

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

VERÔNICA KASTALSKI DE SOUZA

**Influência do cancro cítrico nas características do fruto e
qualidade do suco de laranja**

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

Orientador: Dr. Franklin Behlau

Coorientador: Dr. Fabrício Eustáquio Lanza

**Araraquara
Novembro 2018**

VERÔNICA KASTALSKI DE SOUZA

**Influência do cancro cítrico nas características do fruto e
qualidade do suco de laranja**

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

Orientador: Dr. Franklin Behlau

Coorientador: Dr. Fabrício Eustáquio Lanza

**Araraquara
Novembro 2018**

VERÔNICA KASTALSKI DE SOUZA

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

Araraquara, 14 de novembro de 2018.

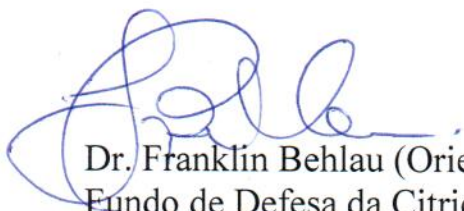
BANCA EXAMINADORA



Dr. Marcos David Ferreira
Embrapa Instrumentação - EMBRAPA, São Carlos/SP.



Dr. Renato Beozzo Bassanezi
Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS, Araraquara/SP



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

*À minha mãe Sonia Maria Kastalski,
À minha irmã Vanessa Cristina Kastalski Ferreira Borges,
Aos meus sobrinhos Nicolas, Carolina e Pedro Lucas,
por todo o amor, carinho e apoio.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e oportunidade de concluir mais essa conquista em minha vida.

À minha mãe, Sonia Maria Kastalski, por todo apoio e compreensão durante mais essa jornada.

Aos meus orientadores Franklin Behlau e Fabrício Eustáquio Lanza, pela orientação, ensinamentos e apoio na realização deste trabalho.

À Daniela Kharfan, por toda a ajuda prestada junto à JBT.

Ao Fundecitrus, pela oportunidade de cursar o Mastercitrus e de ser uma das primeiras bolsistas de mestrado da instituição.

A todos os professores do Mastercitrus Ciclo VI, por compartilharem seu conhecimento e lecionarem com excelência.

Aos colegas de turma do Mastercitrus Ciclo VI, pelas experiências profissionais compartilhadas. Em especial as amigas Mônica Neli, Amanda Zito e Narimã Freitas, pelas ajudas trocadas nos momentos de desespero, sempre agregando valor ao conhecimento.

À Amanda Oliveira, por toda sua ajuda e paciência desde a inscrição, consultas bibliográficas e conversas intelectuais de almoço até o auxílio na finalização deste trabalho.

Aos colegas do Fundecitrus: Tamires Garcia, Tatiane Malara, Rafael Smirne, Samuel Silva e Hermes Teixeira, pelo apoio em algum momento na condução deste trabalho. Em especial, ao parceiro de equipe Bruno Eugênio.

As amigadas do Fundecitrus e, que conquistei na Morada do Sol: Michele Dutra, Josi, Tatiane Cunha, Márcia, Rosângela, Jasmine, Laudecir, Juan, João Pedro, Everton e Danny Mendoza.

Aos Agrônomos do Fundecitrus, Sérgio Nascimento e Luis Scandelai pela ajuda na busca pelos talhões.

Aos proprietários e administradores das fazendas nas regiões Centro, Norte e Noroeste do Estado de SP.

Aos analistas e auxiliares da JBT: Luis Gimenez, Adriano Romero, Diego Doria e Cláudio Silva pelo apoio e execução da etapa inicial do processamento das frutas.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram na realização deste trabalho e estiveram presente durante esses dois anos de aprendizado e experiências adquiridas, o meu muito obrigado!

Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.

Antoine de Saint-Exupéry

Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar.

Anatole France

Influência do cancro cítrico nas características do fruto e qualidade do suco de laranja

Autora: Verônica Kastalski de Souza

Orientador: Franklin Behlau

Coorientador: Fabrício Eustáquio Lanza

Resumo

O cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) é uma das doenças mais importantes da citricultura mundial, tanto por causar a redução da produção em função da queda prematura de frutos sintomáticos quanto por depreciar a qualidade da produção para o mercado de fruta de mesa. Além disso, suspeita-se que as lesões necróticas de cancro cítrico na casca de frutos, as quais servem de substrato para a colonização de fungos saprofitos, possam estar relacionadas à presença de fragmentos de fungos (*mold*) no suco. No entanto, não há estudos sobre essa associação ou mesmo informações na literatura sobre a influência da doença nas características do fruto e do suco de laranja. Para garantir a qualidade não só do produto final, mas também da matéria-prima, parâmetros físico-químicos e de quantidade de *mold* são monitorados pela indústria para atender as exigências dos mercados compradores de suco. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do cancro cítrico sobre as características do fruto e sobre os parâmetros de qualidade físico-química e incidência de *mold* no suco de laranja. Para isso, frutos com e sem lesões de cancro cítrico, coletados da planta e do chão, foram amostrados em diferentes talhões localizados nas regiões noroeste, norte e centro do estado de São Paulo. Os frutos foram analisados quanto ao diâmetro, peso, conteúdo de óleo na fruta e rendimento industrial. As características físico-químicas do suco avaliadas foram °Brix, acidez, *ratio*, teor de óleo, limonin, hesperidina, aminoácidos primários (índice de formoldeído) e secundários (prolina) e pectina. A avaliação de *mold* foi realizada pela quantificação de fragmentos de hifas presentes no suco, utilizando a metodologia Howard *mold count*. Adicionalmente, foi avaliada a importância da lavagem de frutos na redução de *mold* no suco. As características do fruto e os parâmetros de qualidade físico-química não foram afetados de forma consistente pelo cancro cítrico. No entanto, em algumas amostras o suco de frutos com lesões de cancro cítrico apresentaram aumento na acidez e na quantidade de aminoácidos secundários, e redução de pectina. O cancro cítrico causou aumento de *mold* no suco de frutos coletados do chão e, eventualmente, no suco de frutos coletados da planta, os quais apresentaram média de 21,58 e 7,76% de *mold*, respectivamente. Em contrapartida, frutos assintomáticos coletados na planta e no chão apresentaram 1,25 e 3,66% de *mold*, respectivamente. A lavagem de frutos com cancro reduziu em mais da metade o *mold* no suco. Apesar da associação do cancro cítrico com o aumento de *mold*, o risco de contaminação do suco pode ser minimizado ou evitado por meio do manejo correto da doença no pomar, do não aproveitamento de frutos caídos e da lavagem de frutos antes do processamento.

Palavras-chave: Howard *mold count*; *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; prolina; pectina; *Citrus sisnesis*.

Influence of citrus canker in fruit characteristics and orange juice quality

Author: Verônica Kastalski de Souza

Advisor: Franklin Behlau

Co-advisor: Fabrício Eustáquio Lanza

Abstract

Citrus canker (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) is one of the most important diseases affecting citrus species worldwide. The disease may cause severe premature fruit drop or decrease the marketability of fresh fruit. In addition, the citrus canker lesions on fruit rind may serve as substrate for saprophytic fungi, which may increase the quantity of hypha fragments (mold) in the juice. However, there is no information about this association or on the influence of the disease on several aspects of the fruit and the orange juice. In order to ensure the quality, not only of the final product (juice), but also of the raw material (fruit), thresholds for physical-chemical parameters and mold were established by the industry to meet the customer requirements. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the influence of citrus canker on fruit characteristics, physical-chemical parameters and mold incidence in the juice. Fruit with and without citrus canker lesions were sampled from the trees and from the ground under the canopy, in different citrus blocks located in the northwest, north and central regions of the São Paulo state. The fruit were assessed regarding the diameter, weight, oil content and industrial yield. The evaluated physical-chemical parameters of the juice were Brix, acidity, ratio, oil, limonin, hesperidin, primary amino acids (formoldehyde index) and secondary (proline) and pectin. The amount of mold in the juice was assessed by quantifying the number of hyphae fragments using the “Howard mold count” methodology. A complimentary trial was set up to evaluate the contribution of pre-washing the fruit before juice extraction on the reduction of mold in the juice. The characteristics of the fruit and the physical-chemical parameters were not consistently affected by citrus canker. However, in some samples, the juice from fruit with citrus canker lesions showed higher levels of acidity, secondary amino acids, and lower amount of pectin compared to symptomless fruit. Citrus canker lesions led to an increase of incidence of mold in the juice of fruit from the ground and eventually in the juice of fruit from the tree, with average mold incidence of 21.58 and 7.76%, respectively. On the other hand, the juice from asymptomatic fruits from the tree and from the ground presented average mold incidence of 1.25 and 3.66%, respectively. Pre-washing the fruit with citrus canker before processing reduced more than half of the mold in the juice. Despite the association of citrus canker with the increase of mold incidence in the juice, the risk of contamination may be minimized or prevented by controlling the disease in the field, by avoid harvesting fruit from the ground, and by washing the fruit before processing.

Keywords: Howard mold count; *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; prolin; pectin; *Citrus sisnesis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lesões de cancro cítrico em frutos de laranja.....	7
Figura 2. Coleta das amostras de frutos com e sem cancro cítrico no pomar..	9
Figura 3. Amostras de frutos utilizadas no estudo.....	11
Figura 4. Lavagem e extração dos frutos..	12
Figura 5. Obtenção do suco de laranja no balanço de massa..	13
Figura 6. Câmara de Howard para contagem de filamentos de fungos no suco..	15
Figura 7. Observação de <i>mold</i> em microscópio óptico (aumento nominal de 100x).....	16
Figura 8. Diâmetro, peso e teor de óleo de frutos de laranja ‘Pera’ (A-C) e ‘Valência’ (D-F) com e sem sintomas de cancro cítrico coletados da planta ou do chão.....	18
Figura 9. Rendimento de suco de laranja ‘Pera’ (A) e ‘Valência’ (B) com e sem sintomas de cancro cítrico coletados da planta ou do chão.....	19
Figura 10. Sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável e <i>ratio</i> (SST/acidez) do suco proveniente de frutos de laranja ‘Pera’ (A-C) e ‘Valência’ (D-F) com e sem sintomas de cancro cítrico coletados da planta ou do chão.....	20
Figura 11. Concentração de óleo (v/v) e de pectina solúvel em água no suco de laranja ‘Pera’ (A, B) e ‘Valência’ (C, D) proveniente de frutos com e sem sintomas de cancro cítrico coletados da planta ou do chão.....	21
Figura 12. Teor de limonin e hesperidina no suco de laranja ‘Pera’ (A, B) e ‘Valência’ (C, D) proveniente de frutos com e sem sintomas de cancro cítrico coletados da planta ou do chão.....	22
Figura 13. Índice de formoldeído (mL NaOH 0,1N/100 mL de suco) e teor de prolina (mg/L) no suco de laranja ‘Pera’ e ‘Valência’ proveniente de frutos com e sem sintomas de cancro cítrico coletados da planta ou do chão.....	23
Figura 14. Percentagem de detecção de <i>mold</i> (fragmentos de hifas de fungos) em amostras de suco NFC (<i>not from concentrate</i>) de laranja ‘Hamlin’ (A-C), ‘Pera’ (D-F) e ‘Valência’ (G-I) provenientes de frutos com e sem sintomas de cancro cítrico coletados da planta ou do chão.....	25
Figura 15. Percentagens médias de <i>mold</i> (fragmentos de hifas de fungos) detectadas em amostras de suco NFC (<i>not from concentrate</i>) de frutos de laranja ‘Hamlin’ com lesões de cancro cítrico coletados da planta e do chão submetidos ou não à lavagem antes da extração do suco.....	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1. Descrição dos tratamentos	8
2.2. Caracterização do fruto	11
2.3. Caracterização do suco	11
2.3.1. Processamento dos frutos	11
2.3.2. Parâmetros avaliados	12
2.3.3. Balanço de massa	13
2.3.4. Análise físico-química	13
2.3.5. Quantificação de <i>mold</i>	14
2.4. Análise dos dados	16
3. RESULTADOS	17
3.1. Caracterização do fruto	17
3.2. Caracterização do suco	17
3.2.1. Rendimento de suco	17
3.2.2. Análise físico-química	19
3.2.3. Quantificação de <i>mold</i>	23
4. DISCUSSÃO	27
4.1. Caracterização do fruto	27
4.2. Caracterização do suco	27
4.2.1. Rendimento de suco	27
4.2.2. Análises físico-químicas	27
4.2.3. Quantificação de <i>mold</i>	31
5. CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A citricultura tem se destacado como sendo uma das atividades agrícolas mais importantes em vários países do mundo. Dentre as espécies cítricas cultivadas, a laranja doce (*Citrus sinensis*) merece destaque, tanto pelo volume produzido quanto pelos benefícios socioeconômicos promovidos pela cadeia produtiva. O Brasil é o país líder mundial na produção da fruta, seguido pela China, União Europeia, Estados Unidos e México, respectivamente. O país destaca-se como principal produtor e exportador de suco de laranja do mundo, respondendo por 56% e 76%, respectivamente, da produção e exportação mundial na média das últimas cinco safras. Na última safra brasileira foram produzidas 15,6 milhões de toneladas de laranja, gerando aproximadamente 885 mil toneladas de suco concentrado. A comercialização do fruto e do suco gera montantes que ultrapassam os R\$ 5,3 bilhões por safra, o que corresponde a 6,5 bilhões de dólares no Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro (Neves et al., 2010; FNP, Consultoria e Comércio, 2017; Neves & Trombin, 2017).

O cinturão citrícola paulista, formado por pomares de laranja concentrados no Triângulo/sudoeste do estado de Minas Gerais e principalmente em São Paulo, atualmente é responsável por 73% da produção nacional de laranja. Esta é a região com maior produção da fruta no país. Apesar do grande volume de frutos comercializados *in natura*, dados de 2016 mostram que o comércio de frutas frescas correspondeu à apenas 2,7% do total produzido no estado de São Paulo, evidenciando a grande tendência do estado ao processamento industrial da fruta para produção de suco (Fundo de Defesa da Citricultura, 2017; FNP, Consultoria e Comércio, 2017). Deste modo, é no território paulista onde as grandes indústrias extratoras de suco, como Citrosuco, Sucocítrico Cutrale e Louis Dreyfus Company estão localizadas. Juntas, estas indústrias comportam 90% das extratoras de suco de laranja existentes em todo o país (Barros et al., 2016).

A indústria nacional de suco de laranja exporta um grande volume de suco, conseqüentemente, esta deve atender as exigências dos mercados consumidores para viabilizar o comércio do produto. Os países consumidores de suco estabelecem rigorosas normas de controle de qualidade, dentre as quais as qualidades físico-química e microbiológica são as de maior relevância, tanto para o suco não concentrado (NFC, *not from concentrate*), quanto para o concentrado (FCOJ, *frozen concentrate orange juice*) (Darros-Barbosa, 2006). O mercado internacional, por meio de organizações que regulamentam a comercialização de suco de laranja, como a associação europeia de suco de frutas (AIJN,

European Fruit Juice Association), estabelecem limites restritivos para qualidade físico-química do suco de laranja brasileiro. Por exemplo, a presença de alguns compostos como a hesperidina, indicadora da adição de sucos secundários (provenientes de casca e bagaço) ao suco primário, tem limite máximo estabelecido de 700 mg/L de suco. Também são estabelecidas análises de compostos que indicam a maturação das frutas, como a pectina solúvel em água e aminoácidos primários, os quais têm limites estabelecidos entre 200-500 mg/L e 15-26 mg/L, respectivamente (*European Fruit Juice Association*, 2016). Entretanto, cada mercado consumidor de suco de laranja possui exigências específicas, como os compradores norte-americanos, que exigem análises não só físico-químicas como a de limonóides, mas também a quantificação de fragmentos de fungos (*mold*), a qual é um dos principais parâmetros relacionados à qualidade microbiológica da matéria-prima (fruto) utilizada no processamento.

A qualidade microbiológica do suco de laranja está associada à presença de *mold*, bactérias ácido-tolerantes, bolores e leveduras. Estes microrganismos são contaminantes específicos ligados a cada uma das etapas de produção do suco. A análise de *mold* é utilizada para detectar a presença de fungos que colonizam a superfície de frutos ainda no pomar ou durante o transporte e armazenamento da fruta. Estes fungos se tornam contaminantes principalmente durante a fase de extração do suco e são detectados como hifas inativadas depois do processo de pasteurização, podendo vir a causar a deterioração do suco. Outras análises estão relacionadas à verificação da eficiência dos processos de assepsia durante o processamento industrial, como a contagem total de bactérias ácido-tolerantes, bolores e leveduras (Tetra Pak, 2017).

Diversos fatores estão relacionados com a contaminação microbiológica do suco de laranja, como a estocagem do fruto em locais sujos, o uso de água de lavagem contaminada, a higienização inadequada dos equipamentos durante a extração do suco, além da falta de higiene dos manipuladores (Correia & Roncada, 2002; Correia & Roncada, 2003; Paula et al., 2011; Silveira & Bertagnolli, 2012). Até o final de 2000, a Portaria 451/97-MS, que estabelecia os padrões microbiológicos quanto à contaminação de bolores e leveduras em suco NFC, exigia o limite máximo de 104 unidades formadoras de colônia por mililitro de amostra/mL (UFC/mL). Atualmente, de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº12 de 2001 do Ministério da Saúde, não existem padrões para esse tipo de contaminação (Paula et al., 2011). No entanto, sabe-se que as condições de higiene para o processamento de suco de laranja *in natura* devem ser rigorosamente controladas de forma a

oferecer a seguridade alimentar exigida pelo mercado consumidor, seja este nacional ou internacional.

A contagem de fragmentos de hifas de fungos (*mold*) em produtos termoprocessados derivados de frutas, mesmo quando negativo na contagem total, também é considerada uma importante análise de qualidade microbiológica. Fatores relacionados à carga microbiana da superfície externa do fruto, presença de lesões no epicarpo e, a forma com que a colheita é realizada, assim como os equipamentos utilizados, influenciam a presença de fungos sobre o fruto e conseqüentemente sobre a qualidade da matéria-prima (Correia & Roncada, 2002). Adicionalmente, um manejo fitossanitário insatisfatório no pomar também pode levar a este aumento de microrganismos na superfície do fruto e conseqüente contaminação da matéria-prima que será utilizada em todo o processo de produção do suco.

A associação internacional de química analítica (AOAC, *Association of Official Analytical Chemists*) estabelece o método para a contagem de filamentos de hifas (método Howard) para produtos de diversas frutas. Desta forma, é possível determinar quantitativamente o nível de contaminação de um produto, por fungos ou, indiretamente, por seus metabolitos secundários (micotoxinas). A análise de contaminantes do suco, comumente conhecida por ‘contagem de *mold*’ ou *mold count*, é reconhecida pelo departamento de agricultura dos Estados Unidos (USDA, *United States Department of Agriculture*) e pela agência federal do departamento de saúde e serviços humanos dos Estados Unidos (FDA, *Food and Drug Administration*) sendo rotineiramente utilizada para este fim. Esta análise determina se o produto pode ser considerado como adequado ou não para comercialização com base nos fragmentos microbiológicos encontrados.

Diferente dos parâmetros microbiológicos e sanitários, as características físico-químicas do suco de laranja são estreitamente relacionadas a fatores climáticos, variedade da fruta, grau de maturação, tipo de solo e irrigação (Iha et al., 2000). No entanto, mesmo que a fruta seja produzida em regiões com condições edafoclimáticas propícias ao cultivo de laranjas, como no cinturão citrícola de São Paulo, estas características podem ser afetadas por fatores microbiológicos. A presença de doenças que afetam as plantas cítricas, principalmente aquelas causadas por fungos e bactérias, podem influenciar diretamente ou indiretamente a qualidade físico-química da matéria-prima (fruto) obtida.

Mesmo com o contínuo desenvolvimento de técnicas fitossanitárias para o controle de pragas e doenças no cinturão citrícola de São Paulo, características de cultivo dos citros como continuidade espacial, temporal e genética, favorecem a incidência das doenças e o surto de pragas (Bassanezi et al., 2014). A maioria destas afetam as laranjeiras de modo secundário,

uma vez que não causam grandes danos. Entretanto, algumas são extremamente prejudiciais, por causarem perdas significativas ainda na fase de produção da fruta (Neves et al., 2010). As doenças e pragas causam alterações externas ou internas no fruto levando não somente à queda prematura, mas também à redução da qualidade do fruto e/ou suco, como demonstrado para a morte súbita dos citros (MSC), a clorose variegada dos citros (CVC) e o huanglongbing (HLB), as quais afetam de forma direta as características qualitativas de frutas e do suco de laranja (Bassanezi et al., 2007; Laranjeira et al., 1999; Baldwin et al., 2010).

A morte súbita dos citros causa redução de diâmetro, peso e alteração de sólidos solúveis totais (SST) do fruto (Bassanezi et al., 2007). Estudos demonstraram que a CVC provoca aumento da acidez no suco e quantidade de SST, redução do *ratio*, SST/fruto, volume de suco, relação sulco/polpa, peso e diâmetro do fruto (Menegucci et al., 1995; Laranjeira et al., 1999). As alterações na qualidade do suco de laranja são ainda mais evidentes em frutos provenientes de plantas sintomáticas afetadas pelo HLB (Bassanezi et al., 2017; Bassanezi et al., 2009; Baldwin et al., 2010; Dagulo et al., 2010; Plotto et al., 2010). Frutos de ramos com sintomas de HLB possuem peso e tamanho reduzidos, quando comparados com frutos de plantas sadias ou de ramos assintomáticos. Estes frutos possuem redução na porcentagem de suco, na concentração de SST e aumento da quantidade de óleo no suco. As características organolépticas também são alteradas. O suco de frutos sintomáticos é mais amargo e azedo devido ao aumento de compostos como o limonin e o aumento da acidez, respectivamente. Por outro lado, doenças como a leprose dos citros (*Citrus leprosis virus*) e a pinta preta dos citros (*Phyllosticta citricarpa*) são conhecidas por causarem somente danos externos aos frutos, comprometendo seu valor no mercado *in natura* e prejudicando a comercialização para regiões ou países onde a doença é considerada quarentenária (Bassanezi et al., 2017).

O cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*), da mesma forma que as doenças citadas anteriormente, também causa dano externo ao fruto, levando a depreciação para o comércio *in natura*, devido a presença de lesões na casca. A doença também pode levar à queda prematura de frutos, resultando na redução da produção e, conseqüentemente, no aumento dos custos de produção. Além destes danos, quando em estágios severos, a doença provoca desfolha de plantas jovens, levando ao retardamento em seu desenvolvimento e produção. Em algumas situações, o cancro cítrico pode limitar a escolha de variedades ou espécies de citros muito suscetíveis em regiões onde a doença está estabelecida (Behlau & Belasque, 2014; Porto, 2006). O período de maior favorabilidade ao cancro cítrico ocorre nas condições do Sudeste brasileiro, nas estações de primavera e verão, quando a maior

intensidade de chuva combinada por temperaturas altas e fortes rajadas de vento auxiliam na disseminação da doença e infecção pela bactéria (Amorim & Bergamin Filho, 2001; Gottwald, 2002). A infecção por *Xcc* nos frutos ocorre entre 90 e 120 dias após a queda das pétalas, ou até que estes atinjam diâmetro de cerca de 50 mm (Graham et al., 2011; Behlau & Belasque, 2014; Lanza et al., 2018).

No Brasil, durante 60 anos a estratégia de controle da doença foi baseada na exclusão, com a erradicação de plantas doentes ou com suspeitas de contaminação. A partir de setembro de 2016 a Instrução Normativa IN 37 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), revogada para a IN 21 de abril de 2018, passou a regulamentar o controle do cancro cítrico e estabelecer o status de controle da doença no território brasileiro como: i) área sem ocorrência; ii) área livre de praga; iii) área sob Sistema de Mitigação de Risco (SMR) e; iv) área sob erradicação (Brasil, 2018). No Estado de São Paulo a Resolução SAA de 20/02/2017 define e oficializa o controle do cancro cítrico pelo SMR (São Paulo, 2017), que designa o emprego de medidas de manejo que contribuam com a prevenção da chegada da doença ou com a manutenção de níveis baixos de incidência nos pomares. Atualmente, com essa mudança na legislação, a incidência de pomares com ocorrência da doença está em expansão no estado. No último levantamento realizado pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) a incidência de plantas afetadas apresentou aumento de 35% em relação ao levantamento realizado em 2017, com um total de 11,7% de plantas sintomáticas no cinturão citrícola paulista. Adicionalmente, o levantamento do impacto da doença na queda prematura de frutos apontou 0,31 pontos percentuais de um total de 17,31% de queda de frutos, o que corresponde a 1,5 milhões de caixas de 40,8 kg de laranja perdidas devido ao cancro cítrico (Fundo de Defesa da Citricultura, 2017).

O controle do cancro cítrico segundo o SMR depende de medidas integradas de manejo, como a aplicação preventiva de bactericidas a base de cobre em intervalo de 21 dias durante a fase de suscetibilidade dos frutos (Graham et al., 2011; Behlau et al., 2017; Behlau et al., 2010), o plantio de mudas sadias e de variedades mais resistentes ou menos suscetíveis, o uso de quebra-ventos e o controle do minador-do-citros (*Phyllocnistis citrella*) (Behlau & Belasque, 2014).

Frutos infectados apresentam desenvolvimento de lesões de aspecto pardo (Figura 1 a), salientes e em algumas vezes com halo amarelo circundando a lesão. Em lesões mais severas, podem aparecer crostas salientes, com anéis concêntricos e fissuras (Figura 1 b), por onde a bactéria é exsudada (Rossetti, 2001). As lesões de cancro em frutos estão restritas ao flavedo e albedo (Figura 1 c), e, portanto, não afetam diretamente a polpa. No entanto, a

ocorrência de grandes áreas necrosadas e rachaduras no centro da lesão, o que ocasionalmente facilita a entrada de organismos saprofitos (Figura 1 d), podem levar à deterioração da parte interna do fruto e, teoricamente, à redução da qualidade do suco.

Estudos na literatura dedicados à investigação detalhada da associação do cancro cítrico com alterações nas características do fruto e propriedades do suco são escassos ou não focaram na comparação das qualidades do suco de frutos sadios e afetados pela doença. Graham & Leite Junior (2004) investigaram a qualidade do suco de laranja de plantas submetidas a diferentes medidas de controle da doença, como indutores de resistência e pulverizações com cobre, porém não reportaram a influência do cancro cítrico na qualidade do suco. Além da inexistência de informações consistentes sobre esse tema, as recentes mudanças na estratégia de controle da doença nos pomares de São Paulo, as quais resultaram em um aumento na incidência da doença, reforçam a preocupação com o impacto desta, não somente na produtividade, mas também na qualidade da produção. Assim, o presente trabalho objetivou estudar de forma detalhada a influência do cancro cítrico sobre as características do fruto e, sobre as características de qualidade do suco de laranja, através de parâmetros físico-químicos e de incidência de *mold*.

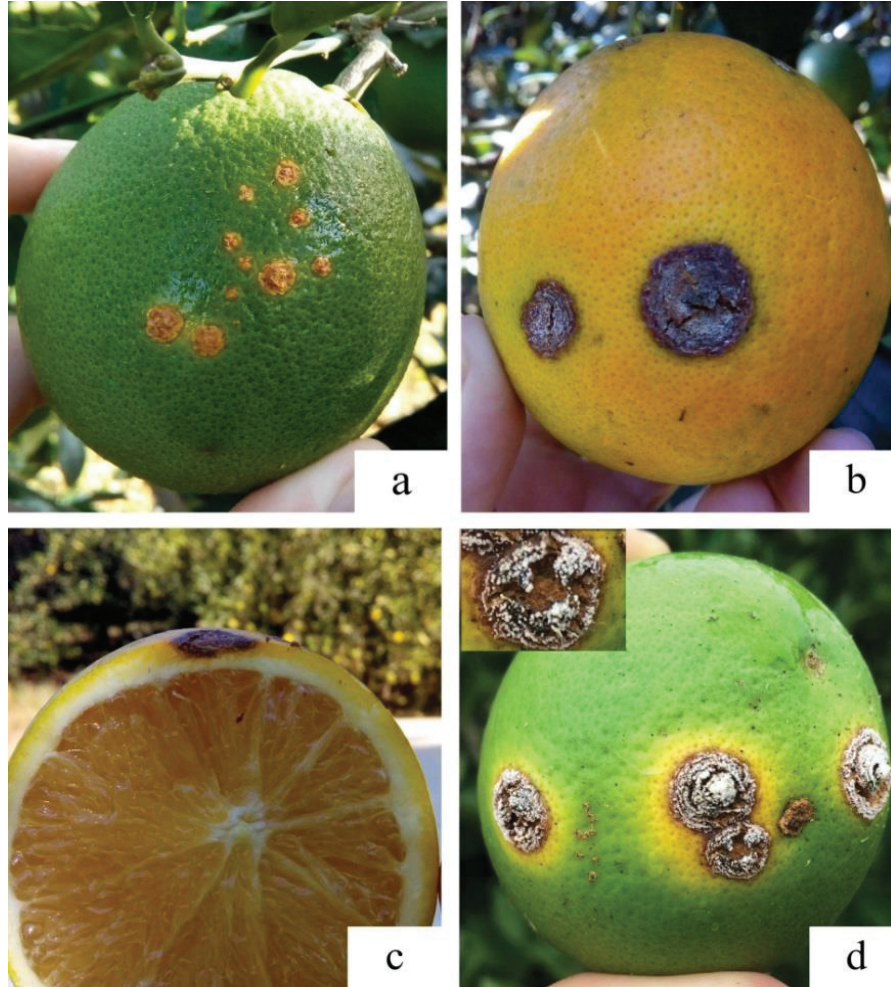


Figura 1. Lesões de cancro cítrico em frutos de laranja. Lesões iniciais em fruto jovem (a), lesões totalmente desenvolvidas em fruto maduro com presença de rachaduras (b), detalhe da lesão atingindo flavedo e albedo (c) e lesões colonizadas por fungos saprofíticos (área branco-acinzentada sobre as lesões de cancro cítrico) (d).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Descrição dos tratamentos

A influência do cancro cítrico sob os diferentes parâmetros de qualidade do fruto e do suco de laranja (*Citrus sinensis*) foi avaliada utilizando-se três amostras de frutos provenientes de três talhões de cada uma das três principais variedades comerciais de laranja doce cultivadas no estado de São Paulo (Tabela 1): Hamlin (maturação precoce), Pera (maturação intermediária), e Valência (maturação tardia).

Os tratamentos estudados no presente trabalho foram (i) frutos sem cancro cítrico coletados da planta; (ii) frutos sem cancro cítrico coletados do solo sob a copa das plantas após sete dias de queda provocada manualmente; (iii) frutos com lesões de cancro cítrico coletados da planta; e (iv) frutos com lesões de cancro cítrico coletados do solo sob a copa das plantas, após sete dias de queda provocada. Para a quantificação de *mold* foi avaliado um tratamento adicional composto por (v) frutos com lesões de cancro cítrico caídos há mais de sete dias. Para esse tratamento, não foram utilizados frutos em decomposição ou impróprios para o processamento. O tamanho das amostras foi determinado em função do volume de suco necessário para realização das análises e da operacionalização de extração. Deste modo, foram utilizadas três amostras de 8 kg de frutos para cada tratamento em cada um dos talhões selecionados (Figura 2 a, b). Para a coleta de frutos com cancro cítrico foi considerada a presença de pelo menos uma lesão grande (> 5 mm).

Os frutos com e sem cancro cítrico dos tratamentos de queda provocada manualmente, foram coletados em cerca de dez plantas aleatoriamente distribuídas no talhão. Em seguida, os frutos foram marcados (Figura 2 c) e depositados na serapilheira sob a área de projeção da copa (Figura 2 d), onde permaneceram por sete dias. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos transparentes, transportadas e armazenadas *overnight* em câmara fria (16 °C) do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), Araraquara, SP, até serem enviadas à planta piloto, da empresa JBT FoodTech[®] localizada no mesmo município, a qual dispõe de equipamentos semi-indústrias que simulam com precisão as condições reais de extração de suco da indústria.

Adicionalmente, em um dos talhões de 'Hamlin', amostras dos tratamentos (iii) e (iv) foram coletadas em dobro com objetivo de avaliar a importância da lavagem de frutos (prática rotineira realizada na indústria) sobre a quantidade de *mold* no suco.



Figura 2. Coleta das amostras de frutos com e sem cancro cítrico no pomar. Amostra de 8 kg de frutos com cancro cítrico (a, b); simulação da queda para o tratamento de frutos coletados do solo sob a copa das plantas da (c, d).

Tabela 1. Descrição dos talhões e variáveis climáticas registradas antes e depois da queda simulada de frutos com e sem cancro cítrico.

Nº talhão	Variedade	Ano de plantio	Município/Região	Data de coleta	7 dias antes da queda simulada ^a			7 dias após a queda simulada				
					Temp. Mín. (°C)	Temp. Máx. (°C)	Temp. Média (°C)	Precipitação (mm)	Temp. Mín. (°C)	Temp. Máx. (°C)	Temp. Média (°C)	Precipitação (mm)
1	Hamlin	2014	Santa Adélia/Norte	mai/18	15,8	27,7	21,7	25,7	9,3	26,2	17,7	0,0
2	Hamlin	2007	Guaimbê/Centro	mai/18	12,5	26,4	19,5	0,0	15,2	27,0	21,1	0,0
3	Hamlin	2007	Bebedouro/Norte	jun/18	16,1	28,7	22,4	0,0	15,3	28,4	21,9	2,3
1	Pera	2007	Itápolis/Centro	ago/17	13,6	32,7	23,2	0,0	16,4	23,9	20,1	37,0
2	Pera	2012	José Bonifácio/Noroeste	ago/17	17,7	31,2	24,4	0,0	17,2	27,6	22,4	27,3
3	Pera	2011	Estrela do Oeste/Noroeste	ago/17	17,7	24,5	21,1	32,6	16,4	28,8	22,6	7,1
1	Valência	2011	José Bonifácio/Noroeste	out/17	19,1	34,5	26,8	0,0	17,5	30,4	23,9	97,4
2	Valência	2013	Itápolis/Centro	out/17	19,2	33,0	26,1	6,6	18,3	30,5	24,4	40,1
3	Valência	2013	Itápolis/Centro	out/17	19,2	33,0	26,1	6,6	18,3	30,5	24,4	40,1

^aDados climáticos referentes à temperatura média e precipitação acumulada nos sete dias que antecederam a queda provocada e nos 7 dias subsequentes que antecederam a coleta de frutos da planta ou do chão.

Dados fornecidos pela SOMAR Meteorologia (Para locais onde não havia estação, os dados meteorológicos foram coletados da estação mais próxima: Onda Verde para José Bonifácio; Itápolis para Santa Adélia e, Guarantã para Guaimbê).

2.2. Caracterização do fruto

A influência do cancro cítrico sobre o tamanho, peso e teor de óleo, foi avaliada em frutos de laranja das variedades Pera e Valência (Figura 3 a). O tamanho foi determinado pela média do comprimento (medida longitudinal) e diâmetro de cada fruto (medida transversal). Para medição dos frutos foi utilizado paquímetro analógico Stainless Hardned de 150 mm (Mitutoyo, Brasil) (Figura 3 b). O teor de óleo disponível na fruta (kg/t) foi obtido pelo ‘método de Scott’ (Aoac, 1990). O tamanho e peso foram mensurados em quatro frutos de cada uma das três amostras, cuja média representou uma repetição do tratamento. Para determinação do óleo disponível foram utilizados dois frutos por amostra.



Figura 3. Amostras de frutos utilizadas no estudo. Recebimento das amostras individualizadas na JBT FoodTech[®] (a), e medição do tamanho dos frutos com paquímetro (b).

2.3. Caracterização do suco

2.3.1. Processamento dos frutos

Frutos não lavados das três variedades estudadas foram processados em extratora JBT modelo 391, em configuração 2H2L, padrão típico para obtenção de sucos NFC (Figura 4 c, d), utilizando copo extrator de três polegadas com base no diâmetro médio do fruto. Para o ensaio de lavagem, antes do processamento, as amostras adicionais de frutos de ‘Hamlin’ foram lavadas com água de torneira, em equipamento semi-industrial de lavagem de frutos cítricos, durante três minutos (Figura 4 a, b).

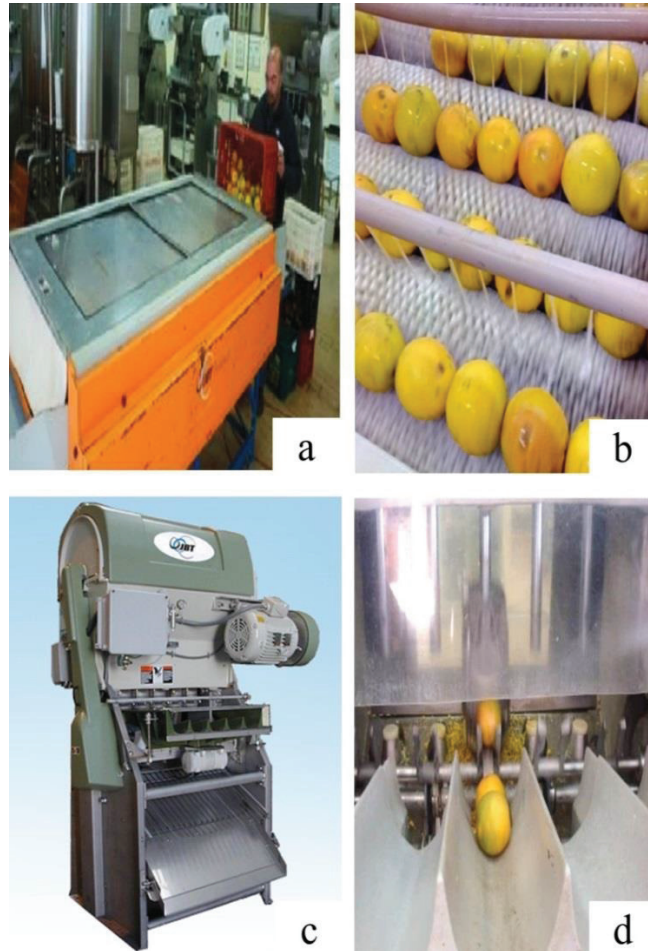


Figura 4. Lavagem e extração dos frutos. Equipamento industrial de lavagem de frutos cítricos (*citrus brusher washer*) utilizado neste estudo (a, b), e extratora de suco de laranja, JBT modelo 391(c, d).

2.3.2. Parâmetros avaliados

O suco obtido das amostras foi caracterizado quanto ao rendimento industrial, aos teores dos componentes químicos e, a quantidade de *mold*. O rendimento de suco foi verificado para as variedades Pera e Valência assim como, as características físico-químicas do suco. A quantificação de *mold* foi realizada para o suco das três variedades citadas.

2.3.3. Balanço de massa

O balanço de massa foi analisado para avaliar o rendimento industrial do lote de frutas. Para sua determinação, foram extraídas as frações de casca (Frit), bagaço e suco de cada amostra, as quais foram separadas em diferentes compartimentos do equipamento extrator. O processo de filtração foi realizado de forma manual em peneira de uso doméstico, uma vez que devido ao pequeno volume amostral de suco não foi possível realizar o processo de filtração em *finisher* (UCF35 Finisher, JBT Food Tech, SP, Brasil), equipamento utilizado na indústria para separar o suco da polpa. (Figura 5 a, b).



Figura 5. Obtenção do suco de laranja no balanço de massa. Obtenção de suco (a), filtragem manual do suco extraído (b) para separar o suco da polpa, simulando o processo de *finisher*.

2.3.4. Análise físico-química

Para simular o processo de pasteurização do suco de laranja utilizado nas indústrias, o suco extraído foi submetido ao tratamento térmico em forno micro-ondas a 90°C por três minutos (Ribas e Flores, 2000). Posteriormente, as amostras de suco foram envasadas em recipientes plásticos de 500 mL e mantidas em freezer (-17 °C) por cerca de 10 dias, até serem analisadas quanto às características físico-químicas, seguindo metodologias descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Análises e metodologias utilizadas para a caracterização físico-química do suco de laranja ‘Pera’ e ‘Valencia’ de amostras de frutos com e sem cancro cítrico, coletados da planta e do chão.

Análise	Objetivo	Metodologia empregada	Referencia
STT (°Brix)	Quantificação de sólidos solúveis totais	Refratômetro de mesa	(JBT,2018)
Acidez	Quantificação da acidez titulável	Via titulométrica (total)	(JBT,2018)
<i>Ratio</i>	Determinação do índice de maturidade da fruta	Razão SST/acidez	(JBT,2018)
% Óleo no Suco	Determinação do conteúdo de D-Limoneno no suco	Método Scott	(AOAC, 1990)
Limonóides	Quantificação de limonin	HPLC-DAD modificado	(Abbasi et al., 2005)
Hesperidina	Quantificação de hesperidina	HPLC-DAD	(IFFJP, 1991)
Aminoácidos primários	Verificação do índice de formoldeído	Via titulométrica (total)	(IFFJP, 1984)
Aminoácidos secundários	Quantificação de prolina	Via colorimétrica (UV-VIS)	(IFFJP, 1983)
Pectina	Quantificação de pectina solúvel em água	Via extração e colorimétrica com carbazol (meio sulfúrico)	(IFFJP, 2005)

2.3.5. Quantificação de *mold*

A quantificação de *mold* foi realizada segundo metodologia proposta pelo USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) com modificações (USDA, 2013). As amostras de suco de 250 mL utilizadas nas análises de *mold* foram mantidas apenas sob refrigeração.

A análise de *mold* para as amostras de suco foi realizada em duas etapas: (i) preparo da amostra e (ii) leitura em câmara de Howard composta por 25 campos de leitura. Para o preparo da amostra, o suco puro de cada repetição foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm em tubo cônico tipo Falcon de 50 mL. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o volume completado com água destilada até 15 mL. A amostra foi novamente homogeneizada e em seguida acondicionada na câmara de Howard (Figura 6 a).

Posteriormente, a câmara de Howard contendo a amostra de suco (Figura 6 b e c), foi posicionada em microscópio óptico com aumento nominal de 100x e o foco ajustado de acordo com a linha de calibração presente na lamínula. A contagem dos fragmentos de hifas foi realizada em duplicata, totalizando 50 leituras (campos). Foram considerados positivos os campos com a presença de pelo menos um fragmento de hifa maior que 1/6 (maior que 0,23 mm) do diâmetro do campo de leitura (Figura 7), ou três fragmentos de hifa que juntos apresentavam a soma do comprimento equivalente a 1/6 do diâmetro do campo de leitura. Campos de leitura sem fragmentos ou com fragmentos cuja soma do comprimento não ultrapasse 1/6 do diâmetro do campo de leitura foram considerados negativos. A proporção (apresentada em porcentagem) de *mold* na amostra foi determinada pela razão entre o total de campos positivos e o total de campos examinados.

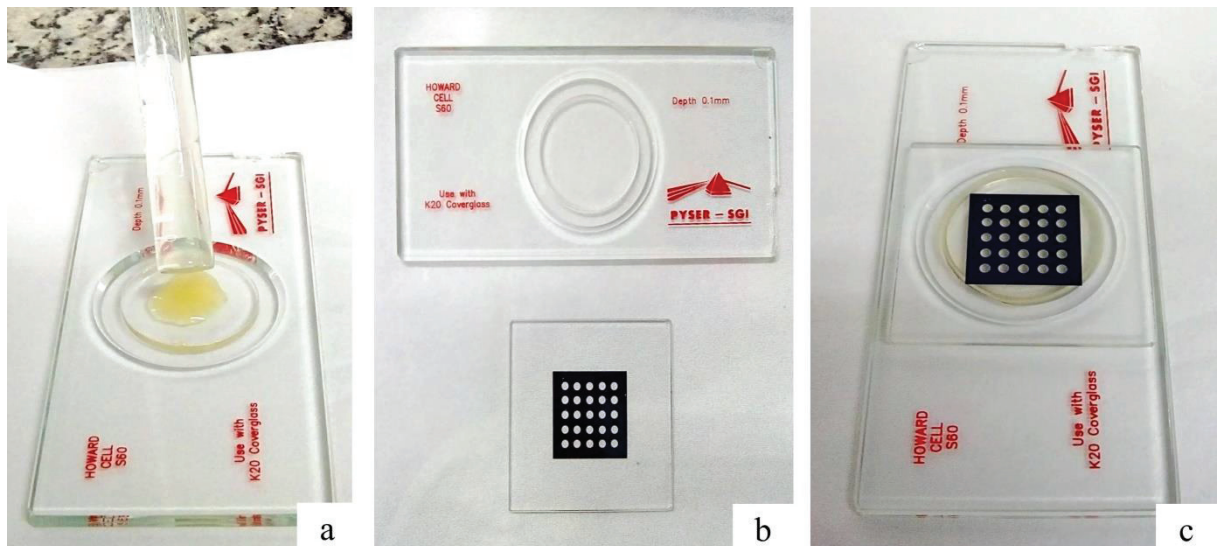


Figura 6. Câmara de Howard para contagem de filamentos de fungos no suco. Câmara com amostra de suco (a); detalhe da lamínula contendo 25 campos de leitura (b) e; amostra pronta para leitura (c).

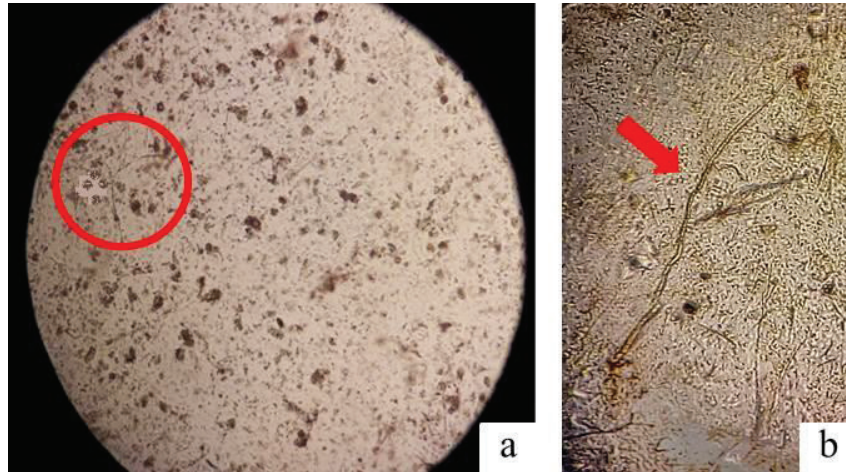


Figura 7. Observação de *mold* em microscópio óptico (aumento nominal de 100x). Campo positivo para *mold* (circulado em vermelho) (a) e, detalhe de fragmento de hifa (indicado por seta vermelha) maior que 1/6 do diâmetro do campo (b).

2.4. Análise dos dados

Os dados das características relacionadas ao fruto e a qualidade físico-química do suco, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em esquema fatorial 2x2 (frutos com e sem sintomas e, frutos coletados da planta e do chão) em blocos casualizados com três repetições, sendo cada talhão considerado como um bloco. O valor médio do tratamento para cada bloco foi resultante da média das três amostras, obtidas de cada um dos três talhões avaliados. Em caso de diferença significativa ($p < 0,05$), as médias foram submetidas ao teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os dados de contagem de *mold* no suco foram analisados da mesma forma, porém, em delineamento inteiramente ao acaso com três repetições (amostras de 8 kg de frutos) por talhão e com tratamento adicional, representado por frutos com lesões de cancro cítrico coletados do chão após queda natural ocorrida há mais de uma semana. Em caso de diferença significativa ($p < 0,05$), as médias foram submetidas ao teste Tukey a 5% de probabilidade.

Para o ensaio adicional da influência da lavagem de frutos sobre a contagem de *mold*, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em esquema fatorial 2x2 (frutos com cancro coletados da planta e do chão e, lavados e não lavados) em delineamento inteiramente ao acaso, com três repetições (amostras de 8 kg de frutos). Em caso de diferença significativa ($p < 0,05$), as médias foram submetidas ao teste Tukey a 5% de probabilidade. Todas as análises foram processadas no software R, utilizando o pacote de análises “ExpDes” (www.r-project.org).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização do fruto

Os frutos de laranja ‘Pera’ não apresentaram diferença significativa quanto ao tamanho, independentemente da presença de cancro cítrico e da origem do fruto (coletados da planta ou do chão). Para essa variedade o diâmetro dos frutos variou de 71 a 76 mm (Figura 8A). Entretanto, para a variedade Valência, frutos com lesão de cancro cítrico coletados do chão (68 mm) apresentaram diâmetro significativamente menor que os frutos coletados da planta (72 mm) ou que os frutos coletados sem lesão do chão (71 mm) (Figura 8D).

Não foram observadas diferenças significativas para ambas as variedades quanto ao peso dos frutos, que variou de 158 a 217 g para ‘Pera’ e de 163 a 221 g para ‘Valência’ (Figura 8B, E). Da mesma forma, a presença de lesões de cancro cítrico não alterou o teor de óleo no fruto em ambas as variedades estudadas. No entanto, em ‘Pera’, frutos coletados do chão apresentaram teor de óleo significativamente superior (8,1 kg/t) que frutos coletados da planta (7,8 kg/t) (Figura 8C). Em ‘Valência’ não foi observada diferença significativa quando avaliado o teor de óleo nos frutos, que foi de 9,9 kg/t para frutos coletados da planta e 10,5 kg/t para frutos coletados do chão (Figura 8F).

3.2. Caracterização do suco

3.2.1 Rendimento de suco

A presença de lesões de cancro não alterou o rendimento final de suco. A percentagem de rendimento para a variedade ‘Pera’ variou de 56 a 68%, e não foi observada diferença significativa para os fatores avaliados. Por outro lado, em ‘Valência’ o rendimento de suco foi maior para os frutos coletados do chão (58,5%), do que aqueles coletados da planta (55,7%) (Figura 9).

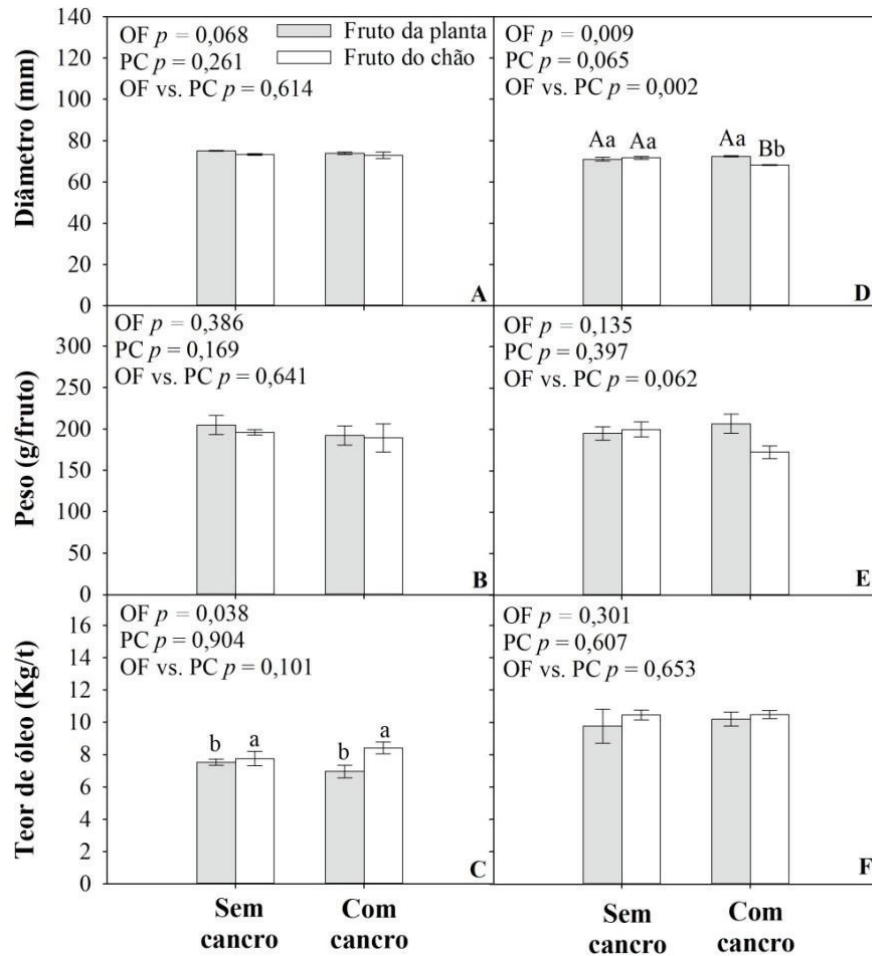


Figura 8. Diâmetro, peso e teor de óleo de frutos de laranja ‘Pera’ (A-C) e ‘Valência’ (D-F) com e sem sintomas de cancro cítrico coletados da planta ou do chão. OF, origem do fruto; PC, presença de lesões de cancro cítrico no fruto. Colunas de mesma cor seguidas de mesma letra maiúscula e colunas de cores diferentes seguidas de mesma letra minúscula, para frutos sem ou com cancro, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. A ausência de letras maiúsculas e/ou minúsculas indica a inexistência de diferença estatística. A significância do teste *F* da análise de variância para os fatores (OF e PC) e interação (OF vs. PC) está representada pelo *p*-valor. Barras indicam o erro padrão da média de três talhões (blocos) distintos.

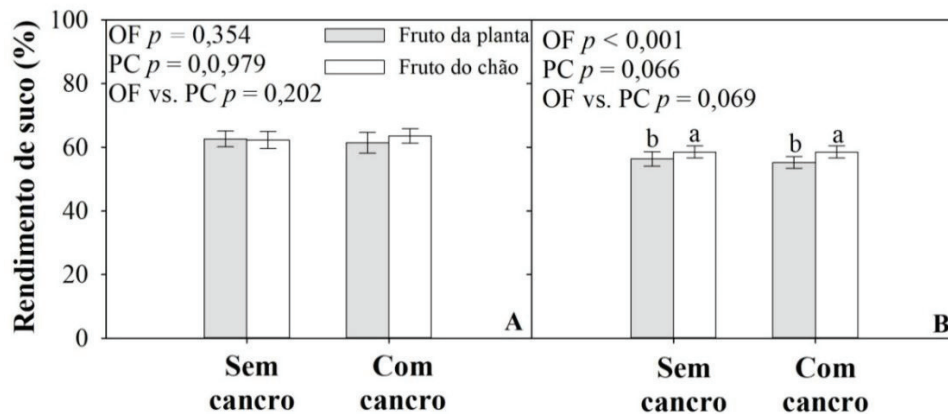


Figura 9. Rendimento de suco de laranja ‘Pera’ (A) e ‘Valência’ (B) com e sem sintomas de cancro cítrico coletados da planta ou do chão. OF, origem do fruto; PC, presença de lesões de cancro cítrico no fruto. Colunas de mesma cor seguidas de mesma letra maiúscula e colunas de cores diferentes seguidas de mesma letra minúscula, para frutos sem ou com cancro, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. A ausência de letras maiúsculas e/ou minúsculas indica a inexistência de diferença estatística. A significância do teste F da análise de variância para os fatores (OF e PC) e interação (OF vs. PC) está representada pelo p-valor. Barras indicam o erro padrão da média de três talhões (blocos) distintos.

3.2.2 Análise físico-química

O cancro cítrico não afetou significativamente a quantidade de SST no suco de frutos das variedades Pera e Valência, as quais apresentaram valores médios de 9,5 e 10,5 °Brix, respectivamente (Figura 10A, D).

O suco proveniente de frutos com cancro da variedade Pera apresentou acidez titulável significativamente superior (0,69 %) em relação a frutos sem sintomas da doença (0,62 %), independentemente da origem (Figura 10B). Consequentemente, o *ratio* do suco representado pela relação SST/acidez, foi significativamente menor em frutos com lesões de cancro (13,8) em relação aos assintomáticos (14,9) (Figura 10C). Para a acidez do suco obtido de frutos de ‘Valência’, que variou de 0,51 a 0,54 %, não foi observada diferença significativa para nenhum dos fatores avaliados (Figura 10E). O mesmo foi observado para o *ratio*, que variou de 16 a 24 (Figura 10F).

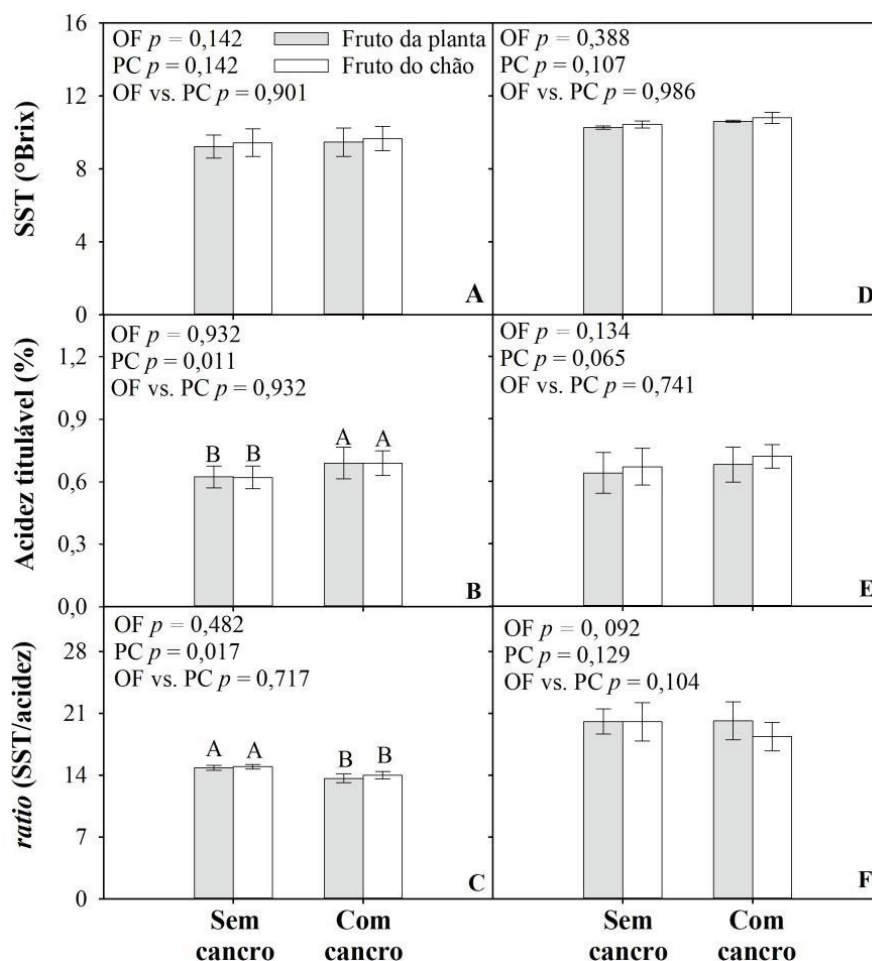


Figura 10. Sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável e *ratio* (SST/acidez) do suco proveniente de frutos de laranja ‘Pera’ (A-C) e ‘Valência’ (D-F) com e sem sintomas de cancro cítrico coletados da planta ou do chão. OF, origem do fruto; PC, presença de lesões de cancro cítrico no fruto. Colunas de mesma cor seguidas de mesma letra maiúscula e colunas de cores diferentes seguidas de mesma letra minúscula, para frutos sem ou com cancro, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. A ausência de letras maiúsculas e/ou minúsculas indica a inexistência de diferença estatística. A significância do teste *F* da análise de variância para os fatores (OF e PC) e interação (OF vs. PC) está representada pelo *p*-valor. Barras indicam o erro padrão da média de três talhões (blocos) distintos.

A percentagem de óleo presente no suco da laranja ‘Pera’ variou de 0,018 a 0,027 e não apresentou diferença significativa, independentemente do fator avaliado (Figura 11A). No entanto, em suco de ‘Valência’ resultante de frutos coletados da planta, a concentração de óleo foi significativamente superior (0,031%) que no suco obtido a partir de frutos coletados do chão (0,027%), independentemente se apresentavam sintomas ou não (Figura 11C).

O suco de frutos com cancro cítrico da variedade Pera apresentou quantidade significativamente menor de pectina solúvel em água (206 mg de ácido galacturônico por litro de suco - AGA/L) do que o suco de frutos sem lesões de cancro (233 mg AGA/L) (Figura 11B). O mesmo resultado foi observado para o suco de frutos com e sem sintomas coletados

da planta, os quais apresentaram menor concentração de pectina (203 e 210 mg AGA/L, respectivamente) quando comparado ao suco de frutos coletados do chão (215 e 250 mg AGA/L, respectivamente). Todavia, o suco de laranjas ‘Valência’ não apresentou alteração significativa na quantidade de pectina, independentemente dos fatores analisados. Para essa variedade, a concentração de pectina solúvel em água variou de 170,7 a 254,7 mg AGA/L (Figura 11D).

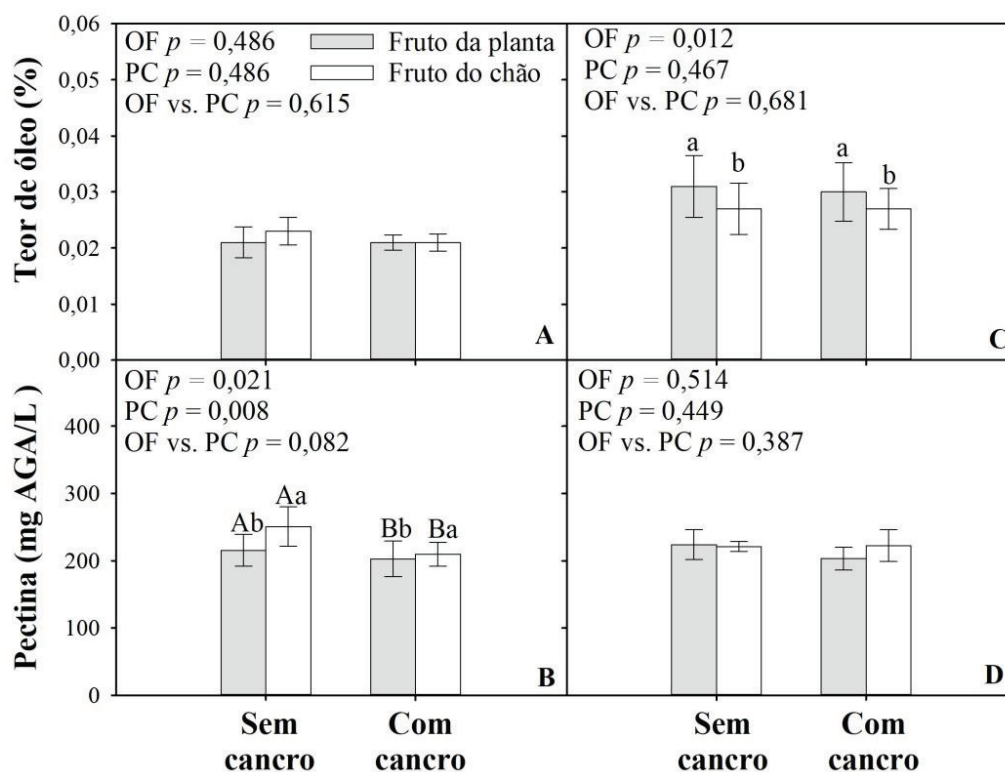


Figura 11. Concentração de óleo (v/v) e de pectina solúvel em água no suco de laranja ‘Pera’ (A, B) e ‘Valência’ (C, D) proveniente de frutos com e sem sintomas de cancro cítrico coletados da planta ou do chão. OF, origem do fruto; PC, presença de lesões de cancro cítrico no fruto. Teor de pectina determinado em suco ajustado a 11,2° Brix. AGA/L, teor de pectina mensurado pela quantidade de ácido galacturônico por mililitro de suco. Colunas de mesma cor seguidas de mesma letra maiúscula e colunas de cores diferentes seguidas de mesma letra minúscula, para frutos sem ou com cancro, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. A ausência de letras maiúsculas e/ou minúsculas indica a inexistência de diferença estatística. A significância do teste *F* da análise de variância para os fatores (OF e PC) e interação (OF vs. PC) está representada pelo *p*-valor. Barras indicam o erro padrão da média de três talhões (blocos) distintos.

O teor de limonin presente no suco de laranja ‘Pera’ resultante de frutos com lesões de cancro coletados da planta foi significativamente superior (1,1 mg/L) aos teores existentes no suco de frutos com cancro coletados do chão (0,67 mg/L) e de frutos sem lesões de cancro coletados da planta (0,74 mg/L) (Figura 12A). Não foi observada, para nenhum dos fatores analisados, diferença significativa nos teores de limonin do suco de frutos da variedade

Valência, os quais variaram de 0,18 a 0,67 mg/L (Figura 12C). Do mesmo modo, o teor de hesperidina não variou significativamente em função do cancro cítrico para ambas as variedades. Em suco de ‘Pera’ a concentração de hesperidina detectada variou de 280 a 394mg/L e o valor médio foi 45% maior que a média de ‘Valência’, a qual variou de 154 a 334 mg/L (Figura 12B, D).

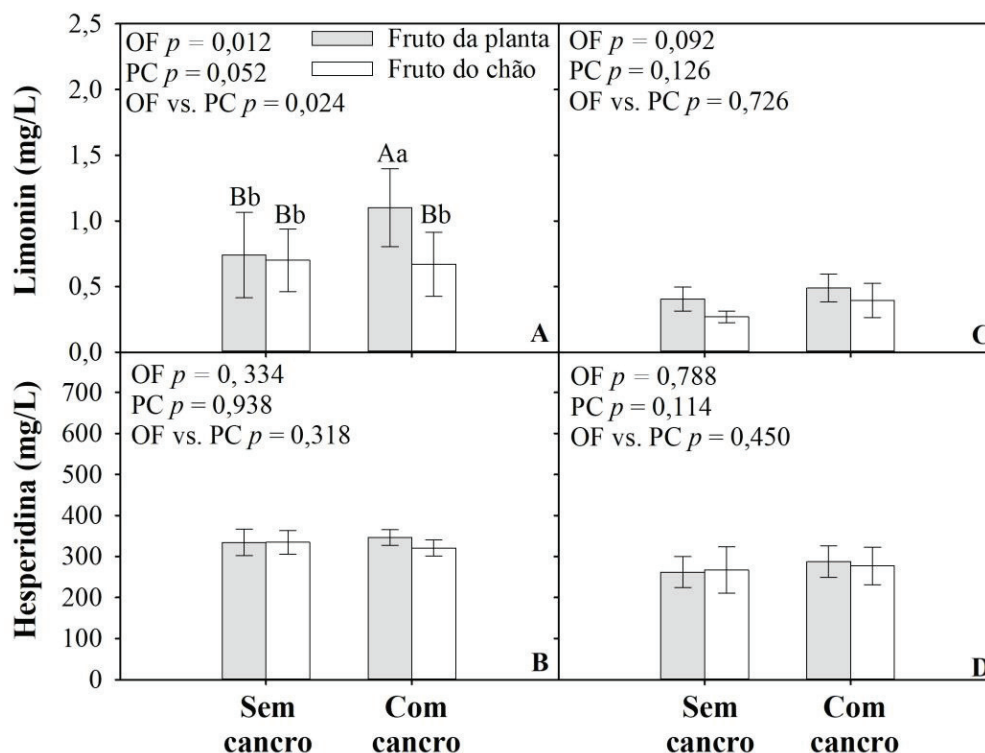


Figura 12. Teor de limonin e hesperidina no suco de laranja ‘Pera’ (A, B) e ‘Valência’ (C, D) proveniente de frutos com e sem sintomas de cancro cítrico coletados da planta ou do chão. OF, origem do fruto; PC, presença de lesões de cancro cítrico no fruto. Teores de limonin e hesperidina determinados em suco ajustado a 11,2° Brix. Colunas de mesma cor seguidas de mesma letra maiúscula e colunas de cores diferentes seguidas de mesma letra minúscula, para frutos sem ou com cancro, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. A ausência de letras maiúsculas e/ou minúsculas indica a inexistência de diferença estatística. A significância do teste *F* da análise de variância para os fatores (OF e PC) e interação (OF vs. PC) está representada pelo *p*-valor. Barras indicam o erro padrão da média de três talhões (blocos) distintos.

Para ambas as variedades, a quantidade de prolina no suco (indicador da presença de aminoácidos secundários) foi significativamente superior em frutos com lesões de cancro cítrico, tanto para aqueles coletados da planta (1065 e 985 mg/L para as variedades Pera e Valência, respectivamente) quanto do chão (1080 e 992 mg/L para as variedades Pera e Valência, respectivamente) (Figura 13A,C).

A presença de lesões de cancro cítrico em frutos de laranja ‘Pera’ também resultou em um aumento significativo no índice de formoldeído (*index formol* - utilizado para estimar o conteúdo de aminoácidos totais no suco de laranja), tanto em frutos coletados da planta (28,7 NaOH/100 mL) quanto do chão (29,4 mL NaOH/100 mL) (Figura 13C). Para a variedade ‘Valência’, os frutos coletados do chão apresentaram maior índice de formoldeído no suco (28,2 mL NaOH/100 mL) quando comparado ao índice encontrado no suco de frutos coletados da planta (26,1 mL NaOH/100 mL), independentemente da presença de lesões de cancro (Figura 13D).

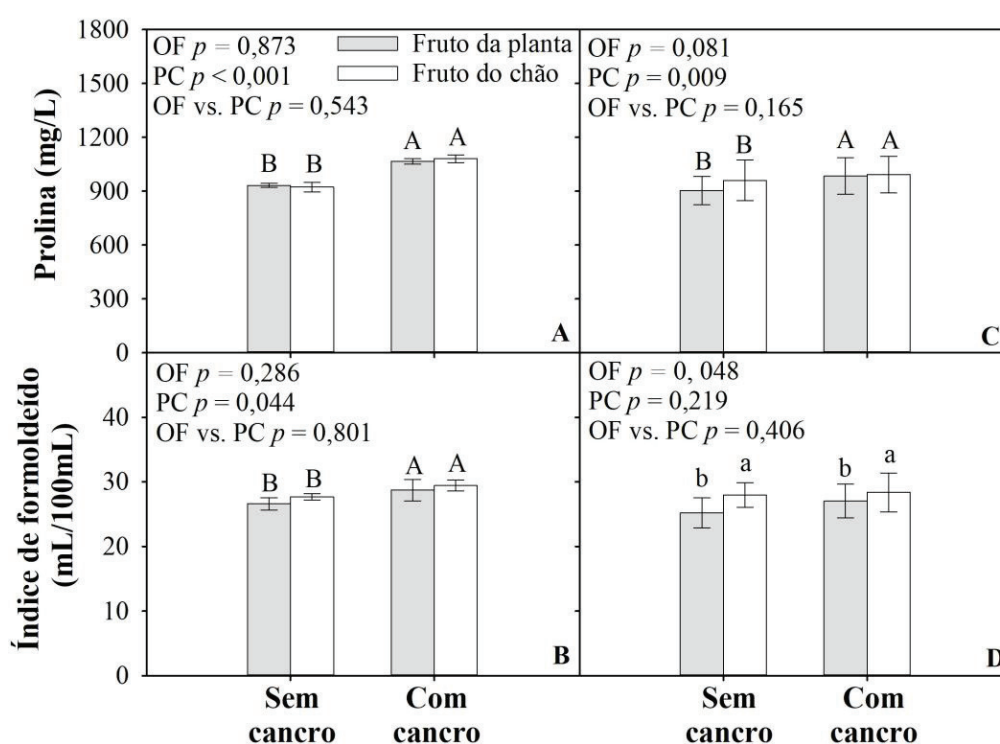


Figura 13. Índice de formoldeído (mL NaOH 0,1N/100 mL de suco) e teor de prolina (mg/L) no suco de laranja ‘Pera’ e ‘Valência’ proveniente de frutos com e sem sintomas de cancro cítrico coletados da planta ou do chão. OF, origem do fruto; PC, presença de lesões de cancro cítrico no fruto. Teores de prolina determinado em suco ajustado a 11,2° Brix. Colunas de mesma cor seguidas de mesma letra maiúscula e colunas de cores diferentes seguidas de mesma letra minúscula, para frutos sem ou com cancro, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. A ausência de letras maiúsculas e/ou minúsculas indica a inexistência de diferença estatística. A significância do teste *F* da análise de variância para os fatores (OF e PC) e interação (OF vs. PC) está representada pelo *p*-valor. Barras indicam o erro padrão da média de três talhões (blocos) distintos.

3.2.3 Quantificação de *mold*

Para todos os talhões avaliados, o percentual de *mold* no suco de frutos com cancro cítrico, caídos há mais de sete dias (tratamento adicional), foi superior à média dos demais

tratamentos. Para este tratamento, os frutos de laranja dos três talhões de ‘Hamlin’ resultaram nos maiores índices de *mold*. Para ‘Hamlin’, ‘Pera’ e ‘Valência’ o percentual de *mold* no suco de frutos do tratamento adicional variou de 70,7 a 78, 48 a 62,7 e 60 a 67,3, respectivamente (Figura 14).

De modo geral, apesar de observado algumas diferenças entre os talhões, a presença de lesões de cancro cítrico levou a aumentos significativos na percentagem de *mold* no suco de laranja, principalmente em suco de frutos coletados do chão. Para as três variedades estudadas, o suco de frutos com lesões de cancro que permaneceram no chão por até sete dias, apresentou aumento significativo de *mold* (de 67 a 93%) em relação ao suco de frutos com cancro coletados na planta, ou sem cancro, independentemente da origem do fruto (Figura 14B, C, F, H, I). Adicionalmente, em alguns talhões, o suco de frutos com lesões de cancro mesmo quando coletados da planta, apresentou aumento significativo na incidência de *mold* quando comparado ao suco de frutos sem lesões também coletados na planta (Figura 14C, D, G). Da mesma forma, em outros talhões, o suco de frutos sem lesões de cancro coletados do chão, também apresentou níveis significativamente mais elevados de *mold* que o suco de frutos sem lesão coletados da planta (Figura 14B, C, E, H).

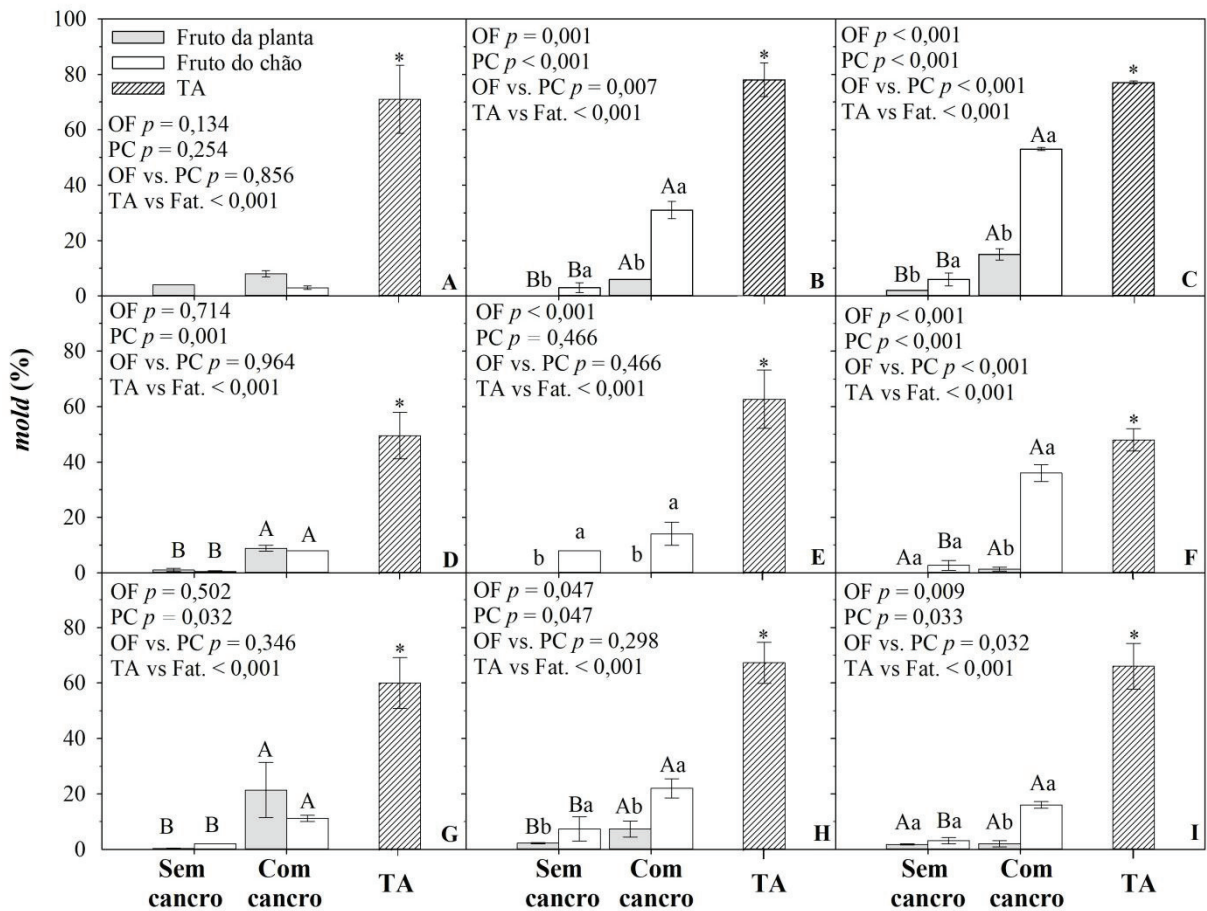


Figura 14. Percentagem de detecção de mold (fragmentos de hifas de fungos) em amostras de suco NFC (*not from concentrate*) de laranja ‘Hamlin’ (A-C), ‘Pera’ (D-F) e ‘Valência’ (G-I) provenientes de frutos com e sem sintomas de cancro cítrico coletados da planta ou do chão. OF, origem do fruto; PC, presença de lesões de cancro cítrico no fruto; TA, tratamento adicional composto por frutos com lesões de cancro cítrico caídos há mais de sete dias. Colunas de mesma cor seguidas de mesma letra maiúscula, e colunas de cores diferentes, para frutos sem ou com lesão de cancro cítrico, seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Colunas hachuradas seguidas de asterisco indicam diferença significativa entre TA e a média dos demais tratamentos (Fat.) pelo teste F a 5% de probabilidade. A ausência de letras maiúsculas e/ou minúsculas indica a inexistência de diferença estatística. A significância do teste F da análise de variância para os fatores (OF e PC) e interação (OF vs. PC) está representada pelo p-valor. Barras indicam o erro padrão da média de três amostras (repetição) por talhão. Em A, D, E, G e I os dados foram analisados após transformação em arco seno $\sqrt{x/100}$.

A lavagem de frutos com cancro cítrico antes da extração do suco contribuiu de forma significativa para redução de *mold*. O suco de frutos sintomáticos que não foram lavados apresentou *mold* de 53% para aqueles colhidos do chão e, de 15% para os colhidos da planta. No entanto, os frutos com cancro que foram lavados resultaram em 26 e 2% de *mold* no suco de frutos colhidos do chão e da planta, respectivamente. O suco de frutos lavados, coletados

tanto da planta, quanto do chão, resultaram em reduções de 87 e 51% de *mold* no suco (Figura 15).

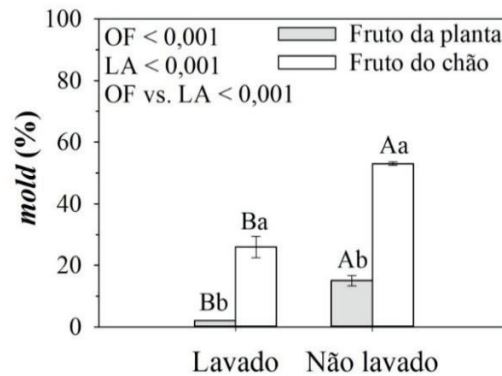


Figura 15. Percentagens médias de *mold* (fragmentos de hifas de fungos) detectadas em amostras de suco NFC (*not from concentrate*) de frutos de laranja ‘Hamlin’ com lesões de cancro cítrico coletados da planta e do chão submetidos ou não à lavagem antes da extração do suco. OF, origem do fruto; LA, processo de lavagem. Colunas de mesma cor seguidas de mesma letra maiúscula, e colunas de cores diferentes, para frutos coletados da planta e do chão, seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. A significância do teste *F* da análise de variância para os fatores (OF e LA) e interação (OF vs. LA) está representada pelo *p*-valor. Barras indicam o erro padrão da média obtida de três repetições (amostras) em um talhão.

4. DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do fruto

O estudo mostrou pela primeira vez que as características do fruto não são, ou são pouco afetadas pelo cancro cítrico. Para a variedade Valência foi observado que os frutos com lesões coletados do chão apresentaram redução significativa no diâmetro e uma tendência de redução no peso, quando comparados aos demais tratamentos. Provavelmente isto pode ser explicado pela desidratação natural que ocorre a partir do momento em que o mesmo se desprende da planta. Além disso, a maior desidratação observada nesta variedade provavelmente ocorreu devido às altas temperaturas na época de colheita dos frutos (Tabela 1). Frutos de ‘Pera’ coletados do chão, apresentaram maiores porcentagens de óleo provavelmente também devido à perda de água, que leva ao aumento da proporção de óleo no fruto. Portanto, apesar do cancro cítrico comprometer algumas vesículas de óleo na casca, a doença não interferiu de forma significativa na obtenção de óleo essencial do fruto.

4.2. Caracterização do suco

4.2.1. Rendimento de suco

O rendimento de suco não foi afetado pela doença, no entanto, para a variedade Valência o rendimento de suco de frutos coletados do chão foi maior. Este fato pode ser explicado, novamente, devido à desidratação da casca (pericarpo) e endocarpo, o que torna o fruto mais macio, aumentando a eficiência de extração do suco, e/ou, fazendo com que o peso destas partes seja reduzido, aumentando o rendimento (p/v).

4.2.2. Análises físico-químicas

A presença de lesões de cancro cítrico no fruto não alterou a quantidade de SST no suco de laranja. Para a variedade Pera, houve um aumento da acidez titulável, e conseqüentemente uma diminuição no *ratio* do suco obtido a partir de frutos com cancro. Todavia, não se pode afirmar com segurança que a doença influenciou a acidez do suco, uma vez que, diferença significativa nos valores desta variável foi observada apenas em uma das

duas variedades estudadas. Além disso, mesmo com a redução no *ratio*, o mesmo manteve-se dentro dos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) do MAPA, que estabelece como ideal, um *ratio* maior ou igual a sete para suco de laranja. Para os consumidores, sucos com *ratio* entre 14 e 16 são considerados os mais palatáveis. O *ratio* é utilizado nas indústrias para identificar o grau de maturação da fruta, sendo este um importante indicador para produção de sucos cítricos (Pozzan & Triboni, 2005; Kimball, 1991).

A presença de lesões de cancro cítrico nos frutos não afetou o teor de óleo essencial encontrado no suco de laranja NFC. No entanto, em suco de frutos de ‘Valência’ coletados da planta, foi detectado maior teor de óleo do que o suco daqueles frutos que foram coletados do chão. Contudo, os teores de óleo essencial no suco de laranja detectados pelo presente estudo nas diferentes amostras não excederam o limite de 0,035%, considerado apropriado para consumo (Brasil, 2016; Darros-Barbosa & Curtolo, 2005). Dependendo da variedade e do tipo de equipamento utilizado na extração o suco pode apresentar teores muito elevados de óleo essencial ($> 0,1\%$), o que leva a depreciação do aroma e sabor do produto. Por outro lado, em quantidades muito baixas, o óleo no suco não restaura as características naturais de aroma e sabor inerentes ao produto. Assim, em sucos naturais e concentrados, a determinação do teor de óleo essencial proveniente da casca da fruta se torna necessária, uma vez que esta variável está relacionada com os parâmetros de qualidade do suco de laranja. Na indústria, durante o processo de concentração, o suco perde por evaporação uma grande parte dos seus componentes voláteis, presentes no óleo, responsáveis por suas características organolépticas. Pelo contrário, a elevada pressão exercida na extração, sobre a fruta, apesar de proporcionar maior rendimento de extração, acarreta um maior arraste de compostos para o suco e, conseqüentemente, em maior quantidade de óleo, principalmente em frutos murchos, os quais são esmagados com maior facilidade. Desta forma, por meio da estimativa da proporção de óleo no suco, é possível determinar a necessidade de adição ou diluição dos componentes aromáticos voláteis (presentes no óleo) ao suco concentrado reconstituído ou NFC, melhorando assim sua palatabilidade. Contudo, a adição de óleo deve ser praticada atendendo a limites preestabelecidos (Machado, 2010; Almeida, 2013).

Apesar de ter sido detectado dentro dos limites especificados pelos mercados compradores (entre 200 e 500 mg de AGA/L em suco a 11,2 °Brix), o teor de pectina no suco da variedade Pera foi menor em função da presença de lesões de cancro cítrico no fruto. Essa redução pode ter ocorrido devido à ação de enzimas pectinolíticas como a poligalacturonato liase e a polimetilgalacturonato liase, produzidas durante a colonização do tecido por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ou enzimas pectinolíticas produzidas por outros

microrganismos, principalmente fungos saprofiticos que se desenvolvem nas lesões (Uenojo & Pastore, 2007). De acordo com Alkorta et al. (1998) as paredes celulares dos tecidos que compõem os frutos contêm uma grande variedade de polissacarídeos, entre eles as substâncias pécnicas classificadas como pectina, a qual é responsável pela consistência e turbidez dos sucos de frutas. Apesar de ser uma substância desejável no suco, uma quantidade elevada de pectina se torna muitas vezes um problema, causando um considerável aumento na viscosidade e dificultando os processos de prensagem, filtração e subsequente concentração, diminuindo assim, o rendimento da extração de sucos. Este problema é solucionado pela adição de pectinases que hidrolisam a pectina e outros polissacarídeos, promovendo a redução da viscosidade dos sucos e aumento da vida de prateleira dos mesmos. Enzimas pectinolíticas são produzidas por diversos microrganismos, incluindo bactérias, fungos filamentosos, leveduras, protozoários, insetos e nematoides. Segundo Jayani et al. (2005) e Santi et al. (2014) fungos filamentosos como, *Aspergillus niger*, *Coniothyrium diplodiela*, *Sclerotinia libertina* e espécies de *Botrytis*, *Penicilium* e *Rhizopus* são os mais empregados para a produção em escala industrial dessas enzimas, principalmente devido ao pH ideal das pectinases secretadas por estes fungos aproximar-se do valor de pH de muitos sucos de frutas (3,0 a 5,5).

Somente o suco de frutos da variedade Pera com presença de lesões de cancro, resultou em um acréscimo de limonin, apesar de não ter sido detectado acima do limite máximo estabelecido pelos mercados compradores (4,5 mg/L em suco a 11,2 °Brix) para ambas as variedades estudadas. A tendência de maior concentração de limonin em suco de frutos com lesões de cancro pode ser explicada pelo rompimento de células do albedo durante o processo de colonização de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. O limonin, principal limonóide amargo encontrado em suco de laranja, é responsável por causar sérios problemas na indústria de sucos cítricos. O sabor amargo, perceptível algumas horas depois da extração ou após o tratamento térmico, se deve à presença desta substância. O limonin em sua forma pura não está presente na fruta, mas seu precursor denominado ácido limonóico monolactona A, está presente nos mesmos e também é sintetizado por folhas e sementes de citros. Este precursor é estável no pH fisiológico dos tecidos intactos, que ao serem rompidos, por meio de danos ao tecido, quer seja pelo processo natural de decomposição, congelamento ou durante o processo de extração do suco (em casos de elevada pressão exercida sob a fruta), torna o meio acidificado, ocorrendo a conversão gradual do ácido limonóico a limonin, que proporciona intenso sabor amargo ao suco (Oliva, 2002).

O cancro cítrico, bem como a origem do fruto não afetaram as concentrações de hesperidina no suco obtido. De acordo com o European Fruit Juice Association (2016) o conteúdo de hesperidina no suco de laranja deve estar entre 250 a 700 mg/L, o que foi observado neste estudo para ambas as variedades. A hesperidina é um dos flavonoides mais importantes, proveniente de metabólitos secundários, presente na casca e polpa dos cítricos. Pertencente ao grupo das flavanonas glicosídicas, a hesperidina é uma substância sem sabor, que está presente, juntamente com a narirutina, apenas em sucos derivados de *Citrus sinensis* (Pupin, 1997). Por estar em maior quantidade comparada aos outros flavonoides, a hesperidina é utilizada por muitos laboratórios de controle de qualidade, como marcador de perfis polifenólicos de sucos cítricos. Dessa forma, quando detectada acima do limite estabelecido, esse marcador indica o processamento de frutos muito macios, excessiva pressão de extração, ou ainda adição de sucos de outras variedades, de substâncias aditivas ou, de sucos secundários (*pulp-wash*, *core wash*, *peel wash*) provenientes da água de lavagem da polpa, do suco ou da casca (Silva, 2009). Porém, em níveis abaixo do mínimo estabelecido, a hesperidina indica sucos amargos e clarificados (European Fruit Juice Association, 2016).

Suco de frutos com lesões de cancro cítrico apresentaram maiores concentrações de prolina quando comparado ao suco de frutos sem lesões. Porém, em ambas as variedades estudadas o teor de prolina permaneceu dentro do intervalo de 450 a 2090 mg/L, estabelecido pelo AIJN. O aumento de prolina pode ser explicado devido ao amadurecimento precoce dos frutos, que ocorre por consequência das lesões de cancro. A presença de lesões leva a um estresse metabólico no fruto, o que desencadeia a síntese de etileno. Este regulador vegetal está envolvido na modulação de vários processos nos vegetais, dentre eles as respostas a estresses bióticos, como os causados por patógenos e, amadurecimento de frutos (Bonato, 2015). Uma vez que frutos muito maduros ou muito verdes não são adequados para o processamento, a análise de prolina é realizada de forma a determinar o nível de maturação do fruto, indicando os níveis organolépticos ideais para comercialização do suco de laranja. De forma semelhante, porém mais rápida, o índice de formoldeído também é utilizado para avaliar a maturação do fruto. A indústria também utiliza este índice para determinar a adição indesejada de sucos secundários ao suco primário, uma vez que tal adição eleva o índice de formoldeído a valores acima de 26. O AIJN especifica um intervalo de 15 a 26 mL de NaOH 0,1N/100 mL de suco para este parâmetro. Uma extração com elevada pressão sobre o fruto, ou mesmo frutos moles devido à perda de água ou amadurecimento elevado, provocam o aumento do índice de formoldeído do suco. Assim como observado para os valores de prolina, a presença de cancro cítrico em frutos de laranja 'Pera', também provocou aumento no índice

de formoldeído do suco. Além disso, foi observado um elevado valor para o índice, acima do limite estabelecido, quando frutos de ‘Valência’ foram coletados do chão. Portanto, a colheita de frutos caídos que apresentam maturação avançada não é recomendada, pois podem interferir negativamente na composição de aminoácidos do suco de laranja (Esteve & Frígola, 2007).

4.2.3. Quantificação de *mold*

O presente estudo demonstrou de forma inédita a influência de lesões de cancro cítrico sobre o aumento na quantidade de fragmentos de hifas de fungos no suco de laranja. Na maioria dos talhões analisados, o suco de frutos coletados do chão com lesões grandes de cancro cítrico apresentam as maiores quantidades de *mold*. Além disso, foi observado, em algumas situações, que frutos com lesões de cancro, mesmo quando coletados da planta, resultaram em acréscimo na percentagem de *mold* no suco. De maneira semelhante, também foi observado que frutos caídos sem sintomas podem levar a um aumento na proporção de *mold*, porém, em menor quantidade quando comparado ao suco de frutos com sintomas. Estes resultados indicam que a presença de lesões de cancro no fruto é um fator importante para o aumento de *mold* no suco, e que este aumento pode ser favorecido pelo contato dos frutos com o solo. Apesar de uma alta umidade ser favorável ao desenvolvimento de fungos, não foi observada neste trabalho associação entre o aumento de *mold* e a ocorrência de chuvas antes da amostragem de frutos ou durante o período em que os frutos permaneceram em contato com o solo (Tabela 1).

Fungos saprofiticos, tais como os pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aureobasidium pullulans* estão presentes naturalmente na serapilheira dos pomares (Pasin et al., 2011; Fisher et al., 2013; Gomes, 2006). Estes fungos colonizam o tecido vegetal necrosado e, muitas vezes também se nutrem de substâncias orgânicas liberadas por tecidos vegetais injuriados. Este processo pode acelerar a decomposição do fruto até mesmo nas fases pós-colheita (Fisher et al., 2013) e aumentar a quantidade de hifas presentes no suco. A contagem de *mold* não só do suco de laranja, mas de qualquer alimento industrializado ou *in natura*, deve atender as exigências estabelecidas pelos órgãos fiscalizadores (United State Agriculture Department, 2013). Este procedimento é realizado pela indústria de sucos, geleias, molhos e afins, de forma a se manter um padrão de qualidade não só do produto final, mas da matéria-prima utilizada em todo o processo (Stancari et al., 2018; Potts et al., 2001). Na cadeia citrícola, todas as etapas de cultivo,

colheita e processamento devem ser realizadas de forma a se preconizar a qualidade da fruta que será processada. Dessa forma, o cancro cítrico passa a ser não só uma doença que exige cuidados em pré-colheita, mas também em pós-colheita durante o processamento da produção.

É importante ressaltar que tanto a amostragem quanto o preparo dos frutos para o processamento foram realizados de forma a maximizar a probabilidade de detecção de fragmentos de hifas no suco. No estudo, todos os frutos amostrados tinham pelo menos uma lesão grande de cancro cítrico e não foram lavados antes do processamento. No entanto, em lotes normalmente processados na indústria todos os frutos são lavados previamente e a incidência de frutos sintomáticos provenientes de pomares que receberam manejo adequado da doença é bem menor, muitas vezes inferior a 5% (Behlau et al., 2017). Destaca-se ainda que em lotes com alta incidência de frutos com cancro cítrico, a lavagem de frutos sintomáticos pode não ser suficientemente para reduzir o *mold* no suco. Conforme demonstrado, frutos colhidos do chão, mesmo passando pelo processo de lavagem, apresentaram percentagem de *mold* acima do limite de 10% estabelecido pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para sucos cítricos (FDA, 2018). Assim, em trabalhos futuros, sugere-se que seja investigada a incidência de *mold* em lotes de frutos com diferentes níveis de incidência e severidade de cancro cítrico.

Apesar deste estudo ter mostrado a influência do cancro cítrico na quantidade de *mold*, é importante mencionar que a adoção de boas práticas nos processos de produção, colheita, transporte e processamento, como conduzir o manejo adequado da doença nos pomares, evitar o aproveitamento de frutos caídos e realizar a lavagem dos frutos colhidos antes da extração do suco podem minimizar ou evitar o problema.

5. CONCLUSÕES

- O cancro cítrico aumenta os níveis de prolina no suco de frutos sintomáticos.
- O cancro cítrico não afeta de forma consistente o diâmetro, peso e teor de óleo dos frutos de laranja, tampouco o rendimento, quantidade de sólidos solúveis totais, acidez, *ratio*, óleo, limonin, hesperidina, pectina e aminoácidos primários do suco de laranja.
- O cancro cítrico provoca o aumento de *mold* em suco de frutos sintomáticos, principalmente quando coletados do chão.
- A lavagem de frutos antes do processamento reduz a incidência de *mold* no suco.
- Quanto maior o tempo de permanência de frutos caídos com cancro cítrico no solo, maior é a incidência de *mold* no suco.

REFERÊNCIAS

Abbasi, S., Zandi, P., Mirbagheri, E. 2005. Quantitation of limonin in Iranian orange juice concentrates using high-performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. **European Food Research and Technology** 221:202-207.

Alkorta, I., Garbisu, C., Irama, M.J., Serra, J.L. 1998. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry** 33(1):21-28.

Almeida, M.M.C. 2013. Suco concentrado de laranja e seus subprodutos. 44 p. **Relatório de estágio supervisionado**. Campo Mourão, PR: Universidade Federal Tecnológica do Paraná.

Amorim, L., Bergamin Filho, A. 2001. A epidemiologia do cancro cítrico. **Summa Phytopathologica** 27:151-156.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. **Official methods of analysis**. 15 ed. Washington. (2):1278.

Baldwin, E., Plotto, A., Manthey, J., McCollum, G., Bai, J., Irey, M., Cameron, R., Luzio, G. 2010. Effect of *Liberibacter* infection (Huanglongbing Disease) of citrus on orange fruit physiology and fruit/fruit juice quality: chemical and physical analyses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 58:1247-1262.

Barros, J.R.M. de, Barros, A.L.M. de, Cypriano, M. P. 2016. **O mercado da citricultura no Brasil e as suas novas perspectivas**. CitrusBR. 34 p.

Bassanezi, R.B., Ayres, A.J., Massari, C.A., Belasque Junior, J., Barbosa, J.C. 2014. Progressão e distribuição espacial das principais pragas dos citros. In: Andrade, D.J., Ferreira, M. da C., Martinelli, N.M. (Ed.). **Aspectos da fitossanidade em citros**. Jaboticabal: Cultura Acadêmica. cap. 2. p. 31-50.

Bassanezi, R.B., Miranda, M.P. de, Lopes, S.A., Behlau, F., Junior, G.J. da S., Sala, I. 2017. **Influência de pragas e doenças na qualidade do suco de laranja**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/artigo-influencia-de-pragas-e-doencas-na-qualidade-do-suco-de-laranja/546>>. Acesso em: 01 fev. 2018.

Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Sanches, A.L., Spósito, M.B., Stuchi, E.S., Barbosa, J.C. 2007. Effect of citrus sudden death on yield and quality of sweet orange cultivars in Brazil. **Plant Disease** 91:1407-1412.

Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Stuchi, E.S. 2009. Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. **European Journal of Plant Pathology** 125:565–572.

Behlau, F., Belasque, J. 2014. **Cancro cítrico: a doença e seu controle**. Araraquara: Fundecitrus. 94 p.

Behlau, F., Belasque Junior, J., Graham, J.H., Leite Junior, R.P. 2010. Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of Young bearing sweet Orange trees. **Crop Protection** 29:300-305.

Behlau, F., Scandelai, L.H., Silva Junior, G.J., Lanza, F.E. 2017. Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet orange trees. **Crop Protection** 94:185-191.

Bonato, V.C. de B. 2015. Interação etileno-auxina e sua influência na produção de compostos voláteis do aroma durante o amadurecimento do tomate (*Solanum lycopersicum*). 94 p. **Dissertação de Mestrado**. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo.

Brasil. Instrução Normativa nº 21, de 25 de abril 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 maio 2018. Seção 1. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-mapa-n-21-de-25-de-abril-de-2018,1152.html>>. Acesso em: 23 nov. 2018.

Correia, M., Roncada, M.J. 2002. Ocorrência de filamentos micelianos e de matérias estranhas em frutas em calda comercializadas em São Paulo. B. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos** 20(1):89-102.

Correia, M., Roncada, M.J. 2003. Padronização de método e quantificação de matérias estranhas e fungos filamentosos. II. Geléias de frutas. **Revista Instituto Adolfo Lutz** 62 (1):41-48.

Dagulo, L., Danyluk, M.D., Spann, T.M., Valim, M.F., Goodrich-Schneider, R., Sims, C, Rouseff, R. 2010. Chemical characterization of Orange juice from trees infected with Citrus Greening (Huanglongbing). **Journal of Food Science** 75(2):199-207.

Darros-Barbosa, R. 2006. Processamento Industrial da Laranja. In: Koller, O.C. Citricultura: 1. **Laranja: tecnologia de produção, pós-colheita, industrialização e comercialização**. Porto Alegre- RS: Cinco Continentes. cap. 11. p. 333-363.

Darros-Barbosa, R., Curtolo, J.E. 2005. Produção industrial de suco e subprodutos cítricos. In: Junior, D. de M., Negri, J.D. de, Pio, R.M., Junior, J.P. **Citros**. Campinas. Instituto APTA Citros Sylvio Moreira. cap. 28. p. 841-870.

Esteve, M.J., Frígola, A. 2007. Refrigerated fruit juices: quality and safety issues. **Advances in food and nutrition research** 52:103-139.

European Fruit Juice Association. 2016. **Reference Guideline for Orange Juice**. 8 p. Disponível em: <<http://www.aijn.org/publications/aijn-papers-guidelines/juice-quality/>>. Acesso em: 06 mar. 2018.

FDA (U.S. Food and Drug Administration). 2018. **Defect leves handbook**. Disponível em< <https://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm056174.htm#CHPTO>>. Acesso em: 04 out. 2018.

Fisher, I.H., Palharini, M.C. de A., Spósito, M.B., Amorim, L. 2013. Doenças pós-colheita em laranja 'Pera' produzida em sistema orgânico e convencional e resistência de *Penicillium digitatum* a fungicidas. **Summa Phytopathologica** 39(1):28-34.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2017. **Orange production forecast update for the 2017-2018 season of são paulo and west-southwest of minas gerais citrus belt – final estimate: april 2018.** Disponível em:<
http://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0418_Orange_Forecast_Update.pdf>.
 Acesso em: 19 abr. 2018.

FNP, Consultoria e Comércio. **Agriannual 2017:** anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo. 432 p.

Gomes, M.S. 2006. Estudo da pasteurização de suco de laranja utilizando ultrafiltração. 84 p. **Dissertação de Mestrado.** Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Gottwald, T.R., Sun, X., Riley, T., Graham, J.H., Ferrandino, F., Taylor, E.L. 2002. Geo-Referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. **Phytopathology** 92(4):361-377.

Graham, J.H., Dewdney, M.M., Yonce, H.D. 2011. Comparison of copper formulations for control of citrus canker on ‘Hamlin’ Orange. **Proc. Florida State Horticultural Society** 124:79-84.

Graham, J.H., Leite Junior, R.P. 2004. Lack of control of citrus canker by induced systemic resistance compounds. **Plant Disease** 88:745-750.

IFFJP (International Federation of Fruit Juice Producers). 1991. **Reference Analysis-Hesperidina.** n. 58.

IFFJP (International Federation of Fruit Juice Producers). 1983. **Reference Analysis-Prolina.** n. 49.

IFFJP (International Federation of Fruit Juice Producers). 1984. **Reference Analysis- Formol Number.** n. 30.

IFFJP (International Federation of Fruit Juice Producers). 2005. **Reference Analysis-Pectina.** n. 26.

Iha, M.H., Fávaro, R.M.D., Okada, M.M., Prado, S. de P.T., Bergamini, A.M.M., Oliveira, M.A. de, Garrido, N.S. 2000. Avaliação físico-química e higiênico-sanitária de suco de laranja fresco engarrafado e suco pasteurizado. **Revista Instituto Adolfo Lutz** 59(1/2):39-44.

Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry** 40:2931-2944.

John Bean Technologies Corporation (JBT). 2018. **Laboratory manual:** procedures for analysis of citrus products. 7 ed. 192 p.

Kimball, D.A. 1991. **Citrus Processing:** quality control and technology. 473 p.

Lanza, F.E., Marti, W., Silva Junior, G.J., Behlau, F. 2018. Characteristic of citrus canker lesions associated with premature drop of sweet orange fruit. **Phytopathology** (aceito para publicação).

Laranjeira, F.F., Palazzo, D.A. 1999. Danos qualitativos à produção de laranja ‘Natal’ causados pela clorose variegada dos citros. **Laranja** 20(1):77-91.

Machado, T.V. 2010. Avaliação sensorial e físico-química do suco de laranja proveniente das etapas do processamento do suco concentrado e congelado. 177 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Universidade Estadual Paulista.

Menegucci, J.L.P., Paiva, L.V., Souto, R.F., Carvalho, S.A. de, Marinho, C.S., Amaral, A.M.do, Souza, M. de. 1995. Alterações físico-químicas de frutos de laranja ‘Valência’ com sintomas de clorose variegada dos citros. **Revista Brasileira de Fruticultura** 17(1):153-155.

Neves, M. F., Trombin, V.G. 2017. **Anuário da citricultura**. São Paulo: CitrusBR. cap. 1. p. 10-13.

Neves, M.F., Trombin, V.G., Milan, P., Lopes, F.F., Cressoni, F., Kalaki, R. 2010. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: CitrusBR. 137 p.

Oliva, P.B. 2002. Influência das variedades cítricas (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Natal, Pêra-Rio e Valência na qualidade do suco de laranja pasteurizado. 173 f. **Tese de Doutorado**. Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas.

Pasin, L.A.A.P., Abreu, M.S. de, Souza, I.P. 2011. Influence of the physicochemical and chemical composition of coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Science and Technology** 31 (3):681-687.

Paula, A.T., Casarotti, S.N., Braga, H.F., Grandi, A.Z., Rossi, D.A. 2011. Avaliação microbiológica em suco de laranja *in natura* pelo sistema rápido Compact Dry. **UNOPAR Científica. Ciências biológicas e da saúde** 13(1):55-58.

Plotto, A., Baldwin, E., McCollum, G., Manthey, J., Narciso, J., Irey, M. 2010. Effect of *Liberibacter* infection (Huanglongbing or “Greening” Disease) of citrus on orange juice flavor quality by sensor evaluation. **Journal of Food Science** 75 (4):220-230.

Porto, O.M. de. 2006. Doenças e pragas. In: Koller, O.C. Citricultura: 1. **Laranja: tecnologia de produção, pós-colheita, industrialização e comercialização**. Porto Alegre, RS: Cinco Continentes. cap. 9. p. 181-317.

Potts, S.J., Slaughter, D.C., Thompson, J.F. 2001. Measuring mold infestation in raw tomato juice. **Journal of Food Science** 67(1):321-325.

Pozzan, M., Triboni, H.R. 2005. Colheita e qualidade do fruto. In: Junior, D. de M., Negri, J.D. de, Pio, R.M., Junior, J.P. (Ed.). **Citros**. Campinas. Instituto APTA Citros Sylvio Moreira. cap. 26. p. 801-822.

Pupin, A.M. 1997. Estudo da composição de laranjas brasileiras (*Citrus sinensis*) e seu uso como comprovação de autenticidade de suco de laranja. 173 f. **Tese de Doutorado**. Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/255004>>. Acesso em: 19 set. 2018.

Ribas, A.F., Flores, L.F. 2000. **Produtos alimentícios vegetais**. In: Frutas. Suco de laranja. Pasteurização. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/alimentus1/feira/afeira.htm>> Acesso em: 21 fev. 2018.

Rosseti, V.V. 2001. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba: Fealq/Fundecitrus. 207 p.

Santi, L., Berger, M., Beys, W.O.S. 2014. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. **Caderno pedagógico** 11(1):130-139.

São Paulo. Resolução SAA 10, de 20 de fevereiro de 2017. Delimita e oficializa todo o território do Estado de São Paulo como área sob Sistema de Mitigação de Risco, relativo à praga do cancro cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e institui procedimentos fitossanitários. **Diário Oficial da União**. 21 de fevereiro 2017. Seção 1. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/resolucao-saa-10-de-20-02-2017,1093.html>>. Acesso em: 23 nov. 2018.

Silva, L.C.R.C. 2009. Desenvolvimento de estratégias analíticas para determinação de flavanonas e psoraleno por CLAE-DAD em sucos de laranja de diferentes procedências. 146 f. **Tese de Doutorado**. Salvador, BA: Universidade Federal da Bahia.

Silveira, M.L., Bertagnolli, S.M.M. 2012. Qualidade de suco de laranja *in natura*. **Alimentos e Nutrição** 23(3):461-466.

Stancari, R.C.A., Pauli, L.F., Nscentes, G.A.N., Anversa, L. 2018. Comparison of mould filament techniques for industrialized tomato sauces. **Brazilian Journal of Food Technology** 21:1-6. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-67232018000100446&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 02 out. 2018.

Tetra Pak. 2017. The orange book. Disponível em: <<https://orangebook.tetrapak.com/chapter/principles-processing-orange-juice>>. Acesso em: 01 nov. 2018.

Uenojo, M., Pastore, G.M. 2007. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Revista Química Nova** 30(2):388-394.

United State Agriculture Department. 2013. **Foreign Material Manual**. 69 p. Disponível em: <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Foreign_Material_Manual%5B1%5D.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2018.