

Eficácia dos extratos de romã no controlo de doenças pós-colheita em laranjas ‘Navelina’

Diana Tereso Ferreira¹, Miguel Salazar², Carla Nunes², David Tereso Ferreira¹, Elisabete Rebocho¹ & Lluís Palou³

¹ Frutas Tereso - Comércio de Frutos e Hortícolas, Lda.; Ferrarias, 8365-084 Algoz; diana@frutastereso.pt

² Agro-On; Centro Empresarial Gambelas E-2, 8005-139 Faro; miguel.salazar@agro-on.pt

³ Laboratorio de Patologia, Centre de Tecnologia Postcollita (CTP). IVIA. 46113 Montcada, Valencia; palou_llu@gva.es

Resumo

O controlo de doenças pós-colheita através da utilização de produtos fitofarmacêuticos é cada vez mais difícil, com limitações estritas, perda de eficácia e a exigência pública e dos mercados de produtos com menos ou até livres de resíduos.

Como tal, o sector tem a necessidade de minimizar de forma eficaz as perdas provocadas por podridões por fungos patogénicos pós-colheita nos citrinos, com uma diminuição da utilização de fitofarmacêuticos. A literatura indica que diferentes extratos naturais, como extratos da pele de romã, apresentam propriedades de controlo de crescimento de *Penicillium digitatum*.

O objetivo geral do trabalho foi verificar a eficácia de extratos de romã na redução das perdas pós-colheita dos citrinos que a Frutas Tereso comercializa, provocadas pelo principal fungo patogénico em pós-colheita, *P. digitatum*.

Obtiveram-se extratos de água e metanol de pele de romã das variedades ‘Acco’ ‘Wonderful’ e ‘Mollar de Elche’ e realizaram-se *screening* secundário e ensaio semi-comercial em laranjas ‘Navelina’.

No *screening* secundário em laranjas ‘Navelina’, o tratamento com extrato aquoso da variedade de romã ‘Wonderful’ a uma concentração de resíduo seco de 1,2% *versus* controlo permitiu uma redução da incidência de podridões superior a 47% aos 7 dias e superior a 37% aos 10 dias. Com o dissolvente metanol a uma concentração de resíduo seco de 2%, a redução da incidência de podridões em relação ao controlo foi superior a 47% aos 7 e aos 10 dias. No ensaio semi-comercial, o tratamento Wonderful-Metanol-2% foi o mais eficaz; a redução da incidência, esporulação e severidade, com este tratamento foi de 33%, 44% e 40%, respetivamente.

Os testes realizados indicaram que os tratamentos com extratos de romã, particularmente extratos metanólicos de ‘Wonderful’ a 2%, são eficazes para a redução da incidência, severidade, e esporulação das podridões causadas por *P. digitatum* em ‘Navelina’.

Palavras-Chave: Frutas Tereso, ensaio semi-comercial, *Penicillium digitatum*, *screening* secundário, ‘Wonderful’.

Abstract

Efficacy of pomegranate extracts on controlling post-harvest diseases in ‘Navelina’ oranges

Controlling post-harvest diseases through the use of plant protection products is becoming increasingly difficult, with strict limitations, loss of effectiveness and the public and markets demand for less or even residue-free products.

As so, horticultural sector needs to effectively minimize post-harvest pathogenic fungal rot losses in citrus fruits with a reduced use of plant protection products. The

literature indicates that different natural extracts, such as pomegranate skin extracts, have growth control properties of *Penicillium digitatum*.

The objective of this work was to verify the effectiveness of pomegranate extracts in reducing postharvest losses of citrus fruits that Frutas Tereso markets, caused by the main postharvest pathogenic fungus *P. digitatum*.

Water and methanol extracts of pomegranate skin from the varieties 'Acco' 'Wonderful' and 'Mollar de Elche' were obtained and secondary screening and semi-commercial testing on 'Navelina' oranges were performed.

In secondary screening in 'Navelina' oranges, treatment with aqueous extract of the 'Wonderful' pomegranate variety at a dry residue concentration of 1.2% versus control allowed a reduction in rot incidence of over 47% at day 7 and over 37% at day 10. With methanol solvent at a dry residue concentration of 2%, the reduction in the incidence of decay over the control was greater than 47% at days 7 and 10. In the semi-commercial trial, Wonderful-Methanol-2% treatment was the most effective: the reduction in incidence, sporulation and severity with this treatment was 33%, 44% and 40%, respectively.

Tests indicate that pomegranate extract treatments, particularly 2% 'Wonderful' methanolic extracts, are effective in reducing the incidence, severity, and sporulation of *P. digitatum* rot in 'Navelina'.

Keywords: Frutas Tereso, *Penicillium digitatum*, secondary screening, semi-commercial testing, 'Wonderful'.

Introdução

O sector agrícola português tem crescido consideravelmente nos últimos anos: as exportações deste sector aumentaram quase 10% em 2014 e as importações diminuíram perto de 5%, mantendo-se esta tendência em 2015. O Algarve é a principal região produtora de citrinos de Portugal, representando 80% da produção nacional e gerando mais de 30% do Produto Agrícola Bruto Regional.

A comercialização de produtos hortofrutícolas através de centrais de embalamento é uma operação obrigatória para normalizar estes produtos, e necessária para acrescentar valor aos mesmos. A Frutas Tereso é um dos principais comercializadores nacionais de citrinos, presente no mercado desde há várias décadas, que comercializa mais de 25 000 000 kg de citrinos por campanha.

Um das principais preocupações da Frutas Tereso e do sector são as perdas pós-colheita: perdas de peso, fisiopatias e especialmente podridões, que podem afetar até 20% da produção. As podridões, para além de resultar em perdas diretas, são causa de reclamações e devoluções cujo custo pode ser ainda maior do que a perda direta. Entre estas, os ataques do fungo *Penicillium digitatum*, causador da podridão verde, representam mais do que 80% das perdas por podridões.

Os métodos habitualmente utilizados para o controlo destas doenças consistem na aplicação de fungicidas específicos, cuja utilização tem vindo a ser cada vez mais discutida e a sua utilização cada vez mais limitada por diferentes motivos, quer de eficácia, quer de segurança alimentar e ambiental (Salazar *et al.*, 2009b), o que tem levado a pressões por parte dos clientes e dos consumidores para reduzir ou eliminar determinados produtos fitofarmacêuticos (Nunes, 2010). Estes produtos e os seus derivados persistem nos produtos agrícolas, no solo, na água e no ar, sendo alguns potenciais agentes nocivos, tanto para o homem, como para o ambiente.

Neste âmbito, têm sido realizados diversos ensaios que relatam resultados satisfatórios com a utilização de produtos alternativos aos fungicidas para o controlo de podridões, como substâncias GRAS (*Generally Recognised As Safe*) (Salazar *et al.*, 2007;

2009a). Entre estas, encontram-se os extratos naturais de plantas, os quais têm sido usados desde antigamente nos alimentos, devido, entre outras, às suas propriedades antimicrobianas (Valencia-Chamorro *et al.*, 2008; Nunes, 2010)). A literatura científica identifica as propriedades ao nível do controlo do crescimento de *P. digitatum* de diferentes extratos naturais, como óleos essenciais de cravinho e tomilho, e também de extratos da pele de romã, como por exemplo da variedade ‘Mollar de Elche’, produzida em Valência, Espanha (Yahyazadeh *et al.*, 2008; Taberner, 2011). A romã é um fruto conhecido pelas suas múltiplas propriedades benéficas para a saúde humana, como a prevenção de determinados cancros e doenças vasculares, as quais são atribuídas à sua riqueza em compostos com atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica (Jayaprakasha *et al.*, 2006). Dos compostos com capacidade antifúngica, alguns estão situados na pele da romã (Al-Zoreky, 2009; Tayel *et al.*, 2009a, 2009b; Endo *et al.*, 2010).

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da utilização de extractos de romã no controlo das podridões provocadas pelo principal fungo patogénico em pós-colheita, *P. digitatum*, fazendo face à necessidade de minimizar as perdas observadas em pós-colheita nos citrinos da Frutas Tereso através da eliminação da utilização de produtos fitofarmacêuticos sintetizados quimicamente.

Material e Métodos

Obtenção dos extratos de diferentes variedades de romã

Para obtenção dos extratos de romã, foi adaptado o protocolo desenvolvido por Taberner (2011), tendo sido utilizados dois dissolventes, metanol e água, modificando o protocolo descrito por Taberner (2011).

As variedades selecionadas foram a ‘Acco’ e a ‘Wonderful’, da produção própria da Frutas Tereso, e uma variedade controlo, ‘Mollar de Elche’, de origem em Valência (Espanha), uma vez que a esta já é reconhecida eficácia no controlo da podridão causada pelo *P. digitatum*.

Escolheram-se as romãs em perfeito estado sanitário e descascaram-se. Procedeu-se à secagem das cascas em estufa ventilada entre 50 a 60 °C durante aproximadamente 48 h e, em seguida, trituraram-se as cascas secas até obter um pó muito fino, que se armazenou em vácuo ou lugar seco e protegido da luz até à sua extração.

Para a extração, colocou-se este pó (25 g) num Erlenmeyer e adicionou-se 100 mL de dissolvente (água - extrato aquoso - ou metanol - extrato metanólico) e foi ao agitador orbital a 200 rpm, à temperatura ambiente, durante 1 h. Em seguida foram centrifugados a 12 000 rpm e a 4 °C durante 20 min. O sobrenadante foi filtrado em vácuo com um funil de Büchner e filtro Whatman 41 e conservou-se em frio. O resíduo da centrifugação foi resubmetido a extração. Para tal, colocou-se em 50 mL de dissolvente e levou-se a agitar nas mesmas condições durante 1 h, após o qual se centrifugou e filtrou. Os dois filtrados foram misturados e secos em evaporador rotativo e completou-se a secagem num exsiccador a vácuo até alcançar peso constante.

Obtidos os resíduos secos, estes redissolveram-se em água até obter um resíduo seco de entre 3 e 8%, dependendo do dissolvente. Os extratos líquidos conservaram-se a -80 °C até serem utilizados nos ensaios. Para determinar a concentração em resíduo seco dos extratos, tomaram-se alíquotas de 1 mL dos extratos em cápsulas de porcelana, que se colocaram na estufa a 105 °C até alcançar peso constante e pesou-se numa balança de precisão.

Screening secundário

Os ensaios foram realizados em laranjas da variedade ‘Navelina’ procedentes de pomares da Frutas Tereso. Os frutos foram utilizados um a dois dias após a colheita e sem qualquer tratamento de pós-colheita. Os frutos são misturaram-se entre si aleatoriamente,

desinfetaram-se durante 4 min com hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5%, tendo sido enxaguados abundantemente com água e deixados a secar. A fruta colocou-se em alvéolos de plásticos e em caixas de madeira.

Posteriormente, foi realizada a inoculação destas laranjas, através de uma suspensão de *P. digitatum* preparada a partir de uma cultura do fungo de uma estirpe isolada da central de Frutas Tereso e com comprovada capacidade de infeção sobre laranjas e clementinas. A estirpe usada foi mantida em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) a 25 ± 1 °C e repicada semanalmente. A partir de uma cultura com aproximadamente 10 dias, retiraram-se esporos do fungo com o auxílio de uma asa de Kolle, para uma solução de água destilada com Tween 80 e agitou-se durante aproximadamente 3 min, com vista à dispersão e uniformidade de esporos na suspensão. Procedeu-se à contagem de esporos recorrendo ao uso de um hemacitómetro e procedeu-se à diluição da suspensão em água destilada com Tween 80 estéril, de modo a obter a concentração de 10^5 esporos/mL.

A fruta foi inoculada num ponto da zona equatorial, efetuando uma ferida com uma agulha de inoculação de 1 mm de diâmetro e 2 mm de profundidade, em aço inoxidável esterilizada. A agulha foi previamente submersa na suspensão de *P. digitatum*. Para evitar a acumulação de óleos da casca na suspensão e para manter a viabilidade do agente patogénico, a suspensão foi renovada por cada 20 frutos inoculados. Os frutos foram armazenados à temperatura de 20 ± 2 °C e 85% de humidade relativa (HR) durante 24 h, após as quais se aplicaram os diferentes tratamentos com os extratos.

Estes tratamentos foram formulados no dia da aplicação a partir dos extratos originais, que, após a descongelação, se diluíram em água, de modo a obter as concentrações de 1,2%, 2% e 3%, para cada um dos extratos testados: Mollar-Água, Mollar-Metanol, Acco-Água, Acco-Metanol, Wonderful-Água e Wonderful-Metanol. A unidade amostral foi composta por cinco laranjas, tendo-se realizado quatro repetições por cada tratamento.

Em cada ferida de laranja inoculou-se 30 µL de extrato. Como tratamento controlo usaram-se laranjas também feridas e inoculadas com *P. digitatum* a 10^5 esporos/mL com 30 µL de água. A fruta armazenou-se durante 10 dias a 20 ± 2 °C e 85% HR. Após sete e 10 dias desde a inoculação do agente patogénico, determinou-se a incidência (percentagem de frutos podres) e severidade (diâmetro da podridão) da doença, assim como a evolução da esporulação do fungo nas feridas. Quatro dias após o tratamento avaliou-se a presença de fitotoxicidade (manchas, perfurações...) na zona de inoculação e aplicação do extrato.

Avaliação à escala semi-comercial

Este ensaio foi realizado em laranjas da variedade ‘Navelina’ procedentes de pomares da Frutas Tereso. Os frutos foram utilizados um a dois dias após a colheita e sem qualquer tratamento pós-colheita. As laranjas foram selecionadas, preparadas e inoculadas como descrito anteriormente nos ensaios de *screening* secundário, tendo sido utilizada uma unidade amostral composta por 10 laranjas e realizadas quatro repetições por cada tratamento.

Após 24 h de inoculação de *P. digitatum* a 10^5 ufc/mL aplicaram-se os tratamentos selecionados no *screening* secundário. Estes foram formulados no mesmo dia da aplicação, a partir dos extratos originais, que após a descongelação se diluíram para obter a concentração pretendida. A aplicação dos tratamentos realizou-se mediante banhos a temperatura ambiente: as laranjas foram colocadas em malhas próprias para fruta e foram submersas nas formulações dos extratos durante 150 s. Como tratamento controlo banhou-se a fruta, previamente ferida e inoculada com *P. digitatum* a 10^5 esporos/mL, em água, também durante 150 s. A fruta armazenou-se durante 7 dias a 20 ± 2 °C e 85% HR. Após este tempo determinou-se a incidência e severidade da doença, assim como a

evolução da esporulação do fungo nas feridas. Quatro dias após o tratamento avaliou-se a presença de fitotoxicidade na zona de inoculação e aplicação do extrato.

Análise estatística

Para cada ensaio realizou-se a análise de variância (ANOVA) da incidência e da severidade, ou então da redução da incidência e redução da severidade da doença em relação ao controlo, mediante Statgraphics Plus 4.1. Na análise da severidade ou redução da severidade apenas se consideraram as feridas infetadas. Para a análise da incidência, os dados foram transformados ao arco seno da raiz quadrada da percentagem de frutos podres. Quando ocorreram diferenças estatísticas significativas, as médias separaram-se mediante a prova Mínima Diferença Significativa (MSD) com um nível de confiança de 95%.

Resultados e Discussão

Screening secundário

Os resultados da incidência, esporulação e severidade da podridão verde nas laranjas sujeitas aos diferentes tratamentos encontram-se no Quadro 1. Conforme se verifica, as formulações em que a incidência de *P. digitatum* foi estatisticamente menor, foram a de extrato de romã da variedade 'Wonderful' com dissolvente água a uma concentração de resíduo seco de 1,2% (Wonderful-Agua-1,2%) e com o dissolvente metanol a uma concentração de resíduo seco de 2% (Wonderful-Metanol-2%), permitindo uma redução da incidência em relação ao controlo, superior a 47% para ambos os tratamentos após sete dias de inoculação e de 37% para Wonderful-Agua-1,2% e 47% para Wonderful-Metanol-2% após 10 dias de inoculação. Os tratamentos com Mollar-Agua-3%, Acco-Agua-1,2%, Acco-Agua-2%, por outro lado, apresentaram incidências muito altas, com reduções quase nulas do número de frutos. Como tal, os tratamentos com extratos metanólicos permitiram reduções superiores da incidência da podridão verde em laranja 'Navelina' face aos extratos aquosos. Estes resultados são comparáveis com os obtidos por Tayel *et al.* (2009a) na avaliação da actividade antifúngica de extratos de pele de romã em ensaios de difusão em agar, onde o extrato metanólico foi o mais eficaz no controlo do crescimento de *P. digitatum*.

No que respeita à avaliação da esporulação, apesar de não se terem observado diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, foram também os tratamentos com extratos Wonderful-Agua-1,2% (35% aos sete dias e 60% aos 10 dias) e Wonderful-Metanol-2% (45% aos 7 dias e 60% aos 10 dias) que permitiram as maiores reduções face ao controlo.

Os tratamentos que apresentaram menor diâmetro de podridão (severidade) foram o Wonderful-Agua-3%, Acco-Metanol-1,2% e Acco-Metanol-3%, com reduções superiores a 57% em relação ao controlo. Portanto, globalmente, os tratamentos Wonderful-Agua-1,2%, Wonderful-Metanol-2% e Acco-Agua-3% foram os que menor incidência, esporulação e severidade apresentaram, com reduções destes parâmetros na ordem dos 50%, face ao controlo. Estes resultados estão de acordo com Taberner (2011), que observou em ensaios em clementina 'Ortanique' e laranja 'Lanelate' que a aplicação de extratos de romã 'Mollar de Elche' era menos eficaz no controlo da podridão nos extratos aquosos.

Não se observaram danos ou fitotoxicidade na epiderme dos frutos aos quatro dias após a aplicação dos tratamentos.

Avaliação à escala semi-comercial

Nesta fase do estudo, verificou-se a eficácia dos extratos de romã com melhor desempenho no ensaio de *screening* secundário numa situação semelhante à utilizada na

central hortofrutícola da Frutas Tereso. Após uma avaliação integrada dos resultados obtidos nessa primeira fase do estudo, decidiu-se utilizar o tratamento Wonderful-Metanol-2% e testar o tratamento Mollar-Metanol-2% como referência.

A análise estatística indica que apenas o tratamento em banho com extrato metanólico de romã da variedade ‘Wonderful’ a 2%, apresentou diferenças significativas em relação ao controlo, quer ao nível da incidência, quer da esporulação e da severidade de *P. digitatum*, mais concretamente, permitiu reduções de 33%, 44% e 20% face ao controlo, respectivamente (quadro 2 e figura 1). Enquanto o tratamento com extrato metanólico da variedade ‘Mollar de Elche’ apenas reduziu em 15% a incidência, em 21% a esporulação e em 24% a severidade. Estes resultados concordam com os obtidos por Taberner (2011) e por Tayel et Al. (2009a,b) em que a imersão de laranja e limão, respectivamente em extratos de pele de romã durante 3 min reduziu o desenvolvimento da podridão verde.

Também neste ensaio, não se observaram danos ou fitotoxicidade na epiderme dos frutos aos quatro dias após a aplicação dos tratamentos.

Conclusões

Com os procedimentos executados obtiveram-se extratos de pele de romã das variedades ‘Acco’ e ‘Wonderful’ da Frutas Tereso e ‘Mollar de Elche’ de Valencia.

Os testes realizados indicam que os tratamentos com extratos de romã, particularmente extratos metanólicos de ‘Wonderful’ a 2%, são eficazes para a redução da incidência, esporulação e severidade das podridões causadas por *P. digitatum*, o fungo mais frequentemente associado a podridões pós-colheita em centrais hortofrutícolas. Adicionalmente, a utilização destes extratos não se associou a danos ou fitotoxicidade na epiderme dos frutos estudados.

Os controlos da podridão obtidos não são equivalentes aos habituais num tratamento fitofarmacêutico convencional (composto por fungicidas específicos), mas podem contribuir para reduzir a quantidade utilizada destes produtos e, assim, reduzir a quantidade de resíduos fitofarmacêuticos presentes na fruta.

Como tal, poderá ser interessante o desenvolvimento de ensaios que combinem a utilização de extratos de romã e outras matérias fungicidas, fitofarmacêuticos ou alternativos.

Referências

- Al-Zoreky, N.S. 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134:244-248.
- Endo, E.H., Córtez, D.A.G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V. & Filho, B.P.D. 2010. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. 2010. *Research in Microbiology*, 161:534-540.
- Jayaprakasha, G.K., Negi, P.S. & Jena, B.S. 2006. Antimicrobial activities of pomegranate. En: Seeram, N.P., Schulman, R.N., Heber, D. (eds). *Pomegranates: ancient roots to modern medicine*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp.167-183.
- Nunes, C. 2010. New developments in safety methods to control postharvest fruit decays. Nunes, C. (ed). *Environmentally Friendly and Safe Technologies for Quality of Fruits and Vegetables* ISBN: 978-989-8472-01-4. Universidade do Algarve, Faro, pp:133-145.
- Salazar, M., Manso, T., Graça, A. & Nunes, C. 2009a. Potencial del uso de aditivos alimentarios y substancias de bajo riesgo para el control en poscosecha de los patógenos *Penicillium digitatum* y *P. expansum*. *Actas de Horticultura* 54: 1208-1211.

- Salazar, M., Manso, T., Simões, D., Monteiro, D., Afonso, M. & Nunes, C. 2007. Studies of physicochemical methods to control *Penicillium expansum* and *P. digitatum*. *Proc. International Congress Novel Approaches for the Control of Postharvest Diseases and Disorders*: 409-413.
- Salazar, M., Vero, S., Mendes, S., Plaza, P. & Nunes, C. 2009b. Resistencia a los fungicidas Imazalil y Tiabendazol en las centrales citrícolas del Algarve. *Actas de Horticultura* 54: 268-271.
- Taberner; V. 2011. *Aplicación de extractos de granada para el control de podredumbres en poscosecha de frutos cítricos*. Máster en Gestión y Seguridad Alimentaria. IVIA. Universitat Politècnica de València. 19 pp
- Tayel, A.A., El-Baz, A.F., Salem, M.F. & El-Hadary, M.H. 2009a. Potential applications of pomegranate peel extract for the control of citrus green mould. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116:252-256.
- Tayel, A.A., El-Tras, W.F. 2009b. Anticandidal activity of pomegranate peel extract aerosol as an applicable sanitizing method. *Mycoses*, 53:117-122
- Valencia-Chamorro, S.A., Palou L., del Río, M.A., Pérez-Gago, M.B. 2008. Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* by hydroxypropyl methylcellulose-lipid edible composite films containing food additives with antifungal properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:11270-11278.
- Yahyazadeh, M., Omidbaigi, R., Zare, R., Taheri, H. 2008. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24:1445-1450.