

**FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA
MESTRADO PROFISSIONAL EM
CONTROLE DE DOENÇAS E PRAGAS DOS CITRUS**

ALEXANDRE PALOSCHI

**Bactericidas alternativos e redução tempo de exposição para a
descontaminação de frutos de citros em pós-colheita contra
Xanthomonas citri subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico**

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da
Citricultura como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Fitossanidade

Orientador: Dr. Franklin Behlau

**Araraquara
Março 2019**

ALEXANDRE PALOSCHI

**Bactericidas alternativos e redução no tempo de exposição para a
descontaminação de frutos de citros em pós-colheita contra
Xanthomonas citri subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico**

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da
Citricultura como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Fitossanidade

Orientador: Dr. Franklin Behlau

**Araraquara
Março 2019**

ALEXANDRE PALOSCHI

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da Citricultura como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

Araraquara, 20 de março de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Franklin Behlau (Orientador)
Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS, Araraquara/SP

Dra. Lenice Magali Nascimento
Associação Brasileira de Citro de Mesa – ABCM, Araras/SP

Dr. Silvio Aparecido Lopes
Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS, Araraquara/SP

Bactericidas alternativos e redução no tempo de exposição para a descontaminação de frutos de citros em pós-colheita contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico

Autor: Alexandre Paloschi
Orientador: Dr. Franklin Behlau

Resumo

Com a mudança na legislação em 2016 e adoção do sistema de mitigação de risco para a praga cancro cítrico no estado de São Paulo, a higienização de frutos em pós-colheita passou a ser obrigatória para viabilizar a comercialização de frutas de citros *in natura* entre os estados da federação e a outros países. Contudo, apenas o hipoclorito de sódio é permitido no Brasil para a descontaminação de frutos de citros contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), bactéria causadora do cancro cítrico. O objetivo deste trabalho foi avaliar os bactericidas: Dioxiplus (dióxido de cloro), Frexus CH (oxicloreto de cálcio), Peracetic (ácido peracético) e o Pluron 444 A (hipoclorito de sódio), utilizado como referência, e tempo de exposição para descontaminação de frutos em pós-colheita contra Xcc. Os bactericidas foram avaliados quanto a capacidade de eliminar células viáveis de Xcc em calda após 0 ou 1 h de exposição e a eficiência na descontaminação de frutos de lima ácida ‘Tahiti’ contaminados artificialmente e naturalmente com Xcc em tempos de exposição de 1 ou 2 minutos. Todos os bactericidas avaliados apresentaram desempenhos similares. Enquanto tratamento controle utilizando apenas água apresentou 5 a 6 log₁₀ ufc/mL de Xcc após 0 ou 1 h de exposição, respectivamente, todos os bactericidas avaliados foram capazes de eliminar toda população de Xcc em mistura com água. Para os frutos tratados, independentemente do tempo de exposição, a quantidade de Xcc recuperada variou de 0,5 a 1,0 log₁₀ ufc/mL. Estes valores representam uma redução de 2 a 3 log₁₀ ufc/mL na quantidade de bactérias viáveis quando comparado ao controle negativo. O desempenho na higienização de frutos de pomares com cancro cítrico foi similar entre os bactericidas e todas as formulações promoveram a diminuição da população de Xcc de 1,3 a 1,8 para 0,1 a 0,3 log₁₀ ufc/mL, independentemente do tempo de exposição aos bactericidas. A inoculação em folhas de laranja demonstrou que suspensões de Xcc na concentração de até 2 log₁₀ ufc/mL não é eficiente para causar lesões de cancro cítrico, demonstrando que a quantidade de Xcc remanescentes em frutos após tratamento com bactericida não representa risco para disseminação da doença. Os bactericidas avaliados são eficientes para a descontaminação de frutos de citros contra Xcc em pós-colheita nos tempos de exposição aos bactericidas de 1 ou 2 minutos.

Palavras-chave: Higienização, Hipoclorito de sódio, Dióxido de cloro, Oxicloreto de cálcio, Ácido peracético.

Alternative bactericides and reduction of time of exposure for post-harvest decontamination of citrus fruit against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causal agent of citrus canker

Author: Alexandre Paloschi

Advisor: Dr. Franklin Behlau

Abstract

After the publication of the new legislation in 2016 and adoption of the risk mitigation system for the citrus canker in the state of São Paulo, the post-harvest sanitation of citrus fruit became mandatory to enable the commercialization and transport of citrus fruit to other states and countries. However, only sodium hypochlorite is allowed in Brazil for disinfection of citrus fruit against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), the causal agent of citrus canker. The objective of this study was to evaluate the bactericides Dioxiplus (chlorine dioxide), Frexus CH (calcium oxychloride), Peracetic (peracetic acid) e o Pluron 444 A (sodium hypochlorite), used as reference, and time of exposure for post-harvest disinfection of fruit destined to fresh market against Xcc. The bactericides were evaluated regarding the capacity to eliminate live Xcc in water after 0 or 1 h of exposure and the efficiency in disinfecting artificially and naturally contaminated 'Tahiti' acid lime fruit exposed to the bactericides for 1 or 2 minutes. All the evaluated bactericides presented similar performances. While the control using only water showed 5 to 6 log₁₀ cfu/mL of Xcc after 0 or 1 h of exposure, respectively, all bactericides were able to completely eliminate all the Xcc population immediately after exposition. In artificially contaminated fruit, the bactericides presented significant reductions of the population of Xcc after the sanitation. For treated fruit, regardless of the exposure time, the amount of recovered Xcc ranged from 0.5 to 1.0 log₁₀ cfu/mL. These populations represent a reduction of 2 to 3 log₁₀ cfu/mL in the amount of live bacteria when compared to the untreated control. The performance of the bactericides was also similar on fruit naturally contaminated with Xcc. There was no difference between the formulations and all formulations promoted the decrease of the Xcc population from 1.3-1.8 to 0.1-0.3 log₁₀ cfu/mL, regardless of the time of exposure. Inoculation of Xcc on orange leaves showed that suspensions at concentrations of up to 2 log₁₀ cfu/mL are not efficient to cause citrus canker lesions, demonstrating that the amount of Xcc remaining on fruit after treatment poses no risk of spreading of the disease. The evaluated bactericides are efficient for disinfecting citrus fruit against Xcc in post-harvest at the times of exposure of 1 or 2 minutes.

Keywords: Sanitation, Sodium hypochlorite, Chlorine dioxide, Calcium oxychloride, Peracetic acid.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Legislação de controle de cancro cítrico no estado de São Paulo	1
1.2 Descontaminação de frutos em pós-colheita.....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1 Bactericidas avaliados	14
2.2 Isolado bacteriano e condições de cultivo.....	14
2.3 Capacidade bactericida do produto contra <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	14
2.4 Descontaminação de frutos de citros contaminados artificialmente em laboratório por <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	15
2.5 Descontaminação de frutos de citros contaminados por <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> provenientes de pomares com cancro cítrico.....	16
2.6 Potencial infectivo de suspensões de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> em diferentes concentrações.....	17
2.7 Análise dos dados.....	18
3. RESULTADOS	19
4. DISCUSSÃO.....	24
5. CONCLUSÕES.....	28
REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

1.1 Legislação de controle de cancro cítrico no estado de São Paulo

Xanthomonas citri subsp. *citri* (Xcc), bactéria originária do Sudeste Asiático, é agente causal do cancro cítrico, uma das doenças mais importantes da citricultura mundial por reduzir a produtividade das plantas afetadas pela desfolha e pela queda prematura dos frutos (Gottwald et al., 2002; Behlau & Belasque, 2014). A doença afeta também a comercialização de frutos *in natura*, pois além de causar depreciação na aparência do fruto, restringe sua comercialização a outras regiões, pelo risco de disseminação do patógeno, principalmente aquelas sem ocorrência da doença (indenes). Os sintomas característicos do cancro cítrico nos frutos são lesões escuras, salientes e concêntricas que apresentam anéis circulares e rachaduras à medida que evoluem (Figura 1).

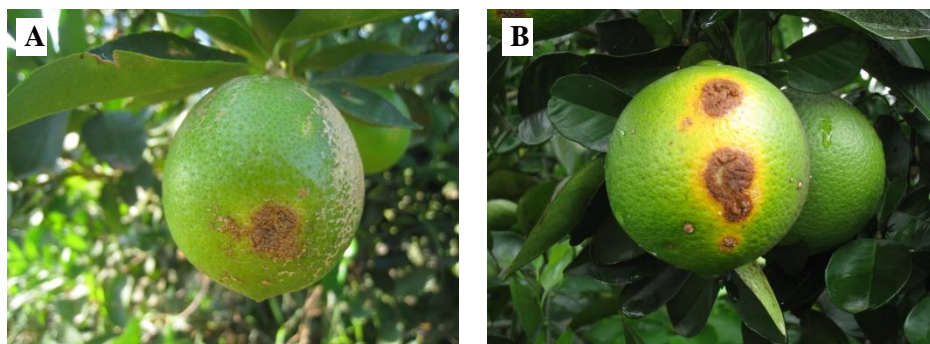


Figura 1. Lesões de cancro cítrico em fruto de lima ácida ‘Tahiti’ (*Citrus latifolia*) (A) e em fruto de laranja doce (*Citrus sinensis*) (B). Fonte: Fundecitrus.

A primeira constatação da bactéria causadora do cancro cítrico no continente americano ocorreu no Texas, Estados Unidos em 1910. Xcc foi introduzida nos EUA por mudas provenientes do Japão (Leite Júnior, 1990) e rapidamente disseminada a outros estados. Nos anos de 1912 e 1913, a doença se tornou epidêmica em viveiros da Flórida, que iniciou um programa de erradicação, o qual atingiu seu objetivo em 1943, quando foram encontradas as últimas plantas com cancro cítrico (Dopson, 1964; Leite Júnior, 1990; Schubert et al., 2001). Também nesta época, a doença foi relatada pela primeira vez na África do Sul e Austrália.

Na América do Sul, a primeira detecção do cancro cítrico ocorreu no Brasil em Presidente Prudente (SP) em março de 1957. Provavelmente o patógeno também foi introduzido por meio de material propagativo de citros contaminado proveniente do Japão (Bitancourt, 1957). A constatação da doença foi em lima ácida ‘Galego’ e a comprovação oficial realizada

pelo Instituto Biológico do Estado de São Paulo (IB), responsável na época pela Defesa Agropecuária no estado de São Paulo (Santos, 1991). Naquele ano, a doença que até então era considerada praga quarentenária ausente (A1 ou PQA), isto é, praga exótica de importância econômica potencial ainda não presente no país, se tornou uma praga quarentenária presente (A2 ou PQP), ou seja, praga de importância econômica potencial e presente no país, porém não amplamente distribuída e sob programa oficial de controle.

No mesmo ano, por meio de atos executivos e legislação, iniciou-se a “Campanha de Erradicação do Cancro Cítrico” no país. A primeira fase, que tinha caráter emergencial, ocorreu de março a novembro de 1957 e tinha como objetivo erradicar os focos iniciais da doença e consequentemente sua disseminação (Santos, 1991).

Essa fase de erradicação foi baseada no caso de sucesso de erradicação do cancro cítrico ocorrido anos antes nos Estados Unidos (Behlau & Belasque, 2014; Behlau et al., 2016) e constituiu na aplicação imediata de ações dedicadas à eliminação de focos iniciais e de todas as plantas de citros existentes em um raio mínimo de 12 metros a partir das plantas sintomáticas, inspeções por amostragem nas propriedades vizinhas e reinspeções nas áreas erradicadas após 90 dias (Santos, 1991). Além disso, outras ações complementares foram tomadas, como restrições à comercialização de frutas e mudas dessa região, instituição da obrigatoriedade de registro e inspeção de viveiros no estado, e proibição de instalação de novos viveiros e pomares de citros na região interdita, composta por 29 municípios. Essas ações tiveram ampla campanha de divulgação e conscientização em todo estado pela Secretaria da Agricultura com integração das secretarias da Justiça, Segurança Pública e Educação na região contaminada (Santos, 1991).

A avaliação das ações cinco meses após o início da campanha revelou incessante disseminação da doença na região interdita com relatos por parte dos produtores da ocorrência de plantas contaminadas antes dos 90 dias da reinspeção, bem como a disseminação da doença por meio de revendedores ambulantes de mudas para outras regiões e estados vizinhos como Paraná e Mato Grosso. Assim, decidiu-se pela readequação do programa e início de uma nova fase com o lançamento do “Plano de Erradicação Total” na região interdita e expansão para todo o restante do estado de São Paulo (Santos, 1991). Essa fase foi caracterizada pela adoção de medidas mais drásticas, com emprego de maior número de pessoas e aporte financeiro adicional visando a erradicação total das plantas de citros na região interdita independentemente da presença da doença e a formação de uma zona geográfica de isolamento, com fiscalização contínua de trânsito de material vegetal em rodovias e ferrovias.

Esta fase da campanha de erradicação, que seguiu com rigor as recomendações técnicas para erradicação do cancro cítrico na área interditada, teve participação direta do governo do Estado, por meio de apoio ao IB e disponibilização de soldados da Força Pública do Estado para fiscalização e monitoramento da zona de isolamento e auxílio na erradicação de plantas, além de apoio político e econômico aos municípios atingidos. Paralelamente, a Procuradoria Judicial do Estado trabalhou para que não ocorressem atrasos na erradicação de plantas doentes pela instalação de ações judiciais e emissão de mandados de segurança. Nessa etapa, que perdurou até 1961, a inspeção de cerca de 11 mil propriedades rurais e urbanas resultou na erradicação de 1,2 milhões de plantas, sintomáticas ou suspeitas, com supervisão das rebrotas (Santos, 1991).

A preocupação com as outras áreas do estado levou no final de 1962 à intensificação da campanha contra o cancro cítrico pela criação do “Plano de Expansão da Campanha de Erradicação”. Este plano estendeu a vigilância nas demais regiões do estado ainda livres da doença, principalmente aquelas limítrofes à área afetada localizadas ao sul do rio Tietê, desde Sorocaba até as margens do rio Paraná. A partir desse plano foi instituído também o controle do trânsito de frutos e mudas em todo o estado de São Paulo, por meio da Permissão de Trânsito Vegetal (PTV), com informações sobre o registro do viveiro, origem e destino do material vegetal além da certificação comprovando a sanidade das mudas (Santos, 1991).

Apesar dos esforços, no mesmo ano, foram encontrados os primeiros focos isolados de cancro cítrico fora da região interditada, próximo à área limítrofe. Essa detecção tornou a situação preocupante novamente pela iminente possibilidade da doença ultrapassar as barreiras impostas e atingir por vias naturais (chuvas acompanhadas de ventos) a região com grandes plantios comerciais de citros ao norte do rio Tietê, onde ocorria pujante expansão das indústrias de suco concentrado e comércio de frutos *in natura*, ambos para exportação. Estes fatos resultaram em nova revisão das normas da campanha de erradicação. Assim considerando o sucesso relativo da campanha na região interditada e levando em conta que os novos focos eram isolados, a nova metodologia instituída a erradicação de todas as plantas contaminadas das propriedades e um raio de 1 km ao seu entorno, bem como a inspeção e eliminação de rebrotas e proibição de novos plantios nessas áreas. Além disso, em propriedades indenizadas as plantas eram inspecionadas no máximo a cada dois anos para verificar seu status fitossanitário (Santos, 1991).

Em 1966 devido a reestruturação técnico-administrativa da Secretária da Agricultura os trabalhos de Defesa Sanitária Animal e Vegetal, incluindo aqueles relacionados à Comissão Técnica de Citricultura, que até então eram desempenhados pelo IB, passaram a ser geridos

pela recém-criada Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI) com participação de membros dos institutos de pesquisa e da CATI. Em 1975 foi criada a Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC) subordinada ao Ministério da Agricultura para unificar as ações nos estados e frear o avanço da doença também nos estados de Mato Grosso e Paraná (Santos, 1991). Com problemas estruturais e financeiros a CANECC demorou para ter ação efetiva no campo, e o avanço da doença no Paraná já alcançava 50% das áreas do norte e centro oeste do estado (Santos, 1991). Em São Paulo, para que os esforços anteriores não fossem perdidos, os produtores, comerciantes e industriais de suco foram convocados a participar diretamente da campanha para reforçar as ações do poder público na erradicação de cancro cítrico no estado. Dessa união, nasceu em 1977, o Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) para garantir a aplicação da CANECC nos pomares paulistas e do Triângulo Mineiro (Santos, 1991; Behlau & Belasque, 2014). O apoio do Fundecitrus às ações de defesa foi viabilizado por convênio firmado naquele mesmo ano com a Secretaria de Agricultura e Abastecimento do estado de São Paulo (Behlau & Belasque, 2014). Essa parceria, que durou até 2010, foi uma das principais responsáveis por manter os níveis da doença estáveis e abaixo de 1% dos talhões contaminados no estado durante décadas (Behlau et al., 2016).

Apesar das inúmeras ações de contenção em todo o estado, a disseminação do cancro cítrico continuou até ser encontrado em propriedade isolada no município de Urupês (SP) em 1974. Este foi o primeiro caso localizado ao norte do rio Tietê, considerado uma barreira natural à doença (Santos, 1991). Seguindo o caminho contrário à necessidade, em 1975 o raio de erradicação de 1 km passou a 200 m (Behlau & Belasque, 2014), causando grande preocupação ao setor. Posteriormente, em 1979, com o auxílio do Fundecitrus, que havia intensificado os levantamentos amostrais para monitoramento da doença nos pomares, o cancro cítrico foi detectado em pomares de laranja na região de Limeira destinados à indústria de suco e também em plantas de lima ácida ‘Galego’ em Monte Alto e Cândido Rodrigues, onde ocorreu intensa campanha de conscientização. Apesar de todos os esforços, a doença progrediu para outros municípios da região como Taquaritinga, Fernando Prestes, Itajobi e Araraquara (Santos, 1991; Behlau & Belasque, 2014).

Nos anos subsequentes, o Ministério da Agricultura continuou alterando as legislações por meio de Portarias, como a Portaria 234 publicada em 1983, que estabeleceu que o imóvel ou propriedade afetada, e não mais o município deveria ser interditado (Behlau et al., 2016), e a Portaria 282 de 1987, que alterou novamente o raio antes de 200 m para 50 m, o que durou até 1995, quando a Portaria 62, de 16 de fevereiro de 1995, reduziu o raio para 30 m e estabeleceu três métodos de erradicação a serem empregados, sendo: (i) erradicação da planta

foco e demais plantas de citros contidas no raio de 30 m da planta foco; (ii) erradicação da planta foco com poda drástica das plantas contidas no raio de 30 m da planta foco; (iii) erradicação da planta foco associada à desfolha das plantas no raio de 30 m do foco (Behlau et al., 2016).

Dentre as inúmeras mudanças na legislação, uma das que mais perdurou e manteve a doença em níveis baixos e estáveis foi a Portaria 291, de 23 de julho de 1997. Esta Portaria, baseada na Portaria 62 de 1995, determinava quatro métodos possíveis para a eliminação de focos de cancro cítrico: (i) eliminação da planta ou plantas contaminadas e das demais contidas num raio mínimo de 30 metros, consideradas suspeitas de contaminação; (ii) eliminação da planta ou plantas contaminadas e poda drástica das demais contidas num raio mínimo de 30 metros, consideradas suspeitas de contaminação; (iii) eliminação da planta ou plantas contaminadas e desfolha química das demais contidas num raio mínimo de 30 metros, consideradas suspeitas de contaminação; e (iv) poda drástica da(s) planta(s) contaminada(s) e pulverização do raio perifocal de mínimo de 30 metros com calda cúprica na concentração de 0,1% de cobre metálico a cada brotação. Independentemente do método adotado, a propriedade ficava interdita por no mínimo dois anos após a última detecção da doença e proibida do plantio de novas mudas de citros. Além disso, os frutos produzidos nos plantios remanescentes deveriam ser obrigatoriamente destinados à indústria de suco.

No estado de São Paulo por meio da Instrução Técnica, em 13 de maio de 1998, a CEE-CANECC/SP estabeleceu a adoção do método com eliminação das plantas foco e de todas as plantas de citros num raio de 30 m (Barelli, 2013). Por outro lado, o Paraná, alegando não ter recursos repassados pelo Governo Federal para a manutenção da CANECC, criou em 1979 legislação específica (Resolução 079/90) a qual autorizava novos plantios em propriedades saneadas, ou seja, livres da doença, e regulamentava o manejo integrado como media profilática a novas ocorrências (Paraná, 1990). Ao contrário, o estado de São Paulo continuou trabalhando com relativo sucesso na supressão da doença até que no final dos anos 1990 a doença voltou a crescer. Esse aumento ocorreu pela introdução em 1996 da larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) (Parra et al., 2004), que apesar de não ser vetor da bactéria causadora do cancro cítrico, alterou a distribuição espacial da doença, de fortemente agregado à parcialmente agregado ou aleatório, tornando o raio de erradicação 30 m pouco eficiente (Christiano, 2006).

Com a alteração da distribuição espacial do cancro cítrico, o Fundecitrus passou a inspecionar 100% das plantas do talhão e o estado de São Paulo necessitou tornar ainda mais severo o combate à doença. Assim, diante do aumento de focos da doença, um novo protocolo de erradicação mais rigoroso que o anterior foi instituído por meio da publicação da Resolução

CEE-CANECC/SP – 1, de 20 de março de 2000, com base na incidência de plantas doentes no talhão, de forma que se no talhão houvesse 0,5% ou menos de plantas sintomáticas, eram eliminadas as plantas sintomáticas e aquelas em um raio mínimo de 30 metros. Porém, se no talhão fossem encontradas mais de 0,5% de plantas sintomáticas, todo o talhão era erradicado. As reinspeções no talhão contaminado e nos talhões vizinhos se repetiam em intervalos de 30, 60 e 90 dias, conforme detalhado por Behlau et al. (2016). Em talhões parcialmente erradicados com aplicação do raio de 30 metros, era realizada apenas a eliminação das plantas sintomáticas se a incidência fosse menor ou igual a 0,5% ou a eliminação total do talhão se a incidência de plantas doentes encontradas fosse maior que 0,5%. Este protocolo foi capaz de manter a incidência de talhões contaminados entre 2000 a 2009 de 0,08% a 0,27% (Belasque Junior. et al., 2010).

Mais tarde, em 2009, houve uma nova mudança na legislação passando a vigorar no estado a Resolução SAA 43, de 29 de junho de 2009, que voltou a determinar a erradicação da planta sintomática e aquelas existentes no raio de 30 m, dispensando a necessidade de erradicação do talhão quando a incidência de plantas contaminadas era superior a 0,5% (São Paulo, 2009). Este fator e o fim do convênio entre a CDA e Fundecitrus resultou em diminuição drástica das inspeções e eliminação de focos da doença. Essa mudança acarretou em um aumento exponencial da doença, passando de 0,14% de talhões contaminados em 2009 para 0,44% em 2010, 0,99% em 2011 e 1,39% em 2012 (Behlau et al., 2016). Com a escassa inspeção nos pomares e sem o apoio dos citricultores que tendiam a omitir a presença da doença, houve nova mudança na legislação com a publicação da Resolução SAA 147, de 31 de outubro de 2013, que determinava a erradicação apenas da planta sintomática e pulverização das plantas existentes num raio mínimo de 30 m com calda cúprica. Além disso, os produtores eram obrigados a realizar uma inspeção trimestral em todas as plantas de citros para detectar e erradicar as plantas com sintomas de cancro cítrico e relatar os resultados das inspeções todo o semestre à CDA (São Paulo, 2013).

Após anos adotando medidas de erradicação e supressão da doença com a eliminação de milhares de plantas sintomáticas e assintomáticas, a diminuição do rigor dos protocolos mais recentes possibilitou que a doença atingisse grande quantidade de árvores, tornando inviável a continuação do programa de erradicação. Segundo levantamento realizado no Fundecitrus em 2017, a doença atingiu 12,92% dos talhões de citros do estado, sendo a região noroeste a mais afetada com incidência de 37,35% de árvores sintomáticas (Fundo de Defesa da Citricultura, 2017). Esse aumento associado aos avanços nas pesquisas e experiências bem-sucedidas de manejo empregado no sul do Brasil, Argentina, Uruguai e Flórida (EUA), aumentaram os

questionamentos sobre a coerência da legislação vigente. Além disso, em 2016 ocorreram as primeiras interceptações na União Europeia de frutos de lima ácida ‘Tahiti’ com cancro cítrico provenientes do Brasil (European Commission, 2018) e aumentou a urgência de alterações na legislação vigente para viabilizar a exportação de frutos *in natura* de maneira segura para áreas sem ocorrência da doença.

Desta forma, seguindo Normas Internacionais de Medidas Fitossanitárias (NIMF) determinadas pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), em 5 de setembro de 2016 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sancionou a Instrução Normativa nº 37, que instituiu em todo território nacional, critérios e procedimentos para o estabelecimento e manutenção do *status* fitossanitário relativo à praga do cancro cítrico. A IN 37/2016, que passou a vigorar em 03 de março de 2017, determinava que cada unidade da federação (UF) adotasse diferentes status de controle ao cancro cítrico dependendo da incidência da doença nos pomares: (i) Área com Praga Ausente, (ii) Área Livre da Praga, (iii) Área sob Erradicação ou Supressão e (iv) Área sob Sistema de Mitigação de Risco (SMR). O SMR é um programa de certificação que preconiza a redução de riscos de comercialização de frutos com cancro cítrico por meio da adoção de medidas de manejo da doença nos pomares e higienização de frutos na unidade de consolidação (UC). A IN 37/2016 difere em muitos pontos da legislação anterior, Portaria 291/1997, e representou uma das mais significativas mudanças no controle do cancro cítrico no Brasil (Tabela 1).

O SMR proposto se baseou na NIMF nº 14 (FAO, 2006) e exige duas ou mais medidas que sejam independentes umas das outras, com os objetivos de: (i) reduzir o potencial de inóculo visando a proteção de áreas ainda sem ocorrência da praga, (ii) permitir o trânsito para outras UF de frutos de citros oriundos de áreas de ocorrência da praga e (iii) permitir a exportação de frutos de citros oriundos de áreas de ocorrência da praga para países que reconheçam o SMR como medida fitossanitária. Diante da mudança da legislação e dos índices crescentes da doença, a Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA) do estado de São Paulo por meio da Resolução SAA 10, de 20 de fevereiro de 2017, e da Resolução SDA 04, de 22 de março de 2017, oficializou o SMR como status oficial para todo o estado de São Paulo.

Tabela 1. Principais diferenças entre a Portaria 291/1997 e o Sistema de Mitigação de Risco (SMR) da Instrução Normativa 37/2016.

Portaria 291/1997	SMR - IN 37/2016
Interdição de propriedade com cancro cítrico para novos plantios de citros e comercialização	Não interdição de propriedade com cancro cítrico

de frutos de mesa por período mínimo de dois anos após a eliminação do foco da doença	
Medidas de exclusão e erradicação da doença compulsórias para todos os pomares	Medidas para mitigação de risco compulsórias apenas para pomares de produção de fruta de mesa para comercialização fora do estado produtor ou país
Manutenção da propriedade livre da praga	Produção de partidas (cargas de frutas) livres da praga
Partida de frutos permitida a partir de propriedade ou UC	Partida de frutos permitida somente a partir de UC após higienização
OEDSV como executor e fiscalizador do processo	OEDSV como auditor do processo conduzido pelo engenheiro agrônomo, responsável técnico da propriedade
Viabilização do comércio de frutas <i>in natura</i> de pomares sem cancro cítrico	Viabilização do comércio de frutas <i>in natura</i> de pomares com cancro cítrico

UC, Unidade de consolidação; OEDSV, órgão estadual de defesa sanitária vegetal.

Apesar da IN 37 ter sido oportuna à realidade de aumento da incidência de pomares com cancro cítrico no estado, esta nova legislação apresentava entraves significativos à cadeia produtiva de fruta de mesa e indústria. Assim, visando atender a demanda de ajustes propostas pelo setor, em 25 de abril de 2018, foi publicada a IN 21. Esta IN revogou a IN 37/2016, mas manteve sua estrutura com os quatro status fitossanitários. As alterações facilitaram a implantação do SMR (Tabela 2). As principais alterações foram o reconhecimento de propriedades sem ocorrência de cancro cítrico dentro de área sob status de SMR, a possibilidade de industrialização de frutos em UF limítrofes deste que ambas estejam sob SMR, a necessidade de inspeções frequentes e destruição de mudas contaminadas, e dispensa da obrigatoriedade de lavagem de frutos com o detergente em beneficiamento pós-colheita. Atualmente o Brasil possui diferentes status fitossanitários para o cancro cítrico, ou seja, há estados com e sem a presença da doença, o que eleva a necessidade de vigilância fitossanitária (Figura 2; Tabela 3).

Tabela 2. Principais diferenças entre o Sistema de Mitigação de Risco (SMR) da IN 37/2016 e o SMR da IN 21/2018.

SMR - IN 37/2016	SMR - IN 21/2018
Adoção das medidas de controle do cancro cítrico no mínimo 180 dias antes do cadastro da propriedade	Adoção das medidas de controle do cancro cítrico no mínimo 120 dias antes do cadastro da propriedade

Emissão do termo de habilitação de colheita pelo OEDSV em até 15 dias após envio do relatório de inspeção

Obrigatória a partida de frutos somente de UC independentemente da presença de cancro cítrico na propriedade

Obrigatoriedade de lavagem de frutos com detergente e higienização com sanitizante em UC

Frutos destinados à produção de suco em UF diferente da UF de origem necessitavam passar por tratamento em UC antes do transporte

Não regulamentava as medidas de controle de cancro cítrico em viveiros de mudas de citros

Emissão do termo de habilitação de colheita pelo OEDSV em até 7 dias após envio do relatório de inspeção.

Obrigatória a partida de frutos somente de UC de propriedade com cancro cítrico e permitida a partida de frutos do pomar de propriedade sem ocorrência de cancro cítrico

Obrigatoriedade somente da higienização de frutos na UC com sanitizante

Frutos destinados à produção de suco em UF diferente da UF de origem não necessitam passar por tratamento em UC antes do transporte

Determina a realização de inspeções em viveiros, eliminação do lote de mudas contaminadas e interdição com quarentena de 120 dias dos demais lotes para comercialização

OEDSV, órgão estadual de defesa sanitária vegetal; UC, unidade de consolidação; UF, unidade da federação.



Figura 2. Status fitossanitário relativo ao controle de cancro cítrico adotado nas diferentes unidades da federação do país segundo a IN 21/2018.

Tabela 3. Status fitossanitário para o cancro cítrico nas Unidades da Federação (UF) segundo a IN 21/2018 e respectivas resoluções publicadas pela Secretaria Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

UF	Status fitossanitário	Nº resolução	Data da publicação
Amazonas	Área sem ocorrência	15	14/09/2017

Bahia	Área sem ocorrência	10	12/04/2017
Ceará	Área sob erradicação	13	28/08/2017
Distrito Federal	Área sem ocorrência	14	14/09/2017
Espirito Santo	Área sem ocorrência	01	05/01/2018
Goiás	Área sem ocorrência	02	27/03/2017
Minas Gerais	Área sob erradicação	07	27/03/2017
Mato Grosso	Área sob sistema de mitigação de risco	03	27/03/2017
Mato Grosso do Sul	Área sob sistema de mitigação de risco	05	27/03/2017
Minas Gerais	Área sob erradicação	07	27/03/2017
Pará	Área livre da praga ^a	01	08/03/2017
	Área livre da praga ^b	06	28/03/2017
Paraíba	Área sem ocorrência	19	13/12/2017
Paraná	Área sob sistema de mitigação de risco ^c	18	08/12/2017
Pernambuco	Área sem ocorrência	17	02/10/2017
Rio de Janeiro	Área sem ocorrência	3	14/05/2018
Rio Grande do Sul	Área sob sistema de mitigação de risco	11	05/04/2017
Rondônia	Área sem ocorrência	02	10/01/2017
Roraima	Área sob erradicação	08	28/03/2017
Santa Catarina	Área sob sistema de mitigação de risco	12	18/05/2017
São Paulo	Área sob sistema de mitigação de risco	04	27/03/2017
Sergipe	Área sem ocorrência	16	02/10/2017
Tocantins	Área sem ocorrência	09	29/03/2017

^amunicípios de Ourém, Irituia, Garrafão do Norte, Capitão Poço e Nova Esperança do Piriá.

^bmunicípios de Alenquer, Belterra, Mojuí dos Campos, Monte Alegre, Prainha e Santarém.

^cmunicípios de Adrianópolis, Agudos do Sul, Almirante Tamandaré, Araucária, Antonina, Balsa Nova, Bocaiuva do Sul, Campina Grande do Sul, Campo Largo, Campo Magro, Cerro Azul, Colombo, Contenda, Curitiba, Doutor Ulysses, Fazenda Rio Grande, Guaraqueçaba, Guaratuba, Itaperuçu, Mandirituba, Matinhos, Morretes, Paranaguá, Pinhais, Piraquara, Pontal do Paraná, Quatro Barras, Rio Branco do Sul, São José dos Pinhais, Tijucas do Sul e Tunas do Paraná.

1.2 Descontaminação de frutos em pós-colheita

Apesar do Brasil ser o maior produtor e exportador mundial de suco de citros, o país tem pequena participação no mercado internacional de frutas *in natura*. Neste segmento, o Brasil está muito abaixo de países com amplo histórico no cultivo de citros, como por exemplo a Espanha, África do Sul e Argentina, que possuem áreas cultivadas menores que a do Brasil. Os principais fatores que limitam a exportação de citros do Brasil estão relacionados à restrições fitossanitárias, em decorrência principalmente da ocorrência da pinta preta e cancro cítrico (Neves et al., 2010). Apesar da pequena participação no cenário internacional, o citros é a terceira fruta *in natura* mais exportada do país, gerando receita anual de mais de 97 milhões de dólares (MAPA, 2018) e com grande potencial de aumento do volume de exportação.

Com a recente mudança na legislação e adoção do SMR no estado de São Paulo, que permite a presença de plantas com cancro cítrico nos pomares, a descontaminação de frutos em pós-colheita na UC passou a ser obrigatória para viabilizar a comercialização de frutas de citros *in natura* entre os estados da federação e outros países. Anteriormente a esta legislação, quando o cancro cítrico não estava disseminado no estado, a descontaminação de frutos em casas de

embalagem era praticada por poucos produtores que visavam a aplicação de produtos sanitizantes para reduzir ou inibir a microbiota presente nos frutos e assim prolongar a “vida de prateleira” da produção. Conseqüentemente, apesar de implicar em investimentos estruturais aos produtores, a obrigatoriedade de construir e adaptar as instalações para atender a legislação tem levado a um avanço importante na qualidade de produtos e processos à toda cadeia de frutos de citros *in natura*. Neste trabalho, o termo descontaminação é utilizado como sinônimo de desinfecção, higienização e sanitização.

Os produtos sanitizantes mais utilizados atualmente em pós-colheita de diversas frutas para redução da população de microrganismos na superfície dos frutos possuem cloro na composição (Moretti, 2007). Esta medida deve ser sempre associada à seleção e descarte de frutos com injúrias e rachaduras causadas por ações mecânicas ou agentes bióticos como insetos ou patógenos. Em ferimentos, lesões e partes protegidas pela própria cera do fruto, a ação biocida do cloro sobre microrganismos é baixa ou inexistente, porém pode ser maximizada com a aplicação de surfactantes (detergentes) em lavagem antes do processo de higienização (Bastos, 2006; Gottwald et al., 2009; Redondo et al., 2015).

Apesar de existirem inúmeros produtos sanitizantes, de acordo com a IN 21/2018, apenas o hipoclorito de sódio (NaClO) é permitido no Brasil para a descontaminação de frutos de citros contra Xcc (Brasil, 2018). O hipoclorito de sódio é, provavelmente, o sanitizante de frutos de mesa mais utilizado no mundo. O amplo uso deste produto se deve principalmente ao grande volume de pesquisas que atestam sua eficácia e baixo custo (Moretti, 2007). No entanto, este produto apresenta desvantagens importantes que levam à necessidade de validação de bactericidas alternativos para esta finalidade, como perda de eficácia em calda com presença de sólidos em suspensão e matéria orgânica, e alto poder corrosivo à metais, o que reduz a vida útil de algumas máquinas e equipamentos utilizados na UC (Pfundner, 2011). Além disso, o hipoclorito de sódio pode ser precursor de compostos clorados tóxicos como cloraminas orgânicas, trihalometanos e dioxinas, que são prejudiciais à saúde humana pelo potencial carcinogênico (Mcneal et al., 1995; Nascimento & Silva, 2010; Pfundner, 2011). Por esse motivo, o uso de sanitizantes a base de hipoclorito em alimentos frescos foi proibido em alguns países da Europa como Alemanha, Bélgica, Dinamarca, Holanda e Suíça (Nascimento & Silva, 2010).

Diversos outros produtos sanitizantes contendo ingredientes ativos de diferentes composições químicas são utilizados para a descontaminação de microrganismos de frutos, ambientes hospitalares, indústrias de alimentos, etc. (Bastos, 2006). Esses produtos possuem ampla caracterização e aval favorável quanto a toxicidade, impacto ao meio ambiente e resíduos

nas superfícies tratadas credenciando-os para uso contra Xcc em UC como substitutos ou alternativos ao hipoclorito de sódio (Srebernich, 2007). Entre estes produtos pode-se destacar o dióxido de cloro (ClO_2), oxiclureto de cálcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) e o ácido peracético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3$).

O dióxido de cloro tem a vantagem de ser mais estável na presença de matéria orgânica e tolerar faixa de pH em calda mais ampla (4 a 10), possuindo um poder oxidante 2,5 vezes maior quando comparado ao hipoclorito de sódio, o que possibilita o uso de menor concentração do produto (Birko, 2005; Basto, 2006; Vero et al., 2006; Sun et al. 2016). O dióxido de cloro possui ainda menor poder corrosivo e não forma compostos secundários tóxicos na calda ou superfície tratada (Andrade et al, 1996; Birko, 2005; Vero et al., 2006; Pfuntner, 2011). Por sua vez, o oxiclureto de cálcio, assim com o hipoclorito de sódio, ao ser adicionada à água forma o ácido hipocloroso (HOCl) que tem alta capacidade biocida. O oxiclureto de cálcio difere dos demais sanitizantes estudados por ser formulado em pó ou pastilhas, o que facilita o armazenamento, porém necessita de agitação antes da utilização para completa dissolução em água. Além disso, o cálcio presente na formulação pode contribuir para uma maior resistência da superfície tratada ao ataque de microrganismos em pós-colheita e assim prolongar o período de armazenagem (Carvalho et al., 1998). Por fim, o ácido peracético é um produto não clorado, conseqüentemente não corrosivo. Além disso, não leva à formação de substâncias residuais tóxicas em calda, gerando apenas oxigênio e ácido acético em contato com a água, e sua eficiência é pouco afetada pela presença de matéria orgânica em suspensão (Vero et al., 2006; Srebernich, 2007; Pfuntner, 2011). Este bactericida tem sido amplamente utilizado nos EUA para higienização de legumes e frutas em pós-colheita, incluindo citros (Pfuntner, 2011).

Além da formulação do bactericida, o tempo de exposição do fruto ao produto para descontaminação contra microrganismos é outro fator importante no processo de beneficiamento da produção. Quanto maior o tempo exigido de tratamento, maior também deverá ser o dimensionando da balsa de imersão (Figura 3) e conseqüentemente do investimento necessário em infraestrutura. A atual legislação (Brasil, 2018) determina que os frutos de citros sejam tratados em solução bactericida por no mínimo 2 minutos. Este tempo é motivo de contestação e considerado exagerado por muitos produtores por onerar significativamente o processo. Além disso, existem trabalhos na literatura que demonstram a efetividade de ação dos bactericidas na higienização de frutos quando expostos por 45 segundos ou 1 minuto (Narciso, 2005; Gottwald et al., 2009).



Figura 3. Balsa de imersão para a higienização de frutos de citros em pós-colheita na unidade de consolidação. Frutos de lima ácida ‘Tahiti’ (A) e frutos de laranja doce (B).

Em função da existência de bactericidas com eficiência comprovada contra diversos microrganismos e da iminente necessidade de regulamentação pelo MAPA de produtos e tempos de tratamento alternativos para higienização de frutos de citros, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de diferentes bactericidas e da redução do tempo de exposição para descontaminação de frutos de citros em pós-colheita contra Xcc agente causal do cancro cítrico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Bactericidas avaliados

Os bactericidas avaliados no presente estudo foram selecionados com base na sugestão do setor de frutos de mesa do estado de São Paulo e em estudos realizados anteriormente que demonstraram o potencial de diversas formulações para higienização de frutos e verduras pós colheita. As doses testadas de cada produto foram recomendadas pelos fabricantes (Tabela 4). O estudo foi composto por três tipos de experimentos: (i) avaliação da capacidade bactericida do produto contra Xcc, (ii) eficiência do produto na descontaminação de frutos de citros contaminados artificialmente em laboratório por Xcc e (iii) eficiência do produto na descontaminação de frutos de citros contaminados naturalmente em campo por Xcc. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia do Fundecitrus, localizado no município de Araraquara, SP.

Tabela 4. Formulações e doses de bactericidas avaliadas.

Nome comercial	Ingrediente Ativo	Dose	
		Produto comercial	Ingrediente ativo (ppm)
Dioxiplus	Dióxido de cloro	1,0 mL/L	70
Frexus CH	Oxicloreto de cálcio	0,3 g/L	200
Peracetic	Ácido peracético	0,666 mL/L	100
Pluron 444 A	Hipoclorito de sódio	1,7 mL/L	200

2.2 Isolado bacteriano e condições de cultivo

Nos ensaios em laboratório foi utilizado o isolado Xcc 306, obtido em 1997 de planta de laranja doce no município de Paranaíba, PR (Silva et. al., 2002). Para o preparo do inóculo, o isolado foi previamente cultivado em meio ágar nutriente (AN, extrato de carne 3 g, peptona 5 g, ágar 15 g e água destilada 1000 mL a pH 7) por 24 h a 28°C.

2.3 Capacidade bactericida do produto contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Esse experimento foi realizado para avaliar a capacidade de eliminação de Xcc pelos diferentes bactericidas em estudo. Para isso, suspensão de Xcc 306 na concentração final de 10^6 unidades formadoras de colônia/mL (ufc/mL) foi exposta à calda de 50 mL em tubo Falcon

contendo os diferentes produtos bactericidas na concentração recomendada pelo fabricante ou fornecedor, preparada em água de torneira autoclavada (Tabela 4). Os tubos foram mantidos sob agitação na posição inclinada por 1 h. Alíquotas de 100 μ L da calda e das diluições 10^{-1} e 10^{-2} foram plaqueadas em meio AN 0 h (imediatamente após adição da bactéria) e 1 h após a exposição da bactéria ao produto. Após 96 h de incubação a 28°C foi realizada a contagem de ufc presentes nas placas e calculada a concentração bacteriana viável após a exposição ao bactericida em \log_{10} ufc/mL. Suspensão de Xcc não exposta ao produto foi utilizada como controle. Para cada tratamento foram utilizadas 5 repetições (caldas) e os experimentos foram realizados em duplicata (Figura 4). No primeiro ensaio foram realizadas medições de pH da calda de cada repetição.

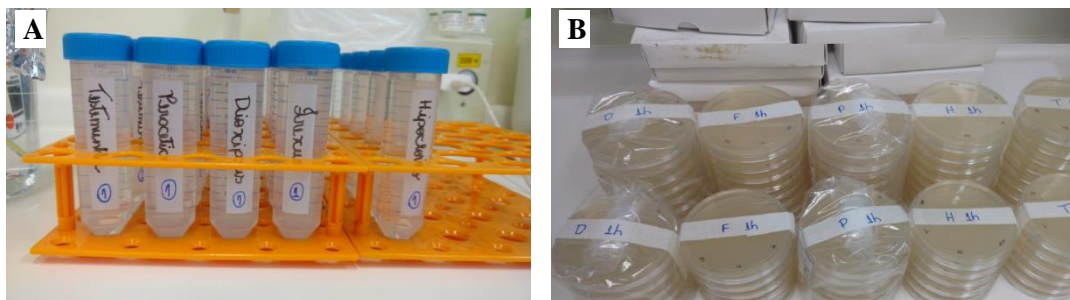


Figura 4. Avaliação da capacidade biocida dos diferentes bactericidas contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc). Tubos Falcon contendo suspensão de Xcc em mistura com os bactericidas avaliados (A) e placas com meio ágar nutriente utilizadas para avaliação da viabilidade de suspensões de Xcc expostas aos bactericidas (B).

2.4 Descontaminação de frutos de citros contaminados artificialmente em laboratório por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

A eficiência dos bactericidas na descontaminação de frutos de citros contra Xcc foi avaliada com base nos seguintes tratamentos: (i) descontaminação de frutos contaminados em laboratório com Xcc utilizando calda bactericida durante 1 minuto (metade do tempo estabelecido pela legislação vigente), (ii) descontaminação de frutos contaminados durante 2 minutos (tempo estabelecido pela legislação vigente) e (iii) testemunha, composta por frutos não higienizados com bactericida. O experimento foi conduzido em triplicata e para cada tratamento foram utilizadas cinco repetições com três frutos por repetição. Para este experimento foram utilizados frutos de lima ácida ‘Tahiti’ levando-se em consideração que a produção nacional desta espécie tem grande representatividade para o mercado de fruto de mesa nacional e internacional. Os ensaios foram conduzidos utilizando frutos com diâmetro uniforme

de aproximadamente 50 mm, obtidos de pomares comerciais da região de Itajobi, SP, sem ocorrência de cancro cítrico.

Após a colheita cada fruto foi lavado manualmente em água por 30 segundos com detergente Wash Fruit 33 na concentração recomendada pelo fabricante, enxaguados em água de torneira autoclavada e secados em temperatura ambiente sobre folhas de papel pardo por aproximadamente 2 h. Após a secagem, os frutos foram contaminados por aspersão (quatro borrifadas homogeneamente distribuídas ao redor do fruto) utilizando suspensão bacteriana de Xcc 306 na concentração de 10^7 ufc/mL. Antes do preparo da suspensão bacteriana, o isolado de Xcc foi cultivado em meio AN a 28°C por 24 h.

Após a secagem dos frutos com a suspensão bacteriana durante aproximadamente 2 h os 3 frutos de cada repetição foram imersos durante 1 ou 2 minutos em 2 L de calda bactericida preparada em água de torneira na dose recomendada (Tabela 4). Uma nova calda foi utilizada para cada repetição. Frutos imersos somente em água de torneira autoclavada durante 2 minutos serviram como testemunhas. Após tratamento, os frutos foram dispostos sobre papel pardo para secagem em temperatura ambiente por aproximadamente 2 h. Na sequência, os frutos de cada repetição foram lavados por agitação em sacos plásticos contendo 100 mL de tampão fosfato (pH 7,2), durante 5 minutos. Depois de lavados os frutos foram descartados e o tampão de lavagem foi centrifugado utilizando dois tubos Falcon de 50 mL por 20 minutos a $10.000 \times g$. O pellet de cada repetição foi ressuscitado em 3 mL de tampão fosfato para posterior avaliação da população de Xcc viável por meio de plaqueamento e inoculação. O plaqueamento foi realizado utilizando 100 μ L da suspensão original e das diluições 10^{-1} e 10^{-2} em meio AN. Após 96 h de incubação a 28° C foi realizada a contagem de colônias de Xcc presentes nas placas e determinada a concentração de bactérias provenientes do fruto.

2.5 Descontaminação de frutos de citros contaminados por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provenientes de pomares com cancro cítrico

Nesse experimento, a eficiência dos bactericidas na descontaminação de frutos de citros contra Xcc foi avaliada com base nos seguintes tratamentos: (i) descontaminação de frutos contaminados por Xcc provenientes de pomares com cancro cítrico utilizando calda bactericida durante 1 minuto, (ii) descontaminação de frutos contaminados durante 2 minutos e (iii) testemunha, composta por frutos não higienizados com bactericida. O experimento foi conduzido em duplicata e para cada tratamento foram utilizadas cinco repetições com três frutos

por repetição. Para este experimento foram utilizados frutos de lima ácida ‘Tahiti’ com diâmetro uniforme de aproximadamente 50 mm, obtidos de pomares comerciais da região de Itajobi, SP, com ocorrência de cancro cítrico.

Para aumentar a contaminação dos frutos por Xcc, antes da higienização frutos com e sem sintomas de cancro cítrico foram misturados em sacos plásticos na proporção de 2:1 (2 frutos com sintomas para 1 fruto sem sintoma), umedecidos com água de torneira autoclavada utilizando borrifador e mantidos em câmara úmida em temperatura ambiente durante 24 h (Figura 5). Os frutos foram retirados do saco plástico, sendo os frutos com sintomas descartados e os frutos sem sintoma foram dispostos sobre papel pardo para secagem. Após a secagem foi realizada a descontaminação e plaqueamento conforme descrito no item 2.3 (anterior).



Figura 5. Sacos plásticos com frutos de lima ácida ‘Tahiti’ com e sem sintomas de cancro cítrico misturados em sacos plásticos na proporção de 2:1 (2 frutos com sintomas para 1 fruto sem sintoma) e umedecidos com água de torneira autoclavada (A) e frutos dispostos sobre papel pardo para secagem (B).

2.6 Potencial infectivo de suspensões de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em diferentes concentrações

Para avaliar o potencial de causar cancro cítrico da população de Xcc remanescente nos frutos após tratamento com bactericidas, suspensões de Xcc 306 foram inoculadas nas concentrações de 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 e 10^4 ufc/mL. Antes do preparo da suspensão de Xcc foi cultivado em meio de cultura AN a 28°C por 24 h. Para cada concentração foram inoculadas 10 folhas de plantas de laranja ‘Hamlin’ em estágio V4 a V5 mantidas em casa de vegetação. A inoculação foi realizada pela infiltração 1,0 mL da suspensão em cada folha com o auxílio de seringa desprovida de agulha (Figura 6). As avaliações foram realizadas 30 dias após a inoculação pela contagem de folhas com lesões de cancro cítrico e do número de lesões por folha.

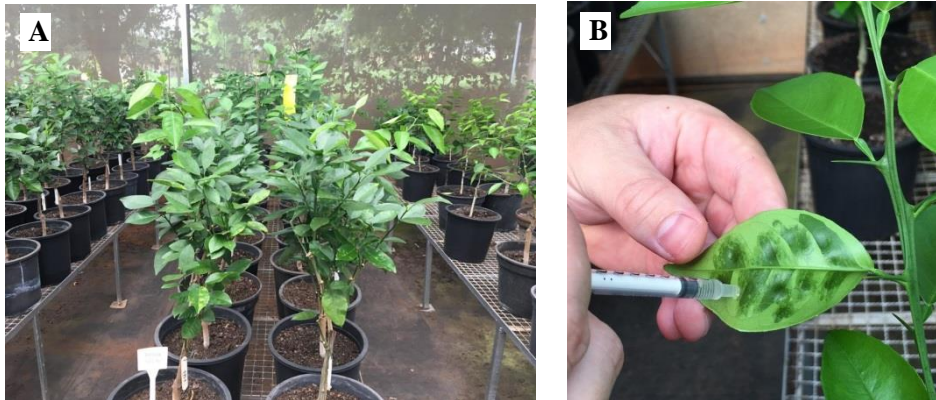


Figura 6. Mudas de laranja ‘Hamlin’ mantidas em casa de vegetação (A) utilizadas para inoculação de suspensão de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em diferentes concentrações por infiltração com seringa (B).

2.7 Análise dos dados

Para cada bactericida avaliado, as quantidades de Xcc recuperadas em meio de cultura provenientes de frutos de lima ácida ‘Tahiti’ contaminados artificialmente em laboratório e naturalmente em campo após exposição de 1 e 2 min e sem exposição ao produto foram submetidas a análise de variância utilizando delineamento em blocos casualizados e teste Tukey ($p=0,05$) para comparação de médias. Para a análise, cada experimento representou um bloco (repetição). Além disso, foi calculado o percentual de redução da quantidade de Xcc recuperada de frutos contaminados em laboratório e em campo para os tempos de exposição de 1 e 2 min em relação ao controle negativo (água) não tratado com bactericida.

Para o experimento que avaliou o potencial infectivo de suspensões de Xcc em diferentes concentrações foi calculado o percentual de folhas com sintomas de cancro cítrico e o número médio de lesões por folha inoculada acompanhado do erro padrão da média.

3. RESULTADOS

As caldas de todos os bactericidas estudados foram capazes de eliminar completamente a população de Xcc viável imediatamente (0 h) após contato com a bactéria ou 1 h de exposição ao produto. Enquanto que da calda contendo os diferentes bactericidas não foi recuperada nenhuma ufc de Xcc, o controle, contendo somente água resultou na recuperação de 5 a 6 \log_{10} ufc/mL de Xcc após 0 ou 1 h de exposição (Figura 7 A, B). O pH da água utilizada foi 5,8. Nas caldas de Dioxiplus, Frexus CH, Peracetic e Pluron 444 o pH foi de 9,2, 8,8, 4,2 e 6,8, respectivamente (Figura 7 C).

Os bactericidas avaliados apresentaram desempenho similares e promoveram reduções significativas da população de Xcc em frutos contaminados artificialmente em laboratório após tratamento por 1 ou 2 minutos. Para os frutos tratados, independentemente do tempo de exposição, a quantidade de Xcc recuperada variou de 0,5 a 1,0 \log_{10} ufc/mL. Estes valores representam uma redução de 100 a 1000 vezes da quantidade de ufc viáveis quando comparado ao tratamento controle (Figura 8 A-D). A exposição dos frutos por 1 ou 2 minutos aos bactericidas proveu a redução de 66,1 a 75,9% e 73,6 a 85,0%, respectivamente, na quantidade de Xcc recuperada (Figura 8 E). Não houve diferença significativa entre os tempos exposição dos frutos aos bactericidas, de 1 ou 2 minutos, sobre a quantidade de Xcc recuperada após tratamento higienizante (Figura 8).

O desempenho dos bactericidas na higienização de frutos de pomares com cancro cítrico foi similar ao observado para frutos contaminados em laboratório. Não houve diferença entre as formulações e todos os produtos promoveram a diminuição da população de Xcc de 1,3 a 1,8 para 0,1 a 0,3 \log_{10} ufc/mL, independentemente ao tempo de exposição aos bactericidas (Figura 9 A-D). Essa diferença representou uma redução de 80,8 a 95,7% na quantidade de Xcc recuperado em \log_{10} ufc/mL (Figura 9 E).

A inoculação de Xcc em folhas de laranja demonstrou que concentrações abaixo de 10^3 ufc/mL não são eficientes para causar lesões de cancro cítrico. Suspensões de Xcc nas concentrações de 10^3 e 10^4 ufc/mL provocaram a ocorrência de lesões em 70 e 100% das folhas inoculadas, com médias de 60 e 28,0 lesões/folha, respectivamente. Por outro lado, não foram observadas lesões em folhas inoculadas com suspensões de Xcc nas concentrações de 10^0 e 10^2 ufc/mL. Nas inoculações com suspensão de Xcc na concentração de 10^1 ufc/mL foi observada apenas uma folha com sintoma, a qual apresentou uma única lesão da doença (Figura 10).

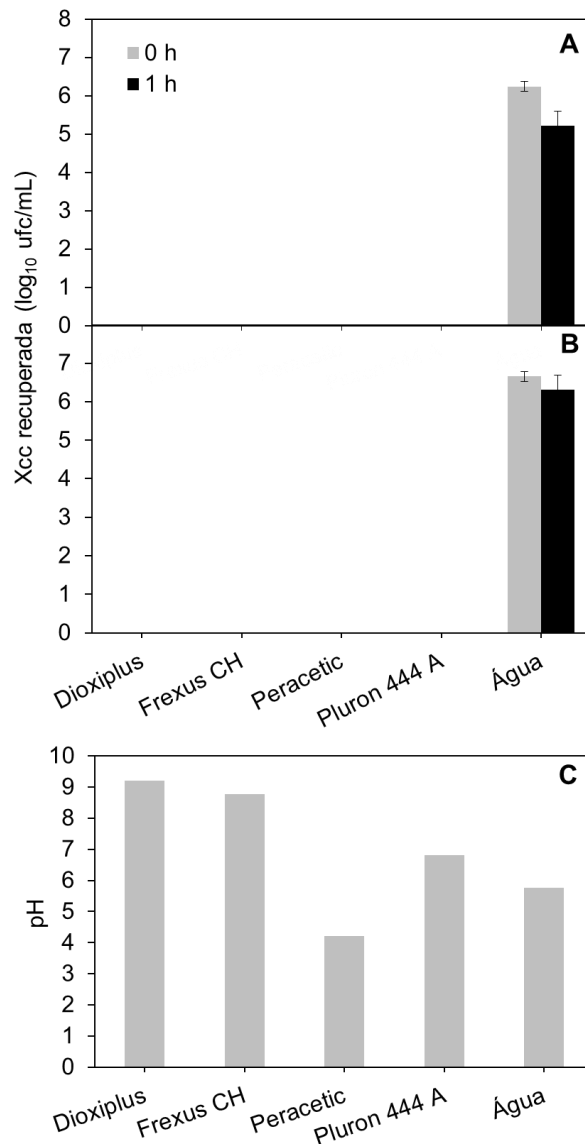


Figura 7. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) após 0 h (imediatamente após contato com o bactericida) e 1 h de exposição à calda contendo individualmente os bactericidas Dioxiplus (dióxido de cloro), Frexus CH (oxicloreto de cálcio), Peracetic (ácido peracético) e Pluron 444 A (hipoclorito de sódio) em dois experimentos independentes (A, B) após adição dos bactericidas em água de torneira autoclavada e pH das caldas bactericidas imediatamente após o preparo no primeiro experimento (C). Água de torneira autoclavada e Pluron 444 A foram utilizados como controles de ação bactericida negativo e positivo, respectivamente. ufc, unidade formadora de colônia. Barras de erro indicam o erro padrão da média de cinco repetições.

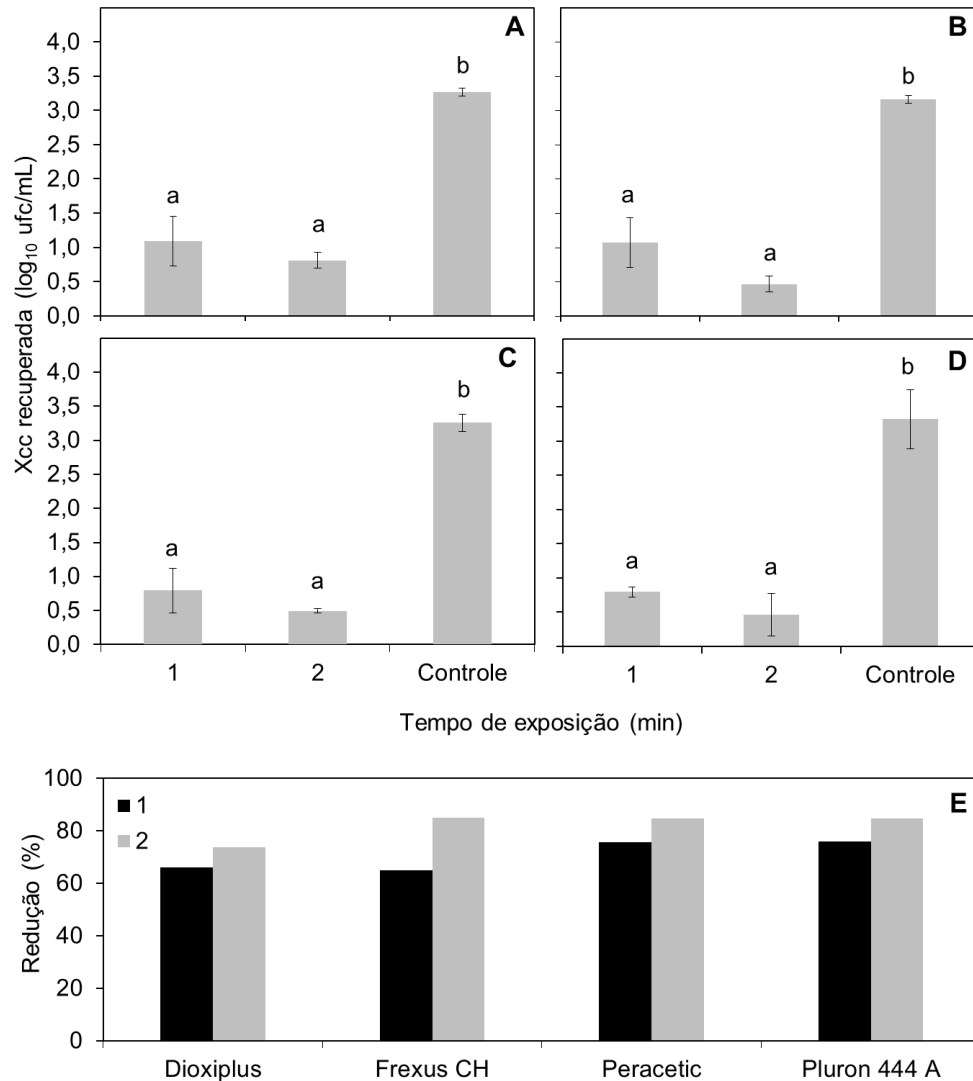


Figura 8. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) proveniente de frutos de lima ácida ‘Tahiti’ contaminados em laboratório e recuperada em meio de cultura sólido após 1 ou 2 minutos de exposição à calda contendo individualmente os bactericidas Dioxiplus (dióxido de cloro) (A), Frexus CH (oxiclóreto de cálcio) (B), Peracetic (ácido peracético) (C) e Pluron 444 A (hipoclorito de sódio) (D) preparados em água de torneira autoclavada (controle) e redução percentual da quantidade de Xcc recuperada em meio de cultura após 1 ou 2 minutos de exposição à calda contendo os diferentes bactericidas (E). ufc, unidade formadora de colônia. Para cada produto, colunas seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey ($p=0,05$). Barras de erro indicam o erro padrão da média de três experimentos independentes.

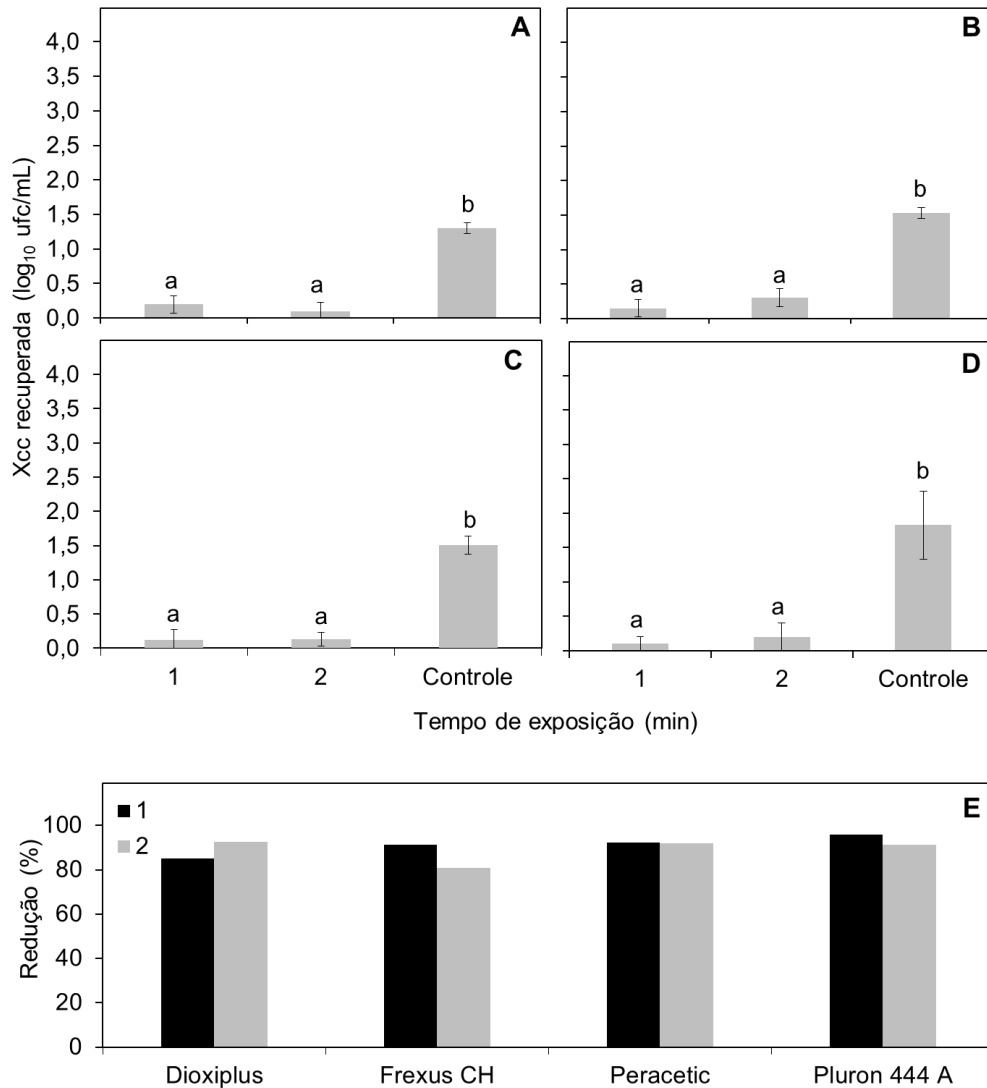


Figura 9. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) proveniente de frutos de lima ácida ‘Tahiti’ contaminados naturalmente em pomar com cancro cítrico recuperada em meio de cultura sólido após 1 e 2 minutos de exposição à calda contendo individualmente os bactericidas Dioxiplus (dióxido de cloro) (A), Frexus CH (oxicloreto de cálcio) (B), Peracetic (ácido peracético) (C) e Pluron 444 A (hipoclorito de sódio) (D) preparados em água de torneira autoclavada (controle) e redução percentual da quantidade de Xcc recuperada em meio de cultura após 1 e 2 minutos de exposição à calda contendo os diferentes bactericidas (E). ufc, unidade formadora de colônia. Para cada produto, colunas seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey ($p=0,05$). Análise realizada com transformação de dados $\sqrt{x+1}$. Barras de erro indicam o erro padrão da média de três experimentos independentes.

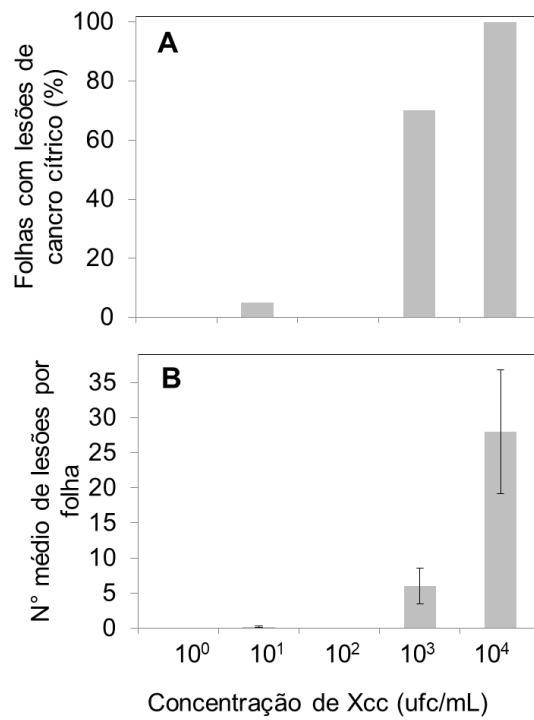


Figura 10. Potencial de suspensões de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) em diferentes concentrações em causar lesões de cancro cítrico após infiltração em folhas de laranja 'Pera'. Incidência de folhas com cancro cítrico (A) e número médio de lesões por folha doente (B), 30 dias após a inoculação. Barras de erros indicam o erro padrão da média (n = 10).

4. DISCUSSÃO

O hipoclorito de sódio é a substância historicamente mais utilizada no mundo para a descontaminação de frutas e hortaliças e a única regulamentada no Brasil para higienização de frutos de citros de mesa em pós-colheita (Basto, 2006; Brasil, 2018). Além do presente estudo, diversos trabalhos demonstraram a eficiência desse produto na descontaminação de frutas de citros (Narciso, 2005; Basto, 2006; Vero et al., 2006; Gottwald et al., 2009; Lindner, 2009; Nascimento & Silva, 2010; Martinez et al., 2014). Martinez et al. (2014) demonstraram que não foi possível recuperar Xcc viável de frutos assintomáticos de limão (*Citrus limon*) colhidos de plantas com cancro cítrico após o tratamento com hipoclorito de sódio. Apesar de ser eficiente, de forma geral, esse produto tende a ser pouco estável pela facilidade de complexação do cloro ativo com moléculas orgânicas (Mcneal et al., 1995; Nascimento & Silva, 2010; Pfunter, 2011). Para minimizar esse efeito é necessário um rigoroso e constante controle do pH da concentração do ingrediente ativo em calda durante o uso. Além disso, o hipoclorito de sódio pode acelerar significativamente a corrosão e depreciação de equipamentos (Moretti, 2007) e formação de substâncias secundárias tóxicas na presença de matéria orgânica (Mcneal et al., 1995; Vero et al., 2006; Nascimento & Silva, 2010; Pfunter, 2011). Essas desvantagens levaram a necessidade de avaliação de outros produtos que também possam ser utilizados em UC de frutos de citros em todo o país.

O presente estudo demonstrou que os bactericidas Dioxiplus (dióxido de cloro), Frexus CH (oxiclureto de cálcio), Peracetic (ácido peracético) e o Pluron 444 A (hipoclorito de sódio), utilizado como referência, foram capazes de eliminar completamente a população de Xcc viável imediatamente após a adição em calda. Além disso, os bactericidas avaliados foram igualmente eficientes na descontaminação de frutos de lima ácida ‘Tahiti’ em pós-colheita contaminados por Xcc. Considerando a epidemiologia da doença, a forma de ação dos produtos avaliados e a semelhança morfológica entre os frutos de citros de diferentes espécies, os resultados desse estudo podem ser aplicados a frutos de laranja, limão, tangerina, tangor, entre outros, importantes para o mercado *in natura*.

De forma geral os bactericidas foram capazes de reduzir a população de Xcc recuperada em até aproximadamente 3,0 unidades de \log_{10} . Os níveis de redução na descontaminação de Xcc em frutos pós-colheita foram similares àqueles obtidos em estudos anteriores. Gottwald et al. (2009) demonstraram redução de aproximadamente 2,0 a 2,5 unidades de \log_{10} ufc/mL na população de Xcc recuperada da superfície de frutos assintomáticos de pomelo (*Citrus paradise*) provenientes de pomares com cancro crítico tratados com hipoclorito de sódio a 200

ppm por 45 segundos. Nesse caso, os melhores resultados foram obtidos quando o tratamento com hipoclorito de sódio foi antecedido pela lavagem dos frutos para remoção de impurezas.

No presente estudo o ácido peracético foi eficiente na descontaminação de frutos de citros com a eliminação da população viável de Xcc em até 2,8 \log_{10} ufc/mL. Outros trabalhos demonstraram anteriormente que esse bactericida possui grande potencial para a higienização de hortaliças e frutas em pós-colheita, incluindo citros. Narciso (2005) observou que o tratamento de frutos de laranja com bactericida a base de ácido peracético a 100 ppm por 1 minuto foi capaz de reduzir a carga de importantes fungos em pós-colheita como *Penicillium digitatum*, *Geotrichum citri-aurantii* e *Colletotrichum gloeosporioides* em até 2,5 unidades de \log_{10} ufc/cm². Da mesma forma, Nascimento & Silva (2010) obteve reduções similares da população de microrganismos em morangos tratados com hipoclorito de sódio a 200 ppm e ácido peracético a 80 ppm.

O dióxido de cloro foi capaz de reduzir a população viável de Xcc em até 2,4 \log_{10} ufc/mL. Esta redução é similar àquela observada por Sun et al. (2016) em frutos de pomelo. Nesse estudo, o dióxido de cloro foi capaz de inibir o crescimento de *Penicillium digitatum* e de reduzir a população de Xcc em 2,4 a 6,4 \log_{10} ufc/mL. Na dose de 60 ppm, este bactericida inibiu completamente o crescimento de Xcc. Em outro trabalho, Vero et al. (2006) demonstraram que o dióxido de cloro foi o bactericida com ação mais rápida na eliminação em pós-colheita de propágulos viáveis de *Penicillium italicum* em frutos de laranja em relação ao hipoclorito de sódio. Além desses microrganismos, o dióxido de cloro demonstrou ser efetivo contra *E. coli*, *Salmonella* sp., *Penicillium expansum* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Wisniewsky et al., 2000; Okull et al., 2006; Mahmoud et al., 2008; Krauthausen et al., 2011). O dióxido de cloro também tem sido associado a prevenção e destruição de biofilmes (Birko, 2005; Bang et al., 2014), importante na colonização e sobrevivência de bactérias em superfícies de frutas e hortaliças em pós-colheita.

Como alternativa aos produtos líquidos, este estudo avaliou o oxiclureto de cálcio, o qual proporcionou redução de até 2,7 \log_{10} ufc/mL na população viável de Xcc em frutos de lima ácida 'Tahiti'. Dentre os bactericidas avaliados, o oxiclureto de cálcio é o que apresenta menor volume de pesquisas relacionadas ao uso como agente para higienização de frutas e hortaliças. Trabalho prévio reportou que este sanitizante é eficiente na redução da germinação de conídios de *Botrytis cinerea* e da severidade do mofo cinzento em peras inoculadas (Nunes et al., 2012). Em outro estudo, Domingues et al. (2016) demonstraram o potencial do oxiclureto de cálcio na redução da incidência de podridões causadas por *Penicillium*, *Pezizula malicorticis* e *Alternaria* em maçã. Além disso, o oxiclureto de cálcio tem sido utilizado nos

EUA, por recomendação do FDA, para o tratamento de sementes de alfafa e feijão mungo utilizadas na produção de brotos comestíveis contra *E. coli* e *Salmonella* (Fett, 2002a, 2002b; Suslow et al., 2002).

O presente estudo também demonstrou que, tanto para frutos contaminados com Xcc em laboratório como para frutos contaminados naturalmente no pomar, não houve diferença significativa na eficiência dos bactericidas na descontaminação contra Xcc para os tempos de exposição de 1 ou 2 minutos. Resultados satisfatórios também foram obtidos em trabalhos anteriores para descontaminação de frutos contra Xcc utilizando tempo de exposição de 45 segundos e 1 minuto (Narciso, 2005; Vero et. al., 2006; Gottwald et al., 2009). Em alguns países, como Estados Unidos, tempos menores de tratamentos de frutos de citros com bactericidas já são regulamentados e praticados (United States Department of Agriculture, 2006). Desta forma, diante dessas evidências, é justificável que o tempo de tratamento exigido no protocolo de descontaminação de frutos de citros da legislação brasileira seja revisado.

Assim como em pesquisas anteriores relacionadas (Gottwald et al., 2009; Sun et al., 2016), esse estudo demonstrou que apesar dos bactericidas avaliados não serem capazes de eliminar completamente a população viável de Xcc presentes na superfície dos frutos de citros o potencial infectivo das bactérias remanescentes é insignificante. Embora em folhas inoculadas com suspensão de Xcc na concentração de 10^1 ufc/mL tenha resultado apenas uma folha com sintoma, a qual apresentou uma única lesão da doença, é importante ressaltar que a inoculação foi realizada pela infiltração de suspensão bacteriana diretamente no mesófilo foliar, método mais invasivo do que as condições de naturais de infecção em campo. Além disso, foi demonstrado que a população de Xcc remanescentes nos frutos foi sempre inferior a esta concentração. Outros fatores importantes a serem considerados são que a população de Xcc recuperada de frutos higienizados não necessariamente corresponde a população de Xcc capaz de causar doença (Gottwald et al., 2009) e que há um declínio natural da população bacteriana durante o transporte. Martinez et al. (2014) demonstraram que o tempo de deslocamento de um container da América do Sul à Europa também é capaz de reduzir a população de Xcc viável presente em frutos de limão assintomáticos.

Segundo o artigo 49 da IN 21/2018, em vigência, a higienização dos frutos de citros em pós colheita contra Xcc só pode ser realizada com a “imersão em solução com hipoclorito de sódio a duzentos ppm, pH sete, durante dois minutos” (MAPA, 2018). Contudo, o mesmo artigo possibilita a regulamentação de “outros métodos ou produtos para higienização, homologados pela pesquisa e reconhecidos pelo MAPA” (MAPA, 2018). Diante desta concessão e dos resultados obtidos nesse trabalho, os quais corroboram com estudos prévios relacionados

conforme apresentado, é plausível que tanto os produtos regulamentados quanto o tempo de exposição para descontaminação de frutos de citros em pós-colheita contra Xcc, agente causal do cancro cítrico, sejam revistos.

5. CONCLUSÕES

Os bactericidas alternativos Dioxiplus (dióxido de cloro), Frexus CH (oxicloreto de cálcio), e Peracetic (ácido peracético) são eficientes para descontaminação de frutos de citros contra Xcc em pós-colheita.

A redução do tempo de exposição dos frutos de citros aos bactericidas avaliados de 2 para 1 minuto não interfere na eficiência de descontaminação contra Xcc em pós-colheita.

REFERÊNCIAS

- Andrade, J.N., Macedo, J.A.B. 1996. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo. 182 p.
- Bang, J., Hong, A., Kim, H., Beuchat, L.R., Rhee, M.S., Kim, Y., Ryu, J.H. 2014. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in biofilm on food-contact surfaces by sequential treatments of aqueous chlorine dioxide and drying. **International Journal of Food Microbiology** 191:129-134.
- Barelli, N.L. 2013. Estudo de caso de sucesso de erradicação de cancro cítrico em propriedade citrícola na região sul do estado de São Paulo. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.
- Bastos, M.S.R. 2006. **Frutas minimamente processadas: aspectos de qualidade e segurança**. Embrapa Agroindústria Tropical. 59 p.
- Behlau, F., Belasque Junior, J. 2014. **Cancro cítrico: a doença e seu controle**. Araraquara, SP. Fundecitrus. 94 p.
- Behlau, F., Fonseca, A.E., Belasque Junior, J. 2016. A comprehensive analysis of the citrus eradication program in from 1999 to 2009. **Plant Pathology** 65:1390-1399.
- Belasque Junior, J., Barbosa J.C., Bergamin Filho, A., Massari, C.A. 2010. Prováveis consequências do abrandamento da metodologia de erradicação do cancro cítrico no estado de São Paulo. **Tropical Plant Pathology** 35:314-317.
- Birko. 2005. **10 Reasons why you should be using chlorine dioxide**. Food Safety Magazine. Disponível em: <<https://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/februarymarch-2005/food-safety-insider-sanitation-solutions/10-reasons-why-you-should-be-using-chlorine-dioxide/>>. Acesso 31 jan. 2019.
- Bitancourt, A. A. 1957. O cancro cítrico. **O Biológico** 23:101-111.
- Brasil. Instrução Normativa MAPA nº 21, de 25 de abr. de 2018. Institui, em todo o território nacional, os critérios e procedimentos para o estabelecimento e manutenção do status fitossanitário relativo à praga denominada Cancro Cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*). **Diário Oficial da União**, 11 de mai. de 2018. Seção 1, p 9.
- Carvalho, H.A., Chitarra, M.I.F., Chitarra, A.B., Menezes, J.B. 1998. Eficiência da concentração de cloreto de cálcio e do tempo de imersão no tratamento pós-colheita de goiaba de polpa branca cv. Kumagai. *Revista Brasileira de Fruticultura* 20:375-381
- Christiano, R.S.C. 2006. Cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) e sua interação com a lagarta minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) em laranja doce (*Citrus sinensis*). **Tese de Doutorado**. Piracicaba SP: Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz.

Domingues, S., Santos, A.S., Santos, K.C., Gabardo, G.C., Schweitzer, B., 2016. Tratamento pós colheita de frutos de maçã para redução da incidência de podridões. **Revista Congrega Urcamp** 1-8.

Dopson, R.N. 1964. The eradication of citrus canker. **Plant Disease Reporter** 48:30-1.

European Commission. 2018. **European Union Notification System for Plant Health Interceptions - EUROPHYT**. Disponível em:
<https://ec.europa.eu/food/plant/plant_health_biosecurity/europhyt/interceptions_en>. Acesso em: 22 out. 2018.

Fett, W.F. 2002a. Factors affecting the efficacy of chlorine against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* on alfalfa seed. **Food Microbiology** 19:135–149.

Fett, W.F. 2002b. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp on laboratory-inoculated mung bean seed by chlorine treatment. **Journal of Food Protection** 65:848–852.

Food and Agriculture Organization. 2006. **NIMF N° 14 O uso de medidas integradas em um sistema de mitigação de risco para o manejo de risco de pragas**. Disponível em:
<https://www.ippc.int/largefiles/NIMF_14_2002_PTFINAL_0.pdf>. Acesso em: 22 out. 2018.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2017. **Levantamento de doenças dos citros: HLB, CVC e Cancro cítrico**. Araraquara, SP: Fundecitrus, 56 p.

Gottwald, T.R., Graham, J.H., Schubert, T.S. 2002. **Citrus canker: the pathogen and its impact**. Plant health progress. Disponível em:
<<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/citruscanker/>>. Acesso em: 21 nov. 2017.

Gottwald, T., Graham, J., Bock, C., Bonn, G., Civerolo, E., Irey, M., Leite, R., McCollum, G., Parker, P., Ramalho, J., Riley, T., Schubert, T., Stein, B., Taylor, E. 2009. The epidemiological significance of post-packinghouse survival of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* for dissemination of Asiatic citrus canker via infected fruit. **Crop Protection** 28:508-524.

Leite Júnior, R.P. 1990. **Cancro cítrico: prevenção e controle no Paraná**. Londrina, PR: IAPAR. 51 p. Circular 61.

Lindner, J.L. 2009. **Los cítricos y su poscosecha en Uruguay**. Uruguay: INIA. (Hoja de Divulgación, 98). Disponível em:
<<http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/1506/1/18429080509094836.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2018.

Mahmoud, B.S., Vaida, N.A., Corvalan, C.M., Linton, R.H. 2008. Inactivation kinetics of inoculated *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Poona* on whole cantaloupe by chlorine dioxide gas. **Food Microbiol** (7):857-865.

Martinez, V., Acosta, E., Rojas, A., Stein, B., Ramalho, J. 2014. Estudios de sobrevivencia de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* en frutos de limoneros y su dispersión a partir de frutos cosechados y severamente infectados. **Revista industrial y agrícola de Tucumán** (2):17-24.

Mcneal, T.P., Hollifield, H.C., Diachenko, G.W. 1995. Survey of trihalomethanes and other volatile chemical contaminants in processed foods by purge-and-trap capillary gas chromatography with mass selective detection. **Journal of AOAC International** 78(2):391-397.

Krauthausen, H.J., Laun, N., Wohanka, W. 2011. Methods to reduce the spread of the black rot pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, in brassica transplants. **Journal of Plant Diseases and Protection** 118(1):7-16.

Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2018. **AGROSTAT – Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro**. Disponível em: <<http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>>. Acesso em: 22 out. 2018.

Moretti, C.L. 2007. **Manual de processamento mínimo de frutas e hortaliças**. Embrapa Hortaliças. 531 p.

Narciso, J.A. 2005. An assessment of methods to clean citrus fruit surfaces. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**. 118:437-440.

Nascimento, M.S., Silva, N. 2010. Tratamentos químicos na sanitização de morango (*Fragaria vesca* L). **Brazilian Journal Food Technology** 13 (1):11-17.

Neves, M.F., Trombin, V.G, Milan, P., Lopes, F.F., Cressoni, F., Kalaki, R. 2010. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. Ribeirão Preto, SP. 137 p.

Nunes, C.C., Alves, S.A.M., Antonioli, R. 2012. Sanitizantes para redução da germinação de *Botrytis cinerea* e da severidade de mofo cinzento em pera. **XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura**. Bento Gonçalves, RS. p. 2349-2352.

Okull, D.O., Demirci, A., Rosenberger, D.A., Laborde, L.F., 2006. Susceptibility of penicillium expansum spores to sodium hypochlorite, electrolyzed oxidizing water, and chlorine dioxide solutions modified with nonionic surfactants. **Journal of Food Protection** 69(8):1944–1948.

Paraná. Resolução estadual nº 079/90 de 1990. Permitir a implantação de citricultura em áreas indenes das propriedades da região interdita, desde que saneadas da doença denominada cancro cítrico. **Secretário de Estado da Agricultura e do Abastecimento**. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao/Sanidade_Vegetal/Citricultura/resoluc_ao_79_1990.pdf>. Acesso em: 22 out. 2018.

Parra, J.R.P., Chagas, M.C.M., Yamamoto, P.T. 2004. O controle biológico da larva-minadora dos citros. **Visão Agrícola** 2:64-67

Pfuntner, A. 2011. **Sanitizers and disinfectants**: the chemicals of prevention. Food Safety Magazine. Disponível em: <<https://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/augustseptember-2011/sanitizers-and-disinfectants-the-chemicals-of-prevention/>>. Acesso em: 22 out. 2018.

Redondo, C., Sena-Vélez, M., Gella, I., Ferragud, E., Sabuquillo, P., Graham, J.H., Cubero, J., 2015. Influence of selected bactericides on biofilm formation and viability of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Crop Protection** 78:204–213.

Santos, C.F.O. 1991. Cancro Cítrico: ocorrência no Brasil e seu combate. In: Rodriguez, O., Viégas, F., Pompeu Júnior, J., Amaro, A.A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. Campinas, SP: Fundação Cargill. p. 787-823. v. 2.

São Paulo. Resolução SAA n° 147, de 31 de out. de 2013. Estabelece procedimentos a serem adotados no Estado de São Paulo visando a supressão/erradicação da praga denominada cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Diário Oficial**, 01 de nov. de 2013. Seção 1, p 50.

Schubert, T.S., Rizvi, S.A., Sun, X., Gottwald, T.R., Graham, J.H., Dixon, W.N. 2001 Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida. **Plant Disease** 85:340-356.

Silva, A.C.R., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., MonteiroVitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M.C., Do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E.A., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M.B., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J.S., Ferreira, R.C.C., Ferro, M.I.T., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C., Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite Junior, R.P., Lemos, E.G.M., Lemos, M.V.F., Locali, E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M.B.N., Martinez-Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J., Menck, C.F.M., Miyaki, C.Y., Moon, D.H., Moreira, L.M., Novo, M.T.M., Okura, V.K., Oliveira, M.C., Oliveira, V.R., Pereira JR., H.A., Rossi A., Sena, J.A.D., Silva, C., De Souza, R.F., Spinola, L.A.F., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I.D., Trindade, M.S., Truffi, D., Tsai, S.M., White, F.F., Setúbal, J.C., Kitajima, J.P. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature** 417(6887):459-463.

Srebernich, S.M. 2007. Utilização do dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 27:744-750.

Sun, X., Baldwin, E., Ference, C., Narciso, J., Plotto, A., Ritenour, M., Harrison, K., Gangemi, D., Bai, J. 2016. The effect of controlled-release chlorine dioxide on the preservation of grapefruit. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society** 129:203–207.

Suslow, T.V., Wu, J., Fett, W.F., Harris, L.J. 2002. Detection and elimination of *salmonella mbandaka* from naturally contaminated alfalfa seed by treatment with heat or calcium hypochlorite. **Journal of Food Protection** 65:452-458. Disponível em:

<<https://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-65.3.452>>. Acesso em: 21 nov. 2017.

United States Department of Agriculture. 2006. **Chlorine/Bleach**: crops. Technical Evaluation Report. Disponível em:

<<https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Chlorine%20%20TR%202006.pdf>>.

Acesso em: 31 jan. 2019.

Vero, S., Gamendia, G., Garat, F., Alaniz, S., Aurrecochea, I., Wozniak, A., Silvera, E. 2006. **Alternativas al tratamiento convencional en postcosecha de citrus**. Disponível em:

<<http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/publica/conferencia15.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2018.

Wisniewsky, M.A., Glatz, B.A., Gleason, M.L., Reitmeier, C.A., 2000. Reduction of escherichia coli O157:H7 counts on whole fresh apples by treatment with sanitizers. **Journal of Food Protection** 63(6):703-708. Disponível em: <<https://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-63.6.703>>. Acesso em: 19 dez. 2018.