

**FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA
MESTRADO PROFISSIONAL EM
FITOSSANIDADE DOS CITROS**

JASMINE DE FREITAS

**Compatibilidade e eficiência de estrobilurina em misturas com
agroquímicos na inibição de *Phyllosticta citricarpa***

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

Orientador: Dr. Geraldo José Silva Junior

Coorientador: Dr. Fabrício Eustáquio Lanza

**Araraquara
Maio 2021**

JASMINE DE FREITAS

Compatibilidade e eficiência de estrobilurina em misturas com agroquímicos na inibição de *Phyllosticta citricarpa*

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

Orientador: Dr. Geraldo José Silva Junior

Coorientador: Dr. Fabrício Eustáquio Lanza

**Araraquara
Maio 2021**

JASMINE DE FREITAS

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

Araraquara, 26 de maio de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Dr. João Paulo Arantes Rodrigues da Cunha
Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia/MG

Me. Marcelo da Silva Scapin
Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS, Araraquara/SP

Dr. Fabrício Eustáquio Lanza (Coorientador)
Cambuhy Agrícola LTDA, Matão/SP

Dr. Geraldo José Silva Júnior (Orientador)
Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS, Araraquara/SP

Dedico

À todas as pessoas que atuam no setor científico brasileiro, em especial aos profissionais da pesquisa agrícola, que contribuem para a evolução da pesquisa e ciência no Brasil.

A todos os professores, em especial aos que fizeram parte da minha formação como pessoa e profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo bem-sucedido fim de mais um ciclo em minha vida e pela oportunidade de aprendizado e crescimento como pessoa e espírito.

Ao professor Dr. Geraldo José Silva Junior por toda orientação e contribuição na realização deste trabalho; pela confiança, apoio incondicional e amizade dedicados a mim durante todo esse tempo que estivemos trabalhando juntos, assim como, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Ao Dr. Fabrício Eustáquio Lanza por toda orientação e contribuição na realização deste trabalho, assim como, pela confiança, apoio e amizade dedicados a mim durante todo o meu mestrado.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura pela oportunidade de cursar o Mestrado Profissional em Controle de Doenças e Pragas dos Citros – Mastercitrus como bolsista através da Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola – Fundag.

A todos os docentes do Mestrado Profissional em Fitossanidade dos Citros – Mastercitrus, por todo apoio e conhecimentos dedicados a mim e pelos bons momentos vividos durante as disciplinas cursadas.

Aos pesquisadores do Fundecitrus, por todo apoio e conhecimento dedicados a mim durante todo meu mestrado.

À equipe Doenças Fúngicas, Rosana Pereira, Rafael Smirne, João Pedro Pereira, Régis Fialho, Deivid Floriano, Franklin Machado e Rafaele Moreira por todo apoio e amizade durante todo o meu mestrado.

Aos colegas do Departamento Científico do Fundecitrus, em especial aos amigos, Fabricio Jaciani, Elaine Martins, Camila Fassini, Talita dos Santos, Mônica Neli, Michele Dutra, Laudecir Lemos Júnior, Everton Carvalho, Isabela Primiano, Samuel Silva, Alisson Cayres, Ricardo Teodoro, Moacir Vizoni, Rafael Garcia e Olavo Bianchi por todo apoio e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os funcionários do Fundecitrus, em especial às secretárias Priscila Barsaglini e Andrieli Botacio, por todo apoio e amizade durante todo meu mestrado.

Ao Dr. Hamilton Humberto Ramos e toda equipe do Centro de Engenharia e Automação, do Instituto Agrônomo de Campinas, por realizarem as primeiras avaliações de compatibilidade físico-química das misturas avaliadas nesse trabalho.

Ao professor Dr. Saulo Santesso Garrido, por permitir que eu realizasse a leitura das microplacas no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química de Araraquara.

Aos amigos Beatriz Sanchez, Jonatas Angelo e Carolina Zambom, por colaborarem nas leituras de placas no Instituto de Química de Araraquara e por todo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais Gilda de Freitas e Luiz de Freitas por toda dedicação, cuidado, apoio, carinho e amor dedicados a mim por toda minha vida.

À minha irmã Janaina Alvarenga, por todo cuidado, apoio, carinho amor e incentivo dedicados a mim por toda a minha vida.

A todos os colegas da turma de 2019 do Mastercitrus pela amizade, cumplicidade e bons momentos vividos durante todo o mestrado.

A todos os meus amigos e familiares, pelo apoio, carinho e momentos descontraídos que vivemos, tornando minha vida mais leve e feliz.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, o meu muito obrigada!

“É no conhecimento que existe a chance de libertação”
(Leandro Karnal)

Compatibilidade e eficiência de estrobilurina em misturas com agroquímicos na inibição de *Phyllosticta citricarpa*

Autor: Jasmine de Freitas

Orientador: Dr. Geraldo José Silva Junior

Coorientador: Dr. Fabrício Eustáquio Lanza

Resumo

Entre todos os problemas fitossanitários que afetam os citros, a pinta preta é considerada um dos mais importantes devido aos danos que a doença pode causar. A fase de proteção dos frutos contra a pinta preta coincide com o período de controle das principais pragas e doenças dos citros, exigindo a adoção do manejo conjunto de mais de um alvo. Esse manejo conjunto geralmente é realizado com mistura de agroquímicos em tanque de pulverização. Durante a mistura no tanque podem surgir três efeitos advindos da interação desses produtos, sendo eles: o efeito aditivo, o efeito sinérgico ou o efeito antagônico, que conferem, respectivamente, eficiência superior, semelhante ou inferior ao da aplicação dos produtos isoladamente. Por isso, existem aspectos importantes que devem ser mensurados antes da utilização de misturas de agroquímicos em tanque, dentre eles, a compatibilidade entre os produtos, a eficiência de controle do alvo, o custo-benefício das aplicações e os possíveis riscos ao meio ambiente. Deste modo, os objetivos do presente trabalho foram: i) avaliar a compatibilidade físico-química de misturas de piraclostrobina (estrobilurina, principal grupo químico de fungicidas no controle da pinta preta) com agroquímicos comumente utilizados em pomares de citros (abamectina, bifentrina, oxicloreto de cobre, enxofre, imidacloprido, óleo mineral, sulfatos de zinco e manganês, ureia e zeta-cipermetrina); ii) avaliar a eficiência biológica das misturas na inibição de *Phyllosticta citricarpa* (agente causal da pinta preta) em laboratório; iii) avaliar o efeito fitotóxico de misturas de piraclostrobina com outros agroquímicos em campo. Um levantamento foi realizado pelo Fundecitrus em diferentes empresas e produtores de citros e foram selecionadas 21 misturas que continham a piraclostrobina. A compatibilidade físico-química dos produtos nessas misturas foi avaliada seguindo a norma NBR 13 875 com os testes estático (calda em repouso) e dinâmico (calda em agitação). A eficiência de inibição de *P. citricarpa* foi avaliada por meio dos ensaios de crescimento micelial e microtitulação à base de resazurina. As misturas avaliadas nesse estudo apresentaram pelo menos um tipo de incompatibilidade físico-química descrita pela NBR 13 875. Em nove das 21 caldas testadas foram observados cristais e/ou grumos. No ensaio de crescimento micelial, a concentração efetiva da piraclostrobina usada individualmente para inibição de 50% (CE_{50}) do crescimento micelial de *P. citricarpa* foi similar ao estimado para outras 19 misturas, com valores inferiores ou iguais a 0,005 mg/L. As outras duas misturas apresentaram CE_{50} de 0,007 a 0,014 mg/L. No ensaio com resazurina, a piraclostrobina reduziu a taxa de respiração do patógeno mesmo em mistura com a maioria dos agroquímicos; porém se mostrou um método com baixa repetitividade. As oito misturas aplicadas no campo não apresentaram fitotoxidade quando comparadas com a testemunha não pulverizada. Trabalhos futuros poderiam avaliar a eficiência das misturas com incompatibilidades físico-química e leves incrementos nos valores de CE_{50} no controle da pinta preta em campo. Esse estudo fornece informações relevantes sobre misturas de diferentes agroquímicos com estrobilurina, que poderão auxiliar o citricultor na tomada de decisão sobre quais produtos utilizar em tanque de pulverização durante o período de controle de pinta preta em pomares comerciais de citros.

Palavras-chave: piraclostrobina, misturas de agroquímicos, compatibilidade físico-química, eficiência biológica.

Compatibility and efficiency of strobilurin in mixtures with agrochemicals on inhibition of *Phyllosticta citricarpa*

Author: Jasmine de Freitas

Advisor: Dr. Geraldo José Silva Junior

Co-advisor: Dr. Fabrício Eustáquio Lanza

Abstract

Among all the phytosanitary problems that affect citrus orchards, citrus black spot (CBS) has been considered one of the most important due to its damages and losses. The period of fruit protection against CBS coincides with the control period of the main citrus pests and diseases, which requires the adoption of joint management of more than one biological target. This management is usually performed with agrochemicals in tank mixtures. Three different effects may occur from the products interaction during the mixing process in the spray tank: the additive, the synergistic or the antagonistic effect, which may result, respectively, in higher, similar or lower efficiency than the isolated use of these products in a spray. There are important factors that must be considered before the use of pesticides in tank mixtures, such as, compatibility, efficiency of control, cost benefit of applications and possible risks to the environment. Therefore, this study aimed to: (i) assess the physical-chemical compatibility of the pyraclostrobin (strobilurin, the main chemical group of fungicide for CBS control) in mixture with agrochemicals commonly applied in citrus orchards (abamectin, bifenthrin, copper oxychloride, sulfur, imidacloprid, mineral oil, zinc and manganese sulfates, urea and zeta-cypermethrin); (ii) assess the biological efficiency of selected mixtures in the inhibition of *Phyllosticta citricarpa* (causal agent of CBS) in laboratory, and (iii) to assess the phytotoxic effect of mixtures containing pyraclostrobin on sweet orange trees in commercial orchard. A survey was conducted by Fundecitrus team in commercial citrus property and 21 mixtures containing pyraclostrobin were selected. The physical-chemical compatibility of these mixtures was assessed following the Brazilian protocol NBR 13 875 that includes a static test (mixture left to stand) and dynamic test (mixture left shaking). The efficiency of *P. citricarpa* inhibition was assessed by mycelial growth and resazurin-based microtiter assays. The mixtures assessed in this study showed at least one kind of physical-chemical incompatibility described by the NBR 13 875. Nine of the 21 mixtures had crystals and/or lumps. In the mycelial growth assay, the effective concentration of pyraclostrobin to inhibit 50% (EC_{50}) of the *P. citricarpa* grown was similar to values estimated for other 19 mixtures, with averages below or equal 0.005 mg/L. The two other mixtures presented EC_{50} values of 0.007 to 0.014 mg/L. In the microtiter assay, pyraclostrobin reduced the rate of pathogen respiration even when used in mixtures with most agrochemicals; however, this method has lower repeatability. The eight mixtures tested in commercial orchard did not cause phytotoxicity on fruit compared with non-sprayed trees. Further investigations may assess the efficiency of mixtures that presented physical-chemical incompatibilities or slight increases in the CE_{50} values for CBS control in the field conditions. This study provides a better understanding of strobilurin tank mixtures, which may help citrus growers to select agrochemicals for use in tank mixture during the CBS control period in commercial citrus orchards.

Keywords: pyraclostrobin, agrochemical mixtures, physicochemical compatibility, biological efficiency.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1 Seleção dos produtos	5
2.2 Compatibilidade físico-química das misturas de agroquímicos.....	6
2.3 Eficiência biológica das misturas sobre <i>Phyllosticta citricarpa</i> em laboratório.....	9
2.3.1 Ensaio de crescimento micelial.....	9
2.3.2 Ensaio de microtitulação à base de resazurina.....	10
2.4 Avaliação de fitotoxicidade das misturas em campo	13
2.5 Análise estatística.....	14
3. RESULTADOS	15
3.1 Compatibilidade físico-química das misturas de agroquímicos.....	15
3.2 Eficiência biológica das misturas sobre <i>Phyllosticta citricarpa</i> em laboratório.....	17
3.2.1 Ensaio de crescimento micelial.....	17
3.2.2 Ensaio de microtitulação à base de resazurina.....	21
3.2.3 Análise do pH das caldas dos ensaios de eficiência biológica.....	27
3.3 Avaliação da fitotoxicidade das misturas em campo	27
4. DISCUSSÃO	29
5. CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é líder mundial na produção da laranja doce e destaca-se como principal produtor e exportador de suco de laranja, com 64% da produção mundial e 76% das exportações mundiais deste produto, respectivamente (FNP Consultoria & Comércio, 2020). A citricultura brasileira está presente em vários estados, porém o cinturão citrícola do estado de São Paulo e Triângulo Mineiro representa 95% da produção nacional (PES, 2020). A área total com pomares de laranja nesse cinturão foi de 407 mil ha na safra 2020/2021, com 174 milhões de árvores produtivas, que produziram cerca de 287 milhões de caixas de 40,8 kg (PES, 2020).

Embora grandes quantidades de suco de laranja sejam produzidas e exportadas, o setor citrícola brasileiro perde parte da sua produção ainda no pomar. Essas perdas são causadas pela ampla gama de pragas e doenças que atacam os citros, as quais afetam negativamente a quantidade e qualidade dos frutos produzidos (Bergamin Filho et al., 2018). O cinturão citrícola possui algumas características que tornam os pomares um ambiente muito favorável à ocorrência de surtos de pragas e epidemias de doenças. Tais características são: as condições climáticas favoráveis a sobrevivência dos patógenos de plantas e/ou seus vetores e ao aumento da duração dos estádios fenológicos mais suscetíveis da planta hospedeira, a continuidade espacial entre os pomares próximos plantados em extensas áreas, a continuidade temporal da cultura perene e a continuidade genética das poucas variedades plantadas (Bassanezi et al., 2003; Bassanezi et al., 2012; Andrade et al., 2014).

As principais doenças que causam danos no parque citrícola paulista são o huanglongbing (HLB, greening), causado pelas bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter americanus*, que são transmitidas por *Diaphorina citri* (Kuwayama), a pinta preta dos citros, causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*, o cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, a podridão floral, causada por espécies de *Colletotrichum*, a leprose, causada pelo vírus *Citrus leprosis virus C* transmitido por ácaros, além das pragas: *Gymnandrosoma aurantianum* (Lima), mariposa conhecida como Bichofurão e as moscas *Ceratitis capitata* (Wiedemann) e *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann), conhecidas como moscas-das-frutas. Essas pragas e doenças estão associadas com queda de frutos e redução na produção das plantas. Na safra 2020/2021, a queda de frutos total foi estimada em 17,6%, sendo que 12,5% (50 milhões de caixas) foram associados com doenças e pragas (PES, 2020).

O manejo das doenças mais importantes para a citricultura paulista é baseado na implantação de diferentes medidas de controle, sendo elas: o controle genético, biológico, químico, físico e cultural. O manejo integrado, que prega o uso conjunto de diferentes medidas de controle, é a melhor ferramenta para o manejo de doenças e pragas dos citros, tendo vantagem por ser muito eficiente, de menor custo e menos agressivo ao meio ambiente, pois contempla os principais métodos de controle (Laranjeira et al., 2005). Entre os métodos citados, o controle químico com aplicações de agroquímicos é o mais utilizado para manejar essas doenças, sendo em muitos casos a única estratégia eficiente e economicamente viável para garantir as altas produtividades e qualidade de produção (Amorim et al., 2011).

As pragas e doenças geralmente acometem as plantas de citros em um mesmo momento no campo, exigindo a adoção de medidas de controle conjunto para mais de um problema fitossanitário, tais como o uso de misturas de produtos em tanque. A mistura em tanque é definida como a adição de mais de um produto, quer seja agrotóxico ou não, no tanque do equipamento pulverizador (Gazziero, 2015). Tal prática é uma ferramenta que apresenta vantagens em relação à aplicação de apenas um produto em tanque, tanto nos aspectos técnicos e operacionais, como também pela economia proporcionada (Azevedo, 2015). Adicionalmente, outros fatores justificam o uso de misturas em tanque, como: redução de pulverizações em uma mesma área, menos compactação do solo, maior eficiência de trabalho, menor tempo de exposição do aplicador a agrotóxicos, menor número de máquinas e economia de água, tempo, combustível e mão de obra (Leite & Uemura, 2014).

Durante a mistura em um tanque de pulverização podem surgir três efeitos advindos da interação desses produtos, sendo eles: o efeito aditivo, o efeito sinérgico ou o efeito antagônico, que conferem, respectivamente, eficiência superior, semelhante ou inferior ao da aplicação dos produtos isoladamente (Ramos & Araújo, 2006). Por isso, existem aspectos importantes que devem ser mensurados antes da utilização de misturas de agroquímicos em tanque, dentre eles, o custo-benefício das aplicações e os possíveis riscos aos seres humanos e ao meio ambiente (Azevedo, 2015).

Em países com agricultura altamente tecnificada, como Austrália e Canadá, que já possuem instruções e normas técnicas regulamentadas sobre misturas em tanque, o uso de calda com mais de um agroquímico é comum, pois tal prática pode reduzir o custo das aplicações e ampliar a ação do tratamento de certos produtos (Azevedo, 2015). No Brasil, a mistura em tanque não era regulamentada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo sua recomendação em receituário agrônomo uma prática proibida até 2018 (AENDA, 2011; MAPA, 2018). Devido à demanda de uso de misturas pelos

agricultores, o MAPA publicou a Instrução Normativa nº40 (IN 40) de 2018, que passou a regulamentar o uso de misturas de agroquímicos em tanque de pulverização. A IN 40 estabelece que a recomendação de misturas em tanque deva ser feita a partir de informações técnicas previamente publicadas; porém, a literatura carece de informações sobre o uso e os procedimentos para misturas de agroquímicos em tanque de pulverização.

No Brasil, é de conhecimento público que existe o uso de mistura em tanque pelos produtores, mesmo sem haver o devido acompanhamento técnico (Azevedo, 2015), o que levou a ocorrência de problemas, como a incompatibilidade entre os produtos. Os problemas mais comuns são: o entupimento de bicos do pulverizador, a sedimentação de produtos, a formação de grumos e de espuma e a perda de eficiência no controle do alvo (Gazziero, 2015). Frequentemente os agroquímicos em mistura reagem entre si, podendo resultar na formação de compostos de menor eficácia e persistência biológica e produtos fitotóxicos, que causam injúrias na cultura. Conseqüentemente, tais problemas são muito indesejáveis e prejudiciais a qualidade de aplicação (Azevedo, 2015). A reação entre os agroquímicos em mistura ocorre inicialmente através de interações físicas (governadas pelas características físico-químicas da calda) que, conseqüentemente, leva a ocorrência das interações químicas. Além disso, geralmente a interação física está associada aos ingredientes inertes contidos na formulação dos produtos, já a interação química está associada aos ingredientes ativos (Petter et al., 2013).

Entre todos os problemas fitossanitários que afetam citros, a pinta preta é considerada um dos mais importantes devido aos danos que a doença pode causar (Silva Junior et al., 2016b). A doença pode prejudicar a comercialização do fruto *in natura* devido à danos estéticos dos frutos sintomáticos e causar a queda prematura dos frutos (Kotzé, 1981). Entre as safras 2017/2018 e 2019/2020, a pinta preta foi associada com a queda prematura média de 2,1% dos frutos no parque citrícola paulista, o que representou uma perda total estimada para as três safras de 23 milhões de caixas de laranja e um montante em torno de R\$ 450 milhões (PES, 2020). Em pomares afetados pela doença e onde medidas de manejo não são adotadas de maneira correta, podem ocorrer perdas de até 80% da produção (Silva Junior et al., 2016a,b). Os sintomas da pinta preta estão restritos ao flavedo e não interferem na qualidade do suco. Portanto, como mais de 70% da produção de frutos do parque citrícola paulista é destinada a produção de suco, o controle da doença em São Paulo é focado principalmente na redução da queda prematura de frutos e conseqüentemente na manutenção de altas produtividades (Silva Junior et al., 2016a; Lanza et al., 2018).

A pinta preta foi relatada no Brasil em 1980, no estado do Rio de Janeiro (Robbs et al., 1980) e em 1992, a doença foi encontrada em pomares do estado de São Paulo (Goes &

Feichtenberger, 1993). A pinta preta pode afetar laranjas doces, limões verdadeiros, tangerinas e alguns híbridos de citros, com exceção a lima-ácida “Tahiti” (*Citrus latifolia*) (Aguilar-Vildoso et al., 2002).

O fungo agente causal da pinta preta é capaz de produzir dois tipos de inóculos, sendo eles esporos sexuados (ascósporos) e esporos assexuados (conídios). O ascósporo é responsável pelo ciclo primário da doença, ou seja, pela introdução do patógeno em área ainda livre da doença (Spósito et al., 2011). Os conídios são produzidos em vários ciclos (ciclos secundários) durante a mesma safra (Sivanesan, 1984). Esses esporos são produzidos em picnídios nas lesões presentes em frutos, em ramos secos e em folhas. Os conídios são disseminados através da água, a curtas distâncias, por escorrimento para outras partes da planta abaixo da fonte de inóculo. Nas condições climáticas do Brasil tanto ascósporos quanto conídios são importantes para o ciclo da doença (Spósito et al., 2011).

Diferentes métodos de manejo podem ser empregados nos pomares de citros para o manejo da pinta preta, sendo os controles químico e cultural os mais utilizados (Scaloppi et al., 2012; Bassanezi et al., 2016). A principal estratégia de controle químico da pinta preta é por meio de pulverizações com fungicidas do grupo das estrobilurinas (azoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina) e cúpricos (hidróxido de cobre, oxiclreto de cobre e óxido cuproso), realizadas em intervalos que variam de 35 a 42 dias e intervalos de 21 a 28 dias, respectivamente (Fundo de Defesa da Citricultura, 2016; Silva Junior et al., 2016a).

De maneira geral, as pulverizações para proteção dos frutos contra pinta preta se iniciam na fase de queda das pétalas (agosto/setembro a novembro/dezembro) e se estendem até o final do período chuvoso (fevereiro/março a abril/maio) (Silva Junior, 2016a). Normalmente, a fase de proteção dos frutos contra pinta preta coincide com o período de controle de outras pragas e doenças dos citros, tornando necessário, em muitos casos, a utilização da estrobilurina associada a inseticidas e acaricidas em uma mesma calda, ou seja, em mistura. Entretanto, não se conhece os efeitos decorrentes da associação desses produtos em tanque na eficácia de controle dos fungos pela estrobilurina.

Deste modo, os objetivos do presente trabalho foram: i) avaliar a compatibilidade físico-química das misturas levantadas em laboratório; ii) avaliar a eficiência biológica das misturas selecionadas contendo piraclostrobina para a inibição de *P. citricarpa* em laboratório; iii) avaliar o efeito fitotóxico das misturas selecionadas em campo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção dos produtos formulados

Os produtos avaliados no presente estudo foram selecionados com base em dois critérios: i) por meio da lista de Produtos para Proteção da Citricultura, também conhecida como ProteCitrus (Fundo de Defesa da Citricultura, 2020), onde estão incluídos todos os produtos registrados para a cultura que estão em conformidade com os principais mercados importadores de suco/fruta, e; ii) com base em um levantamento de produtos mais utilizados em mistura com estrobilurina realizado pelo Fundecitrus nas principais propriedades do cinturão citrícola brasileiro.

O levantamento foi realizado por meio de um questionário, no qual os citricultores responderam se realizavam ou não misturas em tanque na sua propriedade, quais os procedimentos e produtos formulados utilizados para tal prática, o número de produtos adicionados em uma mesma mistura em tanque de pulverização e os principais problemas observados nas pulverizações. A aplicação do questionário e a organização dos dados obtidos por região e por tamanho de propriedade foi realizado pela equipe de engenheiros agrônomos do Fundecitrus. Com os dados do levantamento foram selecionados os produtos formulados mais usados em misturas com o fungicida piraclostrobina (Comet, Basf) nos pomares de citros, sendo dois inseticidas: Provado (Bayer CropScience) e Mustang (FMC); dois inseticidas/acaricidas: Batent (UPL) e Talstar (FMC); um acaricida: Microthiol (UPL); um fungicida: Recop (Albaugh); um adjuvante: Argenfrut (Agrovant) e três fertilizantes: uréia, sulfato de zinco e sulfato de manganês (todos da Cronos Agrícola) (Tabela 1).

Tabela 1. Nome comercial ou tipo de fertilizante, composição fertilizante e de ingrediente ativo, tipo de produto, formulação e dose máxima de bula dos agroquímicos disponíveis para uso em pomares de citros no estado de São Paulo.

Agroquímico ¹	Composição	Tipo	Formulação	Dose/2000L
Ureia	N 45%	Fertilizante	-	12 kg
Sulfato de Zn	Zn 30%	Fertilizante	-	8 kg
Sulfato de Mn	Mn 30%	Fertilizante	-	7 kg
Microthiol	Enxofre 800 g/kg	Acaricida	WG	10 kg
Recop	Oxicloreto de Cu 840 g/kg	Fungicida	WP	5 kg
Provado	Imidacloprido 200 g/L	Inseticida	SC	1 L
Batent	Abamectina 18 g/L	Inseticida/Acaricida	EC	600 mL
Comet	Piraclostrobina 250 g/L	Fungicida	EC	300 mL
Mustang	Zeta-cipermetrina 350 g/L	Inseticida	EC	200 mL
Talstar	Bifentrina 100 g/L	Inseticida/Acaricida	EC	400 mL
Argenfrut	Óleo mineral 845,75 g/L	Fungicida/Inseticida	EC	20 L

¹Sulfato de zinco, de manganês e ureia (Cronos Agrícola); Microthiol (UPL); Recop (Albaugh); Provado (Bayer); Batent (UPL); Comet (BASF); Talstar (FMC); Mustang (FMC) e Argenfrut (Agrovant). WG - granulados dispersíveis, WP - pós molháveis, SC - suspensões concentradas e CE - concentrados emulsionáveis.

2.2 Compatibilidade físico-química das misturas de agroquímicos

As avaliações foram realizadas segundo normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) seguindo a Norma Brasileira (NBR) 13875 de 2014, que regulamenta o estudo de compatibilidade físico-química de agrotóxicos e afins. Essa norma estabelece os testes a serem realizados, assim como a ordem de adição dos produtos na calda e como as mesmas devem ser avaliadas quanto à homogeneidade/heterogeneidade.

A NBR 13875 determina que a avaliação da compatibilidade físico-química de agrotóxicos e afins deve ser feita por meio de dois testes: estático e dinâmico. O teste estático é realizado para avaliar quais mudanças físico-químicas podem ocorrer em caldas que permanecem em repouso. O teste dinâmico é realizado para avaliar quais mudanças físico-químicas podem ocorrer em caldas que permanecem em agitação constante. As caldas são preparadas para ambos os testes seguindo a ordem de adição dos produtos de acordo com a formulação. Inicialmente são adicionados os sais, em seguida os produtos de formulação sólida: os granulados dispersíveis (WG, *sigla em inglês*) seguidos de pós molháveis (WP).

Posteriormente, são adicionados os produtos de formulação líquida: suspensões concentradas (SC), concentrados solúveis (SL) e concentrados emulsionáveis (EC).

A avaliação da calda foi realizada por meio da observação visual da presença ou ausência de creme, cristal, espuma, floculo, grumo, sedimentação, separação de fases e separação de óleo. Os cristais possuem a característica de poder separar a luz através do fenômeno de dispersão. A presença de cristal foi avaliada através da iluminação horizontal de toda a superfície da calda com um feixe de luz, utilizando um laser comum, que quando dispersado nos indica a presença de cristais. A presença de grumo foi avaliada pela observação visual da calda e da passagem da calda em peneira, onde os grumos são retidos (ABNT, 2014).

Para realizar as avaliações de compatibilidade físico-química foi utilizada água padrão com dureza total de 20 mg/kg em equivalente de $CaCO_3$ e pH 7,0; preparada conforme a NBR 13074 de 2016 (ABNT, 2016). Previamente a realização dos ensaios com as misturas, todos os produtos foram avaliados individualmente quanto às suas características de dispersão (homogeneização) na calda. Tanto para os ensaios de produtos individuais como para o de misturas foi utilizada a dose máxima dos produtos recomendada para a cultura dos citros (ProteCitrus), seguindo a ABNT 13875. Os produtos de formulação sólida foram pesados em balança analítica de precisão (Denver, EUA) e os de formulação líquida foram pipetados com micropipetas (Kasvi, Brasil) no momento do preparo da calda.

As caldas foram preparadas em duas provetas de 250 mL (Uniglas, Brasil), sendo uma para o teste estático e outra para o dinâmico. Em cada proveta foi adicionado 150 ml de água padrão e em seguida os produtos, respeitando a ordem de adição por formulação (Tabela 2). Após a adição dos produtos, a proveta foi invertida 10 vezes para obter boa homogeneização. O volume de cada proveta foi completado com água padrão até o volume de 250 ml. O pH inicial da calda foi medido logo após o preparo em medidor de pH (Gehaka modelo P1800, Brasil). A calda a ser avaliada no teste dinâmico foi transferida para um béquer de 400 mL (Uniglas, Brasil), para que pudesse ser submetida a agitação constante por duas horas em agitador mecânico (Fisatom modelo 710, Brasil). A calda do teste estático foi mantida na proveta e em repouso por duas horas.

Para esse estudo foram selecionadas 21 misturas da estrobilurina (piraclostrobina) com um até seis agroquímicos (Tabela 2). Os testes de compatibilidade físico-química dessas misturas foram realizados duas vezes, sendo a primeira repetição conduzida no Centro de Engenharia e Automação do Instituto Agrônomo de Campinas – IAC, localizado em Jundiaí, SP e a segunda repetição conduzida no Fundo de Defesa da Citricultura - Fundecitrus, localizado em Araraquara, SP.

Tabela 2. Misturas de piraclostrobina com diferentes agroquímicos, organizadas por ordem de adição na calda, avaliadas em laboratório para a compatibilidade físico-química e para inibição de *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros.

Misturas	Agroquímicos ¹					
P+O	Pira	Óleo				
I+P+O	Imid	Pira	Óleo			
C+P+O	OxCu	Pira	Óleo			
E+P+O	Enxo	Pira	Óleo			
E+B+P	Enxo	Bife	Pira			
C+I+P+O	OxCu	Imid	Pira	Óleo		
E+C+P+O	Enxo	OxCu	Pira	Óleo		
E+I+P+O	Enxo	Imid	Pira	Óleo		
E+Z+P+O	Enxo	Zeta	Pira	Óleo		
E+A+Z+P+O	Enxo	Abam	Zeta	Pira	Óleo	
E+A+B+P+O	Enxo	Abam	Bife	Pira	Óleo	
E+I+A+P+O	Enxo	Imid	Abam	Pira	Óleo	
E+C+A+Z+P+O	Enxo	OxCu	Abam	Zeta	Pira	Óleo
E+C+A+B+P+O	Enxo	OxCu	Abam	Bife	Pira	Óleo
E+C+I+A+P+O	Enxo	OxCu	Imid	Abam	Pira	Óleo
U+E+I+A+P+O	Urei	Enxo	Imid	Abam	Pira	Óleo
U+E+A+Z+P+O	Urei	Enxo	Abam	Zeta	Pira	Óleo
U+E+A+B+P+O	Urei	Enxo	Abam	Bife	Pira	Óleo
ZM+C+I+A+P+O	ZnMn	OxCu	Imid	Abam	Pira	Óleo
ZM+C+A+Z+P+O	ZnMn	OxCu	Abam	Zeta	Pira	Óleo
ZM+C+A+B+P+O	ZnMn	OxCu	Abam	Bife	Pira	Óleo

¹ZnMn: sulfatos de zinco e manganês; Urei: uréia; Enxo: enxofre (Microthiol WG); OxCu: oxicloreto de cobre (Recop WP); Imid: imidacloprido (Provado SC); Abam: abamectina (Batent EC); Pira: piraclostrobina (Comet EC); Bife: bifentrina (Talstar EC); Zeta: zeta-cipermetrina (Mustang EC) e Óleo: óleo mineral (Argenfrut EC).

A calda do teste estático foi avaliada quanto à homogeneidade/heterogeneidade logo após permanecer em repouso. Após essa avaliação, a proveta foi invertida 10 vezes, colocada novamente em repouso, para que após 10 minutos uma segunda avaliação fosse realizada. Para o teste dinâmico, depois de permanecer duas horas em agitação constante, a calda foi mantida em repouso por 10 minutos para então avaliar a homogeneidade/heterogeneidade. Após esse processo, as caldas tiveram o pH final mensurado, para que fosse possível avaliar

a mudança entre os valores de pH inicial e final. Por fim, as caldas foram passadas em peneira com 149 mm de abertura da malha (Bertel, Brasil), onde avaliou-se a presença de grumos.

2.3 Eficiência biológica das misturas sobre *Phyllosticta citricarpa* em laboratório

Os ensaios de eficiência de inibição de *P. citricarpa* pelo fungicida piraclostrobina individualmente ou em mistura com outros agroquímicos foram conduzidos no laboratório do Fundecitrus, localizado em Araraquara, SP. As 21 misturas contendo piraclostrobina e que apresentaram pelo menos um problema de homogeneidade/heterogeneidade foram avaliadas por meio do teste de crescimento micelial e da microtitulação à base de resazurina. O isolado LRS 42/12 de *P. citricarpa* do Fundo de Defesa da Citricultura, comprovadamente patogênico em ensaios anteriores, foi utilizado nos ensaios de laboratório. Esse isolado foi obtido através do isolamento indireto de lesões em frutos de laranja doce coletados de pomar comercial do município de Ibaté/SP, cultivado em meio de cultura sólido batata-dextrose-ágar (BDA) e armazenado em papel de filtro congelado.

2.3.1 Ensaio de crescimento micelial

O ensaio de crescimento micelial foi conduzido com 21 caldas de misturas de agroquímicos previamente preparadas em ensaio dinâmico seguindo a ordem de adição dos produtos por formulação, segundo a NBR 13 875. Todas as caldas foram preparadas em tubos *Falcon* de 50 mL (Corning, EUA), nos quais a piraclostrobina (produto comercial Comet) pura ou em mistura com outros agroquímicos foi adicionada de forma a obter cinco diferentes concentrações finais (0; 7,5; 18,7; 37,5 e 75 mg de ingrediente ativo/L). O experimento em laboratório foi repetido duas vezes em triplicata, ou seja, em cada repetição foram preparadas três placas para cada concentração de cada mistura. A concentração de 37,5 mg/L representou a utilizada em aplicações no campo. Os demais agroquímicos foram adicionados à calda nas concentrações descritas na Tabela 1 em kg ou L/2000L. Em seguida, os tubos foram transferidos para mesa de agitação (Tecnal modelo TE-421, Brasil), onde ficaram sob agitação constante a 140 rpm por duas horas. Após o período de agitação, as caldas foram adicionadas individualmente em 45 mL de meio BDA fundente para obter concentrações finais de 0; 0,005; 0,05; 0,5 e 5 mg/L de piraclostrobina (Figura 1). Essas concentrações inibem o crescimento micelial de *P. citricarpa* em aproximadamente 0%, 25%, 50%, 75% e 100%.

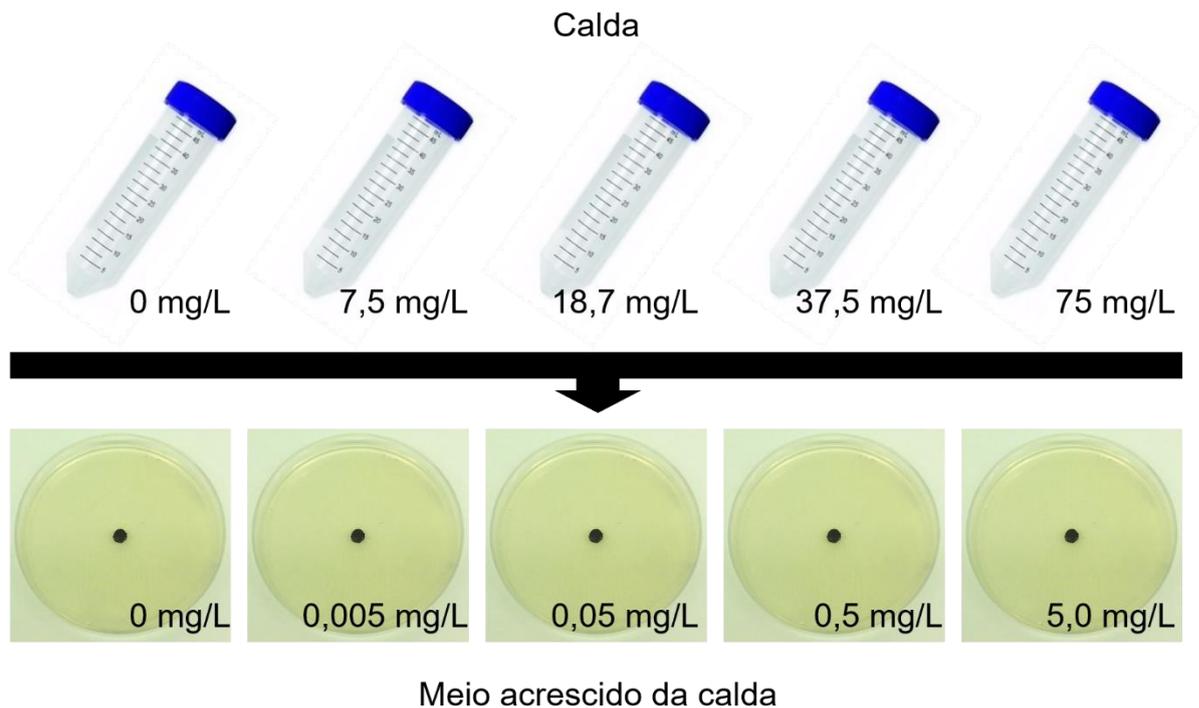


Figura 1. Modelo de diluição das caldas em meio BDA utilizado no teste de crescimento micelial para avaliação da eficiência biológica do fungicida piraclostrobina individualmente ou em mistura com agroquímicos no controle de *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros.

O meio BDA contendo apenas piraclostrobina foi utilizado como controle. O meio BDA foi vertido em placas de poliestireno de 90 mm de diâmetro (Kasvi modelo K30-9015, Brasil), usando aproximadamente 15 mL de meio por placa. Discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram retirados de uma placa com cultura de *P. citricarpa* de 21 dias de idade e adicionados no centro de uma placa com meio BDA acrescido de piraclostrobina isoladamente ou em mistura. A placa foi mantida a 25°C no escuro. Transcorridos 7 e 14 dias, o diâmetro da colônia em cada placa foi mensurado em duas direções perpendiculares, obtendo-se o diâmetro médio da colônia (DMC). A inibição do crescimento da colônia (ICC) foi calculada para cada calda, pela eq. (1)

$$ICC = (DMC_{sf} - DMC_f / DMC_{sf}) \times 100 \quad (1)$$

onde: DMC_{sf} é o diâmetro médio das colônias em BDA sem produtos; DMC_f é o diâmetro médio da colônia obtido em cada calda.

A concentração efetiva para inibição de 50% do crescimento micelial de *P. citricarpa* (CE₅₀) foi estimada para as diferentes caldas contendo misturas de piraclostrobina com os diferentes agroquímicos e comparadas com a CE₅₀ obtida para a piraclostrobina adicionada isoladamente ao meio BDA. Cada calda em uma determinada concentração foi avaliada em três placas, sendo cada placa considerada uma repetição.

2.3.2 Ensaio de microtitulação à base de resazurina

O ensaio de microtitulação foi realizado com a resazurina, que é um corante estável, não tóxico e solúvel em água à base de tetrazólio, que vem sendo muito utilizado em testes de sensibilidade química de fungos e bactérias a agroquímicos e antibióticos. Esse corante redutor apresenta coloração azul na sua forma oxidada (não fluorescente) e coloração rosa na sua forma reduzida (fluorescente). Essa redução da resazurina se dá em resposta ao metabolismo celular do microrganismo, correspondendo diretamente a sua taxa de respiração (Vega et al., 2012).

Esse ensaio foi conduzido com as 21 caldas de misturas de agroquímicos previamente preparadas como descrito no item 2.3.1. Nesse ensaio foi utilizada água destilada esterilizada, pois a água padrão dos testes de compatibilidade físico-química interferiu na mudança de cor da resazurina durante a microtitulação. Todas as caldas foram preparadas em tubos *Falcon* de 50 mL (Corning, EUA), onde a piraclostrobina (produto comercial Comet) isolada ou em mistura com outros agroquímicos foi adicionada nos tubos para obtenção de oito diferentes concentrações finais (0; 7,5; 18,75; 37,5; 56,25; 75; 93,75 e 112,5 mg de piraclostrobina/L). Os demais agroquímicos foram adicionados à calda em apenas uma concentração de cada produto em kg ou L/2000L (Tabela 1). Em seguida, os tubos foram transferidos para mesa de agitação, como descrito no item 2.3.1. Após o período de agitação, as caldas foram diluídas para atingir as concentrações, respectivamente, de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 32 mg de piraclostrobina/L.

Suspensão do fungo *P. citricarpa* extraído de colônia crescida por 21 dias foi preparada na concentração de 10⁵ conídios/mL. Solução de resazurina (Sigma-Aldrich, EUA) foi preparada no escuro na concentração de 400 µM a partir de uma solução estoque 40 mM previamente preparada e armazenada no escuro para evitar a redução do composto para resorufina na presença de luz.

O ensaio foi realizado em placas de cultivo de 96 poços, sendo 12 colunas e oito linhas (Kasvi modelo K12-096, Brasil). As oito concentrações de cada mistura foram montadas em duplicata por placa, sendo cada concentração adicionada em quatro poços, e cada mistura em quatro colunas. Na placa, as quatro primeiras colunas receberam apenas piraclostrobina, e as outras oito colunas receberam duas misturas, sendo quatro colunas para cada. Das quatro colunas de cada tratamento, duas receberam suspensão de *P. citricarpa* e outras duas apenas água (sem o patógeno). Ao final, cada linha (A a H) da placa recebeu uma concentração de piraclostrobina pura ou em mistura (Figura 2). O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada placa considerada uma repetição.

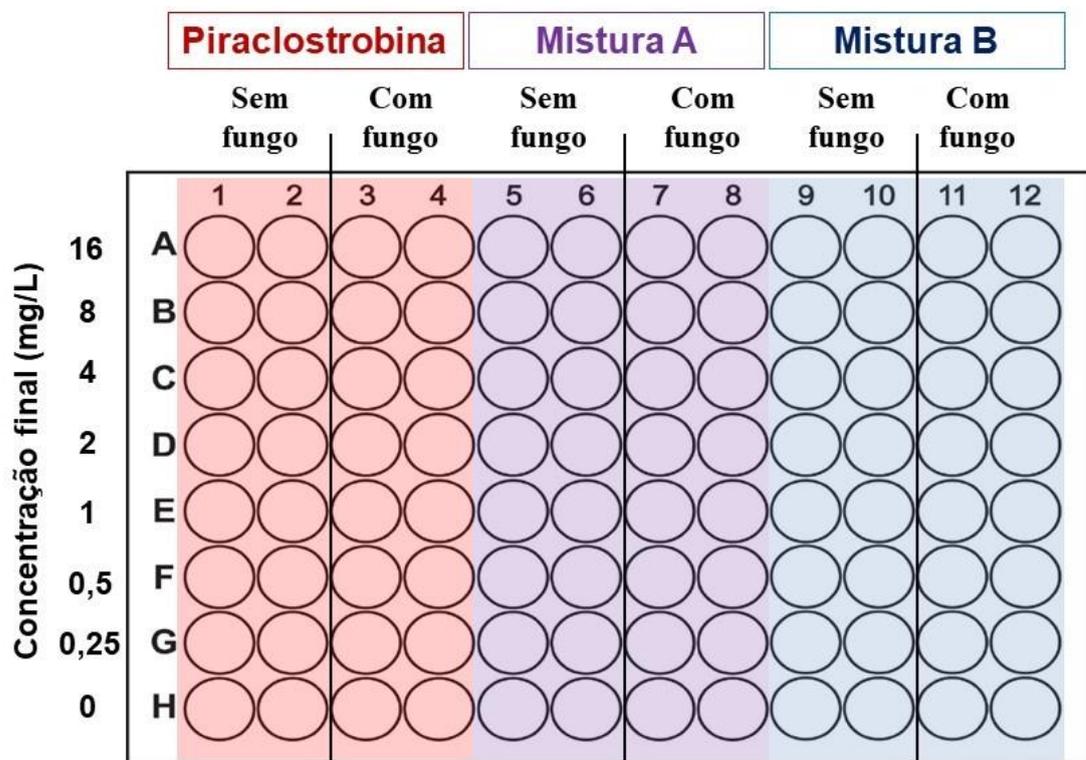


Figura 2. Modelo de placa de cultivo com 96 poços utilizada para o teste de microtitulação com resazurina para avaliação da eficiência biológica do fungicida piraclostrobina individualmente ou em mistura com agroquímicos no controle de *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros.

Na montagem da placa, cada poço recebeu 100 µl de uma concentração de solução contendo piraclostrobina pura ou em mistura, 80 µl de suspensão de conídios de *P. citricarpa* ou água destilada esterilizada e 20 µl da solução de resazurina 400 µM. Cada poço apresentou um volume final de 200 µl, com concentrações finais de 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 e 16 mg/L de piraclostrobina e 40 µM de resazurina (Vega et al., 2012; Chitolina, 2019). As placas foram fechadas com a tampa e incubadas a 25°C por 24 horas no escuro.

As placas foram avaliadas no Instituto de Química de Araraquara por meio de um leitor de microplacas Epoch (Biotek, EUA), nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. A porcentagem relativa de redução da resazurina foi expressa pela relação entre a porcentagem de redução da resazurina na presença dos agroquímicos e a porcentagem de redução na ausência dos produtos multiplicado por 100, pela equação (2).

$$\frac{(\varepsilon_{OX})\lambda_2 A \lambda_1 - (\varepsilon_{OX})\lambda_1 A \lambda_2}{(\varepsilon_{RED})\lambda_1 A' \lambda_2 - (\varepsilon_{RED})\lambda_2 A' \lambda_1} \times 100 \quad (2)$$

onde: ε_{OX} = coeficiente de extinção molar da forma oxidada da resazurina (azul; 80,586 e 117,216, respectivamente, para 570 e 600 nm); ε_{RED} = coeficiente de extinção molar da forma reduzida da resazurina (rosa; 155,677 e 14,652, respectivamente, para 570 e 600 nm); A = absorvância dos poços teste; A' = absorvância dos poços de controle negativos; $\lambda_1 = 570$ nm e $\lambda_2 = 600$ nm.

2.4 Avaliação de fitotoxicidade das misturas em campo

O experimento em campo foi conduzido durante a safra 2020/2021, em pomar comercial localizado no município de Borborema - SP. O experimento foi conduzido em talhão de laranjeiras 'Valência' de três anos de idade, onde foram testadas oito misturas selecionadas a partir dos resultados obtidos em laboratório (P+O; I+P+O; C+P+O; E+P+O; C+I+P+O; E+C+P+O; ZM+C+I+A+P+O e ZM+C+A+B+P+O). Para o preparo da calda as doses testadas no campo não foram as máximas recomendadas para a cultura, mas sim as máximas usadas no setor citrícola para o controle de pragas e doenças. Com isso, os produtos de formulação sólida: sulfatos de zinco e manganês, Microthiol e Recop foram testados, respectivamente, nas doses de 8, 7, 10 e 3,6 kg/2000L. Já os produtos de formulação líquida: Provado, Batent, Comet, Talstar e Argenfrut foram testados, respectivamente, nas doses de 0,5; 0,6; 0,3; 0,4 e 5 L/2000L. Plantas não pulverizadas serviram como controle.

O delineamento experimental foi casualizado em blocos, com quatro repetições. Cada parcela foi formada por três plantas em uma linha de plantio, sendo a parcela útil representada pela planta central e a borda representada pelas plantas adjacentes. Para cada tratamento, foram pulverizados dez ramos (sendo 5 ramos de cada lado da planta). As misturas foram aplicadas nos ramos com pulverizador manual (Guarany, modelo Leve Névoa 500 mL). O

experimento foi conduzido duas vezes, em novembro/2020 e em janeiro/2021, quando os frutos apresentavam, em média 50 e 55 mm de diâmetro, respectivamente.

Uma estação meteorológica iMetos 3.3 (Metos, Brasil) foi instalada a 400 metros da área experimental, para registro dos dados de temperatura, umidade relativa do ar, radiação solar, pluviometria e velocidade do vento durante o período de condução do experimento. A avaliação de fitotoxidade foi realizada sete dias após a pulverização com utilização de escala de notas de Goes et al. (2004), onde a nota 0 representa a ausência de sintomas; nota 1: sintomas leves (pontuações leves e diminutas, pouco perceptíveis); nota 2: sintomas moderados (pontuações pequenas e visíveis e localizadas, às vezes em confluência) e nota 3: sintomas severos (pontuações escuras, bem visíveis, ocupando espaços variáveis).

2.5 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico R (R Core Team, 2020). O conjunto de dados obtido nas avaliações do teste de crescimento micelial em laboratório foi analisado por um modelo não linear, onde os valores de CE_{50} para cada tratamento foram estimadas através da função Log-logístico com três parâmetros. Dessa forma, foi possível analisar quais misturas contendo piraclostrobina apresentaram valores estimados de CE_{50} que se sobrepunham aos valores estimados para a estrobilurina pura.

O conjunto de dados obtidos nas avaliações do teste de microtitulação à base de resazuina em laboratório, atendendo todas as pressuposições da análise de variância, foram submetidos a análise de comparação de médias em pares pelo teste t a 5% de probabilidade, onde os dados de cada mistura contendo piraclostrobina foram comparados com os dados da piraclostrobina utilizada isoladamente dentro de cada concentração.

O conjunto de dados obtidos nas avaliações de pH das caldas dos testes de eficiência biológica em laboratório, atendendo a todas as pressuposições de análise de variância, também foram submetidos a análise de comparação de médias em pares pelo teste t a 5% de probabilidade, onde os dados de pH inicial e final foram comparados para cada mistura. Análise de regressão linear [$y = a + b * x$] foi realizada para os dados de CE_{50} (y) obtidos nas avaliações dos testes de eficiência biológica em laboratório e pH (x) de cada mistura testada.

O conjunto de dados obtidos nas avaliações do experimento de fitotoxidade em campo foram submetidos à análise de variância e os percentuais médios de frutos para cada nível de sintomas de fitotoxidade foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

3.1 Compatibilidade físico-química das misturas de agroquímicos

As 21 misturas apresentaram pelo menos uma das incompatibilidades físico-químicas (floculação, sedimentação, separação de fases, formação de grumos, separação de óleo, formação de cristais, creme, espuma e grumo retido na peneira) nos testes estático (calda em repouso por duas horas) e dinâmico (calda em agitação por duas horas). A floculação foi observada nas caldas de seis misturas, onde duas (E+C+A+Z+P+O e U+E+A+B+P+O) apresentaram floculo apenas no teste estático; três (E+Z+P+O, E+I+A+P+O e U+E+I+A+P+O) apresentaram floculo apenas no teste dinâmico e a mistura U+E+A+Z+P+O apresentou floculo em ambos os testes (Tabela 3). A sedimentação foi observada nas caldas de 18 misturas: E+P+O apenas no teste estático, E+B+P no teste dinâmico e 16 misturas com sedimentação em ambos os testes. A separação de fases foi observada nas caldas de 18 misturas: cinco no teste estático; a mistura E+I+P+O no teste dinâmico e 12 misturas em ambos os testes. A presença de grumos foi observada nas caldas de sete misturas (E+B+P, E+I+P+O, E+Z+P+O, E+A+Z+P+O, E+A+B+P+O, E+C+I+A+P+O e U+E+I+A+P+O) apenas no teste dinâmico. A separação de óleo foi observada nas caldas de 18 misturas: E+A+B+P+O apenas no teste estático, I+P+O e E+I+P+O apenas no teste dinâmico e 15 misturas em ambos os testes. A presença de cristais foi observada apenas na calda da mistura E+C+I+A+P+O, no teste estático do primeiro ensaio. A presença de creme foi observada nas caldas de 13 misturas: quatro no teste dinâmico e nove em ambos os testes. A presença de espuma foi observada nas caldas de 19 misturas: E+I+P+O, E+C+A+Z+P+O, E+C+I+A+P+O e U+E+I+A+P+O apresentaram espuma apenas no teste estático e 15 apresentaram espuma em ambos os testes. A presença de grumos retidos na peneira foi observada nas caldas de quatro misturas (E+B+P, E+Z+P+O, E+A+B+P+O e U+E+I+A+P+O) apenas no teste dinâmico (Tabela 3).

Tabela 3. Valor de pH e incompatibilidade físico-química de 21 misturas de agroquímicos nos testes estático e dinâmico seguindo a NBR 13 875.

Misturas ¹	pH		Incompatibilidades ²																		
	inicial	final	Floculação		Sedimentação		S. fase		Grumo		S. óleo		Cristal*		Creme		Espuma		Peneira		
		Es	Di	Es	Di	Es	Di	Es	Di	Es	Di	Es	Di	Es	Di	Es	Di	Es	Di	Es	Di
P+O	6,8	6,9	6,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
I+P+O	6,1	7,4	6,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
C+P+O	8,0	7,8	8,0	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	
E+P+O	6,9	7,2	7,6	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
E+B+P	7,3	7,4	7,7	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
C+I+P+O	8,2	7,0	6,6	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
E+C+P+O	8,0	7,8	7,4	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	
E+I+P+O	6,9	3,7	7,6	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	
E+Z+P+O	7,1	7,1	7,4	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
E+A+Z+P+O	8,1	6,8	8,3	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
E+A+B+P+O	6,8	6,2	6,6	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
E+I+A+P+O	7,1	7,3	7,9	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
E+C+A+Z+P+O	8,2	7,9	7,8	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	
E+C+A+B+P+O	8,1	7,9	7,1	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
E+C+I+A+P+O	7,8	7,7	7,6	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	
U+E+I+A+P+O	6,6	6,8	7,0	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
U+E+A+Z+P+O	6,7	6,5	6,8	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
U+E+A+B+P+O	6,7	6,8	6,7	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
ZM+C+I+A+P+O	6,0	6,5	6,4	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
ZM+C+A+Z+P+O	5,9	6,4	6,7	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
ZM+C+A+B+P+O	5,8	5,8	6,4	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-

¹Caldas contendo abamectina (A), bifentrina (B), oxicloreto de cobre (C), enxofre (E), imidacloprido (I), óleo mineral (O), piraclostrobina (P), uréia (U), zeta-cipermetrina (Z) e sulfatos de Zn e Mn (ZM). ²(-): ausência de incompatibilidade; (+): presença de incompatibilidade. (Es): teste estático, (Di): teste dinâmico. *Cristais apenas no primeiro ensaio com a mistura E+C+I+A+P+O.

3.2 Eficiência biológica das misturas sobre *Phyllosticta citricarpa* em laboratório

3.2.1 Ensaio de crescimento micelial

Entre as 21 misturas contendo piraclostrobina testadas, 19 delas (P+O, I+P+O, C+P+O, E+P+O, E+B+P, C+I+P+O, E+I+P+O, E+Z+P+O, E+A+Z+P+O, E+A+B+P+O, E+I+A+P+O, E+C+A+Z+P+O, E+C+A+B+P+O, E+C+I+A+P+O, U+E+I+A+P+O, U+E+A+Z+P+O, U+E+A+B+P+O, ZM+C+A+Z+P+O, ZM+C+A+B+P+O) apresentaram CE_{50} inferiores ou iguais a 0,005 mg/L (menor concentração avaliada) e significativamente iguais a CE_{50} estimada para a piraclostrobina usada isoladamente. Apenas duas misturas apresentaram valores de CE_{50} significativamente superiores ao valor de CE_{50} estimada para a piraclostrobina pura: 0,007 (E+C+P+O) e 0,014 mg/L (ZM+C+I+A+P+O) (Figuras 3, 4 e 5).

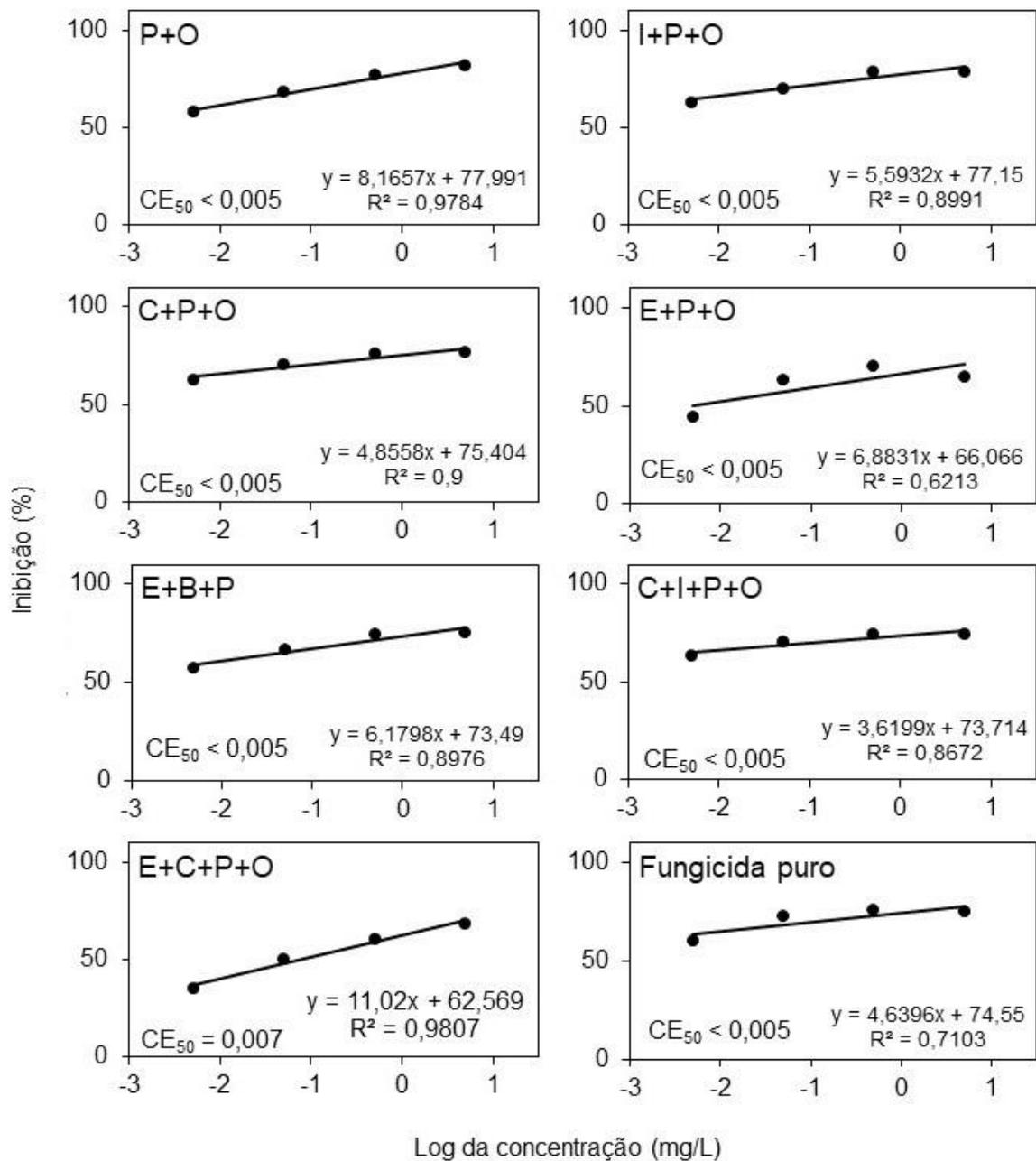


Figura 3. Inibição (%) do crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa* em meio com diferentes concentrações de piraclostrobina pura (0,005; 0,05; 0,5 e 5 mg/L) ou em misturas com os agroquímicos abamectina (A), bifentrina (B), oxicloreto de cobre (C), enxofre (E), imidacloprido (I), óleo mineral (O), uréia (U), zeta-cipermetrina (Z) e sulfatos de Zn e Mn (ZM). A equação e a linha contínua representam o modelo de regressão linear ajustado aos dados para estimar a concentração efetiva para inibição de 50% do crescimento micelial (CE_{50}) expressa em mg/L.

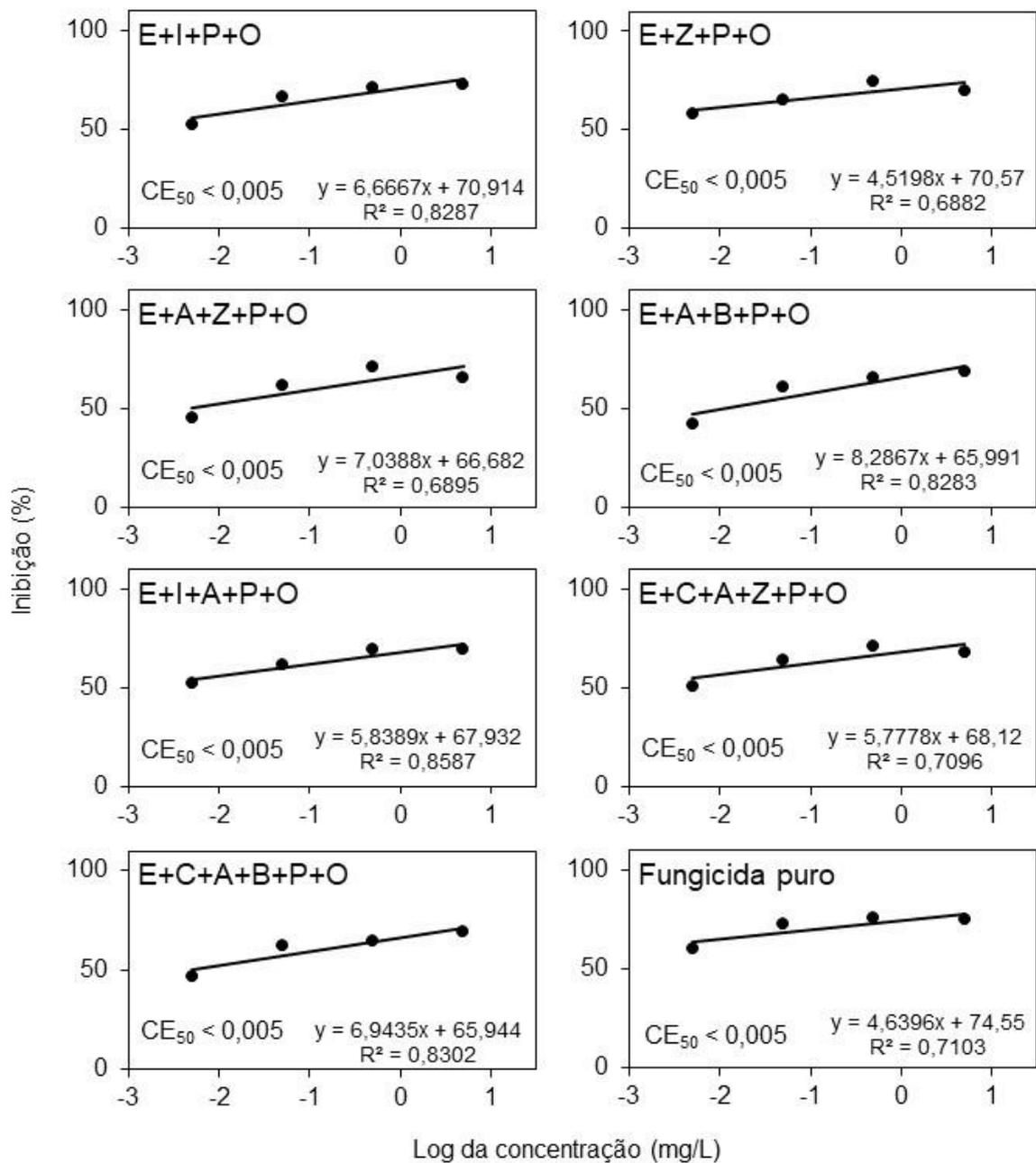


Figura 4. Inibição (%) do crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa* em meio com diferentes concentrações de piraclostrobina pura (0,005; 0,05; 0,5 e 5 mg/L) ou em misturas com os agroquímicos abamectina (A), bifentrina (B), oxicloreto de cobre (C), enxofre (E), imidacloprido (I), óleo mineral (O), uréia (U), zeta-cipermetrina (Z) e sulfatos de Zn e Mn (ZM). A equação e a linha contínua representam o modelo de regressão linear ajustado aos dados para estimar a concentração efetiva para inibição de 50% do crescimento micelial (CE_{50}) expressa em mg/L.

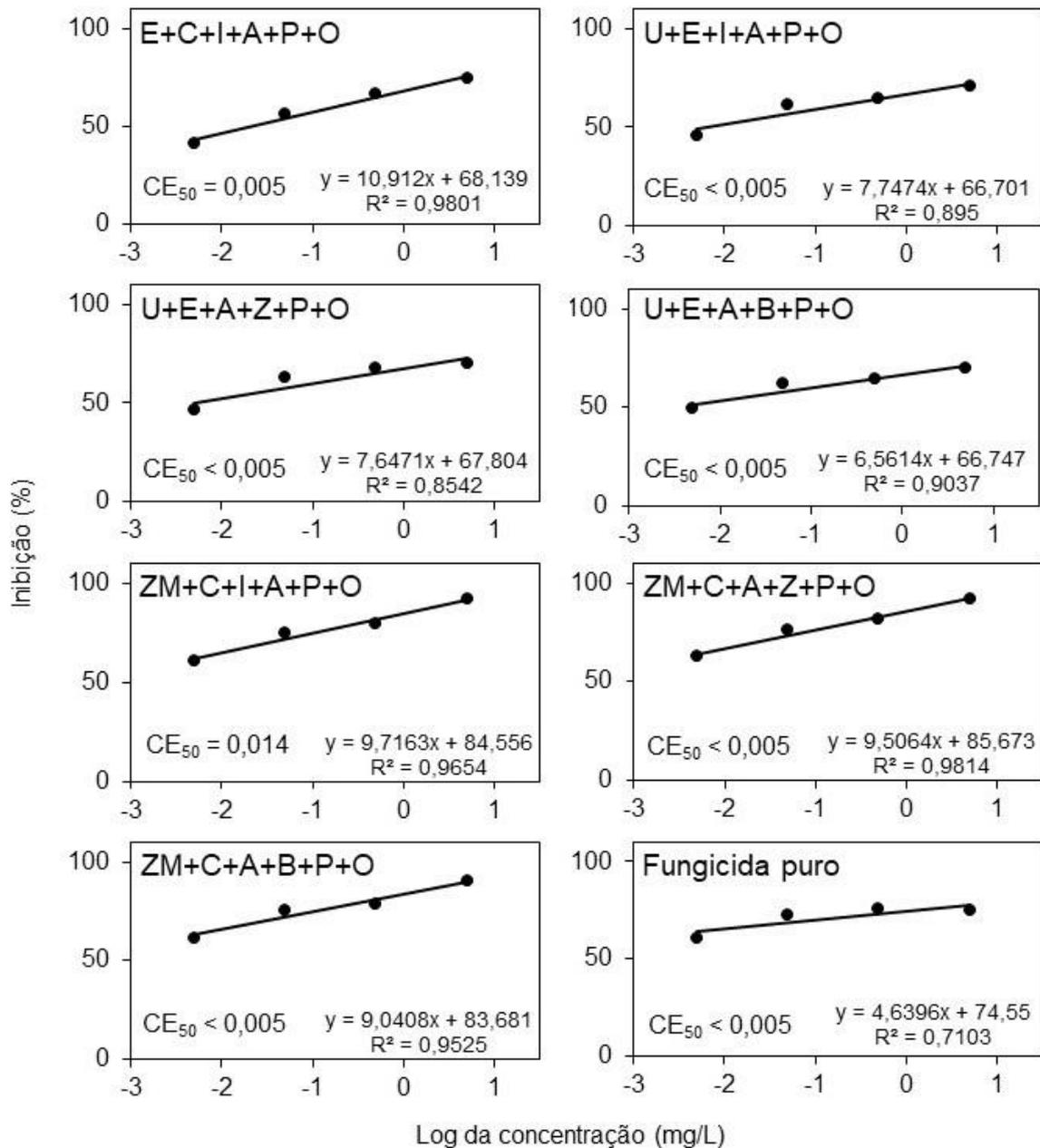


Figura 5. Inibição (%) do crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa* em meio com diferentes concentrações de piraclostrobina pura (0,005; 0,05; 0,5 e 5 mg/L) ou em misturas com os agroquímicos abamectina (A), bifentrina (B), oxiclureto de cobre (C), enxofre (E), imidacloprido (I), óleo mineral (O), uréia (U), zeta-cipermetrina (Z) e sulfatos de Zn e Mn (ZM). A equação e a linha contínua representam o modelo de regressão linear ajustado aos dados para estimar a concentração efetiva para inibição de 50% do crescimento micelial (CE_{50}) expressa em mg/L.

3.2.2 Ensaio de microtitulação à base de resazurina

O ensaio de microtitulação apresentou resultados muito variáveis e baixa repetitividade ao longo do tempo para a coloração dos poços onde foram adicionados apenas a piraclostrobina (usada como controle) nas diferentes doses (Figura 6). O gradiente de coloração azul para rosa esperado à medida que a dose de estrobilurina foi reduzida não foi observado em todos os controles avaliados para as diferentes misturas ao longo do tempo. Por outro lado, mesmo com as variações inerentes ao método, é possível observar que, os poços contendo a estrobilurina em mistura com os diferentes agroquímicos não apresentaram coloração mais rosa (maiores taxas respiratórias) que aquela observada nos poços contendo apenas a estrobilurina na mesma concentração. Algumas misturas como C+P+O, C+I+P+O, U+E+I+A+P+O, U+E+A+Z+P+O, ZM+C+A+Z+P+O e ZM+C+A+B+P+O apresentaram poços com coloração azul bem marcante diferente das cores mais rosas observadas em seus respectivos controles apenas com piraclostrobina, indicando que o patógeno respirou menos quando em contato com a piraclostrobina em mistura com esses agroquímicos (Figura 6).

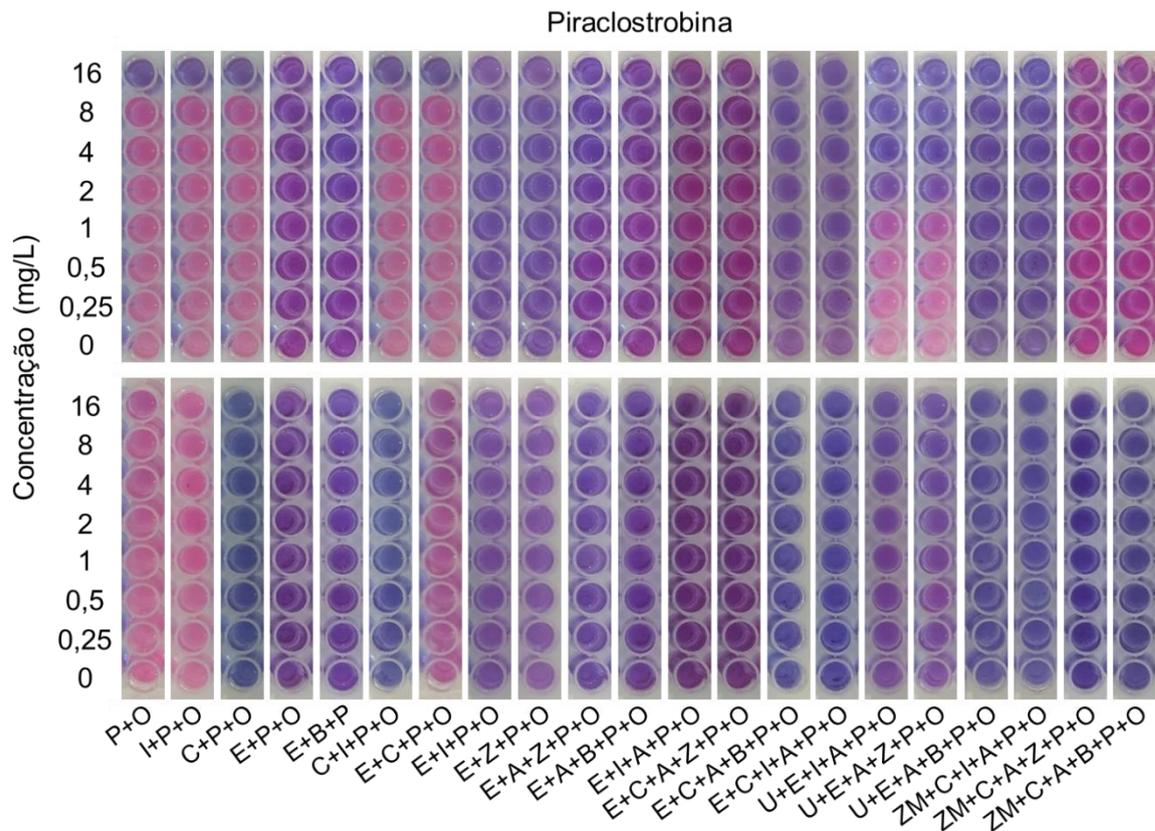


Figura 6. Coloração dos poços de placas usadas no ensaio de microtitulação à base de resazurina com diferentes concentrações (0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 e 16 mg/L) de piraclostrobina pura ou em misturas com os agroquímicos abamectina (A), bifentrina (B), oxicloreto de cobre (C), enxofre (E), imidacloprido (I), óleo mineral (O), uréia (U), zeta-cipermetrina (Z) e sulfatos de Zn e Mn (ZM).

A mistura de piraclostrobina + óleo apresentou valores de redução da RZ (incremento da respiração) significativamente superiores aos obtidos para a piraclostrobina pura nas concentrações de 0,5 e 16 mg/L e reduções inferiores em 4 e 8 mg/L (Figura 7). A mesma tendência foi observada para essa mistura acrescida de imidacloprido, com redução da RZ inferior em relação a piraclostrobina pura em 8 mg/L e superior na concentração de 16 mg/L. A mistura de cobre + piraclostrobina + óleo, apresentou valores de redução da resazurina significativamente inferiores aos valores do fungicida puro em todas as concentrações, demonstrando que a adição do fungicida à base de cobre e do óleo mineral à calda da piraclostrobina contribuiu para reduzir a respiração do patógeno. Os valores de redução de resazurina da mistura E+P+O foram significativamente inferiores aos valores do fungicida puro nas concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2 mg/L, o que demonstra menor taxa respiratória do patógeno. A mistura E+B+P apresentou valores de redução da resazurina significativamente similares aos valores da piraclostrobina pura em todas as concentrações testadas. A mistura C+I+P+O apresentou valores de redução da resazurina significativamente inferiores aos obtidos para o fungicida puro em todas as concentrações, provavelmente devido ao efeito do cobre sobre o desenvolvimento do patógeno. A mistura E+C+P+O apresentou valores de redução da resazurina significativamente superiores aos obtidos para o fungicida puro nas concentrações de 0,25 e 16 mg/L e inferiores nas concentrações de 4 e 8 mg/L (Figura 7).

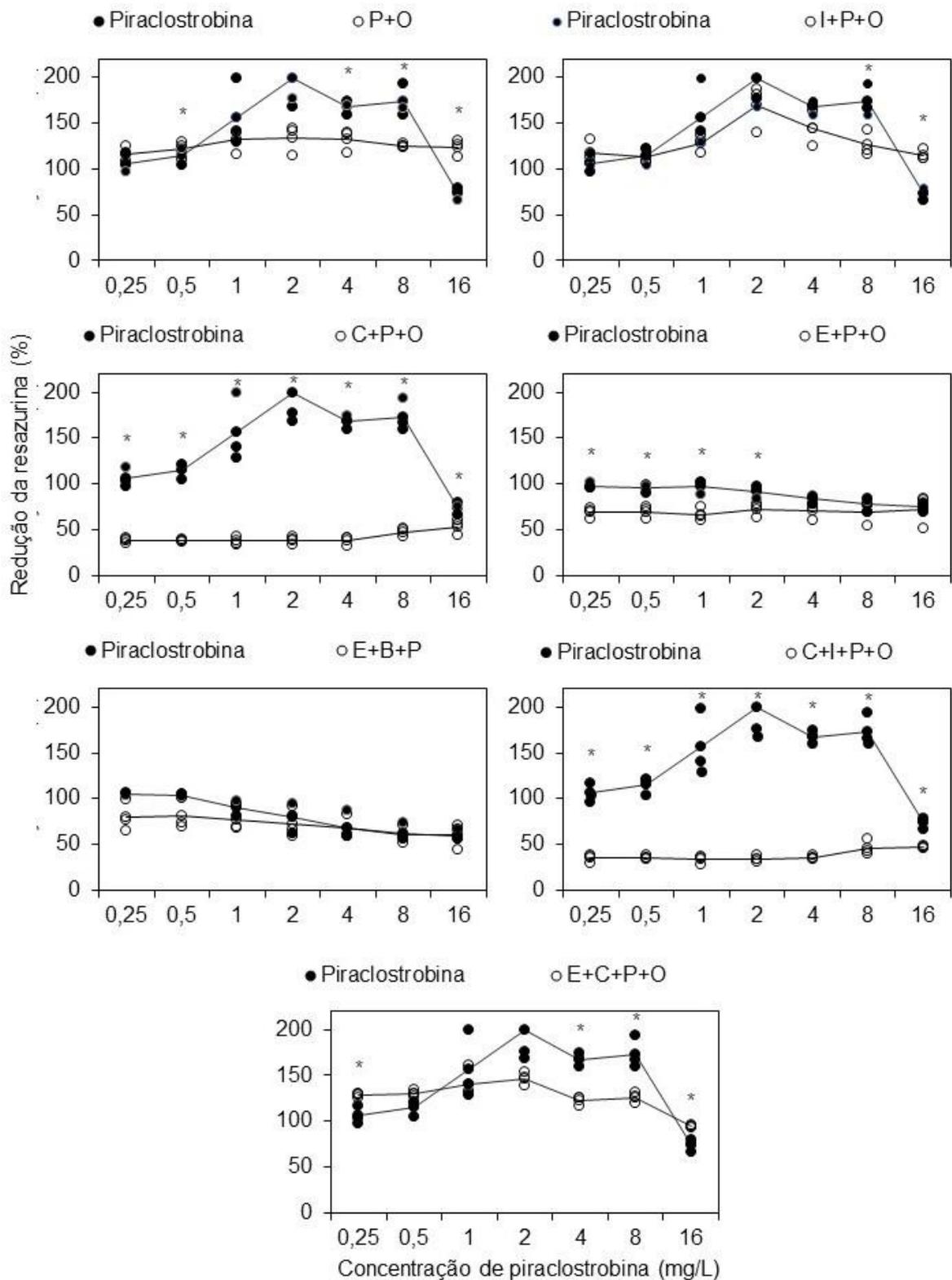


Figura 7. Redução da resazurina (%) por *Phyllosticta citricarpa* em meio com diferentes concentrações de piraclostrobina pura (0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 e 16 mg/L) ou em misturas com os agroquímicos abamectina (A), bifentrina (B), oxicloreto de cobre (C), enxofre (E), imidacloprido (I), óleo mineral (O), uréia (U), zeta-cipermetrina (Z) e sulfatos de Zn e Mn (ZM). *Médias significativamente diferentes (Teste *t*, $p=0.05$).

A mistura E+I+P+O não apresentou valores de redução da resazurina significativamente diferentes dos valores da piraclostrobina pura em nenhuma concentração (Figura 8). A mistura E+Z+P+O apresentou resultado similar ao do fungicida puro, exceto na concentração de 0,5 mg/L que a mistura teve menor redução. A mistura E+A+Z+P+O apresentou valores de redução da resazurina significativamente menores que os obtidos para o fungicida puro nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg/L. As misturas E+A+B+P+O e E+C+A+B+P+O apresentaram valores de redução da resazurina significativamente inferiores aos valores da piraclostrobina pura nas concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2 mg/L. A mistura E+I+A+P+O apresentou valor de redução da resazurina significativamente diferente do valor obtido para o fungicida puro apenas na concentração de 8 mg/L de piraclostrobina. Já a mistura E+C+A+Z+P+O apresentou valores de redução da resazurina significativamente inferiores aos valores da piraclostrobina pura em todas as concentrações, exceto 16 mg/L (Figura 8).

A mistura E+C+I+A+P+O apresentou valores de redução da resazurina significativamente inferiores aos obtidos para o fungicida puro nas concentrações de 0,25; 0,5; 1; 4 e 8 mg/L (Figura 9). A mistura U+E+I+A+P+O apresentou valores de redução da resazurina significativamente inferiores aos valores da piraclostrobina pura nas concentrações de 0,25 e 1 mg/L. Para a mistura U+E+A+Z+P+O obteve-se valor de redução da resazurina significativamente inferior ao valor obtido para o fungicida puro apenas na concentração de 1 mg/L. Já a mistura U+E+A+B+P+O não apresentou valores de redução da resazurina significativamente diferentes dos obtidos para a piraclostrobina pura em nenhuma das concentrações em estudo. Para a mistura ZM+C+I+A+P+O obteve-se valores de redução da resazurina significativamente inferiores aos valores obtidos para o fungicida puro nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1 mg/L. Já as misturas ZM+C+A+Z+P+O e ZM+C+A+B+P+O apresentaram valores de redução da resazurina significativamente inferiores aos valores obtidos para a piraclostrobina pura em todas as concentrações em estudo (Figura 9).

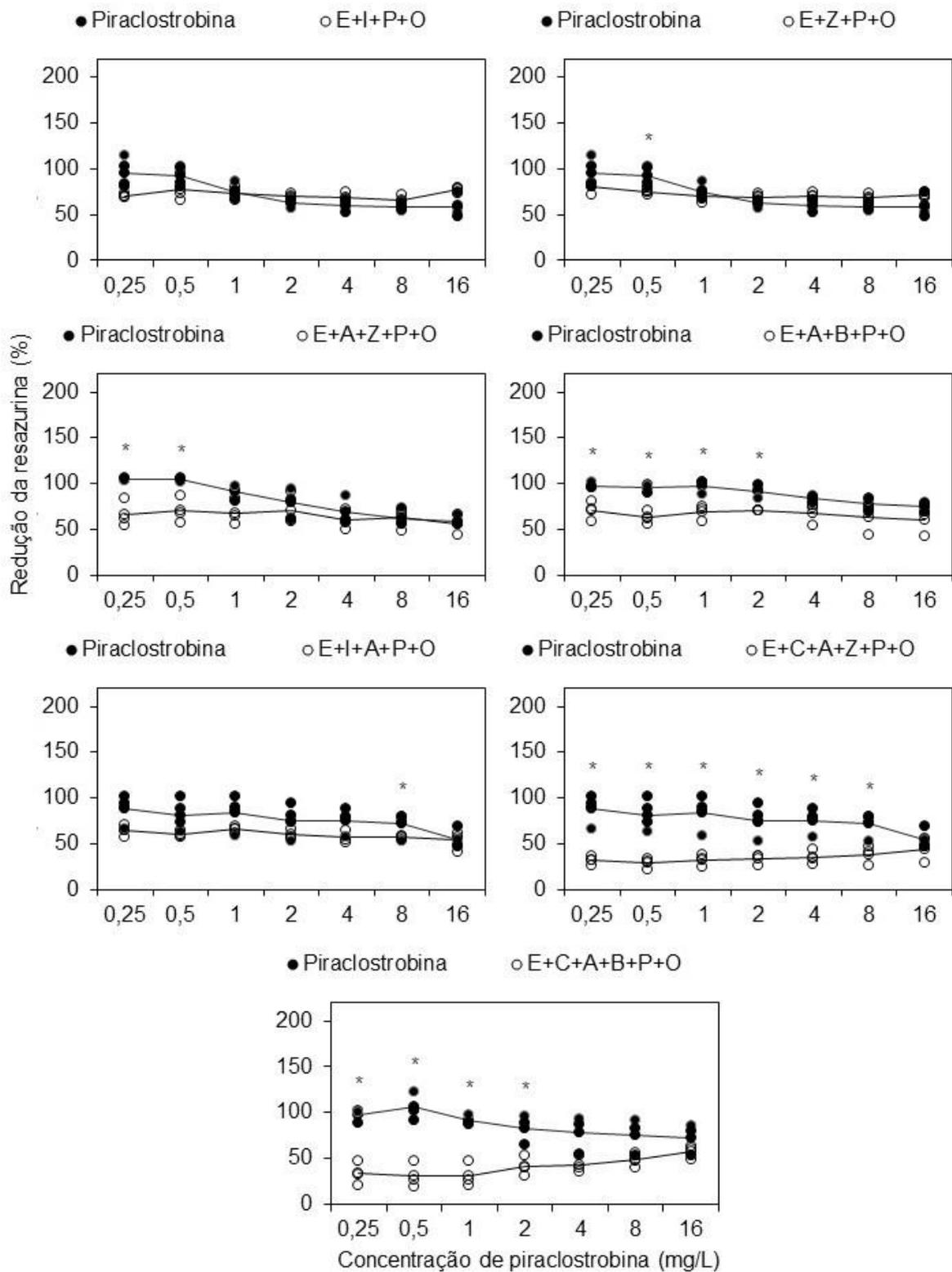


Figura 8. Redução da resazurina (%) por *Phyllosticta citricarpa* em meio com diferentes concentrações de piraclostrobina pura (0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 e 16 mg/L) ou em misturas com os agroquímicos abamectina (A), bifentrina (B), oxicloreto de cobre (C), enxofre (E), imidacloprido (I), óleo mineral (O), uréia (U), zeta-cipermetrina (Z) e sulfatos de Zn e Mn (ZM). *Médias significativamente diferentes (Teste *t*, $p=0.05$).

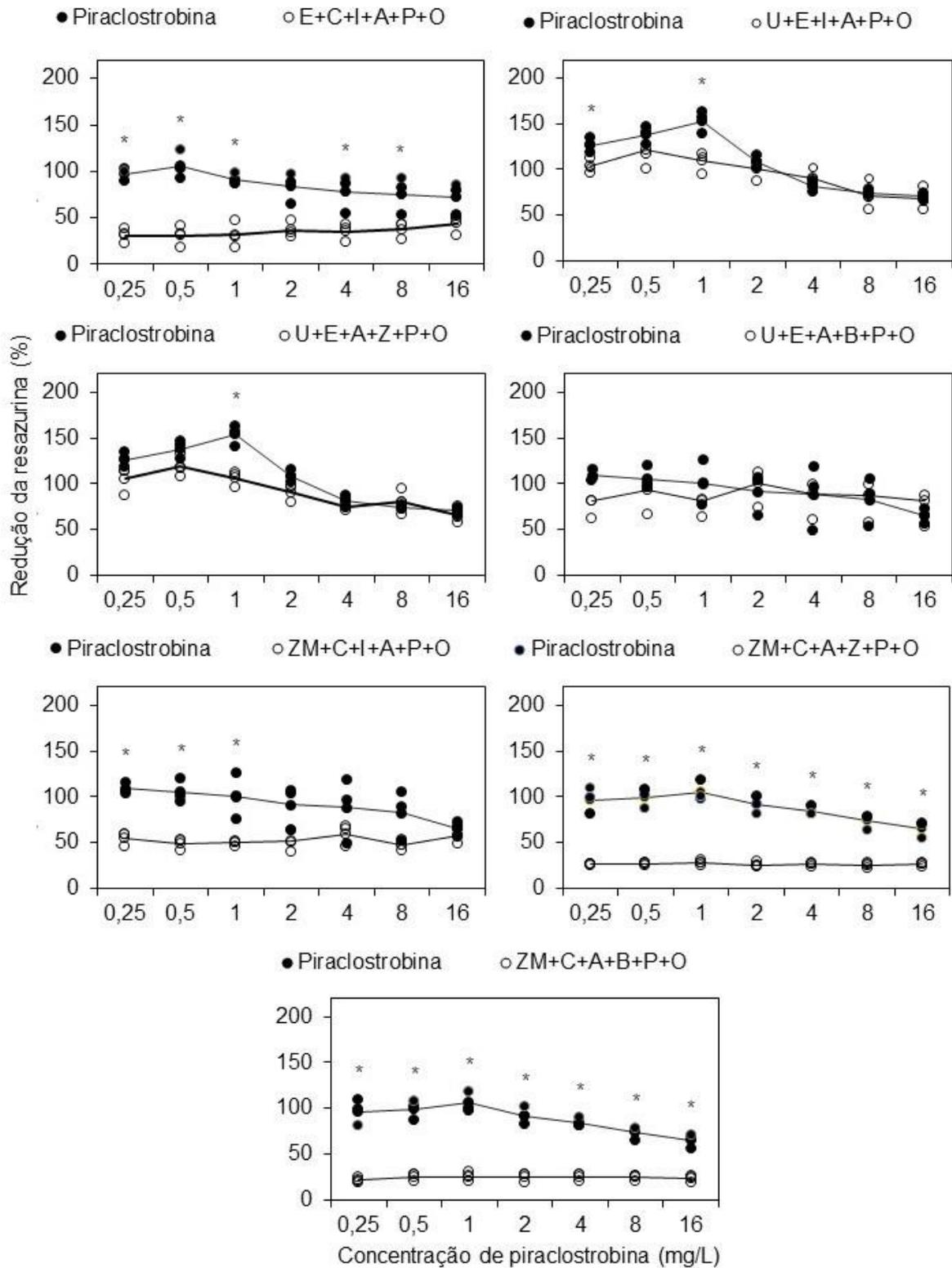


Figura 9. Redução da resazurina (%) por *Phyllosticta citricarpa* em meio com diferentes concentrações de piraclostrobina pura (0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 e 16 mg/L) ou em misturas com os agroquímicos abamectina (A), bifentrina (B), oxicloreto de cobre (C), enxofre (E), imidacloprido (I), óleo mineral (O), uréia (U), zeta-cipermetrina (Z) e sulfatos de Zn e Mn (ZM). *Médias significativamente diferentes (Teste *t*, $p=0.05$).

3.2.3 Análise do pH das caldas dos ensaios de eficiência biológica

Entre as 21 misturas em estudo, cinco misturas (P+O, U+E+A+Z+P+O, U+E+A+B+P+O, ZM+C+A+Z+P+O e ZM+C+A+B+P+O) apresentaram aumento significativo no valor de pH final (após 2 horas em agitação) quando comparado com o valor de pH inicial no preparo da calda. Outras três misturas que continham enxofre, abamectina e óleo (E+I+A+P+O, E+C+A+B+P+O e E+C+I+A+P+O) apresentaram diminuição significativa no valor de pH final quando comparado com o valor do pH inicial. As demais 13 misturas não apresentaram mudanças significativas entre seus valores de pH inicial e final (Tabela 4). A regressão linear entre os dados de pH e CE₅₀ das 21 misturas testadas não foi significativa ($p = 0,7029$) e apresentou coeficiente de terminação muito baixo ($R^2 = 0,008$).

Tabela 4. Valor de pH de 21 misturas de agroquímicos contendo o fungicida piraclostrobina para os ensaios de eficiência biológica.

Misturas	pH		Misturas	pH		Misturas	pH	
	inicial	final		inicial	final		inicial	final
P+O	6,03	7,27*	E+I+P+O	6,49	6,55	E+C+I+A+P+O	8,28	7,67*
I+P+O	6,76	6,00	E+Z+P+O	6,41	6,46	U+E+I+A+P+O	6,50	6,66
C+P+O	8,89	8,79	E+A+Z+P+O	6,23	6,35	U+E+A+Z+P+O	6,45	6,65*
E+P+O	6,73	6,37	E+A+B+P+O	6,50	6,50	U+E+A+B+P+O	6,69	7,08*
E+B+P	6,71	6,61	E+I+A+P+O	7,06	6,78*	ZM+C+I+A+P+O	5,67	5,90
C+I+P+O	8,61	8,62	E+C+A+Z+P+O	8,33	8,00	ZM+C+A+Z+P+O	5,68	5,87*
E+C+P+O	7,29	7,07	E+C+A+B+P+O	8,18	7,88*	ZM+C+A+B+P+O	5,37	5,85*

Caldas contendo abamectina (A), bifentrina (B), oxiclureto de cobre (C), enxofre (E), imidacloprido (I), óleo mineral (O), piraclostrobina (P), uréia (U), zeta-cipermetrina (Z) e sulfatos de Zn e Mn (ZM). *Médias de valores de pH significativamente diferentes (Teste t , $p=0,05$).

3.3 Avaliação da fitotoxicidade das misturas em campo

No experimento para avaliação da fitotoxicidade em campo foi observado que as misturas não apresentaram incremento de fitotoxicidade nos frutos quando comparadas com a aplicação da calda contendo apenas piraclostrobina ($p<0,05$). As plantas não tratadas, assim como as pulverizadas com as diferentes misturas, apresentaram percentuais significativamente similares de frutos com ausência de sintomas de fitotoxicidade, que variou de 83 a 87%. Portanto, todas as plantas, independentemente se receberam ou não aplicação de misturas apresentam percentuais baixos de frutos com sintomas leves (6 a 15%) e sintomas moderados (1 a 5%). Sintomas severos praticamente não foram observados em frutos que receberam aplicação dos agroquímicos em mistura (0 a 0,8%).

Durante a primeira repetição do experimento, a estação meteorológica registrou temperaturas entre 29 e 34 °C, radiação solar de 714 a 1084 W/m² e velocidade do vento de 1,6 a 2,7 m/s. A umidade relativa média do dia variou de 32 a 49% e não houve precipitação no dia das aplicações das misturas. Durante os sete dias seguintes até a avaliação dos frutos, a temperatura variou de 20 a 35 °C, radiação solar atingiu 1159 W/m² e a velocidade máxima do vento foi de 5,5 m/s. A umidade relativa média diária variou de 25 a 89% e durante 3 dias houve precipitação de até 6,4 mm.

A segunda repetição do experimento de avaliação da fitotoxidade das misturas foi realizada com temperaturas que variaram de 24 a 32°C, com valores de radiação solar de 215 a 956 W/m² e vento com velocidades que variaram de 0,8 a 2,1 m/s. A umidade relativa média do dia variou de 51 a 80% e não houve precipitação pluviométrica durante as aplicações. Durante os sete dias seguintes, até o dia de avaliação dos frutos, a estação meteorológica registrou temperaturas que variaram de 20 a 36°C, com valores de radiação solar de até 1147 W/m² e vento com velocidades que chegaram a 2,5 m/s. A umidade relativa média dos sete dias variou de 31 a 97% e durante 4 dias houve precipitação de até 19 mm.

4. DISCUSSÃO

Esse é um trabalho pioneiro na avaliação do efeito da piraclostrobina em mistura com diferentes agroquímicos (inseticidas, acaricidas, fungicidas, bactericidas, adjuvantes e fertilizantes foliares) utilizados em pomares de citros no Brasil. As diferentes misturas de agroquímicos avaliadas nesse estudo apresentaram pelo menos um tipo de incompatibilidade físico-química descrita pela norma NBR 13 875. Isso pode ser explicado pelo fato de o óleo mineral estar presente em todas as misturas testadas, já que a instabilidade física de caldas pode estar relacionada a característica dos óleos de separar-se dos solventes contidos nas formulações comerciais dos agroquímicos em mistura, sendo esse efeito minimizado através do uso de agentes dispersantes e agitação contínua da calda desde o seu preparo até o momento da aplicação (Gadanha Júnior et al., 2007). Porém, a maioria dessas incompatibilidades não afetou significativamente a eficiência biológica das caldas na inibição de *P. citricarpa* em laboratório.

De acordo com Ramos & Araújo (2006), as misturas que apresentam cristal, grumo e/ou grumo retido na peneira podem ser consideradas como críticas para uso em tanques de pulverização, uma vez que esses cristais e grumos são incompatibilidades irreversíveis e causam danos aos equipamentos. Para que tais problemas irreversíveis de incompatibilidade não ocorram é possível previamente a pulverização avaliar a qualidade física e química da água utilizada para tal fim, mensurando seu valor de pH, dureza e quantidade de sedimentos em suspensão, que podem interferir muito na qualidade de aplicação da calda, assim como na ocorrência de incompatibilidades entre os agroquímicos em mistura (Ramos & Araújo, 2006). Essas incompatibilidades podem ser evitadas em alguns casos com a substituição de um ou mais produtos da mistura por outra formulação comercial que contenha o mesmo ingrediente ativo. Além disso, também é possível realizar o preparo da calda seguindo uma ordem de adição dos produtos diferente da realizada anteriormente. As demais incompatibilidades são geralmente observadas na calda em repouso, de forma que essas caldas possam ser pulverizadas se mantidas em agitação contínua.

Algumas misturas apresentaram incompatibilidades no teste dinâmico que não foram observadas no teste estático, ou seja, incompatibilidades foram encontradas em calda preparada sob agitação contínua e não em calda sob repouso. Normalmente algumas das incompatibilidades físicas, como a separação de óleo, separação de fases e sedimentação, são favorecidas pela não agitação da calda e, conseqüentemente, minimizadas quando a calda é

mantida em agitação contínua. Isso ocorre, pois, essas separações físicas presentes na calda em repouso, quando em agitação se espalham homoganeamente por toda a solução, não ficando mais aparentes. Porém, para outras incompatibilidades a agitação pode ser um fator que facilite o encontro das moléculas em mistura, auxiliando na formação dessas incompatibilidades. Além disso, segundo a NBR 13 875, as caldas preparadas no teste dinâmico, após serem mantidas sob agitação contínua também devem ser colocadas em repouso por 10 minutos antes de serem avaliadas, podendo ainda assim apresentar incompatibilidades favorecidas pela não agitação da calda.

Esse estudo foi conduzido com duas diferentes metodologias de avaliação da eficiência das misturas sobre *P. citricarpa*: crescimento micelial e microtitulação à base de resazurina. No ensaio de crescimento micelial, as CE_{50} da maioria das misturas foram inferiores, iguais ou muito próximas a 0,005 mg/L (menor concentração avaliada), nos indicando que a eficiência da piraclostrobina na inibição de *P. citricarpa* não foi alterada pela adição dos produtos. Os maiores valores de CE_{50} foram observados para as misturas E+C+P+O e ZM+C+I+A+P+O que apresentaram valores de CE_{50} de 0,007 e 0,014 mg/L, respectivamente, onde as duas misturas tinham em comum o cobre e o óleo. Vale ressaltar que, seis misturas contendo cobre e óleo apresentaram CE_{50} inferiores a 0,005 mg/L, o que demonstra que a adição desses dois produtos à calda com piraclostrobina não necessariamente reduzirá a eficiência biológica do fungicida.

Embora nesse estudo todas as CE_{50} tenham sido consideradas relativamente baixas e similares aquelas reportadas por Hincapie et al. (2014), que variaram de 0,002 a 0,003, a eficiência biológica das caldas que apresentaram CE_{50} para inibir o crescimento de *P. citricarpa in vitro* superiores a 0,005 mg/L deve ser avaliada em pomares comerciais no controle da pinta preta. Adicionalmente, essas caldas com leve aumento da CE_{50} poderiam ser avaliadas com os mesmos ingredientes ativos, porém com outros produtos comerciais disponíveis no mercado, incluindo as outras estrobilurinas (azoxistrobina e trifloxistrobina) formuladas em grânulos dispersíveis em água, a fim de verificar se há variação entre as diferentes formulações comerciais. Contudo, diante do grande número de formulações existentes para cada ingrediente ativo utilizado no presente estudo, essa prática resultaria em um grande número combinações de produtos formulados em avaliação onerosa.

O crescimento micelial foi adotado nesse estudo por se tratar de um método muito utilizado em testes de sensibilidade de fungos aos fungicidas (Lopes et al., 2015). Embora a avaliação do efeito de fungicidas inibidores de quinona externa (QoI) sobre patógenos seja realizada principalmente com o método da germinação de esporos, alguns trabalhos têm

utilizado o crescimento micelial e/ou unidade formadora de colônias como metodologias para avaliar esse grupo de fungicidas (Hincapie et al., 2014). Nesse estudo, ensaios preliminares com germinação de esporos foram conduzidos, porém não foi possível visualizar os esporos germinando sob microscópio devido à deposição de alguns agroquímicos sobre os esporos, principalmente enxofre e oxicloreto de cobre. A metodologia da contagem de unidade formadora de colônias também foi avaliada previamente, mas devido à grande variação no número de colônias e baixa repetitividade esse teste teve seu uso inviabilizado para tal fim. Portanto, o método do crescimento micelial se mostrou um dos mais viáveis para a avaliação das misturas e tem a vantagem de ser mais simples e exigir menos recursos. Por outro lado, ele é mais demorado que os demais testes, uma vez que o patógeno *P. citricarpa* apresenta crescimento lento em meios de cultivo e as avaliações de crescimento das colônias geralmente são feitas após 14 dias (Hincapie et al., 2014).

Nos ensaios com microtitulação à base de resazurina, quanto maior é a redução desse indicador (da cor azul para rosa), maior é a taxa de respiração e a atividade metabólica de *P. citricarpa* e menos eficiente tende a ser a calda fungicida para controlar o fungo (Vega et al., 2012). Na literatura não há relatos de uso deste teste para avaliação de misturas, mas sim para avaliação da sensibilidade química de fungos e bactérias a agroquímicos e antibióticos utilizados isoladamente (Vega et al., 2012; Chitolina, 2019). Nesse estudo, embora o teste tenha se mostrado válido para avaliação da eficiência da piraclostrobina em diferentes misturas, houve grande variação nas leituras e necessidade de muitas repetições dos ensaios. A maioria das caldas de piraclostrobina preparadas em mistura apresentaram redução da resazurina inferior àquela obtida com calda contendo apenas a estrobilurina individualmente, nos indicando o efeito aditivo dessas misturas na inibição de *P. citricarpa*. Nas doses mais baixas de piraclostrobina o efeito adicional dos produtos foi mais pronunciado na inibição da respiração do fungo, uma vez que a resazurina é reduzida (respiração incrementada) em maior quantidade (coloração mais rosa) na calda apenas com piraclostrobina pura em comparação com caldas de misturas contendo os demais agroquímicos, principalmente o oxicloreto de cobre que também tem atividade fungicida (Silva Junior et al., 2016a).

De maneira geral, as misturas apresentaram valores de redução da resazurina (incremento da respiração) de apenas 50%, enquanto a piraclostrobina pura apresentou reduções de aproximadamente 100% nas menores concentrações até em torno dos 60% nas maiores concentrações testadas. Para algumas misturas foi observado um pico de redução nas concentrações intermitentes, mesmo não tendo sido observado diferenças na coloração das placas referentes a essas misturas. Adicionalmente, as misturas sem a adição da

piraclostrobina apresentaram valores de redução da resazurina (aumento da respiração) inferiores àqueles observados para o fungo em meio de cultivo sem agroquímicos, o que reforça o efeito direto de alguns agroquímicos na inibição do fungo e possível efeito aditivo da calda contendo esses agroquímicos em mistura com a piraclostrobina.

O teste de microtitulação à base de resazurina permitiu observar tendências apesar da alta variabilidade das misturas e tem a vantagem de ser muito rápido, o que possibilita a avaliação das misturas em poucas horas. Entretanto, é um método que apresenta resultados muito variáveis por ser muito sensível e exigir precisão durante a execução de todas as etapas da montagem até a avaliação das placas. Assim, devido a elevada sensibilidade e variação do método se faz necessária a montagem de muitas repetições, o que torna esse método de difícil reprodutibilidade. Além disso, o método também requer mais recursos tanto para a compra dos reagentes quanto para a aquisição do equipamento leitor de microplacas.

Na avaliação da compatibilidade físico-química das misturas é recomendável a utilização da água padrão, pois ela apresenta uma menor dureza total da água, o que caracteriza dureza muito branda. Assim, essa característica da água se torna um fator que não interfere na reação entre os agroquímicos testados em mistura, permitindo a avaliação e descoberta de incompatibilidades em laboratório causadas apenas pela interação entre eles (Ramos & Araújo, 2006). É importante mencionar que, pequenas variações nos ensaios podem gerar resultados um pouco divergentes e o aumento do número de repetições de ensaios se mostram importantes, principalmente nos casos em que incompatibilidades são observadas. Nesse estudo, variações consideráveis foram observadas para a mistura de enxofre, cobre, imidacloprido, abamectina, estrobilurina e óleo. No primeiro ensaio foi observada a presença de cristais e grumos, mas no segundo ensaio não. Portanto, não foram incompatibilidades presentes em todos os ensaios conduzidos. Isso pode ter ocorrido devido a pequenas alterações nas diferentes fases ao longo do procedimento, não reprodutibilidade por variação entre avaliadores, bem como a dificuldade de visualização desses cristais, que dentre as avaliações realizadas nesse teste, é a mais difícil.

A água padrão apresentou também o inconveniente de aumentar as contaminações por bactérias e outros fungos no teste de crescimento micelial, impossibilitando a avaliação do crescimento do patógeno *P. citricarpa*. A pesagem dos produtos e o preparo da água padrão são geralmente realizados em um ambiente não estéril, o que aumenta a probabilidade de contaminação. Após o preparo desta água, há possibilidade de submeter a mesma ao processo de filtração em Milipore, porém, devido à grande quantidade de água utilizada nos ensaios, a filtração pode não se tornar uma etapa viável por requerer a troca do filtro após a filtração

de volumes relativamente reduzidos. No teste de microtitulação, a água padrão interferiu no processo de mudança de cor da resazurina, observada logo que o reagente foi adicionado a água, o que impossibilitou a utilização da mesma nesse tipo de ensaio de avaliação de caldas de agroquímicos em mistura. Dessa forma, a água padrão foi utilizada no teste de incompatibilidade físico-química, enquanto a água destilada autoclavada foi usada para o preparo das caldas nos testes de eficiência biológica. Mesmo não utilizando a água padrão, ambos os testes se mostram suficientes para avaliar a eficiência biológica de misturas de agroquímicos com resultados similares.

Na avaliação do pH das caldas dos ensaios de eficiência biológica, a maioria das misturas não apresentaram mudanças significativas entre os valores de pH inicial e final da calda. De maneira geral, as misturas que apresentaram tais mudanças continham piraclostrobina em mistura com abamectina e óleo. Muitos compostos químicos, quando em contato com a água, podem sofrer degradação por hidrólise, onde a velocidade de degradação é influenciada pelo valor de pH da solução (Kissmann, 1998; Cunha et al., 2017). Assim, valores elevados de pH foram observados para a maioria das misturas, o que as caracterizam como caldas mais alcalinas. Entretanto, a piraclostrobina em solução na temperatura de 25°C se apresenta estável a ocorrência de hidrólise nos valores de pH 5,0 a 9,0 (Lewis et al., 2016). Contudo, não foi observado interferência do valor de pH das caldas na eficiência de inibição de *P. citricarpa* pelas misturas contendo piraclostrobina. A regressão linear entre os dados de pH e CE₅₀ das misturas apresentou coeficiente de terminação muito baixo ($R^2 = 0,008$) e não foi significativa ($p = 0,7029$), demonstrando que esse ligeiro aumento da CE₅₀ observado para algumas caldas não foi causado por mudanças de pH. Adicionalmente, é necessário que essas caldas sejam testadas em pomares comerciais de forma a avaliar a possível interferência do valor de pH na manutenção da eficiência biológica do fungicida aplicado em mistura.

Na avaliação da fitotoxicidade, os tratamentos levados a campo não diferiram significativamente da calda com a piraclostrobina pura, indicando baixo potencial fitotóxico das misturas avaliadas. É importante ressaltar que, as misturas de campo foram preparadas com doses máximas usadas no setor citrícola para o controle de pragas e doenças, conferindo doses mais altas que as normalmente utilizadas em pomar comercial. A fitotoxicidade tende a aumentar com o diâmetro dos frutos e a partir de 40 mm pode haver um incremento da suscetibilidade a efeitos fitotóxicos, principalmente de caldas contendo fungicidas cúpricos (Goes et al., 2004). Nesse estudo, os frutos avaliados apresentavam ~ 50 mm de diâmetro e essa fase pode ser considerada como suscetível a fitotoxicidade por caldas. É importante ressaltar que foram observados frutos com sintomas leves de fitotoxicidade nas plantas

testemunha, o que pode ser explicado pelo fato de o experimento ter sido conduzido em área que, na mesma safra, já havia recebido pulverizações para controle de outras pragas ou vetores. Entretanto, após as pulverizações das misturas testadas não foi observado incremento nos sintomas de fitotoxicidade em frutos tratados com as diferentes misturas em relação aos frutos que não foram pulverizados no mesmo momento. Os resultados de fitotoxicidade obtidos em campo demonstram que as caldas não apresentaram danos cosméticos relevantes aos frutos até 7 dias após a aplicação das mesmas, porém é importante que mais caldas sejam testadas em campo para verificar a ocorrência de outros efeitos adversos de longo prazo.

O trabalho aqui proposto demonstrou que, dentre os diferentes métodos de avaliação da eficiência biológica de misturas de agroquímicos em laboratório, o crescimento micelial parece ser o de melhor custo-benefício. Esse método poderá ser usado para a elaboração de um protocolo referência para avaliação de caldas que possam apresentar indícios de incompatibilidade ou perda de eficiência biológica para fungicidas. O método de crescimento micelial, apesar de mais demorado, se mostrou mais eficaz na avaliação da eficiência biológica de misturas de agroquímicos em laboratório. A microtitulação à base de resazurina pode ser usada como um método qualitativo para identificação de perda de eficiência biológica com base nas cores de poços da placa das misturas em relação ao fungicida usado individualmente. Os resultados obtidos *in vitro* são muito relevantes e possibilitaram sanar várias dúvidas relacionadas a misturas de caldas com fungicidas, porém é importante validar esses resultados com a avaliação da eficiência biológica das caldas em pomares comerciais antes da recomendação de uso das mesmas em larga escala. Contudo, mais trabalhos envolvendo compatibilidade físico-química entre agroquímicos em mistura, assim como os seus efeitos sobre a eficiência biológica dos produtos formulados, são necessários para que possamos aprimorar o uso de misturas em tanque, de forma a realizar aplicações cada vez mais sustentáveis ambientalmente e economicamente e também mais eficiente no controle de pragas e doenças.

5. CONCLUSÃO

Todas as 21 misturas testadas apresentaram algum tipo de incompatibilidade descrita na norma NBR 13 875 e apenas nove delas foram consideradas críticas para uso em tanque de pulverização por apresentarem cristais e/ou grumos.

A piraclostrobina em mistura com todos os agroquímicos testados foi eficiente em inibir o crescimento de *P. citricarpa* em concentrações muito baixas ($CE_{50} < 0,014$ mg/L).

As oito misturas avaliadas em campo não apresentaram incremento de fitotoxicidade em frutos de laranjeiras doce.

REFERÊNCIAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2014. **NBR 13875**: Agrotóxicos e afins – Avaliação de compatibilidade físico-química. Rio de Janeiro: ABNT. p. 16.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2016. **NBR 13074**: Agrotóxicos e afins – Preparação de água-padrão para ensaios. Rio de Janeiro: ABNT. p. 4.
- AENDA – Associação Brasileira dos Defensivos Genéricos. 2011. Mistura em tanque. **Caderno AENDA** (1):1-11.
- Aguilar-Vildoso, C.I., Baldini-Ribeiro, J.G., Feichtemberger, E., Goes, A., Spósito, M.B. 2002. **Manual técnico de procedimentos da mancha preta dos citros**. Brasília: MAPA: DAS: DDIV. 72 p.
- Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A (Ed.). 2011. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 704 p. v.1.
- Andrade, D.J., Ferreira, M.C., Martinelli, N.M. 2014. **Aspectos da fitossanidade em citros**. Jaboticabal: Cultura Acadêmica. 265 p.
- Azevedo, L.A.S. 2015. **Misturas de tanque de produtos fitossanitários: teoria e prática**. Rio de Janeiro: IMOS Gráfica e Editora. 230 p.
- Bassanezi, R.B., Fernandes, N.G., Yamamoto, P.T. 2003. **Morte súbita dos citros**. Araraquara: Fundecitrus. 54 p.
- Bassanezi, R. R.; Belasque Junior, J.; Hamada, E.; Ghini, R.; Nogueira, S. M. C. 2012. Efeito das mudanças climáticas sobre doenças dos citros : estudo de caso do cancro cítrico. Resumos. XXXV Congresso Paulista de Fitopatologia. Jaguariúna SP. **Summa Phytopathologica** v. 38.
- Bassanezi, R.B., Silva Júnior, G.J., Feichtenberger, E., Belasque Júnior, J., Behlau, F., Wulff, N.A. 2016. Doenças dos citros. In: Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres. p. 271-306. v. 2.
- Bergamin Filho A., Amorim, L., Rezende, J.A.M. 2018. Importância das doenças das plantas. In: Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5 ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres. p. 15-24. v.1.
- Chitolina, G.M. 2019. Caracterização da sensibilidade de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom em tangerinas, a fungicidas inibidores da quinona externa. 77 f. **Dissertação de mestrado**. Piracicaba, SP: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo.
- Cunha, J. P. A. R., Alves, G. S.; Marques, R.S. 2017. Tensão superficial, potencial hidrogênionico e condutividade elétrica de caldas de produtos fitossanitários e adjuvantes. **Ciência Agrônômica**. v.48 (2): 261-270.

FNP Consultoria & Comércio. 2020. **Agriannual 2020**: anuário da agricultura brasileira. 25 ed. São Paulo: IBG: FNP. 416 p.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2016. **Manual de pinta preta**. Araraquara: Fundecitrus. 24 p.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2020. **ProteCitrus**. Araraquara: Fundecitrus. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/protecitrus>>. Acesso em: 04 mai. 2020.

Gadanha Júnior, C. D.; Monteiro, M. V. M.; Reichenbach, J. W.; Castro, J. A. V.; Bull, R. C. 2007. Estudo da estabilidade física de caldas de pulverização para aplicação de agrotóxicos em baixo volume oleoso (BVO®) na cultura do algodoeiro. Anais. **VI Congresso Brasileiro do Algodão**. Uberlândia, Brasil. 2007. p. 1-6.

Gazziero, D.L.P. 2015. Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. **Planta daninha** 33(1):83-92.

Goes, A., Feichtengerger, E. 1993. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (Mc Alp) van der Aa (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira** 18:318.

Goes, A.; Martins, R. D.; Reis, R. F. 2004. Efeito de fungicidas cúpricos, aplicados isoladamente ou em combinação com Mancozeb, na expressão de sintomas de fitotoxicidade e controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em goiabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura** 26:237-240.

Hincapie, M., Wang, N.-Y., Peres, N.A., Dewdey, M.M. 2014. Baseline sensitivity of *Guignardia citricarpa* isolates from Florida to azoxystrobin and pyraclostrobin. **Plant Disease** 98:780-789.

Kissmann, K. G. 1998. Adjuvantes para caldas de produtos fitossanitários. In: Guedes, J. V. C., Dornelles, S. B. **Tecnologia e segurança na aplicação de agrotóxicos: novas tecnologias**. Santa Maria. Sociedade de Agronomia de Santa Maria. p. 39-51.

Kotzé, J.M. 1981. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease** 65:945-950.

Lanza, F. E.; Metzker, T. G.; Vinhas, T.; Behlau, F.; Silva Júnior, G. J. 2018. Critical fungicide spray period for citrus black spot control in São Paulo state, Brazil. **Plant Disease** 102:334-340.

Laranjeira, F.F., Feichtenberger E., Bassanezi R.B., Spósito M.B. 2005. Manejo integrado de doenças de citros. In: Mattos Junior, D., De Negri, J.D., Pio, R.M., Pompeu Junior, J. (Ed.). **Citros**. Cordeirópolis: Instituto Agrônomo: Fundag. p. 629-651.

Leite, S.M.M., Uemura, F.T. 2014. **Breve análise econômica da prática de mistura em tanque**. Pompéia: Fatec. 18 p.

Lewis, K. A., Tzilivakis, J., Warner, D.; Green, A. 2016. An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal** 22(4):1050-1064.

Lopes, L.N.S., Silva, A.S., Pereira, C.C.O., Menezes, I.P.P., Malafaia, G., Lima, M.L.P. 2015. Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* a fungicidas. **Multi-Science Journal** 1(1):106-114.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N°40, de 11 de outubro de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 out. 2018. p. 9.

Netto, A. F. A. 2020. Enxofre como desalojante para *Spodoptera frugiperda*, incluindo considerações sobre sua mistura com o inseticida espinosade, em plantas de milho doce. 43 f. **Dissertação de Mestrado**. Morrinhos: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

PES – Programa de Estimativa de Safra. 2020. **Inventário de árvores e estimativa da safra de laranja 2020-21**. Araraquara: Fundecitrus. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2020_05_26_Invent%C3%A1rio_e_Estimativa_do_Cinturao_Citricola_2020-2021.pdf>. Acesso em: 13 maio 2020.

Petter, F. A.; Segate, D.; Almeida, F. A.; Alcântara Netto, F.; Pachecho, L. P. 2013. Incompatibilidade física de misturas entre inseticidas e fungicidas. **Comunicata Scientiae**. 4(2):129-138.

Ramos, H.H., Araújo, D. de. 2006. **Preparo da calda e sua interferência na eficácia de agrotóxicos**. Campinas: Infobibos. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/V2/index.htm>. Acesso em: 22 jan. 2020.

Robbs, C.F., Pimentel, J.P., Ribeiro, R.L.D. 1980. A mancha preta dos frutos cítricos causada por *Phoma citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira** 5:455.

Scaloppi, E.M.T., Aguiar, R.L., Goes, A.D., Sposito, M.B. 2012. Efeito do manejo cultural e químico na incidência e severidade da mancha-preta dos citros. **Revista Brasileira de Fruticultura** 34:102-108.

Silva Junior, G.J., Feichtenberger, E., Spósito, M.B., Amorim, L., Bassanezi, R.B., Goes, A. 2016a. **Pinta preta dos citros: a doença e seu manejo**. Araraquara: Fundecitrus. 208 p.

Silva Junior, G.J., Scapin, M.S., Silva, F.P., Silva, A.R.P., Behlau, F., Ramos, H.H. 2016b. Spray volume and fungicide rates for citrus black spot control based on tree canopy volume. **Crop Protection** 85:38-45.

Sivanesan, A. 1984. **The bitunicate ascomycetes and their anamorphus**. Vaduz: J. Cramer. 701 p.

Spósito, M.B., Amorim, L., Bassanezi, R.B., Yamamoto, P.T., Felipe, M.R., Czermainski, A.B.C. 2011. Relative importance of inoculum sources of *Guignardia citricarpa* on the citrus black spot epidemic in Brazil. **Crop Protection** 30:1546-1552.

Vega, B., Liberti, D., Harmon, P.F., Dewdney, M.M. 2012. A Rapid Resazurin-Based Microtiter Assay to Evaluate QoI Sensitivity for *Alternaria alternata* Isolates and Their Molecular Characterization. **Plant Disease** 96:1262-1270.