

INSTITUTO BIOLÓGICO
Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio

Prospecção de produtos sintéticos bioativos no controle da podridão-parda (*Monilinia fructicola* (Wint.) Honey) do pessegueiro

Andrea Dantas de Souza
Engenheira Agrônoma

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Professor Dr. Luís Otávio Saggion Beriam

São Paulo
2018

Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio

Prospecção de produtos sintéticos bioativos no controle da podridão-parda (*Monilinia fructicola* (Wint.) Honey) do pessegueiro

Andrea Dantas de Souza

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

São Paulo

2018

Andrea Dantas de Souza

Prospecção de produtos sintéticos bioativos no controle da podridão-parda (*Monilinia fructicola* (Wint.) Honey) do pessegueiro

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Professor Dr. Luís Otávio Saggion Beriam

São Paulo

2018

Eu **Andrea Dantas de Souza**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: _____ Data ____/____/____

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Souza, Andrea Dantas de.

Prospecção de produtos sintéticos bioativos no controle da podridão-parda (*Monilinia fructicola* (Wint.) Honey do pessegueiro. / Andrea Dantas de Souza. - São Paulo, 2018.

91 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2018.T.AS012

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Linha de pesquisa: Agrotóxicos e resíduos agrícolas: ecologia e qualidade dos alimentos.

Orientador: Luís Otávio Saggion Beriam.

Versão do título para o inglês: Prospecting of bioactive synthetic products in the control of the brown rot (*Monilinia fructicola* (Wint.) Honey) of the peach tree

1. Pós-colheita 2. *Prunus persica* 3. Concentração Inibitória Mínima
4. Diaminas I. Souza, Andrea Dantas de II. Beriam, Luís Otávio Saggion III.
Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2018/012

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Andrea Dantas de Souza

Título: Prospecção de produtos sintéticos bioativos no controle da podridão-parda (*Monilinia fructicola* (Wint.) Honey) do pessegueiro.

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luís Otávio Saggion Beriam

Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Profa. Dra. Simone Rodrigues da Silva

Instituição: Escola Superior de Agricultura
Luiz de Queiroz

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. César Júnior Bueno

Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Profa. Dra. Patrícia Maria Pinto

Instituição: Faculdade Integral Cantareira

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Profa. Dra. Joana D'arc Felicio Souza

Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria Auxiliadora e Eronides, e aos meus irmãos, Patricia, Juliana e Júnior,
pelo incentivo e exemplo.

Ao meu marido Marcos Roberto e à minha filha Maria Luiza, pelo amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico de São Paulo, pela oportunidade e estrutura. Instituição que fez parte da minha caminhada acadêmica desde a graduação.

À Coordenação e todo o corpo docente do Programa de Pós-graduação, pelos ensinamentos e oportunidade da realização do curso de doutorado.

À Dra. Edlayne Gonzalez, agradeço a valiosa contribuição para meu crescimento profissional, e principalmente pela dedicação, orientação, estímulo, amizade e confiança durante o desenvolvimento deste trabalho

Ao Prof. Dr. Luís Otávio Saggion Beriam, pela confiança, orientação, disponibilidade e informações.

Ao Laboratório de Química e Farmacologia de Produtos Naturais do Instituto Biológico na pessoa da Dra. Joana D'Arc Felicio, pelo apoio, colaboração e amizade.

Ao Departamento de Química Farmacêutica da Universidade de Salamanca, na pessoa do Dr. Arturo San Feliciano Martin, pela colaboração e disponibilidade dos produtos testados no presente trabalho.

À Faculdade Integral Cantareira, pelo apoio e liberação para o desenvolvimento do curso.

Aos alunos: Bruno Ortega Araújo, Ana Cecília Bertoldi Cunha e Tatiana Furtado, pelo auxílio nos ensaios.

Aos pesquisadores Ma. Silvia Regina Galleti e Dr. Ricardo Harakava, pela valiosa contribuição e colaboração.

Aos amigos de trabalho Profa. Ma. Simone Bragantini Camilo, Técnica de Laboratório Engenheira Agrônoma Simone Mieko Yamamoto e Engenheiro Agrônomo Marcelo Issao Kudamatsu, pela colaboração e auxílio nos ensaios.

Ao companheiro de todas as horas Prof. Dr. Marcos Roberto Furlan pelo auxílio na estatística.

RESUMO

SOUZA, Andrea Dantas. **Prospecção de produtos sintéticos bioativos no controle da podridão-parda (*Monilinia fructicola* (Wint.) Honey) do pessegueiro**. 2018. 91 f. Tese (Doutorado em Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema) - Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2018.

O fungo *Monilinia fructicola* causa a podridão parda, doença mais importante no pessegueiro. Infecta flores e frutos, os quais apresentam sintomas de apodrecimento e mumificação na colheita e pós-colheita. O objetivo do presente trabalho foi verificar o potencial de compostos sintéticos bioativos no controle *in vitro* e *in vivo* de *M. fructicola* em pêssegos, cultivar Chiripá. Frutos com sintomas de podridão-parda foram coletados no município de Mogi das Cruzes, SP, e o fungo isolado em meio de cultura BDA, foi identificado por meio de microscopia e extração de DNA. Testes *in vitro* com 17 compostos derivados de esfingolipídios foram utilizados para se determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Discos de papel estéril, embebidos com 5,0 μL dos compostos, controles positivo (Captan) e negativo (DMSO), foram colocados no centro de placas de Petri com meio de cultura BDA. O fungo foi inoculado com auxílio de swab, incubado à $28\pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 dias, quando então foram realizadas as leituras dos halos de inibição de crescimento, com paquímetro digital. Considerou-se ativo o tratamento que inibiu crescimento do microrganismo, produzindo halos \leq a 10 mm de diâmetro. A Concentração Inibitória de 50 % (IC_{50}) foi obtida com curva dose-resposta do experimento *in vitro*. Na plotagem dos pontos, utilizaram-se valores das médias obtidas das triplicatas realizadas para cada teste. As médias dos halos de inibição foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Observou-se efeito de três compostos nas estruturas (microscopia óptica) e ultraestruturas (microscopia eletrônica de transmissão) do fungo. No ensaio *in vivo*, em esquema fatorial 5×2 e delineamento inteiramente casualizado, avaliou-se o efeito dos composto 4a e 1a no controle da doença nas flores e frutos, e na qualidade dos pêssegos recém colhidos no estágio pré-climatérico. As flores foram aspergidas com as soluções e incubadas por três dias a $25\pm 2^\circ\text{C}$ (no escuro), e, posteriormente, foram transferidas para a temperatura de 4°C (com luz) por mais três dias, quando então determinou-se a incidência da doença. Os frutos foram imersos ou aspergidos nas soluções com os tratamentos por cinco minutos. Determinou-se a severidade (inoculação do fungo, 10^5 esporos. mL^{-1}) e a incidência (lesões espontâneas) da

doença, medindo-se diâmetros das lesões. Avaliações físicas e químicas aos 0, 2, 4 e 6 dias após tratamento, determinaram o teor de sólidos solúveis totais (SST); acidez total titulável (ATT); pH e perda de massa. Os dados foram comparados pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Compostos 1a, 2a e 4a derivados de diaminas apresentaram melhores resultados para CIM e IC_{50} e provocaram alterações morfológicas e ultraestruturais no micélio e esporulação do fungo. Os compostos 4a e 1a diminuíram a incidência de *M. fruticola* nas flores. A incidência e severidade da podridão-parda foram inferiores nos frutos com composto 4a (aspergido e imerso). Não foram verificadas diferenças significativas entre tratamentos na pós-colheita da fruta quanto à perda de massa, ATT, SST e pH. Como conclusão principal, os resultados demonstraram que é viável o uso de compostos bioativos derivados de diaminas no controle da *M. fruticola*.

PALAVRAS-CHAVE: Pós-colheita. *Prunus persica*. Concentração Inibitória Mínima. Diaminas.

ABSTRACT

SOUZA, Andrea Dantas. **Prospecting of bioactive synthetic products in the control of the brown rot (*Monilinia fructicola* (Wint.) Honey) of the peach tree.** 2018. 91 f. Tese (Doutorado em Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema) - Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2018.

The fungus *Monilinia fructicola* causes brown rot, the most important disease in the peach tree. Infects flowers and fruits which presents symptoms of rotting and mummification at harvest and post-harvest. The objective of the present study was to verify the potential of bioactive synthetic compounds in the *in vitro* and *in vivo* control of *M. fructicola* in peaches, cultivar Chiripá. Fruits with symptoms of brown rot were collected in the city of Mogi das Cruzes, SP, and the fungus, isolated in PDA culture, was identified through its optical microscope structures and DNA extraction. *In vitro* tests with 17 compounds derived from sphingolipids, were use to determined Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Sterile paper disks embedded with 5.0 μ L of the compounds, positive (Captan) and negative (DMSO), controls were placed in the center of petri plates with PDA culture. The fungus was inoculated with swab aid, incubated at 28 \pm 2 $^{\circ}$ C for 7 days, then the growth inhibition halos were read with a digital pachymeter. It was considered active the treatment that inhibited the growth of the microorganism, producing halos \leq 10mm in diameter. Inhibitory concentration of 50 % (IC₅₀) was obtained with the dose-response curve of the *in vitro* experiment. In the points plotting, we used average values obtained from the triplicates performed for each test. The averages of the inhibition halos were compared by the Tukey test (p \leq 0.05). It was observed effect of three compounds of the structures (optical microscope) and ultrastructure (transmission electron microscopy) of the fungus. In the *in vivo* test, in a 5x2 factorial scheme and a completely randomized design, the compound 4a and 1a was evaluated as effective in the control of the disease on flowers and fruits, and in the quality of the fruits harvested in the pre-climacteric stage. The flowers were sprinkled with the solutions and incubated for three days at 25 \pm 2 $^{\circ}$ C (in the dark) and then transferred to the temperature of 4 $^{\circ}$ C (with light) for another three days, when the incidence of the disease was then determined. The fruits were immersed or sprinkled in the treatments solutions for five minutes. The severity (inoculation of the fungus, 10⁵ spores.mL⁻¹) and the incidence (spontaneous lesions) of the disease were

determined by measuring the diameters of the lesions. Physical and chemical evaluations, at 0, 2, 4 and 6 days after treatment, determined total soluble solids (TSS); total titratable acidity (TTA); mass loss and pH. The data were compared by the Tukey test ($p \leq 0.05$). Compounds 1a, 2a and 4a diamine derivatives showed better results for MIC and IC_{50} and caused morphological and ultrastructural changes in the mycelium and fungal sporulation. Compounds 4a and 1a decreased the incidence of *M. fruticola* in flowers. The incidence and severity of brown rot were lower in fruits with compound 4a (sprinkled and immersed). There were no significant differences between treatments in fruit postharvest for loss of mass, TTA, TSS and pH. The results demonstrated that the use of bioactive compounds derived from diamines in the control of *M. fruticola* is viable.

KEYWORDS: Postharvest. *Prunus persica*. Minimum Inhibitory Concentration. Diamines.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos fungicidas utilizados na produção convencional do pêssego.	28
Tabela 2 - Códigos dos compostos (USAL), fórmula e peso molecular e três concentrações em µg, dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO).	35
Tabela 3 - Compostos e concentrações (volume 5,0 µL) em cada disco, valores dos halos de inibição, porcentagem de inibição, Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Concentração Inibitória de 50% (IC ₅₀) de <i>M. fructicola</i> .	41
Tabela 4 - Incidência (%) de <i>Monilinia fructicola</i> em pessegueiros cv. Chiripá, nas fases flor aberta e queda de pétalas, após serem submetidos aos tratamentos por aspersão com: captan, compostos 1a e 4a e água. As flores foram armazenadas por três dias a 25±2°C (no escuro), e por mais três dias a 4°C (com luz).	51
Tabela 5 - Incidência da podridão-parda (% de frutos doentes) e AACPD (Área abaixo da curva de progresso da doença) em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan (1), composto 4a (2) e água (3) e aspersão em captan (4), composto 4a (5) e água (6). Os frutos permaneceram armazenados a 25±1°C/80 – 90% UR por seis dias.	53
Tabela 6 - Incidência da podridão-parda (% de frutos doentes) e AACPD (Área abaixo da curva de progresso da doença) em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan, composto 1a e água; e aspersão em captan, composto 1a e água. Os frutos permaneceram armazenados a 25±1°C/80 – 90% UR por seis dias.	56
Tabela 7 - Severidade da podridão-parda (% de frutos doentes) em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan, composto 4a e água; e aspersão em captan, composto 4a e água. Os frutos permaneceram armazenados a 25±1°C/ 80 – 90% UR por cinco dias.	57
Tabela 8 - Severidade da podridão-parda (% de frutos doentes) em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan, composto 1a e água; e aspersão em captan, composto 1a e água. Os frutos permaneceram armazenados a 25±1°C/80 – 90% UR por cinco dias.	61
Tabela 9 - Perda de massa fresca de frutos de pêssegos cv. Chiripá, sem ferimento, submetidos aos tratamentos com imersão em captan, composto 4a e água; e aspersão em captan, composto 4a e água, após seis dias de armazenamento.	62
Tabela 10 - Perda de massa fresca de frutos de pêssegos cv. Chiripá, sem ferimento, submetidos aos tratamentos com imersão em captan, composto 1a e água; e aspersão em captan, composto 1a e água, após seis dias de armazenamento.	63
Tabela 11 - Características químicas de frutos de pêssegos cv. Chiripá, tempo de armazenamento e diferentes tratamentos, após serem submetidos aos tratamentos: captan, 4a e água, todos por imersão ou aspersão. Os frutos permaneceram armazenados a 25±1°C/ 80 – 90% UR por seis dias.	64
Tabela 12 - Características químicas de frutos de pêssegos cv. Chiripá, tempo de armazenamento e diferentes tratamentos, após serem submetidos aos tratamentos: captan, 1a e água, todos por imersão ou aspersão. Os frutos permaneceram armazenados a 25±1°C/80 – 90% UR por seis dias.	66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Ciclo da *Monilinia fructicola* em pessegueiro (MAY-DE-MIO et al., 2004). 23
- Figura 2** - Estrutura básica de uma esfingosina (FREDI e TINOCO, 2015). 29
- Figura 3** - Esfingoanálogos ativos frente a *Penicillium* spp. e outros fungos. 30
- Figura 4** - Esfingoanálogos anti-*Leishmania* spp. **Boc**: *terc*-butoxicarbonila, **Et**: etila. 31
- Figura 5** - Esfingoanálogos ativos frente a (MDR)- *M. tuberculosis*. **Et**: etila, **Bn**: benzila. (números dos compostos mantidos de acordo a publicação original) 31
- Figura 6** - Fases da floração de pessegueiro. **A.** gema inchada; **B.** botão rosado; **C.** botão aberto; **D.** plena floração; **E.** queda de pétalas; e **F.** queda de sépalas/início de frutificação, (MAY-DE-MIO et al., 2008). 38
- Figura 7** - Placas de Petri com colônias de *Monilinia fructicola* em meio de cultura batata, dextrose e ágar no sétimo dia de incubação a 28°C±2. Halos de inibição: controle negativo (a e b), controle positivo (c), compostos/concentração 1a/S1(d), 1a/S2 (e) e 1a/S3 (f); 2a/S1 (g), 2a/S2 (h), 2a/S3 (i), 4a/S1 (j), 4a/S2 (k) e 4a/S3 (l). 44
- Figura 8** - Microfotografias de luz de *Monilinia fructicola*, após sete dias de incubação (28°C±2). Aspecto de micélio e esporos do fungo tratado pelos controle negativo (a e b), controle positivo captan (c), compostos/concentrações 1a/S1(d), 1a/S2 (e) e 1a/S3 (f); 2a/S1 (g), 2a/S2 (h), 2a/S3 (i), 4a/S1 (j), 4a/S2 (k) e 4a/S3 (l). Hifas hialinas com crescimento e desenvolvimento normal e esporulação (a e b); Hifas com início de engrossamento na extremidade (c); Hifas modificadas, mostrando estruturas anômalas, com brotamentos e excesso de pigmentação (d, e, f, g, h, j, k e l). Barra 10.000µm. 45
- Figura 9** - Micrografia eletrônica de transmissão de secção ultrafina de conídios (C) e conidióforos (CF) não tratados (controle negativo) de *Monilinia fructicola*, mostrando: membrana plasmática (MP); parede celular (PC); grânulos eletrondensos (G) e citoplasma (Cit). 46
- Figura 10** - Micrografia eletrônica de transmissão de secção ultrafina de conídios e conidióforos de *Monilinia fructicola* tratados com o fungicida captan (controle positivo) (a e b) e as concentrações (S1 e S2) das diaminas 1a, 2a, e 4a (c, d, e, f, g, h), mostrando: membrana plasmática (MP); parede celular (PC), núcleo (N), mitocôndria (Mit), vacúolo (V) e região com MP dissociada (*). 48
- Figura 11** - Micrografia eletrônica de transmissão de secção ultrafina de conídios e conidióforos de *Monilinia fructicola* não tratados (a) e tratados com a diamina 4a na concentração S2 (b), mostrando: membrana plasmática (MP); parede celular (PC), núcleo (N), mitocôndria (Mit) e vacúolo (V). 48
- Figura 12** - Micrografia eletrônica de transmissão de secção ultrafina de conídios de *Monilinia fructicola*, não tratados e tratados, mostrando detalhe da ondulação da parede celular. a-controle negativo; b-captan; c-1aS1; d-2aS1; e-4aS2. 49
- Figura 13** - Avaliação de podridão parda em flores de pessegueiro nos estágios de abertura flor aberta (a, b, c e d) e queda de pétalas (e, f, g e h). Controle negativo (a e e), positivo (b e f) e compostos 1a (c e g) e 4a (d e h). As flores foram armazenadas por três dias a 25±2°C (no escuro), e por mais três dias a 4°C (com luz). 50
- Figura 14** - Incidência da podridão-parda (% de frutos doentes) em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan (T1), composto 4a (T2) e água (T3) e aspersão em captan (T4), composto 4a (T5) e água (T6). Os frutos permaneceram armazenados a 25±1°C/80 – 90% UR por seis dias. 52
- Figura 15** - AACPD - Área abaixo da curva de progresso da doença/Incidência da podridão-parda em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan (1), composto 4a (2) e água (3) e aspersão em captan (4), composto 4a (5) e água (6) e inoculados com *Monilinia fructicola*. Os frutos permaneceram armazenados a 25±1°C/80 – 90% UR por seis dias. 52

- Figura 16** - Aspecto de pêssegos cv. Chiripá, após seis dias de tratamento. Comparativo entre fungicida captan aspersão (a) e imersão (c) e controle negativo imersão (b) e aspersão (d) e entre composto 4a aspersão (e) e imersão (g) e controle negativo imersão (f) e aspersão (h). **53**
- Figura 17** - Incidência da podridão-parda (% de frutos doentes) em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan (T1), composto 1a (T2) e água (T3); e aspersão em captan (T4), composto 1a (T5) e água (T6). Os frutos permaneceram armazenados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}/80 - 90\%$ UR por seis dias. **54**
- Figura 18** - AACPD - Área abaixo da curva de progresso da doença/Incidência da podridão-parda em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan (1), composto 1a (2) e água (3); e aspersão em captan (4), composto 1a (5) e água (6) e inoculados com *Monilinia fructicola*. Os frutos permaneceram armazenados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}/80 - 90\%$ UR por seis dias. **55**
- Figura 19** - Aspecto de pêssegos cv Chiripá, após seis dias de tratamento. Comparativo entre fungicida captan aspersão (a) e imersão (c), controle negativo imersão (b) e aspersão (d), composto 1a aspersão (e) e imersão (g) e controle negativo imersão (f) e aspersão (h). **55**
- Figura 20** - Severidade da podridão-parda (lesão em cm) em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos: imersão em captan (T1); composto 4a (T2); água (T3) e aspersão em captan (T4); composto 4a (T5); água (T6) e inoculados com *Monilinia fructicola*. Os frutos permaneceram armazenados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}/80-90\%$ UR por cinco dias. **56**
- Figura 21** - AACPD - Área abaixo da curva de progresso da doença/Severidade da podridão-parda em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan (1), composto 4a (2) e água (3); e aspersão em captan (4); composto 4a (5) e água (6), e inoculados com *Monilinia fructicola*. Os frutos permaneceram armazenados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}/80 - 90\%$ UR por cinco dias. **57**
- Figura 22** - Frutos de pêssego cv. Chiripá após quatro dias de inoculação de *Monilinia fructicola*, tratados com fungicida captan imersão (b) e aspersão (e), composto 4a imersão (c) e aspersão (f), e imersas (a) e aspergidas (d) com água. **58**
- Figura 23** - Frutos de pêssego Chiripá após seis dias de inoculação de *Monilinia fructicola*, tratados com fungicida captan imersão (b) e aspersão (e), composto 4a imersão (c) e aspersão (f), e imersas (a) e aspergidas (d) com água. **59**
- Figura 24** - Severidade da podridão-parda (lesão em cm) em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos: imersão em captan (T1), composto (T2) e água (T3) e aspersão em captan (T4), composto 1a (T5) e água (T6), e inoculados com *Monilinia fructicola*. Os frutos permaneceram armazenados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}/80-90\%$ UR por cinco dias. **60**
- Figura 25** - AACPD - Área abaixo da curva de progresso da doença/Severidade da podridão-parda em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan (1), composto (2) e água (3) e aspersão em captan (4), composto 1a (5) e água (6), e inoculados com *Monilinia fructicola*. Os frutos permaneceram armazenados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}/80- 90\%$ UR por cinco dias **60**
- Figura 26** - Frutos de pêssego cv. Chiripá após quatro dias de inoculação de *Monilinia fructicola*, tratados com fungicida captan imersão (b) e aspersão (e), composto 1a imersão (c) e aspersão (f), e imersas (a) e aspergidas (d) com água. **61**
- Figura 27** - Perda de massa fresca de frutos de pêssegos cv Chiripá, sem ferimento, submetidos aos tratamentos com imersão em captan (1), composto 4a (2) e água (3); e aspersão em captan (4), composto 4a (5) e água (6), após seis dias de armazenamento. **62**
- Figura 28** - Perda de massa fresca de frutos de pêssegos cv Chiripá, sem ferimento, submetidos aos tratamentos com imersão em captan (1), composto 1a (2) e água (3); e aspersão em captan (4), composto 1a (5) e água (6), após seis dias de armazenamento. **63**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATT	Acidez Total Titulável
SST	Sólidos Solúveis Totais
pH	Potencial hidrogeniônico
AO/OA	Aminoálcool lipídico
DMSO	Dimetilsulfóxido
CIM	Concentração Mínima Inibitória
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
M	Molar
PM	Peso molecular
AACPD	Área abaixo da curva de progresso da doença

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1. Pessegueiro - <i>Prunus persica</i>	21
3.1.1. Pós-colheita do pêssego	22
3.2. Podridão-parda - <i>Monilinia fructicola</i>	22
3.3. Controle da podridão-parda e impactos	25
3.4. Controle Alternativo: produtos sintéticos bioativos	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Esfingoanálogos	33
4.2. Coleta das amostras	33
4.3. Isolamento e identificação de <i>Monilinia</i> spp. das amostras de flores e pêssegos	33
4.3.1. Isolamento e identificação morfológica de <i>Monilinia</i> sp.	33
4.3.2. Identificação molecular de <i>Monilinia</i> sp.	34
4.4. Controle <i>in vitro</i> de <i>Monilinia fructicola</i>	34
4.4.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM	34
4.4.2. Determinação de Concentração Inibitória de 50% (IC ₅₀)	36
4.5. Microscopia óptica	37
4.6. Microscopia eletrônica de transmissão	37
4.7. Avaliação do controle da podridão parda do pêssego em flores de pessegueiro	38
4.8. Avaliação do controle da podridão parda do pêssego em pós-colheita	38
4.9. Avaliações físicas e químicas dos frutos na pós-colheita	40
5. RESULTADOS	41
5.1. Identificação morfológica de <i>Monilinia fructicola</i>	41
5.2. Identificação molecular de <i>Monilinia fructicola</i>	41
5.3. Concentração Inibitória Mínima e Concentração Inibitória de 50%	41
5.4. Microscopia óptica	45
5.5. Microscopia eletrônica de transmissão	46
5.6. Avaliações do controle da podridão-parda em flores de pessegueiro	49
5.7. Avaliações do controle da podridão-parda do pêssego em pós-colheita	51
5.7.1. Incidência	51
5.7.1. 2. Ensaio Composto 4a	51
5.7.1. 3. Ensaio Composto 1a	54
5.7.2. Severidade	56
5.7.2.1. Ensaio composto 4a	56
5.7.2.2. Ensaio composto 1a	59
5.8. Avaliações físico-químicas dos pêssegos em pós-colheita	62
5.8.1. Perda de massa fresca	62
5.8.2. Qualidade dos frutos	64
5.8.2.1. Ensaio Composto 4a	64

5.8.2.2. Ensaio Composto 1a	66
6. DISCUSSÃO	69
7. CONCLUSÕES	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1. INTRODUÇÃO

A fruticultura é uma atividade de relevância social e econômica em todo o mundo, por fornecer alimentos ricos em nutrientes essenciais ao ser humano e gerar renda. Participa diretamente na economia brasileira por meio do valor das exportações e do mercado interno. Pode-se salientar, ainda, a importância no caráter econômico-social, uma vez que está presente em todos os estados brasileiros e ser responsável pela geração de 5,6 milhões de empregos diretos, o equivalente a 27 % do total da mão-de-obra agrícola do País (FACHINELLO et al., 2011).

Segundo Bueno e Baccarin (2012), o Brasil, por ser considerado o terceiro maior produtor mundial de frutas, tem potencial enorme para expandir a sua participação no mercado internacional. No entanto, ainda há necessidade de mais pesquisas sobre a conservação dos frutos, tendo em vista que é considerável a perda devido ao apodrecimento ou outros danos que prejudicam a comercialização. Neta et al. (2013) afirmam que nos países em desenvolvimento, as perdas pós-colheita ultrapassam 20 % da produção. No Brasil, esse valor chega até a 40 % em algumas frutas, o que leva a uma procura constante de métodos alternativos de controle para minimizar essas perdas.

Fachinello et al. (2011) destacaram que os desafios para a fruticultura estão relacionados, dentre outros fatores, à necessidade de se reduzir o uso de agrotóxicos e de insumos, aos manejos pré e pós-colheita realizados nas frutas, ao controle de doenças e pragas e aos programas de melhoramento genético para atender às novas demandas de cada uma das frutíferas.

O pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsch) está entre as frutíferas que vem crescendo em todo o mundo devido aumento no consumo de frutos "in natura" e pela sua utilidade para industrialização e comercialização sob forma de sucos e enlatados (SANTOS et al., 2012).

A produção brasileira de pêssegos, no período de 1999 a 2009, aumentou em 64,69 %, mas a área colhida diminuiu em 15,39 % (FACHINELLO et al., 2011). O Brasil, em 2016, foi responsável pela produção de 222.180 toneladas, entre pêssegos e nectarinas, cultivadas em 21.320 ha, sendo que o Estado de São Paulo é considerado um dos maiores produtores de pêssego (AGRIANUAL, 2017).

Uma das cultivares de pêssego indicada para consumo "in natura" é o Chiripá, criada pela EMBRAPA – Clima Temperado - Pelotas, que produz frutos de tamanho médio a grande, com cerca de 190 g, polpa branca, alto potencial de acúmulo de açúcares, caroço

aderente e epiderme com coloração de superfície avermelhada e cor de fundo esverdeada (ROMBALDI et al., 2002).

Com relação à perecibilidade, o pêsego, dentre as frutas de clima temperado, é uma das mais perecíveis, pois apresenta elevado metabolismo pós-colheita, o que provoca rápida perda de firmeza da polpa, incidência de podridões e murchamento. O amadurecimento acelerado do pêsego é responsável pela sua reduzida vida de prateleira, o que resulta em sérias restrições para eficiente manuseio e transporte. A quantidade colhida não é prontamente absorvida pelo mercado consumidor, o que gera a necessidade de alternativas para manter o fruto por mais tempo armazenado (COELHO, 1994; BONGHI et al., 1999; NAVA e BRACKMANN, 2001).

Em pêsegos destinados ao consumo "in natura", os danos pós-colheita causados por fungos, principalmente a podridão-parda, acarretam grandes perdas no mercado atacadista. Frutos de boa qualidade devem receber tratamento adequado desde a formação no campo, de tal modo que a qualidade seja inerente aos tratamentos culturais pré-colheita (MARTINS et al., 2006).

A podridão-parda, causada pelo fungo *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey, é considerada a principal doença do pessegueiro no Brasil (MAY-DE-MIO et al., 2008). Devido à grande quantidade de chuvas durante o desenvolvimento dos frutos, a incidência de podridões tem sido elevada nos últimos dez anos na cidade de Mogi das Cruzes - SP, localizada na região do alto Tietê. Essa região é responsável pela produção de pêsegos que abastece a cidade de São Paulo, onde a doença já provocou perda de 46% de frutos (MARTINS et al., 2006). Em outros países, como na Espanha, por exemplo, as perdas em pós-colheita, provocadas também pela incidência da podridão-parda, são avaliadas em 59% (LARENA et al., 2005).

O fungo *M. fructicola* tem duas fases de infecção: uma no período de floração, que causa queima de pétalas e cancro nos ramos, e outra nos estágios finais de frutificação, etapa em que ocorre a podridão dos frutos em pré e pós-colheita (HONG et al. 1997).

Villarino et al. (2010) obtiveram uma correlação linear positiva entre o número de frutos mumificados na árvore e a incidência de podridão-parda em pós-colheita. O fungo penetra nos tecidos vegetais através de danos mecânicos que ocorrem durante a colheita, o manuseio, o transporte e o armazenamento dos frutos, levando-os à deterioração (BERGAMIM FILHO e AMORIM, 1996).

As recomendações para o controle da doença no Brasil são baseadas em tratamentos protetores com a utilização de fungicidas, principalmente durante a floração e nos estágios de

pré e pós-colheita (BALARDIN et al., 1994; ANDRADE e MATOS, 1996). Este tipo de controle, além de causar desequilíbrio ambiental, eleva o custo de produção e, muitas vezes, não oferece um controle eficiente em função da grande quantidade de inóculo que pode estar presente no pomar, das condições climáticas durante o ciclo produtivo ou do manejo cultural (BALARDIN et al. 1994).

No controle químico foram relatadas resistência a alguns fungicidas utilizados para aplicações de campo, incluindo benzimidazois e dicarboximidas (ELMER e GAUNT, 1993; THOMIDIS et al., 2009). Além disso, as aplicações de fungicidas no campo estão começando a ser limitadas devido à demanda dos consumidores por baixo resíduo de agrotóxico no fruto aliado às preocupações ambientais.

As demandas públicas para reduzir o uso de agroquímicos e melhorar a saúde ambiental e humana, limitam a aplicação pré-colheita de produtos químicos no campo. Estas preocupações, combinadas com a falta de tratamentos pós-colheita eficazes contra *Monilinia* spp., têm estimulado o interesse de pesquisa no desenvolvimento de novos métodos de controle.

Compostos bioativos obtidos de plantas e seus derivados análogos sintéticos, como chalconas, alcaloides indólicos, aminoalcaloides e diaminas, cujos mecanismos de ação ainda não foram estabelecidos, são atualmente foco de discussões e pesquisas contra patógenos fúngicos de doenças humanas, que utilizam como premissa a potencialidade no controle e baixa toxicidade ao meio ambiente (ABENGÓZAR et al., 2015; LEGARDA-CEBALLOS et al., 2016; OLMO et al., 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar o potencial de compostos sintéticos bioativos no controle de *Monilinia fructicola* em pêssegos da cultivar Chiripá.

2.2. Objetivos específicos:

- Identificar a espécie de *Monilinia* sp. de acordo com as características morfológicas e moleculares;
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CIM) e a Concentração Inibitória de 50% (IC₅₀) dos compostos bioativos no crescimento de *M. fructicola*;
- Avaliar os efeitos microscópicos dos compostos bioativos no fungo *M. fructicola*;
- Verificar a ação dos bioativos em flores e frutos, quando inoculados ou não com *M. fructicola*; e
- Avaliar os efeitos na qualidade pós-colheita de pêssegos tratados com os compostos selecionados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Pessegueiro - *Prunus persica*

A produção mundial de pêssegos está em torno de 12 milhões de toneladas, crescendo ao redor de 20 % a cada 10 anos. A China é o maior produtor mundial, com cerca de 27 % de participação na oferta global, enquanto que o Brasil, a produção representa 1,0 %. O mercado interno é abastecido pelos estados: Rio Grande do Sul (60 %), Paraná (7,0 %), São Paulo (17 %) e Minas Gerais (9,0 %). O Brasil produziu 216.241 toneladas de frutos em 2016, numa área colhida de 17.436 hectares (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2017). O estado de São Paulo produziu em 1.492 hectares de pêssegos, 35.954 toneladas da fruta em 2015 (IBGE, 2017).

O pessegueiro é originário da China e pertence à família Rosaceae, subfamília Prunoidea, gênero *Prunus* (L.) e subgênero *amygdalus*. Todas as cultivares comerciais pertencem à espécie *P. persica* (L.) Bastch (HEDRICK, 1917; SACHS e CAMPOS, 1998). No Brasil, o programa de melhoramento de pessegueiro iniciou-se pouco antes de 1950 no Instituto Agrônomo de Campinas, São Paulo, com plantas introduzidas da Flórida e pessegueiros trazidos com os colonizadores a partir do século 16. Em 1975, dos cruzamento das cultivares Delicioso e Nectared 5, é lançado a cv. Chiripá, desenvolvido pela UEPAE – Embrapa Cascata, cuja a exigência de frio é de 400 a 500 horas. A planta apresenta vigor médio (12 a 14 pares de gemas florais em cada 25 cm de comprimento de ramo). A floração de coloração rosácea ocorre no final de agosto e a colheita dos frutos dá-se em início na primeira semana de janeiro (RASEIRA et al., 2014).

As principais pragas do pessegueiro são a cochonilha-branca-do-pessegueiro (*Pseudolacaspis pentagonal*), a grafolita (*Grapholita molesta*) e a mosca-das-frutas (*Anastrepha fraterculus*). Dentre as pragas secundárias, destacam-se os pulgões (*Myzus persicae* e *Brachycaudus swartzi*), o escólito (*Scolytus rugulosus*), os ácaros rajado (*Tetranychus urticae*) e vermelho (*Panonychus ulmi*) e as formigas (*Atta* spp e *Acromyrmex* spp) (SALLES, 2003).

Dentre as doenças do pessegueiro, podem-se destacar a podridão-parda (*M. fructicola*), ferrugem (*Transchelia discolor*), antracnose (*Glomerela cingulata*), sarna (*Cladosporium carpophilum*), crespeira (*Taphrina deformans*), podridão-mole (*Rhizopus stolonifer*) e a bacteriose (*Xanthomonas arboricola* pv. *prunni*) (FORTES, 2003).

3.1.1. Pós-colheita do pêssego

Após a colheita, o pêssego apresenta padrão respiratório climatérico, com rápida concentração de açúcares nas últimas semanas de maturação e diminuição da acidez. Além disso, seu caráter perecível provoca elevadas perdas da colheita até a comercialização (CHITARRA e CARVALHO, 1985).

Para o consumo da fruta fresca, o teor de sólidos solúveis mínimo do pêssego deve ser de 10°Brix e a acidez titulável máxima de 0,60g de ácido cítrico/100g de polpa (CHITARRA e CHITARRA, 2005). A cultivar Chiripá possui frutos de tamanho médio a grande, polpa branca e firme, com coloração avermelhada nas proximidades do caroço. O sabor é doce, o teor de sólidos solúveis é de 15 a 20°Brix e baixa acidez (RASEIRA; NAKASU, 1998).

Flores-Cantillano (2003) caracteriza o amadurecimento de frutos como sequência de mudanças de cor, sabor, aroma e textura, as quais proporcionam ótima qualidade organoléptica ao serem consumidos. Nesta fase há um considerável aumento no teor de sólidos solúveis, podendo variar de 10° a 15° Brix. Para se determinar a colheita, o parâmetro mais utilizado é a cor característica de cada cultivar, que permite a distinção entre os estádios de maturação: "de vez" quando o fundo do fruto apresenta coloração verde-amarelado e maduro, fundo do fruto amarelado (FLORES-CANTILLANO, 2014).

O fruto do pessegueiro é muito apreciado e sua qualidade visual está entre os fatores de maior importância para a comercialização. Esse atributo pode ser alterado por diversos tipos de defeitos, como, por exemplo: marcas e cicatrizes, rachaduras, danos mecânicos, queimaduras de sol e lesões de pragas e doenças, sendo este último considerado defeito grave, segundo a classificação realizada pela Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP, 2008), e intolerável pelos consumidores, sendo eliminados antes da distribuição (ARGENTA, et. al, 2004).

Martins et al. (2006) quantificaram e caracterizaram os danos pós colheita em pêssegos na CEAGESP, e concluíram que 46 % dos frutos apresentaram podridões associadas a fermentos e à doenças, dentre elas a podridão-parda.

3.2. Podridão-Parda - *Monilinia fructicola*

O gênero *Monilinia* pertence à classe dos Ascomicetos e à ordem Helotiales, cujas características são a formação de apotécios e de escleródios. A fase reprodutiva assexuada dos

fungos do gênero recebe o nome de *Monilinia*. A diferenciação entre as espécies do gênero na fase assexuada é difícil de ser realizada, pois os conídios de todas as espécies de *Monilinia* são limoliformes, hialinos e produzidos em cadeia. Apenas o tamanho dos esporos é variável entre as espécies, embora a variação intraespecífica seja muito grande. *M. fructicola* forma conídios que medem de 15 a 25 x 8 a 14 μm , *M. laxa* de 5 a 23 x 4 a 16 μm e *M. fructigena* forma conídios de 12 a 34 x 9 a 15 μm (OGAWA et al., 1995).

M. fructicola é o patógeno de maior importância econômica entre os causadores de doenças no pessegueiro e demais frutas de caroço. Causa infecção no início da floração, apodrecendo as peças florais, impossibilitando o desenvolvimento do fruto. O fungo permanece no pomar e essa fonte de inóculo promove o desenvolvimento da doença na fase de produção dos frutos e causa o apodrecimento e mumificação destes ainda no campo, e mais intensamente na fase de pós-colheita, quando os frutos estão mais maduros (Figura 1) (EMERY et al., 2000).

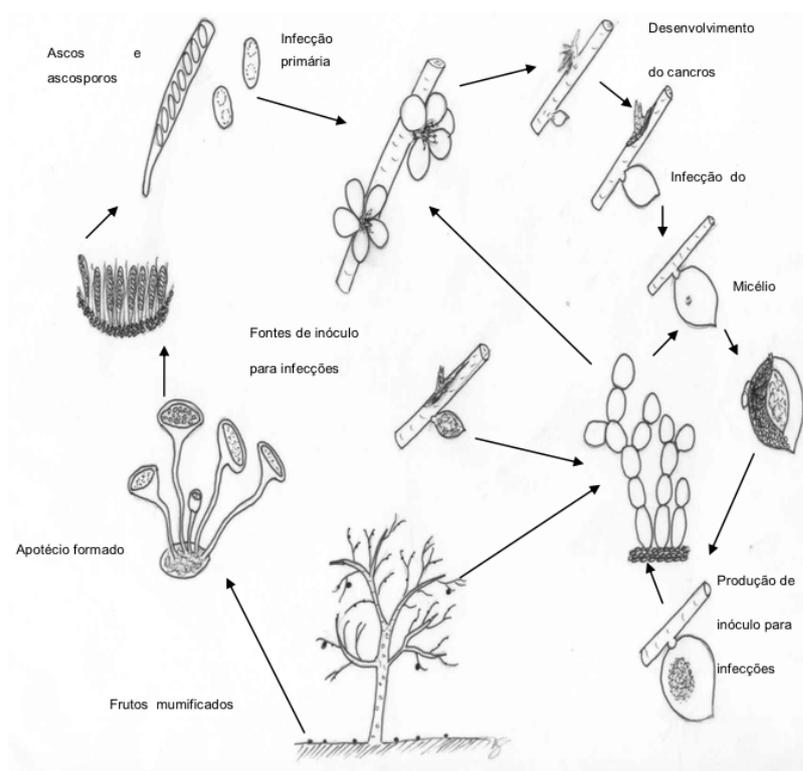


Figura 1 - Ciclo da *Monilinia fructicola* em pessegueiro (MAY-DE MIO et al., 2004).

A doença tem início na primavera, infectando primeiramente os órgãos florais. A partir deste ponto pode avançar pela flor até o pedúnculo. Os conídios são disseminados por vento, água e insetos, atingindo os frutos penetrando a partir daí pela cutícula ou por ferimentos. Causa, a princípio, manchas pardas pequenas e circulares que se desenvolvem

rapidamente e desidratam o tecido mumificando o fruto que pode ficar preso a planta ou caído no solo (OGAWA et al., 1995; MAY-DE MIO et al., 2004), permanecendo dessa forma por todo o inverno até a chegada da primavera quando então inicia liberação de conídios (Figura 1) (AGRIOS, 1997; FORTES e MARTINS, 1998).

As infecções latentes nos frutos imaturos, normalmente, vêm de flores que mesmo com o fungo presente sobrevivem, mas originam frutos contendo o patógeno (MAY-DE MIO et al., 2004). As informações sobre a capacidade do patógeno infectar durante o desenvolvimento dos frutos são escassas; porém, há relatos, para pessegueiro, de que o fungo pode penetrar pelos estômatos, quando os frutos estão imaturos, e na região da inserção do pêlo, no caso de frutos maduros (BYRDE e WILLETTS, 1977). Segundo estes autores, a penetração direta pela cutícula também pode ocorrer, porém em baixa frequência. O que realmente favorece a infecção é a ocorrência de ferimentos, mesmo nos estágios iniciais de desenvolvimento dos frutos, tais como os ocasionados por granizo e insetos. Além disso, condições climáticas favoráveis, próximas ao período de colheita, favorecem o desenvolvimento do patógeno (MOREIRA, 2005).

As três espécies originalmente descritas como causadoras da podridão-parda estão mundialmente distribuídas nas áreas produtoras de frutíferas da família das rosáceas de caroço: *M. fructigena* ocorre na Europa e na América do Norte e *M. laxa* é a espécie que causa a maior quantidade de perdas na Europa, sendo encontrada também na África do Sul, no Chile, no Iraque e nos Estados Unidos; *M. fructicola* é encontrada nos Estados Unidos, no Canadá, na Austrália, na Nova Zelândia e no Japão, além de países da América do Sul (OGAWA et al., 1995); *M. fructicola* é listado como uma doença de quarentena na União Europeia, pois foi detectado na Áustria e França (OEPP/EPPO, 2003). No Brasil, a única espécie relatada como agente causal da podridão-parda em *Prunus* era *M. fructicola* (MARTINS et al., 2006). No entanto, já foi constatada a presença de *M. laxa* causando podridão em frutos de pessegueiro no país (SOUZA et al., 2008).

Holst-Jensen (1997), em um estudo sobre a filogenia molecular e evolutiva da *Monilinia*, relatou 17 espécies do gênero, dando suporte a hipótese de que a espécie não é monofilética. Pizzuolo et al. (2006) estudaram 23 isolados de *Monilinia*, identificando e comparando morfológicamente suas estruturas e as leituras de protocolos biomoleculares por meio da amplificação polimórfica do DNA (RAPD) e PCR.

Frente à necessidade de identificação do agente causal e à dificuldade da diferenciação por meio dos conídios e da diagnose através de sintomas e sinais destes patógenos, foram propostos métodos de diferenciação entre as espécies baseados em meios seletivos ou

morfologia. Antes do surgimento de métodos moleculares com essa finalidade, a inoculação de peras maduras era usada para diferenciar *M. fructicola* de *M. laxa*, uma vez que a esporulação de *M. fructicola* é abundante nesse fruto, enquanto que a esporulação de *M. laxa* é esparsa (OGAWA et al., 1995).

Com o advento de métodos moleculares para a identificação de espécies patogênicas, técnicas como RFLP e PCR passaram a fazer parte do diagnóstico desses patógenos. Sequências de primers específicos para diferenciar *M. fructicola* de *M. laxa* foram desenhadas e têm sido usadas com sucesso (BOEHM et al, 2001; CÔTÉ et al., 2004).

As três espécies de *Monilinia* são geralmente distinguidas por características culturais e morfológicas (BYRDE e WILLETTS, 1977; MORDUE, 1979). No entanto, a identificação das espécies com uso da morfologia não é confiável, pois há muitas diferenças entre isolados de uma mesma espécie e uma sobreposição de morfologia da colônia entre espécies (OGAWA et al., 1995; PENROSE et al., 1976; BYRDE e WILLETTS, 1977). Outras técnicas baseadas em abordagens bioquímicas e moleculares, bem como sobre as características morfológicas e quantitativas, têm aumentado o conhecimento sobre as variações entre os isolados e melhorado a identificação do fungo da podridão-parda (FULTON e BROWN, 1997; VAN LEEUWEN e VAN KESTEREN, 1998; FULTON et al, 1999; SNYDER e JONES, 1999; FÖRSTER e ADASKAVEG, 2000; IOOS e FREY, 2000; BOEHM e MICHAILIDES et al., 2001; LANE, 2002; CÔTÉ et al., 2004).

3.3. Controle da podridão-parda e impactos

No campo, as primeiras medidas para controle da podridão-parda devem ter como objetivo eliminar ou reduzir fontes de inóculo, como as citadas por Byrde e Willetts (1977), os quais recomendam retirar frutos mumificados do chão e dos ramos e realizar as podas de inverno e de limpeza. A retirada das flores com sintomas e dos frutos raleados e abortados que ficam retidos nos ramos são outras atividades recomendadas, pois essas partes da planta atuam como inóculo secundário (LANDGRAF e ZEHR, 1982; HONG et al., 1997).

Em infecções latentes, essas medidas podem não ser eficientes. Nestas infecções em frutos imaturos, ocorre a penetração do fungo via estômatos, pela cutícula ou por meio das infecções florais, mas não ocorre a morte da flor e os sintomas podem se manifestar apenas durante ou após a colheita (SOUZA, 2006).

Segundo Prusky (1996), na infecção latente a interrupção do ataque fúngico ocorre da germinação dos esporos até a colonização. Quando as condições do ambiente ou do hospedeiro forem favoráveis à penetração, mas não ao crescimento ativo do patógeno, as infecções quiescentes são consideradas visíveis ou não visíveis (JARVIS, 1994).

A infecção latente prejudica toda a cadeia produtiva do fruto e o consumidor, pois agrava a incidência da podridão-parda nos períodos da colheita, do armazenamento e do transporte. Proporciona que os frutos sadios sejam contaminados pelos frutos infectados com a podridão entre a colheita e o consumo (AGRIOS, 1997).

Segundo Garrido e Sônego (2005), devido ao fato de o pessegueiro ser atacado por diversas pragas e doenças, o controle deve ser baseado na utilização de agrotóxicos registrados, como fungicidas e inseticidas, nas diferentes fases de desenvolvimento da cultura.

A Lei Federal no. 7.802 de 11/07/89, regulamentada pelo Decreto no. 98.816, no seu Artigo 2, Inciso I, define como agrotóxico: “produtos e componentes físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas. Também para o uso em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL, 2002).

Os defensivos agrícolas podem ser facilmente espalhados para além de seus alvos, intoxicando e matando diretamente insetos benéficos e a vida selvagem, sendo também bioacumulados nesses organismos, provocando alterações indesejáveis nos ecossistemas, como por exemplo, a contaminação de corpos d’água superficiais e subterrâneos e do solo (GLIESSMAN, 2001). Além da contaminação dos ecossistemas naturais, ocorrem impactos sobre a saúde da população, incluindo os aplicadores dos produtos, os membros da comunidade e os consumidores dos alimentos contaminados com resíduos, mas sem dúvida, a primeira categoria é a mais afetada por manter o contato direto com esses produtos (MOREIRA et al., 2002). Essa exposição pode causar problemas respiratórios como bronquite asmática e outras anomalias pulmonares, efeitos gastrintestinais, depressão, câncer e, para alguns compostos como organofosforados e organoclorados, os efeitos incluem distúrbios musculares, debilidade motora e fraqueza (BRIGANTE et al., 2003).

Segundo Ribeiro (2001), somente na década de 90 as vendas mundiais de agrotóxicos ultrapassaram 21 bilhões de dólares, o que representa mais de três milhões de toneladas de produtos. Da mesma forma, o volume de agrotóxicos comercializados no Brasil teve um

grande crescimento, correspondendo a um faturamento anual na ordem de bilhões de reais. Este crescimento desordenado e sem controle se deve a vários fatores de natureza complexa, e se relacionam com a expansão da fronteira agrícola, a intensificação do desequilíbrio biológico do agroecossistema e os aspectos socioeconômicos. O grande volume de produtos utilizados se reflete na contaminação dos alimentos que serão consumidos, pois quando se pesquisam resíduos em produtos colhidos, verifica-se a alta frequência de casos que ultrapassam os limites pré-estabelecidos. Ribeiro (2001) ainda menciona que o excesso de resíduos tóxicos também tem sido um obstáculo à exportação dos produtos nacionais.

Os problemas com agrotóxicos estão associados às suas propriedades, como a toxicidade seletiva, a persistência no ambiente, o potencial de bio-acumulação e a mobilidade (EMBRAPA, 2004). Metais tóxicos podem provocar distúrbios no ecossistema do solo, afetando sua população de invertebrados (SPURGEON et al., 1994). O armazenamento de metais é um aspecto característico de alguns invertebrados terrestres, os quais têm sido chamados de macroconcentradores. A eliminação do metal indesejado por esses organismos pode não ocorrer na mesma proporção da ingestão, causando um problema para estes. Diante disso, esses animais têm desenvolvido uma estratégia para promover a inativação e retenção de metais tóxicos ou quantidades expressivas de elementos não essenciais pela compartimentalização intracelular (ALVES, 2002).

O mercado mundial, além da qualidade externa das frutas, passou a exigir controle e registro sobre todo o sistema de produção, incluindo análise de resíduos de agrotóxicos e estudos sobre impacto ambiental da atividade, ou seja, é necessário que se tenha rastreabilidade de toda a cadeia produtiva, assegurando ao consumidor transparência do processo produtivo. Os aspectos relativos à segurança alimentar e o excesso de oferta de produtos no mercado, mostram que a única alternativa é a busca pela distinção qualitativa (estética, valores nutricionais e aspectos ambientais) do produto para aquisição da confiança do consumidor, levando-se em conta seus gostos e suas preferências (FACHINELLO et al., 2003).

Para o controle dos fitopatógenos, são essenciais informações sobre o seu ciclo de vida, da sua etiologia, do seu comportamento na planta e da sua interação com o ambiente e o hospedeiro. Manter a incidência e a severidade das doenças abaixo do nível de dano econômico é essencial para considerar eficiente o seu controle, o qual muitas vezes só é alcançado com o uso de mais de um método, como controles físicos, mecânicos, culturais, genéticos, legislativos, químicos e biológicos (ZAMBOLIM et al., 1997).

Nos locais em que ocorre alta incidência de *M. fructicola*, o tratamento químico é o

primeiro método a ser utilizado em cultivo convencional ou integrado. Esses tratamentos são feitos logo que as sépalas se tornam visíveis. A segunda intervenção com esses produtos é efetuada na fase de queda das pétalas. Na fase da pré-colheita, as pulverizações ocorrem aos vinte e um, catorze e sete dias antes da colheita (MAY-DE MIO et al., 2004).

Para produção convencional, prevalece o manejo e práticas culturais e tratamentos fitossanitários (Tabela 1) com calendário fixo; sem monitoramento de pragas e doenças.

Tabela 1. Características dos fungicidas utilizados na produção convencional do pêsego.

Princípio Ativo	Grupo estrutural	Número de aplicações	Classificação Toxicológica ^a	Classificação Ambiental ^b	Período de Carência (dias)
Captan	dicarboximida	2	I	III	1
iprodiona	dicarboximida	1	IV	III	3
mancozeb	ditiocarbamato	3	II	II	21
óxido cuproso	derivado de cobre	1	IV	III	7
tebuzonazol	triazol	1	III	II	7
tiofanato metílico	carbamato	2	IV	III	14
Triforina	piperazina	1	I	III	7

* Modificado de Informações AGROFIT, 2017

a. I, extremamente tóxico; II, altamente tóxico, III, medianamente tóxico e IV, pouco tóxico

b. II, produto muito perigoso e III produto perigoso

Apesar do número considerável de agroquímicos registrados para o pessegueiro, conforme observado na Tabela 1, o controle eficiente da podridão-parda nas etapas da colheita e pós-colheita ainda é considerado um desafio para reduzir perdas de frutos.

3.4. Controle Alternativo: produtos sintéticos bioativos

A esfingosina é um amino-álcool natural com 18 átomos de carbono da classe dos lípideos denominada esfingolípídio (LIAO et al., 2005; YUN, 2003). Os esfingolípídios são moléculas encontradas em membranas de organismos eucariontes e procariontes, amplamente encontrados na natureza, tendo sido identificados e isolados de mamíferos, organismos marinhos, plantas, fungos e leveduras. Sua característica estrutural é uma base esfingoide que apresenta uma cadeia alquil com número variado de carbonos (14 a 26), um grupo hidroxila na posição 4 ou 6 e duplas ligações variáveis e grupos metila inseridos ao longo da cadeia carbônica (Figura 2). Estima-se que existam mais de 60 diferentes tipos de bases esfingoides (MERRIL e SANDHOFF, 2002).

Atualmente novas funções foram atribuídas aos esfingolipídios, por exemplo: participação de eventos fisiopatológicos em mamíferos e plantas como, nos processos de multiplicação e comunicação celular, reconhecimento de espécies invasoras, entre outros. (SCHMIDT e VANKAR 2000).

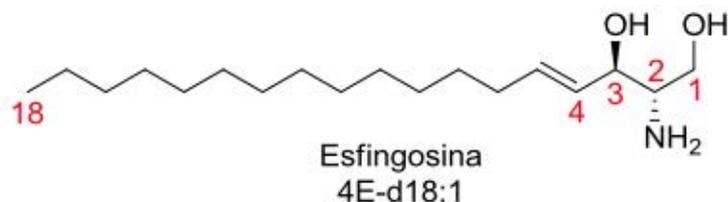


Figura 2 - Estrutura básica de uma esfingosina (FREDI e TINOCO, 2015).

O grupo de pesquisa em Química Farmacêutica DOMOBIO (*Diseño y Obtención de Moléculas BIOactivas*) da Universidade de Salamanca (USAL), Espanha, desenvolveu e sintetizou numerosas substâncias bioativas de diferentes naturezas estruturais e úteis frente a distintas doenças humanas, principalmente câncer e infecções, em colaboração com pesquisadores das áreas biomédicas e com indústrias de vários países. O grupo publicou e patenteou substâncias naturais e semissintéticas, com estruturas de lignanos e terpenilquinonas/hidroquinonas, derivadas de compostos naturais, e sintéticas de natureza lipídica (aminoálcoois e diaminas alifáticas e alicíclicas) e aromática heterocíclica contendo sistemas de benzalftalida, ftalazinona, imidazoisoindol, etc. (informação verbal)¹.

A maioria das substâncias do Grupo DOMOBIO foram desenhadas e sintetizadas a fim de submetê-las a bioensaios de naturezas diversas, para avaliar atividade e potencial de utilidade terapêutica, incluindo ensaios de ação contra fungos patogênicos humanos. Os resultados publicados apenas parcialmente, até hoje, têm servido para selecionar para este trabalho a família de compostos relacionados estruturalmente com esfingosina, um componente celular universal e fundamental para qualquer tipo de organismo. Eles são compostos com funções de tipo amina e álcool e tamanho variável, que foram caracterizadas em termos de bioatividade, tal como descrito abaixo, (informação verbal)¹.

Os resultados obtidos pelos grupos de pesquisa da Universidade Nacional de Rosário, Argentina, (UNR, Dra. Susana Zacchino) e da Universidade de Antioquia, Medellín, Colômbia, (UDEA, Dra Ana C. Mesa), relatam atividade antifúngica dos esfingoanálogos. Em resumo, o grupo da UNR avaliou cerca de 35 esfingoanálogos da Universidade de

¹ informações fornecidas pelo Dr. Arturo San Feliciano, em junho de 2017.

Salamanca (USAL), de tamanho único de cadeia de 14 carbonos, contra duas espécies de *Candida*, uma de *Saccharomyces*, uma de *Cryptococcus*, três de *Aspergillus*, uma de *Microsporium* e duas espécies de *Trichophyton*, encontrando vários compostos com valores de MIC entre 3,9 e 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (10 a 100 μM) e os melhores foram contra *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*. Estes resultados serviram para facilitar a seleção de compostos para a realização de outras avaliações e para orientar o desenho e síntese de melhores esfinguanálogos (informação verbal)¹.

O grupo da UDEA avaliou 10 compostos selecionados contra espécies de *Candida* (8), *Aspergillus* (3), *Cryptococcus* (1), *Fusarium* (1) e *Sporothrix* (1), para encontrar duas substâncias causadoras da inibição total do crescimento e com largo espectro de ação antifúngica, como a diamina 1b (AA-40/00/14) e o amino-álcool 7a (OA-10/02/14), (Figura 5).

Em estudos contra fitopatógenos, Souza et al. (2012) comprovaram a eficácia *in vitro* dos compostos esfinguanálogos: 1a (1c), 1b (1e), 3a (7c), 3b (7e), 4a (8e) e 5a (9a) (Figura 3), todos com halos de inibição superiores a 10 mm, demonstrando ser viável a utilização destes tipos de diaminas no controle de *Penicillium digitatum*, causador no bolor verde em citrus.

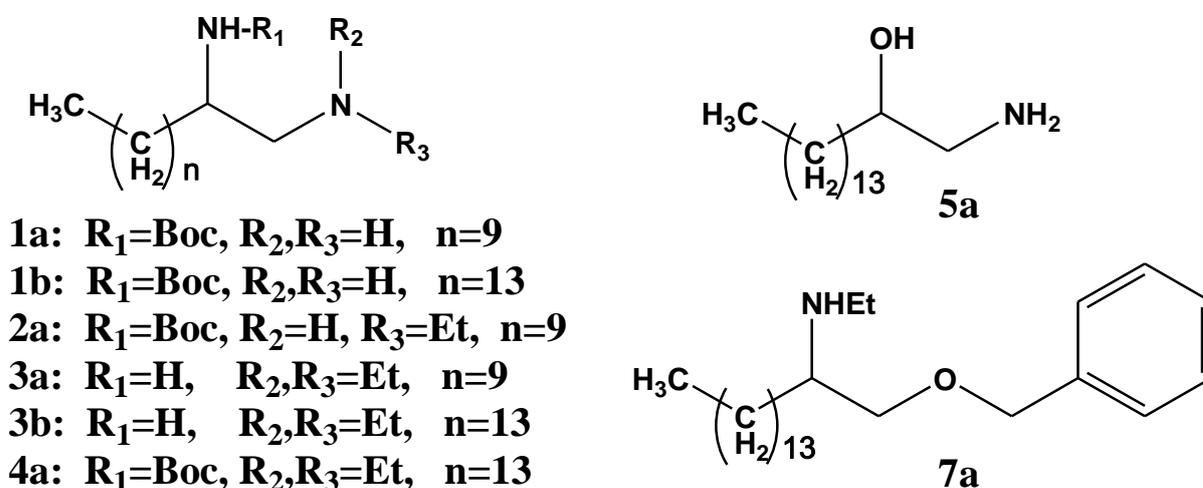


Figura 3 - Esfinguanálogos ativos frente a *Penicillium* spp. e outros fungos.

Em relação às outras atividades e usos dos esfinguanálogos, Olmo et al. (2002) sintetizaram diaminas alifáticas e derivados amino-álcoois e avaliaram seus efeitos em culturas de *Leishmania* spp. Os derivados de diamina foram mais potentes do que os seus análogos de amino-álcool ou amino-éter. Dois derivados de diamina, o carbamato 8b (14d) e o aminodiéster 9d, e de um etilamino-álcool 6a (9d) (Figura 4), resultaram em uma inibição

de crescimento do parasita em concentrações inferiores a $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, com potências mais próximas do medicamento de referência, a anfotericina B.

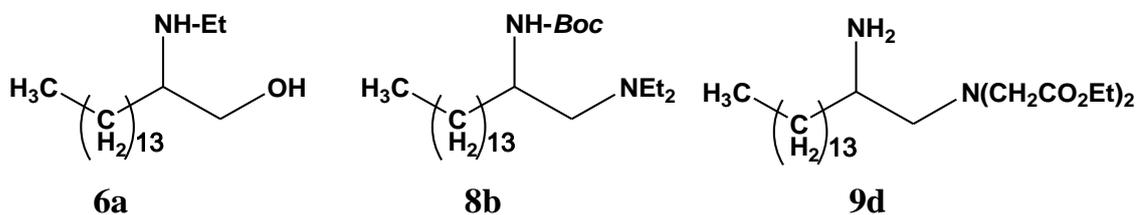


Figura 4 - Esfingoanálogos anti-*Leishmania* spp. **Boc**: *tert*-butoxicarbonila, **Et**: etila.

Abengózar et al. (2014) relataram os resultados de estudo sobre a ação anti-*Leishmania* de aminoálcoois relacionados com o composto 6a (9d), descrevendo três diferentes modos de ação para compostos estruturalmente muito semelhantes. Também foram relatados os efeitos de alguns esfingoanálogos sobre nematoides do gênero *Strongyloides* (LEGARDA-CEBALLOS et al. 2016).

Em outro trabalho, quinze análogos da dihidroesfingosina foram testados *in vitro* contra o *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Dois éter benzílicos (3 e 4b) e uma diamina substituída 8b (14d), (Figura 5), apresentaram alta potência de controle, com valores de CIM de $1,25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os três compostos testados em onze outras estirpes isoladas de casos clínicos com diferentes padrões de multi-resistência a drogas (MDR), mantiveram os seus valores de CIM para a maioria das estirpes, ou até mesmo melhor, como no caso do composto 4b, que, ensaiadas na estirpe n. 332, também resistente a todos os medicamentos de primeira linha anti-tuberculose, atingiu o valor de CIM de $0,78\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (OLMO et al., 2009). Em publicação posterior (OLMO et al., 2016), foi demonstrada a eficácia *in vivo* de vários esfingoanálogos não tóxicos, no camundongo infectado com estirpes clínicas de *Mtb* multirresistentes a drogas anti-TB.

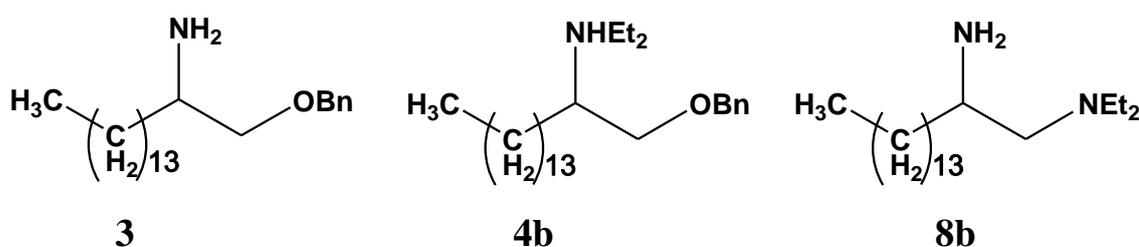


Figura 5 - Esfingoanálogos ativos frente a (MDR)- *M. tuberculosis*. **Et**: etila, **Bn**: benzila. (números dos compostos mantidos de acordo a publicação original)

O grupo da Universidade de Salamanca também publicou outros trabalhos sobre novos agentes antifúngicos que pertencem a outros compostos estruturais. Castro et al. (2013) realizaram a avaliação antifúngica de vinte e sete compostos quinônicos, *in vitro*, contra os microrganismos humanos *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Trichophyton* spp. A estratégia de síntese usada para obter os derivados de quinona foi inicialmente baseada no ciclo adição Diels-Alder entre derivados de p-benzoquinona e vários terpenoides como mirceno, seguido por ciclização da cadeia lateral de prenilo, no caso do antraceno-1,4-dionas. Os compostos mais promissores, exibindo CIM com valores inferiores a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, foram aqueles que ostentam um ou dois átomos de cloro ligados ao anel quinona. Curvas de mortes determinadas para os compostos mais potentes mostraram o seu modo de ação fungistático semelhante à do itraconazol.

Derita et al. (2013) relataram a atividade antifúngica de derivados de ftalazinona em importantes doenças da derme humana como *Aspergillus niger*, *A. fumigatus* ou *A. flavus*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* e *Epidermophyton floccosum*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Esfingoanálogos

Compostos derivados de esfingolipídios, diaminas e aminoálcoois, foram sintetizados no Departamento de Química Farmacêutica da Universidade de Salamanca, Espanha, pelo do Prof. Dr. Arturo San Feliciano Martin e cedidos para o presente estudo.

4.2. Coleta das Amostras

As amostras de pêssegos com sintomas de podridão-parda foram coletadas no município de Mogi das Cruzes - SP, propriedade do Senhor Américo Kudamatso, produtor de pêssegos cultivar Chiripá enxertadas sobre cavalo Okinawa com espaçamento quatro metros entre plantas e seis metros entre linhas, na safra 2015/2016. Vinte frutos recém colhidos e 50 flores com sintomas característicos de mumificação e manchas foram coletados e acondicionados em sacos de papel e transportados em caixas de isopor até o Laboratório de Fitossanidade da Faculdade Integral Cantareira, em São Paulo, SP, para o isolamento.

4.3. Isolamento e identificação de *Monilinia* sp. das amostras de flores e pêssegos

4.3.1. Isolamento e identificação morfológica de *Monilinia* sp.

As amostras da epiderme do fruto foram pesadas e alíquotas de 10g colocadas em frascos de vidro contendo 90 mL de água destilada estéril, sendo agitadas por 30 minutos e posteriormente diluído em concentrações de 10^{-1} a 10^{-8} . Uma fração de 0,1mL de cada diluição foi distribuída superficialmente, em placas de Petri contendo ágar batata dextrose e, posteriormente, incubadas por 5 dias na temperatura de 25°C, em estufa com temperatura controlada, em duplicata (MELLO et al., 2011). O gênero *Monilinia* foi classificado até espécie, de acordo com as suas características morfológicas, utilizando chave Barnett e Hunter (1998) e moleculares.

4.3.2. Identificação molecular de *Monilinia* sp.

O DNA de dois isolados foi extraído conforme método descrito por Doyle e Doyle (1987) a partir do micélio crescido em meio de cultura. A amostra de DNA genômico extraído foi submetida à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação da região ITS (internal transcribed spacer) do rDNA. Os oligonucleotídeos iniciadores para a região ITS foram ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') (WHITE et al., 1990).

A mistura para a PCR consistiu de 1µL de DNA, 1µL de cada primer a 10µM, 10µL de tampão para PCR 5X, 1µL de dNTPs a 10 mM, 0,2µL de GoTaq DNA polimerase 5U.µL⁻¹ (Promega) e 35,8µL H₂O MilliQ autoclavada, para um volume final de 50µL. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 10 segundos, anelamento a 54 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 45 segundos, e extensão final a 72 °C por 4 minutos. A verificação dos produtos amplificados foi realizada com eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo. Os produtos amplificados foram purificados através de precipitação com polietilenoglicol (SCHMITZ e RIESNER, 2006), submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia empregando-se o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) e analisados em sequenciador capilar automático 3500 XL (Applied Biosystems). Sequências similares às obtidas para os isolados do presente estudo foram encontradas no GenBank através da ferramenta Blastn.

O isolado foi depositado na coleção de fungos fitopatogênicos "Micoteca Mário Barreto Figueiredo," no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal do Instituto Biológico de São Paulo - SP, com o registro MMBF13/2018.

4.4. Controle *in vitro* de *Monilinia fructicola*

4.4.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM

Após a identificação molecular, o fungo *M. fructicola* seguiu para a avaliação da atividade antifúngica no Laboratório de Fitossanidade do CEATEC (Centro de Apoio Tecnológico Cantareira) da Faculdade Integral Cantareira.

A triagem das amostras ocorreu em meio sólido BDA com discos estéreis. Com o auxílio de swab, o fungo (conídios e micélio) foi distribuído na superfície da placa, onde

depositou-se o disco de papel filtro estéril de 6 mm embebido com 5,0 μ L de DMSO (controle negativo), 5,0 μ L da solução de Captan® (controle positivo) (0,04 mmoles.disco⁻¹; halo inib.: ~13,5 mm) e 5,0 μ L (0,04 – 10mmoles.disco⁻¹) dos tratamentos (Tabela 2). Os ensaios em triplicata foram incubados à temperatura de 28 \pm 2°C durante sete dias. As leituras foram realizadas, após o período, com paquímetro digital e o resultado expresso pela média dos halos de inibição de crescimento em volta dos discos de papel. Foi considerado ativo o produto que inibiu o crescimento do microrganismo, produzindo halos iguais ou superiores a 10mm de diâmetro. A partir desses resultados determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A técnica de disco-difusão foi realizada segundo recomendações descritas no método M44-A (NCCLS, 2004).

Tabela 2 - Códigos dos compostos (USAL), fórmula e peso molecular e três concentrações em μ g, dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO).

DIAMINAS			
Código USAL* Composto	Fórmula Molecular	Peso Molecular	Concentração (μ g/ μ L)
1a (1c)	C ₁₇ H ₃₆ N ₂ O ₂	300	S1=83,3
			S2=41,6
			S3=20,83
1b (1e)	C ₂₁ H ₄₄ N ₂ O ₂	356	S1=83,3
			S2=41,6
			S3=20,83
2a (2c)	C ₁₉ H ₄₀ N ₂ O ₂	328	S1=34,5
			S2=15
			S3=7,5
2a` (2e)	C ₂₃ H ₄₈ N ₂ O ₂	384	S1=35,5
			S2=47,3
			S3=15,8
3a (7c)	C ₁₆ H ₃₆ N ₂	256	S1=35,5
			S2=40,6
			S3=15,2
3b (7e)	C ₂₀ H ₄₄ N ₂	312	S1=36,5
			S2=52,7
			S3=17,5
4a (8e)	C ₂₁ H ₄₄ N ₂ O ₂	356	S1=39,5
			S2=14,8
			S3=7,4
4a' (8c)	C ₂₅ H ₅₂ N ₂ O ₂	412	S1=31,5
			S2=48,7
			S3=16,2
9a (3e)	C ₂₅ H ₅₂ N ₂ O ₂	412	S1=33,5

			S2=112 S3=22,4
9b (4e)	$C_{27}H_{56}N_2O_2$	440	S1=31,5 S2=58 S3=19,3
10a (5e)	$C_{23}H_{46}N_2O_4$	414	S1=35,5 S2=75 S3=25
10b (6e)	$C_{25}H_{50}N_2O_4$	442	S1=31 S2=140 S3= 70

AMINOÁLCOOIS

Código USAL* Composto	Fórmula Molecular	Peso Molecular	Concentração (µg/µL)
5a (9a)	$C_{16}H_{35}NO$	257	S1=30 S2=120 S3=60
11a (9b)	$C_{18}H_{39}NO$	285	S1=36,5 S2=134 S3=67
6a (9d)	$C_{22}H_{47}NO$	341	S1=32,5 S2=142 S3=71
8e (14a)	$C_{26}H_{47}NO_4$	437	S1=37 S2=70 S3=23,3
8f (14b)	$C_{28}H_{51}NO_4$	465	S1=35,5 S2=146 S3=73

USAL: código de identificação da Universidade de Salamanca.

4.4.2. Determinação de Concentração Inibitória de 50% (IC₅₀)

A concentração inibitória de 50 % do crescimento é a medida quantitativa, indicando quanto do composto é necessário para inibir 50 % do crescimento da *Monilinia* em cultivo. O valor é determinado pela curva dose-resposta obtida do experimento *in vitro*. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas de triplicatas realizadas para cada um dos testes.

A determinação da sensibilidade fúngica aos compostos foi realizada através do método de superfície, conforme metodologia do item 4.4.1. As médias dos halos foram

comparadas pelo teste de Tukey a 5 % realizado no programa ASSISTAT 7.7 beta.

4.5. Microscopia óptica

Blocos de BDA, de 1x1 cm, colonizados por sete dias pelo fungo na presença dos tratamentos foram diretamente retirados das placas e depositados sobre lâminas. Após aplicação de uma gota de água + glicerina (1:1), foram cobertos com lamínula. As análises de hifas, conidióforos e conídios foram feitas em microscópio óptico com objetiva de 40x.

4.6. Microscopia eletrônica de transmissão

Amostras de *M. fructicola* desenvolvida nos diferentes tratamentos e IC₅₀ foram encaminhadas para a visualização de sua ultraestrutura pela técnica de inclusão em resina Spurr e posterior obtenção de cortes ultrafinos, no Centro de Pesquisa em Sanidade Vegetal do Instituto Biológico.

Pequenos fragmentos do micélio do fungo foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5 %, diluído em tampão fosfato 0,1M pH 7,2, por 12 horas em temperatura de 4 °C. Os fragmentos foram lavados no mesmo tampão, por 3 vezes, 5 minutos cada passagem e, então, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1,0 % em água, por 4 horas em temperatura ambiente na ausência de luz. Após este período foram lavados por 6 vezes com água destilada, 5,0 minutos cada passagem. Os fragmentos foram, então, fixados/contrastados *in bloc* com acetato de uranila 4,0 % por 18 horas e, em seguida, desidratados em série cetônica crescente (50, 70, 90 e 100 %) por 5 minutos, 3 vezes em cada concentração, salvo na concentração de 100 %, onde os fragmentos permaneceram por 15 minutos, por 3 vezes.

Após a desidratação, os pequenos fragmentos foram colocados em uma solução de resina Spurr e acetona 100 % (1:1) por cerca de 24 horas sob rotação em temperatura de 37 °C para, em seguida, serem colocados em resina Spurr pura, por 4 horas, também sob rotação na mesma temperatura. Posteriormente, os fragmentos foram colocados em molde de silicone preenchido com resina Spurr pura, a qual foi polimerizada em forno a 68 °C por 72 horas. Os blocos, contendo o fragmento em estudo, foram seccionados para a obtenção dos cortes ultrafinos em ultramicrótomo Leica EM UC7.

Os cortes obtidos foram depositados em telas de cobre, cobertas com filme parlódio reforçado com carvão, contrastados com acetato de uranila 2,5 % por 30 minutos, lavados com água destilada, pós-contrastados com citrato de chumbo por 2,0 minutos e finalmente

lavados, novamente, com água destilada (MARTELLI; RUSSO, 1984). As preparações foram observadas sob microscópio eletrônico de transmissão Philips Tecnai - 10, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.7. Avaliação do controle da podridão parda em flores de pessegueiro

Para cada composto testado e os controles positivo e negativo, foram coletadas 200 flores aleatoriamente considerando as fases de plena floração e queda de pétalas (Figura 6 d e e), conforme descrição feita por May-De-Mio et al. (2008). As estruturas florais foram encaminhadas ao laboratório e acondicionadas em caixas plásticas, forradas com papel filtro esterilizado e umedecido em água estéril, contendo 25 flores cada. Foram aspergidos água (controle negativo), captan (controle positivo) e os compostos 1a e 4a. As caixas permaneceram armazenadas por três dias a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (no escuro), e posteriormente foram transferidas para a temperatura de 4°C (com luz) por mais três dias, com o intuito de promover a esporulação do patógeno (LUO et al., 2001). Não houve inoculação artificial do fungo.

Após esse período, cada estrutura floral foi avaliada para se detectar presença de estruturas do patógeno, com o auxílio de um microscópio ótico.

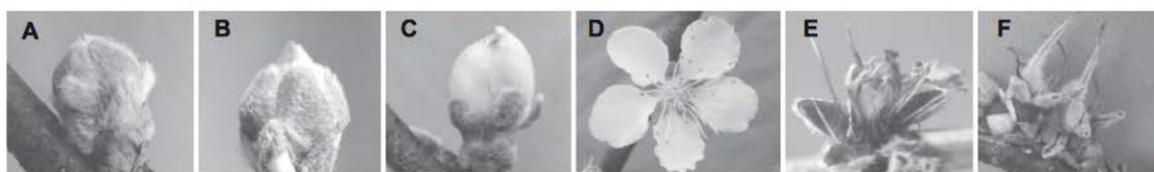


Figura 6 - Fases da floração de pessegueiro. **A.** gema inchada; **B.** botão rosado; **C.** botão aberto; **D.** plena floração; **E.** queda de pétalas; e **F.** queda de sépalas/início de frutificação, (MAY-DE- MIO et al., 2008).

4.8. Avaliação do controle da podridão-parda do pêsego em pós-colheita

Após obtenção dos resultados preliminares, os melhores compostos foram aplicados por aspersão e imersão em frutos recém colhidos no ponto de maturação comercial (maduro e polpa firme) de um lote homogêneo de 40 frutos (20 com ferimento e 20 sem ferimento), sendo quatro frutos por tratamento (5 bandejas com 4 frutos cada). A desinfestação foi realizada com solução de hipoclorito de sódio a 0,015 % por cinco minutos, posteriormente secos a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, com umidade relativa de 90 %. Após a colheita, os frutos apresentaram teor

de sólidos solúveis de 14,4°Brix, acidez total titulável de 0,80 % de ácido cítrico e pH de 3,41. Os pêssegos foram então imersos nas soluções com os tratamentos por cinco minutos e dispostos em grades para posterior escorrimento do excesso de solução.

No lote de pêssegos para quantificação da severidade e verificação do poder curativo dos compostos, fez-se fermento inoculando-se suspensão de esporos (10^5 esporos.mL⁻¹) em cada fruto. Os frutos ficaram dispostos em câmara úmida ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e U.R. 90%) por dezoito horas e, logo depois, em condições ambientais ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 80 – 90% UR) por seis dias. Diariamente foi determinada a severidade e incidência, medindo-se os diâmetros das lesões nos frutos inoculados e contando-se as lesões que surgiram espontaneamente.

Nos frutos que desenvolveram a lesão, a área infectada foi avaliada a partir do centro do ferimento, medindo-se quatro raios em posição ortogonal nas superfícies: superior (S), inferior (I), direita (D) e esquerda (E), utilizando-se o valor médio para o cálculo da área. Como as áreas obtidas são praticamente circulares, foi utilizada a fórmula-padrão para cálculo da área do círculo ($A = \pi \cdot r^2$), em que: **A** = área acometida pela infecção, π = constante (3,1416) e **r** = raio médio.

A partir dos valores obtidos determinou-se o índice de doença (ID), adotando-se notas de 0 a 5, levando-se em consideração a frequência e a nitidez da área lesada, conforme os seguintes critérios:

- 0 - ausência de infecção;
- 1- infecção de área de 0,04cm²;
- 2- infecção de área de 0,041 até 0,60cm²;
- 3- infecção de área de 0,61 até 3,00cm²;
- 4- infecção de área de 3,10 até 6,00cm²; e
- 5- infecção de área superior a 6,00cm².

Utilizou-se o índice de doença (ID), descrito por Mc Kinney, citado por Cirulli e Alexander (1966), possibilitando, assim, uma avaliação qualitativa da resistência dos tecidos dos frutos de pessegueiro ao patógeno (*M. fructicola*), de acordo com o tratamento utilizado:

ID = (f . v) / n . x . 100, onde:

ID = índice de doença;

f = número de frutos em cada categoria de infecção;

v = grau de infecção;

n = número total de frutos inoculados; e

x = grau máximo de infecção.

Com os dados de incidência e severidade das diferentes avaliações, calculou-se a área

abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), pelo método de Berger, 1988, utilizando a fórmula: $\Sigma [((y_1 + y_2)/2) * (t_2 - t_1)]$, onde:

y = intensidade da doença; e

t = tempo da avaliação da intensidade da doença.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5,0 % de probabilidade.

4.9. Avaliações físicas e químicas dos frutos na pós-colheita

As avaliações físicas e químicas foram realizadas a cada dois dias até a perda de qualidade; nos tempos 0, 2, 4 e 6 dias após os tratamentos imerso e aspergido e controles positivo e negativo.

As metodologias utilizadas na avaliação da qualidade e da conservação pós-colheita foram obtidas com os seguintes parâmetros:

- dias de conservação: estabelecida em função do número de dias em que cada fruto permaneceu em condições aceitáveis (sem enrugamento e podridão) para a comercialização;
- perda de massa: foi determinada através da diferença entre a massa inicial e a massa final da fruta em balança semi-analítica, com precisão de 0,01g, sendo os resultados expressos em porcentagem (%);
- teor de sólidos solúveis: determinado por refratometria, com aparelho ATAGO, com os resultados expressos em °Brix;
- acidez total titulável: em porcentagem de ácido cítrico (g de ácido cítrico/100g de tecido fresco), obtida através da titulação com NaOH – 0,1N, utilizando-se 10g do material fresco triturado e diluído em 90 mL de água destilada, conforme recomendação do Instituto Adolpho Lutz (1985); e
- pH obtido em potenciômetro, conforme técnicas recomendadas pelo Instituto Adolpho Lutz (1985).

O ensaio foi conduzido em esquema fatorial 5 x 2, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), utilizando-se quatro frutos por parcela, totalizando-se 120 frutos. Os resultados foram submetidos aos testes F e Tukey ($p=0,05$), por meio do programa ASSISTAT 7.7 beta.

5. RESULTADOS

5.1. Identificação morfológica de *Monilinia fructicola*

O micélio e os conídios do isolado obtidos foram observados em microscópio óptico, onde foram visualizadas hifas hialinas com micélio branco acinzentado, conídios blásticos, em cadeias ramificadas, de formas elipsoide, ovoide e limoniforme. Estas características foram descritas por Barnett e Hunter (1998) para a espécie.

5.2. Identificação molecular de *Monilinia fructicola*

Os produtos da região ITS amplificados por PCR, resultaram em bandas de aproximadamente 534 pb. Similaridades acima de 99 % com sequências de *M. fructicola* foram observadas, confirmando a identificação da espécie.

5.3. Concentração Inibitória Mínima e Concentração Inibitória de 50%

A tabela 3 fornece os códigos dos compostos, as concentrações e o efeito dos compostos bioativos utilizados na inibição (%), na Concentração Mínima Inibitória (CIM) e na Concentração Inibitória de 50 % (IC₅₀) de *M. fructicola* em pêssegos Chiripá.

Tabela 3 - Compostos e concentrações (volume 5,0 µL) em cada disco, valores dos halos de inibição, porcentagem de inibição, Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Concentração Inibitória de 50% (IC₅₀) de *Monilinia fructicola*.

DIAMINAS					
Composto	Concentração	Média dos halos (mm)	% de inibição	CIM (µg.µL ⁻¹)	IC ₅₀ (µg.µL ⁻¹)
1a (1c)	S1	27,2a	130,8	22,3	10,70
	S2	24,7a,b	118,7		
	S3	20,1c	96,5		
1b (1e)	S1	8,86	42,57	-	-
	S2	0,00	0		
	S3	0,00	0		
2a (2c)	S1	21,8b,c	104,7	31,4	9,95
	S2	14,1d	68,0		
	S3	8,49	40,8		
2a'' (2e)	S1	10,6d	51,1	65,4	40,50
	S2	11,0d	53,0		
	S3	0,00	0		

3a (7c)	S1	9,53	45,8		
	S2	19,6c	94,1	38,1	26,70
	S3	12,4d	59,4		
3b (7e)	S1	11,7d	56,2		
	S2	12,0d	57,7	65,4	41,40
	S3	0,00	0		
4a (8e)	S1	27,3a	131		
	S2	22,3b,c	107	20,81	10,19
	S3	20,6c	98,9		
4a' (8c)	S1	11,1d	53,4		
	S2	12,0d	57,7	60,3	37,9
	S3	0,00	0		
9a (3e)	S1	8,59	41,3		
	S2	9,58	46,0	147	82,89
	S3	0,00	0		
9b (4e)	S1	7,18	34,5		
	S2	0,00	0	-	-
	S3	0,00	0		
10a (5e)	S1	8,1	38,92		
	S2	9,30	44,7	104	63,08
	S3	0,00	0		
10b (6e)	S1	0,00	0		
	S2	0,00	0	-	-
	S3	0,00	0		

AMINOÁLCOOIS

Composto	Concentração	Média dos halos (mm)	% de inibição	CIM ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)
5a (9a)	S1	0,00	0		
	S2	8,76	0	-	-
	S3	0,00	0		
11a (9b)	S1	0,00	0		
	S2	0,00	0	-	-
	S3	0,00	0		
6a (9d)	S1	0,00	0		
	S2	0,00	0	-	-
	S3	0,00	0		
8e (14a)	S1	8,00	38,4		
	S2	0,00	0	-	-
	S3	0,00	0		
8f (14b)	S1	0,00	0		
	S2	0,00	0	-	-
	S3	0,00	0		

Produto	Média dos halos mm	% de inibição	CIM ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)
DMSO Cont. negativo	0,00	-	-	-
Captan Cont. positivo	20,8c	-	-	-

Valores de halos de inibição superiores a 10 mm (em negrito), foram submetidos a Teste Tukey 5 %, onde letras iguais, nas colunas, não diferiram estatisticamente entre si.

Na análise de variância foram considerados apenas os promissores, isto é, os compostos que apresentaram halos de inibição superiores a 10 mm (em negrito). Como se pode observar na tabela 3, foram classificadas como promissoras as diaminas 1a e 4a, ambas nas concentrações S1, S2 e S3; 2a, 2a", 3b e 4a, todas nas concentrações S1 e S2; e 3a nas concentrações S2 e S3. Nenhum alminoálcool apresentou halo de inibição do crescimento micelial de *M. fructicola* acima de 10 mm, assim como as diaminas 1b; 9a; 9b; 10a e 10b, nas três diferentes concentrações.

Os halos obtidos no composto 1a, nas concentrações S1 (27,2 mm) e S2 (24,7 mm), não diferiram estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) e foram superiores ao controle positivo (halo de 20,6 mm), assim como o halo apresentado no composto 4a, na concentração S1 (27,3 mm).

Entre os promissores, menores halos foram proporcionados pelos tratamentos 2a (concentração S2, com 14,1 mm), 2a" (concentrações S1, S2, respectivamente, com 10,6 mm e 11,0 mm), 3a (concentração S3, com 12,4 mm), 3b (concentrações S1 e S2, respectivamente, com 11,7 mm e 12,0 mm) e 4a (concentrações S1 e S2, respectivamente, com 11,1 mm e 12,0 mm). Entre eles não foi verificada diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Por meio dos resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Inibitória Mínima de 50 %, fornecidos na tabela 3, se observa que os compostos 1a, 2a e 4a derivados de diaminas apresentaram os melhores resultados para a CIM de 22,27; 31,38 e 20,81 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, respectivamente, e também para o IC_{50} (1a: 10,70 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 2a: 9,95 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e 4a: 10,19 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) e, portanto, foram selecionados para os testes *in vivo*.

Na figura 7, é possível observar que após seis dias de incubação, a colônia de *M. fructicola* completa seu crescimento na placa de Petri, permitindo a visualização do halo de inibição dos compostos 1a, 2a e 4a nas três concentrações S1, S2 e S3 (Figura 7d, e, f, g, h, i, j, k, e l), assim como o controle positivo captan (Figura 7c), diferentemente do controle negativo (Figuras 7a e b) onde, além da ausência de halo, foi possível visualizar o aspecto esporulante do fungo.

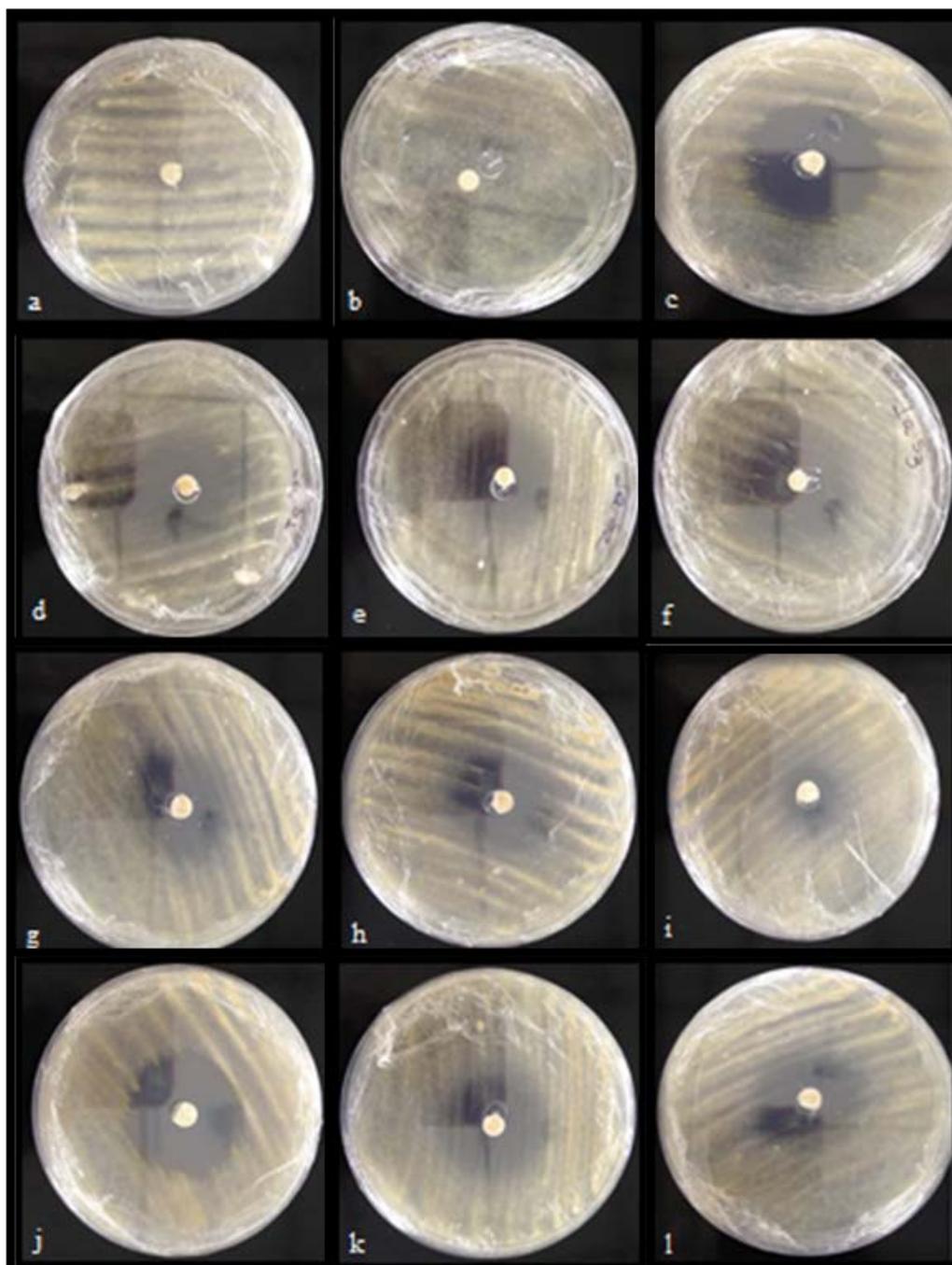


Figura 7 - Placas de Petri com colônias de *Monilinia fructicola* em meio de cultura batata, dextrose e ágar no sétimo dia de incubação a $28^{\circ}\text{C}\pm 2$. Halos de inibição produzidos pelo controle negativo (a e b), controle positivo captan (c), compostos/concentração 1a/S1(d), 1a/S2 (e) e 1a/S3 (f); 2a/S1 (g), 2a/S2 (h), 2a/S3 (i), 4a/S1 (j), 4a/S2 (k) e 4a/S3 (l).

5.4. Microscopia óptica

A figura 8 fornece a microscopia de luz de *M. fructicola* frente aos compostos 1a, 2a e 4a nas concentrações S1, S2, S3; ao captan e ao DMSO.

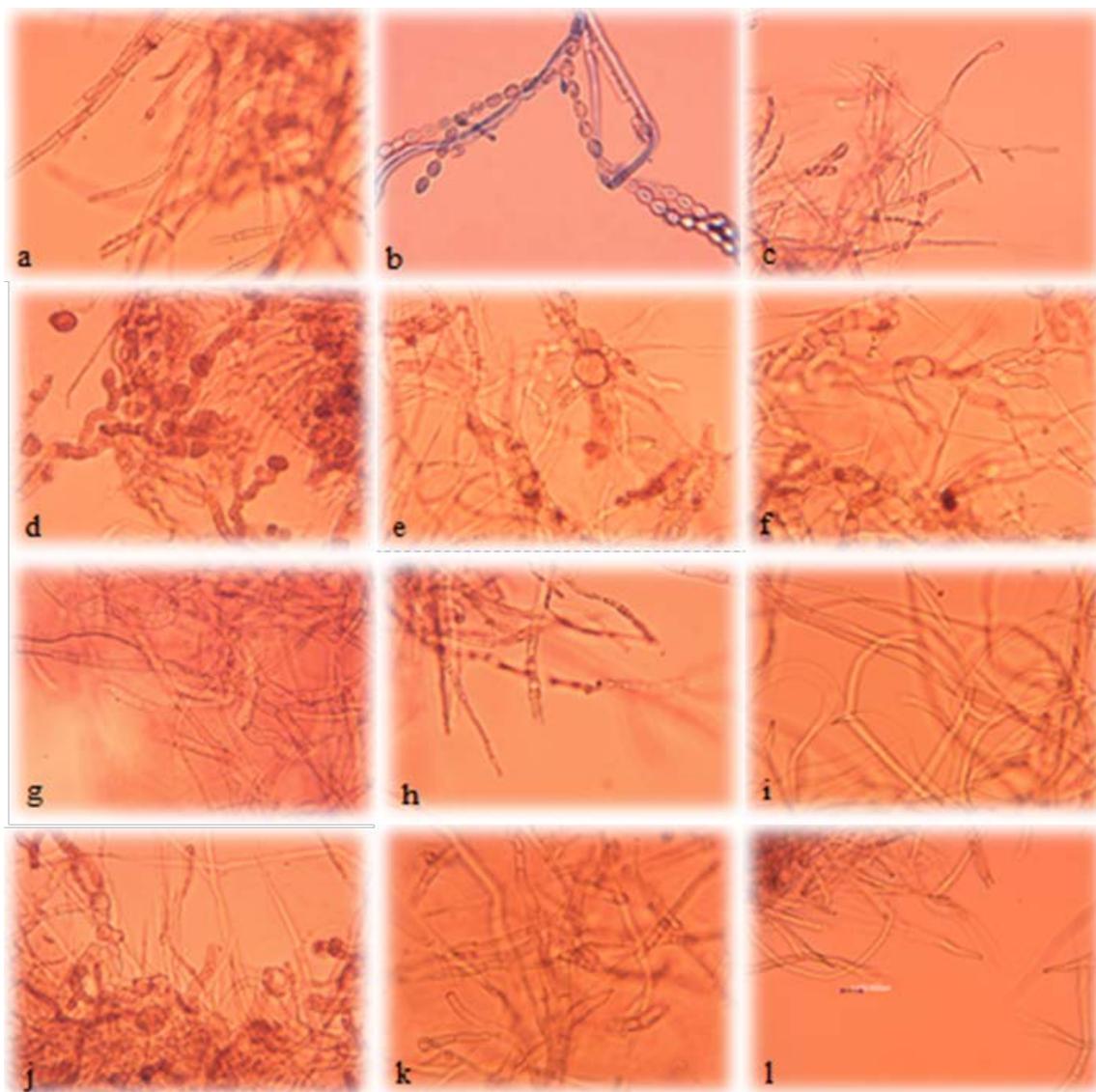


Figura 8 - Microfotografias de luz de *Monilinia fructicola*, após sete dias de incubação, a $28^{\circ}\text{C}\pm 2$. Aspecto de micélio e esporos do fungo tratado pelos controle negativo (a e b), controle positivo captan (c), compostos/concentrações 1a/S1(d), 1a/S2 (e) e 1a/S3 (f); 2a/S1 (g), 2a/S2 (h), 2a/S3 (i), 4a/S1 (j), 4a/S2 (k) e 4a/S3 (l). Hifas hialinas com crescimento e desenvolvimento normal e esporulação (a e b); Hifas com início de engrossamento na extremidade (c); Hifas modificadas, mostrando estruturas anômalas, com brotamentos e excesso de pigmentação (d, e, f, g, h, j, k e l). Barra 10.000 μm .

Os compostos 1a, 2a e 4a derivados de diaminas, em suas três concentrações, provocaram alterações morfológicas na produção de micélio e esporulação de *M. fructicola*, como hifas distorcidas, dilatadas, curtas, escuras e falta de conidiação, como se observa nas

figuras 8 (d, e, f, g, j, k e l). Essa mudança foi mais evidente nos compostos diaminas 1a e 4a, na concentração S1, onde o excesso de pigmentação e alteração das hifas foram intensos, chegando a produzir estruturas arredondadas nas extremidades e ao longo das hifas, similares a estromas e escleródios. Comportamento esse muito distante do apresentado nas micrografias das Figuras 8a e 8b, onde pode-se observar hifas hialinas septadas com estrutura da célula regular, citoplasma homogêneo e conídios abundantes, claramente visíveis, limoniformes, produzidos em cadeias longas.

5.5. Microscopia eletrônica de transmissão

A micrografia eletrônica de transmissão dos cortes ultrafinos das células de conídios e conidióforos não tratados de *M. fructicola* (controle negativo), são apresentados na Figura 9.

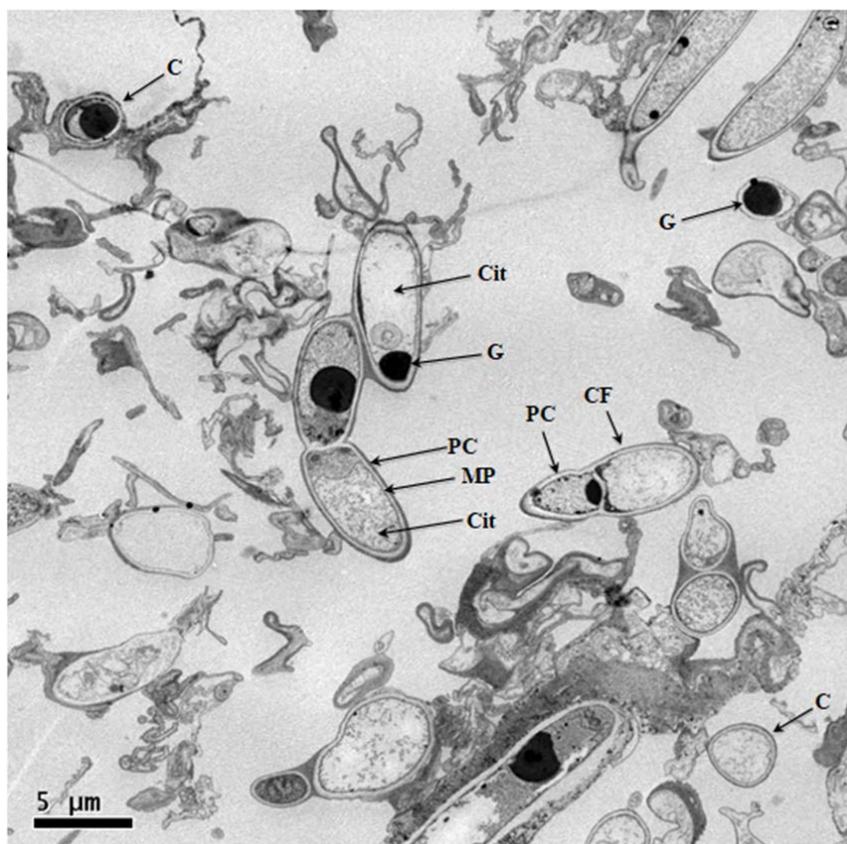
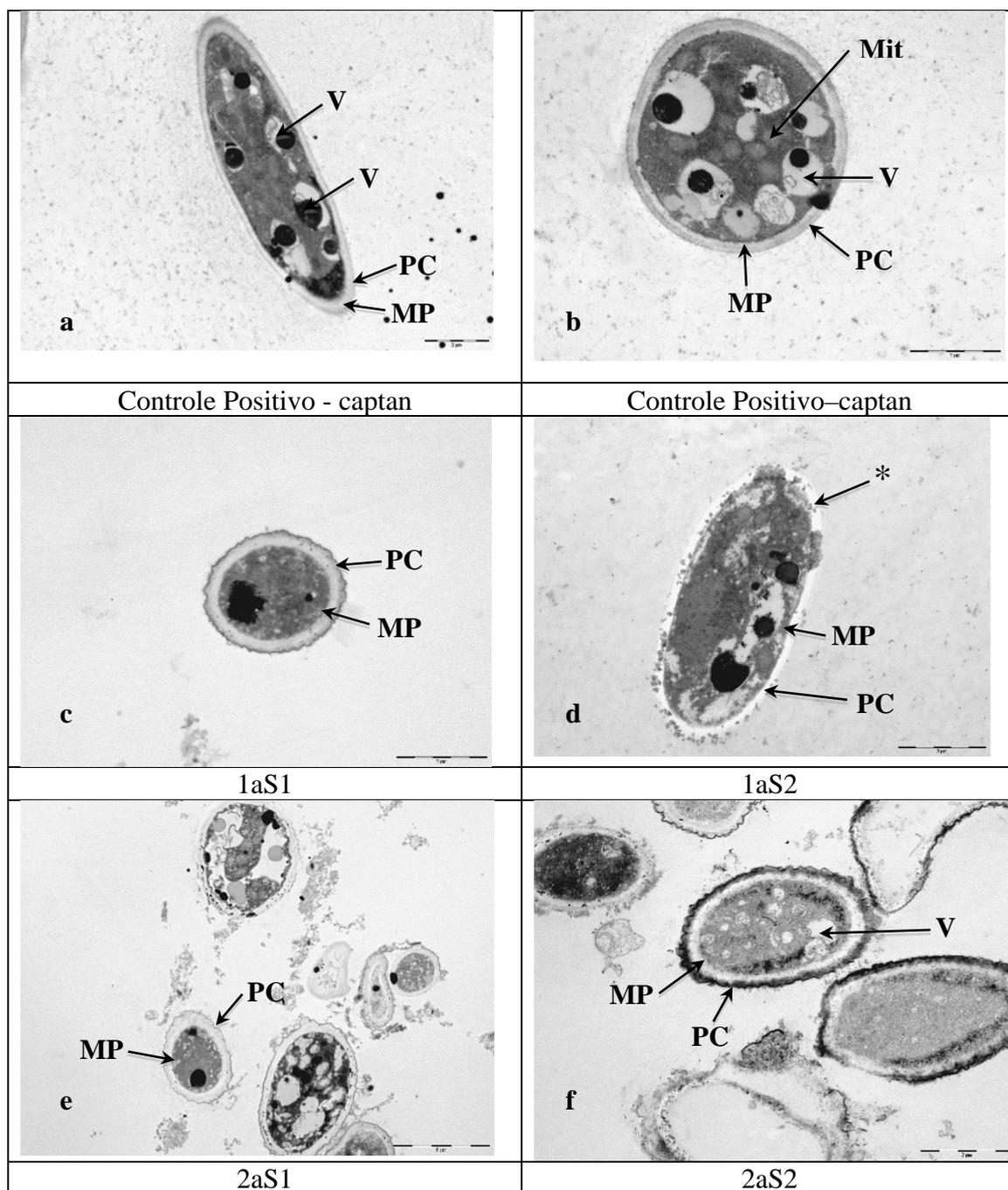


Figura 9 - Micrografia eletrônica de transmissão de seção ultrafina de conídios (C) e conidióforos (CF) não tratados (controle negativo) de *Monilinia fructicola*, mostrando: membrana plasmática (MP); parede celular (PC); grânulos eletrondensos (G) e citoplasma (Cit).

Os conídios e conidióforos de *M. fructicola*, sem tratamento, apresentaram parede celular com formato regular, plasmalema e matriz citoplasmática com núcleo e mitocôndria

(Figuras 9 e 11a). Além disso, grânulos eletrondensos únicos e em formato esférico foram também observados em algumas células de conídios e conidióforos.

As células de *M. fructicola* tratadas com o controle positivo captan e com as diaminas 1a, 2a e 4a, nas concentrações S1 e S2, apresentaram alterações ultraestruturais, quando comparadas às células sem tratamento. Essas alterações foram observadas, sobretudo na parede celular; na quantidade de vacúolos; na densidade do conteúdo celular; e na quantidade e tamanho dos grânulos eletrondensos (Figura 10).



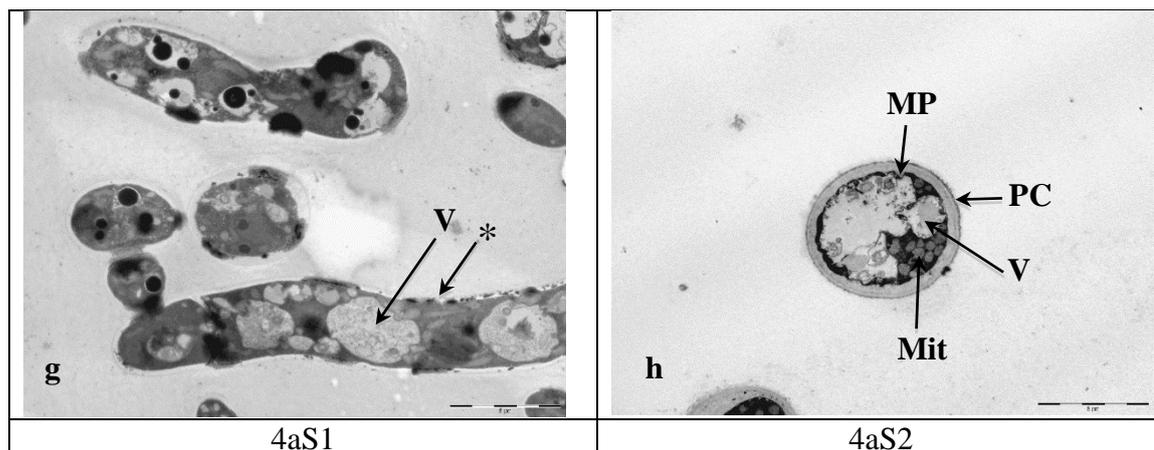


Figura 10 - Micrografia eletrônica de transmissão de secção ultrafina de conídios e conidióforos de *Monilinia fructicola* tratados com o fungicida captan (controle positivo) (a e b) e as concentrações (S1 e S2) das diaminas 1a, 2a, e 4a (c, d, e, f, g, h), mostrando: membrana plasmática (MP); parede celular (PC), núcleo (N), mitocôndria (Mit), vacúolo (V) e região com MP dissociada (*).

Outra observação nas células tratadas com as diaminas, diz respeito a ausência ou falta de definição de organelas, ao contrário do que foi observado nas células do controle positivo e negativo. É possível visualizar com definição as mitocôndrias, vacúolo e o núcleo (Figuras 10a, 10b e 11a). No entanto, nas células de *M. fructicola* tratadas com a diamina 4a na concentração S2 foi possível observar a presença de mitocôndrias (Figura 11b).

Na Figura 11 pode-se comparar os aspectos ultraestruturais da célula não tratada com uma tratada com o composto 4aS2. Observa-se que o controle negativo possuía núcleo com forma esférica e citoplasma matricial uniformemente distribuído com a presença de mitocôndrias e vacúolos; parede celular é uniforme, tanto na sua espessura quanto em seu aspecto (lisa). O citoplasma era contínuo e uniforme (Figura 11a).

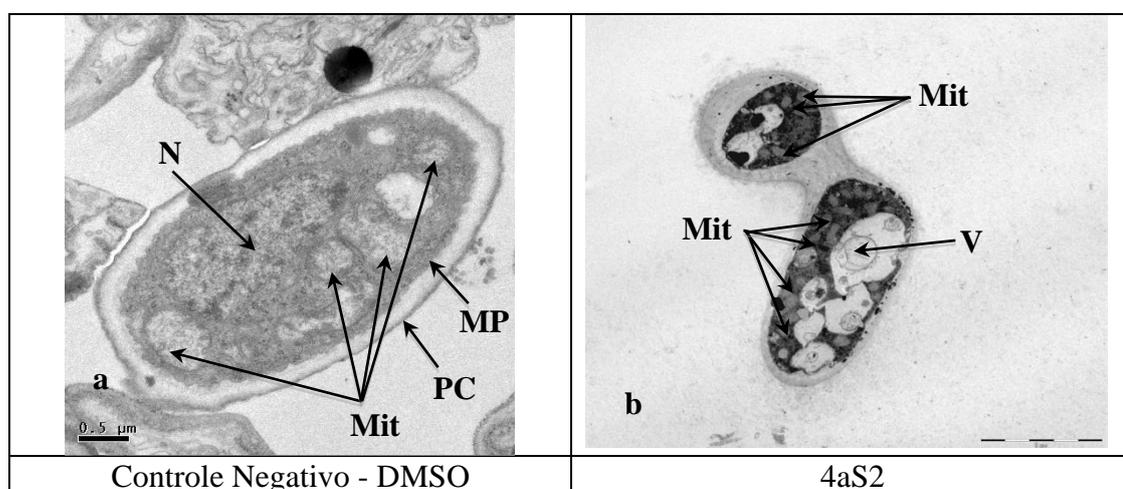


Figura 11 - Micrografia eletrônica de transmissão de secção ultrafina de conídios e conidióforos de *Monilinia fructicola* não tratados (a) e tratados com a diamina 4a na concentração S2 (b), mostrando: membrana plasmática (MP); parede celular (PC), núcleo (N), mitocôndria (Mit) e vacúolo (V).

Nas células tratadas, de maneira geral, foi observada maior densidade no seu conteúdo, aparentando estarem mais escuras do que o conteúdo das células não tratadas. Além disso, um maior número de vacúolos foi observado nas células tratadas e, na sua maioria, esses vacúolos estavam associados à presença de grânulos eletrondensos no seu interior (Figura 11b).

Em relação à parede celular, pode-se observar uma ondulação da sua estrutura externa, tanto na célula tratada com controle positivo (captan) quanto nas tratadas com diaminas (Figuras 12b, 12c, 12d e 12e), em comparação com a não tratada (Figura 12a), que sempre apresentou aparência lisa e contínua. Esta ondulação foi recorrente nas diferentes concentrações e, em alguns casos, observou-se a dissociação da parede celular (Figura 10d e 10g).

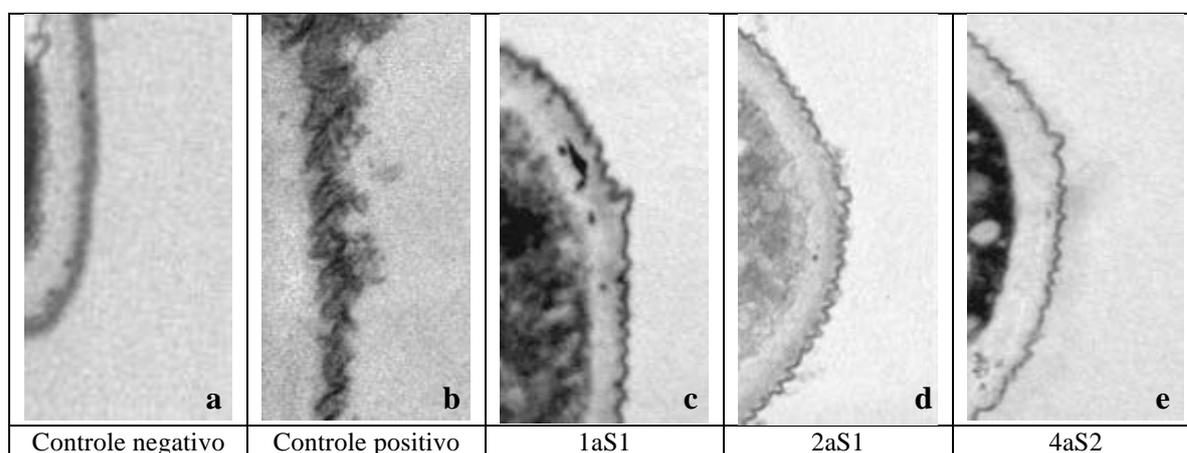


Figura 12 - Micrografia eletrônica de transmissão de secção ultrafina de conídios de *Monilinia fructicola*, não tratados e tratados, mostrando detalhe da ondulação da parede celular. a-controle negativo; b- captan; c-1aS1; d-2aS1; e-4aS2.

5.6. Avaliação do controle da podridão-parda em flores de pessegueiro

Quando se observa o aspecto das flores de pessegueiro cv. Chiripá, após três dias de incubação, é possível constatar que no controle negativo se evidencia uma maior incidência da podridão parda, causada por *M. fructicola*, comparando-se aos demais tratamentos (controle positivo e compostos 4a e 1a) nas fases de flor aberta e de queda de pétala, como pode ser observado na Figura 13.

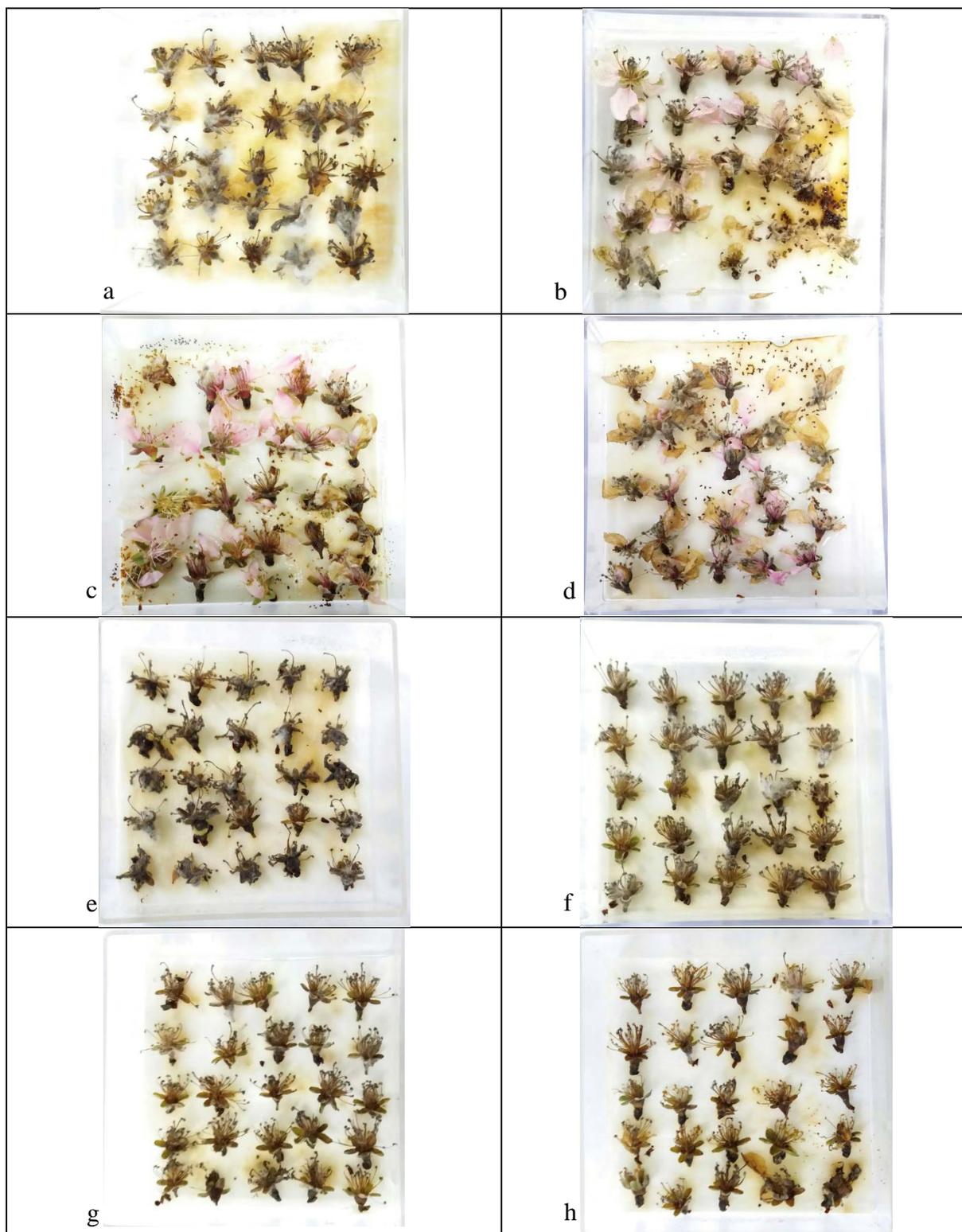


Figura 13 - Avaliação de podridão parda em flores de pessegueiro nos estágios de abertura flor aberta (a,b,c e d) e queda de pétalas (e, f, g e h). Controle negativo (a e e), positivo (b e f) e compostos 1a (c e g) e 4a (d e h). As flores foram armazenadas por três dias a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (no escuro), e por mais três dias a 4°C (com luz).

De acordo com a Tabela 4, quanto ao controle da podridão-parda, o patógeno apresentou maior ocorrência na fase de flor aberta comparado com a fase de queda de pétala.

O composto 4a apresentou incidência similar ao fungicida captan, diferindo, significativamente, em ambas as fases, do controle negativo ($p \leq 0,05$, pelo teste Tukey). O composto 1a teve desempenho inferior na fase flor aberta, quando comparado ao composto 4a e ao fungicida captan. No entanto, na fase de queda de pétala apresentou comportamento que diferiu apenas do controle negativo.

A análise estatística feita para comparar os tratamentos em cada fase de abertura floral, foi usada para verificar o efeito dos compostos 1a, 4a, e dos controles positivo e negativo (Tabela 4) na incidência da podridão-parda.

Tabela 4 - Incidência (%) de *Monilinia fructicola* em pessegueiros cv. Chiripá, nas fases flor aberta e queda de pétalas, após serem submetidos aos tratamentos por aspersão com: captan, compostos 1a e 4a e água. As flores foram armazenadas por três dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (no escuro), e por mais três dias a 4°C (com luz).

Tratamentos	Incidência (%)	
	Flor aberta	Queda de pétalas
Captan	28,0c	25,00c
Composto 4a	30,5c	25,00c
Composto 1a	45,5b	29,50b
Água	58,0a	48,00a
CV (%)	9,83	14,12

Médias seguidas pela mesma letra não possuem diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

5.7. Avaliação do controle da podridão-parda do pêssgo em pós-colheita

5.7.1. Incidência

5.7.1.2. Ensaio Composto 4a

A incidência e a área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) da podridão-parda em pêssgos submetidos aos tratamentos, são apresentadas, respectivamente, nas figuras 14 e 15 para o composto 4a.

A figura 14 demonstra que a incidência da doença foi de 50 % no quinto dia de avaliação dos frutos quando tratados com composto 4a (aspergido e imerso). Nos controles positivo e negativo, o surgimento de lesões da doença iniciou-se no segundo dia. No terceiro dia, apresentaram 56,25 % e 75,00 % de incidência, respectivamente, para o captan imerso e captan aspergido. Os frutos controle chegaram a 93,75 % no quarto dia de avaliação.

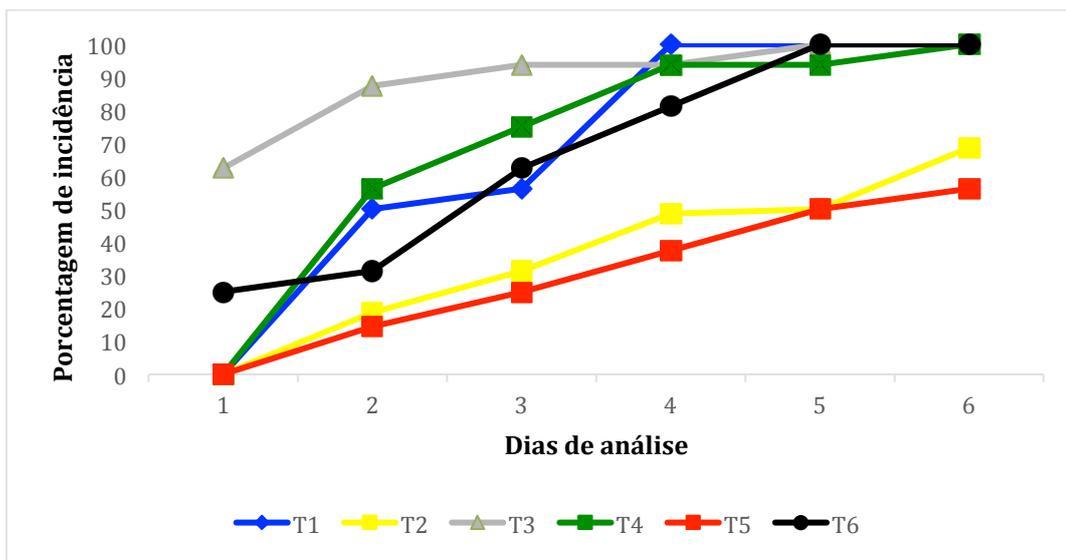


Figura 14 - Incidência da podridão-parda (% de frutos doentes) em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan (T1), composto 4a (T2) e água (T3) e aspersão em captan (T4), composto 4a (T5) e água (T6). Os frutos permaneceram armazenados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}/80 - 90\%$ UR por seis dias.

Ocorreu diferença dos valores da AACPD quando se avaliou a incidência da podridão-parda (Figura 15 e Tabela 5) ($p \leq 0,05$). Os melhores valores foram apresentados pelo composto 4a, tanto imerso quanto aspergido, com AACPD de 183,1 e 155,07, respectivamente (Tabela 5).

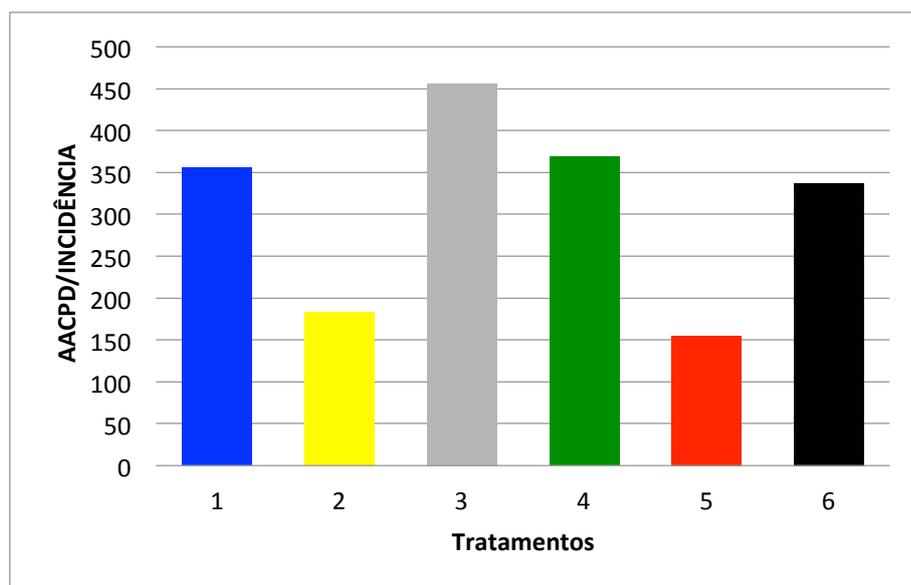


Figura 15 - AACPD - Área abaixo da curva de progresso da doença/Incidência da podridão-parda em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan (1), composto 4a (2) e água (3) e aspersão em captan (T4), composto 4a (5) e água (6) e inoculados com *Monilinia fructicola*. Os frutos permaneceram armazenados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}/80 - 90\%$ UR por seis dias.

Foram observados sintomas de podridão-parda em todos os tratamentos. No entanto, os frutos onde houve aplicação do composto 4a imerso e aspergido apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) quando comparados ao captan e ao controle negativo, em relação à incidência e à AACPD (Tabela 5).

Tabela 5 - Incidência da podridão-parda (% de frutos doentes) e AACPD (Área abaixo da curva de progresso da doença) em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan (1), composto 4a (2) e água (3) e aspersão em captan (4), composto 4a (5) e água (6). Os frutos permaneceram armazenados a $25 \pm 1^\circ\text{C}/80 - 90\%$ UR por seis dias.

Tratamentos		Incidência (%)	AACPD
Imersão	captan	100,00a	356,25
	4a	68,75b	183,10
	água	100,00a	456,25
Aspersão	captan	100,00a	368,75
	4a	56,25b	155,07
	água	100,00a	337,50
CV (%)		22,04	

Médias seguidas pela mesma letra não possuem diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey. CV: coeficiente de variação.

A Figura 16 ilustra o aspecto dos frutos após seis dias de tratamento com presença de lesões causadas por *M. fructicola*.



Figura 16 - Aspecto de pêssegos cv. Chiripá, após seis dias de tratamento. Comparativo entre fungicida captan aspersão (a) e imersão (c) e controle negativo imersão (b) e aspersão (d) e entre composto 4a aspersão (e) e imersão (g) e controle negativo imersão (f) e aspersão (h).

No aspecto dos frutos após seis dias de avaliação é possível comprovar a eficiência do composto 4a no controle das lesões espontâneas causadas por *M. fructicola*. Os frutos tratados com o fungicida e o grupo controle apresentaram-se tomados pela doença (Figura 16).

5.7.1.3. Ensaio Composto 1a

O composto 1a, assim como observado com o composto 4a (Tabela 5) quanto ao efeito na incidência da podridão parda, proporcionou resultados mais promissores dos que os apresentados pelo fungicida captan, como pode ser observado na Figura 17 e na Tabela 6. No entanto, no sexto dia de avaliação todos os frutos apresentaram lesões de *M. fructicola*, como pode ser observado na Figura 19.

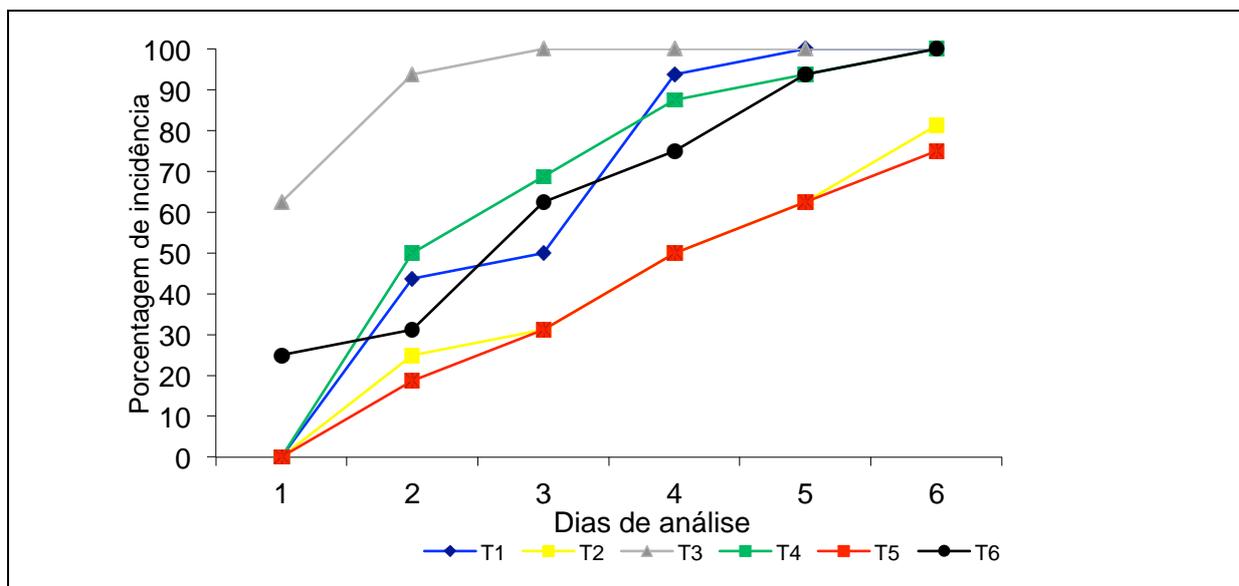


Figura 17 - Incidência da podridão-parda (% de frutos doentes) em pêsegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan (T1), composto 1a (T2) e água (T3); e aspersão em captan (T4), composto 1a (T5) e água (T6). Os frutos permaneceram armazenados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ / 80 – 90% UR por seis dias.

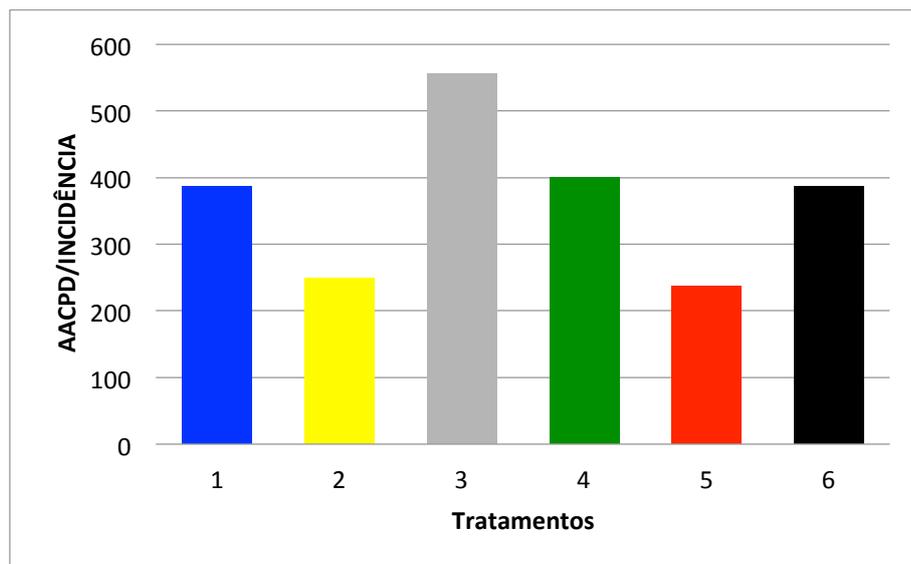


Figura 18 - AACPD - Área abaixo da curva de progresso da doença/Incidência da podridão-parda em pêesegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan (1), composto 1a (2) e água (3); e aspersão em captan (4), composto 1a (5) e água (6) e inoculados com *Monilinia fructicola*. Os frutos permaneceram armazenados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}/80 - 90\%$ UR por seis dias.



Figura 19 - Aspecto de pêesegos cv. Chiripá, após seis dias de tratamento. Comparativo entre fungicida captan aspersão (a) e imersão (c), controle negativo imersão (b) e aspersão (d), composto 1a aspersão (e) e imersão (g) e controle negativo imersão (f) e aspersão (h).

A área abaixo da curva de progresso da doença também foi menor na incidência da podridão parda entre os frutos tratados com o composto 1a e os que foram submetidos ao fungicida captan e controle negativo (Tabela 6 e Figura 18).

Tabela 6 - Incidência da podridão-parda (% de frutos doentes) e AACPD (Área abaixo da curva de progresso da doença) em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan, composto 1a e água; e aspersão em captan, composto 1a e água. Os frutos permaneceram armazenados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}/80 - 90\%$ UR por seis dias.

Tratamentos		Incidência (%)	AACPD
Imersão	captan	100,00a	387,50
	1a	81,25b	250,00
	água	100,00a	556,25
Aspersão	captan	100,00a	400,00
	1a	75,00b	237,50
	água	100,00a	387,50
CV (%)		20,20	

Médias seguidas pela mesma letra não possuem diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey. CV: coeficiente de variação.

5.7.2. Severidade

5.7.2.1. Ensaio Composto 4a

As figuras 20 e 21 ilustram os resultados obtidos e relacionados à severidade e a área abaixo da curva de progresso da doença/Severidade da podridão-parda nos pêssegos cinco dias após serem submetidos aos tratamentos.

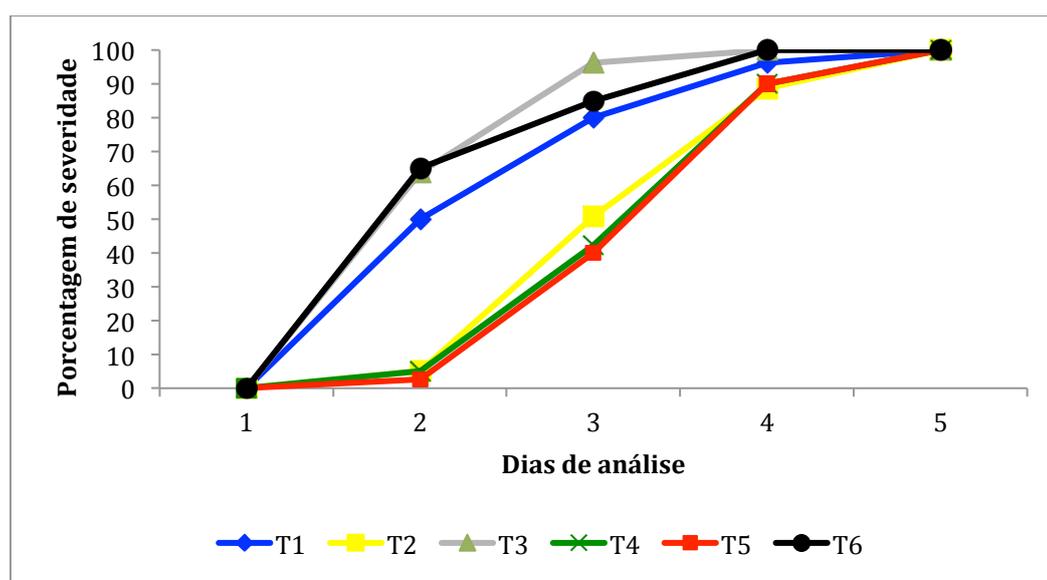


Figura 20 - Severidade da podridão-parda (lesão em cm) em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos: imersão em captan (T1); composto 4a (T2); água (T3) e aspersão em captan (T4); composto 4a (T5); água (T6) e inoculados com *Monilinia fructicola*. Os frutos permaneceram armazenados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}/80 - 90\%$ UR por cinco dias.

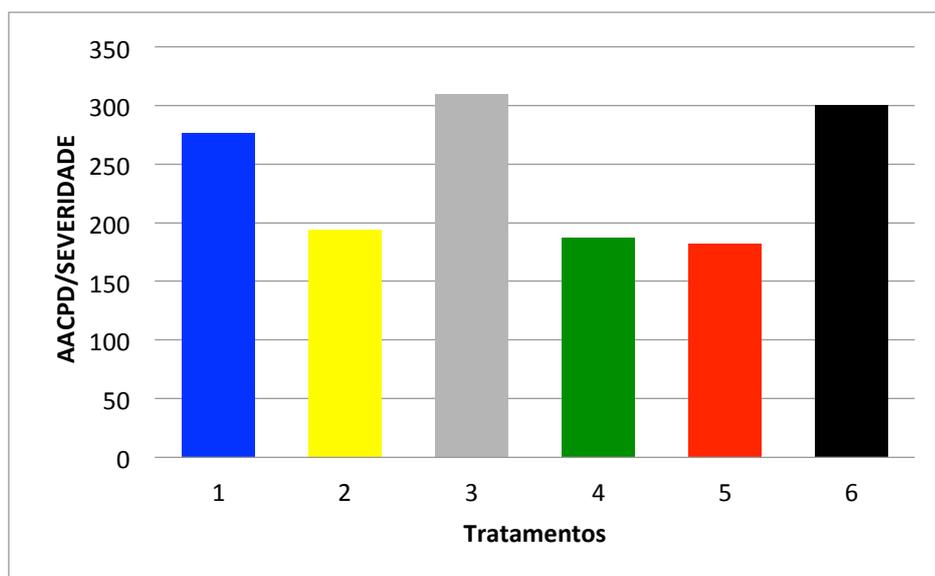


Figura 21 - AACPD - Área abaixo da curva de progresso da doença/Severidade da podridão-parda em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan (1), composto 4a (2) e água (3); e aspersão em captan (4); composto 4a (5) e água (6), e inoculados com *Monilinia fructicola*. Os frutos permaneceram armazenados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}/80 - 90\%$ UR por cinco dias.

A severidade da doença nos frutos de pêssego inoculados com *M. fructicola* e tratados com o composto 4a no terceiro dia após a inoculação foi de 50,75 % para imersão e 40,00 % para aspersão (Figura 20).

Tabela 7 - Severidade da podridão-parda (% de frutos doentes) em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan, composto 4a e água; e aspersão em captan, composto 4a e água. Os frutos permaneceram armazenados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}/80 - 90\%$ UR, após quatro dias.

Tratamentos		Severidade (%)	AACPD
Imersão	captan	96,92a,b	276,25
	4a	88,88b	194,50
	água	100,00a	310,00
Aspersão	captan	90,00b	187,25
	4a	90,00a,b	182,50
	água	100,00a	300,00
CV (%)		5,52	

Médias seguidas pela mesma letra não possuem diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey. CV: coeficiente de variação.

Os frutos sem tratamento apresentaram severidade da doença alta a partir do segundo dia de avaliação, assim como os que foram imersos no fungicida captan. Pode-se afirmar, que apesar do composto 4a não ter controlado a doença da podridão-parda, ele atrasou o seu desenvolvimento em três dias, assim como o controle positivo quando aspergido. Houve

diferença significativa apenas entre os tratamentos com o composto 4a e captan e o controle negativo tanto aspergido como imerso.

A figura 22 contém a aparência dos pêsegos após serem submetidos aos tratamentos após quatro dias de inoculação de *M. fructicola* e tratados com fungicida captan (imersão) e composto 4a (imersão e aspersão) e imersas e aspergidas com água.

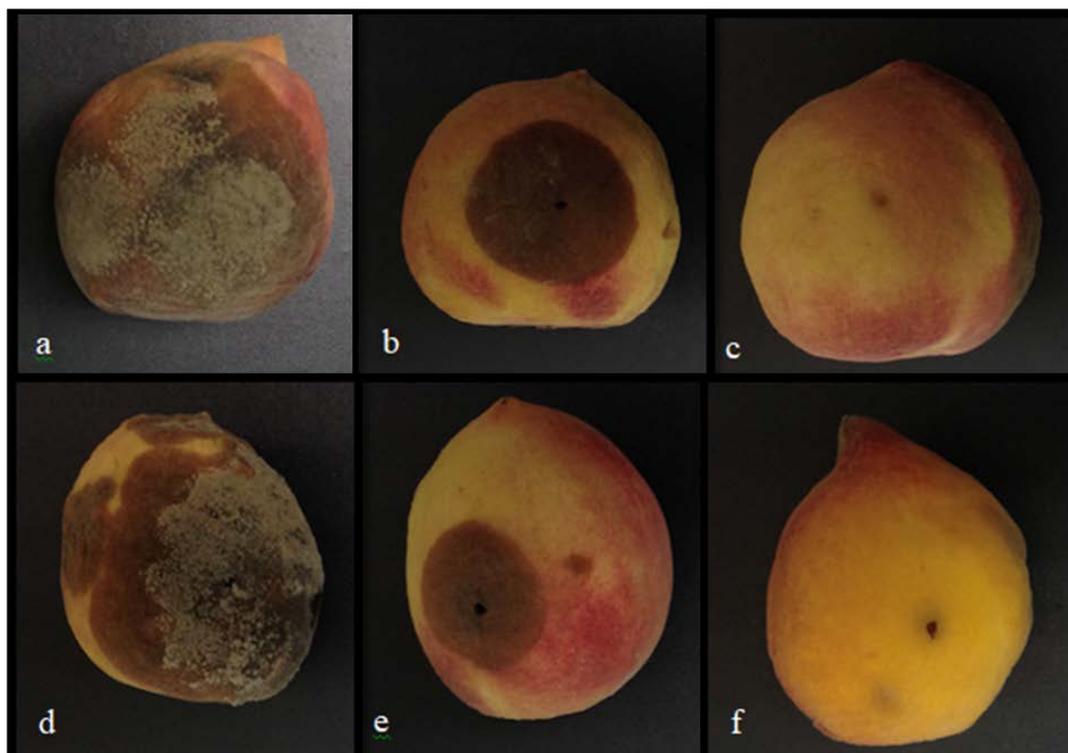


Figura 22 - Frutos de pêsego cv. Chiripá após quatro dias de inoculação de *Monilinia fructicola*, tratados com fungicida captan imersão (b) e aspersão (e), composto 4a imersão (c) e aspersão (f), e imersas (a) e aspergidas (d) com água.

Além do avançado desenvolvimento da doença, é possível observar também a intensa esporulação de *M. fructicola* na superfície dos frutos de pêsegos com água (Figura 22 a e d). O fungicida captan retardou o desenvolvimento da doença e as estruturas reprodutivas do fungo não estavam presentes no quarto dia após a inoculação (Figura 22 b e e). Os frutos tratados com o composto 4a quando aspergido ou imerso não apresentavam a doença (Figura 22 c e f).

A Figura 23 contém a aparência dos pêsegos depois de serem submetidos aos tratamentos após seis dias de inoculação de *M. fructicola* e tratados com fungicida captan (imersão), composto 4a (imersão e aspersão) e água imersas e aspergidas.

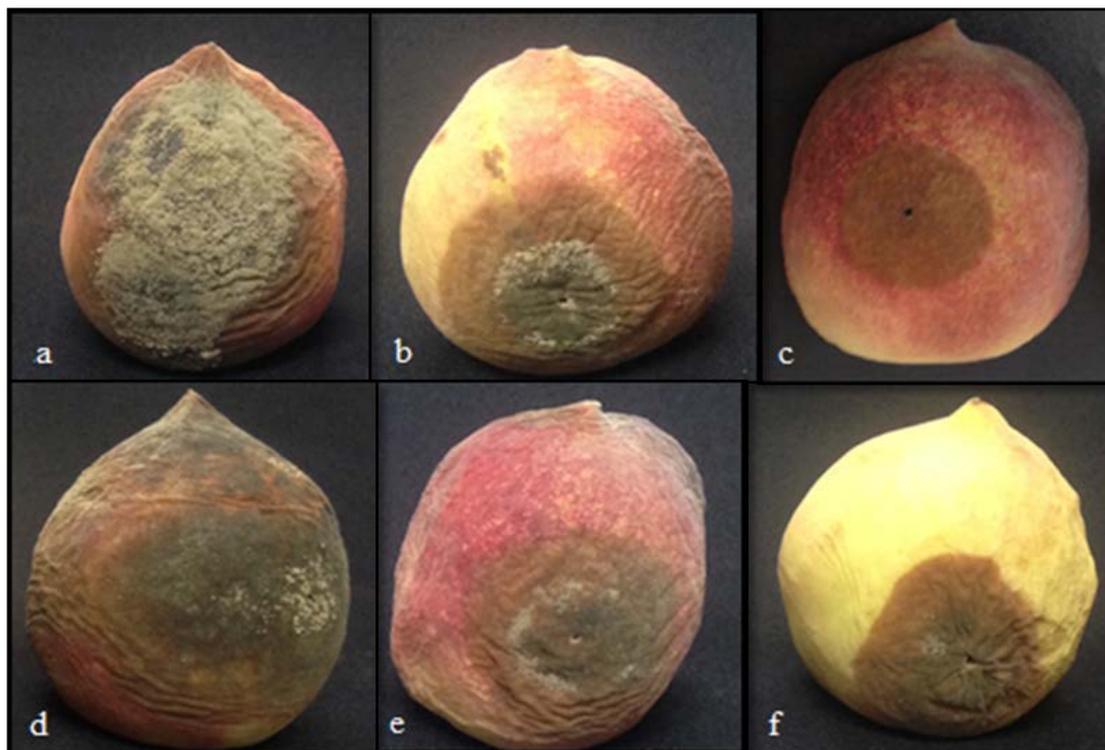


Figura 23 - Frutos de pêssgo Chiripá após seis dias de inoculação de *Monilinia fructicola*, tratados com fungicida captan imersão (b) e aspensão (e), composto 4a imersão (c) e aspensão (f), e imersas (a) e aspergidas (d) com água.

Após seis dias de inoculado, o fungo *M. fructicola* conseguiu desenvolver-se em todos os frutos. Os pêssgos tratados com o composto 4a apresentaram típicas lesões da podridão-parda (Figura 23).

5.7.2.2. Ensaio Composto 1a

O composto 1a apresentou comportamento inferior ao 4a, em relação a severidade da *M. fructicola*, e novamente nenhum dos tratamentos foi capaz de inibir o desenvolvimento da doença totalmente (Figura 24). Também mostrou-se inferior ao fungicida captan quando aspergido e superior a este quando imerso.

No quarto dia de avaliação os frutos tratados com o composto 1a aspergidos já apresentavam 93,5 % de severidade, valor esse superior ao captan aspergido no mesmo período.

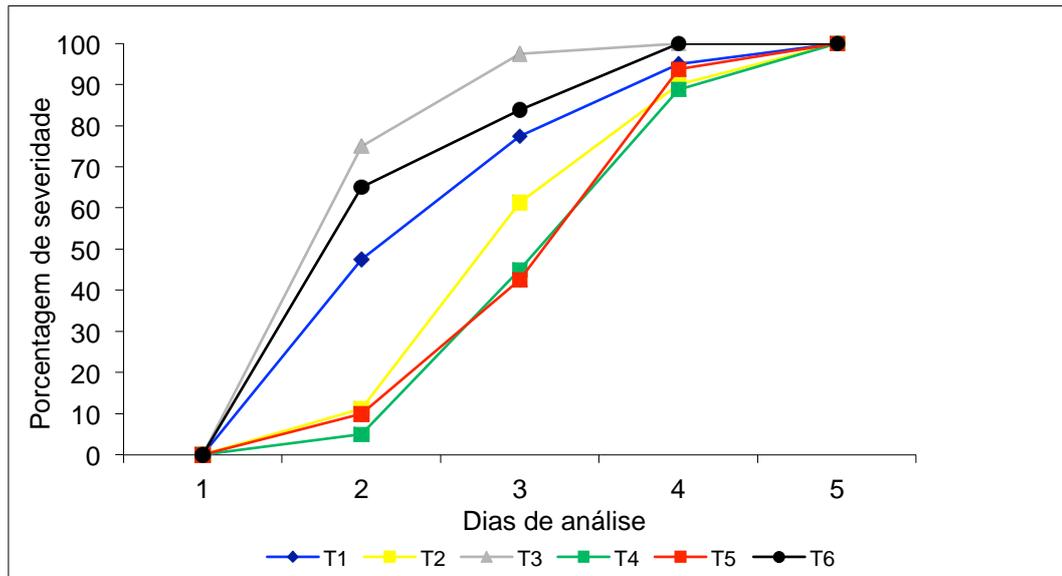


Figura 24 - Severidade da podridão-parda (lesão em cm) em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos: imersão em captan (T1), composto 1a (T2) e água (T3) e aspersão em captan (T4), composto 1a (T5) e água (T6), e inoculados com *Monilinia fructicola*. Os frutos permaneceram armazenados a $25\pm 1^\circ\text{C}/80 - 90\%$ UR por cinco dias.

Para os frutos inoculados com *M. fructicola* os tratamentos captan aspergido e composto 1a aspergido e imerso, apresentaram os menores valores de AACPD para severidade, figura 24.

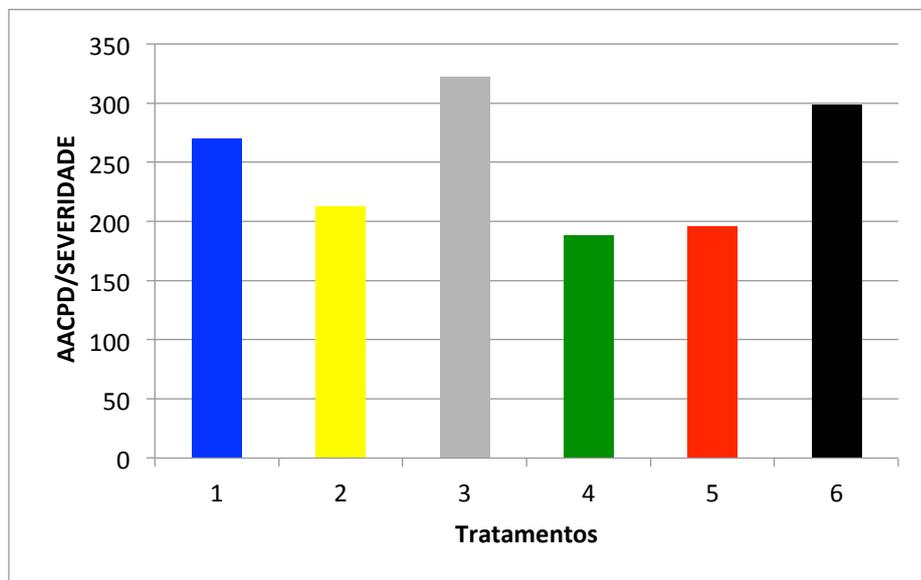


Figura 25 - AACPD - Área abaixo da curva de progresso da doença/Severidade da podridão-parda em pêssegos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan (1), composto 1a (2) e água (3) e aspersão em captan (4), composto 1a (5) e água (6), e inoculados com *Monilinia fructicola*. Os frutos permaneceram armazenados a $25\pm 1^\circ\text{C}/80 - 90\%$ UR por cinco dias.

Ao final do quinto dia de avaliação, o composto 1a quando aspergido e imerso apresentou severidade da doença com diferença significativa, considerando $p \leq 0,05$, pelo teste Tukey, apenas quando comparada aos frutos sem tratamento (Tabela 8).

Tabela 8 - Severidade da podridão-parda (% de frutos doentes) em pêsesgos cv. Chiripá, submetidos aos tratamentos com imersão em captan, composto 1a e água; e aspersão em captan, composto 1a e água. Os frutos permaneceram armazenados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ / 80 – 90% UR após quatro dias.

Tratamentos		Severidade (%)	AACPD
Imersão	captan	95,00a,b	270,00
	1a	90,00b	212,50
	água	100,00a	322,50
Aspersão	captan	88,60b	188,75
	1a	93,60a,b	196,25
	água	100,00a	298,75
CV (%)		4,57	

Médias seguidas pela mesma letra não possuem diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey. CV: coeficiente de variação.

A figura 26 apresenta o aspecto dos pêsesgos após quatro dias de inoculação, onde pode-se observar o desenvolvimento da doença em todos os frutos.

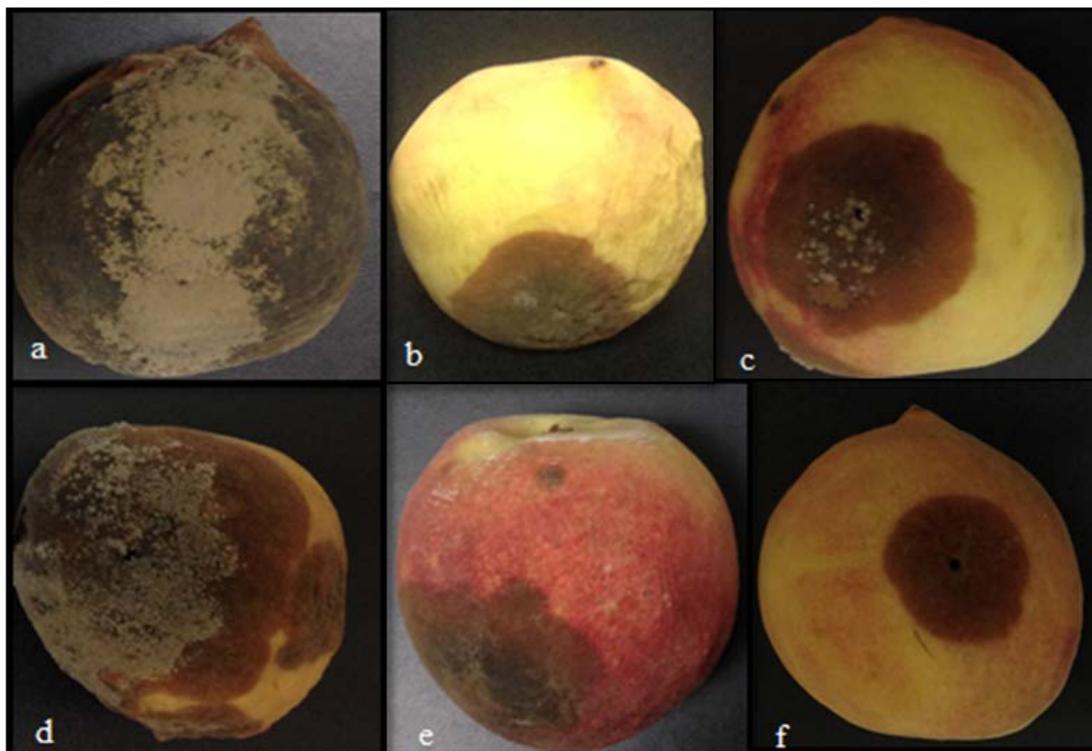


Figura 26 - Frutos de pêsego cv. Chiripá após quatro dias de inoculação de *Monilinia fructicola*, tratados com fungicida captan imersão (b) e aspersão (e), composto 1a imersão (c) e aspersão (f), e imersas (a) e aspergidas (d) com água.

5.8. Avaliações físicas-químicas dos pêssegos em pós-colheita

5.8.1. Perda de Massa Fresca

A Figura 27 fornece a perda de massa fresca de frutos de pêssegos cv. Chiripá, sem ferimento, submetidos aos tratamentos com imersão e aspensão em captan (controle positivo), composto 4a e água (controle negativo).

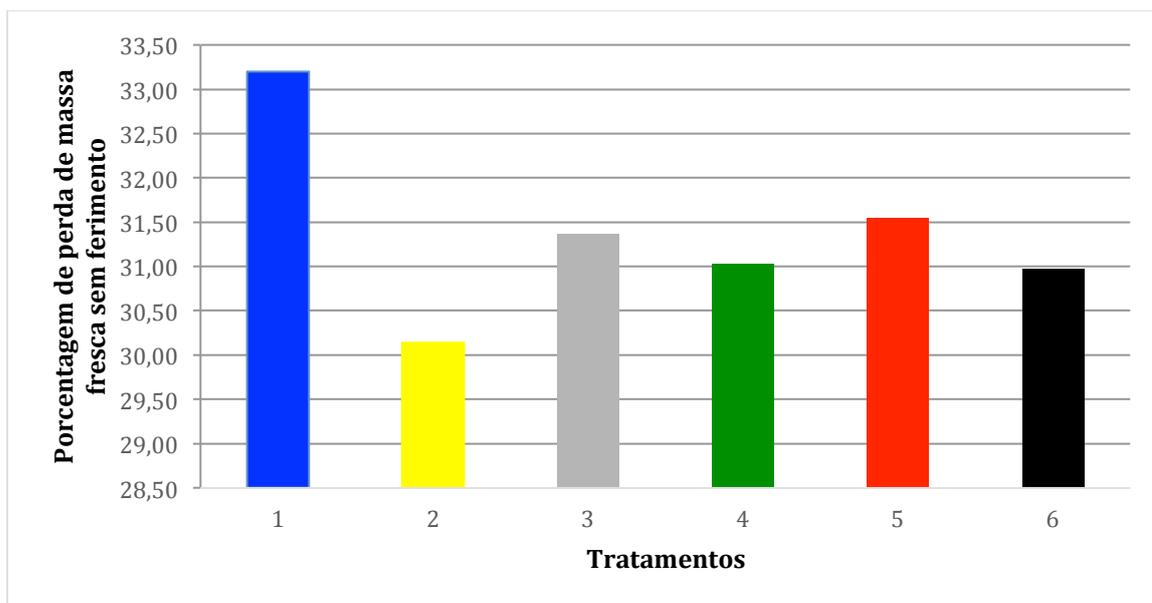


Figura 27 - Perda de massa fresca de frutos de pêssegos cv. Chiripá, sem ferimento, submetidos aos tratamentos com imersão em captan (1), composto 4a (2) e água (3); e aspensão em captan (4), composto 4a (5) e água (6), após seis dias de armazenamento.

A Tabela 9 fornece o resultado da análise estatística relacionada à comparação entre os tratamentos captan, composto 4a e água.

Tabela 9 - Perda de massa fresca de frutos de pêssegos cv. Chiripá, sem ferimento, submetidos aos tratamentos com imersão em captan, composto 4a e água; e aspensão em captan, composto 4a e água, após seis dias de armazenamento.

Tratamentos	Perda de massa (%)	Desvio padrão	
Imersão	captan	33,20a	1,972078
	4a	30,14a	4,195914
	água	31,36a	2,316592
Aspersão	captan	31,03a	1,936827
	4a	31,55a	4,836983
	água	30,97a	5,047144
CV (%)	3,57		

Médias seguidas pela mesma letra não possuem diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey. CV: coeficiente de variação.

De acordo com a Figura 27, a maior perda de massa (33,20 %) ocorreu quando foi aplicado o captan por imersão, enquanto o composto 4a provocou a menor porcentagem de perda (30,14 %). No entanto, após a comparação entre as médias na análise estatística, não foram verificadas diferenças significativas entre todos os tratamentos ao nível de 5 % pelo teste Tukey (Tabela 9).

Com relação ao ensaio utilizando o composto 1a, os dados constam na Figura 28 e na Tabela 10.

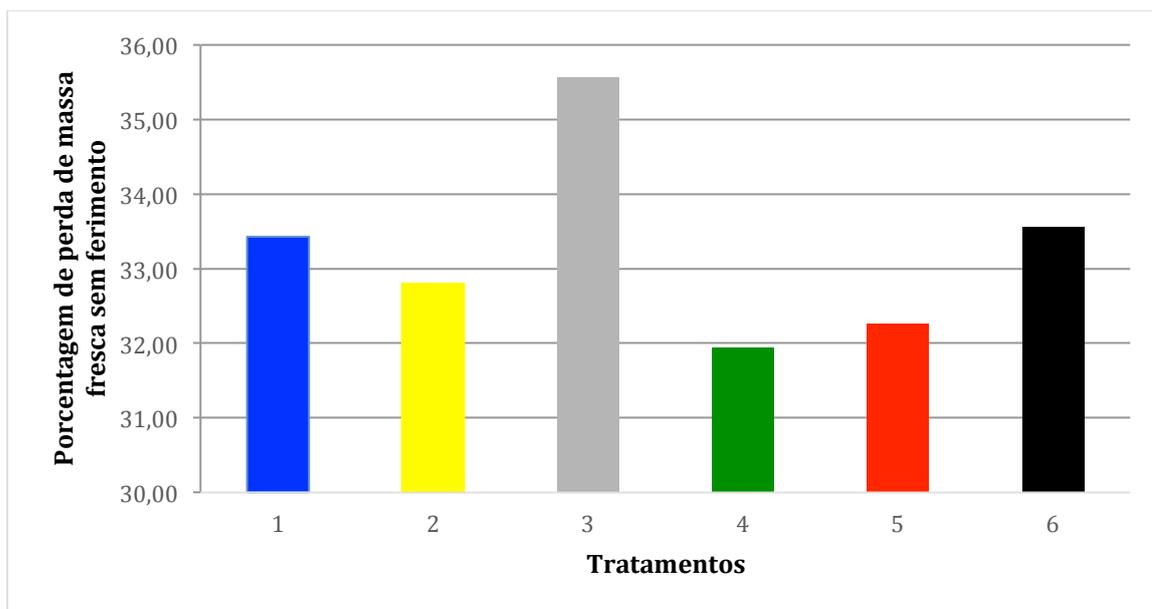


Figura 28 - Perda de massa fresca de frutos de pêssegos cv. Chiripá, sem ferimento, submetidos aos tratamentos com imersão em captan (1), composto 1a (2) e água (3); e aspersão em captan (4), composto 1a (5) e água (6), após seis dias de armazenamento.

A figura 28 demonstra que ocorreu maior perda de massa fresca com a água por imersão (35,57 %), enquanto que a menor perda foi provocada pelo composto 1a por aspersão (31,94 %).

Tabela 10 - Perda de massa fresca de frutos de pêssegos cv. Chiripá, sem ferimento, submetidos aos tratamentos com imersão em captan, composto 1a e água; e aspersão em captan, composto 1a e água, após seis dias de armazenamento.

Tratamentos		Perda de massa (%)	Desvio padrão
Imersão	captan	33,43a,b	1,852788
	1a	32,80b	1,322734
	água	35,57a	1,257537
Aspersão	captan	31,94b	0,783215
	1a	32,27b	1,063657
	água	33,56a,b	0,953555
CV (%)		3,57	

Médias seguidas pela mesma letra não possuem diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey. CV: coeficiente de variação.

Após a aplicação do teste Tukey ao nível de 5 % de significância, verificou-se que não houve diferença significativa entre a água, tanto em imersão quanto por aspersão, e o captan por imersão, isto é, os três tratamentos provocaram a maior perda de massa entre os pêssegos quando se analisa considerando o teste estatístico aplicado. Mesma conclusão pode ser obtida com relação aos tratamentos que provocara menor perdas, pois não foi verificada diferença significativa entre os seguintes tratamentos: captan e composto 1a, ambos por imersão ou aspersão, e água por aspersão.

5.8.2. Qualidade dos frutos

5.8.2.1 Ensaio com o composto 4a

A tabela 11 fornece as análises estatísticas referentes às características químicas quando se aplicou os tratamentos captan (controle positivo), composto 4a e água (controle negativo), tanto em imersão quanto em aspersão.

Tabela 11 - Características químicas de frutos de pêssegos cv. Chiripá, tempo de armazenamento e diferentes tratamentos, após serem submetidos aos tratamentos: captan, 4a e água, todos por imersão ou aspersão. Os frutos permaneceram armazenados a $25 \pm 1^\circ\text{C}/80 - 90\%$ UR por seis dias.

Parâmetro	Tratamentos, Média Geral e CV%		Tempo de Armazenamento (dias) ¹		
			2	4	6
SST (°BRIX)	Imersão	captan	12,00b	13,25a	15,25b,c
		composto 4a	12,25b	13,52a	14,25c
		água	14,25a	15,25a	16,50a,b
	Aspersão	captan	12,25b	13,55a	16,50a,b
		composto 4a	11,50b	13,82a	16,75a,b
		água	13,00a,b	14,50a	18,00a
		Média Geral	12,54	13,98	16,20
	CV%	6,84	6,74	4,66	
ATT (% de ác. cítrico)	Imersão	captan	0,65b	0,58b	0,58a,b
		composto 4a	0,80a	0,40d	0,41c
		água	0,52c	0,42d	0,41c
	Aspersão	captan	0,65b	0,65a	0,61a
		composto 4a	0,66b	0,54c	0,51b
		água	0,35d	0,31e	0,20d
		Média Geral	0,60	0,48	0,45
	CV%	4,92	2,89	6,98	
Ratio	Imersão	captan	18,35c	22,67c	26,28c
		composto 4a	15,22c	33,78a,b	34,15b,c
		água	27,39b	36,09a	40,00b
	Aspersão	captan	18,95c	18,47c	27,07c
		composto 4a	17,60c	25,60b,c	32,51b,c

		água	31,00a	41,95a	86,51a
	Média Geral		22,42	29,70	41,17
	CV%		8,77	13,45	9,00
pH	Imersão	captan	3,72c,d	4,01b,c,d	4,03c,d
		composto 4a	3,66d	3,72d	4,17c
		água	4,34a	4,56a	4,79a
	Aspersão	captan	3,93b	4,19b	4,49b
		composto 4a	3,97b	4,13b,c	4,28b,c
		água	3,84b,c	3,84cd	3,78d
		Média Geral	3,91	4,07	4,25
		CV (%)	1,65	3,71	2,72

¹. Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey em 5 % de probabilidade. CV: coeficiente de variação.

O teor de sólidos solúveis (SST) entre os tratamentos e nos períodos de armazenamento variou, sendo que após quatro dias de armazenamento não foi verificada diferença significativa nos teores entre os tratamentos ($p \leq 0,05$). Após dois dias de armazenamento, o SST obtido na imersão com água diferiu significativamente dos demais ($p \leq 0,05$), exceto com a testemunha aspersão. No sexto dia, se destacam os menores valores para captan imersão e para o composto 4a imersão.

Ainda considerando os dados da Tabela 11, os valores da % de ácido cítrico (ATT) no segundo dia de armazenamento demonstraram que o maior valor (0,80 %) foi para o composto 4a imersão e o menor valor (0,35 %) para o controle imersão, os quais diferiram significativamente dos demais ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey. No quarto dia de armazenamento, maior valor de ATT para captan aspersão (0,65 %) e menor valor para controle aspersão (0,31 %), mesma tendência observada no sexto dia, exceto que não houve diferença significativa entre captan aspersão e captan imersão.

Quanto à ratio, no segundo dia de armazenamento, maior valor foi obtido no controle aspersão (31,00), com diferença significativa ($p \leq 0,05$) dos demais. Os piores foram captan imersão (18,35), composto 4a imersão (15,22), captan aspersão (18,95) e composto 4a aspersão (17,60), os quais não tiveram diferenças significativas entre si no teste Tukey. No quarto dia de armazenamento, maiores valores para controle aspersão (41,95), controle imersão (36,09) e composto 4a imersão (33,78), os quais não diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$), e menores para composto 4a aspersão (25,60), captan imersão (22,67) e captan aspersão (18,47), sem diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre eles. No sexto dia, água aspersão (86,51) apresentou o maior resultado, se diferenciando estatisticamente dos demais ($p \leq 0,05$), enquanto os piores, sem diferença significativa entre si, foram composto 4a imersão (34,15), composto 4a aspersão (32,51), captan aspersão (27,07) e captan imersão (26,28).

Também se observou que em todos os tratamentos, houve aumento dos ratios nos períodos de armazenamento.

Quanto ao pH, ainda de acordo com a Tabela 11, em todos os períodos de armazenamento, o maior valor que diferiu dos demais ($p \leq 0,05$) foi obtido com o controle imersão (4,34; 4,56 e 4,79, respectivamente, aos dois, quatro e seis dias de armazenamento). Menores valores de pH no segundo dia de armazenamento foram obtidos com captan imersão (3,72) e composto 4a imersão (3,66), os quais diferiram dos demais ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey. No quarto dia, menores valores e sem diferenças significativas entre si ($p \leq 0,05$) foram captan imersão (4,01), controle aspersão (3,84) e composto 4a imersão (3,72). No sexto dia, os menores valores foram Captan imersão (4,03) e controle aspersão (3,78), também sem diferença significativa entre eles ($p \leq 0,05$).

5.8.2.2. Ensaio com o composto 1a

A tabela 12 fornece as análises estatísticas referentes às características químicas quando se aplicou os tratamentos captan, composto 1a e água, tanto em imersão quanto em aspersão.

Tabela 12 - Características químicas de frutos de pêssegos cv. Chiripá, tempo de armazenamento e diferentes tratamentos, após serem submetidos aos tratamentos: captan, 1a e água, todos por imersão ou aspersão. Os frutos permaneceram armazenados a $25 \pm 1^\circ\text{C}/80 - 90\%$ UR por seis dias.

Parâmetro	Tratamentos, Média Geral e CV%		Tempo de Armazenamento (dias) ¹		
			2	4	6
SST (°BRIX)	Imersão	captan	11,50b	12,50c	14,50c
		composto 1a	12,50a,b	14,50a,b	15,25b,c
		água	14,50a	15,25a,b	16,75a,b
	Aspersão	captan	12,25b	13,50b,c	16,00a,b,c
		composto 1a	11,75b	13,75b,c	14,50c
		água	13,50a,b	16,25a	18,00a
		Média Geral	12,67	14,29	15,83
	CV%	7,32	5,53	6,22	
ATT (% de ác. cítrico)	Imersão	captan	0,73a,b	0,68a	0,57a
		composto 1a	0,66b	0,58c	0,51a,b,c
		água	0,70a,b	0,57c,d	0,45c
	Aspersão	captan	0,69b	0,65a,b	0,55a,b
		composto 1a	0,76a	0,59b,c	0,49b,c
		água	0,66b	0,51d	0,31d
		Média Geral	0,70	0,60	0,48
	CV%	4,33	4,58	5,82	
Ratio	Imersão	captan	15,86b,c	18,56e	25,34c
		composto 1a	18,92a,b	24,94,b,c	30,07c
		água	20,75a	26,75b	37,43b
	Aspersão	captan	17,84a,b,c	20,86d,e	29,24c

		composto 1a	15,52c	23,26c,d	29,48c	
		água	20,42a	31,88a	57,67a	
		Média Geral	18,21	24,37	34,87	
		CV%	7,68	5,97	8,13	
pH	Imersão	captan	3,72b,c	4,12b,c,d	4,03c	
		composto 1a	3,46d	3,68d	4,06c	
		água	4,36a	4,68a	4,79a	
	Aspersão	captan	3,88b	4,03b	4,54b	
		composto 1a	3,61c,d	3,56b,c	3,84d	
		água	3,88b	3,96cd	3,93c,d	
			Média Geral	3,81	4,00	4,20
			CV (%)	2,53	4,16	1,62

¹: Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey em 5 % de probabilidade. CV: coeficiente de variação.

De acordo com a Tabela 12, assim como no ensaio com o composto 4a, os teores dos parâmetros analisados entre os tratamentos e nos períodos de armazenamento tiveram comportamentos diferentes. No entanto, em todos os parâmetros e períodos de armazenamento foram verificadas diferenças significativas.

Quanto ao teor de sólidos solúveis (SST), se destaca o tratamento água aspersão ou imersão, pois foi superior em todos os períodos de armazenamento, enquanto captan, imersão ou aspersão, foi inferior. Com relação às diferenças não significativas ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos que proporcionaram maior SST, são exemplos: após dois e quatro dias de armazenamento, apenas o composto 1a imersão não se diferenciou dos tratamentos com água com relação ao maior SST, e após 6 dias de armazenamento, os tratamentos com água não se diferiram significativamente do captan aspersão. Destes resultados, a água se destacou no aumento dos SSTs (13,50; 16,25 e 18,00 °Brix, respectivamente, no segundo, quarto e sexto dia de armazenamento), independente da forma de aplicação, enquanto captan, também independente da forma, proporcionou menores SSTs (11,50; 12,50 e 14,50 °Brix, respectivamente, no segundo, quarto e sexto dia de armazenamento).

Quanto aos valores da % de ácido cítrico (ATT), na Tabela 12, se destacam as seguintes comparações: captan imersão forneceu os maiores valores de ATT em todos os períodos de armazenamento (0,73; 0,68 e 0,57 %, respectivamente, no segundo, quarto e sexto dia de armazenamento), apesar de que em todos, as diferenças não foram significativas entre o captan imersão e alguns dos tratamentos, como, por exemplo, aos dois dias de armazenamento, não foi verificada diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidades entre o captan imersão, o composto 1a aspersão e água imersão. Com relação aos menores valores de ATT, a água aspersão forneceu os menores valores em todos os dias de

armazenamento, sendo que no sexto dia, foi o menor valor de ATT (0,31 %) e se diferiu significativamente dos demais.

Com relação ao ratio, a tabela 12 também revela que muitos tratamentos que não se diferenciam significativamente entre si. No entanto, maior valor é obtido com água, aos quatro (31,88) e seis dias (57,67) de armazenamento, com diferenças significativas com os demais. O captan, imersão ou aspersão, proporcionou os menores valores de ratio em todos os dias de armazenamento. A água aspersão também se destaca na variação do ratio, pois de 20,42 após dois de armazenamento foi para 57,67 no sexto dia.

Os valores de pH foram os que demonstraram não haver diferença significativa ($p \leq 0,05$, pelo teste Tukey) entre um tratamento e os outros. A água por aspersão, por exemplo, proporcionou os valores de pH 4,36; 4,68 e 4,79, respectivamente, para dois, quatro e seis dias, os quais foram os maiores valores e se diferiram significativamente dos demais tratamentos ($p \leq 0,05$, pelo teste Tukey). Quanto aos menores valores de pH, nenhum tratamento se destacou quando se considera todos os períodos.

6. DISCUSSÃO

A variabilidade de espécies do gênero *Monilinia* e as semelhanças anatômica e morfológica entre elas é reconhecida por vários autores (BUCHWALD, 1987, BATRA, 1991, HOLST-JENSEN, 1992). Honey (1936) agrupou as características nas seções *Disjunctoriae* e *Junctoriae*, definidas com base na morfologia da mitospora, na biologia da infecção e na especialização do hospedeiro.

Pizzuolo et al. (2006) identificaram 23 isolados de *Monilinia* de várias origens, inicialmente por meio das características morfológicas, e, posteriormente, confirmaram estes resultados com protocolos biomoleculares baseados em análise aleatória de DNA polimórfico amplificado em PCR. Dois isolados identificados inicialmente pelos autores como *M. fructigena*, não foram confirmados com as técnicas moleculares, sendo ambos da espécie *M. fructicola*. Estes fatores foram determinantes no processo de identificação dos isolados do gênero *Monilinia* das amostras de pêssegos, no presente trabalho, utilizando a princípio as características morfológicas, e posteriormente, para determinação da espécie as técnicas moleculares, como PCR e sequenciamento. A espécie causadora da podridão-parda nos frutos e flores de pessegueiro de Mogi das Cruzes- SP, foi identificada como *M. fructicola*.

O controle da podridão-parda é complexo, já que o fungo permanece no fruto mumificado no campo e, portanto, fornece fonte de inóculo constante (LANDGRAF e ZEHR, 1982; HONG et al., 1997). Os fungicidas utilizados no controle do patógeno, em grande volume, muitos com classe toxicológica I (extremamente tóxico), refletem na contaminação com resíduos que permanecem nos frutos (RIBEIRO, 2001). Outros fatores como a toxicidade seletiva, a persistência no ambiente, o potencial de bioacumulação e a mobilidade dificultam a confiança do consumidor e a exportação do fruto (EMBRAPA, 2004). Esta problemática fortalece a busca por novas substâncias para o controle da podridão-parda.

Das amostras sintéticas analisadas no presente trabalho, três (compostos 1a, 2a e 4a) causaram efeito inibitório no crescimento micelial de *M. fructicola*. Estas substâncias apresentaram halos de inibição superiores a 10 mm (Tabela 3 e Figura 7), permitindo calcular as melhores Concentrações Mínimas Inibitórias (CIM) e a Concentração Inibitória de 50% diante do crescimento micelial *in vitro* de *M. fructicola*.

Na literatura científica, os compostos 1a e 4a também foram considerados eficazes no controle de *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da tuberculose em humanos, com resultados de CIM de 84 nM para o composto 1a e 16,6 nM para 4a (OLMO et al., 2009).

Castro et al. (2013), estudando os mesmos compostos em microrganismos causadores de dermatoses, encontraram os seguintes valores de CIM₉₀ para o composto 2a: *Candida parapsilosis* (4,0 µg.ml⁻¹), *C. krusei* (2,4 µg.ml⁻¹), *C. lusitaniae* (3,2 µg.ml⁻¹), *Trichophyton mentagrophytes* (6,4 ug.ml⁻¹) e *T. rubrum* (4,0 µg.ml⁻¹).

Estas diaminas também demonstraram eficácia contra nematoides e protozoários. Legarda-Ceballos et al. (2016), estudando doenças causadas por parasitas como *Strongyloides venezuelensis*, encontraram eficácia das diaminas *in vitro* e *in vivo* no controle do referido nematoide. Os mesmos autores, em 2015, observaram efeitos semelhantes no controle do protozoário *Trypanosoma cruzi*, com valores entre 10,8 e 19,2 µM de IC₅₀. Foi verificada eficiência dos compostos 1a e 2a em estudos de controle de *Trypanosoma brucei* (OLMO et al., 2012).

Pesquisas demonstraram que aminas obtidas de vegetais possuem capacidade antifúngica. Cunico et al. (2006) identificaram zonas de inibição de crescimento de *Saccharomyces aureus* e *S. epidermidis*, quando utilizaram aminas extraídas de raízes de *Ottonia martiana*.

Para melhor entendimento do modo de ação das aminas avaliadas na formação dos halos de inibição, as células tratadas com os compostos foram observadas em microscopia, já que possivelmente interferem na biossíntese da parede celular e podem ocasionar alterações nas características morfológicas. As mudanças podem sugerir o possível alvo ou estratégia dos inibidores. No presente trabalho, foram observadas alterações micromorfológicas em *M. fructicola* quando exposto aos compostos de maior atividade antifúngica (1a, 2a e 4a) nas concentrações S1, S2 e S3 (Tabela 2). Os resultados podem ser conferidos nas Figuras 7: d, e, f, g, h, j, k e l sob o microscópio de luz.

O exame microscópico das células não tratadas de *M. fructicola* mostrou a estrutura da célula regular com citoplasma homogêneo e conídios claramente visíveis, limoniformes, produzidos em cadeias com 15 a 25 por 8 a 14 µm (Figura 8:a e b). O micélio cinza cultivado em meio, adicionando-se os compostos (Figura 7), apresentou algumas alterações morfológicas como desenvolvimento distorcido das hifas escuras, curtas largas e deformadas, apresentando dilatações ao longo de sua estrutura, bem como a formação de possíveis estromas e ou escleródios (Figura 8: d, e, f, g, h, j, k e l). Foram observadas modificações como perda de citoplasma da hifa fúngica, falta de esporulação, redução da cabeça conidial, menor ou ausência total de conidiação e conidióforos totalmente distorcidos, além de hifas bifurcadas.

Carmo (2008) e Sharma e Tripatti (2006) também encontraram alterações morfológicas em espécies do gênero *Aspergillus*, quando em contato com diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Citrus sinensis*, *Caryophyllus aromaticus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Origanum vulgare*. Observaram falta de esporulação; ausência de conidiação e conidióforos distorcidos, dentre outras características.

Dantas (2013), avaliando a atividade antifúngica de timol sobre cepas do gênero *Penicillium*, observou também alterações morfológicas, como, por exemplo, redução de conidiação e estruturas de reprodução rudimentares, além do aparecimento de estruturas semelhantes aos escleródios, caracterizados pela resistência e pela formação apenas em condições adversas.

As modificações estruturais de fungos podem ter relação direta às reações de síntese da parede celular, as quais, em contato com as substâncias tidas como antifúngicas, tem o crescimento e a morfogênese alterados. Também se discute que além dessa interferência na parede celular, a morte celular pode ocorrer devido à retração do citoplasma nas hifas (RASOOLI e ABYANEH, 2004; CARMO et al., 2008).

O entendimento da morfologia fúngica, sobretudo em patógenos de plantas, é determinante na penetração dos tecidos do hospedeiro. Apesar dos conídios iniciarem o processo infeccioso, as hifas são mais especializadas no processo de invasão (ROMÁN et. al, 2007). A incapacidade de formar hifas pode tornar o fungo avirulento (LO et al., 1997). Como o composto diamina 4a comprometeu o crescimento, viabilidade e virulência do fungo, pode-se afirmar que os resultados encontrados na presente pesquisa são determinantes para o fornecimento de alternativas para o controle da podridão-parda.

A microscopia eletrônica de transmissão forneceu evidências para uma possível interação das células de *M. fructicola* com os compostos diaminas, tendo em vista que foram observadas modificações da parede celular e organelas; podendo, inclusive, nortear o provável mecanismo de ação na inibição da reprodução e desenvolvimento do fungo.

Pârvu e Pârvu (2014) realizaram um estudo morfológico e ultraestrutural em fungos da família Sclerotiniaceae. Em sua pesquisa, os autores relatam que nas espécies *M. fructigena* e *M. laxa*, as células dos conídios e dos conidióforos apresentaram parede celular regular com duas camadas (interna espessa e a externa fina e eletrondensa), membrana plasmática, citoplasma, mitocôndrias, vacúolos, e núcleo uniformemente distribuído e esférico. Esta descrição está compatível com a apresentada para as células de *M. fructicola* sem tratamento, no presente estudo (Figura 9).

Outro aspecto observado no controle negativo foram as maiores definição e nitidez das estruturas e dos conteúdos celulares, diferente do que ocorreu nas células tratadas, o que pode ser explicado pela composição química dos compostos diaminas. Estes podem ter uma afinidade com os contrastantes (citrato de chumbo e acetato de uranila) empregados durante o preparo das amostras e da emblocagem. Este fato poderia explicar a ausência, ou a dificuldade de visualização, das estruturas celulares, como, por exemplo, mitocôndrias, núcleo e outras organelas (Figura 10: c, d, e, f e g).

Com relação à *M. fructicola*, não foram encontrados estudos que relatam o efeito de compostos diaminas em células ou de seus mecanismos de ação na inibição do crescimento do fungo.

Nogueira et al. (2010) observaram alterações ultraestruturais em células de *Aspergillus flavus* quando tratadas com óleo essencial de *Ageratum conyzoides*. Entre as alterações, os autores relataram uma dissociação da camada fibrilar que envolve a parede celular do fungo. No presente estudo, as células de *M. fructicola* tratadas também apresentaram efeito sobre a parede celular, porém, foi somente sobre o aspecto da parede que de liso e contínuo passou para ondulado (Figura 12) e, algumas vezes, para descontínuo (Figura 10: d e g).

Nogueira et al. (2010) também descrevem a ocorrência de grânulos eletrondensos nos vacúolos das células tratadas de *A. flavus*. Porém, o comportamento destes grânulos foi distinto diante do efeito dos tratamentos para os quais foram submetidos. A presença das diaminas elevou o número de vacúolos e de grânulos (Figura 10g) nas células de *M. fructicola*, enquanto que as células de *A. flavus* passaram a apresentar desagregação dos grânulos.

Liu et al. (2017), utilizando diferentes doses de óleo extraído de *Eupatorium adenophorum*, relataram alterações em células de *Pythium myriotylum*. Os autores concluíram que quanto maior a concentração o óleo ($80 \mu\text{L.mL}^{-1}$), mais danoso era o efeito no citoplasma do patógeno, não sendo observadas presenças de mitocôndrias, membranas plasmáticas, núcleo e vacúolos. O mesmo ocorreu no trabalho de Duan et al. (2016), quando utilizaram extrato de fumo em células de *Valsa mali*. As células apresentaram distorção celular, desordem e espessamento da membrana plasmática. De maneira geral, o mesmo pode-se afirmar para o presente estudo, já que o efeito das diaminas nas estruturas foi diretamente relacionado a concentração empregada.

A natureza lipídica dos compostos diaminas pode ter facilitado a sua entrada na célula fúngica. Esta possível afinidade pode ter promovido a interação com a parede celular e a membrana plasmática e, em seguida, os compostos podem ter atravessado as estruturas

membranosas citoplasmáticas das organelas, o que acarretaria em alterações morfológicas deletérias irreversíveis.

Zacchino (2001) descreveu inúmeras atividades na interação direta de fármacos com agentes fúngicos, como, por exemplo, inibição da formação e da biossíntese do ergosterol da membrana fúngica; inibição da síntese de RNA e DNA e de parede celular, e, conseqüentemente, interferência na formação das hifas.

A ausência do ergosterol e o acúmulo de seus precursores afetam a estrutura da membrana plasmática e a absorção de vários nutrientes, tornando o fungo vulnerável aos danos (GUPTA et al., 1994; GUPTA et al., 1997). O ergosterol tem como objetivo primário modular a fluidez da membrana e evitar suas alterações por flutuações nas condições ambientais, além de regular o crescimento e a proliferação celular (PARKS et al., 1992; GEORGOPAPADAKOU, 1998).

O grupo químico das alilaminas contém conhecidos antifúngicos que interferem na biossíntese do ergosterol ao inibir a enzima esqualeno-epoxidase, responsável em converter esqualeno a 2,3-oxidoesqualeno (precursor do ergosterol). Neste processo, níveis tóxicos de esqualeno são acumulados no interior da célula fúngica e com a diminuição do ergosterol, a parede é então enfraquecida (NOVERR, 2002). A ondulação observada nas paredes dos conídios de células tratadas com os compostos diaminas (Figuras 12c, 12d e 12e), pode ser um provável efeito de enfraquecimento.

O exame por luz e microscopia eletrônica de transmissão revelou que os compostos diaminas causaram inchaço, ruptura da parede celular e degradação das organelas citoplasmáticas. Estes resultados sugerem que os sistemas de parede celular de *M. fructicola* foram severamente danificados. Desta forma, oferecem potencial significativo para uso como fungicida. No entanto, ensaios de campo são necessários.

O primeiro efeito danoso de *M. fructicola* ocorre na fase de floração do pessegueiro. Além de causar a queima das pétalas e das estruturas florais (Figura 13), também contribui para a manifestação da doença na colheita e na pós-colheita, pois serve como fonte de inóculo ao permanecer latente no interior dos frutos (BYRDE e WILLETS, 1977).

Negri et al. (2011) correlacionaram a queima das flores com a podridão-parda em pêssegos cv. Granada. Confirmaram que há uma relação direta entre a incidência da doença na flor e na pós-colheita. Os autores apresentaram valores que variaram de 22 a 72 % de incidência da doença nas flores sem tratamentos, semelhante ao que ocorreu no presente trabalho, onde 58% das flores abertas e 48 % na fase de queda de pétalas, mostraram-se infectadas por *M. fructicola* (Tabela 4). No mesmo trabalho, os autores verificaram que

quando as flores foram tratadas com calda sulfocálcica, iodo, *Trichothecium roseum* e associações destes com fosfito, CaB e K, houve redução da doença em 25 % e 11 %, respectivamente, nas cultivares Granada e Chimarrita. Na presente pesquisa, os compostos 4a e 1a provocaram redução da incidência da podridão-parda, respectivamente, de 30,5 e 45,5 % na fase de flor aberta. Na fase de queda de pétalas o composto 4a foi similar, pois apresentou também 25 % de incidência da doença enquanto que para o composto 1a foi de 29,50 %, (Tabela 4).

Os valores de incidência da queima das flores quando tratadas com captan (28 % quando flor aberta e 25 % na queda de pétalas) corroboram com os resultados obtidos por May-De Mio et al. (2008). Estes autores compararam dois sistemas de produção de pêssegos, onde no cultivo convencional, o captan era um dos fungicidas aplicados e apresentou, em média, incidência da doença de 22,8 % e de 30,1 % na fase de flor aberta, em dois anos consecutivos.

O efeito do composto 4a sobre a incidência da podridão-parda nas flores de pêssego cv. Chiripá foi representativamente menor que a testemunha. No entanto foi ainda considerada alta, principalmente quando se considera as infecções latentes dos frutos na pós-colheita.

A incidência e a severidade da doença da podridão-parda nos frutos foram significativamente diferentes entre os tratamentos e os métodos de aplicação. A incidência média no primeiro dia de avaliação para os frutos sem tratamentos foi de 62,5 % e 25,0 % para imersão e aspersão, respectivamente, no ensaio com o composto 4a (Figura 14). No segundo dia de avaliação, os melhores resultados foram observados nos tratamentos com o composto 4a: 14,45 % aspergido e 18,75 % imerso. O fungicida chegou a apresentar 50 % dos frutos com pelo menos uma lesão de podridão-parda. O levantamento foi realizado até o sexto dia após a aplicação dos produtos, finalizado com 56,25 % (aspersão) e 68,65 % (imersão) de incidência da doença para o composto 4a, nos dois métodos de aplicação, enquanto que o fungicida apresentava 100 % no quinto dia de avaliação (Tabela 5). O composto 1a também atrasou o surgimento da doença, no entanto não foi tão eficiente quanto o composto 4a.

Nos frutos onde houve a inoculação de *M. fructicola*, a severidade foi determinada até o quinto dia, quando todos os tratamentos apresentaram 100 % do índice da doença. No comparativo entre fungicida e composto 4a, pode-se observar o atraso do desenvolvimento do fungo nos frutos até o quarto dia de avaliação quando o composto 4a apresentou 50,75 % para imersão e 40 % para aspersão. O fungicida apresentou nesta data, 80 e 42,25 % para imersão e aspersão, respectivamente. O composto 1a aspergido já apresentava, no quarto dia de

avaliação, severidade de 80 % para ambos os métodos de aplicação, chegando ao final do experimento com 90,00 % (imersão) e 93,60 % (aspersão) (Figura 24 e Tabela 8).

A diferença entre as técnicas de aplicação dos tratamentos aspersão e imersão interferiu no progresso da doença. Este comportamento pode ser explicado pelo maior manuseio dos frutos durante o processo. A imersão dos frutos, apesar de cuidadosa, pode ter promovido ferimentos na epiderme delicada do pêssego. Chitarra e Chitarra (2005) comentaram sobre a importância do manuseio mínimo de frutas e hortaliças, já que a epiderme pode ser lesionada por meio de batidas, cortes, e movimentação brusca. Estas lesões, além de acelerar o seu envelhecimento, permite o desenvolvimento de microrganismos. A umidade do processo também pode ter influenciado um maior desenvolvimento da podridão-parda, pois, de acordo com Cenci (2006), ocorre uma considerável redução na vida útil pós-colheita de frutos, quando são umedecidos.

M. fructicola foi capaz de infectar os pêssegos, independentemente do tratamento (Figuras 16 e 19). A taxa de desenvolvimento da lesão, representada pela inclinação do modelo linear ajustado ao diâmetro da lesão, foi mais lenta nos tratamentos curativos do que nos tratamentos erradicantes. Resultados semelhantes foram observados quando benzaldeído, benzoato de etilo e salicilato de metilo, foram testados contra *M. fructicola* e *Botrytis cinerea*, embora estes compostos fossem mantidos em recipientes fechados durante um período de duas semanas (WILSON, 1987). Por outro lado, uma dose similar de hexanal utilizada contra uma cepa europeia de *M. laxa* ($57,2 \mu\text{L.L}^{-1}$) inibiu apenas 50 % de seu crescimento micelial (NERI et al., 2007).

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a incidência e severidade da podridão parda foi condizente com o aparecimento e evolução das lesões, já que foi possível integrar toda a curva do progresso levando-se em consideração o início da epidemia e a alta severidade da doença ao longo do tempo.

Fontana et al. (2017) utilizaram extratos vegetais (cravo, canela e boldo) no controle da podridão parda em pêssegos cv Chimarrita e Precocinho e obtiveram valores de AAPCD melhores que o controle, no entanto não foram suficientes para reduzir a severidade da doença.

Em estudo com diversos tipos de controle, Pansera-Espíndola (2017) conseguiu reduzir significativamente o AACPD da podridão-parda em pêssegos cv. Chimarrita do controle (147,3 de severidade e 324,2 de incidência), para 33,8 de severidade e 186,4 de incidência, quando tratados com *Bacillus subtilis*.

O composto 4a não suprimiu completamente o desenvolvimento da podridão-parda de pêssego, mas teve atividade antifúngica, reduzindo o crescimento do tamanho da lesão ($p \leq 0,05$).

Aminas conjugadas têm sido descritas como fitoalexinas e, de acordo com Sen et al. (1994), quando em conjunto com ácidos fenólicos, fortalecem a parede celular de alguns cereais. As interações fisiológicas das aminas sugerem uma ação desses compostos no mecanismo de defesa das plantas contra patógenos (WALTERS, 2003).

A diamina putrescina e as poliaminas espermidina e espermina, por exemplo, ativam a síntese de ácidos nucleicos e, portanto, atuam no crescimento e no desenvolvimento das plantas e também interagem com patógenos fúngicos e virais. Quando conjugadas com compostos fenólicos, atuam nas respostas de defesa da planta. Outros trabalhos afirmam um papel para a poliamina espermina livre na resposta de hipersensibilidade da cevada ao míldio pulverulento e no tabaco à TMV (MARINI et al. 2001; GARDINER et al., 2010). As poliaminas estão envolvidas em vários processos fisiológicos e respostas ao estresse ambiental, incluindo infecções por patógenos. Estudos demonstraram que tanto elas quanto seus produtos catabólicos, como o H_2O_2 produzido por diaminas oxidases e poliaminas oxidases, estão intimamente envolvidos na ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro (TAKAHASHI, 2016).

As plantas desenvolveram mecanismos de defesa para lidar com uma grande variedade de patógenos. A reação de defesa envolvendo a morte celular localizada, conhecida como resposta de hipersensibilidade, é importante para limitar a disseminação de patógenos. A ativação da resposta de defesa é iniciada pelo reconhecimento mediado pelo receptor hospedeiro de padrões moleculares, associados aos patógenos ou pelo reconhecimento de fatores de avirulência específicos de raças de patógenos por uma proteína de resistência correspondente na planta (DANGL e JONES, 2001, CHISHOLM et al., 2006). Pesquisadores demonstraram que as enzimas metabólicas das poliaminas são ativadas e se acumulam durante a resistência à doença, inclusive durante a reação de hipersensibilidade (WALTERS, 2000; 2003). Cowley e Walters (2002), ao infectarem folhas de cevada, observaram aumento de poliaminas conjugadas e de enzimas metabólicas da reação de hipersensibilidade.

Houve perdas significativas de massa fresca à medida que se aumentou o período de armazenamento dos frutos, de maneira progressiva em todos os tratamentos, em ambos os ensaios, 4a e 1a. Isso ocorreu devido à eliminação da água por transpiração. Todos os frutos tratados e o controle não apresentaram diferenças significativas entre si ($p \leq 0,05$), uma vez que os tratamentos sofreram perda de massa, após seis dias armazenados (25+-1C/80 a 90 %

UR), na faixa de 31 %, para o composto 4a e 32 % para o composto 1a (Figuras 26 e 27). O mesmo comportamento foi observado por Cunha Junior et al. (2010), quando armazenaram pêssegos a 12 °C por 35 dias, e observaram perda de até 34,63 %.

A perda de massa é uma variável importante, pois está diretamente associada com a qualidade dos frutos, devido ao enrugamento e à aparência não atrativa. Segundo Ben-Yehoshua (1987), um dos principais problemas durante o armazenamento de frutas e de hortaliças é a perda de massa, a qual tem sido atribuída à transpiração e à respiração. Os resultados obtidos devem-se ao fato dos frutos terem sido armazenados em condições ambientais, o que favorece trocas causadas pelo metabolismo do fruto e conseqüentemente perda de massa.

Diante dos resultados obtidos, não há influência dos compostos 4a e 1a; do fungicida Captan e dos métodos de aplicação imersão e aspersão na perda de massa nos frutos de pêssegos armazenados em temperatura ambiente.

No decorrer do trabalho, os frutos foram avaliados a cada dois dias quanto ao teor de Sólidos Solúveis Totais (SST), Acidez Total Titulável (ATT) e pH (Tabelas 11 e 12), parâmetros que também podem indicar o ponto de maturidade do fruto, pois existe uma relação entre eles e o estágio de maturação (FAGUNDES e YAMANISHI, 2001).

Todos os frutos amadureceram durante o experimento. Apresentaram acréscimos significativos no teor de sólidos solúveis em todos os tratamentos, porém não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$), entre os valores finais. Pode-se então notar que em relação ao teor de sólidos solúveis, os tratamentos não diferem do controle, o que demonstra que os produtos não interferem no processo de adoçamento do fruto.

Os sólidos solúveis indicam a quantidade de sólidos como açúcares, vitaminas, ácidos, aminoácidos e algumas pectinas que se encontram dissolvidas no suco ou na polpa. É expresso em graus Brix e têm a tendência de aumentar com o avanço da maturação (CHITARRA e CHITARRA, 2005). O teor de sólidos solúveis não foi influenciado pelos tratamentos aplicados, assim como como a acidez total titulável e o ratio.

7. CONCLUSÕES

- A espécie fúngica causadora da doença podridão-parda do pessegueiro em Mogi das Cruzes - SP foi identificada como *Monilinia fructicola*;
- Os compostos 1a, 2a e 4a derivados de diaminas apresentaram os melhores resultados para a CIM e também para o IC₅₀, e provocaram alterações morfológicas e ultraestruturais de *M. fructicola*;
- A incidência da podridão-parda nas flores de pessegueiro cv. Chiripá foi reduzida quando tratadas com o composto 4a. O composto 1a não reduziu a incidência;
- A incidência e a severidade da podridão-parda foram inferiores nos frutos quando tratados com composto 4a (aspergido e imerso);
- Os compostos 1a e 4a não alteraram a qualidade pós-colheita da fruta quanto a perda de massa, acidez total titulável, sólidos solúveis totais e potencial hidrogeniônico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABENGÓZAR, María Ángeles et al. Mechanisms of Action of Substituted β -Amino Alkanols on *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 59, n. 2, p.1211-1218, 8 dez. 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.04003-14>.

AGRIANUAL. Pêssego. In: **AGRIANUAL**. São Paulo: Fnp Consultoria & Comércio, 2017. p. 364-366.

AGRIOS, George N.. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. 635 p.

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. 2017. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 nov. 2017.

ALVES, Mirian Ribeiro. **Influência da incorporação de resíduos orgânicos a um latossolo vermelho amarelo e a ação das minhocas como agentes de descontaminação ambiental**. 2002. 150 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química Analítica, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

ANDRADE, E.R.; MATOS, C.S. Controle químico de *Monilinia fructicola* em pêssego na pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, n.2, p.301-303, 1996.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2017. CARVALHO, Cleonice et al. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2017. 88 p.

ARGENTA, Luis Carlos; FLORES-CANTILLANO, Rufino F.; BECKER, Walter Ferreira. Tecnologias Pós-colheita em fruteiras e caroço. In. MONTEIRO, Lino Bittencourt.; MAY-DE MIO, Louise Larissa; SERRAT, Beatriz Monte; CUQUEL, Francine Lorena. **Fruteiras de Caroço: uma visão ecológica**. Curitiba: UFPR, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Departamento de Solos e Engenharia Agrícola, 2004, p. 333-362.

BALARDIN, R.S., BALARDIN, C.R.R.; CHAVES, L.C.S. Eficiência de fungicidas e diferentes doses no controle de *Monilinia fructicola* (Wint) sobre frutos do pessegueiro (*Prunus persica* var. *vulgaris*), em pós-colheita. **Ciência Rural**, v.24, p.15-17, 1994.

BARNETT, Horace Leslie; HUNTER, Barry B.. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1998. 218 p.

BATRA, Lekh R. World species of *Monilinia* (fungi): their ecology, biosystematics and control. **Mycologia Memoirs**, v.16, p.1-246, 1991. 246 p.

BELISARIO A.; LUONGO, L.; CORAZZA, L. Identification of *Monilinia* species by total mycelial protein SDS-PAGE. **Phytopathologia Mediterranea**, v.38, n.3, p.115-121. 1999.

BEN-YEHOSHUA, Shimshon. Transpiration, water stress, and gas exchange. In: WEICHMANN, I. (Ed.), **Postharvest physiology of vegetables**. New York: Marcel Dekker, 1987. p.113-172. 1987.

BERGAMIM FILHO, Armando; AMORIM, Lilian. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 289p.

BERGER, R.D. The analysis of the effects of control measures on the development of epidemics. In: KRANZ, Jürgen; ROTEM, Joseph (Ed.). **Experimental techniques in plant disease epidemiology**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. p.137-151.

BOEHM, E.W.A.; MA, Z.; MICHAILIDES, T.J.. Species-specific detection of *Monilinia fructicola* from California stone fruits and flowers. **Phytopathology**, v.91, n.5, p.428– 439, 2001. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2001.91.5.428>>. Acesso em: 12 nov. 2017.

BONGHI, C.; RAMINA, A.; RUPERTI, B.; VIDRIH, R.; TONUTTI, P. Peach fruit ripening and quality in relation to picking time and hypoxic and high CO₂ short-term postharvest treatments. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.16, n.3, p.213-222, 1999. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521499000289>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

BRASIL. **Decreto nº 4074**, de 4 de janeiro de 2002. Brasília, Distrito Federal, 4 jan. 2002. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em: 5 jun. 2018.

BRIGANTE, J.; SILVA, M.R.C.; QUEIROZ, L.A.; COPPI, E. Quantificação de metais na água e no sedimento do Rio Mogi-Guaçu. In: ESPINDOLA, Evaldo Luiz Gaeta; BRIGANTE, Janete. **Limnologia Fluvial: Um estudo no Rio Mogi-Guaçu**. São Carlos: RIMA, 2003. p. 85-120. (Volume 3).

BUCHWALD, N.F. Sclerotiniaceae Daniae. En floristisk-systematisk oversigt over in Danmark fundne Knoldbaegersvampe 5. *Monilinia Honey* 1928. In: **Friesia**, v.11, n.5, p.287–328, 1987.

BUENO, Gabriel; BACCARIN, José Giacomo. Participação das principais frutas brasileiras no comércio internacional: 1997 a 2008. **Revista Brasileira de Fruticultura** [online], v.34, n.2, p. 424-434, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v34n2/15.pdf>>. Acesso em: 20 de out. 2017.

BYRDE, R.J.W.; WILLETTS, H.J. **The brown rot fungi of fruits: their biology and control**. Oxford: Pergamon Press, 1977. 171 p.

CARMO, Egberto Santos. **Susceptibilidade de fungos do gênero *Aspergillus* a óleos essenciais**. 2008. 113f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008. Disponível em: <<http://livros01.livrosgratis.com.br/cp100730.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

CARMO, Egberto Santos; LIMA, Edeltrudes de Oliveira ; SOUZA, Evandro Leite de. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.362-367, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v39n2/a30.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2018.

CASTRO, Ma Ángeles et al. Synthesis and antifungal activity of terpenyl-1,4-naphthoquinone and 1,4-anthracenedione derivatives. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 67, p.19-27, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.06.018>.

CEAGESP. Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo. Programa Brasileiro para a modernização da Horticultura & produção integrada de frutas. Normas de Classificação de pêsego e nectarina: *Prunus persica* (L.) Batsch.. São Paulo: CEAGESP, 2008. 1 folder. (CEAGESP. Documentos, 31).

CENCI, Sérgio Agostinho. Boas Práticas de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças na Agricultura Familiar. In: NASCIMENTO NETO, Felon do. (Org.). **Recomendações básicas para a aplicação das boas práticas agropecuárias e de fabricação na agricultura familiar**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. p. 64-80. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/83839/1/manual-boas-praticas.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2017.

CIRULLI, M.; ALEXANDER, L.J. A comparison of pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum f. lycopersici* and different sources of resistance in tomato. **Phytochemistry**, Oxford, v.56, n.11, p.1302-1304, 1966.

CHISHOLM, Stephen T. et al. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. **Cell**, [s.l.], v. 124, n. 4, p.803-814, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>.

CHITARRA, Maria Isabel Fernandes; CARVALHO, V. D. Qualidade e industrialização de frutos temperados: pêsegos, ameixas e figos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 125, p. 56-66, 1985.

CHITARRA, Maria Isabel Fernandes; CHITARRA, Adimilson Bosco. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

COELHO, A.H.R. Qualidade pós-colheita de pêsegos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.17, n.180, p.5-9, 1994.

CÔTÉ Marie-José;TARDIF, **Marie-Claude**;MELDRUM, Allison J.. Identification on *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *M. polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. **Plant Diseases**, v.88, n.11, p.1219-1225, 2004. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2004.88.11.1219>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

COWLEY, T., WALTERS, D.R. Polyamine metabolism in barley reacting hypersensitively to the powdery mildew fungus *Blumeria graminis f. sp. hordei*. **Plant Cell Environ**, v.25,p.461468, 2002. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.0016-8025.2001.00819.x>>. Acesso em: 12 fev. 2018.

CUNHA JUNIOR, Luis Carlos; DURIGAN, Maria Fernanda Berlingieri; MATTIUZ, Ben-Hur. Conservação de pêsegos ‘aurora-1’ armazenados sob refrigeração. **Revista Brasileira**

de Fruticultura, Jaboticabal - SP, v. 32, n. 2, p. 386-396, Junho 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v32n2/aop51110>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

CUNICO, Miriam Machado et al. Potencial antimicrobiano e alelopático das amidas isoladas do extrato das raízes de *Ottonia martiana* Miq. **Química Nova**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.746-749, jul. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422006000400021>.

DANGL, Jeffery L., JONES, Jonathan, D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v.411, p.826-833, 2001.

DANTAS, Tassiana Barbosa. **Atividade antifúngica in vitro de timol sobre cepas do gênero *Penicillium***. 2013. 98 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Produtos Naturais e Sintéticos, Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013. Disponível em: <<http://tede.biblioteca.ufpb.br/bitstream/tede/6812/1/arquivototal.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

DERITA, Marcos et al. Synthesis, bioevaluation and structural study of substituted phthalazin-1(2h)-ones acting as antifungal agents. **Molecules**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.3479-3501, 18 mar. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules18033479>.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

DUAN, Suzhen, et al. Chemical Basis of the Fungicidal Activity of Tobacco Extracts against *Valsa mali*. Article in **Molecules** 21(12):1743, 2016. <http://doi.org/10.3390/molecules21121743>. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/603a/c8f622c62e1e97879cce13482f808cdc9560.pdf>, acesso em 20 de jan.2018.

ELMER, P.A.G.; GAUNT, R.E. Effect of frequency of dicarboximide applications on resistant populations of *Monilinia fructicola* and brown rot in New Zealand orchards. **Crop Protection**, [s.l.], v. 12, n. 2, p.83-88, mar. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0261-2194\(93\)90132-3](http://dx.doi.org/10.1016/0261-2194(93)90132-3).

EMBRAPA. **Agrotóxicos & Ambiente**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 400p.

EMERY, K. M.; MICHAELIDES, T. J.; SCHERM, H. Incidence of Latent Infection of Immature Peach Fruit by *Monilinia fructicola* and Relationship to Brown Rot in Georgia. **Plant Disease**, [s.l.], v. 84, n. 8, p.853-857, ago. 2000. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2000.84.8.853>.

FACHINELLO, José Carlos; COUTINHO, Enilton Fick; MARONDIN, Gilmar Arduino Bettio et al. (eds). **Normas técnicas e documentos de acompanhamento da produção integrada de pêssego**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, 2003. 95p. Disponível em: <<http://www.geppif.ufpr.br/downloads/normas%20tecnicas.pdf>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

FACHINELLO, José Carlos et al. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.109-120, out. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452011000500014>.

FAGUNDES, Geni Rodrigues; YAMANISHI, Osvaldo Kiyoshi. Características físicas e químicas de frutos de mamoeiro do grupo 'solo' comercializados em 4 estabelecimentos de Brasília-DF. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.541-545, dez. 2001. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452001000300018>.

FLORES-CANTILLANO, Rufino Fernandes (Ed.). **Pêssego: pós-colheita**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 47 p. Série (Frutas do Brasil, 51).

FLORES-CANTILLANO, Rufino Fernandes. Manejo e conservação pós-colheita: fisiologia e tecnologia. In: RASEIRA, M.do C.B.; PEREIRA, J.F.M.; CARVALHO, F.L.C. **Pessegueiro**. Brasília, D.F.: Embrapa, 2014. p. 559-603.

FONTANA, Daniela Cristina; KULCZYNSKI, Stela Maris; TREVISAN, Renato et al. Uso de extratos vegetais no controle alternativo da podridão parda do pessegueiro. **Revista Cultivando o Saber**, v. 10, n.2, p.148-165 2017. Disponível em: <https://www.fag.edu.br/upload/revista/cultivando_o_saber/59a5b4143085c.pdf>. Acesso em: 18 mai. 2018.

FÖRSTER, H.; ADASKAVEG, J. E. Early brown rot infections in sweet cherry fruit are detected by *Monilinia*-specific DNA Primers. **Phytopathology**, [s.l.], v. 90, n. 2, p.171-178, fev. 2000. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto.2000.90.2.171>.

FORTES, J.F. Principais doenças. In: RASEIRA, Maria do Carmo Bassols; CENTELLAS-QUEZADA, Alberto. **Pêssego: Produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p. 107-114.

FORTES, J.F.; MARTINS, O.M. Sintomatologia e controle das principais doenças. In: MEDEIROS, Carlos Alberto Barbosa; RASEIRA, Maria do Carmo Bassols (Eds.). **A cultura do pessegueiro**. Brasília: Embrapa-SPI; Pelotas: Embrapa-CPACT, 1998. p.243-264.

FREDI, André Roberto de Oliveira e TINOCO, Luzineide Wanderley. Esfingolipídios: Metabólitos Bioativos e Modelos para o Planejamento de Fármacos. **Rev. Virtual Quim.** |Vol 7| |No. 4| |1384-1401| , maio 2015. DOI: 10.5935/1984-6835.20150076 . disponível em: <http://rvq.s bq.org.br/imagebank/pdf/v7n4a20.pdf>. Acesso em: 24 de julho 2018.

FULTON C.E.; BROWN, A.E. Use of SSU rDNA group-I intron to distinguish *Monilinia fructicola* from *M. laxa* and *M. fructigena*. **FEMS. Microbiology Letters**, v.157, n.2, p.307-312, 1997.

FULTON, C.E.; VAN LEEUWEN, G. C. M.; BROWN, A. E. Genetic variation among and within *Monilinia* species causing brown rot of stone and pome fruits. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, n.5, p.495-500, 1999.

GARDINER, Donald M et al. Early activation of wheat polyamine biosynthesis during *Fusarium* head blight implicates putrescine as an inducer of trichothecene mycotoxin production. **Bmc Plant Biology**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.289-289, 2010. Springer Nature.

<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-10-289>. Disponível em: <https://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-10-289>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

GARRIDO, Lucas da Ressurreição; SÔNEGO, Olavo Roberto. Doenças do pessegueiro na Região da Serra Gaúcha. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. 13 p. (Circular técnica, n. 61). Disponível: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/circular/cir061.pdf>>. Acesso em: 4 nov. 2017.

GEORGOPAPADAKOU, Nafsika H. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. **Current opinion in Microbiology**, [s.l.], v. 1, n. 5, p.547-557, out. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1369-5274\(98\)80087-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1369-5274(98)80087-8).

GIL, María I. et al. Antioxidant Capacities, Phenolic Compounds, Carotenoids, and Vitamin C Contents of Nectarine, Peach, and Plum Cultivars from California. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 50, n. 17, p.4976-4982, ago. 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf020136b>.

GLIESSMAN, Stephen R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. 2. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS, 2001. 653p.

GUPTA, Aditya K.; SAUDER, Daniel N.; SHEAR, Neil H.. Antifungal agents: An overview. Part I. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s.l.], v. 30, n. 5, p.677-698, maio 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0190-9622\(08\)81495-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0190-9622(08)81495-8).

GUPTA, Aditya K.; SHEAR, Neil H.. Terbinafine: An update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s.l.], v. 37, n. 6, p.979-988, dez. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0190-9622\(97\)70076-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0190-9622(97)70076-8).

HEDRICK, U. P. **The peaches of New**. Albany (New York): J. B. Lyon Company Printers, 1917. 541 p.

HOLST-JENSEN, Arne, KOHN, Linda M.; SCHUMACHER, Trond. Nuclear rDNA phylogeny of the Sclerotiniaceae. **Mycologia**, v.89, n.6, p.885-899, 1997.

HOLST-JENSEN, A. **Morphology and rDNA restriction site based phylogeny in the genus *Monilinia* (Sclerotiniaceae)**. Master's thesis, University of Oslo, Oslo, Norway.1992.

HONEY, Edwin E.. North American Species of *Monilinia*. I. Occurrence, Grouping, and Life- Histories. **American Journal Of Botany**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.100-106, fev. 1936. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2307/2436302>.

HONG, Chuanxue et al. Significance of Thinned Fruit as a Source of the Secondary Inoculum of *Monilinia fructicola* in California Nectarine Orchards. **Plant Disease**, [s.l.], v. 81, n. 5, p.519-524, maio 1997. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.1997.81.5.519>.

IBGE. SIDRA. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 12 ago. 2017.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análises de alimentos**.3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. 533p. (Volume 1).

IOOS, Renaud; FREY, Pascal. Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, n.4, p.373-378, 2000.

JACOMETTI, Giselle de Assis; MENEGHEL, Renata Fraxino de Almeida; YAMASHITA, Fábio. Aplicação de revestimentos comestíveis em pêssego (*Prunus persica*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.95-100, abr. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612003000100020>.

JARVIS, William R. Latent infection in pre- and postharvest environment. **HortScience**, Alexandria, v.29, n.7, p.749-751, 1994.

LANDGRAF, Frances A; ZEHR, Eldon I. Inoculum Sources for *Monilinia fructicola* in South Carolina Peach Orchards. **Phytopathology**, [s.l.], v. 72, n. 2, p.185-190, 1982. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-72-185>.

LANE, C. R.. A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa*, based on examination of cultural characters. **Eppo Bulletin**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.489-493, dez. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2338.2002.00595.x>.

LARENA, I. et al. Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. **Biological Control**, [s.l.], v. 32, n. 2, p.305-310, fev. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.10.010>.

LEGARDA-CEBALLOS, Ana et al. Trypanocidal Activity of Long Chain Diamines and Aminoalcohols. **Molecules**, [s.l.], v. 20, n. 6, p.11554-11568, 23 jun. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules200611554>.

LEGARDA-CEBALLOS, Ana L. et al. In vitro and in vivo evaluation of 2-aminoalkanol and 1,2-alkanediamine derivatives against *Strongyloides venezuelensis*. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.2-9, 28 jun. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1648-5>.

LIAO, Jiayu et al. Chemistry and biology of sphingolipids. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 61, n. 20, p.4715-4733, maio 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2005.02.075>.

LIU, Xiaoman et al. Oils extracted from *Eupatorium adenophorum* leaves show potential to control *Phythium myriotylum* in commercially-grown ginger. **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 5, p. e0176126, 3 maio 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0176126>.

LO, Hsiu-jung et al. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. **Cell**, [s.l.], v. 90, n. 5, p.939-949, set. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80358-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80358-x).

LUO, Y.; MORGAN, D. P.; MICHAILEDIS, T. J.. Risk analysis of brown rot blossom Blight of prune caused by *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, [s.l.], v. 91, n. 8, p.759-768, ago. 2001. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto.2001.91.8.759>.

MARINI, Francesca et al. Polyamine metabolism is upregulated in response to tobacco mosaic virus in hypersensitive, but not in susceptible, tobacco. **New Phytologist**, [s.l.], v. 149, n. 2, p.301-309, fev. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00017.x>.

MARTELLI, Giovanni P.; RUSSO, Marcello. Use of thin sectioning for visualization and identification of plant viruses. **Methods In Virology**, [s.l.], p.143-224, 1984. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-470208-0.50011-6>.

MARTINS, Marise C.; LOURENÇO, Sílvia A.; GUTIERREZ, Anita S.D.; JACOMINO, Angelo P.; AMORIM, Lilian. Quantificação de danos pós-colheita em pêssegos no mercado atacadista de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 5-10, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/fb/v31n1/a01v31n1.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

MAY-DE MIO Louise Larissa; GARRIDO Lucas da Ressureição, UENO, Bernardo. Doenças de fruteiras de caroço. In: MONTEIRO, LB, MAY-DE MIO, Louise Larissa; SERRAT, Beatriz Monte; MOTTA, Antônio Carlos; CUQUEL, Francine Lorena (eds.). **Fruteiras de caroço: uma visão ecológica**. Curitiba PR: Universidade Federal do Paraná. 2004. p. 169-221.

MAY-DE MIO, Louise Larissa; MOREIRA, Luciene; MONTEIRO, Lino; JUSTINIANO Junior. Infecção de *Monilinia fructicola* no período da floração e incidência de podridão parda em frutos de pessegueiro em dois sistemas de produção. **Tropical Plant Pathology**, [s.l.], v. 33, n. 3, p.227-234, jun. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1982-56762008000300008>.

MELLO, Sueli Correa Marques; REIS, Ailton; SILVA, João Batista Tavares da. **Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Fungos Filamentosos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 25 p. Série (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 335; Embrapa Hortaliças. Documentos, 134). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/149773/1/doc335-134.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

MERRILL, Alfred H.; SANDHOFF, Konrad. Chapter 14 Sphingolipids: metabolism and cell signaling. **Biochemistry Of Lipids, Lipoproteins And Membranes, 4th Edition**, [s.l.], p.373-407, 2002. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7306\(02\)36016-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7306(02)36016-2).

MORDUE J.E.M. *Sclerotinia fructicola*, *Sclerotinia fructigena*, *Sclerotinia laxa*. Descriptions of pathogenicfungi and bacteria. No. 616, 617, 618. **CAB International**, Oxford: UK. 1979

MOREIRA, Josino C. et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.299-311, 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-81232002000200010>.

MOREIRA, Luciene Martins. **Alternativas de controle integrado da podridão parda do pessegueiro**. 2005. 113p. Tese (Doutorado). Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005. Disponível em: <<http://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/3536>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

MOREIRA, Luciene Martins; MIO, Louise Larissa May-de. Metodologia para detecção de infecções latentes de *Monilinia fructicola* em frutas de caroço. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 37, n.

3, p.628-633, jun. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782007000300005>.

NAVA, Gilmar Antônio; BRACKMANN, Auri. Efeito do pré-resfriamento e da umidade relativa da câmara sobre a qualidade pós-colheita de pêssegos (*Prunus persica* (L.) Batsch), cv. 'Chiripá'. **Revista Científica Rural**, Bagé, v.6, n.2, p.142-146, 2001. Disponível em: <<https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/viewFile/302/297>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

NCCLS - Clinical Laboratory Standards Institute Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Proposed Guideline - M. 44A. 2004;23 (6).

NEGRI, Genuino et al. Manejo da queima das flores e da podridão-parda do pessegueiro cultivado em sistema orgânico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.415-423, out. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452011000500054>.

NERI, Fiorella et al. Fungicidal activity of plant volatile compounds for controlling *Monilinia laxain* stone fruit. **Plant Disease**, [s.l.], v. 91, n. 1, p.30-35, jan. 2007. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pd-91-0030>.

NETA, Lindanor Gomes Santana et al. Tecnologias patenteadas para produção e frutas tropicais desidratadas. **Revista GEINTEC**, São Cristóvão, v.3, n.5, p.348-361, 2013. Disponível em: <<http://www.revistageintec.net/index.php/revista/article/view/311/361>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

NOGUEIRA, Juliana H.C. et al. *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 137, n. 1, p.55-60, 31 jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.017>.

NOVERR, M. C.. Production of Prostaglandins and Leukotrienes by Pathogenic Fungi. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 70, n. 1, p.400-402, 1 jan. 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.70.1.400-402.2002>.

OGAWA, J.M.; ZEHR, E.I.; BIGGS, A.R. Brown rot. In: OGAWA, Joseph M. et al. (Ed.). **Compendium of Stone Fruit Diseases**. Saint Paul: APS, cap 1, 1995. p. 7-10.

OEPP/EPPO, 2003. Distribution maps of quarantine pests for Europe. Disponível em: www.EPPO.org, 2003. Acesso em: 06 mai. 2017.

OLMO, Esther del et al. Leishmanicidal activity of some aliphatic diamines and amino-Alcohols. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.659-662, fev. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-894x\(01\)00837-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-894x(01)00837-x).

OLMO, Esther del et al. Simple dihydrosphyngosine analogues with potent activity against MDR-*Mycobacterium tuberculosis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 19, n. 19, p.5764-5768, out. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.07.147>.

OLMO, Esther del et al. Diamine and amino alcohol derivatives active against *Trypanosoma brucei*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.440-443, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.10.108>.

OLMO, Esther del et al. Efficacious in vitro and in vivo effects of dihydrosphingosine-ethambutol analogues against susceptible and multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Archives Of Medical Research**, [s.l.], v. 47, n. 4, p.262-270, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2016.07.004>.

PANSERA-ESPINDOLA, Bruno, **Indução de resistência e vaporização de óleos essenciais no controle de podridões pós-colheita em pêssegos Chimarrita**, 2017. 83f. Tese (Doutorado) – Produção Vegetal, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de São Catarina, 2017. Disponível em: <http://www.cav.udesc.br/arquivos/id_submenu/988/tese_bruno_pansera_espindola_digital.pdf>. Acesso em: 23 mai. 2018.

PARKS, Leo W.; LORENZ, R. Todd; CASEY, Warren M.. Functions for sterols in yeast membranes. **Emerging Targets In Antibacterial And Antifungal Chemotherapy**, [s.l.], p.393-409, 1992. Springer US. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-3274-3_15.

PÂRVU, Marcel; PÂRVU, Alina E. Parasitic fungi Sclerotiniaceae: morphology and ultrastructure. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). *Microscopy: advances in scientific research and education*. Espanha: Formatex Research Center, 2014. p.530-537. Disponível em: <<http://www.formatex.info/microscopy6/book/530-537.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2018.

PENROSE, Lj; TARRAN, J; WONG, A-l. First record of *Sclerotinia laxa* Aderh. Ruhl. in New South Wales: differentiation from *S. fructicola* (Wint.) Rehm. by cultural characteristics and electrophoresis. **Australian Journal Of Agricultural Research**, [s.l.], v. 27, n. 4, p.547-556, 1976. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/ar9760547>.

PIZZUOLO, P. H; CHILOSI, G; BALMAS, V. et al. Variations in the molecular and physiological characteristics and the virulence of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa* isolates. **Phytopathol. Mediterranea**, v.45, p.139-152, 2006. Disponível em: <<http://www.fupress.net/index.php/pm/article/view/1825/1760>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

PRUSKY, Dov. Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review Of Phytopathology**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.413-434, set. 1996. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.413>.

RASEIRA B., et. al. 2014. Polyphenolics from peach (*Prunus persica* var. Rich Lady) inhibit tumor growth and metastasis of MDA-MB-435 breast cancer cells in vivo, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25 (7), p. 796-800.

RASEIRA, M.C.B.; NAKASU, B.H. Cultivares: descrição e recomendação. In: MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M.C.B. (Ed.). **A cultura do pessegueiro**. Brasília: EMBRAPA, SPI; Pelotas: EMBRAPA, CPACT, 1998. p. 29-97.

RASOOLI, Iraj; ABYANEH, Mehdi Razzaghi. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.479-483, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2003.07.002>.

RIBEIRO, Raul de Lucena Duarte. Resíduos de agrotóxicos e piretróides nos alimentos e sua relação com doenças no homem. O problema dos resíduos de agrotóxicos nos alimentos: um enfoque agrônômico, político e estratégico. 2001. Disponível em:<<http://www.planetaorganico.com.br/trablucen.htm>>. Acesso em: 3 nov. 2015.

ROMÁN, Elvira et al. MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. **Trends In Microbiology**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.181-190, abr. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2007.02.001>.

ROMBALDI, Cesar Valmor et al. Armazenamento de pêsegos (*Prunus persica* L.), cultivar Chiripá, em atmosfera controlada. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.43-47, fev. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782002000100008>.

SACHS, S.; CAMPOS, A.D. O pessegueiro. In: MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M.C.B. **A cultura do pessegueiro**. Brasília: EMBRAPA, SPI; Pelotas: EMBRAPA, CPACT, 1998. p. 13-19.

SALLES, L.A.B. Principais pragas e seu controle. In: RASEIRA, M.C.B; CENTELLASQUEZADA, A. Pêssego: Produção. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 123- 135. 2003

SANTOS, Juliano dos; RASEIRA, Maria do Carmo Bassols; ZANANDREA, Ilisandra. Resistência à podridão parda em pessegueiro. **Bragantia**, [s.l.], v. 71, n. 2, p.219-225, 26 jul. 2012. Fap UNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0006-87052012005000022>.

SCHMIDT, R.R.; VANKAR Y. D. Chemistry of glycosphingolipids—carbohydrate molecules of biological significance. **Chem. Soc. Rev.** 29, 201, 2000.

SCHMITZ, Axel; RIESNER, Detlev. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 354, n. 2, p.311-313, jul. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2006.03.014>.

SEN, Alok; BERGVINSON, David; MILLER, S. Shea et al. Distribution and microchemical detection of phenolic acids, flavonoids and phenolic acid amides in maize kernels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1879-1883, 1994. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf00045a009>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

SHARMA, Neeta; TRIPATHI, Abhishek. Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 22, n. 6, p.587-593, 24 jan. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-005-9075-3>.

SNYDER C.L.; JONES A. L. Genetic variation between isolates of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* isolated from cherries in Michigan. **Canadian Journal of Plant Pathology** 21: 70– 77. 1999.

SOUZA, Andrea Dantas; SAMARTINI, Cristiano; STIVAL, Mariana Matsien.; DOIMO, Nathali; CAMILO, Simone Bragantini; BUSTOS, L.A.; ESCARCENA, Ricardo.; OLMO,

Ester.; SAN FELICIANO, Arturo. Avaliação *in vitro* de esfingoanálogos visando o controle de *Penicillium digitatum*. In: **I Congresso Brasileiro De Pós-Colheita**, Recife, UFPE, 2012.

SOUZA, Davi Carvalho de. **Progresso temporal e padrão espacial de epidemias da podridão parda do pessegueiro**. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Área de Concentração em Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006.

SOUZA, D.C.; FAZZA, A.C.; CAMARGO, L.A.; MIO, L.M.; ANGELI, S.S.; AMORIM, L. First report of *Monilinia laxa* causing brown rot on peaches in Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, (suplemento), v. 98, n. 6, p. S148-S149, 2008.

SPURGEON, D.J.; HOPKIN, S.P.; JONES, D.Y. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 84, n. 2, p.123-130, 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0269-7491\(94\)90094-9](http://dx.doi.org/10.1016/0269-7491(94)90094-9).

TAKAHASHI, Yoshihiro. The role of polyamines in plant disease resistance. **Environment Control In Biology**, [s.l.], v. 54, n. 1, p.17-21, 2016. Japanese Society of Agricultural, Biological and Environmental Engineers and Scientists. <http://dx.doi.org/10.2525/ecb.54.17>.

THOMIDIS, Thomas; MICHAILIDES, Themis; EXADAKTYLOU, Efstathia. Contribution of Pathogens to Peach Fruit Rot in Northern Greece and their Sensitivity to Iprodione, Carbendazim, Thiophanate-methyl and Tebuconazole Fungicides. **Journal Of Phytopathology**, [s.l.], v. 157, n. 3, p.194-200, mar. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2008.01469.x>.

VAN LEEUWEN, G.C.M.; VAN KESTEREN, H.A. Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.) on the basis of quantitative characteristics. **Canadian Journal of Botany**, [s.l.], v. 76, n. 12, p.2042-2050, dez. 1998. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/b98-183>.

VILLARINO, M. et al. Primary Inoculum Sources of *Monilinia* spp. in Spanish peach orchards and their relative importance in brown rot. **Plant Disease**, [s.l.], v. 94, n. 8, p.1048-1054, ago. 2010. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-94-8-1048>.

WALTERS, Dale R. Polyamines in plant–microbe interactions. **Physiological and molecular plant pathology**, [s.l.], v. 57, n. 4, p.137-146, out. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/pmpp.2000.0286>.

WALTERS, Dale R. Polyamines and plant disease. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 64, n. 1, p.97-107, set. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00329-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00329-7).

WHITE, T. J., T; BRUNS, S. LEE; J. W. TAYLOR. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A., D. H.; GELFAND, J. J. Sninsky; WHITE, T. J. (eds). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press, Inc., 1990. p. 315-322.

WILSON, Charles L. Fruit Volatiles Inhibitory to *Monilinia fructicola* and *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, [s.l.], v. 71, n. 4, p.316-319, 1987. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pd-71-0316>.

YUN, Jung Min et al. Efficient Synthesis of Enantiomerically Pure 2-Acylaziridines: Facile Syntheses of N-Boc-safingol, N-Boc-d-erythro-sphinganine, and N-Boc-spisulosine from a Common Intermediate. **The Journal Of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 68, n. 20, p.7675-7680, out. 2003. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jo034755a>.

ZACCHINO, S. Estratégia para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R.A. E CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 435-479.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; PEREIRA, A.A.; CHAVES, G.M. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Eds.) **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora. 1997. p. 83-180.