pandey, B. K. 2013.

Identification and phylogenetic correlation among *Colletotrichum gloeosporioides* pathogen of anthracnose for mango. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2, 285-287.

Kosman, E., Cohen, Y., 1996. Procedures for calculating and differentiating synergism and antagonism in action of fungicide mixtures. *Phytopathology* 86, 1263–1272.

Lima, N.B., Batista, M.V.A., Junior-Morais, M.A., Maria, A.G.B., Michereff, S.J., Hyde, K.D., Câmara, M.P.S. 2013. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Div.* 61, 75–88.

Lima, N.B., Lima, W.G., Tovar-Pedraza, J.M., Michereff, S.J., Câmara, M.P.S. 2015.

Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in northeastern Brazil. *Eur. J. Plant Pathol.* 141, 679–688.

- Maqbool, M., Ali, A., Alderson, P.G., Mohamed, M.T.M., Siddiqui, Y., Zahid, N. 2011. Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. *Postharvest Biol. Technol.* 62, 71–76.
- Mohammadi, A., Hashemi, M., Hosseini, S.M. 2016. Integration between chitosan and *Zataria multi Flora* or *Cinnamomum zeylanicum* essential oil for controlling *Phytophthora drechsleri*, the causal agent of cucumber fruit rot. *LWT- Food Sci. Technol.* 65, 349 –356.
- Munhunweyi, K., Caleb, O.J., Lennox, C.L., Reenen, A.J., Opara, U.L. 2017. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of chitosan-essential oils against pomegranate fruit pathogens. *Postharvest Biol. Technol.* 129, 9-22.
- 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.). *Int. J. Food Microbiol.* 171, 54–61.
- Oliveira, K.A.R., Berger, L.R.R., Araújo, S.A., Câmara, M.P.S., Souza, E. L. 2017. Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. *Food Microbiol.* 66, 96-103.
- Perdones, A., Sanchez-Gonzalez, L., Chiralt, A., Vargas, M., 2012. Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biol. Technol.* 70, 32–41.
- Prins, C.L., Freitas, S. P., Campostrini, E., Gravina, G.A., Reis, F.O. 2008. Effects of root system confinement on lemongrass (*Cymbopogon citratus*). *Rev. Cien. Agron.* 39, 416-421.
- [In Portuguese]

- Regnier, T., Plooy, D.W., Combrinck, S., Botha, B. 2008. Fungitocity of *Lippia scaberrima* essential oil and select terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. *Postharvest Biol. Technol.* 48, 254-258.
- Romanazzi, G., Feliziani, E., Baños, S.B., Sivakumar, D. 2017. Shelf life extension of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 579-601.
- 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 Microbiol.* 32, 345–353.
- Sarkar, A.K., 2016. Anthracnose diseases of some common medicinally important fruit plants. *J. Med. Plants Studies* 4, 233–236.
- Shah, G., Shri, R., Panchal, V., Sharma, N., Singh, B., Mann, A.S. 2011. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus* stapf (lemon grass). *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2, 3-8.
- Shao, X., 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 Biol. Technol.* 99, 37–43.
- Silva, A.C., Souza, A.P., Leonel, S.M., Souza, E., Ramos, D.P.A., Tanaka, A. 2014. Growth and flowering of five mango cultivar under subtropics conditions of Brazil. *Am. J. Plant Sci.* 5, 393–402.
- Sivakumar, D., Bautista-Baños, S. 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Prot.* 64, 27–37.
- Suhr, K.I., Nielsen, P.V. 2003. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *J. Appl. Microbiol.* 94, 665–674.

- Treichel, M., Kist, B.B., Santos, C.E., Carvalho, C., Beling, R. R. 2016. Brazilian Horticultural Directory. 1th ed. Gazeta Santa Cruz, Santa Cruz do Sul. [In Portuguese]
- Tzortzakis, N.G., Economakis, C.D. 2007. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 8, 253-258.
- Vieira, W.A.S., Michereff, S.J., Morais Junior, M.A., Hyde, K.D., Câmara, M.P.S. 2014. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal Div.* 67, 181–202.
- Yahia, E. 2011. Postharvest biology and technology and tropical and subtropical fruits. 1th ed. Woodhead Publishing, England.
- Yuan, G., Chen, X., Li, D. 2016. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. *Food Res. Int.* 89, 117-128.
- Zheng, M., Shi, J., Wang, Q., Li, Y. 2013. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biol. Cont.* 65, 200-206.

Table 1. Constituents identified in *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. essential oil (constituents detected at a concentration $\geq 0.1\%$).

LRI*	Constituents	% (w/v)
754	3-Hexanol	0.11
802	2-Hexanol	0.15
729	Tricyclene	0.11
948	α -Pinene	0.13
943	Camphene	0.76
938	Methyl heptanone	1.01
919	Ocimene quintoxide	0.17
1018	Limonene	0.15
1052	4-Nonanone	0.59
1082	Linalool	0.65
864	Di-t-butyacetylene	0.39
807	1,4-Hexadiene, 3,3,5-trimethyl	0.20
1179	Isogeranial	0.72
1204	Decanal	0.15
1229	Nerol	0.47
1174	Neral	29.29
1228	Geraniol	3.06
1268	Geranial	51.39
1224	Epoxy-linalooloxide	0.78
1224	Epoxy-linalooloxide	0.43
1300	Geranyl formate	0.65
1056	Trans-2-[2'-(2''-Methyl-1''-propenyl)cyclopropyl]propan-2-ol	0.27
1380	Geranyl acetate	3.91
1494	Isocaryophyllene	0.33
1512	γ -Cadinene	0.19
1507	Caryophyllene oxide	0.79
1665	(Z)-Nerolidyl acetate	0.23
1227	Ethanol <(2Z)-(3,3-dimethylcyclohexylidene)	0.20
1561	(E)-Nerolidol	0.38
1342	Neric acid	0.18

LRI: Linear retention index, calculated relative to the retention time of a mixture of n-alkanes (C7-C25) in a column. Other constituents identified at concentration $< 0.1\%$ totalized 2.1% of *C. citratus* essential oil total mass.

Table 2. Effects of chitosan (Chi) and *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. essential oil (CCEO) alone or in combinations on mycelial growth inhibition (MGI%) of different *Colletotrichum* species and their types of interaction, as measured by the Abbott method.

Fungal strains	Combinations	Chi or CCEO alone		Chi; CCEO combination		Abbott method	
		MGI% ¹ Chi*	MGI% CCEO	MGI% ² observed	MGI% expected	Abbott index	Effect
<i>C. asianum</i> CMM 4057	Chi 5 mg/mL; CCEO 0.15 µL/mL	73.2%	5.0%	100%	74.5%	1.3	Additive
	Chi 5 mg/mL; CCEO 0.3 µL/mL	73.2%	8.0%	100%	75.3%	1.3	Additive
	Chi 5 mg/mL; CCEO 0.6 µL/mL	73.2%	21.8%	100%	79.0%	1.2	Additive
	Chi 5 mg/mL; CCEO 1.25 µL/mL	73.2%	37.0%	100%	83.1%	1.2	Additive
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 0.15 µL/mL	80.2%	5.0%	100%	81.2%	1.2	Additive
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 0.3 µL/mL	80.2%	8.0%	100%	81.8%	1.2	Additive
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 0.6 µL/mL	80.2%	21.8%	100%	84.5%	1.1	Additive
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 1.25 µL/mL	80.2%	37.0%	100%	87.5%	1.1	Additive
<i>C. fruticola</i> CMM 4069	Chi 5 mg/mL; CCEO 0.15 µL/mL	30.0%	3.0%	100%	32.1%	3.1	Synergistic
	Chi 5 mg/mL; CCEO 0.3 µL/mL	30.0%	12.0%	100%	38.4%	2.6	Synergistic
	Chi 5 mg/mL; CCEO 0.6 µL/mL	30.0%	25.3%	100%	47.7%	2.1	Synergistic
	Chi 5 mg/mL; CCEO 1.25 µL/mL	30.0%	37.8%	100%	56.5%	1.8	Synergistic
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 0.15 µL/mL	44.2%	3.0%	100%	45.8%	2.2	Synergistic
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 0.3 µL/mL	44.2%	12.0%	100%	50.9%	2.0	Synergistic
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 0.6 µL/mL	44.2%	25.3%	100%	58.3%	1.7	Synergistic
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 1.25 µL/mL	44.2%	37.8%	100%	65.3%	1.5	Synergistic
<i>C. tropicale</i> CMM 4071	Chi 5 mg/mL; CCEO 0.15 µL/mL	35.8%	8.0%	100%	40.9%	2.4	Synergistic
	Chi 5 mg/mL; CCEO 0.3 µL/mL	35.8%	19.7%	100%	48.4%	2.0	Synergistic
	Chi 5 mg/mL; CCEO 0.6 µL/mL	35.8%	26.4%	100%	52.8%	1.9	Synergistic
	Chi 5 mg/mL; CCEO 1.25 µL/mL	35.8%	52.3%	100%	69.4%	1.4	Additive
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 0.15 µL/mL	41.5%	8.0%	100%	46.2%	2.2	Synergistic
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 0.3 µL/mL	41.5%	19.7%	100%	53.0%	1.9	Synergistic
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 0.6 µL/mL	41.5%	26.4%	100%	56.9%	1.8	Synergistic

	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 1.25 µL/mL	41.5%	52.3%	100%	72.1%	1.4	Additive
<i>C. siamense</i> CMM 4077	Chi 5 mg/mL; CCEO 0.3 µL/mL	37.4%	12.5%	100%	45.2%	2.2	Synergistic
	Chi 5 mg/mL; CCEO 0.6 µL/mL	37.4%	19.8%	100%	49.8%	2.0	Synergistic
	Chi 5 mg/mL; CCEO 1.25 µL/mL	37.4%	52.9%	100%	70.5%	1.4	Additive
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 0.15 µL/mL	48%	6.0%	100%	51.1%	2.0	Synergistic
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 0.3 µL/mL	48%	12.5%	100%	54.5%	1.8	Synergistic
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 0.6 µL/mL	48%	19.8%	100%	58.3%	1.7	Synergistic
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 1.25 µL/mL	48%	52.9%	100%	75.5%	1.3	Synergistic
<i>C. karstii</i> CMM 4101	Chi 5 mg/mL; CCEO 0.15 µL/mL	24%	19.5%	100%	38.8%	2.6	Synergistic
	Chi 5 mg/mL; CCEO 0.3 µL/mL	24%	30.0%	100%	46.8%	2.1	Synergistic
	Chi 5 mg/mL; CCEO 0.6 µL/mL	24%	51.0%	100%	62.8%	1.6	Synergistic
	Chi 5 mg/mL; CCEO 1.25 µL/mL	24%	90.3%	100%	92.6%	1.1	Additive
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 0.15 µL/mL	32.8%	19.5%	100%	45.9%	2.2	Synergistic
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 0.3 µL/mL	32.8%	30.0%	100%	53.0%	1.9	Synergistic
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 0.6 µL/mL	32.8%	51.0%	100%	67.1%	1.5	Synergistic
	Chi 7.5 mg/mL; CCEO 1.25 µL/mL	32.8%	90.3%	100%	93.5%	1.1	Additive

¹ MGI%: Percent of radial mycelial growth inhibition.

² Results expressed as average. Standard deviations were always in the range of $\pm 0.2 - 0.4\%$.

*Results from Oliveira et al. (2017).

Table 3. Percentage (average $\pm$ standard deviation) of anthracnose lesion diameter reduction in guava cv. Paluma coated with combinations of chitosan (Chi) and *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. essential oil (CCEO) or treated with synthetic fungicides (thiophanate-methyl or difenoconazole) and inoculated with different pathogenic *Colletotrichum* species, stored at 25 °C during 12 d.

Fungal strains	Treatments	Days of storage			
		6	8	10	12
<i>C. asianum</i> CMM 4057	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.15 μ L/mL	100% (± 0.0) ^{Aa}	89.3% (± 2.5) ^{Bb}	86.7% (± 1.5) ^{Bb}	63.5% (± 2.1) ^{Cb}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.3 μ L/mL	100% (± 0.0) ^{Aa}	93.0% (± 1.7) ^{Bab}	91.0% (± 3.0) ^{Bab}	65.2% (± 2.6) ^{Cab}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.6 μ L/mL	100% (± 0.0) ^{Aa}	98.3% (± 2.9) ^{ABa}	96.0% (± 3.5) ^{Ba}	70.5% (± 1.6) ^{Ca}
	Thiophanate-methyl (10 μ g a.i./mL)	77.3% (± 2.0) ^{Ab}	66.6% (± 2.3) ^{Bc}	32.3% (± 1.6) ^{Cc}	20.3% (± 2.3) ^{Dc}
	Difenoconazole (5 μ g a.i./mL)	0% (± 0.0) ^{Dc}	44.0% (± 1.2) ^{Ad}	15.5% (± 1.4) ^{Cd}	21.8% (± 1.6) ^{Bc}
<i>C. fructicola</i> CMM 4069	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.15 μ L/mL	100% (± 0.0) ^{Aa}	61.7% (± 2.1) ^{Bc}	27.7% (± 3.0) ^{Cc}	28.5% (± 0.4) ^{Cd}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.3 μ L/mL	100% (± 0.0) ^{Aa}	62.1% (± 1.3) ^{Bc}	32.3% (± 2.7) ^{Cb}	29.9% (± 0.8) ^{Cd}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.6 μ L/mL	100% (± 0.0) ^{Aa}	92.0% (± 1.3) ^{Ba}	86.9% (± 2.1) ^{Ca}	81.2% (± 1.8) ^{Da}
	Thiophanate-methyl (10 μ g a.i./mL)	24.6% (± 3.0) ^{Bc}	20.0% (± 1.9) ^{Bd}	14.2% (± 1.2) ^{Cd}	31.1% (± 0.4) ^{Ac}
	Difenoconazole (5 μ g a.i./mL)	75.5% (± 3.0) ^{Ab}	69.3% (± 2.1) ^{Bb}	34.1% (± 1.8) ^{Db}	45.4% (± 2.9) ^{Cb}
<i>C. tropicale</i> CMM 4071	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.15 μ L/mL	47.0% (± 3.0) ^{Ab}	35.2% (± 2.1) ^{Bc}	27.9% (± 3.10) ^{Cc}	15.0% (± 1.8) ^{Dc}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.3 μ L/mL	48.6% (± 2.4) ^{Ab}	43.5% (± 2.4) ^{Bb}	37.2% (± 1.8) ^{Cb}	31.9% (± 1.7) ^{Db}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.6 μ L/mL	68.2% (± 2.7) ^{Aa}	57.9% (± 1.0) ^{Ba}	49.1% (± 0.8) ^{Ca}	47.2% (± 1.9) ^{Ca}
	Thiophanate-methyl (10 μ g a.i./mL)	0% (± 0.0) ^{Bd}	0% (± 0.0) ^{Be}	2% (± 1.7) ^{Ad}	1.3% (± 1.1) ^{Ad}
	Difenoconazole (5 μ g a.i./mL)	34.8% (± 1.6) ^{Ac}	26.7% (± 1.1) ^{Cd}	36.1% (± 0.7) ^{Ab}	33.8% (± 0.7) ^{Bb}
<i>C. siamense</i> CMM 4077	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.15 μ L/mL	27.4% (± 2.1) ^{Ac}	26.9% (± 2.7) ^{Ac}	10.1% (± 1.8) ^{Cc}	14.9% (± 1.0) ^{Bc}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.3 μ L/mL	36.2% (± 1.6) ^{Bb}	43.9% (± 2.6) ^{Ab}	27.0% (± 1.8) ^{Cb}	20.0% (± 3.3) ^{Db}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.6 μ L/mL	55.8% (± 1.2) ^{Aa}	57.5% (± 1.3) ^{Aa}	43.6% (± 2.0) ^{Ba}	33.0% (± 2.6) ^{Ca}
	Thiophanate-methyl (10 μ g a.i./mL)	0% (± 0.0) ^{Ad}	0% (± 0.0) ^{Ae}	0% (± 0.0) ^{Ad}	0% (± 0.0) ^{Ad}
	Difenoconazole (5 μ g a.i./mL)	0% (± 0.0) ^{Bd}	13.3% (± 0.9) ^{Ad}	11.15% (± 2.7) ^{Ac}	12.4% (± 3.8) ^{ABc}
<i>C. karstii</i> CMM 4101	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.15 μ L/mL	70.2% (± 2.6) ^{Ad}	64.6% (± 1.4) ^{Bd}	58.0% (± 1.1) ^{Ce}	40.2% (± 1.6) ^{Dd}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.3 μ L/mL	74.4% (± 2.2) ^{Ac}	68.3% (± 4.5) ^{Bcd}	63.7% (± 3.2) ^{Bde}	48.9% (± 1.8) ^{Cc}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.6 μ L/mL	100% (± 0.0) ^{Aa}	100% (± 0.0) ^{Aa}	100% (± 0.0) ^{Aa}	100% (± 0.0) ^{Aa}
	Thiophanate-methyl (10 μ g a.i./mL)	73.0% (± 3.9) ^{Bc}	78.1% (± 1.5) ^{Ab}	73.8% (± 2.6) ^{Bb}	58.5% (± 3.1) ^{Cb}
	Difenoconazole (5 μ g a.i./mL)	79.4% (± 2.1) ^{Ab}	72.7% (± 2.1) ^{Bc}	68.5% (± 2.3) ^{Bcd}	46.9% (± 2.0) ^{Cc}

The results are expressed as percentage reduction rates of anthracnose lesion diameter in coated/treated fruit compared with the uncoated/untreated fruit, according to the formula: % ALDR = [(N - F/N) x 100, where N is the anthracnose lesion diameter in negative control fruit, and F is the anthracnose lesion diameter in fruit coated with Chi-CCEO combinations or treated with the synthetic fungicides (Munhuweyi et al., 2017).^{a-d} Average values in the same column with different lowercase letters are significantly different ($p \leq 0.05$) based on Tukey's test; ^{A-D} Average values in the same row with different uppercase letters are significantly different ($p \leq 0.05$) based on Tukey's test.

Table 4. Percentage (average; $\pm$ standard deviation) of anthracnose lesion diameter reduction in mango cv. Tommy Atkins coated with combinations of chitosan (Chi) and *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. essential oil (CCEO) or treated with synthetic fungicides (thiophanate-methyl or difenoconazole) and inoculated with different pathogenic *Colletotrichum* species, stored at 25 °C during 12 d.

Fungi	Treatments	Days of storage			
		6	8	10	12
<i>C. asianum</i> CMM 4057	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.15 μ L/mL	62.1% ($\pm$ 4.4) ^{Ab}	54.5% ($\pm$ 1.5) ^{Bc}	53.1% ($\pm$ 2.0) ^{Bc}	55.7% ($\pm$ 1.9) ^{Bb}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.3 μ L/mL	64.4% ($\pm$ 5.1) ^{Ab}	62.5% ($\pm$ 1.4) ^{Ab}	64.9% ($\pm$ 2.1) ^{Ab}	57.0% ($\pm$ 2.9) ^{Bb}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.6 μ L/mL	85.0% ($\pm$ 5.0) ^{Aa}	74.3% ($\pm$ 2.9) ^{Aa}	74.6% ($\pm$ 3.1) ^{Ba}	63.0% ($\pm$ 1.4) ^{Ca}
	Thiophanate-methyl (10 μ g a.i./mL)	40.9% ($\pm$ 4.5) ^{Bc}	50.7% ($\pm$ 4.2) ^{Ac}	23.7% ($\pm$ 3.7) ^{Dd}	30.7% ($\pm$ 1.9) ^{Cc}
	Difenoconazole (5 μ g a.i./mL)	27.3% ($\pm$ 4.5) ^{Ad}	26.7% ($\pm$ 2.8) ^{Ad}	15.7% ($\pm$ 4.8) ^{Bd}	14.7% ($\pm$ 2.7) ^{Bd}
<i>C. fructicola</i> CMM 4069	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.15 μ L/mL	61.9% ($\pm$ 4.1) ^{Bb}	69.9% ($\pm$ 3.2) ^{Ab}	61.3% ($\pm$ 4.8) ^{Bb}	46.1% ($\pm$ 2.9) ^{Cb}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.3 μ L/mL	61.9% ($\pm$ 4.1) ^{Bb}	68.2% ($\pm$ 1.7) ^{Ab}	61.5% ($\pm$ 2.6) ^{Bb}	49.7% ($\pm$ 2.9) ^{Cb}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.6 μ L/mL	81.8% ($\pm$ 2.0) ^{Ba}	89.7% ($\pm$ 1.4) ^{Aa}	92.3% ($\pm$ 2.5) ^{Aa}	91.8% ($\pm$ 2.0) ^{ABa}
	Thiophanate-methyl (10 μ g a.i./mL)	7.6% ($\pm$ 2.0) ^{Dc}	22.1% ($\pm$ 4.4) ^{Bd}	15.9% ($\pm$ 2.7) ^{Cc}	32.2% ($\pm$ 3.8) ^{Ac}
	Difenoconazole (5 μ g a.i./mL)	0% ($\pm$ 0.0) ^{Dc}	11.5% ($\pm$ 3.8) ^{Cd}	19.0% ($\pm$ 4.7) ^{Bc}	28.0% ($\pm$ 2.0) ^{Ac}
<i>C. tropicale</i> CMM 4071	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.15 μ L/mL	66.7% ($\pm$ 3.6) ^{Ab}	68.9% ($\pm$ 3.4) ^{Ab}	66.1% ($\pm$ 2.7) ^{Aa}	35.6% ($\pm$ 5.2) ^{Bb}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.3 μ L/mL	66.7% ($\pm$ 3.6) ^{ABb}	68.9% ($\pm$ 3.4) ^{Ab}	64.4% ($\pm$ 3.9) ^{Aa}	41.7% ($\pm$ 2.6) ^{Bb}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.6 μ L/mL	82.0% ($\pm$ 4.4) ^{Aa}	84.2% ($\pm$ 4.2) ^{Aa}	71.7% ($\pm$ 1.7) ^{Ca}	78.2% ($\pm$ 2.2) ^{Ba}
	Thiophanate-methyl (10 μ g a.i./mL)	24.2% ($\pm$ 3.0) ^{Ad}	13.2% ($\pm$ 2.6) ^{Bd}	5.7% ($\pm$ 1.9) ^{Cc}	0% ($\pm$ 0.0) ^{Dd}
	Difenoconazole (5 μ g a.i./mL)	41.9% ($\pm$ 2.1) ^{Ac}	39.7% ($\pm$ 3.9) ^{ABc}	37.8% ($\pm$ 2.9) ^{Ab}	20.5 ($\pm$ 2.7) ^{Bc}
<i>C. siamense</i> CMM 4077	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.15 μ L/mL	77.6% ($\pm$ 4.1) ^{Ab}	68.4% ($\pm$ 2.9) ^{Bb}	59.6% ($\pm$ 2.5) ^{DCc}	62.1% ($\pm$ 4.0) ^{BCb}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.3 μ L/mL	82.3% ($\pm$ 3.1) ^{Aab}	72.1% ($\pm$ 2.3) ^{Bb}	65.9% ($\pm$ 3.2) ^{Cb}	69.4% ($\pm$ 2.0) ^{Cb}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.6 μ L/mL	83.3% ($\pm$ 7.2) ^{Aa}	81.5% ($\pm$ 2.4) ^{Aa}	76.8% ($\pm$ 5.0) ^{Aa}	82.0% ($\pm$ 3.6) ^{Aa}
	Thiophanate-methyl (10 μ g a.i./mL)	75.4% ($\pm$ 3.1) ^{Aab}	74.6% ($\pm$ 3.2) ^{Aab}	58.7% ($\pm$ 2.8) ^{Bc}	37.9% ($\pm$ 3.4) ^{Cc}
	Difenoconazole (5 μ g a.i./mL)	18.4% ($\pm$ 2.6) ^{Ac}	13.4% ($\pm$ 2.9) ^{Bc}	6.7% ($\pm$ 1.9) ^{Cd}	6.0% ($\pm$ 2.4) ^{Cd}
<i>C. karstii</i> CMM 4101	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.15 μ L/mL	88.6% ($\pm$ 3.2) ^{Ab}	89.8% ($\pm$ 2.5) ^{Ab}	90.2% ($\pm$ 2.5) ^{Ab}	90.2% ($\pm$ 2.5) ^{Ab}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.3 μ L/mL	98.4% ($\pm$ 2.7) ^{Aa}	98.6% ($\pm$ 2.4) ^{Aa}	98.3% ($\pm$ 2.9) ^{Aa}	90.2% ($\pm$ 2.5) ^{Bb}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.6 μ L/mL	100% ($\pm$ 0.0) ^{Aa}	100% ($\pm$ 0.0) ^{Aa}	100% ($\pm$ 0.0) ^{Aa}	100% ($\pm$ 0.0) ^{Aa}
	Thiophanate-methyl (10 μ g a.i./mL)	32.7% ($\pm$ 2.5) ^{Ac}	32.7% ($\pm$ 2.5) ^{Ac}	31.0% ($\pm$ 1.7) ^{Ac}	29.3% ($\pm$ 1.1) ^{Ac}
	Difenoconazole (5 μ g a.i./mL)	32.7% ($\pm$ 2.5) ^{Ac}	32.7% ($\pm$ 2.5) ^{Ac}	32.0% ($\pm$ 1.7) ^{Ac}	30.6% ($\pm$ 2.2) ^{Ac}

The results are expressed as percentage reduction rates of anthracnose lesion diameter in coated/treated fruit compared with the uncoated/untreated fruit, according to the formula: % ALDR = [(N - F/N) x 100, where N is the anthracnose lesion diameter in negative control fruit, and F is the anthracnose lesion diameter in fruit coated with Chi-CCEO combinations or treated with the synthetic fungicides (Munhuweyi et al., 2017); ^{a-d} Average values in the same column with different lowercase letters are significantly different ($p \leq 0.05$) based on Tukey's test.

^{A-D} Average values in the same row with different uppercase letters are significantly different ($p \leq 0.05$) based on Tukey's test.

Table 5. Percentage (average; $\pm$ standard deviation) of anthracnose lesion diameter reduction in papaya cv. Papaya coated with combinations of chitosan (Chi) and *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. essential oil (CCEO) or treated with synthetic fungicides (thiophanate-methyl or difenoconazole) and inoculated with different pathogenic *Colletotrichum* species, stored at 25 °C during 12 d.

Fungi	Treatments	Days of storage			
		6	8	10	12
<i>C. asianum</i> CMM 4057	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.15 μ L/mL	88.8% (± 4.9) ^{Aa}	83.9% (± 0.9) ^{Ab}	88.3% (± 3.7) ^{Aa}	85.0% (± 5.0) ^{ABa}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.3 μ L/mL	88.9% (± 3.1) ^{Aa}	84.5% (± 2.1) ^{Ab}	88.5% (± 3.8) ^{Aa}	88.3% (± 2.9) ^{Aa}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.6 μ L/mL	88.1% (± 2.0) ^{Aa}	91.9% (± 3.5) ^{Aa}	91.2% (± 2.2) ^{Aa}	91.4% (± 2.8) ^{Aa}
	Thiophanate-methyl (10 μ g a.i./mL)	10.0% (± 2.0) ^{Ac}	9.0% (± 1.2) ^{Ad}	2.9% (± 2.6) ^{Bc}	0.7% (± 1.1) ^{Bc}
	Difenoconazole (5 μ g a.i./mL)	32.7% (± 2.5) ^{Ab}	17.2% (± 2.0) ^{Bc}	16.4% (± 1.9) ^{Bb}	8.8% (± 2.9) ^{Cb}
<i>C. fructicola</i> CMM 4069	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.15 μ L/mL	47.2% (± 4.8) ^{Ab}	43.4% (± 2.4) ^{Ac}	36.1% (± 2.8) ^{Cc}	49.0% (± 3.5) ^{Ab}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.3 μ L/mL	50.5% (± 2.3) ^{Bb}	44.8% (± 2.4) ^{Cc}	47.0% (± 3.0) ^{Bb}	57.8% (± 4.7) ^{Aab}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.6 μ L/mL	65.2% (± 2.4) ^{Ca}	79.8% (± 3.2) ^{Aa}	74.6% (± 2.8) ^{Ba}	61.6% (± 4.1) ^{Da}
	Thiophanate-methyl (10 μ g a.i./mL)	0% (± 0.0) ^{Ac}	0% (± 0.0) ^{Ad}	0% (± 0.0) ^{Ad}	0% (± 0.0) ^{Ac}
	Difenoconazole (5 μ g a.i./mL)	62.4% (± 4.3) ^{Aa}	61.6% (± 4.5) ^{Ab}	51.7% (± 2.6) ^{Bb}	2.8% (± 3.0) ^{Cc}
<i>C. tropicale</i> CMM 4071	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.15 μ L/mL	33.3% (± 3.0) ^{Ac}	17.5% (± 2.6) ^{Bd}	19.8% (± 2.8) ^{Bbc}	19.8% (± 2.1) ^{Bb}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.3 μ L/mL	34.2% (± 2.6) ^{Ac}	18.7% (± 2.4) ^{Bd}	21.8% (± 1.5) ^{Bb}	21.0% (± 2.0) ^{Bb}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.6 μ L/mL	75.0% (± 3.8) ^{Aa}	62.5% (± 3.3) ^{Ba}	47.4% (± 2.3) ^{Ca}	28.0% (± 2.7) ^{Da}
	Thiophanate-methyl (10 μ g a.i./mL)	52.0% (± 4.6) ^{Ab}	31.2% (± 4.5) ^{Bc}	13.4% (± 3.0) ^{Cc}	17.6% (± 1.3) ^{Cb}
	Difenoconazole (5 μ g a.i./mL)	71.7% (± 2.9) ^{Aa}	42.8% (± 3.6) ^{Bb}	25.9% (± 2.3) ^{Cb}	18.1% (± 3.3) ^{Db}
<i>C. siamense</i> CMM 4077	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.15 μ L/mL	82.3% (± 3.0) ^{Aa}	79.3% (± 2.1) ^{Ab}	74% (± 0.7) ^{Bb}	57.7% (± 2.5) ^{Cb}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.3 μ L/mL	83.1% (± 1.9) ^{Aa}	82.0% (± 3.0) ^{Aab}	77% (± 1.9) ^{Bab}	64.0% (± 4.0) ^{Cab}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.6 μ L/mL	86.4% (± 4.3) ^{Aa}	87.9% (± 1.7) ^{Aa}	82% (± 3.4) ^{Ba}	67.7% (± 2.3) ^{Ca}
	Thiophanate-methyl (10 μ g a.i./mL)	57.1% (± 2.0) ^{Ab}	45.1% (± 1.8) ^{Bc}	16.7% (± 3.0) ^{Cc}	12.5% (± 3.9) ^{Cc}
	Difenoconazole (5 μ g a.i./mL)	42.6% (± 2.5) ^{Ac}	39.1% (± 2.4) ^{Ad}	15.8% (± 2.8) ^{Bc}	13.0% (± 2.6) ^{Bc}
<i>C. karstii</i> CMM 4101	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.15 μ L/mL	98.3% (± 2.8) ^{Aa}	87.0% (± 3.2) ^{Bb}	81.5% (± 3.1) ^{Bb}	67.7% (± 2.5) ^{Cb}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.3 μ L/mL	100% (± 0.0) ^{Aa}	100% (± 0.0) ^{Aa}	96.2% (± 3.2) ^{Ba}	77.3% (± 2.5) ^{Ca}
	Chi 5 mg/mL + CCEO 0.6 μ L/mL	100% (± 0.0) ^{Aa}	100% (± 0.0) ^{Aa}	97.7% (± 2.5) ^{Aa}	84.4% (± 3.1) ^{Ba}
	Thiophanate-methyl (10 μ g a.i./mL)	90.1% (± 4.3) ^{Ab}	77.8% (± 3.5) ^{Bc}	67.6% (± 3.2) ^{Cc}	58.4% (± 4.5) ^{Dc}
	Difenoconazole (5 μ g a.i./mL)	79.4% (± 5.2) ^{Ac}	75.7% (± 3.0) ^{Ac}	69.0% (± 2.0) ^{Bc}	60.4% (± 2.8) ^{Cbc}

The results are expressed as percentage reduction rates of anthracnose lesion diameter in coated/treated fruit compared with the uncoated/untreated fruit, according to the formula: % ALDR = $[(N - F/N) \times 100]$, where N is the anthracnose lesion diameter in negative control fruit, and F is the anthracnose lesion diameter in fruit coated with Chi-CCEO combinations or treated with the synthetic fungicides (Munhuweyi et al., 2017); ^{a-d} Average values in the same column with different lowercase letters are significantly different ($p \leq 0.05$), based on Tukey's test; ^{A-D} Average values in the same row with different uppercase letters are significantly different ($p \leq 0.05$) based on Tukey's test.

S1. Percent of radial mycelial growth inhibition (MGI%) of different *Colletotrichum* species after a 7-d exposure period to different concentrations of *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. essential oil (CCEO) in solid medium (25 °C).

CCEO concentrations	<i>C. asianum</i> CMM 4057	<i>C. fruticola</i> CMM 4069	<i>C. tropicale</i> CMM 4071	<i>C. siamense</i> CMM 4077	<i>C. karstii</i> CMM 4101
0.15 µL/mL	5.0% (±1.2) ^{BCd}	3.0% (±1.0) ^{Ce}	8.0% (±2.0) ^{Be}	6.0% (±2.0) ^{BCe}	19.5% (±2.2) ^{Ae}
0.3 µL/mL	8.0% (±2.6) ^{Cd}	12.0% (±2.0) ^{Cd}	19.7% (±1.5) ^{Bd}	12.5% (±2.5) ^{Cd}	30.0% (±1.0) ^{Ad}
0.6 µL/mL	21.8% (±3.8) ^{Bc}	25.3% (±3.0) ^{Bc}	26.4% (±1.4) ^{Bc}	19.8% (±2.5) ^{Bc}	51.0% (±4.0) ^{Ac}
1.25 µL/mL	37.0% (±3.0) ^{Cb}	37.8% (±2.0) ^{Cb}	52.3% (±3.2) ^{Bb}	52.9% (±2.6) ^{Bb}	90.3% (±3.0) ^{Ab}
2.5 µL/mL	100%(±0.0) ^{Aa}	100% (±0.0) ^{Aa}	100% (±0.0) ^{Aa}	100% (±0.0) ^{Aa}	100% (±0.0) ^{Aa}

The results are expressed as percent inhibition rates of radial mycelial growth compared to control treatment (0 µL/mL of CCEO).

^{a-e} Average values in the same column with different lowercase letters are significantly different ($p \leq 0.05$) based on Tukey's test.

^{A-C} Average values in the same row with different uppercase letters are significantly different ($p \leq 0.05$) based on Tukey's test.

S2. Effects of chitosan (Chi) and *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. essential oil (CCEO) alone or in combination on different on mycelial growth inhibition (MGI%) of different *Colletotrichum* species and their kind of interaction, as measured by the Abbott method.

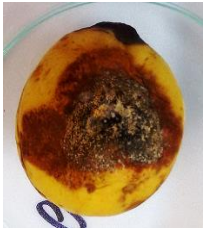
Fungal strains	Combinations	Chi or CCEO alone		Chi-CCEO combination		Abbott method	
		MGI% ¹ Chi*	MGI% CCEO	MGI% ² observed	MGI% expected	Abbott index	Effect
<i>C. asianum</i> CMM 4057	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 0.15 µL/mL	64.9%	5.0%	100%	66.7%	1.5	Synergistic
	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 0.3 µL/mL	64.9%	8.0%	100%	67.7%	1.5	Synergistic
	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 0.6 µL/mL	64.9%	21.8%	100%	72.6%	1.4	Additive
	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 1.25 µL/mL	64.9%	37.0%	100%	77.9%	1.3	Additive
<i>C. fruticola</i> CMM 4069	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 0.15 µL/mL	20.3%	3.0%	100%	22.7%	4.4	Synergistic
	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 0.3 µL/mL	20.3%	12.0%	100%	29.9%	3.4	Synergistic
	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 0.6 µL/mL	20.3%	25.3%	100%	40.5%	2.5	Synergistic
	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 1.25 µL/mL	20.3%	37.8%	100%	50.4%	2.0	Synergistic
<i>C. tropicale</i> CMM 4071	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 0.15 µL/mL	29.2%	8.0%	100%	34.9%	2.9	Synergistic
	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 0.3 µL/mL	29.2%	19.7%	100%	43.2%	2.3	Synergistic
	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 0.6 µL/mL	29.2%	26.4%	100%	47.9%	2.1	Synergistic
	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 1.25 µL/mL	29.2%	52.3%	100%	66.2%	1.5	Synergistic
<i>C. siamense</i> CMM 4077	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 0.15 µL/mL	18.9%	6.0%	100%	23.8%	4.2	Synergistic
	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 0.3 µL/mL	18.9%	12.5%	100%	29.0%	3.4	Synergistic
	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 0.6 µL/mL	18.9%	19.8%	100%	35.0%	2.9	Synergistic
	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 1.25 µL/mL	18.9%	52.9%	100%	61.8%	1.6	Synergistic
<i>C. karstii</i> CMM 4101	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 0.15 µL/mL	8.4%	19.5%	100%	26.3%	3.8	Synergistic
	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 0.3 µL/mL	8.4%	30.0%	100%	35.9%	2.8	Synergistic
	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 0.6 µL/mL	8.4%	51.0%	100%	55.1%	1.8	Synergistic
	Chi 2.5 mg/mL; CCEO 1.25 µL/mL	8.4%	90.3%	100%	91.1%	1.1	Additive

¹ MGI%: Percent of radial mycelial growth inhibition.

² Results expressed as average. Standard deviations were always in a range of $\pm 0.2 - 0.3\%$.

*Results expressed according to Oliveira e al. (2017) assays.

S3. Anthracnose lesion inhibition in mango cv. Tommy Atkins, papaya cv. Papaya and guava cv. Paluma coated with the combination of chitosan (Chi) and *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf. essential oil (CCEO) and inoculated with different *Colletotrichum* species stored at 25 °C for 12 d. (A) negative control - lesion severity (uncoated fruit) in guava cv. Paluma; (AA) guava cv. Paluma coated with the combination of Chi 5 mg/mL and CCEO 0.6 µL/mL.; (B) negative control - lesion severity (uncoated fruit) in mango cv. Tommy Atkins; (BB) mango cv. Tommy Atkins coated with the combination of Chi 5 mg/mL + CCEO 0.6 µL/mL; (C) negative control - lesion severity (uncoated fruit) in papaya cv. Papaya; (CC) papaya cv. Papaya coated with the combination of Chi 5 mg/mL and CCEO 0.6 µL/mL.

Fungi	Fruit					
	(A)	(AA)	(B)	(BB)	(C)	(CC)
<i>C. asianum</i> CMM 4057						
<i>C. fruticola</i> CMM 4069						
<i>C. tropicale</i> CMM 4071						

C. siamense CMM 4077*C. karstii* CMM 4101