

MARIA LUIZA SILVA FAZIO

**CARÁTER “KILLER” E ANTAGONISMO DE
LEVEDURAS APLICADAS NO BIOCONTROLE DE
FITOPATÓGENOS MICOTOXIGÊNICOS
EM FRUTA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos (Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

Orientador: Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann

São José do Rio Preto
2009

MARIA LUIZA SILVA FAZIO

**CARÁTER “KILLER” E ANTAGONISMO DE LEVEDURAS
APLICADAS NO BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS
MICOTOXIGÊNICOS EM FRUTA**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTORA

Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann
Presidente e Orientador

Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho
2º. Examinador

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
3º. Examinador

Prof. Dr. Roberto da Silva
4º. Examinador

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
5º. Examinador

São José do Rio Preto, 21 de agosto de 2009.

DADOS CURRICULARES**MARIA LUIZA SILVA FAZIO**

NASCIMENTO: 23.11.1974 - Catanduva - SP

FILIAÇÃO: Alcides Tinti Fazio
Zaira Aparecida Silva Fazio

1994/1998: Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos -
Universidade Estadual Paulista - UNESP - SP

2004/2006: Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de
Alimentos (Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos), nível de Mestrado, no Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista
(UNESP) - Campus de São José do Rio Preto - SP

2006/2009: Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de
Alimentos (Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos), nível de Doutorado, no Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista
(UNESP) - Campus de São José do Rio Preto - SP

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE), Universidade Estadual Paulista (UNESP).

A Deus, que está sempre presente em todos os momentos de minha vida dando saúde, perseverança e força;

Aos meus pais, Alcides e Zaira, e irmã Ana Paula, pelo amor, compreensão, colaboração e incentivo em mais uma etapa de minha vida;

Aos meus sobrinhos, Victor, Jullia e Guilherme por existirem, sendo sempre razão de alegria e incentivo em tudo o que faço.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann, pela incomparável orientação, colaboração, confiança, paciência, compreensão e amizade, sem as quais este trabalho não seria concretizado;

Ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro no ano de 2006;

Aos membros titulares, Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho, Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka, Prof. Dr. Roberto da Silva, Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi e suplentes, Dra. Miyoko Jakabi, Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, e Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz da banca examinadora, pelas valiosas sugestões que contribuíram para a melhoria desta Tese;

À Tânia Maria Vinturim Gonçalves, pelo apoio, carinho, paciência e amizade para comigo;

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação Juliano e Ana Paula, pelo incentivo, amizade e auxílio;

Ao Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho, pelo auxílio prestado;

Aos professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pelo apoio e incentivo;

À funcionária da Seção de Pós-Graduação, Rosana Ferri, pelo apoio, incentivo e amizade;

À minha família e amigos que sempre acreditaram e torceram por mim;

Ao meu cunhado Valdir, pela colaboração;

Ao meu amor Fernando Tomaz dos Santos por acreditar e torcer por mim sempre;

À minha irmã Ana Paula, pelo amor, cumplicidade, confiança e por estar sempre me incentivando;

Aos meus pais Alcides e Zaira, pelo amor, exemplo de vida e esforços realizados para a minha formação.

*”O covarde nunca começa,
o fracassado nunca termina,
o vencedor nunca desiste”.*

Norman Vicent Peale

RESUMO

As exportações brasileiras de frutas frescas têm sido pauta de destaque nas discussões de alternativas na geração de divisas para o país no comércio internacional. O alto valor agregado do produto e, muitas vezes, sua reconhecida qualidade, garantem perspectivas positivas para o setor frutícola no mercado externo. Entre outros fatores, as consideráveis perdas nas culturas de importância econômica resultam da susceptibilidade das frutas à infecção fúngica, desencadeada pelos fatores ambientais (temperatura, umidade) e danos mecânicos na colheita e estocagem. Os métodos de controle biológico constituem alternativas viáveis em relação ao químico tradicional, principalmente por não deixarem resíduos tóxicos nas frutas tratadas. Foi empregado um total de cento e vinte e cinco leveduras isoladas de polpas congeladas de frutas e formigueiro no estudo de características antagônicas e presença de fator "killer". O sobrenadante obtido do cultivo de *Dekkera bruxellensis* PF58₃ exerceu o melhor efeito inibitório sobre o crescimento de hifas e germinação de esporos de *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium expansum*. A atividade antifúngica de *D. bruxellensis* PF58₃ é possivelmente devido à produção de uma enzima extracelular e não está associado ao caráter "killer". As prováveis toxinas "killer" produzidas por *Saccharomyces cerevisiae* PF3₄ são codificadas por plasmídeos que foram perdidos no tratamento térmico. A produção de toxina por *Pichia anomala* 142 é provavelmente cromossomal. Para os testes *in vivo*, com relação à levedura *D. bruxellensis* PF58₃ a melhor eficácia de controle foi evidenciada pelos tratamentos C (30 µL da suspensão de células antagonistas no fungicida Tecto SC[®] à baixa dosagem - 10% da dosagem recomendada pelo fabricante) e E (30 µL do fungicida em dosagem recomendada pelo fabricante - 400 mL/100L) para *A. ochraceus* e *P. expansum*. Os valores obtidos foram de, respectivamente, 100 e 100%, 87,5 e 100%. No que se refere ao agente biológico *S. cerevisiae* PF3₄, a melhor eficácia de controle de *P. expansum* foi exibida pelo fungicida aplicado em dosagem completa (EC=100%). Para *A. ochraceus*, as eficácias de controle obtidas para os tratamentos A (30 µL de água destilada estéril), B (30 µL da suspensão de células antagonistas), C, D (30 µL do fungicida em baixa dosagem - 40 mL/100 L) e E foram, respectivamente, 33,3, 66,6, 66,6 e 33,3%. Para a antagonista *P. anomala* 142 a melhor eficácia de controle foi verificada a partir dos tratamentos B e E

para *A. ochraceus* (100%) e tratamento E para *P. expansum* (87,5%). A combinação da levedura com baixa dosagem do fungicida é uma estratégia de controle muito interessante do ponto de vista econômico e técnico. Tal combinação apresenta diversos efeitos positivos, dentre os quais; melhor controle da podridão e prolongada armazenagem da fruta, redução dos riscos de resistência do patógeno ao fungicida e redução do risco de acúmulo de resíduos tóxicos na fruta.

ABSTRACT

The Brazilian exports of fresh fruits have been prominent agenda in the discussions on alternatives in the conceiving of borders for the country in the international trade. The accumulated high value of the product and, several times, its recognized quality, guarantee positive perspectives on the fruit sector in the external market. Among other factors, considerable losses in the cultures of economic importance result from the susceptibility of fruits to fungal disease caused by environmental factors (temperature, moisture) and mechanical damage in the harvest and storage. The methods of biological control constitute feasible alternatives in relation to the traditional chemical, mainly because they don't let toxic waste in the treated fruits. It was used one hundred and twenty five yeasts isolated from fruit frozen pulp and ants' nest in the study of the antagonistic characteristics and presence of killer factor. The supernatant obtained from the *Dekkera bruxellensis* PF58₃ cultivation showed the best inhibitory effect on the micelial growth and conidia germination of *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium expansum*. The antifungal activity of *D. bruxellensis* PF58₃ is possibly due to the production of an extracellular enzyme and it isn't associated with the killer phenomenon. The probable killer toxins produced by *Saccharomyces cerevisiae* PF3₄ are codified by plasmids that were lost in the thermal treatment. The toxin production by *Pichia anomala* 142 is probably chromosomal. For the in vivo assays, in relation to the yeast *D. bruxellensis* PF58₃ the best control efficacy was showed by the treatment C (30 µL of antagonist cell suspension in a low dose of the fungicide Tecto SC[®] - 10% of the full label dose) and E (30 µL of fungicide at the full label dose - 400 mL/100L) for *A. ochraceus* and *P. expansum*. The values obtained were 100 and 100%, 87.5 and 100%, respectively. In relation to the biological agent *S. cerevisiae* PF3₄, the best control efficacy on *P. expansum* was showed by the fungicide applied in complete dosage (CE=100%). For *A. ochraceus* the control efficacy obtained for the treatments A (30 µL of sterile distilled water), B (30 µL of antagonist cell suspension), C, D (30 µL of fungicide at a low dose - 40 mL/100 L) and E was 33.3, 66.6, 66.6 and 33.3%, respectively. The best control efficacy for the antagonist *P. anomala* 142 was verified for the treatments B (yeast individually) and E (fungicide in complete dosage) for *A.*

ochraceus (100%) and treatment E for *P. expansum* (87.5%). The yeast integration with low dosage on fungicide is a control strategy very interesting from the economic and technical point of view. Such integration has several positive effects, among which best control of rottenness and prolonged fruit storage, reduction of risks of pathogen resistance to the fungicide and risk reduction of toxic waste accumulation in the fruit.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1. Fungos testes	49
4.2. Leveduras antagonistas	49
4.3. Caracterização de leveduras “killer”	49
4.4. Atividade antifúngica em meio sólido	50
4.5. Teste com sobrenadante de cultivo	50
4.5.1. Obtenção do extrato bruto	
4.5.2. Atividade antifúngica em meio líquido	
4.6. Cura de linhagem “killer” por tratamento térmico	51
4.7. Análise estatística	52
4.8. Atividade antifúngica em maçã	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Leveduras isoladas e respectivos códigos empregados nos ensaios	54
Tabela 2. Identificação de leveduras positivas para o fator “killer” empregando leveduras sensíveis de referência	56
Tabela 3. Efeito antagônico de leveduras (células íntegras) no desenvolvimento de <i>A. ochraceus</i> , <i>F. verticillioides</i> e <i>P. expansum</i>	58
Tabela 4. Antifungigrama em meio líquido com sobrenadante do cultivo obtido de levedura e da interação levedura/ <i>A. ochraceus</i>	63
Tabela 5. Antifungigrama em meio líquido com sobrenadante do cultivo obtido de levedura e da interação levedura/ <i>F. verticillioides</i>	68
Tabela 6. Antifungigrama em meio líquido com sobrenadante do cultivo obtido de levedura e da interação levedura/ <i>P. expansum</i>	73
Tabela 7. Antifungigrama em meio líquido com sobrenadante do cultivo obtido de levedura após tratamento térmico a 42°C/48 horas	78
Tabela 8. Porcentagem de eficácia de controle dos tratamentos (PF58 ₃) sobre o desenvolvimento de <i>A. ochraceus</i> e <i>P. expansum</i>	79
Tabela 9. Porcentagem de lesões infectadas nos tratamentos (PF58 ₃) sobre o desenvolvimento de <i>A. ochraceus</i> e <i>P. expansum</i>	80
Tabela 10. Porcentagem de eficácia de controle dos tratamentos (PF3 ₄) sobre o desenvolvimento de <i>A. ochraceus</i> e <i>P. expansum</i>	83
Tabela 11. Porcentagem de lesões infectadas nos tratamentos (PF3 ₄) sobre o desenvolvimento de <i>A. ochraceus</i> e <i>P. expansum</i>	83
Tabela 12. Porcentagem de eficácia de controle dos tratamentos (142) sobre o desenvolvimento de <i>A. ochraceus</i> e <i>P. expansum</i>	86
Tabela 13. Porcentagem de lesões infectadas nos tratamentos (142) sobre o desenvolvimento de <i>A. ochraceus</i> e <i>P. expansum</i>	86

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *D. bruxellensis* PF 58₃ e da interação *D. bruxellensis* PF 58₃ /*A. ochraceus* no crescimento de hifas e germinação de esporos de *A. ochraceus* (10⁵ esporos), após 12 horas de incubação a 25°C 64
- Figura 2.** Efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *D. bruxellensis* PF 58₃ e da interação *D. bruxellensis* PF 58₃ /*F. verticillioides* no crescimento de hifas e germinação de esporos de *F. verticillioides* (10⁵ esporos), após 12 horas de incubação a 25°C 69
- Figura 3.** Efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *D. bruxellensis* PF 58₃ e da interação *D. bruxellensis* PF 58₃ /*P. expansum* no crescimento de hifas e germinação de esporos de *P. expansum* (10⁵ esporos), após 12 horas de incubação a 25°C 74
- Figura 4.** Efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *P. anomala* 142 e da interação *P. anomala* 142 /*A. ochraceus* no crescimento de hifas e germinação de esporos de *A. ochraceus* (10⁵ esporos), após 12 horas de incubação a 25°C 65
- Figura 5.** Efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *P. anomala* 142 e da interação *P. anomala* 142 /*F. verticillioides* no crescimento de hifas e germinação de esporos de *F. verticillioides* (10⁵ esporos), após 12 horas de incubação a 25°C 70
- Figura 6.** Efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *P. anomala* 142 e da interação *P. anomala* 142 /*P. expansum* no crescimento de hifas e germinação de esporos de *P. expansum* (10⁵ esporos), após 12 horas de incubação a 25°C 75
- Figura 7.** Efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *S. cerevisiae* PF 3₄ e da interação *S. saccharomyces* PF 3₄ /*A. ochraceus* no crescimento de hifas e germinação de esporos de *A. ochraceus* (10⁵ esporos), após 12 horas de incubação a 25°C 66
- Figura 8.** Efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *S. cerevisiae* PF 3₄ e da interação *S. saccharomyces* PF 3₄ /*F. verticillioides* no crescimento de hifas e germinação de esporos de *F. verticillioides* (10⁵ esporos), após 12 horas de incubação a 25°C 71
- Figura 9.** Efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *S. cerevisiae* PF 3₄ e da interação *S. saccharomyces* PF 3₄ /*P. expansum* no crescimento de hifas e germinação de esporos de *P. expansum* (10⁵ esporos), após 12 horas de incubação a 25°C 76

- Figura 10.** Maças submetidas a diferentes tratamentos (biológico, químico ou controle integrado) após 21 dias de armazenagem a 21°C 81
- Figura 11.** Maças submetidas a diferentes tratamentos (biológico, químico ou controle integrado) após 21 dias de armazenagem a 21°C 84
- Figura 12.** Maças submetidas a diferentes tratamentos (biológico, químico ou controle integrado) após 21 dias de armazenagem a 21°C 87

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem na agricultura uma das bases mais potentes da economia, garantindo o fornecimento contínuo de cereais, oleaginosas, hortaliças, frutas e derivados oriundos de processamento (COELHO; HOFFMANN; HIROOKA, 2003). A produção de fruta brasileira superou os 38 milhões de toneladas em 2002, classificando o país entre os quatro maiores produtores mundiais juntamente com a China, Índia e EUA (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS - IBRAF, 2005; FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO, 2005).

As exportações brasileiras de frutas frescas têm sido pauta de destaque nas discussões de alternativas na geração de divisas para o país no comércio internacional. O alto valor agregado do produto e, muitas vezes, sua reconhecida qualidade, garantem perspectivas positivas para o setor frutícola no mercado externo. Conhecer o mercado internacional está sendo um desafio para os produtores brasileiros de frutas frescas que, cada vez mais, querem conquistar uma fatia desse atraente canal de comercialização. O Brasil, em função de suas condições climáticas, apresenta um enorme potencial para se tornar um dos maiores pólos produtivos de frutas frescas para o mercado mundial, aproveitando a onda naturalista que o mundo atravessa. A Europa é uma grande compradora do produto brasileiro, chegando a importar em torno de 63% do volume total das frutas brasileiras (CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA - CEPEA, 2007).

O consumo de frutas no Brasil e no mundo tem crescido a taxas elevadas. O consumo per capita brasileiro de frutas, de 57 kg/pessoa/ano, equivale a um terço do consumo europeu e do norte americano (140 e 150 kg/pessoa/ano, respectivamente) (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2007).

O melão liderou a exportação brasileira de frutas frescas em fevereiro de 2007, com um volume de 19.249.686 Kg; seguido pela maçã 16.100.981 e banana 15.477.533 (IBRAF, 2007).

Com relação ao ano de 2008 os maiores volumes exportados foram representados por melões (211.789,635 kg); seguidos por mangas (133.724,756 kg), bananas (130.887,737 kg) e maçãs (112.249,624 kg) (IBRAF, 2009).

Entre outros fatores, as consideráveis perdas nas culturas de importância econômica resultam da susceptibilidade das frutas à infecção fúngica, desencadeada pelos fatores ambientais (temperatura, umidade) e danos mecânicos na colheita e estocagem (COELHO; HOFFMANN; HIROOKA, 2003). Em adição, a globalização do consumo de frutas e a procura por produtos naturais saudáveis, requerem segurança na qualidade, devendo-se direcionar atenção ao potencial toxigênico de fungos associados predominantemente no transporte e armazenagem. Ênfase especial deve ser dada ao risco de patulina e ocratoxina, além de outras micotoxinas oriundas de exposição a novos sistemas de manutenção de frutos frescos (JELINEK; PHOLAND; WOOD, 1989; PICCI, 1992; FALLIK et al., 1996).

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos provenientes de vias biossintéticas comuns em fungos, que proliferam em produtos agrícolas destinados a alimentação humana e animal (GOLDBLATT, 1977; BEUCHAT, 1987; HARISSON, 1989; ABARCA et al., 2001).

Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria* são os principais representantes fúngicos responsáveis pela produção de micotoxinas numa ampla variedade de produtos agrícolas (BLUNDEN et al., 1991; HUSSEIN; BRASEL, 2001).

A aplicação indiscriminada de fungicidas sintéticos vem sendo desencorajada por afetar a saúde humana e o ecossistema, aliada ao aumento da resistência antimicrobiana, com surgimento de cepas fúngicas resistentes (JANISIEWICZ; PETERSON; BORS, 1994; JANISIEWICZ, 1996; ARRAS et al., 1998; SUGAR; SPOTTS, 1999).

Os métodos de controle biológico constituem alternativas viáveis em relação ao químico tradicional, principalmente por não deixarem resíduos tóxicos nas frutas tratadas (WILSON; WISNIEWSKI, 1994).

Em vista da situação, abre-se perspectiva para o biocontrole empregando leveduras, devido à baixa possibilidade micotoxigênica deste grupo elegido para os processos fermentativos, não tendo sido relatado casos de micotoxicose (JANISIEWICZ, 1996).

O controle biológico na pós-colheita realçou o potencial de microrganismos antagonistas, porém contra determinados patógenos e em hospedeiros específicos, não

se podendo generalizar a aplicação para todos os produtos agrícolas. Os estudos visando identificação de antagonistas portadores de amplo espectro de atividade são promissores (MARI; GUIZZARDI, 1998).

Determinadas leveduras apresentam o fator “killer”, capaz de inibir o desenvolvimento de outros microrganismos. O fator é um peptídeo tóxico liberado no meio de cultivo, sendo detectado nos gêneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis* (PHILLISKIRK; YOUNG, 1975; YOUNG, 1981), *Ustilago* (KANDEL; KOLTIN, 1978), *Rhodotorula*, *Trichosporon* (MORACE et al., 1984), *Hanseniaspora* (RADLER; PFEIFFER; DENNART, 1985), *Williopsis*, *Zygowilliopsis* (KAZANTSEVA; ZIMINA, 1989) e *Zygosaccharomyces* (RADLER et al., 1993). Fungos filamentosos também podem ser susceptíveis às leveduras “killer”, constatando-se *Saccharomyces cerevisiae* (WALKER; MCLEOD; HODGSON, 1995) e *Sporobolomyces roseus* (JANISIEWICZ; PETERSON; BORS, 1994) entre as linhagens com maior potencial antagonico.

Num processo fermentativo, a capacidade de produzir a toxina “killer” pode conferir uma vantagem sobre o desenvolvimento de linhagens competitivas mais sensíveis (SOARES; SATO, 2000).

As evidências indicaram atuação na membrana de células sensíveis, reduzindo o pH intracelular e causando conseqüente extravasamento de íons potássio e ATP (Adenosina Trifosfato), entre outros (DE LA PEÑA et al., 1981; MARTINAC et al., 1990). O transporte de aminoácidos e a bomba de prótons também foram inibidos (SKIPPER; BUSSEY, 1977).

Muitas toxinas de leveduras são glicoproteínas formadoras de prótons capazes de originar canais iônicos (MARTINAC et al., 1990), resultando em desestabilização do potencial eletroquímico da membrana e eventual morte celular.

Estudos sobre a natureza do fator “killer” produzido por *Saccharomyces* têm mostrado que esta proteína tem um espectro de ação altamente específico e é dependente de pH, temperatura e condições de aeração (WOODS; BEVAN, 1968).

A atividade “killer” em meios de cultura é expressa sob condições ácidas (pH 3-6), com maior atuação em pH 4-5 (WOODS; BEVAN, 1968; MIDDELBECK; HERMANS;

STUMM, 1979) e entre 15-20°C, podendo ser inativada em temperaturas superiores (VUSTIN et al., 1989 apud GOLUBEV, 1998).

A produção e estocagem de vários alimentos é freqüentemente comprometida pelo desenvolvimento de certas leveduras, por exemplo, *Kloeckera apiculata* (a qual produz baixas concentrações de etanol e produtos de fermentação indesejáveis), *Saccharomyces ludwigii* (a qual apresenta alta resistência a compostos anti-sépticos, por exemplo SO₂) e algumas espécies de *Schizosaccharomyces* e *Zygosaccharomyces* (que se desenvolvem em 50% de açúcar). O controle biológico destas leveduras indesejáveis pode ser realizado por culturas que produzam toxinas “killer” (PALPACELLI; CIANI; ROSINI, 1991).

As leveduras “killer” inibem cepas contaminantes indesejáveis durante o processo fermentativo, cujo caráter é expresso em diferentes gêneros, inclusive sendo constatada a letalidade em fungos filamentosos. Fato que ampliou as perspectivas de aplicação no biocontrole de fitopatógenos e bolores deteriorantes de alimentos.

O biocontrole através de compostos bioativos produzidos por leveduras de caráter inócuo, compatível com aplicação prática, seria favorável para garantir a qualidade e segurança de produtos oriundos da fruticultura.

2. OBJETIVOS

2.1. Determinar o caráter “killer” de leveduras isoladas de polpas congeladas de frutas e isoladas de formigueiro;

2.2. Analisar o potencial antagônico sobre fungos deteriorantes ou patogênicos;

2.3. Verificar o potencial antagônico sobre fungos deteriorantes ou patogênicos “in vivo”.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Bolores

A estrutura básica dos bolores é formada por filamentos denominados hifas, que, em conjunto, formam o micélio. Hifas podem ser septadas, isto é, divididas em células que intercomunicam-se através de poros, e não septadas (ou cenocíticas), com os núcleos celulares dispersos ao longo de toda hifa. O micélio pode ter duas funções distintas: promover a fixação do bolor ao substrato (micélio vegetativo) e promover a reprodução, através da produção de esporos (micélio reprodutivo). Os bolores podem reproduzir-se sexualmente (fungos perfeitos) ou assexualmente (fungos imperfeitos), ou ainda pelos dois processos, simultaneamente. O micélio dos bolores é responsável pelo aspecto característico das colônias que formam. Estas colônias podem ter um aspecto cottonoso, ser secas, úmidas, compactas, aveludadas, gelatinosas, com variadas colorações (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Nos produtos agrícolas, os fungos toxigênicos têm sido divididos em dois grupos. O primeiro inclui os invasivos, que produzem toxinas antes da colheita. O segundo é formado pelos que se desenvolvem após a colheita. Em ambos os casos, entretanto, a fonte original dos fungos é o campo. A invasão antes da colheita é governada principalmente pela planta hospedeira e por outras interações biológicas (insetos), enquanto o desenvolvimento fúngico pós-colheita é governado pelo produto agrícola (nutrientes), fatores físicos (temperatura, umidade) e fatores biológicos (insetos, competição) (TANIWAKI; SILVA, 2001).

Fungos filamentosos produzem uma grande variedade de metabólitos secundários, muitos dos quais têm sido associados a diversos efeitos em animais e humanos. Estes compostos são denominados micotoxinas e ocorrem no micélio de bolores, mas podem também estar presentes nos esporos destes organismos. Os efeitos produzidos são chamados micotoxicoses. As micotoxinas são normalmente produzidas depois de uma fase de desenvolvimento balanceado. As principais

micotoxinas associadas ao *Penicillium expansum* e *Aspergillus ochraceus* são, respectivamente, patulina e ocratoxina A (D'MELLO; MACDONALD, 1997).

Gonçalves, Paterson e Lima (2006) examinaram a água de torneira de Portugal quanto à presença de fungos filamentosos. *Penicillium* spp (40,6%) e *Acremonium* spp (38,8%) foram os fungos mais frequentemente isolados. Este último está associado à produção de ocentol, o qual é responsável por odores e sabores desagradáveis. *P. expansum* está associado à produção de micotoxina patulina.

Em clima temperado espécies de *Penicillium* são os bolores mais importantes em grãos estocados. Foi examinado o efeito da levedura *Pichia anomala* sobre *Penicillium roqueforti*, *P. carneum* e *P. paneum* inoculados em grãos de trigo. O desenvolvimento das três espécies foi inibido por *P. anomala* (BOYSEN; BJÖRNEHOLM; SCHNÜRER, 2000).

Aspergillus fumigatus está frequentemente associado à putrefação de silagem e produção de micotoxinas. Produz a gliotoxina, a qual pode afetar a imunidade (AMIGOT et al., 2006).

Espécies do gênero *Fusarium*, dentre outras, têm sido relatadas como predominantes entre os agentes de doenças pós-colheita em frutos de tomateiro. Esses patógenos requerem ferimentos para penetração no hospedeiro e causam perdas importantes quando induzem o aparecimento de lesões de evolução rápida e que resultam no apodrecimento completo (SILVEIRA et al., 2001).

Martins et al. (2006) constataram a presença de bolores pertencentes aos gêneros *Rhizopus*, *Monilinia*, *Geotrichum*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Alternaria* em pêssegos.

Kaaya e Kyamuhangire (2006) realizaram um estudo para determinar a incidência de bolores e contaminação por aflatoxina em milho comercializado em três

regiões de Uganda (área de média altitude - úmida, média altitude - seca e elevada altitude). O milho foi dividido em duas categorias: aqueles estocados por dois a seis meses e os estocados por mais de seis meses a um ano. *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, *Penicillium* spp e *Rhizopus* spp foram os gêneros predominantes e, dentre suas espécies, *A. niger* apresentou a incidência mais elevada; seguido por *A. flavus*, *F. verticillioides*, *A. wentii*, *A. penicillioides* e *Rhizopus stolonifer*. A porcentagem de amostras positivas para aflatoxina foi maior para a área de média altitude - úmida (88%), seguida pelas amostras da de média altitude - seca (78%) e de elevada altitude (69%). Os níveis de aflatoxina aumentaram com o período de estocagem. Aflatoxina B₁ foi o tipo mais predominante e foi encontrada em amostras das três áreas.

Estudar a microbiota nativa de cevada utilizada em cervejarias na Espanha e avaliar a habilidade dos bolores para produzir micotoxinas “in vitro” foi o objetivo da pesquisa realizada por Medina et al. (2006). Cento e oitenta e sete amostras foram recolhidas antes do processamento. Os bolores predominantes foram espécies de *Alternaria* spp, *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp e *Fusarium* spp, os quais estavam presentes em respectivamente 93; 82,3; 57,8 e 27,8% das amostras. Alternariol e alternariol monometil éter foram produzidos por 26,7% dos isolados de *Alternaria*. Todos os isolados de *F. verticillioides* produziram fumonisina B₁ (FB₁) e 61,3% produziram fumonisina B₂ (FB₂); enquanto FB₁ foi sintetizada por 83,3% e FB₂ por 77,8% dos isolados de *F. proliferatum*. Vinte por cento dos isolados do grupo *A. flavus/A. parasiticus* apresentaram a capacidade de produzir aflatoxina B₁ e B₂. Trinta dos trinta e quatro isolados de *F. graminearum* produziram deoxivalenol e zearalenona enquanto os outros quatro produziram nivalenol.

Visando a importância da identificação de fungos contaminantes de frutas frescas, uma vez que determinados bolores podem se desenvolver e produzir toxinas, Tournas e Katsoudas (2005) investigaram o perfil fúngico de várias frutas frescas comercializadas em Washington - EUA. Os bolores mais isolados foram *Botrytis cinerea*, *Rhizopus* spp, *Alternaria* spp, *Penicillium* spp, *Cladosporium* spp e *Fusarium* spp.

González et al. (2005) estudaram a micobiota natural presente em pólen de abelha comercializado na Espanha e Argentina, e encontraram as espécies potencialmente produtoras de micotoxinas: *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. flavus*, *A. parasiticus* e *Alternaria* spp. Fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Alternaria* foram detectados em respectivamente, 80, 90 e 86,6% das amostras.

Amostras de arroz coletadas na República da Coreia foram analisadas com relação à micoflora e micotoxinas: fumonisinas, ocratoxina A, tricotecenos e zearalenona. *Penicillium citrinum* e *Aspergillus candidus* foram as espécies mais freqüentes nas amostras, enquanto *F. proliferatum* foi encontrado como a espécie de *Fusarium* dominante. Ocratoxina A foi a micotoxina mais comumente detectada (PARK et al., 2005).

Um estudo foi realizado visando determinar bolores produtores de micotoxina em uvas destinadas à produção de vinho. Os gêneros mais freqüentes foram *Cladosporium* (25%), *Alternaria* (24%), *Botrytis* (15%), *Penicillium* (9%) e *Aspergillus* (8%). Produtores potenciais de ocratoxina A (*A. niger* 5,4%; *A. carbonarium* 0,6%) e tricotecenos (*Fusarium* spp. 0,9%; *Trichotecium roseum* 0,8%) foram as espécies micotoxigênicas mais freqüentes. Concluiu-se que existe o potencial para produção de micotoxinas em uvas antes da colheita (SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005).

Romero et al. (2005) realizaram um estudo com o objetivo de determinar a incidência de fungos toxigênicos em uvas secas de algumas regiões da Argentina (Mendoza, San Juan, Salta e Catamarca). Os gêneros predominantes foram *Aspergillus* (50,2%), *Eurotium* (21,4%) e *Penicillium* (13,5%). A predominância de aspergilos negros nas frutas não surpreendeu porque membros deste grupo podem sobreviver ao processo de secagem devido à relativa resistência dos esporos negros à luz do sol e radiação ultravioleta. Neste grupo, *A. niger* foi a espécie mais comum (37,3%) seguida por *A. carbonarius* (7,3%) e *A. japonicus* (2,9%).

Os resultados de uma pesquisa realizada por Batta (2006) indicaram que *Drosophila melanogaster* adulta é um vetor eficiente na transmissão dos esporos de *Penicillium expansum* para nectarina e pêra no estágio pós-colheita. A transmissão é realizada por meio da inserção do esporo, aderido à cavidade bucal das moscas ou ao abdômen, nas frutas enquanto perfuram as mesmas para alimentação ou postura de ovos.

Fusarium spp é um hifomiceto caracterizado pela produção de macronídios hialinos, multiseptados e em forma de meia lua. Em muitas espécies ocorre também um micronídio menor (TANIWAKI; SILVA, 2001).

Penicillium spp é um gênero importante de fungo deteriorador de alimentos, caracterizado por crescimento vagaroso e produção de conídios verdes ou azuis, nascidos em penicilos (TANIWAKI; SILVA, 2001).

Aspergillus spp é, provavelmente, o gênero mais comumente implicado na deterioração de alimentos de origem tropical. É caracterizado pelo desenvolvimento de colônias coloridas e brilhantes, e produzir conídios em cabeças do tipo “mop-like” (escovão), típicas (TANIWAKI; SILVA, 2001).

3.2. Micotoxinas

Micotoxinas são compostos tóxicos produzidos a partir do metabolismo secundário de bolores toxigênicos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Estes, quando em condições adequadas de temperatura e umidade podem se desenvolver em vários alimentos causando sérios riscos para a saúde humana e animal. Embora sejam conhecidas mais de trezentas micotoxinas, especial atenção é direcionada àquelas de efeito tóxico e carcinogênico. Estas incluem um metabólito de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, aflatoxina B₁, a mais potente substância hepatocarcinogênica conhecida; ocratoxina A, produzida por *Penicillium verrucosum* e *Aspergillus ochraceus*, a qual é conhecida por ser carcinogênica em roedores e

nefrotóxica em humanos; zearalenona, produzida por várias espécies de *Fusarium*, em particular *F. graminearum* e *F. culmorum*, a qual é tóxica para o sistema reprodutivo de animais; os tricotecenos produzidos por espécies de *Fusarium*, *Stachybotris* e *Cephalosporium*, os quais causam principalmente dermatotoxicidade, imunotoxicidade e distúrbios gastrointestinais; e as fumonisinas, produzidas principalmente por *F. moniliforme*, o qual pode induzir leucoencefalopatia em eqüinos assim como hepatotoxicidade em ratos (BRERA; MIRAGLIA; COLATOSTI, 1998).

O termo micotoxina deriva da palavra grega “mykes”, que significa fungo e, do latim “toxican”, que significa toxinas. É usado para designar um grupo de compostos produzidos por espécies fúngicas, capazes de provocar doenças ou morte quando ingeridas pelo homem ou animais. As micotoxinas são conhecidas há muito tempo, porém, o seu estudo só se tornou intensivo após o incidente ocorrido em 1960, na Inglaterra, envolvendo a morte de mais de 100.000 aves alimentadas com ração contaminada pelo fungo *Aspergillus flavus*. A produção de micotoxinas depende do desenvolvimento fúngico, portanto pode ocorrer em qualquer época do cultivo, colheita ou estocagem dos alimentos. Contudo, desenvolvimento de fungos e produção de toxinas não são sinônimos, porque nem todos os fungos produzem toxinas. Por outro lado, as micotoxinas podem permanecer no alimento mesmo após a morte dos fungos produtores. Os gêneros dos fungos mais comumente associados com toxinas que ocorrem naturalmente são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (TANIWAKI; SILVA, 2001).

As micotoxinas podem ser encontradas em vários alimentos, porém, alguns alimentos são mais susceptíveis que outros. Em geral, alimentos com alto teor de carboidratos são mais favoráveis à produção de toxinas que as oleaginosas, sendo amendoim uma exceção. A maioria dos fungos requer umidade relativa acima de 80% e um mínimo de atividade de água (a_w) para desenvolver. A produção de toxina pode não ocorrer em umidade relativa abaixo desse valor. Quanto à a_w , a produção de toxinas pode ocorrer na faixa de 0,70 a 0,90, atingindo, portanto, também os alimentos de umidade intermediária (TANIWAKI; SILVA, 2001).

Desde a descoberta da aflatoxina, em 1960, é reconhecida a capacidade de muitos fungos de origem alimentar para produzir micotoxinas. Estas representam um sério risco para a saúde humana e animal, embora a gravidade dos casos de envenenamento seja muito variável, dependendo das espécies envolvidas. Os dados permitem observar que uma mesma toxina, como a patulina, pode ser produzida por uma variedade de fungos diferentes, por exemplo, *Aspergillus clavatus*, *A. terreus*, *Penicillium expansum* e *P. griseofulvum*. Também é possível observar que alguns fungos são capazes de produzir várias toxinas diferentes, como *Aspergillus flavus*, por exemplo, que produz aflatoxinas, aflatrem, ácido aspergílico, ácido ciclopiazônico. *Fusarium verticillioides* produz fumonisinas, moniliformina, fusarina C, giberelinas, ácido fusárico e naftoquinonas. *Penicillium expansum*: patulina, citrinina e roquefortina C (TANIWAKI; SILVA, 2001).

As toxinas são produzidas principalmente por quatro gêneros de bolores: *Fusarium*, *Claviceps*, *Aspergillus* e *Penicillium*; os quais se desenvolvem em quase todo o tipo de meio nutritivo. No passado, a principal preocupação sobre ocratoxina A estava no potencial carcinogênico e nefrotóxico; no entanto estudos recentes têm mostrado alterações significativas nas respostas imunológicas (PETZINGER; WEIDENBACH, 2002).

Micotoxinas podem causar vários efeitos tóxicos em humanos. Doenças respiratórias crônicas e agudas foram reportadas após inalação de pó orgânico contendo bolores toxigênicos e micotoxinas. Bolores dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* coletados em plantas foram testados para citotoxicidade. As micotoxinas detectadas e suas distintas citotoxicidades fornecem respaldo à hipótese de que as micotoxinas podem estar envolvidas em doenças pulmonares devido à inalação de pó orgânico (BÜNGER et al., 2004).

Os mais altos índices de contaminação por micotoxinas são encontrados em alimentos provenientes de regiões tropicais e semi-tropicais, onde o clima favorece o desenvolvimento de fungos toxigênicos. *A. flavus* produz toxinas entre 12 e 40°C, com

produção ótima na faixa de 25-32°C. As espécies do gênero *Fusarium* preferem temperaturas entre 12-15°C. Nas condições naturais encontradas nos alimentos, sempre há uma interação entre os bolores, as leveduras e as bactérias presentes. A produção de toxinas pelos bolores pode afetar os demais microrganismos, dificultando o seu desenvolvimento, mas o contrário também é possível, pois certos microrganismos podem inibir a produção de toxinas, removê-las ou degradá-las. Há evidências de que as toxinas são produzidas em menor quantidade quando os fungos toxigênicos se desenvolvem na presença de outros microrganismos (TANIWAKI; SILVA, 2001).

De acordo com as reações farmacológicas, as micotoxinas podem ser classificadas nas seguintes categorias:

- carcinogênicas: aflatoxinas, esterigmatocistina, luteosquirina, ácido ciclopiazônico.
- mutagênicas: aflatoxinas, 8 metoxipsoralen.
- hepatotóxicas: aflatoxinas, ocratoxina A, luteosquirina, rubratoxina.
- nefrotóxicas: ocratoxina A, citrinina, deoxinivalenol.
- estrogênicas: zearalenona.
- neurotóxicas: citreoviridina, tremorgênica (penitrem), patulina, alguns derivados do ácido lisérgico, fumonisinas.

A aflatoxina B₁ é a mais tóxica das aflatoxinas (*A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*), causando uma variedade de efeitos adversos em diferentes espécies animais. As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram classificadas na classe 1 dos carcinógenos humanos. Quanto à aflatoxina M₁, o metabólito da aflatoxina B₁ encontrada no leite humano e animal, não há, até o momento, evidências claras de carcinogenicidade. Há evidências baseadas em estudos estatísticos, de que a aflatoxina é a causa da elevada incidência de câncer primário no fígado em países como Moçambique, Uganda, Tailândia, Quênia e Swazilândia (TANIWAKI; SILVA, 2001).

A ocratoxina (*Penicillium verrucosum*, *A. ochraceus* e *A. carbonarius*) é suspeita de ser um dos agentes causadores do câncer do trato urinário e dos danos aos rins que ocorrem no leste europeu. Praticamente todos os europeus apresentam alguma concentração de ocratoxina no sangue (TANIWAKI; SILVA, 2001).

As fumonisinas são produzidas por *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*), *F. proliferatum* e vários outros fusários menos comuns. Há pelo menos três tipos de fumonisinas de ocorrência natural, a FB₁, FB₂ e FB₃. Ainda não há informação suficiente para determinar se as fumonisinas são carcinogênicas para os humanos, embora pareça haver uma possível associação do câncer esofágico humano com a ingestão de grãos contaminados por *F. verticillioides*, contendo fumonisinas e fusarina C. As fumonisinas são estáveis na maioria dos alimentos processados (TANIWAKI; SILVA, 2001).

A patulina causa distúrbios gastrointestinais e efeitos neurotóxicos e imunotóxicos em animais. Pode ser produzida por várias espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys*, e tem sido encontrada em frutas, verduras e cereais. Verruculogeno é uma toxina produzida principalmente por espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* e causa fortes tremores em animais afetados (KAWASHIMA; SOARES; MASSAGUER, 2002).

Ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina nefrotóxica e possivelmente carcinogênica amplamente encontrada em cereais e derivados. É produzida por algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. Inibe a síntese de proteína pela competição com a fenilalanina e também aumenta a peroxidação lipídica, danificando as células (GOLLÜCKE; TANIWAKI, TAVARES, 2004).

Um estudo, abrangendo oito fazendas na Finlândia, foi realizado para avaliar a exposição dos agricultores às impurezas presentes no ar, fungos e possivelmente às toxinas do *Fusarium* durante a secagem e moagem de grãos, assim como durante a alimentação do gado. Espécies de *Fusarium* foram identificadas em oito amostras de grãos, sendo detectada a toxina tricoteceno tipo B em todas as amostras analisadas. Verificou-se que fungos toxigênicos e toxinas de *Fusarium* podem estar presentes no ar e a exposição à inalação das toxinas pelos agricultores é possível no ambiente agrícola (LAPPALAINEN et al., 1996).

Espécies de *Fusarium* produzem fumonisinas, tricotecenos (toxina T-2, toxina HT-2, deoxynivalenol e nivalenol, zearalenona), as quais desencadeiam náusea, vômito, dor abdominal e diarreia. Algumas toxinas produzidas por *Aspergillus*: aflatoxina B₁ e seu metabólito aflatoxina M₁ são sintetizadas por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*; ocratoxina A por *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* (CREPPY, 2002).

Experimentos realizados na Dinamarca mostraram rápida degradação de zearalenona, e em particular ocratoxina A, no solo. A degradação foi mais rápida em solo com alto teor de silte (fragmento de mineral ou rocha menor que areia fina e maior do que argila) comparada aos outros tipos de solo (arenoso e arenoso com argila); e o teor de argila diminuiu a taxa de degradação. Em geral a degradação foi mais rápida em solo plantado (provavelmente devido à alta atividade microbiana) comparado ao não plantado (MORTENSEN; STROBEL; HANSEN, 2006).

Várias toxinas podem ocorrer simultaneamente, dependendo das condições do ambiente e do substrato. Humanos e animais estão sempre mais expostos a combinações do que a compostos individuais. Portanto, avaliações de riscos futuros devem considerar dados de toxicidade mista. Ocratoxina A, ocratoxina B, citrinina e patulina foram selecionadas para um estudo dos efeitos interativos "in vitro". Os resultados obtidos confirmaram um potencial para efeitos sinérgicos de citrinina e ocratoxina A, e possivelmente outras micotoxinas, em células renais. Muitas toxinas podem ser produzidas por um bolor em particular; por outro lado muitas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* podem produzir muitas micotoxinas simultaneamente, dependendo das condições do ambiente e do substrato. Isto é particularmente verdade para ocratoxina A, ocratoxina B, citrinina e ocasionalmente patulina; as duas últimas também têm sido associadas a alterações na função renal e desenvolvimento de patologias renais. A toxicidade de combinações de micotoxinas não pode ser prevista apenas com base no efeito individual das toxinas (HEUSSNER; DIETRICH; O'BRIEN, 2006).

Uma pesquisa realizada por Simas et al. (2007) objetivou determinar a microflora e avaliar a presença de aflatoxinas e ocratoxinas em grãos de cevada empregados na alimentação do gado leiteiro no estado da Bahia. *Aspergillus* foi o gênero mais frequentemente isolado (42,5%), seguido por *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Fusarium*. Análises micotoxicológicas não mostraram presença de ocratoxinas, mas aflatoxinas foram encontradas em 33,75% das amostras.

Um total de cento e uma amostras de vinho tinto importado e suco de uva foram analisadas com relação à presença de ocratoxina A. A análise foi realizada em vinte e nove amostras de vinho tinto e trinta e oito de suco de uva produzidos no Brasil; e em trinta e quatro amostras de vinho tinto importado. Os resultados mostraram contaminação por ocratoxina A em nove das vinte e nove amostras de vinho tinto provenientes do Brasil, e em dezoito das trinta e quatro amostras de vinho tinto importado (Argentina, Uruguai, França, Itália, Portugal, Espanha e África do Sul). A micotoxina não foi encontrada nas amostras de suco de uva (SHUNDO et al., 2006).

Oliveira et al. (2006) estudaram a patogenicidade do *Penicillium sclerotigenum*, agente etiológico da podridão verde em inhame, em dezesseis frutas e hortaliças diferentes. Os resultados mostraram que maçã, pêra, banana e inhame foram susceptíveis; batata inglesa, berinjela e beterraba moderadamente susceptíveis e as demais resistentes. *P. sclerotigenum* possui alto poder de disseminação, resultando em maiores riscos de produção de patulina em produtos armazenados. Esta micotoxina apresenta atividades mutagênica, carcinogênica e teratogênica demonstradas, experimentalmente em animais. Pêra e maçã são bons substratos para sua produção.

Um total de noventa e três amostras de uva portuguesa, destinadas à produção de vinho, foram examinadas quanto à presença de ocratoxina A e o fungo produtor. Os resultados demonstraram que o estágio de maturação das uvas influenciou a incidência do fungo, com aproximadamente 96% das linhagens produtoras de ocratoxina A sendo detectadas no período de colheita. *Aspergillus carbonarius* foi a espécie produtora de ocratoxina A mais abundante. Constatou-se que a síntese de ocratoxina A ocorre em

uvas desde os primeiros estágios de maturação. A composição das uvas nos diferentes estágios influenciou significativamente a produção da toxina, sendo a mesma favorecida por altos teores de ácidos orgânicos e baixos teores de açúcares redutores (SERRA; MENDONÇA; VENÂNCIO, 2006).

Cem amostras de frutas foram coletadas e analisadas para verificar a presença de micotoxinas e foi também estudado o efeito da irradiação gama sobre a produção de micotoxinas. As análises revelaram a ocorrência de ácido penicílico, patulina, ácido ciclopiazônico, citrinina, ocratoxina A e aflatoxina B₁. Sessenta amostras foram positivas para uma ou mais micotoxinas. A irradiação reduziu significativamente a contagem de bolores. A produção de micotoxinas diminuiu com o aumento da dose de irradiação (AZIZ; MOUSSA, 2002).

Foi examinada a ocorrência de citrinina e a capacidade de produção da mesma por cepas de *Penicillium* spp. isoladas de maçãs deterioradas e colhidas em pomares domésticos no interior da Croácia. Das cem amostras de maçãs examinadas foram isoladas trinta e sete cepas de *Penicillium* spp., incluindo *P. expansum*, *P. roqueforti*, *P. impicatum* e *P. purpurogenum*. A citrinina foi detectada em 19% das amostras de maçãs (PEPELJNJAK; ŠEGVIĆ; OŽEGOVIĆ, 2002).

Silva et al. (2004) avaliaram a produção de aflatoxinas por cinquenta e nove linhagens de *Aspergillus flavus* e de fumonisinas por trinta e cinco cepas de *Fusarium verticillioides* isoladas de amostras de grãos de sorgo. Os resultados revelaram a produção das aflatoxinas B₁ e B₂ por trinta e oito cepas (64,4%) de *A. flavus*. Dentre as cepas de *F. verticillioides*, trinta e duas (91%) produziram a aflatoxina B₁.

Ross et al. (1998) avaliaram a produção de patulina em maçãs, pertencentes aos cultivares Gala e Fuji, inoculadas com *Penicillium expansum* NRRL 1172 e *Penicillium variable* toxigênico, isolado de maçãs. As frutas contaminadas foram mantidas em condições de tempo de armazenamento e temperatura que variaram de 15 a 90 dias e de 0 a 25°C. A produção de patulina ocorreu em todas as combinações de

armazenagem e temperatura, independente dos cultivares. Nas maçãs inoculadas com *P. variable* ocorreu maior concentração de patulina do que nas contaminadas com *P. expansum* NRRL 1172. O risco freqüente de produção de patulina nas temperaturas de refrigeração indicou a necessidade de melhor controle nos estágios de colheita e armazenagem, a fim de evitar a constante ingestão de toxina.

Realizou-se a investigação dos efeitos de nutrientes (nitrogênio, zinco e boro) no desenvolvimento de bolores e a produção de fumonisina em amostras de milho no início da formação do grão e na colheita. A análise do milho recém-colhido revelou maior freqüência de *Penicillium* spp. (72%) e *Fusarium verticillioides* (27%). As análises mostraram que 100% dos grãos estavam contaminados com fumonisina B₁ e 93% contaminados com fumonisina B₂. Nitrogênio em combinação com boro resultou em um aumento da produção de fumonisina B₂. A combinação de nitrogênio, zinco e boro reduziu os níveis de ambas as toxinas (HASSEGAWA et al., 2007).

Pardo et al. (2005) estudaram a influência da umidade relativa (80, 90 e 100%) e temperatura (10, 20 e 30°C) no desenvolvimento do bolor *Aspergillus ochraceus* em uva e o acúmulo de ocratoxina A após 14 dias de incubação. Evitando a exposição das uvas às altas temperaturas e minimizando o acúmulo das mesmas sob elevada umidade relativa, entre a colheita e o processo de fabricação do vinho, foi possível prevenir o desenvolvimento do bolor e a formação de ocratoxina A. *A. ochraceus* produziu ocratoxina A sob umidade relativa de 80% e 30°C. Máximo acúmulo ocorreu a 30°C e 100% de umidade relativa. O desenvolvimento do bolor foi máximo a 30°C e 80-90% de umidade relativa.

Foi realizada uma pesquisa sobre a presença de patulina, entre 1996 e 1998, em sessenta produtos de maçã comercializados na África do Sul. Os níveis de patulina encontrados estavam abaixo daquele estabelecido pela legislação (LEGGOTT; SHEPHARD, 2001).

Um total de quatrocentas e oito amostras de café brasileiro foram examinadas com relação à presença de ocratoxina A e bolores com potencial para produzi-la. Três por cento dos isolados de *Aspergillus niger* produziram ocratoxina A, assim como 75% dos de *A. ochraceus* e 77% dos de *A. carbonarius* (TANIWAKI et al., 2003).

Dois principais gêneros são responsáveis pela produção de micotoxina em uvas: *Aspergillus* e *Penicillium*. Serra et al. (2006) realizaram uma pesquisa visando investigar os bolores presentes na superfície de uvas destinadas à produção de vinho no momento da colheita e comparar as diferenças devido à origem geográfica. Confirmou-se que *Aspergillus* e *Penicillium* são importantes componentes da microbiota deterioradora de uvas. Os bolores pertencentes ao gênero *Aspergillus* são importantes em climas caracterizados como quente e seco. Em climas mais úmidos, *Botrytis* parece ser o principal patógeno. A espécie produtora de micotoxina mais importante encontrada foi *Aspergillus carbonarius*, a qual produz ocratoxina A.

3.3. Fenômeno “killer”

O fenômeno “killer” é amplamente difundido entre muitos gêneros de leveduras como *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Ustilago*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Williopsis*, *Kluyveromyces* e *Zygosaccharomyces* (SCHMITT; BREINING, 2002). As linhagens de leveduras “killer” são imunes às suas próprias toxinas devido a um mecanismo chamado auto-imunidade, mas podem ser sensíveis às toxinas de outras (WICKNER, 1979).

Toxinas “killer” destroem as células sensíveis por meio de diferentes mecanismos. Elas hidrolisam (İZGÜ; ALTINBAY, 2004) ou inibem a síntese (TAKASUKA et al., 1995) do principal componente da parede celular, β -1,3-glucana, ou causam a saída de íons pela formação de canal de íons na membrana citoplasmática (KAGAN, 1983).

Um estudo realizado por İzgü, Altıbay e Acun (2006) mostrou que *Pichia anomala* NCYC432 produz uma toxina “killer” que é inibitória para uma variedade de leveduras, incluindo a patogênica *Candida* spp. A atividade da exo- β -1,3-glucanase está envolvida na ação desta toxina, uma vez que na ausência da atividade de glucanase não é verificada ação “killer”.

Duzentas e quarenta linhagens de leveduras foram isoladas de amostras de solos da Estação Ecológica de Maracá, na Amazônia Brasileira. As espécies dominantes foram *Candida etchellsii*, *C. famata*, *C. robusta*, *C. rugosa*, *C. valida*, *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus albidus*, *C. laurentii*, *Rhodotorula glutinis*, *R. minuta* e *R. mucilaginosa*. Seis linhagens foram capazes de produzir micocinas: *Issatchenkia* spp., *Saccharomyces exiguus*, *Williopsis saturnus* var. *subsufficiens* e 3 *W. saturnus* (VITAL et al., 2002).

Farias, Maia e Vital (2005) realizaram um estudo objetivando identificar a atividade “killer” em linhagens de leveduras isoladas de solos de savana. Dos trinta e nove isolados testados, vinte e nove apresentaram atividade “killer” contra as cepas patogênicas testadas (*Cryptococcus neoformans* e *Candida tropicalis*).

Cabral et al. (2005) verificaram a incidência de leveduras “killer” provenientes de ambientes distintos. Investigou-se cinquenta e cinco cepas de solo de Mata Atlântica, cinquenta e três linhagens coletadas nos frutos em decomposição de jaqueira e quarenta e três estirpes de rizosfera de milho. Foi observada atividade “killer” em uma cepa de Mata Atlântica, quatro de jaca e seis de rizosfera.

Trindade et al. (2002) encontraram leveduras micocinogênicas em frutas maduras e polpas congeladas de frutas. A atividade “killer” foi exibida pelas leveduras *Pseudozyma antarctica*, *Cryptococcus albidus*, *C. bhutanensis*-like, *Rhodotorula graminis*, *R. mucilaginosa*-like, *Candida tepae*-like e levedura preta. A atividade “killer” foi mais elevada quando as leveduras micocinogênicas foram testadas contra linhagens isoladas de substratos diferentes daquelas.

A podridão negra em abacaxis ocorre mais comumente em frutos lavados do que naqueles não lavados. É possível que durante o manuseio pós-colheita certos microrganismos benéficos sejam removidos. Estes microrganismos foram investigados com relação ao potencial como agentes de biocontrole contra doenças pós-colheita de abacaxi (*Chalara paradoxa*). O isolado que exibiu maior poder inibitório foi *Pichia guilliermondii*. O modo de ação pareceu ser competição por espaço e nutrientes (REYES; ROHRBACH; PAULL, 2004).

Maneerat e Hayata (2006) avaliaram a atividade antifúngica (“in vitro” e “in vivo”) da reação fotocatalítica de dióxido de titânio (TiO_2), na forma de pó e revestindo filme plástico, sobre *Penicillium expansum*. Observou-se que as colônias viáveis de *P. expansum* foram aparentemente reduzidas “in vitro” quando a radiação ultravioleta foi combinada com TiO_2 . Ambas as formas do dióxido de titânio exibiram atividade antifúngica no controle do desenvolvimento de podridão em frutas.

Os efeitos do tratamento com vapores de trans-2-hexanal (composto aromático de muitas frutas e vegetais) foram avaliados em vários cultivares de pêras e maçãs. O controle de *Penicillium expansum* variou de 50 a 98% e a redução do teor de patulina foi atingida quando as frutas foram expostas a vapores de trans-2-hexanal (12,5 $\mu\text{L/L}$) 24 horas após a inoculação do patógeno. Por outro lado, os tratamentos aplicados 2 horas após a inoculação não foram muito eficientes ou estimularam as infecções (NERI et al., 2006).

Liu et al. (2005) mostraram os efeitos do indutor químico BTH (benzo-tiadiazol-7-ácido carbotióico-S-metil éster) na indução de resistência à doenças em pêssigo após colheita, em resposta ao ataque do patógeno (*Penicillium expansum*) e na atividade de enzimas ou metabólitos que podem estar envolvidos na indução. Os resultados dos tratamentos mostraram que o BTH pode significativamente melhorar a resistência à doenças. A lesão e a incidência da doença foram, respectivamente, 64,1 e 49,5% menores.

3.4. Controle biológico

Biocontrole, uma alternativa aos fungicidas, emprega microrganismos que protegem frutas e vegetais de infecção. No entanto, o controle de doenças pós-colheita com microrganismos antagonistas não é frequentemente tão efetivo quanto o controle com fungicidas sintéticos. Portanto, pode ser necessário melhorar a atividade dos microrganismos antagonistas ou combiná-los com outras formas de controle biológico (WILSON et al., 1994).

Após aplicação, o antagonista interage com o patógeno, mas também com o fungicida aplicado na fruta antes e/ou após a colheita e alguns destes compostos podem apresentar efeitos negativos na sobrevivência do mesmo (BUCK, 2004).

A otimização da eficácia do biocontrole, no entanto, depende da sobrevivência e colonização da superfície e lesões da fruta na presença dos patógenos, os quais são sensíveis ou resistentes a esses compostos (LIMA et al., 2006).

O desenvolvimento de resistência a fungicidas à base de benzimidazol, preocupações com a saúde devido à contaminação do ambiente e frutas pelos pesticidas e a restrição do uso de fungicidas têm estimulado a pesquisa de medidas de controle alternativas; incluindo agentes de biocontrole, produtos sanitizantes e compostos que ocorrem naturalmente (MARI; BERTOLINI; PRATELLA, 2003).

A indução da resistência de frutas à infecção causada por patógenos tem sido avaliada como promissora no controle de doenças pós-colheita (LIU et al., 2005).

Franco e Bettioli (2002) verificaram a ocorrência de sinergismo entre misturas de produtos alternativos aos fungicidas para o controle do bolor azul (*Penicillium digitatum*) em pós-colheita de laranja. Os produtos testados não apresentaram efeito sinérgico, exceto a mistura carbonato de sódio e ácido bórico. Carbonato de sódio e ácido bórico empregados individualmente controlaram a doença em, respectivamente, 78 e 87%;

utilizando-se a mistura o controle foi 93%. Destacaram-se ainda, bicarbonato de sódio, metabissulfito de sódio e as misturas bicarbonato de sódio com ácido bórico, carbonato de sódio com carbonato de potássio, carbonato de sódio com sorbato de potássio, bicarbonato de sódio com carbonato de sódio; os quais exerceram controle de respectivamente, 92, 77, 81, 77, 75 e 71%. O tiabendazol, utilizado como padrão, controlou totalmente a doença.

As podridões pós-colheita podem ocasionar perdas substanciais em maçã. O mofo azul (*Penicillium expansum*), a podridão amarga (*Glomerella cingulata*) e a podridão olho-de-boi (*Pezizula malicorticis*) estão entre as mais comuns. Muita atenção tem sido dispensada ao uso de alternativas de controle de doenças pós-colheita. A aplicação pós-colheita de leveduras, como *Cryptococcus laurentii*, é uma das opções. Blum et al. (2004) testaram a eficiência de *C. laurentii* no controle de podridões de maçãs. Nos testes de laboratório, *C. laurentii* reduziu as podridões tanto quanto os fungicidas testados (tiabendazol e iprodione). Nos testes efetuados em câmara fria, constatou-se que, após o armazenamento, o tratamento com *C. laurentii* foi tão eficiente quanto os tratamentos com fungicidas (tiabendazol, iprodione, digluconato de clorohexidina, dicloro-s-triazinatriona sódica, dicloroisocianurato de sódio e hipoclorito de sódio) na redução da podridão causada por *P. expansum*.

Apesar das práticas de profilaxia e produtos químicos utilizados em pré e pós-colheita, a podridão parda (*Monilinia fructicola*) causa danos relevantes nos pessegueiros. Moreira et al. (2002) selecionaram microrganismos antagônicos ao patógeno e avaliaram a eficiência destes, de fungicidas e de fosfitos no controle da doença pós-colheita. Os antagonistas que exerceram maior controle da doença foram os isolados de *Trichothecium* spp., acima de 80% de controle, não diferindo estatisticamente dos fungicidas testados.

Um estudo foi realizado com o objetivo de encontrar alguns óleos essenciais que pudessem ser utilizados de maneira segura como substitutos para fungicidas para inibir parcial ou totalmente o desenvolvimento de bolores e a produção de micotoxinas. Óleos

essenciais de doze plantas medicinais foram testados para atividade inibitória contra *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *Fusarium verticillioides*. Os resultados indicaram que os bolores foram sensíveis a todos os óleos, e particularmente sensíveis ao tomilho e à canela. O óleo de tomilho em baixas concentrações inibiu completamente o desenvolvimento (SOLIMAN; BADEAA, 2002).

Sideróforos, agentes de baixa massa molecular e quelantes de ferro, podem melhorar a efetividade de um agente de biocontrole. Existe evidência substancial para se acreditar que os sideróforos têm algum papel no biocontrole de microrganismos fitopatogênicos, seqüestrando o ferro e deste modo inibindo o desenvolvimento do patógeno ou a atividade metabólica (RIQUELME, 1996). É possível que a presença do sideróforo retarde a germinação de esporos, sequestrando ferro, facilitando a colonização pela levedura (MERCIER; WILSON, 1994).

Calvente, Benuzzi e Tosetti (1999) estimularam a produção de sideróforos por *Rhodotorula glutinis* na tentativa de melhorar o controle biológico pós-colheita de bolor azul (*Penicillium expansum*) em maçã. O bolor azul foi mais efetivamente controlado pelo agente antagonista com sideróforo do que pelo mesmo empregado individualmente. O agente quelante melhorou o controle de doença sem aumentar a concentração do antagonista. Considerando que a aplicação do antagonista a altas concentrações torna o biocontrole menos econômico, o sideróforo pode ser utilizado para reduzir a concentração do antagonista.

O maior obstáculo na comercialização de produtos de biocontrole é o desenvolvimento de um produto com vida-de-prateleira estável que retenha a atividade similar àquela das células frescas do agente. Bio-Save 11 é um pó formulado a partir da de *Pseudomonas syringae* linhagem ESC-11 (= L-59-66). O principal objetivo do estudo realizado por Janisiewicz e Jeffers (1997) foi determinar a eficácia do Bio-Save 11 no controle do bolor azul (*Penicillium expansum*) e bolor cinza (*Botrytis cinerea*) em maçã. O produto formulado desenvolvido para aplicação comercial foi tão efetivo quanto as células frescas originais do antagonista.

Avaliou-se a capacidade de *Cryptococcus laurentii* na redução de podridão cinza, azul e *Rhizopus* pós-colheita em pêssego; causada respectivamente por *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Rhizopus stolonifer*. As concentrações da antagonista apresentaram efeitos significativos no biocontrole; quanto maiores as concentrações (10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 UFC/mL) menor a incidência da doença. *C. laurentii* pode ser empregada como tratamento alternativo (não químico) contra doenças pós-colheita em pêssego (ZHANG; ZHENG; YU, 2007).

Pesquisa realizada por Karabulut e Baykal (2004) avaliou a eficácia do uso de água quente (55°C/10 segundos), o uso de uma levedura antagonista (*Candida oleophila*) e embalagem em atmosfera modificada a 0°C; como tratamentos individuais ou em várias combinações para o controle de podridões causadas por *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* em pêssego. Água quente e levedura antagonista como tratamentos isolados não foram efetivos no controle de ambos os bolores. Atmosfera modificada reduziu a lesão causada por ambos os patógenos. O biocontrole com a levedura antagonista foi melhorado se combinado com embalagem em atmosfera modificada. A maior eficácia foi obtida pela combinação dos três tratamentos. Nenhum dos tratamentos causou danos à superfície das frutas ou prejudicou a qualidade das mesmas.

A efetividade de *Candida sake* linhagem (CPA-1), contra *Penicillium expansum*, sob várias condições de atmosfera controlada. Máxima redução de decomposição foi obtida com atmosfera 3% O₂ - 3% CO₂ (1°C). Para as condições de atmosfera controlada estudadas foi observada influência significativa de *C. sake* sobre a decomposição causada por *P. expansum* e o tamanho da lesão reduziu mais de 70% quando empregada *C. sake* a 10^7 UFC/mL (USALL et al., 2000).

Yao, Tian e Wang (2004) mostraram que o biocontrole de *Cryptococcus laurentii* ou *Trichosporon pullulans* contra a podridão pós-colheita por *Penicillium expansum* e *Alternaria alternata* em pêra aumentou quando *C. laurentii* ou *T. pullulans* foram combinadas com bicarbonato de sódio. A combinação de uma das leveduras com

bicarbonato de sódio promoveu um controle mais efetivo dos bolores do que o emprego da levedura antagonista ou do bicarbonato de sódio individualmente. A atuação de *C. laurentii*, com ou sem bicarbonato de sódio, no controle dos bolores foi melhor do que aquela de *T. pullulans*.

Comparando *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri* e *Hanseniaspora uvarum*, predominantes durante o processamento de café, no desenvolvimento de *Aspergillus ochraceus* e produção de ocratoxina A em substratos de laboratório; incluindo ágar café. Ambas as leveduras foram capazes de prevenir a produção de ocratoxina A quando cultivadas em ágar extrato de malte. No ágar café, *P. anomala* e *P. kluyveri* preveniram a produção de ocratoxina A por *A. ochraceus* (MASOUD; KALTOFT, 2006).

Calvo et al. (2007) determinaram o potencial de *Rahnella aquatilis* para o controle de doenças pós-colheita causadas por *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* em maçã da variedade "Red Delicious". Quando as frutas foram mantidas a 4°C e 90% de umidade relativa, o tratamento com a bactéria significativamente inibiu o desenvolvimento de *B. cinerea* durante 40 dias de armazenamento; e a incidência da doença foi 100% reduzida. A incidência da doença causada por *P. expansum* sob as mesmas condições foi 60%.

Investigou-se o efeito da quitosana em diferentes concentrações, individualmente ou em combinação com *Cryptococcus laurentii*, no controle da podridão pós-colheita por *Penicillium expansum* em maçã. A combinação da levedura antagonista com quitosana à apropriada concentração (0,1%) e baixa viscosidade (12cP) foi mais efetiva (YU; LI; ZHENG, 2007).

Zhang, Zheng e Su (2006) aplicaram microondas como um tratamento isolado ou em combinação com a levedura *Cryptococcus laurentii* (10^8 células/mL) no controle de *P. expansum* em pêras e investigaram os efeitos na qualidade após estocagem. O efeito da combinação de microondas (2450 MHz/2-3 minutos) com o agente de controle

biológico foi significativamente mais elevado do que o efeito dos tratamentos isolados. O tratamento não afetou a qualidade da fruta.

Avaliou-se o uso do tratamento térmico (37°C/2 dias) em combinação com *C. laurentii* (10^8 células/mL), para o controle da decomposição causada por *Penicillium expansum* e *Rhizopus stolonifer* em pêssego. A combinação foi mais efetiva (20% de decomposição) do que os efeitos destes tratamentos individualmente (ZHANG et al., 2007).

Testes em larga escala mostraram que a maioria das leveduras antagonistas incluindo Aspire® promoveram um nível de controle da doença equivalente aos fungicidas sintéticos apenas quando suplementadas com baixas doses dos fungicidas sintéticos (DROBY et al., 2003).

Yu et al. (2007) avaliaram o potencial da combinação de *C. laurentii* (10^8 células/mL) e ácido salicílico (100 µg/mL) no controle de doença pós-colheita por *P. expansum* e *Botrytis cinerea* em pêra. O uso da *C. laurentii* foi compatível com o ácido salicílico (induz a resistência natural) e que a integração destes resultou em um excelente controle das doenças.

Maçãs estão entre as quatro principais frutas e vegetais que são mais contaminados com pesticidas. Muitos dos fungicidas como benzimidazol e dicarboximida estão perdendo a eficiência devido ao desenvolvimento de resistência em muitos patógenos pós-colheita (LENNOX; SPOTTS, 2003).

Conway et al. (2005) estudaram a combinação de antagonistas (*Cryptococcus laurentii* e *Metschnikowia pulcherrima*), calor (38°C/4 dias) e bicarbonato de sódio (2%); individualmente e combinados, na redução da decomposição pós-colheita de maçã causada por *Colletotrichum acutatum* e *P. expansum*. As frutas foram estocadas durante 4 meses a 1°C e, então a 20°C por 2 semanas. Tanto o calor como as antagonistas reduziram a decomposição causada por *C. acutatum*, mas uma

combinação dos dois tratamentos eliminou completamente a mesma. As antagonistas individualmente reduziram a decomposição causada por *P. expansum*, porém foram mais efetivas quando combinadas. Bicarbonato de sódio melhorou a atuação das leveduras.

Karabulut et al. (2005) avaliaram a eficácia e compatibilidade de uso combinado de duas leveduras (*Kloeckera apiculata* e *Metschnikowia fructicola*) e bicarbonato de sódio, individualmente ou combinados, no controle de doença pós-colheita em cereja causadas por *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*. A armazenagem foi realizada a 0°C/60 dias e 20°C/5 dias. Os tratamentos individuais ou combinados reduziram significativamente a incidência de podridão por *P. expansum* e *B. cinérea*, sendo que a combinação não melhorou a atuação das mesmas.

Chand-Goyal e Spotts (1996) avaliaram linhagens de leveduras isoladas da superfície de pêras para o potencial de biocontrole de *P. expansum*. Sete linhagens (*Cryptococcus albidus*, *C. infirmo-miniatus*, *C. laurentii*, *Rhodotorula aurantiaca* e 3 *R. glutinis*) reduziram a incidência do bolor. *C. laurentii* e *R. glutinis* HRB 6 combinadas com baixa dosagem de tiabendazol (15 µg/mL) controlaram de maneira mais eficiente a doença quando submetidas à 5, 10 e 20°C comparando-se ao tiabendazol ou a leveduras individualmente; e foi comparável ao controle da doença utilizando alta dosagem comercialmente recomendada do fungicida (525 µg/mL).

Cao e Jiang (2006) avaliaram como a resistência à doenças de pêras após a colheita pode ser afetada pelo "spray" acibenzolar-S-metil (análogo funcional do ácido salicílico). Os resultados mostraram que a incidência da doença e o diâmetro da lesão em pêras maduras colhidas de árvores tratadas com o produto por 3 vezes durante o desenvolvimento e inoculadas com *P. expansum* ou *A. alternata* após a colheita foram, respectivamente, 27,9 e 42,7% ou 29,1 e 23,4% menores do que no controle dezessete dias após a inoculação. As frutas exibiram atividade mais elevada das enzimas de defesa, incluindo fenilalanina amônia liase, quitinase e β -1,3-glucanase. As duas

últimas são consideradas enzimas chave, apresentando atividade direta contra patógenos nos sistemas de resistência à doenças em plantas.

Conway et al. (2007) determinaram os efeitos da combinação de estocagem (2-4 meses/1°C) em atmosfera controlada, antagonistas (*Metschnikowia pulcherrima* e *Cryptococcus laurentii*) individualmente ou em combinação e bicarbonato de sódio na redução da podridão por *P. expansum* em maçã. O único tratamento que eliminou o bolor completamente foi a combinação das duas antagonistas, atmosfera controlada e bicarbonato de sódio.

Em estudo desenvolvido por Izgu e Altinbay (2004), a análise de sequência mostrou que a *Pichia* β -glicosidase é uma exo- β -1,3-glucanase. *Pichia anomala* exo- β -1,3-glucanase foi identificada como toxina “killer” tipo K5 ativa contra outros fungos.

Qin et al. (2003) avaliaram os efeitos do ácido salicílico (composto fenólico natural de planta) e duas leveduras antagonistas (*Rhodotorula glutinis* e *C. laurentii*) empregados em combinação ou separadamente no controle de *P. expansum* e *A. alternata* em cereja. Aplicados separadamente, ambos os tratamentos inibiram a decomposição. O ácido salicílico elevou a atividade de biocontrole de *R. glutinis* e induziu ao aumento significativo da atividade de polifenoloxidase, fenilalanina e β -1,3-glucanase.

El-Ghaouth et al. (2001) avaliou a eficácia de *Candida saitoana* associada a 2-deoxi-D-glicose como tratamento no controle de podridão pós-colheita de maçã e frutas cítricas. A combinação resultou em 85 a 95% de redução da decomposição de maçãs, enquanto uma redução de 45 a 85% foi observada no tratamento com *C. saitoana*. O nível de controle foi similar ou superior àquele obtido com tiabendazol.

Yu et al. (2006) investigaram a viabilidade da aplicação do ácido giberílico individualmente ou combinado com *Cryptococcus laurentii* para controlar a podridão

pós-colheita por *P. expansum* em pêra. A combinação resultou em controle mais efetivo (8,3% de incidência de podridão).

Ippolito et al. (2000) pesquisaram a atividade de *Aureobasidium pullulans* na decomposição de maçã por *B. cinerea* e *P. expansum*, e a habilidade de induzir respostas de defesa bioquímica no tecido da fruta. *A. pullulans* reduziu a incidência dos bolores em, respectivamente, 89 e 67%. Ocasinou também um aumento nas atividades de β -1,3-glucanase (hidrolase antifúngica), quitinase e peroxidase. Este fato, associado à capacidade de competir por nutrientes e espaço com o patógeno, pode ser a base de biocontrole.

Usall et al. (2001) testaram *Candida sake* (linhagem CPA-1) como agente de biocontrole de doenças pós-colheita causadas por *Penicillium expansum* em maçãs. A aplicação de *C. sake* (10^7 UFC/mL) resultou num efeito (mais de 70% de redução) igual àquele exibido pelo tratamento com imazalil (375 ppm) e superior àquele com tiabendazol (425 ppm) associado ao folpet (1000 ppm).

Castoria et al. (2001) *Aureobasidium pullulans* (LS-30) mostrou atividade antagonista significativa contra *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger* em uvas; *B. cinerea* e *P. expansum* em maçãs. As uvas apresentaram 86% de redução de infecção. Com relação à maçã, as infecções causadas por *B. cinerea* e *P. expansum* reduziram, respectivamente, 76,5 e 88,5%.

Spadaro et al. (2002) objetivaram determinar o mecanismo de ação dos isolados antagonistas (*Metschnikowia pulcherrima*) e avaliar a eficácia sob condições controlada e semi-comercial à baixas temperaturas e atmosfera controlada. As antagonistas mostraram nível de controle contra *B. cinerea* e *P. expansum* similar àquele obtido com tiabendazol.

Foram avaliados os efeitos de propionato de cálcio, bicarbonato de sódio e ácido tetra acético-etilenodiamina de sódio sobre patógenos pós-colheita de maçã e pêsego;

e no aumento da eficácia do produto de biocontrole Aspire® (baseado na levedura *Candida oleophila*). O efeito inibitório aumentou com a concentração de cada composto. Em combinação com Aspire®, 2% de bicarbonato de sódio exibiu habilidade para melhorar significativamente o biocontrole contra *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* em maçã; e *Monilinia* e *Rhizopus* em pêsego (DROBY et al., 2003).

Leverentz et al. (2003) determinaram o efeito de 1-metilciclopropeno (inibidor do etileno) e combinações de tratamento térmico e uma levedura termotolerante aplicada à fruta antes do tratamento térmico, sobre o controle de podridão de maçãs (*P. expansum*) após a colheita. A combinação do tratamento térmico seis horas após a colheita, inoculação do patógeno e adição da levedura antagonista foi mais efetivo do que cada tratamento individualmente, com redução de 96-100% da incidência de podridão.

Determinou-se o efeito do tratamento térmico, antagonista (*M. pulcherrima*) e bicarbonato de sódio; individual e em combinação, na decomposição pós-colheita causada por *Colletotrichum acutatum* e *Penicillium expansum* em maçã. Tanto o tratamento térmico como a combinação deste com as antagonistas eliminaram a podridão causada por *P. expansum*. No entanto, uma combinação do tratamento térmico com as antagonistas foi requerida para eliminar completamente a podridão causada por *Colletotrichum acutatum* (CONWAY et al., 2004).

Chan e Tian (2005) compararam o modo direto de ação das leveduras (*Pichia membranefaciens* e *Cryptococcus albidus*) como agentes de biocontrole contra *Monilinia fructicola*, *P. expansum* e *Rhizopus stolonifer*, responsáveis pela podridão em maçã. Em adição, possíveis mecanismos envolvidos na adesão da levedura à hifa dos patógenos pós-colheita foram demonstrados. *P. membranefaciens* produziu quantidade maior ou ao menos igual de β -1,3-glucanase e exoquitinase quando comparada à *C. albidus*. Este fato foi correlacionado com a observação de que *P. membranefaciens* apresentou maior capacidade de adesão à hifa do que *C. albidus*. Os resultados deste experimento sugerem que interações levedura-patógeno podem ser dependentes do

reconhecimento do sinal da proteína entre as células da levedura e a hifa do bolor. A eficiência de adesão das leveduras parece ser, ao menos parcialmente, dependente das habilidades de secreção de enzimas líticas e esta adesão pode estar envolvida na eficiência de biocontrole das leveduras antagonistas.

3.5. Fungicidas

O fungicida químico é um dos principais métodos de controle de doenças de plantas, sendo a única forma de controle para diversos problemas fitossanitários. A facilidade de aplicação e os resultados imediatos obtidos os tornaram amplamente difundidos em diversas culturas. Porém, o uso contínuo pode promover a seleção de fungos fitopatogênicos resistentes, não controlados pelo fungicida anteriormente eficaz, questionando a eficiência do método. Assim, o surgimento de fungos fitopatogênicos resistentes a fungicidas é um sério problema que pode por em risco o controle dessas doenças de plantas (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, 2007).

As podridões pós-colheita constituem um fator de risco nas exportações. Terao et al. (2006) estudaram a eficiência de três fungicidas (tiabendazol, imazalil e azoxystrobin) em três condições de armazenamento (temperatura ambiente, ambiente refrigerado durante quinze dias seguido de armazenamento ambiente, refrigeração contínua durante todo o período de armazenamento - trinta e quatro dias) no controle de podridão pós-colheita em melão (*Fusarium poleidoroseum*). No armazenamento à temperatura ambiente, até o sexto dia os fungicidas mostraram-se efetivos, sendo que azoxystrobin e tiabendazol controlaram eficientemente a severidade e o tamanho da lesão, respectivamente, até doze e dezesseis dias de armazenamento. Sob refrigeração, o melhor controle foi obtido em frutos tratados com tiabendazol e imazalil.

Errampalli (2004) avaliou o impacto do fungicida fludioxonil na germinação de esporos e desenvolvimento micelial de *P. expansum* sensíveis ou resistentes ao tiabendazol (“in vitro”) e o efeito inibitório na formação de podridão em maçã. Os

resultados mostraram que fludioxonil potencialmente pode ser uma alternativa ao tiabendazol no controle pós-colheita de bolor azul. Para evitar o possível desenvolvimento de resistência do *P. expansum* ao fludioxonil, uma combinação deste com outros fungicidas, com modos de ação diferentes daquele do fludioxonil, poderia ser incorporado em um programa de controle de doenças.

No Canadá e nos Estados Unidos da América poucos fungicidas estão disponíveis para o controle de doenças pós-colheita em maçã. Apenas tiabendazol tem sido constantemente usado para o controle de bolor azul e bolor cinza, mas seu uso tem-se tornado limitado devido ao desenvolvimento de *P. expansum* e *B. cinerea* resistentes. Sholberg, Bedford e Stokes (2005) avaliaram o pirimetanil como um novo fungicida pós-colheita. Vinte e um isolados de *Botrytis cinerea* e vinte e dois de *Penicillium* spp. foram avaliados quanto à sensibilidade ao pirimetanil. Concluiu-se que pirimetanil é um fungicida importante no controle de ambos os bolores causadores de podridão em maçã, podendo ser aplicado antes ou após a colheita.

Franck et al. (2005) avaliaram o efeito dos tratamentos com fungicidas (cyprodinil, fludioxonil e fenhexamida) empregados antes e após a colheita combinados com sachês geradores de dióxido de enxofre na decomposição causada por *Penicillium expansum* em uvas. A estocagem foi realizada a 0°C/15 dias e 20°C/5 dias. Os resultados evidenciaram que a aplicação de fungicidas pré-colheita e o uso de sachês no interior da embalagem efetivamente reduziu a podridão, após longo período de estocagem sob refrigeração.

Os fungos causadores de doenças, como outros organismos vivos, podem desenvolver resistência aos produtos tóxicos visando a sobrevivência da espécie. A grande diversidade dos microrganismos e sua intensa capacidade de multiplicação fornecem uma ampla oportunidade para a seleção de linhagens resistentes surgidas espontaneamente. Assim, numa população de fitopatógenos, sensível a um determinado fungicida, células com menor sensibilidade ao produto surgem devido à mutação ou outro mecanismo de variabilidade dos seres vivos. A aplicação do fungicida

seleciona as células resistentes, eliminando as sensíveis. Com aplicações sucessivas do mesmo ingrediente ativo, ocorre uma intensa pressão de seleção, fazendo com que as linhagens resistentes predominem na população até o momento em que o produto não tem mais efeito. Vários casos de resistência ocorreram após o lançamento de fungicidas sistêmicos no mercado. Antes, com os produtos convencionais, o problema não ocorria, pois eles atuavam em diversos pontos do metabolismo do fungo. Os sistêmicos atuam em poucas etapas do metabolismo, permitindo o desenvolvimento de linhagens resistentes (MAPA, 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Fungos testes

Os fungos toxigênicos *Aspergillus ochraceus* A152, *Fusarium verticillioides* 103F e *Penicillium expansum* n.2 (cedidos pela Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka), provenientes de cultura monospórica (NELSON; TOUSSON; MARASAS, 1983), foram mantidos em Ágar Batata Dextrose (PDA) a 4°C (infusão de batatas, dextrose e ágar) inclinado. Após incubação a 21°C/120 horas, sendo padronizados com auxílio da câmara de Newbauer (10^5 esporos/mL) para os testes subseqüentes. As leveduras, por sua vez, foram mantidas em meio GYMP (glicose, extrato de levedura, extrato de malte, NaH_2PO_4 e ágar) cobertas com óleo mineral para evitar ressecamento e mantidas a $8 \pm 2^\circ\text{C}$. Para os ensaios foram padronizadas com o emprego da escala de McFarland.

4.2. Leveduras antagonistas

Cento e quinze leveduras isoladas de polpas congeladas de frutas (FAZIO, 2006) e dez de formigueiro (Laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais - UNESP, Rio Claro) foram utilizadas para o estudo de antagonismo em relação à presença de fator “killer”.

4.3. Caracterização de leveduras “killer”

As linhagens padrão de leveduras sensíveis utilizadas para a caracterização do fator “killer” consistiram de *Candida glabrata* NCYC 366, *C. glabrata* NCYC 388, *C.*

albicans 12A, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 e *Pichia kluyveri* CAY 15.

Uma alçada de cepa sensível cultivada em Ágar Sabouraud Glicose (glicose, peptona, extrato de levedura e ágar) foi suspensa em 3 mL de solução salina a 0,85% e padronizada na Escala n°. 1 de McFarland. As culturas sensíveis ($3,0 \times 10^6$ células) foram semeadas por profundidade em placas de Petri adicionando-se 20 mL de Ágar Sabouraud modificado, composto por glicose, peptona, ágar e azul de metileno (POLONELLI et al., 1983). Após a solidificação foi inoculada uma alçada de leveduras teste previamente cultivadas em tubos de ensaio contendo Ágar Sabouraud Glicose sob forma de pequenos pontos (2,0 mm de diâmetro) na superfície do meio. Após incubação a 25°C/120 horas, a presença de fator “killer” foi evidenciada pela formação do halo de inibição ao redor das leveduras teste (WALKER; MCLEOD; HODGSON, 1995).

4.4. Atividade antifúngica em meio sólido

Foi analisada pela técnica de semeadura em profundidade (placas de Petri contendo 25 mL de Ágar MPL (glicose, extrato de levedura, cloreto de sódio, fosfato diácido de sódio, sulfato de amônio e ágar) inoculado com 10^5 esporos de fungos teste. Após a solidificação se procedeu uma perfuração no centro da placa (diâmetro de 8 mm) e foram introduzidos 100 µL ($3,0 \times 10^6$ células) do cultivo de levedura em Caldo MPL (glicose; extrato de levedura; NaH_2PO_4 ; NaCl; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) a 25°C/48 horas. As placas foram incubadas a 25°C e os diâmetros de inibição medidos após 5 dias com auxílio de paquímetro (MOTOMURA; HIROOKA, 1996). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5. Teste com sobrenadante de cultivo

4.5.1. Obtenção do extrato bruto

Para o pré-inóculo, uma alçada de levedura foi transferida para frasco de Erlenmeyer com 25 mL de Caldo MPL e incubado a 25°C/24 horas a 150 rpm. O inóculo foi preparado baseando-se na escala de McFarland para bactérias (INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - ITAL, 1995) adaptada para leveduras,

recalculando-se para obter os valores de $3,0 \times 10^7$ (escala n°. 1) a $3,0 \times 10^8$ leveduras/mL (escala n°. 10), considerando que o tamanho de uma levedura equivale a 10 vezes ao bacteriano (LEVY, 2003). A seguir $3,0 \times 10^6$ células de leveduras foram inoculadas em 5 frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL de Caldo MPL e em 5 com 50 mL do mesmo caldo com 10^5 esporos do fungo teste. Após 24, 48, 72, 96 e 120 horas a 25°C , os cultivos foram centrifugados ($6.500 \times g/15 \text{ min.}$, 10°C) e o extrato bruto obtido.

4.5.2 Atividade antifúngica em meio líquido

Foi realizada baseando-se essencialmente nas metodologias descritas por Janisiewicz, Tworkoski e Sharer (2000) e Chen et al. (1999). O extrato bruto obtido foi filtrado (membrana “Millipore” $0,20 \mu\text{m}$) e inoculado em volume igual (1,0 mL) de Caldo MPL previamente inoculado com 10^5 esporos de fungos teste. Os tubos de ensaio foram incubados a 25°C e se procedeu microscopia após 12 horas, determinando-se a germinação dos esporos e tamanho das hifas. Paralelamente foi preparado o controle (branco), inoculando-se 10^5 esporos de fungos teste em tubos de ensaio contendo 1,0 mL de Caldo MPL e 1,0 mL de água destilada estéril.

Os resultados foram obtidos por meio de três repetições, sendo que em cada uma foi medido o tamanho de 40 hifas selecionadas aleatoriamente e foram contadas 100 células para determinar a porcentagem de esporos germinados. Os dados de cada repetição foram analisados perante dois dados para a porcentagem de esporos germinados e 40 para a determinação do tamanho de hifas.

4.6. Cura de linhagem “killer” por tratamento térmico

O processo de cura das leveduras foi realizado com o intuito de associar o caráter “killer” perante a possibilidade de perda de atividade antagônica, conforme descrito por Petering et al. (1991). As leveduras foram pré-cultivadas a 25°C “overnight” em meio YPD (extrato de levedura, peptona, glicose) e padronizadas na escala n°. 1 de McFarland, procedendo diluições decimais seriadas até 10^{-4} . Uma alíquota de 0,1 mL (aproximadamente $3,0 \times 10^2$ células) foi inoculada na superfície de placas de Petri contendo o mesmo meio com ágar, seguido de incubação sob tratamento térmico de $42^\circ\text{C}/48 \text{ horas}$ (PETERING et al. 1991). As cepas termorresistentes (colônias

desenvolvidas) foram submetidas ao teste “killer”, para comprovar a cura. O resultado positivo (perda de atividade “killer”) foi caracterizado pela ausência do halo de inibição da linhagem sensível padrão.

4.7. Análise estatística

Os dados sobre atividade antifúngica exercida pelas leveduras antagonistas foram analisados pelo programa ANOVA/MANOVA (STATÍSTICA 5.0, 1995) mediante teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.8. Atividade antifúngica em maçã

Para a constatação da atividade antifúngica “in vivo” empregou-se as leveduras utilizadas no antifungigrama em meio líquido: *Dekkera bruxellensis* (PF58₃) isolada de polpa congelada de morango, *Pichia anomala* (142) e *Saccharomyces cerevisiae* (PF3₄) isolada de polpa congelada de melão; e os fungos filamentosos *Aspergillus ochraceus* A152 e *Penicillium expansum* n.2. Foi realizada baseando-se essencialmente nas metodologias descritas por Lima et al. (2006), sendo os testes realizados em duplicata. Maçãs (*Malus domestica*) da variedade Fuji foram superficialmente sanitizadas por imersão em hipoclorito de sódio (2%) durante 15 minutos. Em seguida, realizou-se o enxágüe e a secagem à temperatura ambiente.

Foram realizadas 4 lesões (3 mm de largura x 3 mm de profundidade), inoculando-se 30 µL da suspensão de células antagonistas (PF58₃, PF3₄ e 142) contendo 10⁸ células/mL em cada orifício. Após 2 horas à temperatura ambiente, foram inoculados 15 µL da suspensão de esporos (10⁵ esporos/mL). Incubou-se a 21°C/21 dias; e o número de orifícios com características de podridão foi verificado periodicamente (7, 14 e 21 dias).

Cinco tratamentos diferentes foram realizados:

- A - Controle (30 µL de água destilada estéril);
- B - 30 µL da suspensão de células antagonistas;
- C - 30 µL da suspensão de células antagonistas no fungicida à baixa dosagem (10% da dosagem recomendada pelo fabricante);
- D - 30 µL do fungicida em baixa dosagem (40 mL/100 L) e

E - 30 µL do fungicida em dosagem recomendada pelo fabricante (400 mL/100L).

Utilizou-se o fungicida Tecto[®]SC (Syngenta Crop Protection), o qual apresenta 48,5% m/v do ingrediente ativo tiabendazol (fungicida sistêmico do grupo químico Benzimidazol). Tendo como objetivo verificar a vantagem da aplicação do tratamento integrado com relação aos tratamentos aplicados individualmente, o número de orifícios com sinais de podridão foram transformados em porcentagem de eficácia de controle (EC) como segue:

$$EC = [(C-T)/C] \times 100$$

Onde C é o número de orifícios com sinal de podridão no controle e T no tratamento avaliado. Os valores variaram de 0 (nenhuma eficácia de controle) a 100 (máxima eficácia de controle).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de cento e vinte e cinco leveduras isoladas de polpas congeladas de frutas e formigueiro (Laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais - UNESP, Rio Claro) foi empregado no estudo de características antagônicas (antibiose e competição por nutrientes) e presença de fator “killer”, sendo os códigos exibidos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Leveduras isoladas e respectivos códigos empregados nos ensaios.

Leveduras	Código dos isolados
<i>Aureobasidium</i> spp.	102* ^k
<i>Bullera variabilis</i>	PF39 ₁₀ ^k
<i>Candida apis</i>	PF58 ₁ ^k
<i>Candida homilentoma</i>	11*
<i>Candida sake</i>	90* ^k
<i>Cryptococcus albidus</i>	PF2 ₂ ^k ; 145* ^k
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryi</i>	PF11 ₂ ^k ; PF14 ₁ ^k ; PF16 ₆ ^k ; PF17 ₂ ^k ; PF17 ₉ ^k ; PF30 ₄ ^k ; PF34 ₁ ^k ; PF37 ₁ ^k ; PF37 ₅ ^k ; PF38 ₁ ; PF39 ₂ ^k ; PF39 ₃ ^k ; PF39 ₄ ^k ; PF39 ₉ ; PF40 ₁ ^k ; PF48 ₅ ^k ; PF54 ₄ ^k ; PF56 ₁ ^k ; PF56 ₆ ^k ; PF60 ₃
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	PF17 ₁ ^k
<i>Dekkera bruxellensis</i>	PF27 ₁ ^k ; PF31 ₁₀ ^k ; PF34 ₃ ^k ; PF48 ₇ ^k ; PF49 ₁ ; PF58 ₃ ^k
<i>Hanseniaspora vineae</i>	PF25 ₅ ^k
<i>Pichia anomala</i>	142* ^k
<i>Pichia farinosa</i>	PF31 ₄ ^k
<i>Pichia guilliermondii</i>	42* ^k ; 72*
<i>Rhodotorula glutinis</i>	PF12 ₁ ^k ; PF25 ₇ ^k ; PF39 ₇ ; PF56 ₂ ; 166* ^k
<i>Rhodotorula minuta</i>	PF30 ₁ ^k
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	PF11 ₃ ^k ; PF25 ₁₀ ; PF27 ₂ ^k ; PF27 ₄ ^k ; PF42 ₃ ^k ; PF43 ₁ ^k ; PF3 ₁ ^k ; PF3 ₂ ^k ; PF3 ₃ ^k ; PF3 ₄ ^k ; PF3 ₅ ^k ; PF3 ₆ ^k ; PF3 ₇ ^k ; PF3 ₉ ^k ; PF3 ₁₀ ^k ; PF3 ₁₁ ^k ; PF4 ₁ ^k ; PF4 ₂ ^k ; PF4 ₃ ^k ; PF4 ₄ ^k ; PF4 ₅ ^k ; PF4 ₇ ^k ; PF4 ₁₀ ^k ; PF4 ₁₁ ^k ; PF4 ₁₂ ^k ; PF10 ₁ ^k ; PF10 ₃ ^k ; PF16 ₁ ^k ; PF16 ₂ ^k ; PF16 ₃ ^k ; PF16 ₅ ^k ; PF17 ₃ ^k ; PF27 ₃ ^k ; PF27 ₅ ^k ; PF31 ₂ ^k ; PF37 ₃ ^k ; PF39 ₁ ; PF39 ₅ ^k ; PF39 ₆ ; PF39 ₁₁ ^k ; PF41 ₂ ^k ; PF46 ₃ ^k ; PF48 ₁ ^k ; PF48 ₂ ^k ; PF48 ₃ ; PF48 ₄ ^k ; PF48 ₆ ; PF49 ₂ ^k ; PF49 ₃ ^k ; PF54 ₁ ; PF54 ₂ ^k ; PF54 ₃ ; PF54 ₅ ; PF54 ₇ ^k ; PF56 ₃ ^k ; PF56 ₇ ; PF56 ₁₀ ^k ; PF57 ₁ ^k
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	PF54 ₈ ^k
<i>Sporobolomyces roseus</i>	PF56 ₉ ^k
<i>Stephanoascus ciferrii</i>	PF25 ₈ ^k
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	PF11 ₁ ^k ; PF11 ₄ ^k ; PF11 ₅ ^k ; PF11 ₆ ^k ; PF11 ₇ ^k ; PF12 ₃ ^k ; PF12 ₄ ^k ; PF12 ₆ ; PF12 ₈ ^k ; PF12 ₉ ^k ; PF31 ₁ ^k ; PF60 ₁ ^k ; 04* ^k ; 54* ^k
<i>Tremella foliacea</i>	25* ^k
<i>Trichosporon beigelii</i>	PF31 ₃ ^k ; PF31 ₇ ^k ; PF37 ₂ ; PF37 ₄ ^k

Leveduras fornecidas pelo Laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais - UNESP, Rio Claro; as cepas de código PF foram isoladas de polpas congeladas de frutas (FAZIO, 2006); ^k leveduras "killer".

A **Tabela 2** apresenta as cento e seis (84,8%) leveduras “killer” positivas, do total de cento e vinte e cinco (100,0%) testadas. Em trabalhos realizados por Coelho (2005), Trindade et al. (2002), Cabral et al. (2005) e Ceccato-Antonini, Cremonini e Regenfuss (1999) porcentagens inferiores de leveduras exibiram o fenótipo “killer”, sendo respectivamente 29,5; 8,4; 7,3 e 21,2%. A *Saccharomyces cerevisiae* apresentou o maior número de linhagens com atividade micocinogênica positiva, ou seja, 44 (35,2%). Com relação a esta espécie, porcentagem inferior (0,76%) foi verificada por Trindade et al. (2002) em trabalho similar. A constatação da atividade “killer” por esta espécie está de acordo com resultados da literatura (PHILLISKIRK; YOUNG, 1975; YOUNG, 1981; WALKER; MCLEOD; HODGSON, 1995).

Tabela 2. Identificação de leveduras positivas para o fator “killer” empregando leveduras sensíveis de referência.

Leveduras sensíveis	Leveduras (+) para fator “killer”
<i>Pichia kluyveri</i> CAY 15	PF2 ₂ ; PF3 ₃ ; PF3 ₄ ; PF3 ₅ ; PF3 ₆ ; PF3 ₇ ; PF3 ₉ ; PF3 ₁₀ ; PF3 ₁₁ ; PF4 ₁ ; PF4 ₂ ; PF4 ₃ ; PF4 ₄ ; PF4 ₅ ; PF4 ₇ ; PF4 ₁₀ ; PF4 ₁₁ ; PF4 ₁₂ ; PF10 ₃ ; PF11 ₁ ; PF11 ₂ ; PF11 ₃ ; PF11 ₄ ; PF11 ₅ ; PF11 ₆ ; PF11 ₇ ; PF12 ₄ ; PF12 ₈ ; PF12 ₉ ; PF14 ₁ ; PF16 ₁ ; PF16 ₂ ; PF16 ₃ ; PF16 ₅ ; PF16 ₆ ; PF17 ₁ ; PF17 ₂ ; PF17 ₃ ; PF17 ₉ ; PF27 ₁ ; PF27 ₂ ; PF27 ₄ ; PF27 ₅ ; PF30 ₁ ; PF30 ₄ ; PF31 ₁ ; PF31 ₃ ; PF31 ₄ ; PF31 ₇ ; PF34 ₃ ; PF37 ₁ ; PF37 ₃ ; PF37 ₄ ; PF37 ₅ ; PF40 ₁ ; PF43 ₁ ; PF48 ₁ ; PF48 ₂ ; PF48 ₄ ; PF48 ₅ ; PF48 ₇ ; PF49 ₂ ; PF54 ₂ ; PF54 ₄ ; PF56 ₉ ; PF56 ₁₀ ; PF57 ₁ ; PF58 ₃ ; 90; 142; 166
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1006	PF2 ₂ ; PF3 ₃ ; PF3 ₄ ; PF3 ₇ ; PF3 ₉ ; PF3 ₁₀ ; PF4 ₁ ; PF4 ₂ ; PF4 ₃ ; PF4 ₄ ; PF4 ₅ ; PF4 ₇ ; PF4 ₁₀ ; PF4 ₁₁ ; PF11 ₁ ; PF11 ₃ ; PF11 ₄ ; PF11 ₇ ; PF12 ₁ ; PF12 ₃ ; PF12 ₈ ; PF12 ₉ ; PF14 ₁ ; PF16 ₁ ; PF16 ₆ ; PF25 ₇ ; PF25 ₈ ; PF27 ₂ ; PF27 ₄ ; PF30 ₁ ; PF30 ₄ ; PF31 ₂ ; PF31 ₃ ; PF31 ₄ ; PF31 ₇ ; PF31 ₁₀ ; PF34 ₁ ; PF37 ₅ ; PF39 ₃ ; PF39 ₁₁ ; PF40 ₁ ; PF43 ₁ ; PF56 ₁ ; PF56 ₆ ; PF57 ₁ ; PF58 ₃ ; PF60 ₁ ; 102; 142; 145; 166
<i>Candida glabrata</i> NCYC 366	PF2 ₂ ; PF3 ₂ ; PF3 ₄ ; PF3 ₅ ; PF3 ₆ ; PF3 ₉ ; PF3 ₁₁ ; PF4 ₁₁ ; PF4 ₁₂ ; PF10 ₁ ; PF10 ₃ ; PF14 ₁ ; PF16 ₂ ; PF16 ₃ ; PF16 ₅ ; PF17 ₃ ; PF25 ₅ ; PF31 ₂ ; PF31 ₄ ; PF34 ₁ ; PF34 ₃ ; PF37 ₁ ; PF37 ₄ ; PF37 ₅ ; PF39 ₂ ; PF39 ₄ ; PF39 ₁₀ ; PF39 ₁₁ ; PF40 ₁ ; PF43 ₁ ; PF48 ₂ ; PF48 ₄ ; PF48 ₇ ; PF56 ₁ ; PF56 ₃ ; PF56 ₆ ; PF56 ₉ ; PF56 ₁₀ ; PF58 ₃ ; 04; 142; 166
<i>Candida glabrata</i> NCYC 388	PF2 ₂ ; PF3 ₁ ; PF12 ₈ ; PF14 ₁ ; PF17 ₉ ; PF27 ₂ ; PF27 ₄ ; PF30 ₁ ; PF30 ₄ ; PF31 ₂ ; PF31 ₃ ; PF31 ₄ ; PF34 ₁ ; PF37 ₅ ; PF43 ₁ ; PF54 ₄ ; PF54 ₇ ; PF56 ₁ ; PF56 ₃ ; PF56 ₆ ; PF57 ₁ ; PF58 ₃ ; 42; 142; 166
<i>Candida albicans</i> 12 A	PF2 ₂ ; PF3 ₁ ; PF3 ₂ ; PF3 ₃ ; PF3 ₄ ; PF3 ₅ ; PF3 ₆ ; PF3 ₇ ; PF3 ₉ ; PF3 ₁₀ ; PF3 ₁₁ ; PF4 ₁ ; PF4 ₂ ; PF4 ₃ ; PF4 ₄ ; PF4 ₅ ; PF4 ₇ ; PF4 ₁₀ ; PF4 ₁₂ ; PF10 ₃ ; PF11 ₃ ; PF16 ₁ ; PF16 ₂ ; PF16 ₃ ; PF16 ₅ ; PF16 ₆ ; PF17 ₉ ; PF25 ₇ ; PF27 ₁ ; PF27 ₂ ; PF27 ₃ ; PF27 ₄ ; PF30 ₄ ; PF31 ₁ ; PF31 ₂ ; PF31 ₃ ; PF31 ₄ ; PF31 ₇ ; PF34 ₁ ; PF37 ₁ ; PF37 ₅ ; PF39 ₂ ; PF39 ₅ ; PF39 ₁₀ ; PF39 ₁₁ ; PF41 ₂ ; PF42 ₃ ; PF43 ₁ ; PF46 ₃ ; PF48 ₂ ; PF48 ₄ ; PF48 ₇ ; PF49 ₂ ; PF49 ₃ ; PF54 ₇ ; PF54 ₈ ; PF56 ₁ ; PF56 ₃ ; PF56 ₆ ; PF56 ₉ ; PF56 ₁₀ ; PF57 ₁ ; PF58 ₃ ; 25; 54; 102; 166

Ensaio em ágar Sabouraud adicionado de 0,003% de azul de metileno (POLONELLI et al., 1983) com culturas sensíveis ($3,0 \times 10^6$ células) incubadas a 20°C por 72 horas, em triplicata.

PF = leveduras isoladas de polpas congeladas de frutas.

Verificou-se que trinta e quatro (27,2%) leveduras foram “killer” positivas contra uma linhagem sensível; vinte (16,0%) contra duas; trinta e três (26,4%) contra três; treze (10,4%) contra quatro e seis (4,8%) contra cinco. Dentre essas, cinquenta e cinco (44%) leveduras foram selecionadas para realização do antifungigrama em meio sólido por apresentarem maior espectro de ação “killer” (positividade por antibiose contra duas ou mais leveduras sensíveis).

A ação micocinogênica foi também detectada em leveduras pertencentes aos gêneros *Aureobasidium*, *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Stephanoascus*, *Torulaspota* e *Trichosporon*; resultado semelhante àqueles obtidos por outros pesquisadores (COELHO, 2005; PHILLISKIRK; YOUNG, 1975; YOUNG, 1981; MORACE et al., 1984; RADLER; PFEIFFER; DENNART, 1985; JANISIEWICZ; PETERSON; BORS, 1994; REYES; ROHRBACH; PAULL, 2004; TRINDADE et al., 2002; VITAL et al., 2002).

Cryptococcus albidus e *Rhodotorula mucilaginosa* estão entre as linhagens que exibiram ação micocinogênica; resultado este também obtido por Trindade et al. (2002). *Pichia anomala* e *P. farinosa* apresentaram ação antagônica sobre a levedura sensível de referência *Saccharomyces cerevisiae* NCYC-1006. Em pesquisa realizada por Ceccato-Antonini, Cremonini e Regenfuss (1999) a mesma habilidade foi demonstrada pelo gênero *Pichia*. Dentre as linhagens testadas, seis (4,8%) apresentaram atividade micocinogênica contra todas as linhagens sensíveis empregadas. Resultados superiores; 7,3 e 74,4%, foram obtidos, respectivamente por Cabral et al. (2005) e Farias, Maia e Vital (2005).

A **Tabela 3** apresenta os resultados do antifungigrama em meio sólido, empregado como método de triagem de leveduras antagonistas de interesse na produção de compostos extracelulares bioativos na inibição de *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium expansum*. Das cinquenta e cinco leveduras “killer” positivas submetidas ao antifungigrama em meio sólido, quarenta e duas (76,4%) apresentaram antagonismo contra *A. ochraceus*, vinte e quatro (43,6%) contra *F. verticillioides* e trinta e duas (58,2%) contra *P. expansum*; seja por competição de nutrientes ou por antibiose.

Tabela 3. Efeito antagonístico de leveduras (células íntegras) no desenvolvimento de *A. ochraceus*, *F. verticillioides* e *P. expansum*.

Leveduras/códigos	Diâmetro de inibição (mm) ^F											
	<i>Aspergillus ochraceus</i>				<i>Fusarium verticillioides</i>				<i>Penicillium expansum</i>			
	CN ^a	A ^b	CN / A ^c		CN	A	CN / A		CN	A	CN / A	
<i>Aureobasidium</i> spp 102						9,00						
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryi</i> PF14 ₁	15,00											9,00
<i>D. hansenii</i> var. <i>fabryi</i> PF16 ₆											14,00	
<i>D. hansenii</i> var. <i>fabryi</i> PF17 ₉			15,00 / 20,00 ^d		10,00						15,00	
<i>D. hansenii</i> var. <i>fabryi</i> PF30 ₄	16,00											
<i>D. hansenii</i> var. <i>fabryi</i> PF34 ₁	10,50			15,00							15,00	
<i>D. hansenii</i> var. <i>fabryi</i> PF37 ₅		10,00										
<i>D. hansenii</i> var. <i>fabryi</i> PF39 ₂		9,50										
<i>D. hansenii</i> var. <i>fabryi</i> PF40 ₁	19,50				23,00						19,00	
<i>D. hansenii</i> var. <i>fabryi</i> PF54 ₄	19,00				17,00						16,50	
<i>D. hansenii</i> var. <i>fabryi</i> PF56 ₁	12,00											
<i>D. hansenii</i> var. <i>fabryi</i> PF56 ₆	11,00											
<i>Dekkera bruxellensis</i> PF27 ₁	21,00					11,00						
<i>D. bruxellensis</i> PF34 ₃	11,00				10,00							
<i>D. bruxellensis</i> PF58 ₃			31,00 / 35,00					50,00 / 52,00				13,00
<i>Pichia anomala</i> 142		10,00							10,00			10,00
<i>Pichia farinosa</i> PF31 ₄	29,00			17,50							15,00	
<i>Rhodotorula glutinis</i> 166						9,00						
<i>R. mucilaginosa</i> PF11 ₃		10,00										
<i>R. mucilaginosa</i> PF43 ₁												
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PF3 ₁	11,00											
<i>S. cerevisiae</i> PF3 ₂		9,00							9,00			9,00
<i>S. cerevisiae</i> PF3 ₃		9,00							9,00			
<i>S. cerevisiae</i> PF3 ₄		9,00										
<i>S. cerevisiae</i> PF3 ₅		10,00							10,00			10,00
		9,00							9,00			

(continua)

Tabela 3. Efeito antagônico de leveduras (células integras) no desenvolvimento de *A. ochraceus*, *F. verticillioides* e *P. expansum*.

Leveduras/códigos	Aspergillus ochraceus			Diâmetro de inibição (mm) ^F			Penicillium expansum		
				<i>Fusarium verticillioides</i>					
	CN	A	CN / A	CN	A	CN / A	CN	A	CN / A
<i>S. cerevisiae</i> PF3 ₇				9,00				9,00	
<i>S. cerevisiae</i> PF3 ₉				9,00					
<i>S. cerevisiae</i> PF4 ₁				9,00				9,00	
<i>S. cerevisiae</i> PF4 ₂		9,00		9,00					
<i>S. cerevisiae</i> PF4 ₃		9,00		9,00				9,00	
<i>S. cerevisiae</i> PF4 ₄	10,00								
<i>S. cerevisiae</i> PF4 ₅	10,00								
<i>S. cerevisiae</i> PF4 ₁₀								9,00	
<i>S. cerevisiae</i> PF4 ₁₁								10,00	
<i>S. cerevisiae</i> PF4 ₁₂		10,00						11,00	
<i>S. cerevisiae</i> PF10 ₃								11,00	
<i>S. cerevisiae</i> PF16 ₁								10,00	
<i>S. cerevisiae</i> PF16 ₂								9,00	
<i>S. cerevisiae</i> PF16 ₃		13,00						9,00	
<i>S. cerevisiae</i> PF16 ₅		10,50						9,00	
<i>S. cerevisiae</i> PF17 ₃								9,00	
<i>S. cerevisiae</i> PF31 ₂	19,00								
<i>S. cerevisiae</i> PF54 ₇	12,00			17,00			10,00		
<i>S. cerevisiae</i> PF56 ₃								9,00	
<i>S. cerevisiae</i> PF56 ₁₀			23,00 / 27,00						
<i>S. cerevisiae</i> PF57 ₁			27,00 / 31,00			20,00 / 22,00	11,00		
<i>Stephanoascus ciferrii</i> PF25 ₈	9,00								
<i>Torulaspota delbrueckii</i> PF11 ₁	9,00							9,00	
<i>T. delbrueckii</i> PF11 ₄		9,50						9,00	
<i>T. delbrueckii</i> PF11 ₇		11,00						9,00	

(continua)

Tabela 3. Efeito antagônico de leveduras (células íntegras) no desenvolvimento de *A. ochraceus*, *F. verticillioides* e *P. expansum*.

Leveduras/códigos	Diâmetro de inibição (mm) ^F													
	<i>Aspergillus ochraceus</i>						<i>Fusarium verticillioides</i>						<i>Penicillium expansum</i>	
	CN	A	CN / A	CN	A	CN / A	CN	A	CN / A	CN	A	CN / A		
<i>T. delbrueckii</i> PF12 ₈				10,00										
<i>T. delbrueckii</i> PF12 ₉				11,00										
<i>T. delbrueckii</i> PF31 ₁				10,00							9,00			
<i>Trichosporon beigelii</i> PF31 ₃	18,00			16,00			13,00							
<i>T. beigelii</i> PF31 ₇	20,50			12,50			14,00							

Células íntegras: leveduras cultivadas em Caldo MPL a 25°C/48 h.

a: Diâmetro caracterizado por desenvolvimento de massa celular.

b: Diâmetro caracterizado por halo de inibição.

c: Diâmetro caracterizado por desenvolvimento de massa celular seguido de halo de inibição.

d: O segundo valor corresponde ao somatório do diâmetro caracterizado por desenvolvimento de massa celular mais o halo de inibição.

e: Ensaio com inóculo de células íntegras (3,0 x 10⁶ células) em orifício de 8 mm no Ágar MPL previamente inoculado "Pour Plate" com 10⁵ esporos de fungos teste (25°C/5 dias), em triplicata.

Com relação a *A. ochraceus*, dentre as leveduras testadas empregando células íntegras, dezenove (34,5%) apresentaram antagonismo por antibiose, dezenove (34,5%) por competição de nutrientes e quatro (7,3%) por competição de nutrientes e antibiose. O diâmetro de inibição caracterizado por competição de nutrientes (desenvolvimento de massa celular) variou de 9 a 31 mm, sendo *Dekkera bruxellensis* PF58₃ responsável pela formação de maior halo. Em relação às antagonistas produtoras de compostos extracelulares (halos de inibição evidenciados por antibiose), o diâmetro variou de 9 a 35 mm. Em trabalho realizado por Soliman e Badeaa (2002) foi observada atividade antagônica (100,0%) de óleo essencial de menta (2000 ppm) sobre *A. ochraceus*. Masoud e Høj Kalsoft (2006) também constataram a atividade antifúngica de *Pichia anomala*, *P. kluyveri* e *Hanseniaspora uvarum* sobre *A. ochraceus*.

No que se refere à *Fusarium verticillioides*, quatorze (25,5%) exibiram atividade micocinogênica por antibiose, oito (14,5%) por competição de nutrientes e duas (3,6%) por competição de nutrientes e antibiose. O diâmetro de inibição caracterizado por competição de nutrientes variou de 10 a 50 mm, sendo *Dekkera bruxellensis* PF58₃ responsável pela formação de maior halo. Em relação às antagonistas produtoras de compostos extracelulares, o diâmetro variou de 9 a 52 mm. O emprego da bactéria *Bacillus* RC9 inibiu o desenvolvimento de *F. verticillioides* em 51,5% (CAVAGLIERI; PASSONE; ETCHEVERRY, 2004). Em trabalho realizado por outros pesquisadores uma linhagem do gênero *Bacillus* exerceu atividade antagônica de 78,0% sobre o mesmo fungo filamentoso (CAVAGLIERI et al., 2005).

Para testes realizados frente a *Penicillium expansum* vinte e duas (40,0%) leveduras mostraram ação antagonista por antibiose e dez (18,2%) por competição de nutrientes. O diâmetro de inibição caracterizado por competição de nutrientes variou de 10 a 19 mm, sendo *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi* PF40₁ responsável pela formação de maior halo. Em relação às antagonistas produtoras de compostos extracelulares, o diâmetro variou de 9 a 13 mm. Intervalos superiores (10 a 31 mm e 13 a 17 mm) foram obtidos em pesquisa desenvolvida por Coelho (2005) para o mesmo bolor. Trabalhos realizados por Blum et al. (2004) e Zhang, Zheng e Yu (2007) constataram o antagonismo de *Cryptococcus laurentii* sobre este fungo filamentoso. Atividade micocinogênica sobre este bolor também foi constatada para *Rhodotorula*

glutinis (CALVENTE; BENUZZI; TOSETTI, 1999), *Metschnikowia pulcherrima* (SPADARO et al., 2002) e *Kloeckera apiculata* e *M. pulcherrima* (KARABULUT et al., 2005).

Foram selecionadas para realização do antifungigrama em meio líquido as três leveduras que apresentaram os melhores indícios de antibiose contra os três bolores.

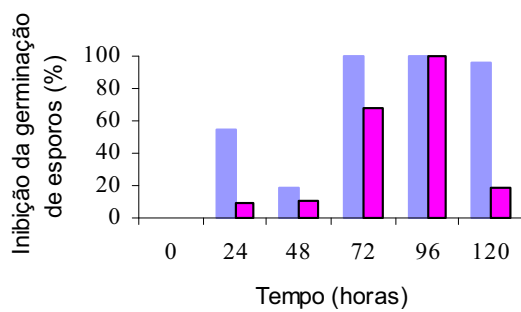
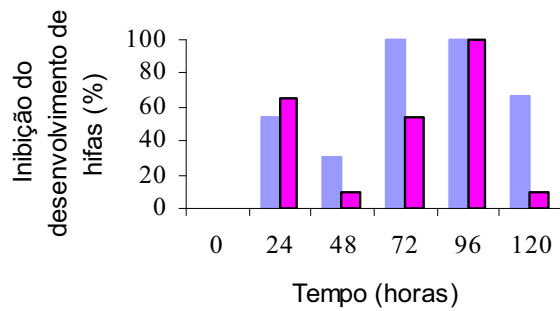
A **Tabela 4** e **Figuras 1, 4 e 7** apresentam as médias gerais dos resultados de três repetições do antifungigrama em meio líquido com sobrenadante do cultivo de *Dekkera bruxellensis* PF58₃, *Pichia anomala* 142 e *Saccharomyces cerevisiae* PF3₄ contra a germinação de esporos e desenvolvimento de hifas de *A. ochraceus*. Em adição, cultivou-se as leveduras em interação com os bolores, e os sobrenadantes obtidos foram inoculados novamente com o fungo; objetivando estimular maior produção de substância antagônica associada a um processo induzido.

Tabela 4. Antifungograma em meio líquido com sobrenadante do cultivo obtido de levedura e da interação levedura/A. ochraceus.

Incubação (horas)	Comprimento de hifas (μm)				Germinação de esporos (%)			
	Sobrenadante levedura		Sobrenadante Levedura/A. ochraceus		Sobrenadante levedura		Sobrenadante Levedura/A. ochraceus	
	Controle		Controle		Controle		Controle	
	<i>Dekkera bruxellensis</i> PF58 ₃							
24	96,31 \pm 30,18 ^{cB}	43,53 \pm 15,78 ^{bA}	33,25 \pm 8,72 ^{bA}	64,00 ^{bC}	29,00 ^{dA}	58,00 ^{dB}		
48	52,10 \pm 18,16 ^{aB}	36,33 \pm 11,84 ^{bA}	46,96 \pm 18,60 ^{cB}	53,00 ^{aC}	43,00 ^{cA}	47,00 ^{cB}		
72	69,58 \pm 19,73 ^{bC}	0,00 ^{aA}	32,22 \pm 10,08 ^{bB}	77,00 ^{dC}	0,00 ^{aA}	25,00 ^{bB}		
96	74,72 \pm 20,82 ^{bB}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	73,00 ^{cB}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}		
120	81,23 \pm 24,72 ^{bA}	27,42 \pm 0,00 ^{abA}	73,35 \pm 31,59 ^{dA}	79,00 ^{eC}	3,00 ^{bA}	64,00 ^{eB}		
	<i>Pichia anomala</i> 142							
24	122,02 \pm 55,35 ^{aA}	124,42 \pm 59,43 ^{cA}	128,53 \pm 58,64 ^{bA}	80,00 ^{aB}	76,00 ^{cB}	60,00 ^{cA}		
48	127,85 \pm 57,87 ^{aB}	35,30 \pm 22,79 ^{aA}	51,41 \pm 39,97 ^{aA}	81,00 ^{aC}	29,00 ^{bA}	39,00 ^{bB}		
72	147,04 \pm 59,88 ^{aB}	34,62 \pm 11,19 ^{aA}	47,64 \pm 42,11 ^{aA}	81,00 ^{aB}	23,00 ^{aA}	25,00 ^{aA}		
96	137,79 \pm 56,57 ^{aA}	118,25 \pm 50,89 ^{cA}	110,37 \pm 61,39 ^{bA}	78,00 ^{aC}	72,00 ^{cB}	65,00 ^{cdA}		
120	151,15 \pm 58,95 ^{aB}	89,46 \pm 60,20 ^{bA}	104,54 \pm 55,77 ^{bA}	77,00 ^{aB}	75,00 ^{cB}	67,00 ^{dA}		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PF3 ₄							
24	101,80 \pm 18,34 ^{bB}	30,51 \pm 6,58 ^{aA}	30,51 \pm 7,91 ^{aA}	83,00 ^{dC}	49,00 ^{cA}	58,00 ^{cB}		
48	100,08 \pm 22,86 ^{bB}	27,98 \pm 2,74 ^{aA}	28,73 \pm 4,12 ^{aA}	71,00 ^{bB}	9,00 ^{aA}	11,00 ^{aA}		
72	106,25 \pm 26,30 ^{bB}	34,62 \pm 11,19 ^{aA}	42,50 \pm 23,40 ^{bA}	80,00 ^{cdB}	49,00 ^{cA}	45,00 ^{bA}		
96	75,41 \pm 18,10 ^{aC}	33,93 \pm 9,81 ^{aA}	43,87 \pm 17,06 ^{bB}	75,00 ^{bcB}	69,00 ^{dA}	66,00 ^{dA}		
120	76,43 \pm 27,75 ^{aB}	32,69 \pm 13,48 ^{aA}	37,02 \pm 10,39 ^{abA}	62,00 ^{aB}	42,00 ^{bA}	57,00 ^{cB}		

Ensaio realizado em Caldo MPL incubado a 25°C/12 horas; cada valor corresponde à média dos valores de 40 dados para crescimento de hifas e 2 dados para germinação de esporos. Letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Dekkera bruxellensis PF 58₃

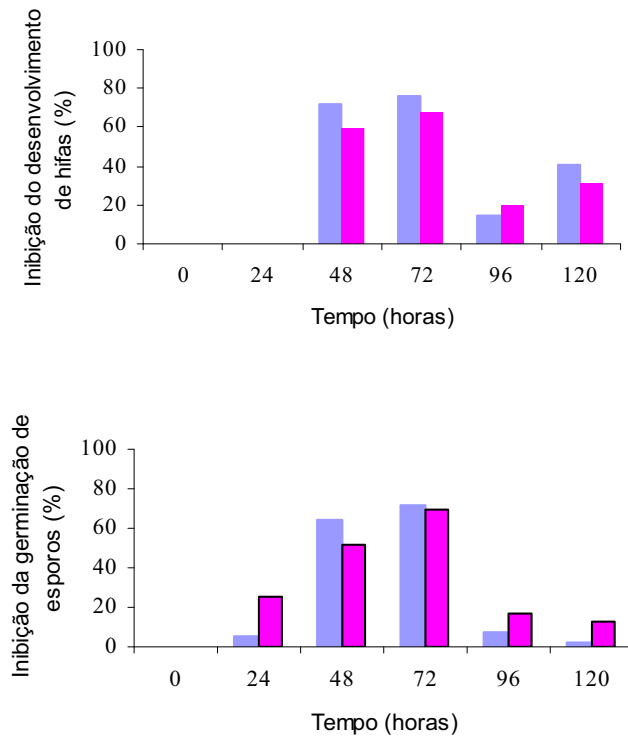


_____ Sobrenadante do cultivo de *D. bruxellensis* PF 58₃

_____ Sobrenadante do cultivo da interação *D. bruxellensis* PF 58₃ / *A. ochraceus*

Figura 1. Efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *D. bruxellensis* PF 58₃ e da interação *D. bruxellensis* PF 58₃ / *A. ochraceus* no crescimento de hifas e germinação de esporos de *A. ochraceus* (10^5 esporos), após 12 horas de incubação a 25°C.

Pichia anomala 142

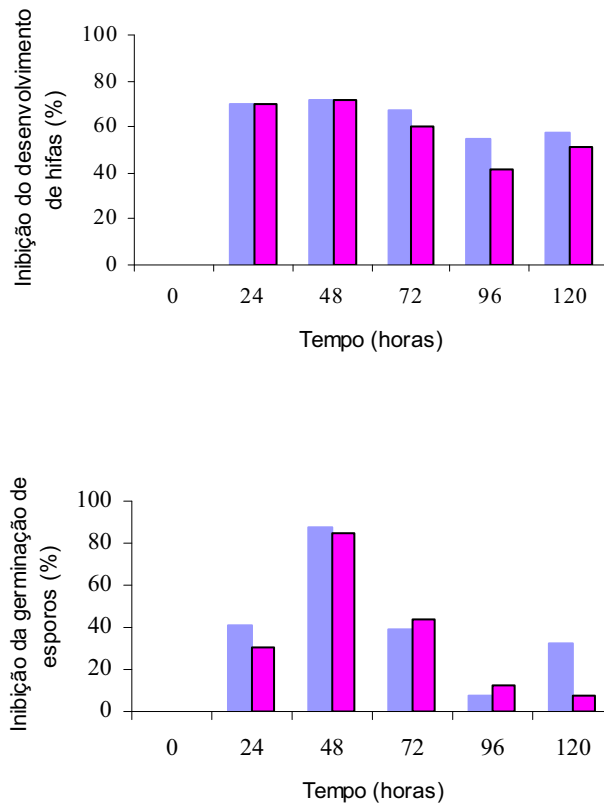


_____ Sobrenadante do cultivo de *P. anomala* 142

_____ Sobrenadante do cultivo da interação *P. anomala* 142 / *A. ochraceus*

Figura 4. Efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *P. anomala* 142 e da interação *P. anomala* 142 / *A. ochraceus* no crescimento de hifas e germinação de esporos de *A. ochraceus* (10^5 esporos), após 12 horas de incubação a 25°C.

Saccharomyces cerevisiae PF 3₄



_____ Sobrenadante do cultivo de *S. cerevisiae* PF 3₄

_____ Sobrenadante do cultivo da interação *S. cerevisiae* PF 3₄ / *A. ochraceus*

Figura 7. Efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *S. cerevisiae* PF 3₄ e da interação *S. cerevisiae* PF 3₄ / *A. ochraceus* no crescimento de hifas e germinação de esporos de *A. ochraceus* (10^5 esporos), após 12 horas de incubação a 25°C.

Analisando os valores apresentados para *A. ochraceus*, os sobrenadantes obtidos dos cultivos de 72 horas de *P. anomala* 142, 48 horas de *S. cerevisiae* PF3₄ e de 72 horas de *D. bruxellensis* PF58₃ inibiram o bolor com maior intensidade. O efeito inibitório sobre o crescimento de hifas e a germinação de esporos foi semelhante para *P. anomala* 142 e *S. cerevisiae* PF3₄ quando cultivadas por 48 horas. *D. bruxellensis* PF58₃ exerceu a melhor inibição (cultivo de 72 horas) sobre o bolor em questão; houve diferença significativa entre o sobrenadante do cultivo de levedura e da interação levedura/fungo ($P < 0,05$). Os valores inibitórios foram de, respectivamente, 100,0 e 53,7% para o crescimento de hifas; 100,0 e 67,5% para germinação de esporos. Isto sugere que o sobrenadante do cultivo da interação levedura/*A. ochraceus* (72 horas) continha produtos do metabolismo do fungo teste que dificultavam a atuação da substância antagônica. Para o cultivo de 96 horas esta diferença não existiu (100,0%). Inibição inferior (80,0%) foi constatada para *Pichia anomala* S17 sobre o desenvolvimento de *A. ochraceus* (MASOUD; HØJ KALTOFT, 2006). Efeito semelhante foi verificado em estudo realizado por Soliman e Badeaa (2002) por anis (concentração ≤ 500 ppm) sobre *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* e *Fusarium moniliforme*.

Os valores exibidos na **Tabela 5** e **Figuras 2, 5 e 8** para *Fusarium verticillioides* demonstram que os sobrenadantes obtidos dos cultivos de 72 horas de *P. anomala* 142, 48 horas de *S. cerevisiae* PF3₄; e de 96 horas da *D. bruxellensis* PF58₃ exerceram efeito antagônico mais intenso sobre o crescimento de hifas do fungo filamentoso, sendo respectivamente, 63,0; 60,6 e 77,9%. O melhor efeito inibitório sobre o crescimento de hifas (77,9%) e germinação de esporos (79,8%) foi exercido por *D. bruxellensis* PF58₃. Soliman e Badeaa (2002) constataram inibição superior (100,0%) de óleos essenciais de anis (500 ppm) e menta (3000 ppm) sobre o fungo filamentoso do mesmo gênero. Atividade antifúngica de *Arthrobacter globiformis* RC4 e *Bacillus subtilis* RC8 sobre *F. verticillioides* foi verificada em trabalho desenvolvido por Cavaglieri, Passone e Etcheverry (2004). Em pesquisa realizada por outros pesquisadores, *Bacillus* spp. 3 e *Bacillus* spp. CE1 exerceram atividade antifúngica equivalente a, 78,0 e 60,0% sobre, respectivamente este bolor (CAVAGLIERI et al., 2005).

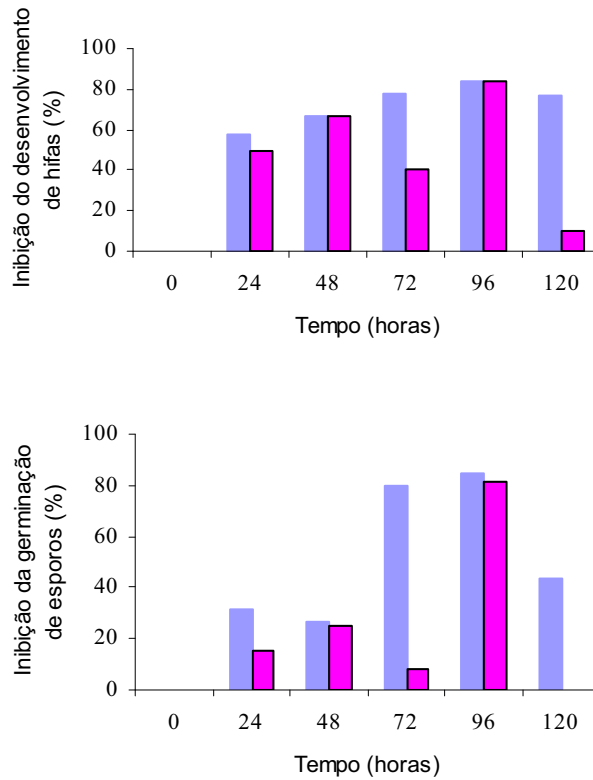
Tabela 5. Antifungograma em meio líquido com sobrenadante do cultivo obtido de levedura e da interação levedura/*F. verticillioides*.

Incubação (horas)	Comprimento de hifas (µm)				Germinação de esporos (%)			
	Sobrenadante levedura		Sobrenadante Levedura/ <i>F. verticillioides</i>		Sobrenadante levedura		Sobrenadante Levedura/ <i>F. verticillioides</i>	
	Controle		Controle		Controle		Controle	
	<i>Dekkera bruxellensis</i> PF58 ₃							
24	172,06 ± 51,95 ^{aB}	73,01 ± 37,95 ^{bA}	86,37 ± 35,43 ^{bA}	92,00 ^{bC}	63,00 ^{cA}	78,00 ^{cB}		
48	213,20 ± 60,36 ^{bB}	71,63 ± 25,69 ^{bA}	71,98 ± 31,78 ^{bA}	87,00 ^{abB}	64,00 ^{cA}	65,00 ^{bA}		
72	220,73 ± 58,40 ^{bC}	48,67 ± 18,88 ^{aA}	131,96 ± 38,36 ^{cB}	84,00 ^{aB}	17,00 ^{aA}	77,00 ^{cA}		
96	212,16 ± 56,91 ^{bB}	34,96 ± 9,79 ^{aA}	34,96 ± 12,00 ^{aA}	87,00 ^{abB}	13,00 ^{aA}	16,00 ^{aA}		
120	198,45 ± 54,13 ^{abB}	45,24 ± 13,95 ^{aA}	178,57 ± 60,79 ^{dB}	82,00 ^{aB}	46,00 ^{bA}	85,00 ^{dB}		
	<i>Pichia anomala</i> 142							
24	232,38 ± 58,66 ^{aB}	120,65 ± 44,26 ^{bA}	144,98 ± 35,66 ^{aA}	88,00 ^{bB}	80,00 ^{bA}	88,00 ^{cB}		
48	216,28 ± 57,20 ^{aC}	79,86 ± 31,80 ^{aA}	149,10 ± 54,86 ^{aB}	92,00 ^{bB}	83,00 ^{bA}	81,00 ^{bA}		
72	229,99 ± 51,72 ^{aC}	77,80 ± 36,69 ^{aA}	190,91 ± 55,22 ^{bB}	81,00 ^{aB}	74,00 ^{aA}	72,00 ^{aA}		
96	227,93 ± 56,20 ^{aB}	160,75 ± 44,88 ^{cA}	208,39 ± 54,24 ^{bB}	85,00 ^{abC}	70,00 ^{aA}	79,00 ^{bB}		
120	246,78 ± 46,88 ^{aC}	161,44 ± 38,84 ^{cA}	198,45 ± 50,16 ^{bB}	83,00 ^{abA}	80,00 ^{bA}	80,00 ^{bA}		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PF3 ₄							
24	205,65 ± 38,90 ^{aB}	164,18 ± 37,58 ^{bC}	186,78 ± 43,76 ^{bB}	67,00 ^{aB}	66,00 ^{cB}	58,00 ^{bA}		
48	213,19 ± 50,73 ^{aB}	83,97 ± 31,38 ^{aA}	105,91 ± 43,13 ^{aA}	85,00 ^{bB}	50,00 ^{aA}	49,00 ^{aA}		
72	202,91 ± 53,34 ^{aB}	149,10 ± 40,02 ^{bA}	191,26 ± 45,31 ^{bB}	84,00 ^{bC}	66,00 ^{cB}	58,00 ^{bA}		
96	214,90 ± 54,70 ^{aB}	176,52 ± 57,77 ^{cA}	210,11 ± 43,95 ^{bB}	71,00 ^{aC}	50,00 ^{aA}	65,00 ^{cB}		
120	205,31 ± 48,45 ^{aB}	151,84 ± 30,16 ^{bC}	209,08 ± 44,96 ^{bB}	84,00 ^{bC}	59,00 ^{bA}	66,00 ^{cB}		

Ensaio realizado em Caldo MPL incubado a 25°C/12 horas; cada valor corresponde à média dos valores de 40 dados para crescimento de hifas e 2 dados para germinação de esporos. Letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste

de Tukey ($P < 0,05$).

Dekkera bruxellensis PF 58₃

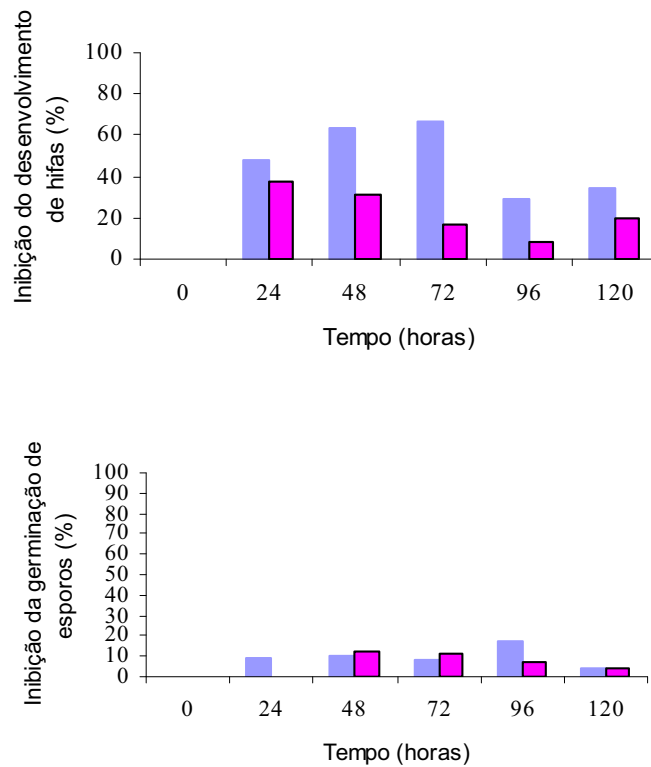


_____ Sobrenadante do cultivo de *D. bruxellensis* PF 58₃

_____ Sobrenadante do cultivo da interação *D. bruxellensis* PF 58₃ / *F. verticillioides*

Figura 2. Efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *D. bruxellensis* PF 58₃ e da interação *D. bruxellensis* PF 58₃ / *F. verticillioides* no crescimento de hifas e germinação de esporos de *F. verticillioides* (10^5 esporos), após 12 horas de incubação a 25°C.

Pichia anomala 142

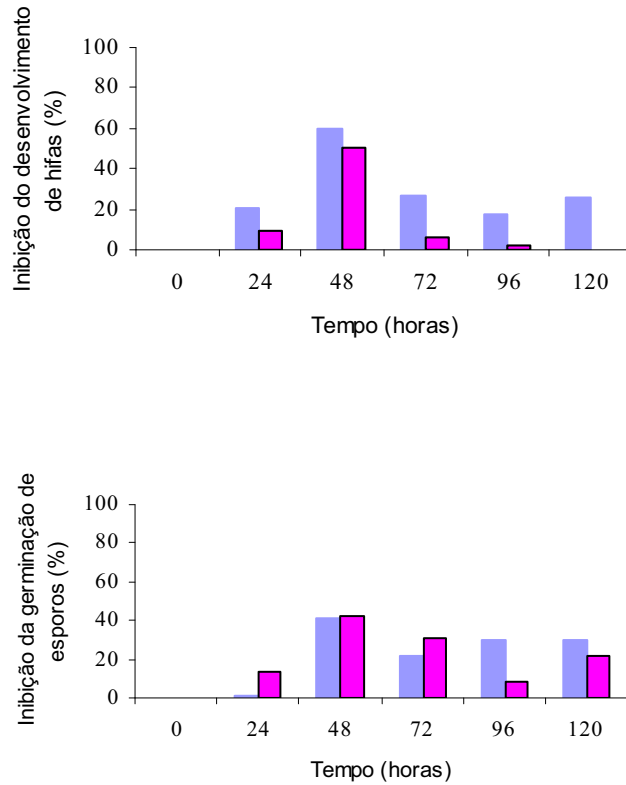


_____ Sobrenadante do cultivo de *P. anomala* 142

_____ Sobrenadante do cultivo da interação *P. anomala* 142 / *F. verticillioides*

Figura 5. Efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *P. anomala* 142 e da interação *P. anomala* 142 / *F. verticillioides* no crescimento de hifas e germinação de esporos de *F. verticillioides* (10^5 esporos), após 12 horas de incubação a 25°C.

Saccharomyces cerevisiae PF 3₄



_____ Sobrenadante do cultivo de *S. cerevisiae* PF 3₄

_____ Sobrenadante do cultivo da interação *S. cerevisiae* PF 3₄ / *F. verticillioides*

Figura 8. Efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *S. cerevisiae* PF 3₄ e da interação *S. cerevisiae* PF 3₄ / *F. verticillioides* no crescimento de hifas e germinação de esporos de *F. verticillioides* (10^5 esporos), após 12 horas de incubação a 25°C.

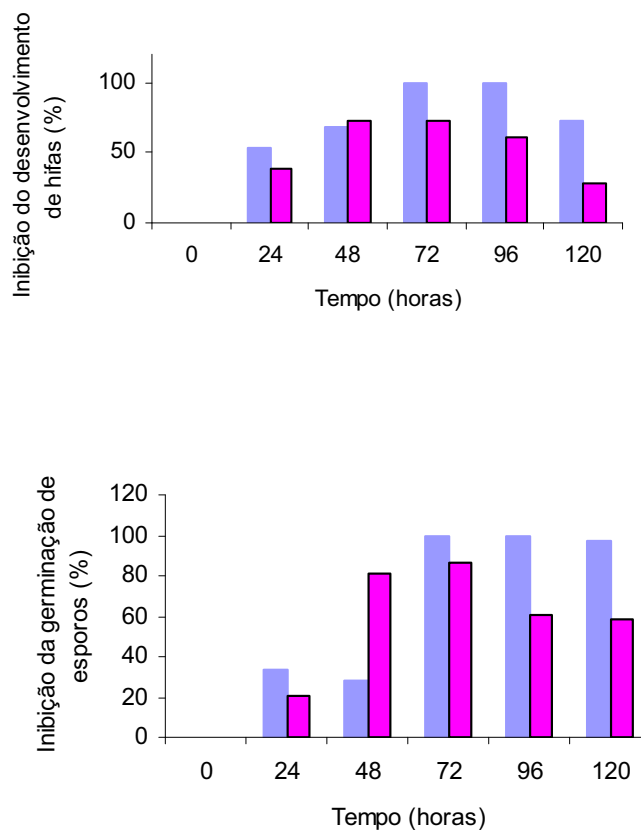
A **Tabela 6** e **Figuras 3, 6 e 9** apresentam os resultados para *Penicillium expansum*. Os sobrenadantes obtidos dos cultivos de 48 horas de *P. anomala* 142 (82,9%) e 72 horas de *S. cerevisiae* PF3₄ (72,7%); e do de 72 horas de *D. bruxellensis* PF58₃ (100,0%) inibiram *P. expansum* com maior intensidade em relação ao crescimento de hifas. Em trabalho realizado por Fan e Tian (2001) ação similar a da *D. bruxellensis* PF58₃ foi constatada para a ação de *Cryptococcus albidus* sobre o fungo filamentososo em questão. No entanto, inibição inferior (66,17%) foi verificada pela atuação de *Pichia ohmeri* sobre *P. expansum* (COELHO, 2005). Existiu diferença significativa entre o sobrenadante do cultivo de levedura e da interação levedura/fungo para *D. bruxellensis* PF58₃ e *P. anomala* 142 ($P < 0,05$).

Tabela 6. Antifungograma em meio líquido com sobrenadante do cultivo obtido de levedura e da interação levedura/*P. expansum*.

Incubação (horas)	Comprimento de hifas (μm)				Germinação de esporos (%)			
	Sobrenadante levedura		Sobrenadante Levedura/ <i>P. expansum</i>		Sobrenadante levedura		Sobrenadante Levedura/ <i>P. expansum</i>	
	Controle				Controle			
			<i>Dekkera bruxellensis</i> PF58 ₃					
24	123,39 \pm 41,89 ^{aC}	56,90 \pm 26,26 ^{bA}	75,41 \pm 30,10 ^{bB}	91,00 ^{dC}	61,00 ^{bA}	72,00 ^{dB}		
48	164,18 \pm 58,46 ^{bB}	53,13 \pm 21,77 ^{bA}	43,87 \pm 14,63 ^{aA}	81,00 ^{cC}	58,00 ^{bB}	15,00 ^{aA}		
72	102,48 \pm 30,26 ^{aC}	0,00 ^{aA}	27,42 \pm 0,00 ^{aB}	74,00 ^{bC}	0,00 ^{aA}	10,00 ^{aB}		
96	101,45 \pm 33,98 ^{aC}	0,00 ^{aA}	39,42 \pm 17,34 ^{aB}	68,00 ^{aC}	0,00 ^{aA}	27,00 ^{bB}		
120	99,40 \pm 34,82 ^{aB}	27,42 \pm 0,00 ^{abA}	71,98 \pm 26,11 ^{bB}	80,00 ^{cC}	2,00 ^{aA}	33,00 ^{cB}		
			<i>Pichia anomala</i> 142					
24	197,08 \pm 55,69 ^{abC}	88,09 \pm 27,40 ^{cA}	113,11 \pm 46,65 ^{cB}	93,00 ^{bcC}	64,00 ^{cA}	84,00 ^{dB}		
48	192,28 \pm 46,31 ^{abC}	32,90 \pm 8,10 ^{aA}	50,38 \pm 21,37 ^{aB}	85,00 ^{aC}	25,00 ^{bA}	71,00 ^{cB}		
72	173,77 \pm 36,69 ^{aB}	39,76 \pm 18,83 ^{aA}	53,13 \pm 27,63 ^{aA}	96,00 ^{cC}	16,00 ^{aA}	44,00 ^{aB}		
96	197,42 \pm 43,33 ^{abC}	45,24 \pm 18,42 ^{abA}	76,43 \pm 41,06 ^{bB}	90,00 ^{abC}	17,00 ^{aA}	58,00 ^{bB}		
120	203,59 \pm 37,46 ^{bB}	57,24 \pm 28,09 ^{bA}	62,72 \pm 35,25 ^{abA}	87,00 ^{aC}	21,00 ^{abA}	61,00 ^{bB}		
			<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PF3 ₄					
24	114,82 \pm 33,54 ^{bB}	50,04 \pm 19,03 ^{bA}	47,99 \pm 22,17 ^{bA}	69,00 ^{bC}	34,00 ^{cA}	40,00 ^{cB}		
48	99,40 \pm 27,90 ^{bB}	33,25 \pm 9,76 ^{aA}	30,85 \pm 7,45 ^{aA}	75,00 ^{cC}	10,00 ^{bA}	16,00 ^{aB}		
72	105,22 \pm 25,10 ^{bB}	28,75 \pm 4,12 ^{aA}	36,33 \pm 13,37 ^{aA}	72,00 ^{bcC}	3,00 ^{aA}	31,00 ^{bB}		
96	108,65 \pm 23,31 ^{bC}	34,51 \pm 11,94 ^{aA}	48,67 \pm 19,38 ^{bB}	76,00 ^{cC}	10,00 ^{bA}	46,00 ^{dB}		
120	67,18 \pm 16,95 ^{aB}	27,42 \pm 0,00 ^{aA}	51,76 \pm 17,42 ^{bA}	58,00 ^{aB}	37,00 ^{cA}	59,00 ^{eB}		

Ensaio realizado em Caldo MPL incubado a 25°C/12 horas; cada valor corresponde à média dos valores de 40 dados para crescimento de hifas e 2 dados para germinação de esporos. Letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

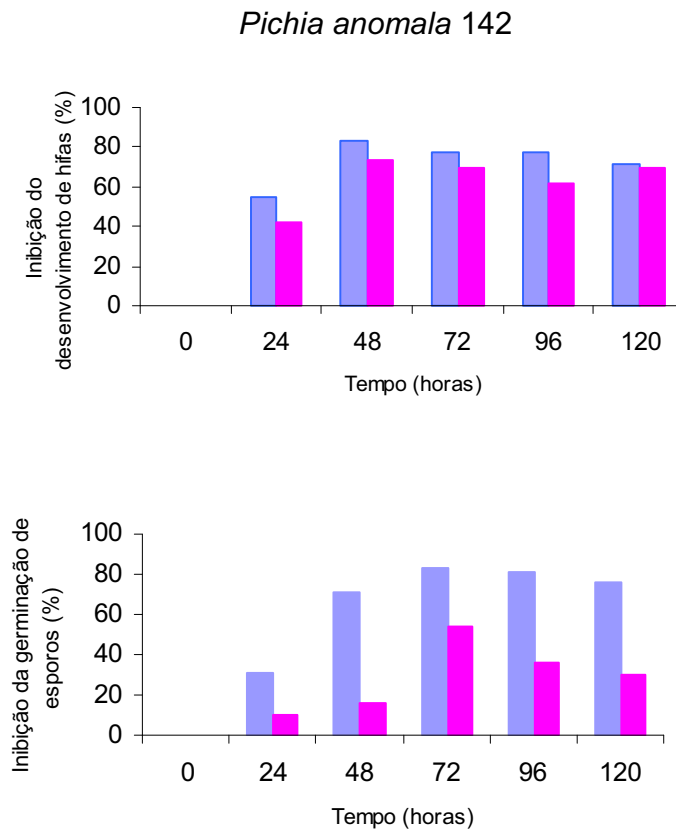
Dekkera bruxellensis PF 58₃



_____ Sobrenadante do cultivo de *D. bruxellensis* PF 58₃

_____ Sobrenadante do cultivo da interação *D. bruxellensis* PF 58₃ / *P. expansum*

Figura 3. Efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *D. bruxellensis* PF 58₃ e da interação *D. bruxellensis* PF 58₃ / *P. expansum* no crescimento de hifas e germinação de esporos de *P. expansum* (10^5 esporos), após 12 horas de incubação a 25°C.

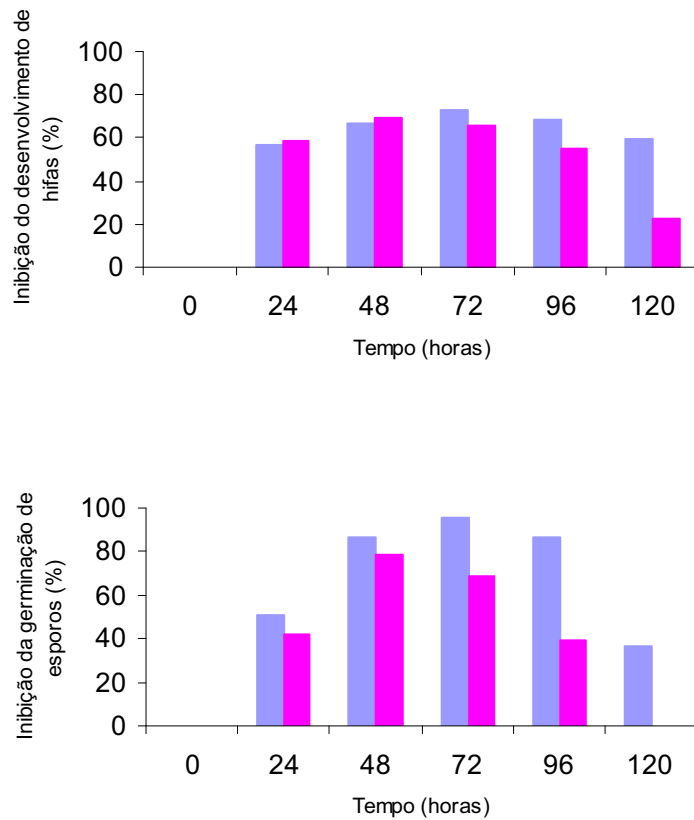


_____ Sobrenadante do cultivo de *P. anomala* 142

_____ Sobrenadante do cultivo da interação *P. anomala* 142 / *P. expansum*

Figura 6. Efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *P. anomala* 142 e da interação *P. anomala* 142 / *P. expansum* no crescimento de hifas e germinação de esporos de *P. expansum* (10^5 esporos), após 12 horas de incubação a 25°C.

Saccharomyces cerevisiae PF 3₄



_____ Sobrenadante do cultivo de *S. cerevisiae* PF 3₄

_____ Sobrenadante do cultivo da interação *S. cerevisiae* PF 3₄ / *P. expansum*

Figura 9. Efeito inibitório do sobrenadante do cultivo de *S. cerevisiae* PF 3₄ e da interação *S. cerevisiae* PF 3₄ / *P. expansum* no crescimento de hifas e germinação de esporos de *P. expansum* (10^5 esporos), após 12 horas de incubação a 25°C.

Para a germinação de esporos as 3 leveduras exerceram efeitos semelhantes com o cultivo da levedura de 72 horas, os quais foram de 100,0% para *D. bruxellensis* PF58₃, 83,3 % para *P. anomala* 142 e 95,8% para *S. cerevisiae* PF3₄. Efeito semelhante ao da *D. bruxellensis* PF58₃ foi obtido à partir da atuação da *Metschnikowia pulcherrima* sobre *Botrytis cinerea*, *P. expansum*, *Alternaria* spp. e *Monilia* spp. (SPADARO et al., 2002); e da *Cryptococcus albidus* sobre *P. expansum* (FAN; TIAN, 2001). Resultado inferior (58,15%) foi obtido pela atuação de *Candida guilliermondii* sobre o referido bolor em pesquisa realizada por Coelho (2005). Pesquisa realizada por Yao, Tian e Wang (2004) evidenciou a inibição completa da germinação de esporos e do crescimento de hifas de *P. expansum* por *Cryptococcus laurentii* combinada com 2% de bicarbonato de sódio. Existiu diferença significativa entre o sobrenadante do cultivo de levedura e da interação levedura/fungo de *D. bruxellensis* PF58₃, *Pichia anomala* 142 e *Saccharomyces cerevisiae* PF3₄ ($P < 0,05$).

A **Tabela 7** apresenta os resultados para o antifungigrama em meio líquido com sobrenadante do cultivo de levedura; *S. cerevisiae* e *P. anomala* (48 horas) e *D. bruxellensis* (72 horas), obtido após tratamento térmico (42°C/48 horas).

Tabela 7. Antifungograma em meio líquido com sobrenadante do cultivo obtido de levedura após tratamento térmico a 42°C/48horas.

Bolores	Comprimento de hifas (μm)				Germinação de esporos (%)			
	Sobrenadante		Sobrenadante		Sobrenadante		Sobrenadante	
	Controle	levedura sem cura	levedura curada	levedura curada	Controle	levedura sem cura	levedura curada	levedura curada
	<i>Dekkera bruxellensis</i> PF58 ₃							
<i>A. ochraceus</i>	161,09 \pm 36,83 ^B	0,00 ^A	164,86 \pm 21,84 ^B	75,00 ^C	0,00 ^A	69,00 ^B		
<i>F. verticillioides</i>	205,65 \pm 26,71 ^B	37,36 \pm 11,61 ^A	196,74 \pm 40,19 ^B	79,00 ^C	24,00 ^A	65,00 ^B		
<i>P. expansum</i>	244,04 \pm 44,04 ^B	0,00 ^A	228,96 \pm 50,08 ^B	85,00 ^C	0,00 ^A	80,00 ^B		
	<i>Pichia anomala</i> 142							
<i>A. ochraceus</i>	161,09 \pm 36,83 ^B	54,50 \pm 20,94 ^A	52,78 \pm 19,77 ^A	75,00 ^B	27,00 ^A	26,00 ^A		
<i>F. verticillioides</i>	205,65 \pm 26,71 ^B	97,68 \pm 31,84 ^A	90,49 \pm 29,26 ^A	79,00 ^B	63,00 ^A	59,00 ^A		
<i>P. expansum</i>	244,04 \pm 44,04 ^B	59,64 \pm 19,03 ^A	61,01 \pm 18,09 ^A	85,00 ^C	37,00 ^A	55,00 ^B		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PF3 ₄							
<i>A. ochraceus</i>	116,19 \pm 44,23 ^B	36,67 \pm 10,93 ^A	113,79 \pm 35,15 ^B	64,00 ^B	12,00 ^A	60,00 ^B		
<i>F. verticillioides</i>	201,88 \pm 28,45 ^B	68,89 \pm 20,94 ^A	188,85 \pm 32,49 ^B	75,00 ^B	41,00 ^A	72,00 ^B		
<i>P. expansum</i>	236,84 \pm 13,88 ^B	54,50 \pm 24,54 ^A	223,47 \pm 34,18 ^B	89,00 ^C	17,00 ^A	81,00 ^B		

Ensaio realizado em Caldo MPL incubado a 25°C/12 horas; cada valor corresponde à média dos valores de 40 dados para crescimento de hifas e 2 dados para germinação de esporos. Letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Após a cura, a *D. bruxellensis* PF58₃ manteve o caráter “killer”, porém perdeu a atividade antifúngica, indicando que o efeito é possivelmente devido à produção de uma enzima extracelular e não está associado ao caráter “killer”. Castoria et al. (2001) exibiram a hidrólise da parede celular de *P. expansum* e *B. cinerea* por β -1-3 glucanase como um dos efeitos de inibição por *A. pullulans*.

A levedura *S. cerevisiae* PF3₄ perdeu a ação antifúngica após a cura, o que está de acordo com a literatura (SCHMITT; BREINING, 2002), pois grande parte das toxinas “killer” produzidas por esta espécie são codificadas por plasmídeos que foram perdidos no tratamento térmico.

Pichia anomala 142 manteve o caráter “killer” e a ação antifúngica, o que indica que a produção de toxina é provavelmente cromossomal e pode estar associado ao fator “killer”.

Os resultados dos experimentos realizados com a levedura PF58₃ não curada (*Dekkera bruxellensis*) aplicada individualmente ou em combinação com uma pequena dosagem de Tecto[®]SC contra *A. ochraceus* e *P. expansum* estão demonstrados nas **Tabelas 8 e 9; e Figura 10.**

Tabela 8. Porcentagem de eficácia de controle dos tratamentos sobre o desenvolvimento de *A. ochraceus* e *P. expansum*, após incubação a 21°C por 21 dias.

Tratamentos	<i>A. ochraceus</i>	<i>P.expansum</i>
A	0,0	0,0
B	0,0	0,0
C	100,0	100,0
D	12,5	25,0
E	87,5	100,0

A = Controle; B = 30 μ L da suspensão de células antagonistas; C = 30 μ L da suspensão de células antagonistas no fungicida em baixa dosagem; D = 30 μ L do fungicida em baixa dosagem; E = 30 μ L do fungicida em dosagem recomendada pelo fabricante.

Tabela 9. Porcentagem de lesões infectadas nos tratamentos sobre o desenvolvimento de *A. ochraceus* e *P. expansum*, após incubação a 21°C por 21 dias.

Tratamentos	<i>A. ochraceus</i>	<i>P.expansum</i>
A	100,0	100,0
B	100,0	100
C	0,0	0,0
D	87,5	75,0
E	12,5	0,0

A = Controle; B = 30µL da suspensão de células antagonistas; C = 30µL da suspensão de células antagonistas no fungicida em baixa dosagem; D = 30µL do fungicida em baixa dosagem; E = 30µL do fungicida em dosagem recomendada pelo fabricante.

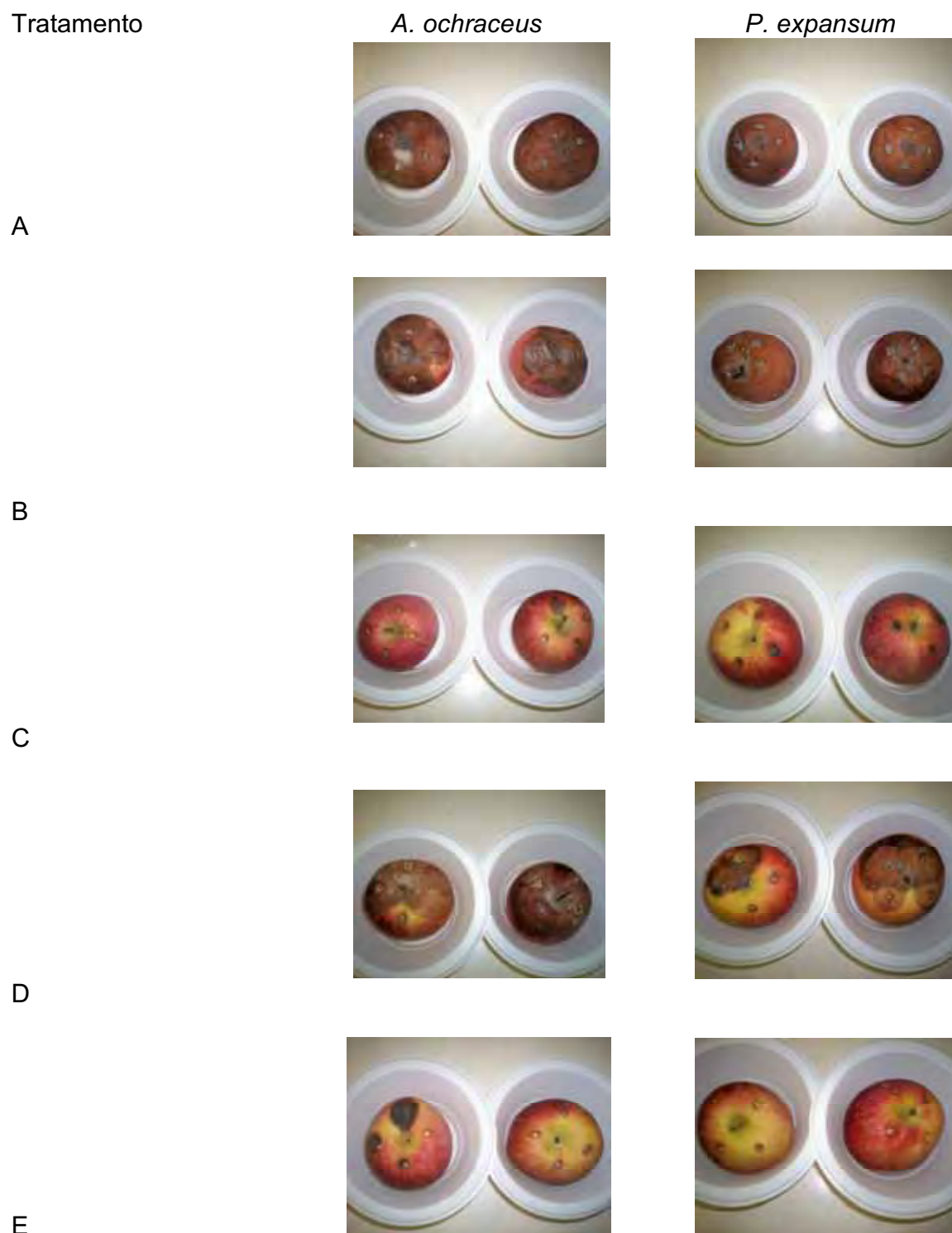


Figura 10. Maçãs submetidas a diferentes tratamentos (biológico, químico ou controle integrado) após 21 dias de armazenagem a 21°C.

Após 7 dias de armazenagem, 75 e 100% das lesões das maçãs controle mostraram podridão ocasionada por *A. ochraceus* e *P. expansum*, respectivamente. O fungicida Tecto®SC em baixa dosagem foi eficiente contra ambos os bolores (12,5 e 50% das lesões infectadas), assim como o mesmo aplicado em dosagem recomendada pelo fabricante (0% de lesões infectadas). As lesões que receberam apenas a levedura apresentaram 100% de podridão, enquanto que a mesma em combinação com uma baixa dosagem do fungicida exibiu 100% de controle.

Depois de 14 dias de estocagem, as maçãs controle e aquelas que receberam apenas a antagonista mostraram eficácia de controle nula com relação aos dois fungos filamentosos. O tratamento que empregou a levedura e o fungicida em baixa dosagem manteve 100% de eficácia de controle, resultado este superior ao observado por Castoria et al. (2001) (88,5%) para a ação de *Aureobasidium pullulans* sobre *P. expansum* e por Lima et al. (2006) (92%) para a atividade de *Cryptococcus laurentii* sobre *Botrytis cinerea*. No entanto, a baixa dosagem utilizada individualmente promoveu 12,5 e 25% de controle. A dosagem recomendada pelo fabricante exibiu eficácia de controle de, respectivamente, 87,5 e 100%; resultado este que se manteve ao final do período de armazenagem (21 dias).

Finalizados 21 dias de estocagem a melhor eficácia de controle foi evidenciada pelos tratamentos C e E para *A. ochraceus* e *P. expansum*. Os valores obtidos foram de, respectivamente, 100 e 100%; 87,5 e 100%. Resultados inferiores (67 e 70%) foram obtidos por Ippolito et al. (2000) com relação à atividade de biocontrole exercida por *Aureobasidium pullulans* sobre *P. expansum*.

Como pode ser observado, o tratamento combinado (C) apresentou eficácia de controle de 100% para ambos os bolores. Inibição inferior (94%) foi constatada por Calvente, Benuzzi e Tosetti (1999) ao aplicar *Rhodotorula glutinis* e sideróforos sobre *P. expansum*; e por Usall et al. (2000) (70%) ao testar *Candida sake* sobre o mesmo bolor.

As **Tabelas 10 e 11**; e **Figura 11** exibem os resultados obtidos por meio do emprego da levedura PF3₄ (*Saccharomyces cerevisiae*), individualmente ou em associação com baixa dosagem de Tecto®SC, sobre *A. ochraceus* e *P. expansum*.

Tabela 10. Porcentagem de eficácia de controle dos tratamentos sobre o desenvolvimento de *A. ochraceus* e *P. expansum*, após incubação a 21°C por 21 dias.

Tratamentos	<i>A. ochraceus</i>	<i>P.expansum</i>
A	0,0	0,0
B	33,3	0,0
C	66,6	0,0
D	66,6	37,5
E	33,3	100,0

A = Controle; B = 30µL da suspensão de células antagonistas; C = 30µL da suspensão de células antagonistas no fungicida em baixa dosagem; D = 30µL do fungicida em baixa dosagem; E = 30µL do fungicida em dosagem recomendada pelo fabricante.

Tabela 11. Porcentagem de lesões infectadas nos tratamentos sobre o desenvolvimento de *A. ochraceus* e *P. expansum*, após incubação a 21°C por 21 dias.

Tratamentos	<i>A. ochraceus</i>	<i>P.expansum</i>
A	37,5	100,0
B	25,0	100,0
C	12,5	100,0
D	12,5	62,5
E	25,0	0,0

A = Controle; B = 30µL da suspensão de células antagonistas; C = 30µL da suspensão de células antagonistas no fungicida em baixa dosagem; D = 30µL do fungicida em baixa dosagem; E = 30µL do fungicida em dosagem recomendada pelo fabricante.

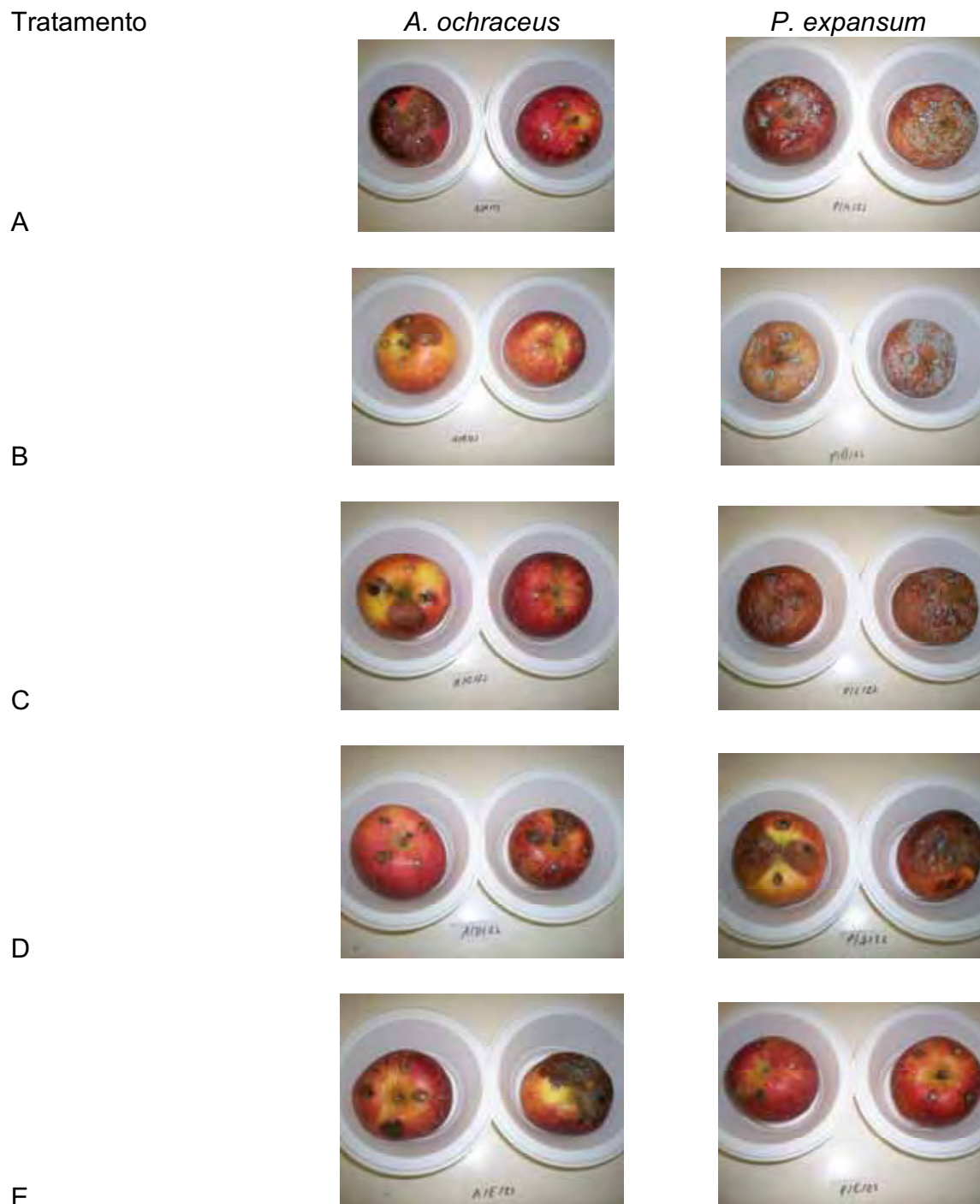


Figura 11. Mações submetidas a diferentes tratamentos (biológico, químico ou controle integrado) após 21 dias de armazenagem a 21°C.

Depois de uma semana de armazenagem nenhuma maçã exibiu podridão por *A. ochraceus*. Com relação a *P. expansum* as maçãs pertencentes aos tratamentos A, B, C, D e E exibiram respectivamente, 62,5; 62,5; 62,5; 37,5 e 0% de podridão.

Após duas semanas observou-se nos tratamentos A, B, C, D e E, respectivamente, 25,0; 12,5; 0; 0 e 12,5% de podridão para as maçãs que foram inoculadas com *A. ochraceus*. No entanto, para *P. expansum* os valores obtidos foram 100,0; 100,0; 100,0; 62,5 e 0%, sendo este o resultado obtido após os 21 dias de armazenagem.

Ao final de três semanas, a melhor eficácia de controle de *P. expansum* foi exibida pelo fungicida aplicado em dosagem recomendada pelo fabricante (EC=100%); sendo o mesmo constatado por Spadaro et al. 2002 com relação à ação de *Metschnikowia pulcherrima* sobre *P. expansum*. A eficácia de controle para o tratamento com a levedura foi de 0%, sendo este inferior àquele (33,3%) constatado por Zhang, Zheng e Yu (2007) para a ação de *Cryptococcus laurentii* sobre *P. expansum* em pêssegos. Resultado inverso foi observado por Blum et al. (2004), os quais verificaram que *C. laurentii* foi tão eficiente quanto o tratamento com thiabendazol. No que se refere a *A. ochraceus* para os tratamentos A, B, C, D e E, a eficácia de controle obtida foi, respectivamente, 33,3; 66,6; 66,6 e 33,3%.

Os resultados obtidos a partir do emprego da levedura *Pichia anomala* 142, utilizada individualmente ou em combinação com pequena dosagem de Tecto[®]SC, sobre *A. ochraceus* e *P. expansum* estão exibidos nas **Tabelas 12 e 13 e Figura 12**.

Tabela 12. Porcentagem de eficácia de controle dos tratamentos sobre o desenvolvimento de *A. ochraceus* e *P. expansum*, após incubação a 21°C por 21 dias.

Tratamentos	<i>A. ochraceus</i>	<i>P.expansum</i>
A	0,0	0,0
B	100,0	0,0
C	20,0	0,0
D	20,0	0,0
E	100,0	87,5

A = Controle; B = 30µL da suspensão de células antagonistas; C = 30µL da suspensão de células antagonistas no fungicida em baixa dosagem; D = 30µL do fungicida em baixa dosagem; E = 30µL do fungicida em dosagem recomendada pelo fabricante.

Tabela 13. Porcentagem de lesões infectadas nos tratamentos sobre o desenvolvimento de *A. ochraceus* e *P. expansum*, após incubação a 21°C por 21 dias.

Tratamentos	<i>A. ochraceus</i>	<i>P.expansum</i>
A	62,5	100,0
B	0,0	100,0
C	50,0	100,0
D	50,0	100,0
E	0,0	12,5

A = Controle; B = 30µL da suspensão de células antagonistas; C = 30µL da suspensão de células antagonistas no fungicida em baixa dosagem; D = 30µL do fungicida em baixa dosagem; E = 30µL do fungicida em dosagem recomendada pelo fabricante.

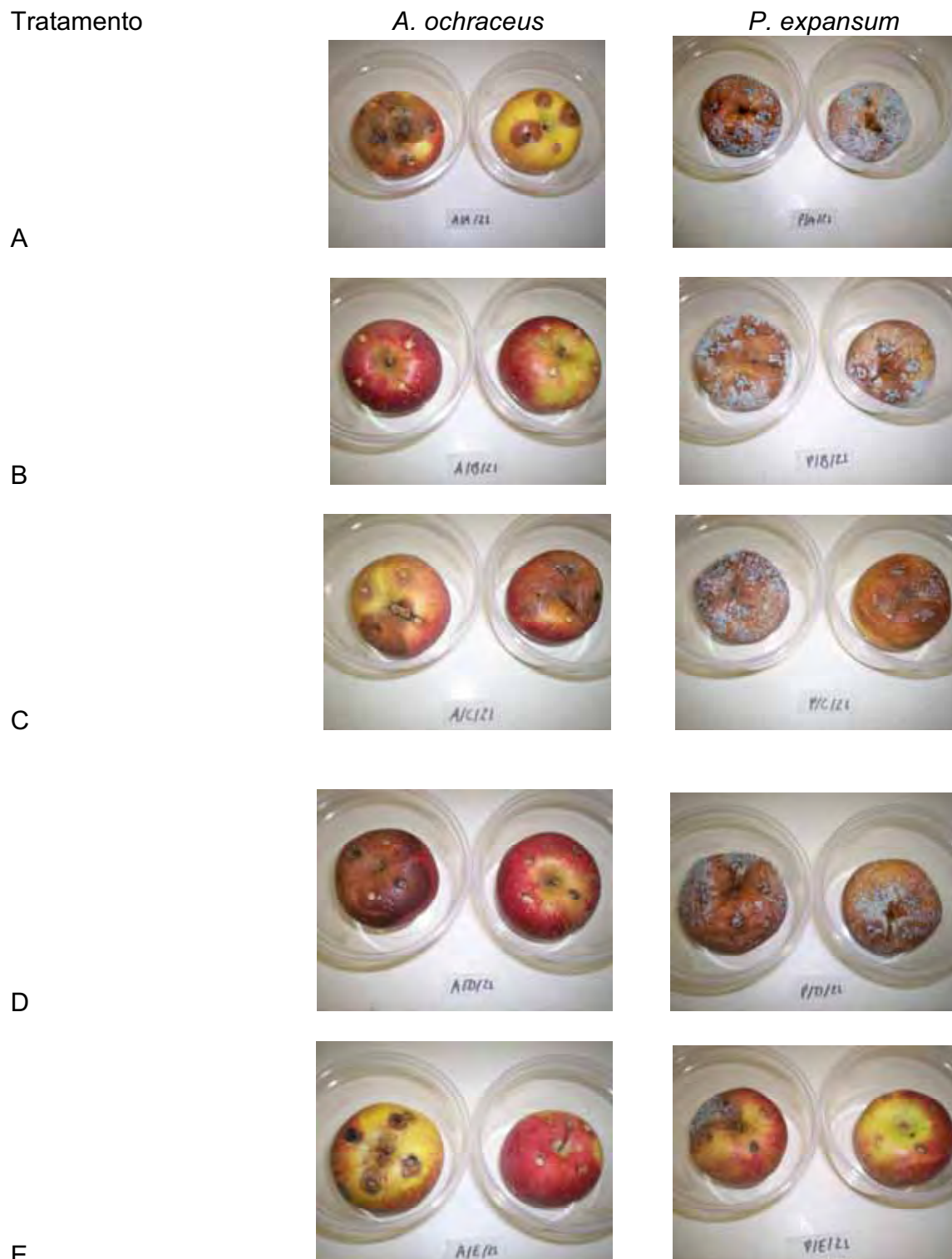


Figura 12. Maçãs submetidas a diferentes tratamentos (biológico, químico ou controle integrado) após 21 dias de armazenagem a 21°C.

Após 7 dias de armazenagem, 0 e 100% das lesões das maçãs controle exibiram deterioração ocasionada por *A. cohraceus* e *P. expansum*, respectivamente. Para os demais tratamentos (B, C, D e E) a porcentagem de lesões infectadas por *A. ochraceus* foi nula. Porém, para *P. expansum* foi de, respectivamente, 100,0; 87,5; 100,0 e 12,5%.

Completados 14 dias de estocagem verificou-se que no referente à *A. cohraceus*, para os tratamentos A, B, C, D e E a podridão atingiu, respectivamente, 37,5; 0; 12,5; 50,0 e 50,0% das lesões. Para *P. expansum* obteve-se 100%, exceto para o tratamento E (12,5%).

Depois de 21 dias foi constatado para *A. ochraceus*, com relação aos tratamentos B, C, D e E, eficácia de controle de respectivamente, 100, 20, 20 e 100%. No que se refere a *P. expansum* os valores foram 0, 0, 0 e 87,5%. Para o tratamento combinado C, resultado superior (100%) foi verificado por Yao, Tian e Wang (2004) para a ação de *C. laurentii* associada a 2% de bicarbonato de sódio sobre *P. expansum* em pêras; da mesma maneira Karabulut e Baykal (2004) obtiveram 50% de eficácia de controle para a ação de *Candida oleophila* associada à água quente (55°C/10 segundos) e atmosfera modificada a 0°C sobre *P. expansum* em pêssegos. A melhor eficácia de controle foi verificada a partir dos tratamentos B (levedura individualmente) e E (fungicida em dosagem recomendada pelo fabricante) para *A. cohraceus* (100%) e tratamento E para *P. expansum* (87,5%).

Diante dos excelentes resultados de eficácia de controle apresentados por *D. bruxellensis* PF58₃ (sobre ambos os bolores) e *P. anomala* 142 (sobre *A. ochraceus*), estudos mais avançados deveriam ser realizados visando o emprego do sobrenadante de levedura associado a filmes comestíveis (à base de polissacarídeos, por exemplo) para o revestimento de frutas.

6. CONCLUSÕES

O sobrenadante obtido do cultivo de *Dekkera bruxellensis* PF58₃ exerceu o melhor efeito inibitório sobre o crescimento de hifas e germinação de esporos de *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium expansum*.

A atividade antifúngica de *D. bruxellensis* PF58₃ é possivelmente devido à produção de uma enzima extracelular e não está associado ao caráter “killer”.

As prováveis toxinas “killer” produzidas por *Saccharomyces cerevisiae* PF3₄ são codificadas por plasmídeos (pequeno anel de DNA extra-cromossomal) que foram perdidos no tratamento térmico, uma vez que eles não apresentam cobertura protéica como o DNA cromossomal.

A produção de toxina por *Pichia anomala* 142 é provavelmente cromossomal e pode estar associado ao caráter “killer”.

Com relação à levedura *D. bruxellensis* PF58₃ a melhor eficácia de controle foi evidenciada pelos tratamentos C (30 µL da suspensão de células antagonistas no fungicida Tecto SC[®] à baixa dosagem - 10% da dosagem recomendada pelo fabricante) e E (fungicida em dosagem recomendada pelo fabricante) para *A. ochraceus* e *P. expansum*.

No que se refere ao agente biológico *S. cerevisiae* PF3₄, a melhor eficácia de controle de *P. expansum* foi exibida pelo fungicida aplicado em dosagem recomendada pelo fabricante (EC=100%).

Para a antagonista *Pichia anomala* 142 a melhor eficácia de controle foi verificada a partir dos tratamentos B (levedura individualmente) e E para *A. ochraceus* (100%) e tratamento E para *P. expansum* (87,5%).

A integração da levedura com baixa dosagem do fungicida é uma estratégia de controle muito interessante do ponto de vista econômico e técnico. O sistema proposto poderia também ser considerado na seleção de biocontroles mais eficientes para a aplicação integrada com fungicidas. Tal integração apresenta diversos efeitos positivos, dentre os quais: melhor controle da podridão e mais longa armazenagem da fruta, redução dos riscos de resistência do patógeno ao fungicida, redução do risco de acúmulo de resíduos tóxicos na fruta.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L. et al. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. **Journal of Food Protection**, New York, v. 64, n. 6, p. 903-906, 2001.
- AMIGOT, S. L. et al. New parameters to evaluate forage quality. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 41, n. 2, p. 215-224, 2006.
- ARRAS, G. et al. Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 73, n. 3, p. 413-418, 1998.
- AZIZ, N. H.; MOUSSA, L. A. A. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. **Food Control**, New York, v. 13, n. 4, p. 281-288, 2002.
- BATTA, Y. A. Quantitative postharvest contamination and transmission of *Penicillium expansum* (Link) conidia to nectarine and pear fruit by *Drosophila melanogaster* (Meig.) adults. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 40, n. 2, p. 190-196, 2006.
- BEUCHAT, L. R. (Ed.). **Food and Beverage Mycology**, 2nd. ed. New York: Van Nostrand Reinbold, 1987.
- BLUM, L. E. B. et al. *Cryptococcus laurentii* aplicado em pós-colheita reduz podridões em maçãs. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 433-436, 2004.
- BLUNDEN, G. et al. Micotoxins in food. **Medical Laboratory Sciences**, v. 48, n. 4, p. 271-282, 1991.
- BOYSEN, M. E.; BJÖRNEHOLM, S.; SCHNÜRER, J. Effect of the biocontrol yeast *Pichia anomala* on interactions between *Penicillium roqueforti*, *Penicillium carneum*, and *Penicillium paneum* in moist grain under restricted air supply. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 19, n. 2, p. 173-179, 2000.
- BRERA, C.; MIRAGLIA, M.; COLATOSTI, M. Evaluation of the impact of mycotoxins on human health: sources of errors. **Microchemical Journal**, New York, v. 59, n. 1, p. 45-49, 1998.
- BUCK, J. W. Combination of fungicides with phylloplane yeasts for improved control of *Botrytis cinerea* on geranium seedlings. **Phytopathology**, New York, v. 94, n. 1, p. 196-202, 2004.
- BÜNGER, J. et al. Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. **Toxicology**, New York, v. 202, n. 3, p. 199-211, 2004.
- CABRAL, A. S. et al. Incidência de leveduras “killer” em diferentes ambientes tropicais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23., 2005, Santos. **Anais.... Santos: Polo**, 2005.

CALVENTE, V.; BENUZZI, D.; TOSETTI, M. I. S. Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, New York, v. 43, n. 4, p. 167-172, 1999.

CALVO, J. et al. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 113, n. 3, p. 251-257, 2007.

CAO, J.; JIANG, W. Induction of resistance in Yali pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) fruit against postharvest diseases by acibenzolar-S-methyl sprays on trees during fruit growth. **Scientia Horticulturae**, New York, v. 110, n. 2, p. 181-186, 2006.

CASTORIA, R. et al. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its mode of action. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 22, n. 1, p. 7-17, 2001.

CAVAGLIERI, L. R.; PASSONE, A.; ETCHEVERRY, M. Screening procedures for selecting rhizobacteria with biocontrol effects upon *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B₁ production. **Research in Microbiology**, New York, v. 155, n. 9, p. 747-754, 2004.

CAVAGLIERI, L. et al. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at maize root level. **Research in Microbiology**, New York, v. 156, n. 5, p. 748-754, 2005.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; CREMONINI, L. C. M.; REGENFUSS, C. "Killer" character of yeasts isolated from ethanolic fermentations. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 3, p. 20-25, 1999.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA (CEPEA). **Janelas de mercado**: a fruticultura brasileira no Mercado internacional. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br>>. Acesso em: 02 jul. 2007.

CHAN, Z.; TIAN, S. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 36, n. 2, p. 215-223, 2005.

CHAND-GOYAL, T. SPOTTS, R. A. Control of postharvest pear diseases using natural saprophytic yeast colonists and their combination with a low dosage of thiabendazole. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 7, n. 1, p. 51-64, 1996.

CHEN, Z. et al. Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1320-1324, 1999.

COELHO, A. R. **Controle de *Penicillium expansum* / biodegradação de patulina: perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras *killer* visando aplicação pós-colheita**. 2005. 122 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

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.

CONWAY, W. S. et al. Control of blue mold of apple by combining controlled atmosphere, an antagonist mixture, and sodium bicarbonate. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 45, n. 3, p. 326-332, 2007.

CONWAY, W. S. et al. Improving biocontrol using antagonist mixture with heat and/or sodium bicarbonate to control postharvest decay of apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 36, n. 3, p. 235-244, 2005.

CONWAY, W. S. et al. Integrating heat treatment, biocontrol and sodium bicarbonate to reduce postharvest decay of apple caused by *Colletotrichum acutatum* and *Penicillium expansum*. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 34, n. 1, p. 11-20, 2004.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, New York, v. 127, n. 1, p. 19-28, 2002.

DE LA PEÑA, P. et al. Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 20, p. 1420-1425, 1981.

D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, New York, v. 69, n. 1, p. 155-166, 1997.

DROBY, S. et al. Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product *Aspire*. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 27, n. 2, p. 127-135, 2003.

EL-GHAOUTH, A. et al. Control of decay of apple and citrus fruits in semicommercial tests with *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. **Biological Control**. New York, v. 20, n.2, p. 96-101, 2001.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **A fruticultura no Brasil**. Disponível em: <<http://www.embrapa.org.br>>. Acesso em: 02 jul. 2007.

ERRAMPALLI, D. Effect of fludioxonil on germination and growth of *Penicillium expansum* and decay in apple cvs. Empire and Gala. **Crop Protection**, New York, v. 23, p. 811-817, 2004.

FALLIK, E. et al. Pre-storage heat treatment reduces pathogenicity of *Penicillium expansum* in apple fruit. **Plant Pathology**, v. 45, n. 1, p. 92-97, 1996.

FAN, Q.; TIAN, S. Postharvest biological control of grey mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 21, n. 3, p. 341-350, 2001.

FARIAS, M. V.; MAIA, R. S. M.; VITAL, M. J. S. Produção de toxinas “killer” por leveduras isoladas de solos de savana (Roraima - Brasil). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. 23, 2005, Santos. **Anais** Santos: Polo, 2005.

FAZIO, M. L. S. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em polpas congeladas de frutas**. 2006. 132 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 17 mar. 2005.

FRANCK, J. et al. The effect of preharvest fungicide and postharvest sulfur dioxide use on postharvest decay of table grapes caused by *Penicillium expansum*. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 37, n. 1, p. 20-30, 2005.

FRANCO, D. A. S.; BETTIOL, W. Efeito de produtos alternativos para o controle do bolor verde (*Penicillium digitatum*) em pós-colheita de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 569-572, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

GOLDBLATT, L. A. Mycotoxins-Past, present and future. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 54, p. 302a-310a, 1977.

GOLLÜCKE, A. P. B.; TANIWAKI, M. H.; TAVARES, D. Q. Survey on ochratoxin A in brazilian green coffee destined for exports. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 641-645, 2004.

GOLUBEV, W. I. Mycocins (killer toxins) In: Kurtzman, C. P.; Fell, J. W. (Ed.) **The yeasts, a taxonomic study**. Academic Press, 1998. p. 55-62.

GONÇALVES, A. B.; PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. Survey and significance of filamentous fungi from tap water. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 209, n. 3, p. 257-264, 2006.

GONZÁLEZ, G. et al. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 105, n. 1, p. 1-9, 2005.

HARISSON, M. A. Presence and stability of patulin in apple product: a review. **Journal of Food Safety**, v. 9, p. 147-153, 1989.

HASSEGAWA, R. H. et al. Influence of macro and micronutrient fertilization on fungal contamination and fumonisin production in corn grains. **Food Control**, New York, v. 19, n. 1, p. 36-43, 2007.

HEUSSNER, A. H.; DIETRICH, D. R.; O'BRIEN, E. In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and other selected mycotoxins on renal cells. **Toxicology In Vitro**, New York, v. 20, n. 3, p. 332-341, 2006.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Exportação brasileira de frutas frescas (janeiro de 2009)**. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br>>. Acesso em: 19 abr. 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Exportação brasileira de frutas frescas (fevereiro de 2007)**. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br>>. Acesso em: 15 ago. 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Novos horizontes para a fruticultura brasileira**. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br>>. Acesso em: 16 abr. 2005.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (ITAL). Manual Técnico n°. 14, p. 45, 1995.

IPPOLITO, A. et al. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 19, n. 3, p. 265-272, 2000.

ÍZGÜ, F.; ALTINBAY, D.; ACUN, T. Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its exo- β -1,3-glucanase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 4, p. 669-676, 2006.

ÍZGÜ, F.; ALTINBAY, D. Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an exo- β -1,3-glucanase. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, New York, v. 68, p. 685-693, 2004.

JANISIEWICZ, W. J. Biological control of pathogens affecting temperate fruit crops. In: V SINCBIOL, Foz do Iguaçu, 1996. **Anais...**, p. 43-48, 1996.

JANISIEWICZ, W. J.; JEFFERS, S. N. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. **Crop Protection**, New York, v. 16, n. 7, p. 629-633, 1997.

JANISIEWICZ, W. J.; PETERSON, D. L.; BORS, R. Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. **Plant Disease**, v. 78, n. 5, p. 466-470, 1994.

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**, New York, v. 90, n. 11, p. 1196-1200, 2000.

JELINEK, C. F.; PHOLAND, A. E.; WOOD, E. E. Worldwide occurrence of mycotoxins on foods and feeds-an update. **Journal of AOAC**, v. 72, n. 2, p.223-230, 1989.

KAAYA, A. N.; KYAMUHANGIRE, W. The effect of storage time and agroecological zone on mould incidence and aflatoxin contamination of maize from traders in Uganda. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 110, n. 3, p. 217-223, 2006.

KAGAN, B. L. Mode of action of yeast killer toxins: channel formation in lipid bilayers. **Nature**, New York, v. 302, p. 709-711, 1983.

KANDEL, J.; KOLTIN, Y. Killer phenomenon in *Ustilago maydis*: comparison of killer proteins. **Experimental Mycology**, v. 2, p. 270-278, 1978.

KARABULUT, O. A. et al. Integrated control of postharvest diseases of sweet cherry with yeast antagonists and sodium bicarbonate applications within a hydrocooler. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 37, n. 2, p. 135-141, 2005.

KARABULUT, O. A.; BAYKAL, N. Integrated control of postharvest diseases of peaches with a yeast antagonist, hot water and modified atmosphere packaging. **Crop Protection**, New York, v. 23, n. 5, p. 431-435, 2004.

KAZANTSEVA, D. I.; ZIMINA, M. S. Yeast killer strains with a broad spectrum of action: a search among collection strains and preliminary classification. **Mikrobiologiya**, v. 58, n. 2, p. 291-297, 1989.

KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. V.; MASSAGUER, P. R. The development of an analytical method for two mycotoxins, patulin and verruculogen, and survey of their presence in commercial tomato pulp. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 269-273, 2002.

LAPPALAINEN, S. et al. *Fusarium* toxins and fungi associated with handling of grain on eight finnish farms. **Atmospheric Environment**, New York, v. 30, n. 17, p. 3059-3065, 1996.

LEGGOTT, N. L.; SHEPHARD, G. S. Patulin in South African commercial apple products. **Food Control**, New York, v. 12, n. 2, p. 73-76, 2001.

LENNOX, C. L.; SPOTTS, R. A. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* from pear-related sources to benzimidazole and dicarboximide fungicides. **Plant Diseases**, New York, v. 87, p. 645-649, 2003.

LEVERENTZ, B. et al. Effect of combining MCP treatment, heat treatment, and biocontrol on the reduction of postharvest decay of `Golden Delicious` apples. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 27, n. 3, p. 221-233, 2003.

LEVY, R. M. **Aplicação de leveduras no controle de *Penicillium expansum***. 2003. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003

LIU, H. et al. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 35, n. 3, p. 263-269, 2005.

LIMA, G. et al. Integration of biocontrol yeast and thiabendazole protects stored apples from fungicide sensitive and resistant isolates of *Botrytis cinerea*. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 40, n. 1, p. 301-307, 2006.

MANEERAT, C.; HAYATA, Y. Antifungal activity of TiO₂ photocatalysis against *Penicillium expansum* in vitro and in fruit tests. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 107, n. 2, p. 99-103, 2006.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Resistência de fungos a fungicidas**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 26 jun. 2007.

MARI, M.; GUIZZARDI, M. The postharvest phase: Emerging technologies for the control of fungal diseases. **Phytoparasitica**, v. 26, n. 1, p. 59-66, 1998.

MARI, M.; BERTOLINI, P.; PRATELLA, G. C. Non conventional methods for the control of postharvest pear diseases. **Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 94, p. 761-766, 2003.

MARTINAC, B. et al. Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. **Cell Biology**, v. 87, p. 6228-6232, 1990.

MARTINS, M. C. et al. Quantificação de danos pós-colheita em pêssegos no Mercado atacadista de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 5-10, 2006.

MASOUD, W.; HØJ KALTOFT, C. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 106, n. 2, p. 229-234, 2006.

MEDINA, A. et al. Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 108, n. 2, p. 196-203, 2006.

MERCIER, J.; WILSON, C. Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. **Biological Control**, New York, v. 4, p. 138-144, 1994.

MILDDDELBEEK, E. J.; HERMANS, J. M. H.; STUMM, C. Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri*, killer toxin. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 45, n. 3, p. 437-450, 1979.

MORACE, G. et al. Strain differentiation of pathogenic yeasts by the killer system. **Mycopathology**, v. 84, p. 81-85, 1984.

MOREIRA, L. M. et al. Controle em pós-colheita de *Monilinia fructicola* em pêssegos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 395-398, 2002.

MORTENSEN, G. K.; STROBEL, B. W.; HANSEN, H. C. B. Degradation of zearalenone and ochratoxin A in three Danish agricultural soils. **Chemosphere**, New York, v. 62, n. 10, p. 1673-1680, 2006.

MOTOMURA, M.; HIROOKA, E. Y. Método rápido para o isolamento de microrganismos de solo com atividade antifúngica sobre *Fusarium moliniforme*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n. 2, p. 313-322, 1996.

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium species***: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.

NERI, F. et al. Control of *Penicillium expansum* in pears and apples by trans-2-hexenal vapours. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 41, n. 1, p. 101-108, 2006.

OLIVEIRA, I. S. et al. Patogenicidade de *Penicillium sclerotigenum* a diferentes frutas e hortaliças em pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 408-410, 2006.

PALPACELLI, V.; CIANI, M.; ROSINI, G. Activity of different killer yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. **Microbiology Letters**, v. 84, p. 75-78, 1991.

PARDO, E. et al. Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes. **Food Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 383-389, 2005.

PARK, J. W. et al. Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 103, n. 3, p. 305-314, 2005.

PEPELJNJAK, S.; ŠEGVIĆ, M.; OŽEGOVIĆ. Citrininotoxinogenicity of *Penicillium* spp. isolated from decaying apples. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 134-137, 2002.

- PETERING, J. E. et al. Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a market *Saccharomyces* wine yeast strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 3232-3236, 1991.
- PETZINGER, E.; WEIDENBACH, A. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. **Livestock Production Science**, New York, v. 76, n. 3, p. 245-250, 2002.
- PHILLISKIRK, G.; YOUNG, T. W. The occurrence of killer character in yeasts of various genera. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 41, n. 2, p. 147-151, 1975.
- PICCI, G. Micotossine. Aspectii microbiologici e tossicologici. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v. 42, n. 1, p. 35-47, 1992.
- POLONELLI, L. et al. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 774-780, 1983.
- QIN, G. Z. et al. Enhancement of biocontrol efficacy of antagonistic yeasts by salicylic acid in sweet cherry fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, New York, v. 62, n. 3, p. 147-154, 2003.
- RADLER, F.; PFEIFFER, P.; DENNART, M. Killer toxins in new isolates of the yeast *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kluyveri*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 19, p. 269-272, 1985.
- RADLER, F. et al. Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailli*. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 495-500, 1993.
- REYES, M. E. Q.; ROHRBACH, K. G.; PAULL, R. E. Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 33, n. 2, p. 193-203, 2004.
- RIQUELME, M. Fungal siderophores in plant-microbe interactions. **Microbiologia Sem**, v. 12, p.537-546, 1996.
- ROMERO, S. M. et al. Toxicogenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 104, n. 1, p. 43-49, 2005.
- ROSS, G. et al. Produção de patulina em maçã (*Malus domestica* Borkhausen), cultivares Gala e Fuji inoculadas com *Penicillium* spp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 63-67, 1998.
- SCHMITT, M. J.; BREINING, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiology Letters**, New York, v. 26, p. 257-276, 2002.
- SERRA, R.; BRAGA, A.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. **Research in Microbiology**, New York, v. 156, n. 4, p. 515-521, 2005.

SERRA, R.; MENDONÇA, C.; VENÂNCIO, A. Ochratoxin A occurrence and formation in portuguese wine grapes at various stages of maturation. **Internatonal Journal of Food Microbiology**, New York, v. 111, n. 1, p. S35-S39, 2006.

SERRA, R. et al. Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Mycological Research**, New York, v. 110, n. 8, p. 971-978, 2006.

SHOLBERG, P. L.; BEDFORD, K.; STOKES, S. Sensitivity of *Penicillium* spp. and *Botrytis cinerea* to pyrimethanil and its control of blue and gray mold of stored apples. **Crop Protection**, New York, v. 24, n. 2, p. 127-134, 2005.

SHUNDO, L. et al. Ochratoxin A in wines and grape juices commercialized in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 533-537, 2006.

SILVA, J. B. et al. Production of aflatoxins by *Aspergillus flavus* an of fumonisins by *Fusarium species* isolated from brazilian sorghum. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 182-186, 2004.

SILVEIRA, N. S. S. et al. Influência da temperatura, período de molhamento e concentração do inóculo de fungos na incidência de podridões pós-colheita em frutos de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 33-38, 2001.

SIMAS, M. M. S. et al. Determination of fungal microbiota and mycotoxins in brewers grain used in dairy cattle feeding in the State of Bahia, Brazil. **Food Control**, New York, v. 18, n. 5, p. 404-408, 2007.

SKIPPER, N.; BUSSEY, H. Mode of action of yeast toxins: energy requirement for *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin. **Journal of Bacteriology**, v. 129, n. 2, p. 668-677, 1977.

SOARES, G. A. M.; SATO, H. H. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L killer toxin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 291-297, 2000.

SOLIMAN, K. M.; BADEAA, R. I. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 11, p. 1669-1675, 2002.

SPADARO, D. et al. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 24, n. 2, p. 123-134, 2002.

STATISTICA for Windows. Inc. Tulska OK, USA, 1995.

SUGAR, D.; SPOTTS, R. A. Control of postharvest decay in pear by four laboratory-grown yeasts and two registered biocontrol products. **Plant Disease**, v. 83, n. 2, p. 155-158, 1999.

TAKASUKA, T. et al. Cell wall synthesis specific cytotoxic effect of Hansenula mrakii toxin-1 on *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Molecular Biology Research**, New York, v. 41, p. 575-581, 1995.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: ITAL, 2001. 82 p.

TANIWAKI, M. H. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 82, n. 2, p. 173-179, 2003.

TERAO, D. et al. Integração de fungicidas à refrigeração no controle de podridão pós-colheita em frutos de meloeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 89-93, 2006.

TOURNAS, V. H.; KATSODAS, E. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 105, n. 1, p. 11-17, 2005.

TRINDADE, R. C. et al. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, p. 294-300, 2002.

USALL, J. et al. Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 21, n. 2, p. 147-156, jun. 2001.

USALL, J. et al. Biological control of blue mould on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 58, n. 1, p. 83-92, 2000.

VITAL, M. J. S. et al. Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá Ecological Station, Roraima - Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p. 230-235, 2002.

WALKER, G.; MCLEOD, A.; HODGSON, V. Interactions between killer yeast and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 127, p. 213-222, 1995.

WICKNER, R. B. The killer double stranded RNA plasmids of yeast. **Plasmid**, New York, v. 2, p. 303-322, 1979.

WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. **Biological control of postharvest plant diseases of fruits and vegetables: theory and practice**. Boca Raton: CRC Press, 1994. 465 p.

WILSON, C. L. et al. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Plant Disease**, New York, v. 78, p. 837-844, 1994.

WOODS, D. R.; BEVAN, E. A. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 115-126, 1968.

YAO, H.; TIAN, S.; WANG, Y. Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 93, n. 3, p. 297-304, 2004.

YOUNG, T. W. The genetic manipulation of killer character into brewing yeast. **Journal of Institute Brewing**, v. 87, p. 292-295, 1981.

YU, T.; LI, H. Y.; ZHENG, X. D. Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 114, n. 3, p. 261-266, 2007.

YU, T. et al. Biocontrol of blue and gray mold diseases of pear fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 116, n. 3, p. 339-345, 2007.

YU, T. et al. Improved control of postharvest blue mold rot in pear fruit by a combination of *Cryptococcus laurentii* and gibberellic acid. **Biological Control**, New York, v. 39, n. 2, p. 128-134, 2006.

ZHANG, H.; ZHENG, X.; SU, D. Postharvest control of blue mold rot of pear by microwave treatment and *Cryptococcus laurentii*. **Journal of Food Engineering**, New York, v. 77, n. 3, p. 539-544, 2006.

ZHANG, H.; ZHENG, X.; YU, T. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. **Food Control**, New York, v. 18, n. 4, p. 287-291, 2007.

ZHANG, H. et al. Effect of yeast antagonist in combination with heat treatment on postharvest blue mold decay and *Rhizopus* decay of peaches. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v. 115, n. 1, p. 53-58, 2007.

