



Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Agrárias  
Bacharelado em Agroecologia



CAROLINE DORTA

**AVALIAÇÃO DAS LEVEDURAS *Torulaspota globosa* E  
*Trichosporon asahii* NO CONTROLE DA PODRIDÃO NEGRA EM  
FRUTOS DE TOMATE**

ARARAS – 2020



Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Agrárias  
Bacharelado em Agroecologia



CAROLINE DORTA

**AVALIAÇÃO DAS LEVEDURAS *Torulaspora globosa* E  
*Trichosporon asahii* NO CONTROLE DA PODRIDÃO NEGRA EM  
FRUTOS DE TOMATE**

Monografia apresentada ao Curso de  
Agroecologia – CCA – UFSCar para a obtenção  
do título de Bacharel em Agroecologia

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Maria Rosa Magri

ARARAS – 2020

*Dedico este trabalho à minha família, que sempre me apoiou, incentivou, e acreditou em mim.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me amar, cuidar de mim, e me capacitar para encarar todos os desafios dessa vida.

Sou imensamente grata aos meus pais Angela e Donizeti (*in memoriam*), às minhas irmãs Natalia e Ana Julia e à minha tia Lucia, que não mediram esforços para que eu conseguisse chegar até aqui. Obrigada por acreditarem em mim mesmo quando eu não acreditei. Não existem palavras que expressem o meu amor e gratidão por vocês.

Ao meu namorado Vinicius, que é o meu grande amigo. Obrigada por me apoiar, incentivar, e sempre estar presente, mesmo que de longe.

Agradeço às minhas amigas Bárbara, Daiane, Kézia, Marina, Suelen e Tainá. Foi muito divertido e especial compartilhar todos os momentos vividos durante a graduação com vocês.

Gostaria de expressar minha gratidão à minha orientadora profa. Dra. Márcia Maria Rosa Magri, que esteve presente e disponível desde a execução dos experimentos até a escrita deste trabalho. Muito obrigada por compartilhar seu conhecimento de uma forma tão leve.

Agradeço a estrutura do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), onde foi possível a realização deste trabalho, e a todos os meus amigos, técnicas e colegas de laboratório: Lucinha, Carina, Isabella, Amanda, Elizabete, Gabrielle, Ligianne, Fernanda e Fabrício. Em especial gostaria de agradecer à mestranda Ariane, que me ensinou tanto com muita dedicação e paciência.

Também agradeço ao Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de São Carlos e aos docentes do curso de Agroecologia, que me incentivaram a percorrer o caminho da pesquisa científica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de Iniciação Científica que resultou no presente estudo.

**“Tell me and I forget, teach me and I may  
remember, involve me and I learn”.**

**Xun Kuang**

## RESUMO

As podridões pós-colheita têm sido responsáveis por perdas pelos produtores, fato que tem limitado a comercialização de produtos agrícolas de consumo *in natura*, como frutas e vegetais. O fungo *Alternaria alternata* é o causador da podridão negra em tomate na pós-colheita; seu controle é realizado com fungicidas, o que contribui para a necessidade de alternativas que apresentem menor risco à saúde humana. Nesse contexto, as leveduras vêm sendo estudadas como agentes de controle biológico em frutos. Considerando o exposto, o objetivo desta pesquisa foi determinar o potencial das leveduras *Trichosporon asahii* (3S44) e *Torulaspota globosa* (5S55) no controle do fungo *A. alternata* em frutos de tomate. A produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) foi avaliada com o uso de recipientes fechados com o fruto inoculado com esporos de *A. alternata*, placas de Petri sem tampa inoculadas com células de *T. asahii* ou *T. globosa*, e uma gaze umedecida em água destilada estéril. Para a avaliação da sobrevivência das leveduras na ferida do fruto, formulações com *T. asahii* ou *T. globosa* e os veículos Tween 80, solução salina, amido de milho, gelatina incolor e alginato de sódio foram inoculadas nas feridas do tomate, e após 48 horas retirou-se a porção da região ferida para diluição e plaqueamento. O controle do fungo pela levedura no fruto foi avaliado inoculando-se células de *T. globosa* nas feridas, e após 3 horas, esporos de *A. alternata*. Depois de 7 dias foram realizadas avaliações do diâmetro externo e interno e avaliações qualitativas. Como resultado foi observado no teste de compostos voláteis o controle interno do avanço da podridão no tratamento com a *T. globosa* e diminuição da produção de esporos na presença da *T. asahii*. O amido de milho e a levedura *Torulaspota globosa* apresentaram os melhores resultados de sobrevivência da levedura no fruto. No teste *in vivo* do controle do fungo, o tratamento com a levedura *T. globosa* diferiu estatisticamente do tratamento controle tanto em relação ao sintoma externo quanto interno, além da diminuição da produção de micélio. Portanto, os resultados observados mostraram que a levedura *T. globosa* apresenta potencial para controle do fungo *Alternaria alternata* em frutos de tomate.

**Palavras-chave:** controle fúngico, formulações de inoculantes, leveduras rizosféricas, pós-colheita.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Colônia (A) e conídios (B) do fungo <i>Alternaria alternata</i> . Fonte: Site Microbe Notes. ....	15
<b>Figura 2.</b> Fruto de tomate com podridão negra causada pelo fungo <i>A. alternata</i> .....	16
<b>Figura 3.</b> Escala de amadurecimento do tomate (CEAGESP, 2003). ....	23
<b>Figura 4.</b> Exemplo do fermento realizado artificialmente em um dos lados do fruto. ....	24
<b>Figura 5.</b> Exemplo da disposição da placa (A), fruto (B), suporte do fruto (C) e gaze (D) no recipiente. ....	25
<b>Figura 6.</b> Montagem do teste com a levedura <i>T. globosa</i> , evidenciando as 6 repetições do tratamento controle.....	25
<b>Figura 7.</b> Avaliação dos sintomas externos (A) e internos (B) de um fruto do tratamento controle do teste com a <i>T. asahii</i> , com o auxílio de um paquímetro. ....	26
<b>Figura 8.</b> Exemplo das categorias para presença de micélio e esporos nas lesões com podridão. (BOSQUEIRO, 2019).....	26
<b>Figura 9.</b> Exemplo da alocação dos frutos de tomate na montagem do experimento antes (A) e depois (B) da colocação do saco plástico.....	28
<b>Figura 10.</b> Exemplo da retirada da amostra do fermento (A) e amostras nos frascos com solução salina e Tween 80 (B).....	28
<b>Figura 11.</b> Placas de Petri com as colônias de leveduras. ....	29
<b>Figura 12.</b> Exemplo da alocação dos frutos nas bandejas. ....	31
<b>Figura 13.</b> Exemplo dos sintomas externos (A) e internos (B) dos frutos do tratamento com a levedura <i>T. globosa</i> e amido de milho. ....	31
<b>Figura 14.</b> Médias do diâmetro do sintoma externo da podridão em frutos de tomate utilizados no teste de produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) pelas leveduras <i>T. asahii</i> (3S44) e <i>T. globosa</i> (5S55). ....	32
<b>Figura 15.</b> Médias do diâmetro do sintoma interno da podridão em frutos de tomate utilizados no teste de produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) pelas leveduras <i>T. asahii</i> (3S44) e <i>T. globosa</i> (5S55). ....	33
<b>Figura 16.</b> Características apresentadas pelas lesões com podridão (%) em relação à presença de micélio.....	34
<b>Figura 17.</b> Características apresentadas pelas lesões com podridão (%) em relação à presença de esporos. ....	34

<b>Figura 18.</b> Ilustração dos recipientes com os testes de COVs dos trabalhos citados. (A) Bosqueiro (2019), (B) presente trabalho, e (C) Chen, Chen & Chou (2018). .....	36
<b>Figura 19.</b> Número de unidades formadoras de colônia (UFC/g de tomate) correspondentes as formulações com solução salina (controle); gelatina, tween 80; alginato de sódio e amido de milho. ....	37
<b>Figura 20.</b> Número de unidades formadoras de colônia (UFC/g de tomate) correspondentes aos testes com as leveduras <i>T. asahii</i> (3S44) e <i>T. globosa</i> (5S55). ....	38
<b>Figura 21.</b> Médias do diâmetro do sintoma externo da podridão em frutos de tomate utilizados no teste de controle do fungo <i>A. alternata</i> pela levedura <i>T. globosa</i> (5S55). ....	41
<b>Figura 22.</b> Médias do diâmetro do sintoma interno da podridão em frutos de tomate utilizados no teste de controle do fungo <i>A. alternata</i> pela levedura <i>T. globosa</i> (5S55). ....	42
<b>Figura 23.</b> Características apresentadas pelas lesões com podridão (%) em relação à presença de micélio. ....	43
<b>Figura 24.</b> Características apresentadas pelas lesões com podridão (%) em relação à presença de esporos. ....	43



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Categorias para a descrição da podridão desenvolvida nas lesões quanto à presença de micélios e esporos. (BOSQUEIRO, 2019).....	26
--	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	14
2.1. O Gênero <i>Alternaria</i> .....	14
2.2. <i>Alternaria alternata</i> em tomates .....	15
2.3. Leveduras no Controle Biológico em Pós-Colheita .....	17
2.4. Formulações para Microrganismos Agentes de Controle Biológico .....	18
3. OBJETIVOS .....	21
3.1. Objetivo geral .....	21
3.2. Objetivos específicos .....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
4.1. Material biológico .....	22
4.2. Produção de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) .....	23
4.3. Dinâmica populacional das leveduras em feridas no tomate e no controle de <i>A. alternata</i> .....	27
4.3.1. Sobrevivência da levedura inoculada no fruto sob diferentes formulações .....	27
4.3.2. Controle do fungo pela levedura aplicada em feridas no fruto .....	29
4.4. Análise de dados .....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
5.1. Produção de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) .....	32
5.2. Dinâmica populacional das leveduras em feridas no tomate e no controle de <i>A. alternata</i> .....	37
5.2.1. Sobrevivência da levedura inoculada no fruto sob diferentes formulações .....	37
5.2.2. Controle do fungo pela levedura aplicada em feridas no fruto .....	41
6. CONCLUSÃO .....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47

## 1. INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.), se sobressai dentre as espécies oleráceas cultivadas no Brasil, tanto por sua importância econômica, quanto pela alta demanda de consumo (BRITO JUNIOR, 2012). Em 2019 foram colhidas 4,1 milhões de toneladas em uma área de aproximadamente 58 mil hectares (IBGE, 2019).

Perdas na produção de frutos de tomate podem ocorrer, mesmo que o transporte e armazenamento sejam realizados de maneira correta, devido a susceptibilidade dos frutos à contaminação por patógenos que causam podridões, os quais têm o desenvolvimento influenciado por fatores como o ambiente, tipo de patógeno, e hospedeiro (GOMES; SILVEIRA; MARIANO, 2005).

Os fungos filamentosos ou bolores causam enormes danos em produtos na pós-colheita, promovendo grande desperdício de alimentos e prejuízo aos produtores, varejistas e consumidores, sendo responsável por 80 a 90% das perdas (PARISI, 2015). Um exemplo são os fungos de podridão do gênero *Alternaria* sp., sendo uma das espécies a *Alternaria alternata*, causadora da podridão negra em frutos de tomate (BASURTO et al., 2017).

O método hoje em dia utilizado para tratar podridões em pós-colheita de frutos e vegetais envolve o emprego de grandes quantidades de fungicidas (ZUCCHI; MELO, 2009). O uso desses produtos químicos prejudica o equilíbrio do meio ambiente e afeta a saúde humana dos trabalhadores e consumidores. Sendo assim, a diminuição ou eliminação do uso desses produtos torna-se uma questão de saúde pública (LIMA et al., 2011).

Além dos danos causados ao meio ambiente, um dos maiores problemas em relação aos agrotóxicos são os resíduos deixados nos alimentos de origem vegetal. O contato direto com agrotóxicos pode acarretar o desenvolvimento de doenças como o câncer, e ainda não se conhece todos os efeitos a longo prazo do acúmulo desses produtos químicos no organismo humano (JARDIM; ANDRADE, 2009).

Uma alternativa ao uso dos agrotóxicos, especialmente para o controle de patógenos de pós colheita, é a adoção de métodos de controle biológico, os quais se destacam, sobretudo, por não deixarem resíduos contaminantes nos frutos tratados (COELHO; HOFFANN; HIROOKA, 2003). O controle biológico é uma técnica natural, baseada na aplicação de microrganismos específicos, antagônicos aos patogênicos, que interferem de maneira negativa no desenvolvimento dos organismos causadores

de doenças em plantas (SAITO et al., 2009). Para aumentar sua eficiência, esse método deve ser utilizado em conjunto com outras técnicas comumente empregadas, como o manejo no campo, cuidados com a higiene durante a colheita e transporte, e a refrigeração durante o período de armazenamento (BENDO; VIECELLI, 2009).

As leveduras têm sido estudadas como agentes de controle biológico de fungos em frutos na pós-colheita devido a sua potencial capacidade de produzir compostos antifúngicos específicos e metabólitos que inibem o crescimento e metabolismo de patógenos. Os microrganismos agentes de biocontrole impedem, inibem ou matam os propágulos do patógeno que se encontra em desenvolvimento nos frutos, evitando sua deterioração durante o armazenamento (DUKARE et al., 2019). Para promover o controle, empregam diferentes mecanismos, como competição por espaço e nutrientes, antibiose, produção de substâncias antimicrobianas, parasitismo e indução de resistência (DROBY et al., 2009; JANISIEWICZ; TWORKOSKI; SHARER, 2000).

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) são uma das substâncias antimicrobianas produzidas por leveduras, fungos, e bactérias durante seu metabolismo primário e secundário. Apresentam baixo peso molecular, baixa polaridade e alta pressão de vapor (CONTARINO et al., 2019), podendo promover o crescimento de plantas, induzir seu sistema de defesa, ou agir inibindo o crescimento de patógenos sem contato direto (ZHANG et al., 2019). A produção dos COVs é biologicamente dinâmica e fortemente influenciada pela espécie microbiana, suas condições e fase de crescimento (KORPI; JÄRNBERG; PASANEN, 2009), sendo específica para cada espécie e atuando como um sinal de comunicação química entre as células; mecanismo de liberação de carbono; e como promotor ou inibidor de crescimento microbiano. A aplicação desses compostos pode ser muito promissora por não ser necessário o contato entre o agente de biocontrole e o patógeno ou entre o agente de biocontrole e alimentos para que sua atividade antimicrobiana seja realizada (CONTARINO et al., 2019).

Visando o sucesso da comercialização de produtos biológicos para o controle de doenças de plantas, é necessário que algumas limitações sejam superadas, dentre elas a dificuldade de produção em massa e formulação contendo o microrganismo antagonista. As formulações são basicamente compostas pelo microrganismo (ingrediente ativo); material inerte, servindo como transportador; e adjuvantes, tais como nutrientes e compostos que aumentam a sobrevivência das células. Espera-se que estas formulações, ou veículos, aumentem a vida útil dos microrganismos,

melhorando seu desempenho sob condições comerciais, através da proteção das células contra estresses ambientais como dessecação, tensão osmótica, radiação UV, e extremos de temperatura (DROBY et al., 2016).

Considerando o exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação dos compostos voláteis produzidos pelas leveduras *Trichosporon asahii* (3S44) e *Torulaspota globosa* (5S55) e testar diferentes formulações para auxiliar a ação antimicrobiana desses microrganismos no controle do fungo *Alternaria alternata* em frutos de tomate na pós-colheita.

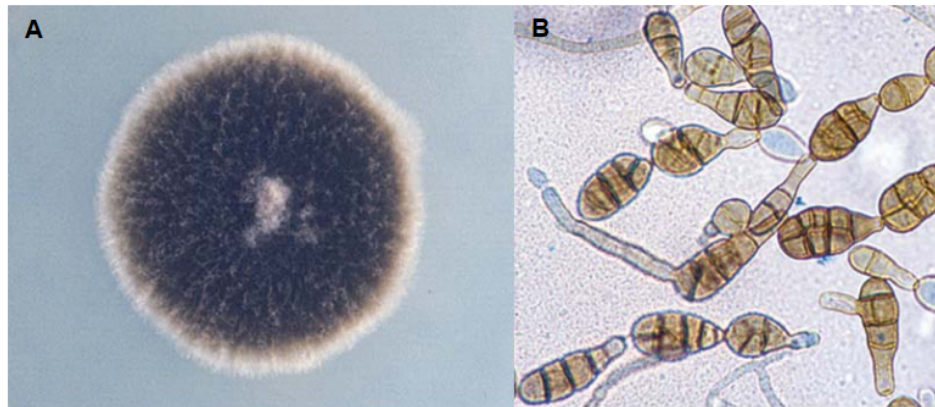
## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O Gênero *Alternaria*

Os fungos do gênero *Alternaria* sp. são facilmente encontrados em diversos ambientes, como solo, ar, sementes, e matérias em decomposição, apresentando elevada adaptabilidade a condições de alta e baixa temperatura. O gênero engloba numerosas espécies endofíticas, saprofíticas e patógenas (MORENO et al., 2012; PEIXOTO, 2015).

Espécies de *Alternaria* são conhecidas como patógenos de plantas que causam grandes perdas durante o cultivo e na pós-colheita em uma ampla gama de culturas (WOUDENBERG et al., 2013). As alternarioses, como são conhecidas as doenças causadas por fungos desse gênero, são uma das doenças fúngicas mais comuns em hortaliças em diversos locais do mundo. São caracterizadas por danificar desde plântulas até frutos de espécies de solanáceas, aliáceas, apiáceas, crucíferas e cucurbitáceas, apresentando diferentes nomenclaturas de acordo com a cultura afetada. Além de poder sobreviver entre cultivos, o patógeno pode permanecer viável pelo período de até um ano em condições de baixa umidade, pois os conídios das espécies de *Alternaria* são altamente resistentes a essas condições (TÖFOLI; DOMINGUES, 2004).

Esse gênero abrange fungos mitospóricos, com conidióforos que podem ser retos ou sinuosos, com septos, e que se encontram isolados ou em grupos. Os conídios apresentam variável comprimento e largura, podendo ser retos ou ligeiramente curvos; individuais, na maioria das vezes; com o corpo em formato elipsoidal ou oblongo, que se torna mais fino conforme se aproxima do ápice, formando um bico comprido, sinuoso, e ocasionalmente ramificado. A coloração dos conídios desse gênero pode se alterar entre parda, palha ou ouro claro, possuindo septos transversais e pouco ou nenhum septo longitudinal (Figura 1) (TÖFOLI; DOMINGUES, 2004).



**Figura 1.** Colônia (A) e conídios (B) do fungo *Alternaria alternata*. Fonte: Site Microbe Notes.

Algumas das espécies de fungo do gênero *Alternaria* sp. podem sintetizar metabólitos tóxicos para as plantas (fitotoxinas) e para seres humanos e animais (micotoxinas). Estudos apontaram que essas micotoxinas têm potencial capacidade genotóxica, mutagênica, carcinogênica e citotóxica (MORENO et al., 2012). O alternariol (AL) e o éter monometílico do alternariol (AME), são as toxinas produzidas em grande quantidade pela maioria das espécies de *Alternaria* (REDDY et al., 2000). Para reduzir a contaminação, alguns países estabeleceram regulamentos que impõem limites a quantidade de micotoxinas presentes em seus produtos de origem vegetal, dando especial atenção à busca de métodos químicos, físicos e biológicos para suprimir o crescimento de bolores micotoxigênicos (BARKAI-GOLAN; PASTER, 2008).

## **2.2. *Alternaria alternata* em tomates**

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), tem como centro de origem a região andina, na América do Sul, pertence à família Solanaceae, e é a segunda olerícola de maior consumo no mundo, com produção mundial de 182 milhões de toneladas em 2018 (FAOSTAT, 2020). Seu fruto apresenta diversos benefícios à saúde, sendo fonte de vitaminas, sais minerais, proteínas, e carotenoides como licopeno e caroteno (PINTO, 2014).

Os frutos de tomate são climatéricos e altamente perecíveis, podendo ter sua vida útil diminuída devido ao apodrecimento provocado por fungos. As doenças de pós

colheita podem acarretar, durante o transporte e armazenamento, a perda de cerca de 30% do total colhido. Um dos patógenos responsáveis por provocar tais perdas é o fungo *Alternaria alternata* (ABDOLAHY et al., 2009), que pode infectar os frutos no campo, tornando-se latente enquanto o fruto não amadurece, e conforme ocorre o amadurecimento o fungo retoma seu crescimento (REDDY et al., 2000). O momento ideal para o desenvolvimento de infecções fúngicas é quando o fruto atinge a maturidade (BASURTO et al., 2017). O fungo *A. alternata* é responsável por várias doenças do tomate, dentre elas o cancro da haste, podridão negra (Figura 2), mancha foliar, e ferrugem precoce (AHMAD; SHAFIQUE; SHAFIQUE, 2013).



**Figura 2.** Fruto de tomate com podridão negra causada pelo fungo *A. alternata*

Além de causar a podridão negra em pós-colheita nos frutos de tomate (REDDY et al., 2000), o fungo *A. alternata* também é responsável por doenças de pós-colheita em culturas como pimentão e berinjela (FALLIK et al., 1994); manga (PRUSKY et al., 2006); caqui (KOBILER et al., 2011); maçã (SARAVANAKUMAR et al., 2008); pitaya amarela (VILAPLANA; PÁEZ; VALENCIA-CHAMORRO, 2017); e jujuba (YUAN et al., 2019).

Para identificar as espécies do gênero *Alternaria* sp. ocorrentes em solanáceas, são levadas em consideração características morfológicas como as dimensões dos conídios, comprimento do rostro, número de septos transversais e longitudinais, e número de rostros apresentado por cada conídio (PEIXOTO, 2015). O fungo *A. alternata*, causador da podridão negra no tomate, caracteriza-se morfológicamente, segundo Muniz et al. (2018), pela “produção de um micélio de coloração cinza escuro



a preto, aéreo, densamente turfado, com produção de conidióforos simples com conídios escuros e multiseptais” (MUNIZ et al., 2018).

### **2.3. Leveduras no Controle Biológico em Pós-Colheita**

O controle biológico de doenças de pós-colheita em frutos usando leveduras antagonicas é uma alternativa promissora ao uso de produtos químicos, pois possuem características como tolerância a múltiplos fatores de estresse, requisitos nutricionais simples e capacidade de colonizar superfícies por longos períodos de tempo (CONTARINO et al., 2019).

As leveduras são microrganismos que podem agir de forma antagonica em relação a outros microrganismos patogênicos. A maioria dos antagonistas microbianos são naturalmente encontrados na superfície de tecidos de frutas e vegetais, na filosfera, em raízes e rizosfera, e também no solo. Existem inúmeras possibilidades de mecanismos de ação pelos quais os antagonistas realizam o biocontrole, e para suprimir a infecção por patógenos, esses mecanismos trabalham em um sistema de interação. Os principais mecanismos de biocontrole exibidos por antagonistas são: competição por nutrientes e espaço; antibiose através da produção de antibióticos; micoparasitismo; produção de enzimas líticas de parede celular; e indução da resistência do hospedeiro (DUKARE et al., 2019).

A eficiência do uso de leveduras no controle de patógenos causadores de doenças em frutos foi atestada em diversos trabalhos. Viñas et al. (1998) obtiveram bons resultados com a levedura *Candida sake* no controle de *Penicillium expansum* (Mofo Azul), *Botrytis cinerea* (Mofo Cinza) e *Rhizopus nigricans* (Podridão de Rhizopus) em maçã. No trabalho de Kalogiannis et al. (2006), a levedura filosférica *Rhodotorula glutinis* Y-44 reduziu significativamente o número de feridas infectadas com *Botrytis cinerea*, causador do mofo cinza em frutos de tomate. O fungo *Penicillium digitatum*, responsável pelo mofo verde em citrus, foi controlado por linhagens das leveduras *Pichia* sp. e *Wickerhamomyces* sp no estudo de Perez et al. (2016), onde foram isoladas leveduras nativas, com potencial “killer” e atividade antagonica contra fungos causadores de doenças na pós-colheita de limão.

Gomes et al. (2005) obtiveram resultados significativos no controle da podridão-mole causada pelo patógeno *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* em tomate com a aplicação de cálcio em conjunto com as leveduras *Rhodotorula* sp. e *Pseudomonas* sp. fluorescente. Em seu trabalho de revisão, Coelho et al. (2003) listam diversos gêneros de leveduras que apresentam o fator “killer”, um dos mecanismos de ação capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos. Os gêneros citados são: *Saccharomyces* spp.; *Candida* spp.; *Cryptococcus* spp.; *Debaryomyces* spp.; *Hansenula* spp.; *Kluyveromyces* spp.; *Pichia* spp.; *Torulopsis* spp.; *Ustilago* spp.; *Rhodotorula* spp.; *Trichosporon* spp.; *Hanseniaspora* spp.; *Williopsis* spp.; *Zygowilliopsis* spp.; e *Zygosaccharomyces* spp.

Em seu estudo, Rosa et al. (2010) constataram que a levedura *Torulasporea globosa* é micocinogênica, ou seja, produz toxinas “killer”. A levedura foi capaz de controlar o fungo fitopatogênico *Colletotrichum sublineolum*, causador da antracnose em sorgo, através de mecanismos de ação como as toxinas “killer” e competição por espaço e nutrientes. A levedura *T. globosa* também apresenta potencial para a liberação de potássio a partir de pó de rochas (ROSA-MAGRI et al., 2012), e promoção de crescimento vegetal (CABRINI; SALA; ROSA-MAGRI, 2019). Em relação a levedura *Trichosporon asahii*, uma de suas potencialidades foi apresentada em um estudo feito por Scarcella et al. (2017), apontando a capacidade da levedura para produção de ácido indolacético (AIA). Bosqueiro et al. (2020) também observaram a produção de compostos orgânicos voláteis (COVs), produção de toxinas killer, formação de biofilme, e competição por nutrientes como mecanismos de ação utilizados pela levedura *T. asahii* no controle do fungo *A. alternata*.

#### **2.4. Formulações para Microrganismos Agentes de Controle Biológico**

O estudo com microrganismos antagonistas visando a elaboração de produtos biológicos que sejam uma alternativa ao uso de agrotóxicos teve forte crescimento na última década, porém, um grande entrave para a sua comercialização é o desenvolvimento de um produto formulado que seja estável em prateleira, retendo a atividade de biocontrole semelhante à das células frescas (ABADIAS et al., 2003). Aumentar o número de pesquisas para desenvolver formulações mais eficientes pode ajudar a espalhar o uso de agentes de controle biológico como uma alternativa real

aos fungicidas sintéticos (CARBÓ et al., 2017). Uma boa formulação apresenta características como viabilidade econômica para a produção, facilidade de distribuição no ambiente desejado, além de extensa vida útil mesmo durante o armazenamento e em condições de temperatura elevada (MELIN; HÅKANSSON; SCHNÜRER, 2006).

Diversos estudos foram publicados buscando aprimorar a adesão dos agentes de controle biológico, aumentando o número de células e sua eficácia através da adição de alguns revestimentos e adjuvantes (CARBÓ et al., 2017). Trabalhos recentes demonstraram que ao adicionar sólidos formadores de revestimento nas células de *Candida sake* foi observado melhora na sua sobrevivência e eficácia contra *Botrytis cinerea* em uvas (MARÍN et al., 2016).

Formulações com microrganismos agentes de controle biológico são obtidas através de diferentes métodos, podendo ser líquidas ou sólidas (AGUIRRE-GÜITRÓN et al., 2019), em geral, as formulações líquidas são usadas para bactérias e leveduras, e as sólidas para a maioria dos fungos. Em relação à temperatura de armazenamento, formulações em estado desidratado ou liofilizado podem ser armazenadas em temperatura ambiente, já as formulações líquidas precisam ser mantidas sob refrigeração (DROBY et al., 2016).

Os produtos de formulação sólida são obtidos a partir de processos de secagem, dentre eles a secagem por spray, considerada a mais viável pelo baixo custo, possibilidade de armazenamento e produção em grande quantidade, além da facilidade de transporte (AGUIRRE-GÜITRÓN et al., 2019). As formulações líquidas são a maneira mais simples de estabilizar a viabilidade das células microbianas. O método pelo qual as formulações líquidas são obtidas envolvem o armazenamento das células do microrganismo em solução à base de água ou óleo com diferentes protetores e aditivos, geralmente a baixas temperaturas. As formulações líquidas foram utilizadas de forma bem sucedida nos trabalhos citados por Droby et al. (2016) como alternativa às formulações sólidas para os microrganismos *C. sake*, *Rhodotorula minuta*, *Pichia anomala* e *Cryptococcus laurentii* (DROBY et al., 2016).

Ao comparar formulações líquidas e sólidas para a produção de um produto biológico com a levedura *P. anomala* (J121), Melin et al. (2006) concluíram em seu estudo, que para cada tipo de formulação existem vantagens e desvantagens, e que a melhor escolha depende do uso e da necessidade do produto de biocontrole,

existindo grandes variações em relação à eficácia de acordo com cada técnica de formulação dependendo da espécie do microrganismo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar a ação antifúngica de compostos voláteis produzidos pelas leveduras e a aplicação das mesmas, em diferentes formulações, no controle da podridão negra em frutos de tomate na pós-colheita.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a ação de compostos voláteis produzidos pelas leveduras no controle da podridão negra em frutos de tomate.

- Avaliar a ação de diferentes veículos (formulações), no estabelecimento das leveduras *Torulaspota globosa* e *Trichosporon asahii* na superfície de frutos de tomate.

- A partir da melhor formulação e levedura com melhor média de sobrevivência na ferida do fruto, avaliar o controle do fungo *A. alternata* em frutos de tomate.

- Avaliar a incubação dos frutos de tomate inoculados com a levedura *T. globosa* em diferentes temperaturas (28°C e 10°C).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material biológico

As duas linhagens de leveduras utilizadas no experimento identificadas como *Torulaspota globosa* (5S55) e *Trichosporon asahii* (3S44), foram obtidas da rizosfera de cana-de-açúcar (variedade RB867515), cultivada no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, em Araras/SP.

Para a identificação foram aplicadas técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento da região D1/D2 – 28S do rDNA com o uso dos primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Os isolados das leveduras foram armazenados e mantidos refrigerados (8°C) até o início dos testes, em tubos de ensaio inclinados, contendo o meio de cultura YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose; composição: 1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% glicose; 2% ágar) e glicerol 0,05%. Para a reativação, os microrganismos foram repicados dos tubos de ensaio para tubos 'Falcon' contendo YEPD líquido, e posteriormente colocados em uma incubadora Shaker à 30°C e 150 rpm.

O isolamento do fungo *Alternaria alternata* foi feito a partir de lesões na superfície de tomates que apresentavam sintomas de podridão negra. Para confirmar sua patogenicidade, foram inoculados esporos em tomates saudáveis. O fungo foi mantido em placas de Petri com meio de cultura comercial BDA (Batata Dextrose Ágar), e guardado em local refrigerado para sua conservação. Anteriormente à montagem dos experimentos, o fungo foi reativado a partir da repicagem para placas com BDA e posterior incubação à 30°C por aproximadamente 14 dias.

Os tomates (*Solanum lycopersicum* L.) utilizados no experimento foram obtidos em supermercado, eram orgânicos, variedade 'italiano', enquadravam-se no grupo "III" em relação ao amadurecimento de acordo com a escala da CEAGESP (Figura 3), e não apresentavam sinais de lesões ou sintomas de outras doenças. Previamente à montagem dos ensaios, os frutos foram lavados com água, detergente neutro, e desinfestados através da imersão em uma solução de hipoclorito de sódio a 1,42% (p/p) por 20 segundos, sendo posteriormente enxaguados em água corrente para a

retirada do excesso de produto, e antes da alocação nos recipientes, foram desinfestados com álcool 70%.



**Figura 3.** Escala de amadurecimento do tomate (CEAGESP, 2003).

#### 4.2. Produção de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs)

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, onde testes foram realizados para avaliar a produção de COVs pelas leveduras *Torulaspota globosa* (5S55) e *Trichosporon asahii* (3S44), de acordo com Parafati et al. (2015) e Chen, Chen & Chou (2018) com modificações.

Os microrganismos a serem inoculados foram previamente preparados e encontravam-se em crescimento ativo em placa de Petri. Para a montagem dos ensaios, placas de Petri com meio de cultura YEPD foram inoculadas com 100 µl de uma suspensão com concentração de  $1 \times 10^8$  células de levedura/ml, ajustadas em Câmara de Neubauer. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 6 repetições para cada tratamento. Sendo os tratamentos: controle (placas de Petri apenas com o meio de cultura YEPD); placas com a levedura *T. globosa* e placas com a *T. asahii*.

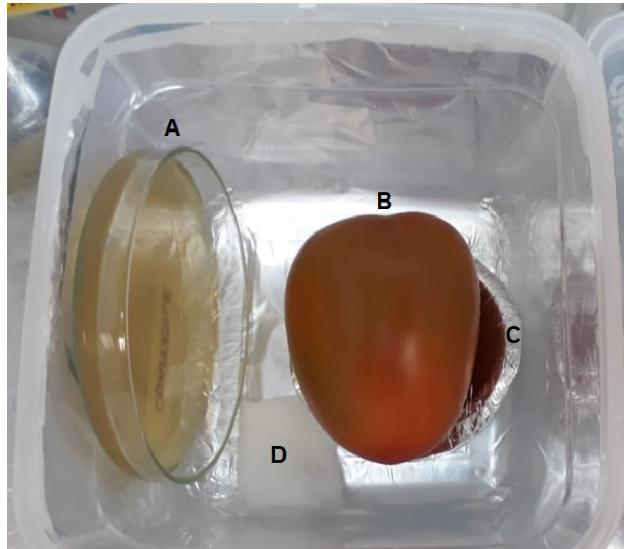
Após a desinfestação descrita no item anterior, os frutos de tomate foram artificialmente feridos (Figura 4), sendo realizadas em cada fruto, duas feridas na região equatorial, em lados opostos, removendo-se a porção de tecido em 7 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade. Em seguida, cada ferida foi inoculada com 20 µl de uma suspensão na concentração de  $1 \times 10^5$  esporos de *Alternaria alternata*/ml.



**Figura 4.** Exemplo do ferimento realizado artificialmente em um dos lados do fruto.

As placas de Petri e os tomates inoculados com o fungo foram alocados em recipientes plásticos, quadrados, herméticos, e com quatro travas, que foram envoltos com papel alumínio. Apresentando as dimensões de 11,5 cm de comprimento, 11,5 cm de largura e 10,5 cm de altura (volume de 1,4 litros). As placas de Petri foram fixadas na parte interna do recipiente com o uso de uma fita adesiva dupla face. Para evitar o deslocamento, os frutos de tomate foram colocados sobre um suporte de papelão encapado com papel alumínio, previamente desinfestado com álcool 70%, que foi colado no recipiente com uma fita adesiva dupla face. Em cada um dos recipientes, entre a placa e o fruto, foi adicionada uma gaze estéril dobrada quatro vezes, e embebida em água destilada também estéril, até a saturação, para a manutenção da umidade no ambiente interno do recipiente (Figura 5). Depois de prontos, os recipientes foram fechados, e entre a tampa e o pote foi passada uma camada de plástico filme de PVC. Em seguida, os recipientes foram levados para a incubadora, onde permaneceram por 7 dias a 28 °C. Foram realizadas 6 repetições por tratamento (Figura 6), sendo o controle (placa não inoculada) e com a presença da levedura, totalizando 12 frutos por ensaio (uma levedura avaliada por ensaio).



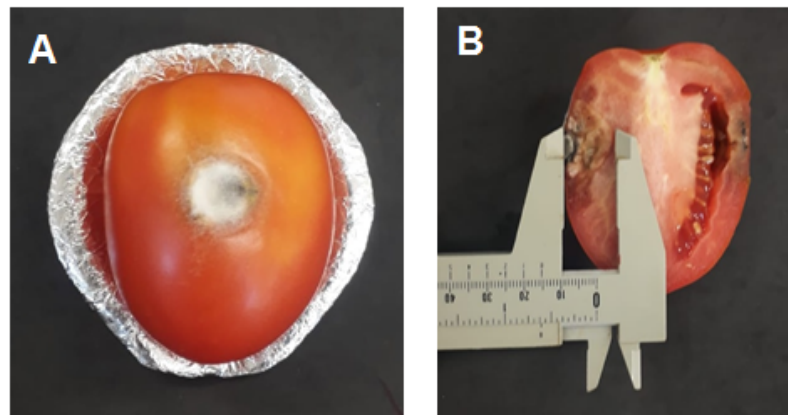


**Figura 5.** Exemplo da disposição da placa (A), fruto (B), suporte do fruto (C) e gaze (D) no recipiente.



**Figura 6.** Montagem do teste com a levedura *T. globosa*, evidenciando as 6 repetições do tratamento controle.

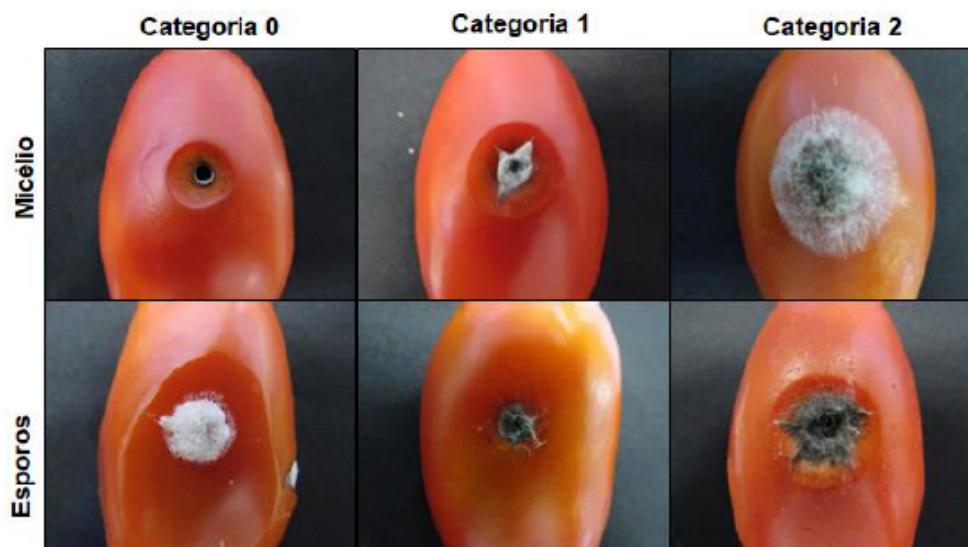
Após o período de incubação, foram avaliados, com o auxílio de um paquímetro, o diâmetro da podridão em cada lesão (medição externa) e a profundidade do sintoma interno (Figura 7). Além disso, foram pré-definidas categorias (Quadro 1), de acordo com o trabalho de Bosqueiro (2019), para determinar a severidade da doença, de forma qualitativa através de notas, a partir da avaliação do grau de desenvolvimento do micélio e a presença de esporos do fungo na lesão (Figura 8), sendo estes dados apresentados em porcentagem de lesões acometidas.



**Figura 7.** Avaliação dos sintomas externos (A) e internos (B) de um fruto do tratamento controle do teste com a *T. asahii*, com o auxílio de um paquímetro.

**Quadro 1.** Categorias para a descrição da severidade da podridão desenvolvida nas lesões quanto à presença de micélios e esporos. (BOSQUEIRO, 2019).

ESTRUTURA	CATEGORIAS	DESCRIÇÃO
Micélio	0	Micélio não visível
	1	Pequena a média quantidade de micélio
	2	Grande quantidade de micélio
Esporos	0	Esporos não visíveis
	1	Pequena a média quantidade de esporos
	2	Grande quantidade de esporos



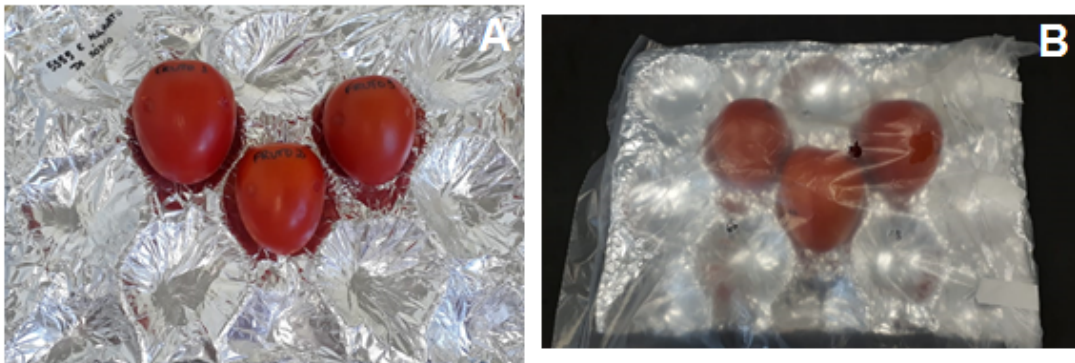
**Figura 8.** Exemplo das categorias para presença de micélio e esporos nas lesões com podridão. (BOSQUEIRO, 2019).

### **4.3. Dinâmica populacional das leveduras em feridas no tomate e no controle de *A. alternata***

#### *4.3.1. Sobrevivência da levedura inoculada no fruto sob diferentes formulações*

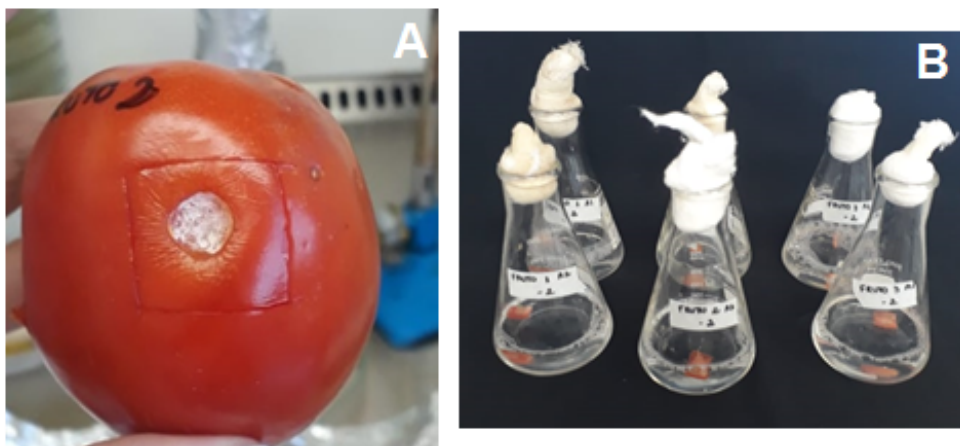
Os ensaios foram realizados de acordo com Lima et al. (2014) com modificações. As leveduras *T. globosa* (linhagem 5S55) e *T. asahii* (linhagem 3S44) foram cultivadas em tubos 'Falcon' contendo 10 ml do meio de cultura YEPD líquido (extrato de levedura, peptona e dextrose) e mantidas em uma incubadora com agitação por 48 horas a 30 °C e 150 rpm para a multiplicação. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a 3.600 rpm durante 10 minutos e posteriormente retirou-se o sobrenadante. Em seguida o veículo foi adicionado ao tubo contendo as células das leveduras até atingir a concentração de  $1 \times 10^8$  células/ml. Foram avaliados como veículos (1) Tween 80, (2) amido de milho, (3) alginato de sódio, e (4) gelatina incolor, os quatro na concentração de 2%. Para o tratamento controle, utilizou-se solução salina (0,85%) como veículo.

Após o processo de desinfestação (descrito no item 'Material Biológico'), os frutos foram feridos artificialmente em lados opostos, sendo realizada duas feridas em cada fruto, retirando-se uma porção de tecido de 7 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade (cada ferimento representou uma amostra). Em seguida, foi inoculado 20 µl da formulação em cada ferida e os frutos foram dispostos em uma bandeja envolta por papel alumínio previamente desinfestado com álcool 70% e posteriormente envolvida por um saco plástico com furos para permitir a oxigenação (Figura 9). Os frutos foram levados para a incubadora onde permaneceram por 48 horas a 28 °C. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, e utilizou-se 3 repetições por tratamento.



**Figura 9.** Exemplo da alocação dos frutos de tomate na montagem do experimento antes (A) e depois (B) da colocação do saco plástico.

Após 48 horas, retirou-se com o auxílio de um bisturi, uma porção de 1 g da região onde o ferimento foi realizado em cada fruto, e em seguida essa fração retirada foi colocada em frascos ‘Erlenmeyer’ de 250 ml contendo 90 mL de solução salina e 1% de Tween 80, constituindo a diluição  $10^{-2}$  (Figura 10). Os frascos ficaram em agitação por 30 minutos em uma incubadora shaker a 25 °C e 160 rpm.

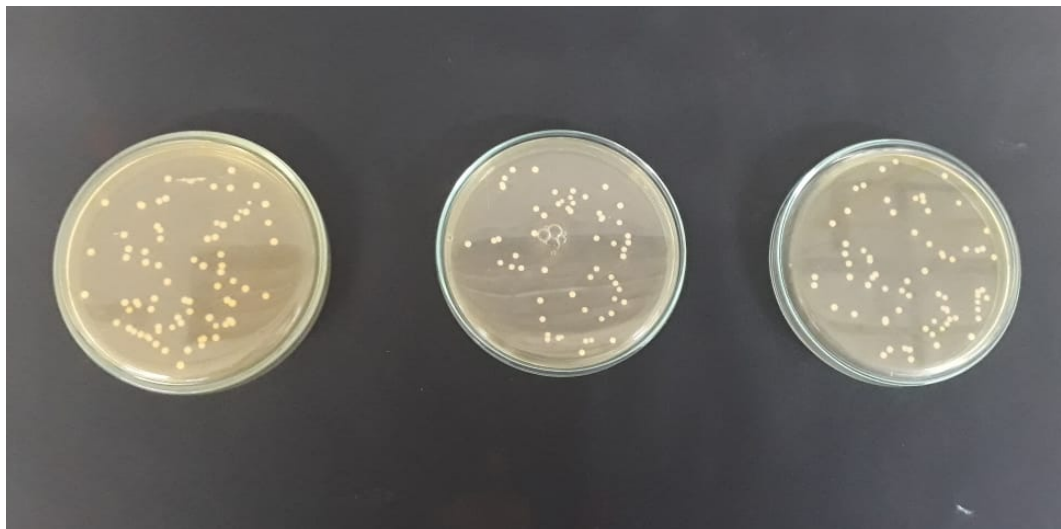


**Figura 10.** Exemplo da retirada da amostra do ferimento (A) e amostras nos frascos com solução salina e Tween 80 (B).

Depois de agitados, os frascos foram levados para o fluxo laminar, onde as amostras foram novamente movimentadas com o auxílio de uma alça de platina para que o restante das células aderidas ao tecido do fruto fossem liberados para a solução.

A partir da solução concentrada contida nos frascos ‘Erlenmeyer’ foram feitas diluições seriadas até a diluição  $10^{-6}$ , e em seguida realizou-se o plaqueamento de 100  $\mu$ l das diluições  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  em placas de Petri contendo o meio de cultura YEPD

(extrato de levedura, peptona, dextrose e ágar). Cada uma das diluições foi plaqueada em triplicata. As placas foram identificadas de acordo com cada amostra e diluição, e levadas para a incubadora onde permaneceram a 28 °C por 48 horas. Posteriormente ao período de incubação, realizou-se a contagem das colônias presentes nas placas, sendo a densidade populacional das leveduras expressa como log<sub>10</sub> UFC (Unidades formadoras de colônias) por ferida (Figura 11). O resultado, portanto, foi dado em UFC/g de tomate.



**Figura 11.** Placas de Petri com as colônias de leveduras.

Os resultados obtidos a partir dos testes com as leveduras e as formulações indicaram que a formulação com o amido de milho (2%) e a levedura *T. globosa* (5S55) destacaram-se dentre as demais em relação à sobrevivência das células na ferida do fruto. A partir desse resultado, visando analisar a sobrevivência da levedura em temperatura amena (condição de armazenamento), realizou-se um segundo teste com as mesmas etapas descritas anteriormente, porém com temperatura de incubação de 10 °C e plaqueamento das diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ .

#### 4.3.2. Controle do fungo pela levedura aplicada em feridas no fruto

O experimento foi realizado de acordo com Wang et al. (2008) com modificações. O fungo *A. alternata* foi repicado em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar; 42 g/L de meio comercial). Para a montagem do experimento foi adicionado aproximadamente 10 ml de solução salina estéril nas placas contendo

o fungo, e com o auxílio de uma alça de platina, as estruturas do fungo foram liberadas (raspagem do micélio) para a solução, que posteriormente foi transferida para tubos 'Falcon'. Utilizando a Câmara de Neubauer, a concentração de esporos foi ajustada para  $1 \times 10^5$  esporos/ml. A levedura *T. globosa* (linhagem 5S55) foi cultivada em tubos 'Falcon' contendo 10 ml do meio de cultura YEPD líquido (extrato de levedura, peptona e dextrose) o qual foi mantido em uma incubadora com agitação por 48 horas a  $30^\circ\text{C}$  e 150 rpm para a multiplicação. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a 3.600 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e em seguida adicionou-se a solução de amido de milho (2%) ou solução salina (NaCl 0,85%) ao tubo contendo as células das leveduras até atingir a concentração de  $1 \times 10^8$  células/ml.

Os frutos foram lavados e desinfestados, como descrito no item 'Material Biológico', e em cada um deles foi feito um ferimento artificial com a retirada de tecido, nas dimensões de 7 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 3 repetições para cada tratamento, sendo eles: tratamento controle; tratamento com células de levedura *T. globosa* em solução salina (0,85%); e tratamento com células de *T. globosa* em solução com amido de milho.

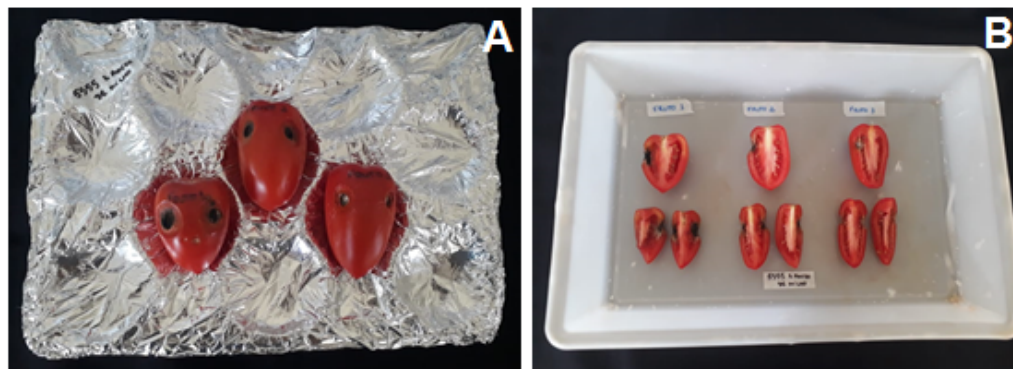
No tratamento com a levedura e solução salina, em cada uma das feridas, inoculou-se 20  $\mu\text{l}$  de uma solução contendo  $1 \times 10^8$  células de *T. globosa*/ml e solução salina (0,85%). No tratamento com a levedura e o amido de milho, foi inoculado nas feridas 20  $\mu\text{l}$  de uma solução com a concentração de  $10^8$  células de *T. globosa*/ml e amido de milho (2%). No tratamento controle, foi inoculado 20  $\mu\text{l}$  de solução salina (0,85%) contendo  $1 \times 10^5$  esporos de *A. alternata*/ml em cada uma das feridas. Os tratamentos com a levedura foram colocados na incubadora onde ficaram por 3 horas, e após esse período foram retirados e inoculou-se, em cada uma das feridas onde a levedura já havia sido inoculada, 20  $\mu\text{l}$  de uma suspensão com concentração de  $1 \times 10^5$  esporos de *A. alternata*/ml.

Os tomates foram dispostos em bandejas envolvidas em papel alumínio, as quais foram desinfestadas com álcool 70%. As bandejas foram envolvidas em sacos plásticos com furos para permitir a oxigenação (Figura 12), e em seguida foram colocadas em uma incubadora a  $28^\circ\text{C}$  por 7 dias.



**Figura 12.** Exemplo da alocação dos frutos nas bandejas.

Após o período de incubação foi realizada uma avaliação qualitativa, segundo o trabalho de Bosqueiro (2019), anteriormente exemplificada no ‘Quadro 1’ e ‘Figura 8’. Esta análise visa determinar, através de notas, o grau de desenvolvimento do micélio e a presença de esporos do fungo na lesão, sendo estes dados apresentados em porcentagem de lesões acometidas. Também foi realizada a análise quantitativa com o auxílio de um paquímetro, com a medida do diâmetro da podridão em cada lesão (medição externa) e a profundidade do sintoma interno (Figura 7 e 13).



**Figura 13.** Exemplo dos sintomas externos (A) e internos (B) dos frutos do tratamento com a levedura *T. globosa* e amido de milho.

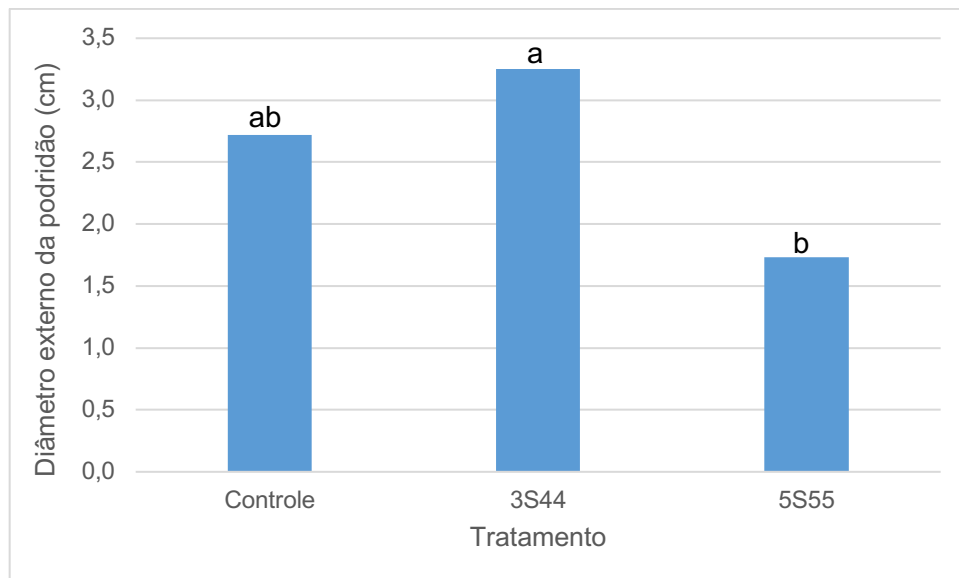
#### 4.4. Análise de dados

Todos os dados quantitativos obtidos deste trabalho foram analisados através de análise de variância (ANOVA) e as a comparação das médias realizada através do teste de Tukey a 5% de significância. Para a análise estatística foi utilizado o software Statistica 6.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Produção de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs)

A média do diâmetro das lesões externas causadas pelo fungo *A. alternata* foi de 2,72 cm no tratamento controle, 3,25 e 1,73 cm para os tratamentos com a *T. asahii* (3S44) e *T. globosa* (5S55), respectivamente (Figura 14). Não houve diferença estatística entre os tratamentos com as leveduras e o tratamento controle. O tratamento com a levedura *Torulaspota globosa* (5S55) apresentou lesões com menor diâmetro, porém, não diferiu estatisticamente do tratamento controle, indicando que não houve uma diminuição significativa do diâmetro externo da podridão. O tratamento com a *Trichosporon asahii* (3S44) apresentou a maior média de diâmetro da lesão, também não diferindo estatisticamente do tratamento controle.

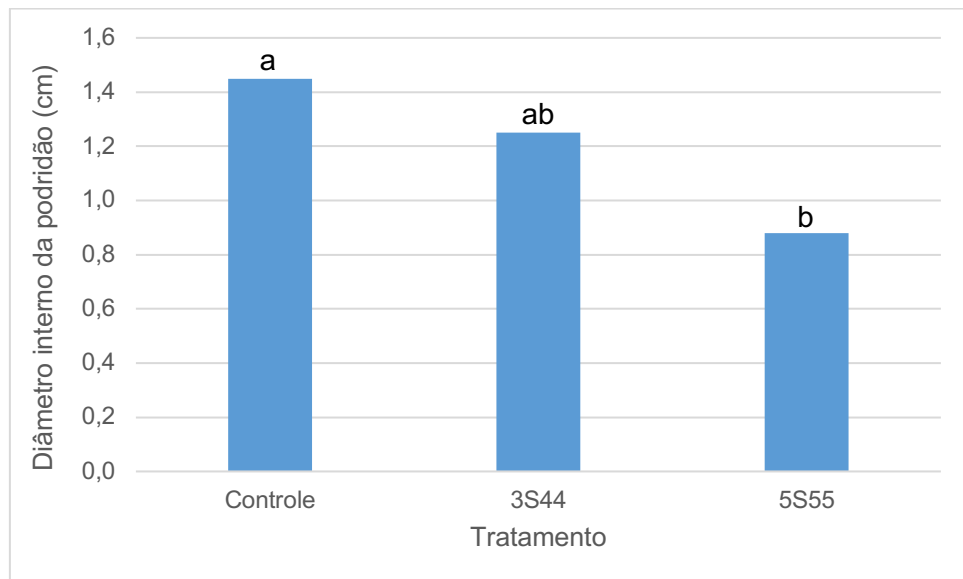


**Figura 14.** Médias do diâmetro do sintoma externo da podridão em frutos de tomate utilizados no teste de produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) pelas leveduras *T. asahii* (3S44) e *T. globosa* (5S55).

Em relação ao sintoma interno, as médias foram de 1,45 cm para o controle, 1,25 e 0,88 cm para a 3S44 e 5S55, respectivamente (Figura 15). O diâmetro da lesão no tratamento controle apresentou a maior média dentre os tratamentos. Com a presença da *T. asahii* (3S44) houve uma redução no diâmetro da lesão interna, porém não diferiu estatisticamente do tratamento controle. Já no tratamento com a *T. globosa* (5S55), ocorreu uma redução significativa do diâmetro da lesão interna, evidenciando



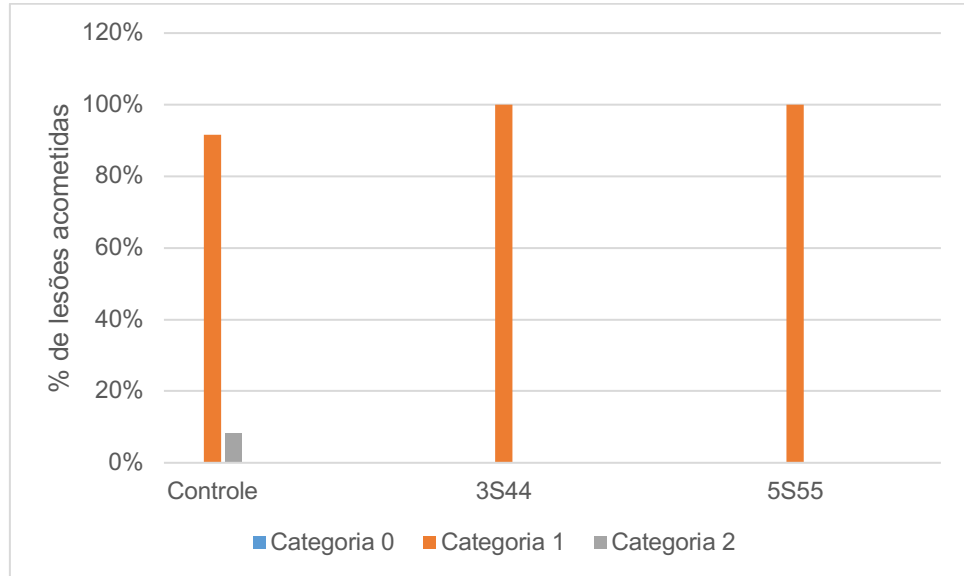
que apesar do diâmetro não ter reduzido externamente, a podridão não evoluiu internamente na presença da levedura.



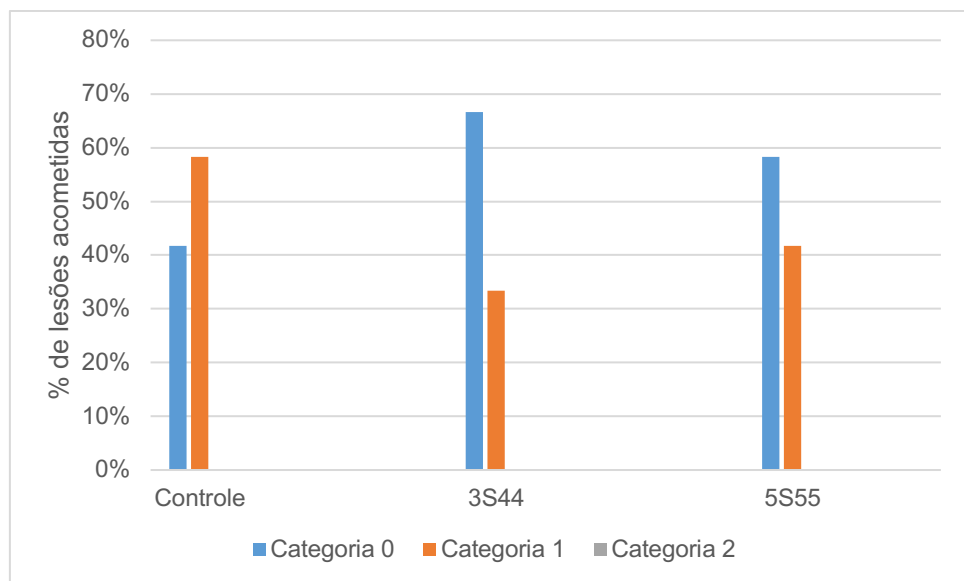
**Figura 15.** Médias do diâmetro do sintoma interno da podridão em frutos de tomate utilizados no teste de produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) pelas leveduras *T. asahii* (3S44) e *T. globosa* (5S55).

Dentre as características qualitativas avaliadas, em relação à presença de micélio na lesão (Figura 16), observou-se que apenas no tratamento controle ocorreram lesões na categoria 2 (caracterizada pela presença de grande quantidade de micélio). Nos tratamentos com ambas as leveduras, todas as lesões encontravam-se na categoria 1, ou seja, com média quantidade de micélio.

Quanto à presença de esporos (Figura 17), não foi observado lesões na categoria 2 em nenhum dos tratamentos. No tratamento controle, a maioria das lesões se enquadravam na categoria 1, e nos tratamentos com as leveduras, ocorreu um aumento das lesões na categoria 0, caracterizada pela ausência de esporos visíveis, indicando que a presença das leveduras promoveu a diminuição da quantidade de esporos do fungo *A. alternata*. A levedura que apresentou melhor resultado em relação à diminuição da quantidade de esporos foi a *T. asahii* (3S44).



**Figura 16.** Características apresentadas pelas lesões com podridão (%) em relação à presença de micélio.



**Figura 17.** Características apresentadas pelas lesões com podridão (%) em relação à presença de esporos.

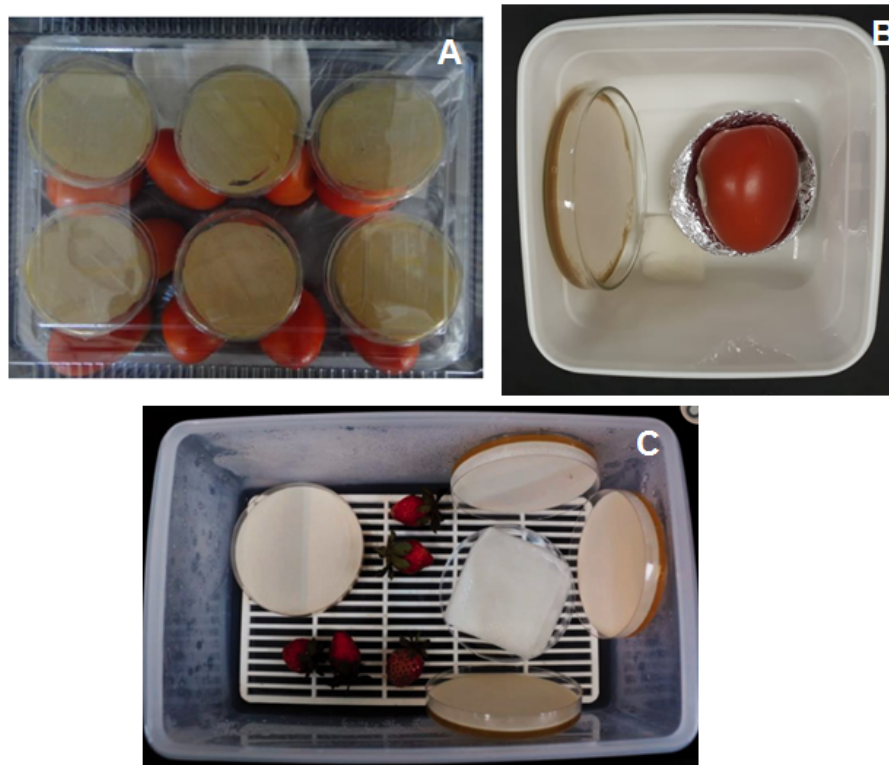
De acordo com os resultados observados neste ensaio, houve controle do fungo *A. alternata* pela levedura *T. globosa* (5S55) em relação à evolução dos sintomas internos, e diminuição da presença de esporos nos sintomas da podridão na presença da levedura *T. asahii* (3S44). Em contrapartida, não ocorreu diminuição significativa das lesões externas. Em testes *in vitro* realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, posicionando as placas de Petri de forma sobreposta, observou-se a inibição de 30,2% da área micelial de *A. alternata* pela levedura *T.*

*asahii* (3S44) (BOSQUEIRO, 2016), e 94,24% de inibição do mesmo fungo pela levedura *T. globosa* (5S55) (BIZARRIA JÚNIOR, 2016). Nos testes *in vivo* do presente estudo, a melhor inibição do sintoma externo observada foi de 36,4% pela levedura *T. globosa*.

Em seu trabalho, Bosqueiro (2019) utilizou caixas plásticas de dimensões 36 x 26,5 x 10 cm (volume de aproximadamente 9,5 litros) (Figura 18-A) para a montagem do experimento, sendo que em cada caixa foram alocadas 6 placas e 10 tomates. Os resultados obtidos para a lesão externa não foram satisfatórios, não havendo o controle do fungo *A. alternata* pelas leveduras *T. asahii* (3S44) e *T. globosa* (5S55); não foi realizada a avaliação do sintoma interno por Bosqueiro (2019). Em relação às categorias descritas quanto ao desenvolvimento do micélio e presença de esporos, tanto no trabalho de Bosqueiro (2019) quanto neste foram observados redução das categorias nos tratamentos com as leveduras.

Ao comparar o estudo de Bosqueiro (2019), este trabalho, e o teste *in vitro* com as duas leveduras, é possível afirmar que o resultado positivo observado no teste *in vitro* pode estar relacionado ao volume do recipiente que abriga o composto volátil produzido pela levedura. Tanto na caixa plástica utilizada por Bosqueiro (2019), como no recipiente utilizado por nós neste estudo (dimensões de 11,5 cm de comprimento, 11,5 cm de largura e 10,5 cm de altura, com volume de 1,4 litros) (Figura 18-B), a atuação dos compostos voláteis produzidos pelas leveduras pode ter sido desfavorecida, provavelmente devido à baixa produção dos voláteis, e baixa saturação deste dentro do recipiente. Pois de maneira geral, os microrganismos produzem esses compostos em muito baixa concentração (DI FRANCESCO et al., 2015).

Em outro estudo envolvendo a produção de compostos orgânicos voláteis por leveduras no controle do fungo *Botrytis cinerea* em frutos de morango, realizado por Chen, Chen e Chou (2018), foram utilizados cinco frutos por recipiente (Figura 18-C) e foi avaliado duas ou quatro placas de Petri com as leveduras. Em seu resultado, observou-se que o controle do fungo foi maior com o maior número de placas (quatro).



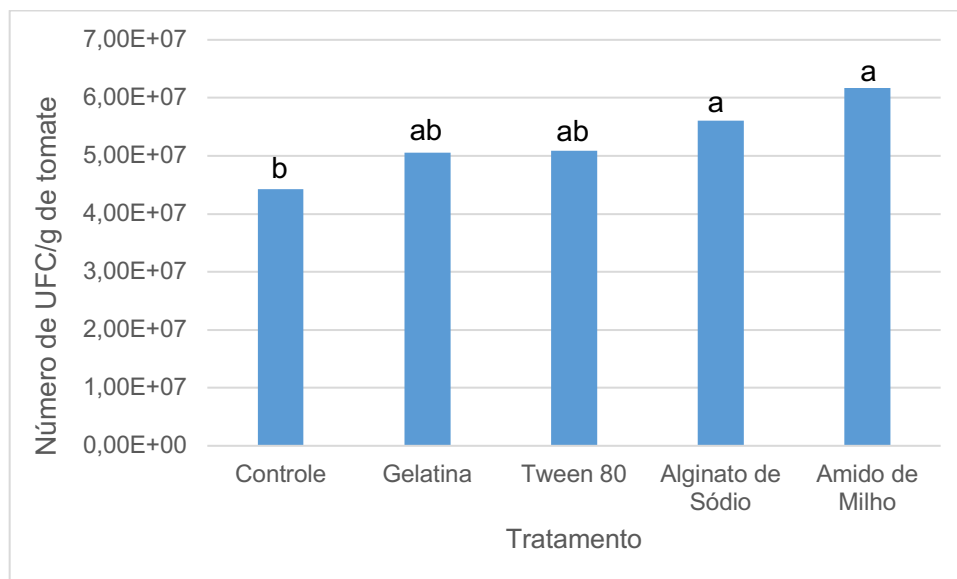
**Figura 18.** Ilustração dos recipientes com os testes de COVs dos trabalhos citados. (A) Bosqueiro (2019), (B) presente trabalho, e (C) Chen, Chen & Chou (2018).

Levando em consideração os trabalhos citados e seus resultados, a ideia proposta no presente estudo foi a redução do tamanho do recipiente e a utilização de uma placa por fruto. Além disso, mais estudos sobre os compostos voláteis produzidos por ambas as espécies de levedura são necessários para entender com propriedade sua contribuição no controle do patógeno, a fim de melhor explorar o potencial desses microrganismos antagonistas.

## 5.2. Dinâmica populacional das leveduras em feridas no tomate e no controle de *A. alternata*

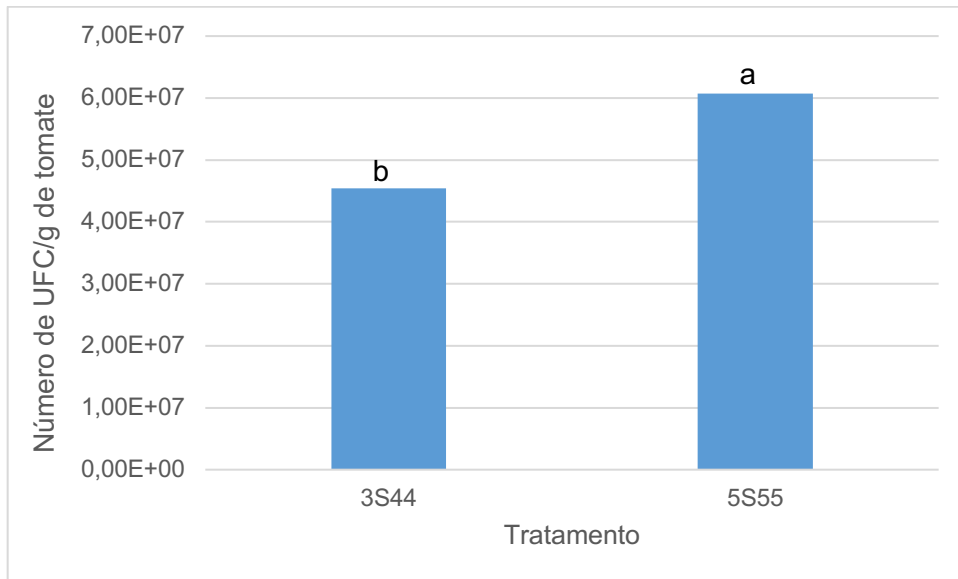
### 5.2.1. Sobrevivência da levedura inoculada no fruto sob diferentes formulações

A média de unidades formadoras de colônia (UFC/g de tomate) recuperadas das feridas do fruto após 48 horas de incubação foi de  $4,42 \times 10^7$  no tratamento controle (solução salina),  $5,06 \times 10^7$  no tratamento com a gelatina incolor,  $5,09 \times 10^7$  no tratamento com o tween 80,  $5,61 \times 10^7$  no tratamento com alginato de sódio, e  $6,18 \times 10^7$  no tratamento com o amido de milho (Figura 19). As formulações com os veículos amido de milho e alginato de sódio destacaram-se positivamente, apresentando os melhores resultados em relação à sobrevivência das leveduras na ferida do fruto, diferindo-se estatisticamente do tratamento controle. Os veículos gelatina incolor e tween 80 não diferiram estatisticamente dos tratamentos com o amido e o alginato, nem do tratamento controle. O tratamento controle, com a solução salina como veículo, apresentou as menores médias de UFC/g de tomate.



**Figura 19.** Número de unidades formadoras de colônia (UFC/g de tomate) correspondentes as formulações com solução salina (controle); gelatina, tween 80; alginato de sódio e amido de milho.

Em relação às leveduras inoculadas na ferida do fruto juntamente com os veículos, a *T. globosa* (5S55) apresentou o melhor resultado, com média de  $6,07 \times 10^7$  unidades formadoras de colônia (UFC/g de tomate), diferindo estatisticamente da levedura *T. asahii* (3S44), que apresentou médias inferiores, de  $4,54 \times 10^7$  unidades formadoras de colônia (UFC/g de tomate) (Figura 20).



**Figura 20.** Número de unidades formadoras de colônia (UFC/g de tomate) correspondentes aos testes com as leveduras *T. asahii* (3S44) e *T. globosa* (5S55).

No teste realizado com temperatura de incubação de 10°C, a partir da contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC/g de tomate), observou-se que não houve aumento do número de células na ferida do fruto. O inóculo inicial apresentava concentração de  $1,0 \times 10^8$  células de levedura/ml, correspondente a  $2,0 \times 10^6$  unidades formadoras de colônia (UFC), e a média após 48 horas de incubação foi de  $2,66 \times 10^5$  unidades formadoras de colônia (UFC/g de tomate). Mesmo que a quantidade de unidades formadoras de colônia tenha diminuído quando exposta à baixas temperaturas, ainda haviam células vivas da levedura *T. globosa* (5S55) na ferida do fruto após 48 horas de incubação.

Em seu trabalho, Bosqueiro (2019) estudou a resistência da levedura *T. globosa* (5S55) à estresses ambientais, incluindo baixas temperaturas. Ao incubar as células da levedura à 10°C, foi observado que mesmo após as 96 horas (maior tempo de incubação avaliado), a levedura não chegou a atingir sua fase estacionária, o que explica o resultado obtido no presente estudo, em que a levedura *T. globosa*, mantida em baixas temperaturas, não aumentou seu número de células, porém ainda haviam células vivas após o período de incubação.

Para que o microrganismo antagonista seja um bom agente de biocontrole é necessário que apresente a capacidade de colonização de feridas e superfícies de frutos. Além disso, o nível de sobrevivência e a taxa de crescimento nessas superfícies intactas ou danificadas deve ser grande o suficiente para evitar o estabelecimento de

patógenos (DROBY et al., 2016). Diversos estudos têm mostrado que uma estratégia possível de ser usada para melhorar a eficácia e confiabilidade dos agentes de biocontrole aplicados na pós-colheita é a adição de substâncias estabilizantes à formulação, tais como polímeros, açúcares, albumina, leite, sais, mel, polióis, aminoácidos, ácidos orgânicos, e aditivos alimentares (DROBY et al., 2016; GOTOR-VILA et al., 2017). Os aditivos utilizados como revestimento também podem aumentar a tolerância dos agentes de biocontrole às condições de estresse ambiental e atuar como protetores durante a preparação, conservação e aplicação de produtos à base de microrganismos (MARÍN et al., 2016).

Como observado, os dois veículos testados que apresentaram os melhores resultados para a aderência e sobrevivência das células das leveduras foram o alginato de sódio e o amido de milho. O alginato de sódio, amplamente utilizado nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, é o sal de sódio de ácido algínico, um polissacarídeo (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; NAVARRO DA SILVA, 2008). É um material altamente biocompatível, possui baixa toxicidade, baixo custo e mecanismo de gelificação simples (CORATO et al., 2018), além de ser um promotor de adesão celular (PATIÑO-VERA et al., 2005). Marín et al. (2016) citam em seu trabalho estudos que mostraram que a adição de revestimento à formulação apresentou efeito de controle sobre patógenos, dentre eles o alginato de sódio, que teve um leve efeito indireto no controle de fungos em uvas e laranjas, sugerindo que as interações dos veículos, não apenas com o microrganismo, mas também com o agente infeccioso, desempenha um papel importante no biocontrole.

O amido de milho, polissacarídeo formado por ligações de unidades de glicose (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2015), assim como o alginato de sódio, também é amplamente utilizado devido à sua alta disponibilidade e baixo custo. As cadeias polissacarídicas formadoras do amido de milho possuem a capacidade de revestir as células e preencher as lacunas entre elas (MARÍN et al., 2016), sendo, portanto, um interessante revestimento para ser aplicado em formulações com microrganismos agentes de controle biológico. De modo geral, os resultados obtidos no presente trabalho apontam o alginato de sódio e o amido de milho, na concentração de 2% como bons veículos de revestimento para as células das leveduras *Torulaspota globosa* (5S55) e *Trichosporon asahii* (3S44).

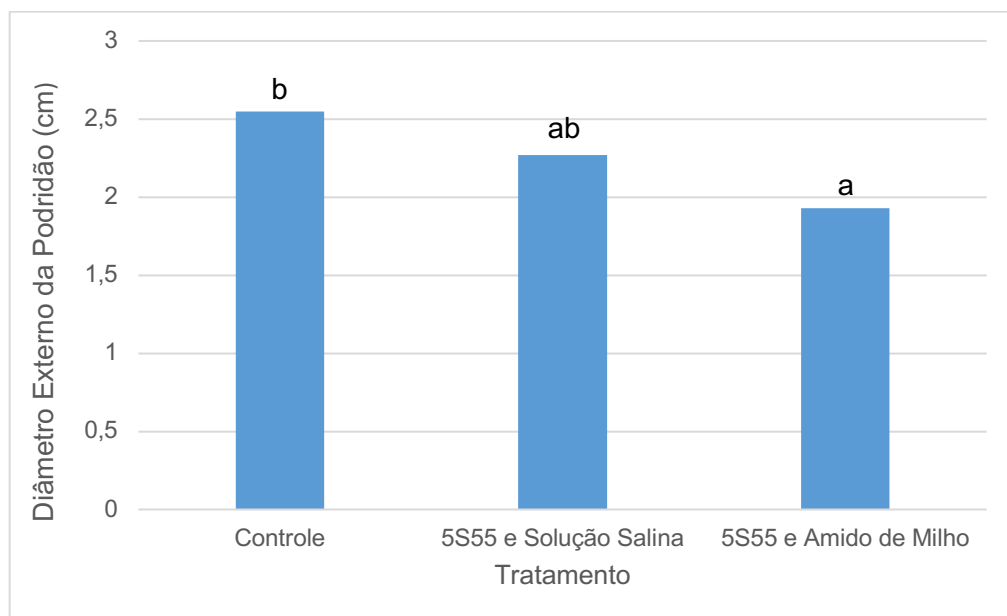
Bosqueiro (2019) testou em seu trabalho formulações contendo as leveduras *Torulaspota globosa* (5S55) e *Trichosporon asahii* (3S44) e os veículos amido de milho e gelatina incolor, ambos na concentração de 2% para avaliação da aderência das células desses microrganismos na superfície de frutos de tomate. A concentração da suspensão de células das leveduras utilizadas por Bosqueiro (2019) na formulação foi a mesma do presente trabalho, porém ao invés de inocular a formulação em feridas artificiais no fruto, os frutos foram mergulhados na formulação contendo veículo e microrganismo. Confirmando os resultados do presente estudo, o veículo que apresentou melhor desempenho foi o amido de milho, com  $1,74 \times 10^5$  UFC/g de tomate recuperadas no teste com a levedura *T. globosa*, e  $1,07 \times 10^6$  UFC/g de tomate recuperadas no teste com a levedura *T. asahii*. Os tratamentos com os dois veículos diferiram estatisticamente do tratamento controle para as duas leveduras testadas. Diferente do que foi observado no presente trabalho, a levedura *T. asahii* apresentou uma ligeira superioridade em relação à *T. globosa* no trabalho de Bosqueiro (2019), o que foi atribuído pela autora à capacidade da levedura *Trichosporon asahii* (3S44) de formar biofilme.

Bons resultados com o veículo amido de milho a 2% também foram observados por Lima et al. (2014), que testaram as leveduras *Wickerhamomyces anomalus* (linhagem 422) e *Meyerozyma guilliermondii* (linhagem 443) na pós-colheita de frutos de mamão. Para ambos os microrganismos, as maiores taxas de sobrevivência foram obtidas em 2% de amido, sendo que no tratamento com *W. anomalus* (cepa 422) e amido de milho a incidência da doença foi 48,3% menor quando comparado ao controle.



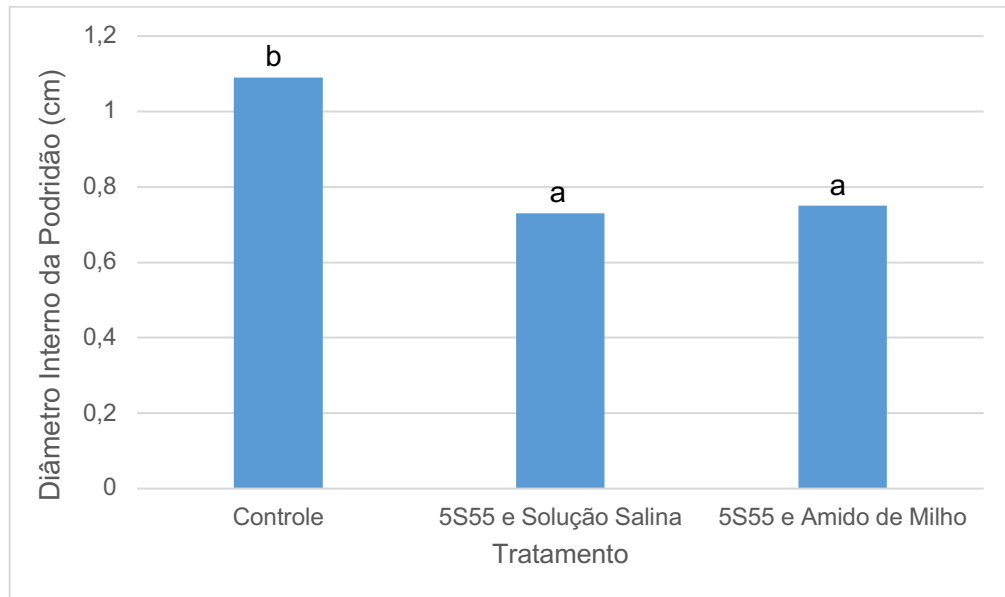
### 5.2.2. Controle do fungo pela levedura aplicada em feridas no fruto

Todas as feridas onde foi inoculado o fungo *A. alternata* apresentaram sintomas da podridão negra. A média do diâmetro da lesão externa da podridão no fruto, causada pelo fungo *A. alternata* foi de 2,55 cm no tratamento controle, 2,27 cm no tratamento com a levedura *T. globosa* e solução salina, e 1,93 cm no tratamento com a levedura e amido de milho (Figura 21). O tratamento com a levedura e o veículo amido de milho obteve o melhor resultado, apresentando o menor diâmetro de lesão, diferindo estatisticamente do tratamento controle. O tratamento com a levedura *T. globosa* e solução salina não apresentou diferença estatística do controle, nem do tratamento com a levedura e o amido de milho.



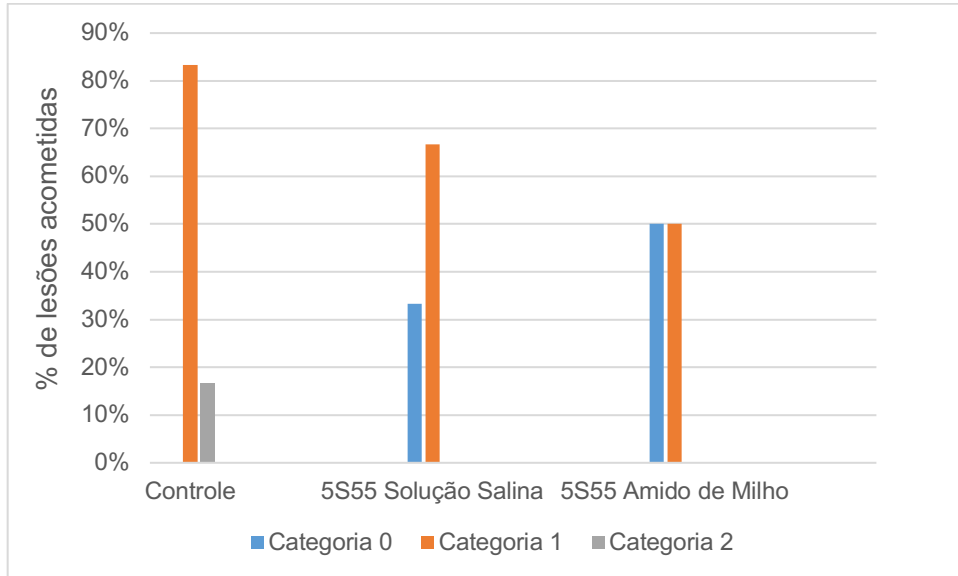
**Figura 21.** Médias do diâmetro do sintoma externo da podridão em frutos de tomate utilizados no teste de controle do fungo *A. alternata* pela levedura *T. globosa* (5S55).

Em relação ao sintoma interno, as médias foram de 1,09 cm para o controle, 0,73 e 0,75 cm para os tratamentos com a levedura e solução salina e a levedura e amido de milho, respectivamente (Figura 22). O diâmetro da lesão no tratamento controle apresentou a maior média dentre os tratamentos, diferindo-se estatisticamente dos outros dois. Os tratamentos com a levedura não diferiram estatisticamente entre si, e apresentaram resultado satisfatório em relação ao controle do sintoma interno no fruto.



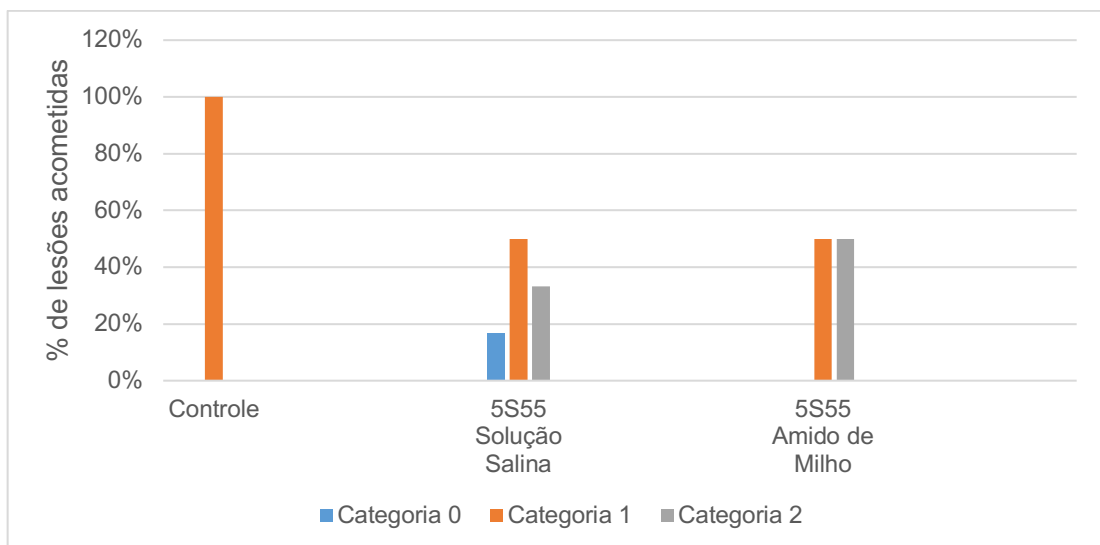
**Figura 22.** Médias do diâmetro do sintoma interno da podridão em frutos de tomate utilizados no teste de controle do fungo *A. alternata* pela levedura *T. globosa* (5S55).

Nos resultados da avaliação qualitativa em relação à presença de micélio do fungo na ferida do fruto (Figura 23), observou-se que apenas no tratamento controle ocorreram lesões na categoria 2 (caracterizada pela presença de grande quantidade de micélio). A maioria das lesões no tratamento controle encontravam-se na categoria 1, com média quantidade de micélio. Nos tratamentos com a levedura, além de não haver lesões na categoria 2, ocorreram lesões na categoria 1 (pequena a média quantidade de micélio) e categoria 0, caracterizada pela ausência de micélio visível. O tratamento com a levedura *T. globosa* e o veículo amido de milho destacou-se positivamente, apresentando 50% das lesões na categoria 0.



**Figura 23.** Características apresentadas pelas lesões com podridão (%) em relação à presença de micélio.

Quanto à presença de esporos (Figura 24), 100% das lesões no tratamento controle encontravam-se na categoria 1, caracterizada por pequena a média quantidade de esporos. No tratamento com a levedura *T. globosa* e solução salina houve lesões nas três categorias (0, 1 e 2), e no tratamento com a levedura e amido de milho, as lesões se encontravam nas categorias 1 e 2. Mesmo na presença da levedura não ocorreu diminuição significativa da quantidade de esporos do fungo *A. alternata*.



**Figura 24.** Características apresentadas pelas lesões com podridão (%) em relação à presença de esporos.

Resultados positivos em relação ao controle do fungo *Alternaria alternata* também foram observados no trabalho de Wang et al. (2008), que estudaram a ação da levedura marinha *Rhodosporidium paludigenum* Fell & Tallman no controle da podridão causada pelo fungo na pós-colheita de tomates cereja. Diferente dos estudos preliminares realizados com as leveduras *Torulaspota globosa* (5S55) e *Trichosporon asahii* (3S44) utilizadas no presente trabalho, nenhum dos tratamentos com a levedura *R. paludigenum* apresentaram inibição do fungo *A. alternata* nos ensaios *in vitro*. Os autores, em sua discussão, atribuíram ao fato de que o mecanismo de ação da levedura seria de competição por espaço e nutrientes e não por produção de compostos antimicrobianos. Os testes nos frutos foram realizados com a inoculação de 20 µl de cada um dos tratamentos em feridas (5 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade) realizadas artificialmente nos tomates. Quatro horas após a inoculação do tratamento com a levedura, foi inoculado 10 µl de  $5 \times 10^4$  esporos de *A. alternata*/mL e os frutos foram colocados em caixas plásticas com umidade controlada. A avaliação da incidência da doença foi feita após 5 dias. Também foram realizados ensaios para verificar a melhor concentração da levedura no controle do fungo no fruto e testes para avaliar o efeito do intervalo entre a aplicação da levedura e inoculação de *A. alternata*. O melhor resultado no teste *in vivo* foi obtido no tratamento com suspensão de  $1 \times 10^8$  células/mL de células lavadas da levedura *R. paludigenum*, com diminuição de 80% da incidência da doença comparado ao tratamento controle. Em relação ao teste que avaliou o tempo entre a aplicação da levedura e do fungo na ferida do fruto, foi observado que a aplicação da levedura antes do patógeno foi melhor do que a aplicação simultânea ou posterior. Tal resultado concorda com a ideia do presente estudo, de que a eficiência de ação da levedura como agente de biocontrole seria superior quando aplicada de forma preventiva e não como remediação. Outro resultado obtido no estudo de Wang et al. (2008) mostrou que quanto maior a concentração da levedura, menor a incidência da doença. Bons resultados foram observados com a concentração mais elevada de células avaliada, de  $1 \times 10^9$  células da levedura/mL. Nessa concentração ocorreu 52% de redução da incidência da doença comparado ao tratamento controle (água destilada estéril), e aproximadamente 15% de redução quando comparado ao tratamento com concentração de  $1 \times 10^8$  células de *R. paludigenum*/mL.

Segundo Patiño-Vera et al. (2005), quando os microrganismos antagonistas são aplicados diretamente nas feridas, o controle biológico de doenças de frutos é particularmente eficaz, pois as feridas são um ponto de entrada para os patógenos e um ambiente rico em nutrientes, portanto, o antagonista compete com o patógeno no espaço limitado disponível. Além disso, assim como foi observado no resultado do trabalho de Wang et al. (2008), a eficácia de muitos antagonistas de patógenos de feridas está diretamente relacionado ao número de células do microrganismo agente de biocontrole aplicados (SPADARO et al., 2010). Considerando as informações expostas, é possível supor que a lesão causada pelo fungo *Alternaria alternata* nos frutos de tomate pode ser reduzida aumentando a concentração da suspensão das leveduras inoculadas.

Os resultados obtidos por Bosqueiro (2019) em seu ensaio sobre o controle do fungo *Alternaria alternata* pela formulação contendo amido de milho (2%) e as leveduras *Torulaspota globosa* (5S55) e *Trichosporon asahii* (3S44) foram positivos, havendo diferença estatística entre o tratamento com as duas leveduras e o tratamento controle. Em relação ao diâmetro externo da lesão, no tratamento com a levedura *T. globosa* foi observado uma inibição de 15,7% comparado ao tratamento controle, já no presente trabalho essa inibição foi ligeiramente superior, com 24,28% de redução do diâmetro da lesão. Bosqueiro (2019) não avaliou o diâmetro interno da lesão, porém, neste estudo, observamos que o controle da doença foi maior internamente, apresentando 31,75% de redução. A respeito da avaliação qualitativa, neste estudo observamos que na presença da levedura *T. globosa* com o veículo amido de milho (2%) ocorreu diminuição da quantidade de micélio e aumento da produção de esporos, e no trabalho de Bosqueiro (2019), que avaliou a quantidade produzida de micélio e esporos das duas leveduras juntamente com o veículo amido de milho (2%), foi observado uma diminuição tanto da quantidade de micélio quanto da quantidade de esporos na presença das leveduras, com destaque positivo para a levedura *Trichosporon asahii* (3S44). Em geral, a levedura *Trichosporon asahii* (3S44) apresentou superioridade nos resultados obtidos por Bosqueiro (2019), e no presente estudo o contrário foi observado, com melhores resultados nos tratamentos com a levedura *Torulaspota globosa* (5S55).

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados observados neste trabalho, concluímos que a levedura rizosférica *Torulaspota globosa* (5S55) apresenta atividade de biocontrole contra o fungo *Alternaria alternata* em frutos de tomate na pós-colheita.

O controle da podridão foi mais eficiente quando células da levedura foram aplicadas na ferida realizada na superfície do fruto. Pouco controle do fungo fitopatogênico foi observado através da produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos pela levedura.

Foi observada influência do veículo na sobrevivência das células de levedura na superfície do fruto, sendo que os melhores resultados foram obtidos no emprego de amido de milho na concentração de 2%.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIAS, M.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; VIÑAS, I. Liquid Formulation of the Postharvest Biocontrol Agent *Candida sake* CPA-1 in Isotonic Solutions. **Phytopatology**, v. 93, n. 4, p. 436-442, 2003.
- ABDOLAH, A.; HASSANI, A.; GHOSTA, Y.; JAVANDI, T.; MESHKATALSADAT, M. H. Essential oils as control agents of postharvest *Alternaria* and *Penicillium* rots on tomato fruits. **Journal of Food Safety**, v. 30, n. 2, p. 341-352, 2009.
- AGUIRRE-GÜITRÓN, L.; CALDERÓN-SANTOYO, M.; BAUTISTA-ROSALES, P. U.; RAGAZZO-SÁNCHEZ, J. A. Application of powder formulation of *Meyerozyma caribbica* for postharvest control of *Colletotrichum gloeosporioides* in mango (*Mangifera indica* L.). **Food Science and Technology**, v. 113, p. 1-6, 2019.
- AHMAD, A.; SHAFIQUE, S.; SHAFIQUE, S. Cytological and physiological basis for tomato varietal resistance against *Alternaria alternata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 93, n. 9, p. 2315-2322, 2013.
- BARKAI-GOLAN, R.; PASTER, N. Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 1. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 4, p 385-396, 2008.
- BASURTO, D. E.; QUINTANAR, M. I. V.; ESTRADA, A, S.; HERNÁNDEZ, M. E. T.; FÉLIX, A. R.; ROJAS, R. T. Alterations in volatile metabolites profile of fresh tomatoes in response to *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 1912 infection. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 77, n. 3, p. 194-201, 2017.
- BENDO, M. I.; VIECELLI, C. A. Controle biológico de *Rhizopus nigricans* em pós-colheita de morango pela utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e leite *in natura*. **Cultivando o Saber**, v. 2, n. 3, p. 23-35, Cascavel-PR, 2009.
- BIZARRIA JÚNIOR, R. Potencial de *Torulaspora globosa* e *Rhodotorula mucilaginosa* como agentes de controle biológico de *Alternaria alternata* em tomate. 2016. 42 f. **TCC (Graduação) - Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas**, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2016.
- BOSQUEIRO, A.S.; BIZARRIA JÚNIOR, R.; ROSA-MAGRI, M.M. Potencial de *Trichosporon asahii* contra *Alternaria* sp. e mecanismos de ação. **Summa Phytopathologica**, v. 46, n. 1, p. 1-6, 2020.

BOSQUEIRO, A. S. Leveduras como agentes de controle de *Alternaria alternata* em tomates no pós-colheita: mecanismos, resistência a estresses e formulação. 96 f. **Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados**, Universidade Federal de São Carlos. Araras, 2019.

BOSQUEIRO, A. S. Potencial de *Meyerozyma guilliermondii* e *Trichosporon asahii* como agentes de controle biológico de *Alternaria alternata* em tomate. 2016. 36 f. **TCC (Graduação) - Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas**, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2016.

BRITO JUNIOR, F. P. Produção de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) reutilizando substratos sob cultivo protegido no município de Iranduba-Am. **Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amazonas**, p. 61, 2012.

CABRINI, P. G.; SALA, F. C.; ROSA-MAGRI, M. M. *Torulaspora globosa*: rhizosphere yeast promoting lettuce growth on seedlings and under field conditions. **Horticultura brasileira**, v. 37, n. 3, p. 266-271, Brasília, 2019.

CARBÓ, A.; TORRES, R.; USALL, J.; SOLSONA, C.; TEIXIDÓ, N. Fluidised-bed spray-drying formulations of *Candida sake* CPA-1 by adding biodegradable coatings to enhance their survival under stress conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 21, p. 7865-7876, 2017.

CEAGESP. Programa Brasileiro para Modernização da Horticultura. Normas de Classificação do Tomate. Centro de Qualidade em Horticultura. CHQ/CEAGESP. 2003. São Paulo (CHQ. Documentos, 26). Disponível em :<folheto TOMATE.cdr (ceagesp.gov.br)> Acesso em: 23 de dezembro de 2020.

CHEN, P.; CHEN, R.; CHOU, J. Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* on Strawberry Fruits. **Mycobiology**, v. 46, n. 1, p. 33-46, 2018.

COELHO, A. R.; HOFFMANN, F. L.; HIROOKA, E. Y. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 2, p. 337–358, 2003.



CONTARINO, R.; BRIGHINA, S.; FALLICO, B.; CIRVILLERI, G.; PARAFATI, L.; RESTUCCIA, C. Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. **Food Microbiology**, v. 82, p. 70-74, 2019.

CORATO, U.; SALIMBENI, R.; PRETIS, A.; AVELLA, N.; PATRUNO, G. Use of alginate for extending shelf life in a lyophilized yeast-based formulate in controlling green mould disease on citrus fruit under postharvest condition. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 15, p. 76-86, 2018.

DI FRANCESCO, A.; UGOLINI, L.; LAZZERI, L.; MARI, M. Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. **Biological Control**, v. 81, p. 8-14, 2015.

DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; MACARISIN, D.; WILSON, C. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? Postharvest **Biology and Technology**, v. 52, p. 137-145, 2009.

DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; TEIXIDÓ, N.; SPADARO, D.; JIJAKLI, M. H. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. **Postharvest Biology and Technology**, v. 122, p. 22–29, dez. 2016.

DUKARE, A. S.; PAUL, S.; NAMBI, V. E.; GUPTA, R. K.; SINGH, R.; SHARMA, K.; VISHWAKARMA, R. K. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 9, p. 1498-1513, 2019.

FALLIK, E.; AHARONI, Y.; GRINBERG, S.; COPEL, A.; KLEIN, J. D. Postharvest hydrogen peroxide treatment inhibits decay in eggplant and sweet red pepper. **Crop Protection**, v. 13, n. 6, p. 451-454, 1994.

FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistic. Tomatoes. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> Acesso em: 18 de Abril de 2020.

FOOD INGREDIENTS BRASIL – O amido e suas propriedades para o setor alimentício. **Revista Food Ingredients Brasil**, n. 35, 2015. Disponível em: <[https://revistafi.com.br/upload\\_arquivos/201606/2016060302306001466693820.pdf](https://revistafi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060302306001466693820.pdf)>. Acesso em: 21 de Setembro de 2020.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; NAVARRO DA SILVA, A. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008.

GOMES, A. M. A.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Tratamento pós-colheita com cálcio e microrganismos para controle da podridão-mole em tomate. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 108–111, 2005.

GOTOR-VILA, A.; USALL, J.; TORRES, R.; ABADIAS, M.; TEIXIDÓ, N. Formulation of the biocontrol agente *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 using different approaches: liquid, freeze-drying and fluid-bed spray-drying. **BioControl**, v. 62, n. 4, p. 545-555, 2017.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE – **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Estatística da Produção Agrícola. Dezembro, 2019.

JANISIEWICZ, W. J.; TWORKOSKI, T. J.; SHARER, C. Characterizing the Mechanism of Biological Control of Postharvest Diseases on Fruits with a Simple Method to Study Competition for Nutrients. **Phytopathology**, v. 90, n. 11, p. 1196–1200, 2000.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A. Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos: Uma preocupação Ambiental Global – Um Enfoque às Maçãs. **Química Nova**, v. 32 n. 4, São Paulo, 2009.

KALOGIANNIS, S.; TJAMOS, S. E.; STERGIIOU, A.; ANTONIOU, P. P.; ZIOGAS, B. N.; TJAMOS, E. C. Selection and evaluation of phyllosphere yeasts as a biocontrol agents against grey mould of tomato. **European Journal of Plant Pathology**, v. 116, p. 69-76, 2006.

KOBILER, I.; AKERMAN, M.; HUBERMAN, L.; PRUSKY, D. Integration of pre-and postharvest treatments for the control of black spot caused by *Alternaria alternata* in stored persimmon fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 59, n. 2, p. 166-171, 2011.

KORPI, A.; JÄRNBERG, J.; PASANEN, A. L. Microbial volatile organic compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 39, n. 2, p. 139-193, 2009.

LIMA, G.; CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; RAIOLA, A.; RITIENI, A.; DE CICCO, V. Integrated control of blue mould using new fungicides and biocontrol yeasts lowers levels of fungicide residues and patulin contamination in apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 60, p. 164-172, 2011.

LIMA, J. R.; VIANA, F. M. P.; LIMA, F. A.; PIENIZ, V.; GONÇALVES, L. R. B. Efficiency of a yeast-based formulation for the biocontrol of postharvest anthracnose of papayas. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 3, p. 203-211, 2014.

MARÍN, A.; CHÁFER, M.; ATARÉS, L.; CHIRALT, A.; TORRES, R.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N. Effect of diferente coating-forming agents on the efficacy of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* on grapes. **Biological Control**, v. 96, p. 108-119, 2016.

MELIN, P.; HÅKANSSON, S.; SCHNÜRER, J. Optimisation and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 5, p. 1008-1016, 2006.

MICROBE NOTES – Online Microbiology and Biology Notes. *Alternaria alternata* – An Overview (12 de Junho de 2020). Disponível em: <<https://microbenotes.com/alternaria-alternata/>>. Acesso em: 18 de Novembro de 2020.

MORENO, M.Á.P.; ALONSO, I.G.; SANTOS, R.M.; LACARRA. Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. **Nutrición Hospitalaria**, v. 27, n. 6, p. 1772-1781, 2012.

MUNIZ, P. H. P. C.; OLIVEIRA, J. B.; PEIXOTO, G. H. S.; RODRIGUES, F.; CARVALHO, D. D. C. Caracterização morfológica de *Alternaria alternata* (Fr.: Fr.) Keissl. ocorrente em solanáceas. **Revista Agropecuária Técnica**, v. 7467, p. 43-49, 2018.

PARAFATI, L.; VITALE, A.; RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI, G. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. **Food Microbiology**, v. 47, p. 85-92, 2015.

PARISI, M. C. M. Doenças Pós-colheita. **APTA Regional**. Governo do Estado de São Paulo. nov. 2015.

PATIÑO-VERA, M.; JIMÉNEZ, B.; BALDERAS, K.; ORTIZ, M.; ALLENDE, R.; CARRILLO, A.; GALINDO, E. Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 540-550, 2005.

PEIXOTO, Celma Cardoso. Caracterização molecular, morfológica e biológica do agente etiológico da pinta-preta em solanáceas no Brasil. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – **Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

PEREZ, M. F.; CONTRERAS, L.; GARNICA, N. M.; FERNÁNDEZ-ZENOFF, M. V.; FARIAS, M. E.; SEPULVEDA, M.; RAMALLO, J.; DIB, J. R. Native Killer Yeasts as a Biocontrol Agents of Postharvest Fungal Diseases in Lemons. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1-22, 2016.

PINTO, I. A.; Análise do crescimento inicial de *Solanum lycopersicum L.* Variedade Roqueso (Tomate) cultivado em associação com fungos micorrízicos. **Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo**. Vitória, 2014.

PRUSKY, D.; KOBILER, I.; AKERMAN, M.; MIYARA, I. Effect of acidic solutions and acidic prochloraz on the control of postharvest decay caused by *Alternaria alternate* in mango and persimmon fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 42, n. 2, p. 134-141, 2006.

REDDY, M. V. B.; ANGERS, P.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Chitosan Effects on Blackmold Rot and Pathogenic Factors Produced by *Alternaria alternate* in Postharvest Tomatoes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 125, n. 6, p. 742-747, 2000.

ROSA-MAGRI, M. M.; AVANSINI, S. H.; LOPES-ASSAD, M. L.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Release of potassium from rock powder by the yeast *Torulaspota globosa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 4, p. 577–582, 2012.

ROSA, M. M. M.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; RAMPAZZO, P. E.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspota globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 1491–1502, 2010.

RUNGJINDAMAI, N. Isolation and evaluation of biocontrol agents in controlling anthracnose disease of mango in Thailand. **Journal of Plant Protection Research**, v. 56, n. 3, p. 306-311, 2016.

SAITO, L. R.; SALES, L. L. S. R.; MARTINCKOSKI, L.; ROYER, R.; RAMOS, M. S.; REFFATTI, T.. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, n. 3, p. 203–216, 2009.

SARAVANAKUMAR, D.; CIAVORELLA, A.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, n. 1, p. 121-128, 2008.

SCARCELLA, A. S. A.; BIZZARIA JUNIOR, R.; BASTOS, R. G.; ROSA-MAGRI, M. M. Temperature, ph and carbon source, affect drastically indole acetic acid production of plant growth promoting yeasts. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 429–438, 2017.

SPADARO, D.; CIAVORELLA, A.; DIANPENG, Z.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Effect of culture media and pH on the biomass production and biocontrol efficacy of a *Metschnikowia pulcherrima* strain to be used as a biofungicide for postharvest disease control. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, p. 128-137, 2010.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. Alternarioses em hortaliças: sintomatologia, etiologia e manejo integrado. (Divulgação Técnica, 66). São Paulo: **Instituto Biológico**, v. 66, n. ½, p. 23-33, 2004.

VILAPLANA, R.; PÁEZ, D.; VALENCIA-CHAMORRO, S. Control of black rot caused by *Alternaria alternate* in yellow pitahaya (*Selenicereus megalanthus*) through hot water dips. **Food Science and Technology**, v. 82, p. 162-169, 2017.

VIÑAS, I.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; SANCHIS, V. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 40, p. 9-16, 1998.

WANG, Y.; BAO, Y.; SHEN, D.; FENG, W.; YU, T.; ZHANG, J.; ZHENG, X. D. Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast

*Rhodosporidium paludigenum* Fell & Tallman. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 234-239, 2008.

WOUDENBERG, J. H. C.; GROENEWALD, J. Z.; BINDER, M.; CROUS, P. W. *Alternaria* redefined. **Studies in Mycology**, v. 75, p. 171-212, 2013.

YUAN, S.; LI, W.; LI, Q.; WANG, L.; CAO, J.; JIANG, W. Defense Responses, Induced by *p*-Coumaric Acid and Methyl *p*-Coumarate, of Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) Fruit against Black Spot Rot Caused by *Alternaria alternata*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 10, p. 2801-2810, 2019.

ZHANG, Y.; LI, T.; LIU, Y.; LI, X.; ZHANG, C.; FENG, Z.; PENG, X.; LI, Z.; QIN, S.; XING, K. Volatile Organic Compounds Produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* SPS-41 as Biological Fumigants to Control *Ceratocystis fimbriata* in Postharvest Sweet Potatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 13, p. 3702-3710, 2019.

ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S. de. Controle Biológico de Fungos Aflatoxigênicos. Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas. **Embrapa Meio Ambiente**. Capítulo 5. Jaguariúna, 2009. p. 69-84.