

ISABELLY CRISTINA DA SILVA MARQUES

**BIOFUNGICIDA À BASE DE *Bacillus subtilis* EM PRÉ-COLHEITA NA
QUALIDADE E CONSERVAÇÃO PÓS-COLHEITA DE FRUTOS DE TOMATE**

Botucatu

2024

ISABELLY CRISTINA DA SILVA MARQUES

**BIOFUNGICIDA À BASE DE *Bacillus subtilis* EM PRÉ-COLHEITA NA
QUALIDADE E CONSERVAÇÃO PÓS-COLHEITA DE FRUTOS DE TOMATE**

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Horticultura).

Orientador: Professor Doutor João
Domingos Rodrigues

Botucatu

2024

M357b

Marques, Isabelly Cristina da Silva

Biofungicida à base de *Bacillus subtilis* em pré-colheita na
qualidade e conservação pós-colheita de frutos de tomate /
Isabelly Cristina da Silva Marques. -- Botucatu, 2024
85 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu
Orientador: João Domingos Rodrigues

1. defesa antioxidante. 2. biofungicida. 3. shelf-life. 4.
Solanum lycopersicum. 5. armazenamento. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas,
Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título:

BIOFUNGICIDA À BASE DE *Bacillus subtilis* EM PRÉ-COLHEITA NA QUALIDADE E CONSERVAÇÃO PÓS-COLHEITA DE FRUTOS DE TOMATE

AUTORA: ISABELLY CRISTINA DA SILVA MARQUES

ORIENTADOR: JOÃO DOMINGOS RODRIGUES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Agronomia (Horticultura), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOÃO DOMINGOS RODRIGUES (Participação Presencial)
Biodiversidade e Bioestatística / Instituto de Biociências de Botucatu UNESP

Prof. Dr. RENATO VASCONCELOS BOTELHO (Participação Virtual)
Agronomia / Universidade Estadual do Centro Oeste

Pesquisadora Dr.^a DAYANE MÉRCIA RIBEIRO SILVA (Participação Virtual)
Câmpus de Arapiraca / Universidade Federal de Alagoas

Prof.^a Dr.^a ELIZABETH ORIKA ONO (Participação Presencial)
Biodiversidade e Bioestatística / Instituto de Biociências de Botucatu UNESP

Prof.^a Dr.^a CARMEN SILVIA FERNANDES BOARO (Participação Presencial)
Biodiversidade e Bioestatística / Instituto de Biociências de Botucatu UNESP

Botucatu, 19 de junho de 2024.

*Aos meus amados pais João Mario e Marta,
Aos meus avós Francisco e Maria do Carmo (in
memorian),*

dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por me mostrar que tudo pode ser possível quando a gente se arrisca.

Aos meus queridos pais, João Mario e Marta, por todo amor, dedicação e apoio incondicional.

Às minhas primas, Darliane, Kalliane, Vanderlange, Thayrene e Bianca, que reclamam saudade, mas só me recebem de volta com o diploma na mão, obrigada por todo investimento e confiança que me fez chegar tão longe.

À minha querida vó, Maria do Carmo (*in memoriam*), que infelizmente não estará presente para comemorar mais uma das minhas conquistas, mas vibrou por mim até o fim dos seus dias.

À Dayane, que desde o mestrado me acompanha nas labutas da pós-graduação, que por vezes, é minha coorientadora e me faz acreditar que tudo é possível. Obrigada por tudo e mais ainda por todas às críticas construtivas que me fazem ser melhor do que fui ontem.

Ao meu querido orientador, Dr. João Domingos, conhecido carinhosamente por Mingo e é também o maior entusiasta da cultura pop que eu já conheci, sem ele tantos planos não seriam concretizados, o que me permite ir além.

À professora Elizabeth por toda ajuda, disponibilidade e parceria em todos os momentos.

Ao Vitor, que é o meu melhor amigo e o maior jogador de league of legends, que me dá credibilidade sem tamanho, sempre deixando minha vida leve por ser muito bem-humorado e como diríamos em Mossoró: “acanhado”.

À Joseane Danielle, minha grande amiga e incentivadora, agradeço por sempre torcer pelo meu sucesso. Entre risadas, ela brinca que agora só me verá em casa durante as férias, pois estou prestes a explorar o mundo.

A todos os amigos que fiz durante essa jornada, Fernanda, Lusiane, Gabi, Gysa, William, Juan, Lucas, Anderson, Melina, Monica e Gino, pelas conversas, ajuda e parceria.

Aos meus bons companheiros de laboratório, menino Júnior e Eduardo, que topam tudo e conseguem rir até do vento, agradeço por todos os bons momentos e auxílio indispensável.

À Bayer por permitir que esse trabalho fosse possível e a todos os envolvidos durante essa trajetória.

À UNESP-FCA, por ter me dado a oportunidade de conhecer tantos lugares e pessoas incríveis.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Não! Tentar não. Faça ou não faça. Tentativa não há”.

Mestre Yoda, *Star Wars – Episódio V: O Império Contra-Ataca*, 1980.

RESUMO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) pertencente à família Solanaceae, é uma das olerícolas mais cultivadas e consumidas no mundo. Do ponto de vista de maturação, o tomate se enquadra no grupo de frutos climatéricos, que são colhidos ainda verdes com propósito de minimizar as perdas pós-colheita. No entanto, reduzir o desperdício de frutas e hortaliças continua sendo um desafio. A prática mais comum para enfrentar esse problema é a aplicação de produtos químicos, especialmente para o controle de patógenos. No entanto, o uso indiscriminado desses produtos pode prejudicar o ambiente, tornando necessária a busca por estratégias alternativas, como o uso de substâncias biológicas. Estas substâncias parecem ser fundamentais para promover uma conservação de alimentos eficaz e segura. Com base nessa premissa, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito do *Bacillus subtilis* aplicado antes da colheita nas respostas físico-químicas e bioquímicas dos frutos de tomate, bem como em seus atributos qualitativos durante o período pós-colheita. A pesquisa foi conduzida em duas etapas. A primeira etapa foi instalada para definir as doses do produto comercial com cepas de *B. subtilis* quanto à eficiência em parâmetros qualitativos e físico-químicos dos frutos, em delineamento de blocos ao acaso, com quatro blocos, constituídos de cinco doses (0, 2, 4, 6 e 8 L ha⁻¹) do biofungicida contendo o microrganismo. Na primeira etapa os resultados revelaram que os frutos de tomate tratados com *B. subtilis* mostraram aumento no teor de sólidos solúveis, acidez titulável, ácido cítrico, ácido ascórbico e conteúdo de amido. Houve também maior capacidade antioxidante dos frutos, principalmente devido à ação de enzimas antioxidantes, especialmente nas doses de 4 e 6 L ha⁻¹. Com base nos resultados obtidos, foram selecionadas as doses de 4 e 6 L ha⁻¹ para a segunda etapa desse estudo. Na segunda etapa, foram avaliados os parâmetros bioquímicos, físico-químicos e qualitativos dos frutos aos 0, 4, 8 e 12 dias de armazenamento à temperatura ambiente com as doses 0, 4 e 6 L ha⁻¹ do biofungicida. Esta etapa foi realizada com delineamento de blocos ao acaso em parcelas subdivididas, sendo a parcela principal as doses e a subparcela o tempo de armazenamento. Na segunda fase do experimento, a aplicação do biofungicida à base de *B. subtilis* na dose de 6 L ha⁻¹ favoreceu as respostas fisiológicas dos frutos de tomate até o 12º dia após a colheita em comparação com o controle. Essas respostas ocorreram devido à maior

atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase, polifenol oxidase, superóxido dismutase, catalase e peroxidase. Além disso, houve redução na atividade de enzimas pectinolíticas e na peroxidação lipídica, o que ajudou a manter a integridade das membranas até o final do período de avaliação. Isso contribuiu para a firmeza dos frutos e retardou o processo de amadurecimento, prolongando assim a vida de prateleira dos frutos. Pode-se concluir que a aplicação pré-colheita de *B. subtilis* influencia positivamente a qualidade pós-colheita dos frutos de tomate, ao regular o processo de amadurecimento. Esta abordagem biológica oferece uma alternativa promissora aos produtos químicos, promovendo uma conservação de alimentos eficaz e segura.

Palavras-chave: defesa antioxidante; biofungicida; shelf-life; *Solanum lycopersicum*; tempo de prateleira, armazenamento.

ABSTRACT

The tomato plant (*Solanum lycopersicum* L.), belonging to the Solanaceae family, is one of the most cultivated and consumed vegetables worldwide. From a maturation perspective, tomatoes are classified as climacteric fruits, which are harvested while still green to minimize post-harvest losses. However, reducing fruit and vegetable waste remains a challenge. The most common practice to address this issue is the application of chemical products, particularly for pathogen control. However, the indiscriminate use of these products can harm the environment, necessitating the search for alternative strategies, such as the use of biological substances. These substances appear to be crucial for promoting effective and safe food preservation. Based on this premise, the present study aimed to evaluate the effect of pre-harvest application of *Bacillus subtilis* on the physicochemical and biochemical responses of tomato fruits, as well as on their qualitative attributes during the post-harvest period. The study was conducted in two phases. The first phase was designed to determine the doses of the commercial product containing *B. subtilis* strains in terms of their efficiency on the qualitative and physicochemical parameters of the fruits, using a randomized block design with four blocks, comprising five doses (0, 2, 4, 6, and 8 L ha⁻¹) of the biofungicide containing the microorganism. Results from the first phase revealed that tomato fruits treated with *B. subtilis* showed increased levels of soluble solids, titratable acidity, citric acid, ascorbic acid, and starch content. There was also an enhanced antioxidant capacity of the fruits, primarily due to the activity of antioxidant enzymes, especially at doses of 4 and 6 L ha⁻¹. Based on these results, doses of 4 and 6 L ha⁻¹ were selected for the second phase of the study. In the second phase, the biochemical, physicochemical, and qualitative parameters of the fruits were evaluated at 0, 4, 8, and 12 days of storage at room temperature with doses of 0, 4, and 6 L ha⁻¹ of the biofungicide. This phase was carried out using a randomized block design with subdivided plots, where the main plot represented the doses and the subplot represented the storage time. In the second phase of the experiment, the application of the *B. subtilis*-based biofungicide at a dose of 6 L ha⁻¹ favored the physiological responses of the tomato fruits up to the 12th day after harvest compared to the control. These responses were attributed to increased activity of the enzymes phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase. Additionally, there was a reduction in pectinolytic enzyme activity and lipid

peroxidation, which helped maintain membrane integrity until the end of the evaluation period. This contributed to the firmness of the fruits and delayed the maturation process, thereby extending the shelf life of the fruits. It can be concluded that pre-harvest application of *B. subtilis* positively influences the post-harvest quality of tomato fruits by regulating the maturation process. This biological approach offers a promising alternative to chemical products, promoting effective and safe food preservation.

Keywords: antioxidant defense; biofungicide; fruit quality; *Solanum lycopersicum*, shelf-life.

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO GERAL.....	17
	CAPÍTULO 1 - IMPACTOS FÍSICO-QUÍMICOS DA APLICAÇÃO PRÉ-COLHEITA DE <i>Bacillus subtilis</i> EM FRUTOS DE TOMATE.....	20
1.1	INTRODUÇÃO.....	22
1.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
1.2.1	Área experimental e condições de cultivo.....	24
1.2.2	Delineamento experimental e aplicação dos tratamentos.....	24
1.2.3	Colheita dos frutos e variáveis analisadas.....	25
1.2.4	Análise estatística.....	28
1.3	RESULTADOS.....	29
1.4	DISCUSSÃO.....	37
1.5	CONCLUSÃO.....	43
	REFERÊNCIAS.....	45
	CAPÍTULO 2 - EFEITO DA APLICAÇÃO PRÉ-COLHEITA DE <i>Bacillus subtilis</i> NA VIDA ÚTIL DE FRUTOS DE TOMATE.....	52
2.1	INTRODUÇÃO.....	53
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.2.1	Área experimental.....	55
2.2.2	Material vegetal e condições de cultivo.....	55
2.2.3	Delineamento experimental e aplicação foliar.....	56
2.2.4	Colheita e armazenamento.....	56
2.2.5	Variáveis bioquímicas.....	57
2.2.6	Variáveis físico-químicas e qualitativas.....	60
2.2.7	Análise estatística.....	61
2.3	RESULTADOS.....	61
2.3.1	Variáveis bioquímicas.....	61
2.3.2	Variáveis físico-químicas e qualitativas.....	66
2.4	DISCUSSÃO.....	70
2.5	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS.....	77
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
	REFERÊNCIAS.....	83

INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma espécie vegetal pertencente à família Solanaceae (Quinet *et al.*, 2019; Rezk *et al.*, 2021) estando seu fruto presente na mesa da maioria dos brasileiros. Seu cultivo é de grande importância econômica e nutricional entre as hortaliças, sendo o segundo vegetal mais consumido no mundo, depois da batata, com aproximadamente 182,3 milhões de toneladas produzidas por ano (FAOSTAT, 2019).

O Brasil está entre os dez maiores produtores mundiais de tomate, englobando o consumo *in natura* e industrial. A produção brasileira de tomate em 2023 alcançou aproximadamente 3,9 milhões de toneladas. Para 2024, a estimativa é de 4,1 milhões de toneladas. Os estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Bahia se destacam como os maiores produtores (IBGE, 2024; Sidra, 2022).

O consumo de tomate é amplamente difundido por apresentar compostos antioxidantes, incluindo vitaminas, carotenoides, ácidos orgânicos e compostos fenólicos (Farooq *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2018). Esses compostos bioativos desempenham uma gama de propriedades fisiológicas como efeito anti-inflamatório, antialergênicos, antimicrobianos, cardioprotetores e antioxidantes (Quinet *et al.*, 2019; Raiola *et al.*, 2014).

Todavia, a qualidade do fruto do tomateiro e a biossíntese de metabólitos podem ser influenciadas pelas condições de crescimento e desenvolvimento das plantas (Diouf *et al.*, 2018), bem como, por seu manuseio pós-colheita, que pode culminar em perdas durante o armazenamento (Shehata *et al.*, 2021). Por se tratar de fruto climatérico e altamente perecível, o tomate apresenta vida pós-colheita muito curta, limitada por alta taxa respiratória e rápido processo de maturação e senescência (Inestroza-Lizardo *et al.*, 2021).

Os frutos climatéricos podem ser colhidos ainda verdes e após a colheita, os frutos tendem a permanecer biologicamente ativos, continuando seu processo metabólico que rapidamente pode levar à deterioração da qualidade, degradando proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e provocando disfunção celular (Pott; Vallarino; Osorio, 2020; Yun *et al.*, 2012). Os mecanismos que promovem essas mudanças indesejadas à qualidade dos frutos durante o armazenamento estão ligados aos fenóis, processos oxidativos, reações enzimáticas e podridão; no entanto, essas

análises são pouco ou não são avaliadas durante o amadurecimento dos frutos, limitando-se à investigação de alterações físico-químicas (Belay; Caleb, 2022).

Essas mudanças estão associadas à síntese contínua de etileno, que é responsável pelo amadurecimento dos frutos (Iqbal *et al.*, 2017; Nazar *et al.*, 2014). O início do amadurecimento durante a pós-colheita, regula a perda progressiva da firmeza dos frutos de tomate e a sua decomposição enzimática, que altera os componentes da parede celular primária. Quando os frutos se encontram imaturos, a pectina que é o principal agente cimentante da parede celular dos tecidos vegetais, ocorre na forma de protopectinas insolúveis em água, as quais são gradualmente despolimerizadas em pectinas solúveis ao longo do amadurecimento e, consequentemente, contribuindo com o amolecimento dos frutos (Chen *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023). O amaciamento dos frutos é considerado uma das principais causas de perdas pós-colheitas (Patel *et al.*, 2020).

No Brasil, as perdas oriundas da pós-colheita de frutos e vegetais situam-se em torno de 30 a 45%, mesmo ocorrendo notável avanço tecnológico de produção nas últimas décadas (Henz, 2017; Santos *et al.*, 2020). Para reverter esse quadro, o uso de produtos químicos sintéticos é um dos mais empregados quando se refere à conservação pós-colheita de frutos e hortaliças, sobretudo, no controle de patógenos (Schreuder *et al.*, 2018; Shimshoni *et al.*, 2020).

Os riscos de resíduos químicos no produto e no ambiente demanda o uso de substâncias alternativas, para evitar o desenvolvimento de cepas de patógenos resistentes e efeitos adversos ao consumidor (Nicosia *et al.*, 2016; Wisniewski *et al.*, 2016). Atualmente, a adoção de produtos biológicos constituídos de materiais naturais como plantas, bactérias e certos minerais fornecem alternativa ecológica e de biossegurança às formulações convencionais (Garganese *et al.*, 2019). Estes produtos têm maior sustentabilidade, número reduzido de aplicações e baixo efeito residual por serem biodegradáveis (Warra; Prasad, 2020). Entretanto, apesar de seus benefícios, poucos desses produtos foram inteiramente testados em diversas condições de campo ou casa de vegetação, ou, seus efeitos ainda não foram plenamente compreendidos.

Dentre esses agentes de biocontrole, produtos formulados com cepas benéficas, como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), podem ser considerados eficazes no metabolismo pós-colheita, pois estabelecem diversas alterações fisiológicas no metabolismo da planta hospedeira, influenciando a

resistência sistêmica e prolongando a vida útil sem causar efeitos nocivos às mesmas (Arroyave-Toro; Mosquera; Villegas-Escobar, 2017; Chandrasekaran *et al.*, 2019; Sarma *et al.*, 2012).

As BPCP são um grupo de bactérias que exercem efeitos benéficos nas plantas por meio de mecanismos diretos e/ou indiretos, promovendo o crescimento, resistência a patógenos, absorção de água e nutrientes, assim como, tolerância aos estresses abiótico e biótico (Backer *et al.*, 2018). Dentro do grupo das BPCP destaca-se o gênero *Bacillus* spp., sendo a espécie *B. subtilis*, atualmente, um dos agentes mais atraentes para formulação de produtos à base de micro-organismos (Lastochkina *et al.*, 2019). Este micro-organismo tem a capacidade de produzir endósporos resistentes ao calor, solventes orgânicos e irradiação UV (radiação ultravioleta), logo, mantém sua capacidade de alterar a defesa das plantas hospedeiras, mesmo em condições adversas (Gao *et al.*, 2016; Lastochkina *et al.*, 2019).

Pesquisas recentes têm relatado o uso de *B. subtilis* na pós-colheita, em uma variedade de frutos e vegetais, para o controle de doenças durante o manuseio, transporte e armazenamento (Ambrico; Trupo, 2017; Fan *et al.*, 2023; Kilani-Feki *et al.*, 2016; Lastochkina *et al.*, 2020). Estudos mais aprofundados sugerem que os agentes de biocontrole do gênero *Bacillus* spp. apresentam potencial para ativar enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase, peroxidase, polifenoloxidase entre outras (Wang *et al.*, 2023; Zhou *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2020), durante o período pós-colheita de frutos infectados por patógenos.

Entretanto, apesar do papel bem documentado do *B. subtilis* no controle de doenças patogênicas durante a pós-colheita, ainda não está bem fundamentada sua influência e os mecanismos subjacentes na pós-colheita de frutos saudáveis, de modo a preservar a qualidade e prolongar o tempo de prateleira dos frutos. Portanto, a presente pesquisa objetivou abordar as implicações da aplicação pré-colheita de cepas benéficas de *B. subtilis* nas respostas fisiológicas e bioquímicas de frutos de tomates.

CAPÍTULO 1 – IMPACTOS FÍSICO-QUÍMICOS DA APLICAÇÃO PRÉ-COLHEITA DE *Bacillus subtilis* EM FRUTOS DE TOMATE¹

Isabelly Cristina da Silva Marques^a, Dayane Mércia Ribeiro Silva^b, Eduardo Santana Aires^a, Fernanda Nery Vargens^a, Francisco Gilvan Borges Ferreira Freitas Júnior^a, Vinicius Alexandre Ávila dos Santos^a, José Wilker Germano de Souza^b, Wesley de Oliveira Galdino^b, Francisco de Assis de Oliveira^c, Elizabeth Orika Ono^d, João Domingos Rodrigues^d

^a Departamento de Horticultura, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Botucatu 18618-000, Brasil; e.aires@unesp.br (E.S.A.); fernanda-nery.vargens@unesp.br (F.N.V.); freitas.jr@unesp.br (F.G.B.F.F.J.); vinicius.alexandre@unesp.br (V.A.A.d.S.)

^b Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas (Ufal), Arapiraca 57309-005, Brasil; dayannemercia@hotmail.com (D.M.R.S.); jose.germano@arapiraca.ufal.br (J.W.G.d.S.); wesley.galdino@arapiraca.ufal.br (W.d.O.G.)

^c Departamento de Ciências Agrárias e Florestais, Universidade Federal Rural do Semi-árido (Ufersa), Mossoró 59625-900, Brasil; thikaoamigao@ufersa.edu.br (F.d.A.d.O.)

^d Departamento de Biodiversidade e Bioestatística, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Botucatu 18618-000, Brasil; elizabeth.o.ono@unesp.br (E.O.O.); joao.domingos@unesp.br (J.D.R.)

Resumo: As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) ocorrem naturalmente no ambiente e promovem diversos benefícios às plantas. O gênero *Bacillus*, pertencente ao grupo da BPCP, apresenta alto desempenho no controle de doenças pós-colheita e pode estar envolvido nos mecanismos subjacentes que regulam a qualidade pós-colheita dos frutos. Assim, esta pesquisa tem como objetivo avaliar a aplicação pré-colheita de diferentes doses de formulação comercial à base de *B. subtilis* nas características físico-químicas e qualitativas de frutos de tomate. O ensaio experimental foi realizado em delineamento de blocos ao acaso com 5 tratamentos e 4 blocos, aplicando doses crescentes do biofungicida Serenade® (*Bacillus subtilis* QST713) via pulverização foliar: T1 (Controle), T2 (2,0 L ha⁻¹), T3 (4,0 L ha⁻¹), T4 (6,0 L ha⁻¹) e T5 (8,0 L ha⁻¹). Foram avaliados os teores de sólidos solúveis (SS), pH, teores de acidez titulável (AT), *ratio* (SS/AT), teores de ácido ascórbico (AA) e ácido cítrico (AC), firmeza, teores de compostos fenólicos totais (CFT), capacidade antioxidante (DPPH), peroxidação de lipídios (PL), peróxido de hidrogênio (H₂O₂),

¹ Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico Australian Journal of Crop Science.

atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT e peroxidase - POD), teores de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e amido, respiração e teor de etileno. As doses de 4 e 6 L ha⁻¹ de *B. subtilis* promoveram o incremento das variáveis SS (13%), AT (58%), AA (30%), AC (17%), CFT, DPPH (50%), H₂O₂ (30%), atividade da CAT (11%) e POD, amido (46%) e respiração, enquanto a *Ratio* foi reduzida em 27%, assim como, PL (20%), atividade da enzima SOD (6%) e o conteúdo de AR (28%), em relação ao controle. A utilização do biofungicida à base de *B. subtilis* em pré-colheita, melhora as características físico-químicas e qualitativas de frutos de tomate, nas doses de 4 e 6 L ha⁻¹ do biofungicida, pois, atua como bioativador de importantes enzimas, potencializa o sistema antioxidante e reduz o dano de membranas, mantendo a integridade do tecido vegetal.

Palavras-chave: análises pós-colheita; biofungicida; enzimas antioxidantes; *Solanum lycopersicum*.

Abstract: Plant growth-promoting bacteria (PGPB) naturally occur in the environment and benefit plants. The genus *Bacillus*, which belongs to the PGPB group, shows high efficacy in controlling post-harvest diseases and may be involved in the underlying mechanisms regulating the post-harvest quality of fruits. Thus, this research aims to evaluate the pre-harvest application of different doses of a commercial formulation based on *Bacillus subtilis* on the physicochemical and qualitative characteristics of tomato fruits. The experimental trial was conducted using a randomized block design with 5 treatments and 4 blocks, applying increasing doses of the biopesticide Serenade® (*Bacillus subtilis* QST713) via foliar spraying: T1 (Control), T2 (2.0 L ha⁻¹), T3 (4.0 L ha⁻¹), T4 (6.0 L ha⁻¹), and T5 (8.0 L ha⁻¹). The parameters evaluated included soluble solids (SS), pH, titratable acidity (TA), ratio (SS/TA), ascorbic acid (AA) and citric acid (CA) levels, firmness, total phenolic compounds (TPC), antioxidant capacity (DPPH), lipid peroxidation (LP), hydrogen peroxide (H₂O₂), antioxidant enzyme activities (superoxide dismutase - SOD, catalase - CAT, and peroxidase - POD), total soluble sugars (TSS), reducing sugars (RS), starch, respiration, and ethylene content. The doses of 4 and 6 L ha⁻¹ of *B. subtilis* led to increased SS (13%), TA (58%), AA (30%), CA (17%), TPC, DPPH (50%), H₂O₂ (30%), CAT activity (11%) and POD, starch (46%), and respiration, while the ratio was reduced by 27%, as well as LP (20%), SOD enzyme activity (6%), and RS content (28%) compared to the control. The use of the

B. subtilis-based biopesticide pre-harvest improves the physicochemical and qualitative characteristics of tomato fruits at doses of 4 and 6 L ha⁻¹, as it acts as a bioactivator of key enzymes, enhances the antioxidant system, and reduces membrane damage, maintaining the integrity of plant tissue.

Keywords: antioxidant enzymes; biofungicide; *Solanum lycopersicum*; post-harvest analysis.

Abbreviations: O.M_Organic matter; P(resin)_Phosphor; K⁺_Potassium; Ca²⁺_Calcium; Mg²⁺_Magnesium; CEC_Cation exchange capacity; V_Base saturation; SS_Soluble solids; TA_Titrable acidity; AA_Ascorbic acid; CA_Citric acid; TPC_Total phenolic compounds; DPPH_Antioxidant capacity; LP_lipid peroxidation; H₂O₂_Hydrogen peroxide; SOD_superoxide dismutase; CAT_Catalase; POD_Peroxidase; RS_Reducing sugars; TSS_Total soluble sugars; RESP_Respiration; ET_Ethylene; FIRM_Firmness

1.1 INTRODUÇÃO

Um dos vegetais mais importantes em termos de área cultivada, produção, rendimento, uso comercial e consumo é o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) (Sinha et al., 2019). Os frutos do tomateiro são amplamente consumidos como fonte de vitamina C e sais minerais, são ricos em compostos antioxidantes e bioativos, como compostos fenólicos, ácido ascórbico e licopeno (Collins et al., 2022; Quinet et al., 2019).

Entretanto, o tomate é altamente perecível devido ao seu padrão de amadurecimento de fruto climatérico, no qual é propenso à rápida deterioração após a colheita, estando mais suscetível à infecção microbiana. Esta perecibilidade é atribuída a diversas modificações fisiológicas e físico-químicas, seja pela respiração, perda de massa, amolecimento da polpa, entre outros, durante o seu período pós-colheita (Meiramkulova et al., 2023; Shehata et al., 2021).

Os frutos climatéricos são colhidos comercialmente após concluir o seu crescimento e seu amadurecimento ocorrerá desligado da planta e está diretamente relacionado à produção de etileno. O amadurecimento dos frutos de tomate compreende uma cascata de eventos sobre respostas bioquímicas, fisiológicas e estruturais e pode ser descrito pelo amolecimento, alterações na cor, sabor e

compostos aromáticos, como açúcares e ácidos orgânicos (Al-Dairi et al., 2021; Changwal et al., 2021).

A qualidade dos produtos agrícolas é fortemente influenciada por muitos fatores pré-colheita, tendo em vista que as práticas agrônômicas são reconhecidas como fator determinante da integridade dos frutos do tomate, sobretudo em função de fatores bióticos (Adhikari et al., 2015; Chandrasekaran et al., 2019). Todavia, é um grande desafio produzir frutos com menor utilização de produtos químicos sintéticos e limitar as perdas pós-colheita, o que encoraja pesquisas no uso de tecnologias baseadas em moléculas naturais.

Diante disso, o uso de produtos biológicos tem se mostrado uma alternativa interessante para driblar o crescente número de micro-organismos resistentes a fungicidas químicos. Atualmente a utilização de antagonistas naturais de patógenos como fungos, vírus, bactérias, predadores, parasitoides e outros estão sendo utilizados como método seguro para reduzir os problemas de resistência adquirida nos campos agrícolas (Lahlali et al., 2022; Ons et al., 2020). Dentre esses agentes de biocontrole, o *Bacillus subtilis* tem destaque no estabelecimento e crescimento de plantas e em tomateiro, parece estar envolvido significativamente na qualidade dos seus frutos, prologando o prazo de validade pós-colheita (Chandrasekaran et al., 2019). O gênero *Bacillus* pertence às bactérias do grupo BPCP (Bactérias promotoras de crescimento de plantas) e a exposição de plantas a esse micro-organismo pode proporcionar a conservação de alimentos no controle de doenças pós-colheita, o que sugere que esse micro-organismo pode estar ligado ao metabolismo fisiológico e bioquímico de frutos (Kalam et al., 2020; Lastochkina et al., 2019).

Atualmente, há diversos estudos que evidenciam o papel benéfico do *B. subtilis* no controle biológico de patógenos em plantas e frutos de tomate (Cawoy et al., 2011; Punja et al., 2016; Samara et al., 2021), entretanto, seu uso na qualidade pós-colheita ainda não está bem documentado. Tendo em vista essa lacuna, a realização deste estudo objetivou avaliar o efeito da aplicação pré-colheita de diferentes doses de formulação comercial à base de *B. subtilis* nas características físico-químicas e qualitativas de frutos de tomate. Hipotetizamos que os efeitos benéficos dessa BPCP, na quantidade adequada, controlam processos fisiológicos que regulam a maturação dos frutos.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Área experimental e condições de cultivo

O experimento foi conduzido no município de Mogi Guaçu - SP (22°22'15" LS, 46°56'38" LW e altitude de 638 m). O clima da região é do tipo Cwa: clima mesotérmico, com inverno seco, no qual a temperatura média do mês mais frio é inferior a 18°C e a do mês mais quente ultrapassa 22°C, de acordo com a classificação de Koppen. O índice pluviométrico varia de 1100 a 1700 mm, tendo uma estação seca entre os meses de abril a setembro, sendo julho o mês mais seco (Sparovek et al., 2007).

Foram utilizadas mudas de tomateiro de mesa, variedade STVE4466 do grupo Seminis®, cujo espaçamento de plantio adotado foi de 1,2 m de largura e 4,5 m de comprimento, contendo 26 plantas por parcela, com 2 linhas de plantio e espaçamento de 75 cm entre linhas e 35 cm entre plantas. A temperatura média e a umidade relativa do ar durante a execução do experimento foi de 26°C e 50%, respectivamente. O solo da área experimental foi caracterizado como Latossolo Vermelho Arenoso, apresentando as seguintes propriedades químicas: pH (CaCl₂)= 5,1; M.O= 23,0 g dm⁻³; P(resina)= 29,0 mg dm⁻³; H⁺+Al³⁺= 28,0 mmol_c dm⁻³; K⁺= 2,5 mmol_c dm⁻³; Ca²⁺= 22,0 mmol_c dm⁻³; Mg²⁺= 10 mmol_c dm⁻³; CTC= 62,7 mmol_c dm⁻³ e V= 55%. A adubação e correção do solo foi realizada de acordo com a análise e recomendações para a cultura do tomateiro (Trani et al. 2015). O sistema de irrigação foi conduzido por gotejamento com estação de controle e sistema de tubos de polietileno flexível.

1.2.2 Delineamento experimental e aplicação dos tratamentos

Foi utilizado o delineamento experimental de blocos ao acaso, com 5 tratamentos e 4 blocos. Os tratamentos consistiram em cinco doses crescentes de biofungicida à base de *Bacillus subtilis*: T1 – (Controle – sem aplicação), T2 – (2,0 L ha⁻¹), T3 – (4,0 L ha⁻¹), T4 – (6,0 L ha⁻¹) e T5 – (8,0 L ha⁻¹), aplicados via pulverização foliar. Para os tratamentos foi utilizado o produto comercial Serenade® (Bayer S.A) que é um biofungicida que tem como fonte o agente biológico *Bacillus subtilis* QST713 na concentração de 13,68 g L⁻¹ (1,37% - 10⁹ UFC. g⁻¹) do ingrediente ativo e formulação em suspensão concentrada.

As aplicações pré-colheita de Serenade® foram realizadas semanalmente, a partir do estágio fenológico de desenvolvimento dos frutos. Esses frutos foram previamente identificados no 4º cacho, todos com a mesma idade. Eram realizadas quatro aplicações do produto antes da colheita (DAC), seguindo esta ordem: 21, 14, 7 e 1 dia antes da colheita. Todas as aplicações ocorreram no horário das 8:00 às 10:00h, com pulverizador pressurizado de operação de trabalho de 2,5 kgf cm⁻², equipado com bicos modelo 110.01, espaçamento dos bicos de 40 cm, largura da barra de 1,2 m e altura da barra de 40 cm.

1.2.3 Colheita dos frutos e variáveis analisadas

A colheita foi realizada quando os frutos apresentavam estágio “de vez” com 30 a 50% de coloração vermelha. Após a colheita, os frutos foram lavados com água destilada e secos com auxílio de papel toalha para a realização das seguintes análises: teor de sólidos solúveis, pH, acidez titulável, *ratio*, teor de ácido ascórbico e ácido cítrico, firmeza, teor de compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante, peroxidação de lipídios, teor de peróxido de hidrogênio, atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e peroxidase), teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores, amido, taxa de respiração e teor de etileno.

As características físico-químicas dos frutos de tomate foram obtidas a partir da homogeneização de dois frutos (com casca e semente) por unidade experimental. Os frutos foram triturados com um mixer e nessa polpa foram determinados: os teores de sólidos solúveis (SS) com o uso de refratômetro digital Atago e os resultados expressos em °Brix. Para a determinação do pH, a medida foi realizada através de extrato aquoso da polpa do fruto, em potenciômetro Micronal modelo B-221, conforme as normas do Instituto Adolfo Lutz (Brasil, 2005). Para a determinação da acidez titulável (AT), expressa em gramas de ácido cítrico por 100 g de polpa, utilizou-se também a recomendação do mesmo autor e os resultados foram obtidos de titulação de 5 g de polpa homogeneizada e diluída para 100 mL de água destilada, com solução padronizada de hidróxido de sódio a 0,1 N, tendo como indicador a fenolftaleína. A relação SS/AT (*ratio*) foi determinada através da relação entre o teor de sólidos solúveis e acidez titulável (Tressler e Joslyn, 1961). O conteúdo de ácido ascórbico (AA) foi determinado a partir de 10 g de polpa, por titulação em ácido oxálico a 0,5% com 2,6-diclorofenolindofenol (DCFI) a 0,01 N, com resultados expressos em mg g⁻¹.

de amostra (Brasil, 2000) e a quantificação de ácido cítrico (AC) foi obtida de acordo com metodologia proposta por Choy et al. (1963) sendo os resultados expressos em g 100 g⁻¹ de amostra.

A firmeza da polpa foi medida em dois frutos inteiros com casca, em dois pontos centrais de cada fruto, utilizando penetrômetro digital modelo PTR-500 da Instrutherm® com resultados expressos em kgf cm⁻².

Para todas as análises bioquímicas (compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante (DPPH), peroxidação de lipídios, teor de peróxido de hidrogênio, atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase, teores de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e amido), os frutos foram coletados e congelados instantaneamente em nitrogênio líquido. No laboratório, os frutos foram armazenados em ultra freezer a -80°C até as análises.

A concentração de compostos fenólicos totais (CFT) dos frutos foi determinada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton et al. 1999), com a utilização de espectrofotômetro UV-visível. Os resultados foram expressos em µg de ácido gálico g⁻¹ de amostra.

A capacidade antioxidante total (DPPH) foi determinada de acordo com metodologia proposta por Brand-Williams et al. (1995), onde a solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi inicialmente preparada em metanol 80% (10 mg em 50 mL). Após a pesagem, as amostras foram extraídas em 10 mL de metanol (80%) e permaneceram por 15 minutos em banho ultrassom; na sequência foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos sob temperatura de 5 °C. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e armazenadas em ambiente protegido da luz por 1 hora, para posterior leitura em espectrofotômetro UV-visível, e os resultados expressos em % DPPH reduzido.

A peroxidação de lipídios (PL) foi determinada através da técnica sugerida por Heath e Packer (1968). Para isso foram utilizados 300 mg do material vegetal congelado em 5 mL de solução composta por ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,25% e ácido tricloroacético (TCA) a 10%. A solução extraída foi incubada em banho-maria a 90°C por 1 h e, em seguida, as amostras foram colocadas em banho de gelo para o completo resfriamento para posterior centrifugação a 10000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante resultante da centrifugação foi coletado para realização das leituras, sendo estas realizadas em dois comprimentos de ondas (560

e 600 nm) em espectrofotômetro. Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar do malondialdeído ($155 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi obtido segundo método de Alexiava et al. (2001), onde 100 mg de amostras maceradas e congeladas em 1 mL de TCA 0,1% foram centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C . A reação iniciou-se com a adição de 0,5 mL de extrato, 0,5 mL de tampão fosfato 0,1 M de pH 7,0 e 2,0 mL de iodeto de potássio a 1M. O conteúdo foi incubado no escuro por uma hora e, posteriormente, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 390 nm. Calculou-se a concentração de peróxido de hidrogênio nas amostras através de curva padrão de peróxido de hidrogênio com os resultados expressos em $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$ de massa fresca.

Para obtenção da atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD) foi realizada a extração enzimática conforme metodologia proposta por Kar e Mishra (1976), onde 300 mg do material vegetal congelado foi extraído, por centrifugação, em 5 mL de tampão fosfato de potássio refrigerado (0,1 M – pH 6,7) e 1% (m/v) de polivinilpolipirrolidona a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C . O extrato obtido foi separado em tubos Eppendorfs de 1,5 mL e armazenado a -80°C para posterior determinação. A partir desse extrato o teor de proteína solúvel total foi determinada através da metodologia de Bradford (1976). A atividade da SOD foi pelo método de Giannopolitis e Reis (1977), da CAT seguiu o procedimento sugerido por Peixoto et al. (1999) e da POD foi quantificada, conforme metodologia proposta por Teisseire e Guy (2000).

Para determinação dos teores de açúcares foram pesadas 100 mg das amostras dos frutos, congeladas e maceradas em tubos Eppendorfs de 2 mL. Os teores de açúcares solúveis totais (AST) e amido foram quantificados segundo metodologia descrita por Yemm e Willis (1954) e os resultados foram calculados com base na curva padrão de glicose e expressos em mg g^{-1} de massa fresca. Os açúcares redutores (AR) foram quantificados segundo metodologia de Miller (1959), sendo os resultados calculados com base na curva padrão de glicose e expressos em mg g^{-1} de massa fresca.

A taxa de respiração e teor de etileno dos frutos foi realizada no laboratório da JM Bioanálises, situado em Botucatu-SP. Para a realização das análises dois tomates de cada repetição foram colocados em frascos de 1,8 L vedados com filme plástico de dupla camada à temperatura ambiente durante 12 horas. A determinação de etileno

foi realizada retirando o ar dos recipientes com seringa *gas-tight* (Hamilton, volume total de 2,5 mL). Esse ar das seringas foram injetados manualmente, 2,0 mL, do ar, do frasco, em cromatógrafo gasoso - GC, com Detector por Ionização de Chama - FID (GC-FID Varian, modelo CP-3800) equipado com coluna PoraPLOT Q (Agilent J&W GC Coluns) com diâmetro, comprimento e espessura de 0,25 mm, 25 m e 8 μ M, respectivamente. As seguintes condições cromatográficas foram utilizadas: temperatura do forno de 50°C, temperatura do injetor de 100°C, temperatura do Detector (FID) de 250°C, modo split (Split State: ON; Split Ratio: 10), Fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹, Gás de arraste (N₂): 29 mL min⁻¹, Gás Hidrogênio: 30 mL min⁻¹ e ar sintético: 300 mL min⁻¹. O etileno apresentou tempo de retenção de 7,40 minutos em uma corrida de 10 minutos.

O padrão utilizado para compor a curva de calibração foi um cilindro de gás etileno. Para análise de CO₂ liberado (respiração) o ar foi retirado com seringa *gas-tight* (Hamilton, volume total de 2,5 mL). Esse ar foi injetado de forma manual utilizando volume de injeção de 2,0 mL do ar do frasco em cromatógrafo gasoso - GC, com Detector por Ionização de Chama - FID (GC-FID Varian, modelo CP-3800) equipado com coluna PoraPLOT Q (Agilent J&W GC Coluns) com diâmetro, comprimento e espessura de 0,25 mm, 25 m e 8 μ M respectivamente. As seguintes condições cromatográficas foram utilizadas: temperatura do forno de 50°C, temperatura do injetor de 100°C, temperatura do Detector (FID) de 250°C, modo split (Split State: ON; Split Ratio: 10), fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹, Gás de arraste (N₂): 29 mL min⁻¹, Gás Hidrogênio: 30 mL min⁻¹ e ar sintético: 300 mL min⁻¹. O CO₂ apresentou tempo de retenção de 4,5 minutos em uma corrida de 10 minutos. O padrão utilizado para compor a curva de calibração foi um cilindro de gás de CO₂ (White Martins) com 99,5% de pureza.

1.2.4 Análise estatística

Para a análise estatística os dados foram previamente submetidos ao teste de normalidade de Anderson-Darling através do programa Minitab®. Verificada a normalidade dos dados procedeu-se à análise de variância (teste F) e regressão polinomial pelo programa Agroestat® (Barbosa; Maldonado, 2015). Os gráficos foram construídos através do software SigmaPlot®. A análise de componentes principais foi realizada utilizando o software estatístico JMP 10 (SAS Institute Inc., EUA).

1.3 RESULTADOS

De acordo com a análise de variância, houve efeito significativo das doses de biofungicida à base de *Bacillus subtilis* para as variáveis: teores de sólidos solúveis (SS), teor de acidez titulável (AT), *ratio* (SS/AT), teores de ácido ascórbico (AA) e ácido cítrico (AC), teor de compostos fenólicos totais (CFT), capacidade antioxidante (DPPH), peroxidação de lipídios (PL), teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD), teores de açúcares redutores (AR) e amido e respiração, enquanto para pH, firmeza, teores de açúcares solúveis totais e etileno não apresentaram resposta significava aos tratamentos (Tabela 1). Portanto, para observar o comportamento das variáveis, ajustaram-se modelos de regressão em função das doses de biofungicida.

Tabela 1. Valores de *p* da análise de variância (teste F) em função das doses de biofungicida à base de *Bacillus subtilis* nas diferentes variáveis avaliadas.

Variáveis	Doses	CV (%)
Teores de sólidos solúveis	0,0005**	2,84
pH	0,1544 ^{ns}	2,99
Teor de acidez titulável	0,0001**	6,05
<i>Ratio</i>	0,0001**	6,12
Teor de ácido ascórbico	0,0047**	10,29
Teor de ácido cítrico	0,0118*	10,65
Firmeza	0,9259 ^{ns}	11,06
Teor de compostos fenólicos totais	0,0274*	3,64
Capacidade antioxidante	0,0015**	12,00
Peroxidação de lipídios	0,0043**	6,10
Teor de peróxido de hidrogênio	0,0002**	9,68
Atividade da SOD	0,0012**	9,63
Atividade da CAT	0,0001**	10,22
Atividade da POD	0,0001**	6,96
Teores de açúcares solúveis totais	0,2259 ^{ns}	15,62
Teores de açúcares redutores	0,0336*	22,64
Teores de Amido	0,0006**	12,52
Taxa de respiração	0,0001**	24,80
Teor de etileno	0,6957 ^{ns}	19,36

**0,01 < p < 0,05*; ^{ns} = não significativo.

Para as variáveis AT, SS e SS/AT (Fig 1.) foi observado efeito quadrático em função das doses de biofungicida à base de *B. subtilis* aplicados nos frutos de tomate. A AT e SS aumentaram até a dose de 4,60 e 5,40 L ha⁻¹ do produto, com aumento de 58 e 13% em relação ao controle, respectivamente (Fig 1A. e 2B.). Por outro lado, houve redução da SS/AT (Fig 1C.) em função do incremento das doses do produto. Essa redução foi observada até a dose de 4,49 L ha⁻¹, 27% menor em relação ao controle.

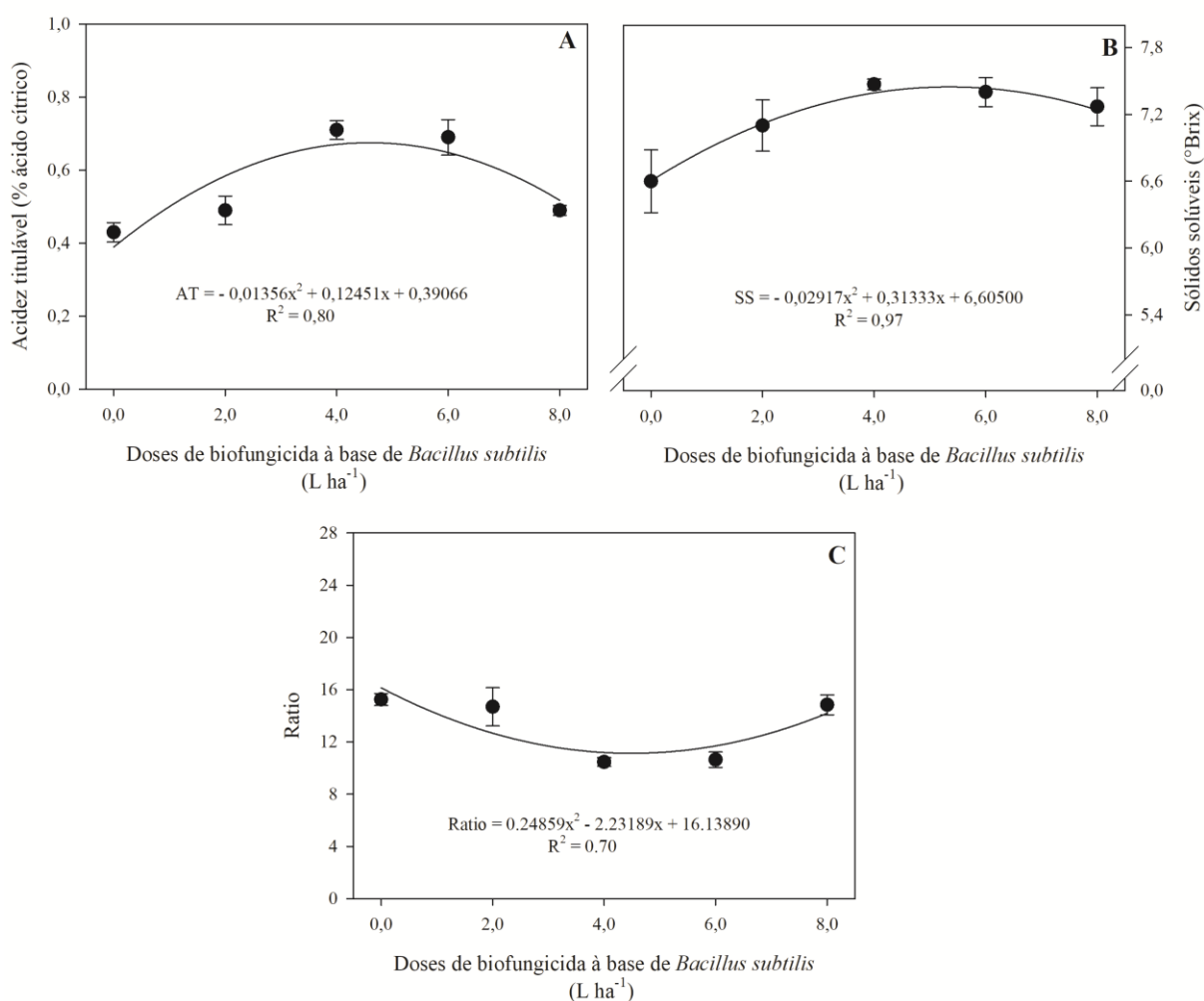


Fig 1. Teores de acidez titulável-AT (A), sólidos solúveis-SS (B) e *ratio*-SS/AT (C) em frutos de tomates tratados com diferentes doses de biofungicida à base de *Bacillus subtilis* aplicadas em pré-colheita. As barras mostram o desvio padrão. n=4 (número de repetições).

Os valores de AA e AC foram ajustados ao modelo quadrático e aumentaram até as doses de 5,82 e 4,44 L ha⁻¹ d produto à base de *B. subtilis*, com máximos de 11,66

mg g⁻¹ de amostra e 0,41 por 100 g⁻¹ de amostra, com ganhos de 30 e 17% em comparação com o tratamento controle, respectivamente (Fig 2A. e 2B.).

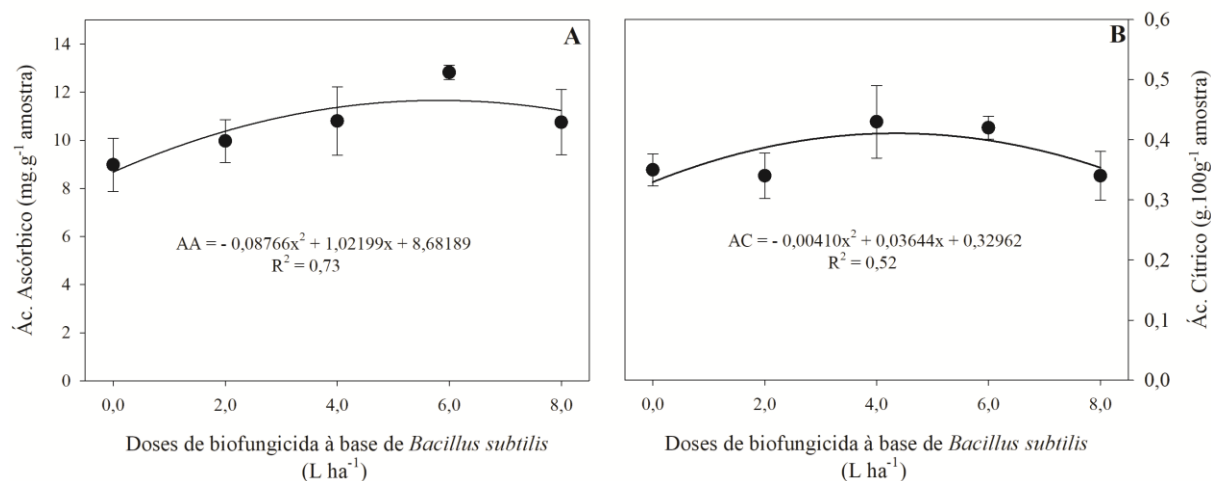


Fig 2. Teores de ácido ascórbico-AA (**A**) e ácido cítrico-AC (**B**) em frutos de tomates tratados com diferentes doses de biofungicida à base de *Bacillus subtilis* aplicadas em pré-colheita. As barras mostram o desvio padrão. n=4 (número de repetições).

A aplicação das doses de biofungicida à base de *B. subtilis* influenciou positivamente nos teores de CFT e DPPH (Fig 3.). Os teores de CFT dos frutos de tomate apresentaram resposta linear positiva em função do aumento das doses aplicadas (Fig 3A.), enquanto o DPPH aumentou até a dose de 5 L ha⁻¹ do produto, resultando em maior percentagem da capacidade antioxidante (50%) em relação ao controle (Fig 3B.).

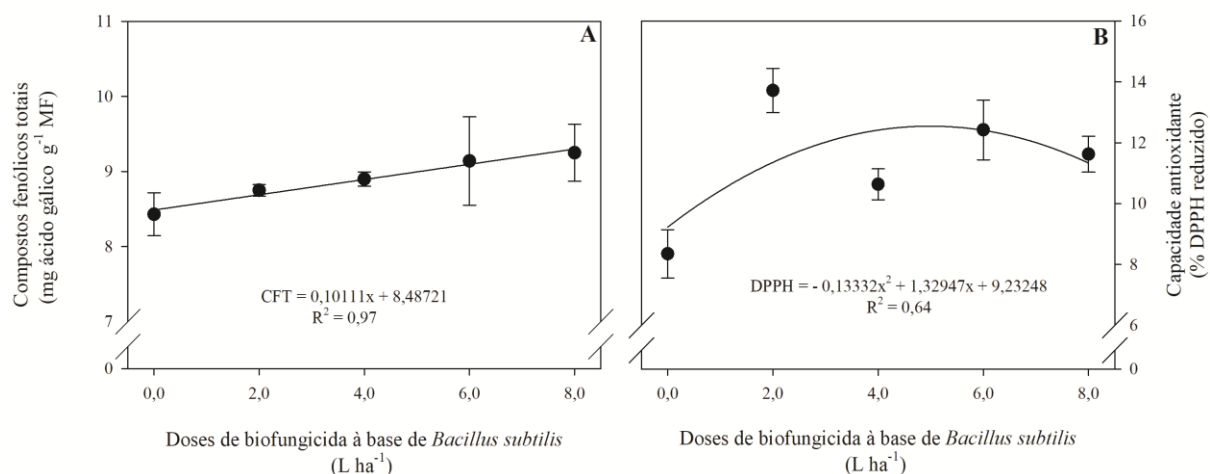


Fig 3. Teores de compostos fenólicos totais-CFT (A) e capacidade antioxidante-DPPH (B) em frutos de tomates tratados com diferentes doses de biofungicida à base de *Bacillus subtilis* aplicadas em pré-colheita. As barras mostram o desvio padrão. n=4 (número de repetições).

A PL foi reduzida substancialmente na presença de *B. subtilis*, apresentando resposta linear decrescente em relação às doses de biofungicida (Fig 4A.), com redução média de 20% em comparação ao controle. Entretanto, o teor de H₂O₂ aumentou em função das doses de *B. subtilis* aplicadas, com aumento mais expressivo na maior dose (8 L ha⁻¹) do produto, 30% maior que o controle (Fig 4B.).

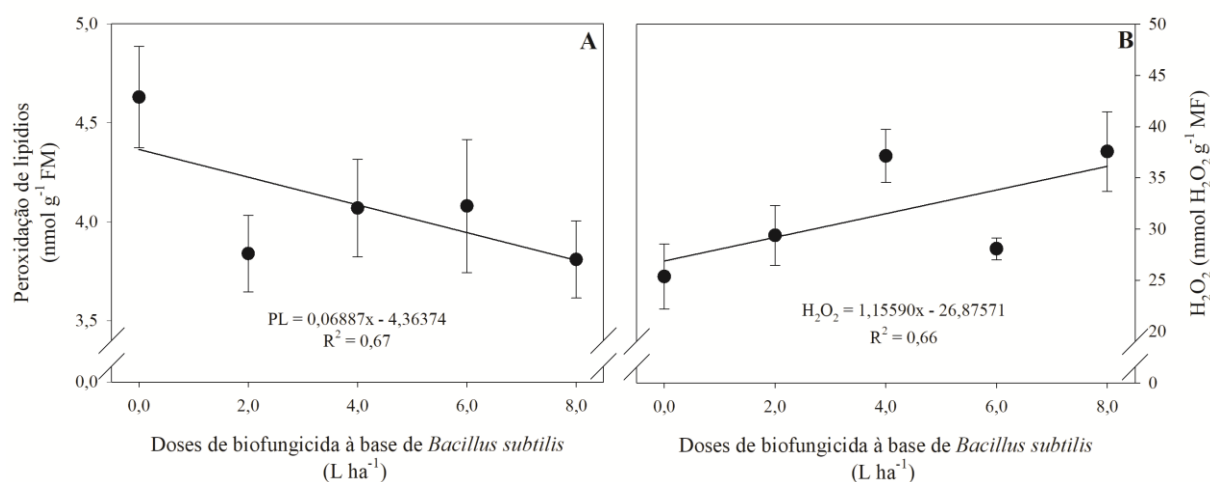


Fig 4. Peroxidação de lipídios-PL (A) e teor de peróxido de hidrogênio-H₂O₂ (B) em frutos de tomates tratados com diferentes doses de biofungicida à base de *Bacillus subtilis* aplicadas em pré-colheita. As barras mostram o desvio padrão. n=4 (número de repetições).

A aplicação pré-colheita do biofungicida à base de *B. subtilis* em tomateiro modificou as características do sistema antioxidante dos frutos (Fig 5.). A atividade da enzima SOD apresentou ajuste quadrático em função das doses aplicadas, promovendo redução dessa atividade até a dose de 3,15 L ha⁻¹ do produto comercial, com posterior aumento. Sob aplicação de 3,15 L ha⁻¹ do biofungicida, houve redução de 6% na atividade da SOD em relação ao controle (Fig 5A.). Por outro lado, a atividade da enzima CAT aumentou com o acréscimo das doses até a dose de 3,18 L ha⁻¹, com 11% a mais de remoção de H₂O₂ em comparação ao controle (Fig 5B.).

Além da CAT, a atividade da POD nos frutos de tomateiro aumentou de forma linear em função do incremento das doses de *B. subtilis* (Fig 5C.).

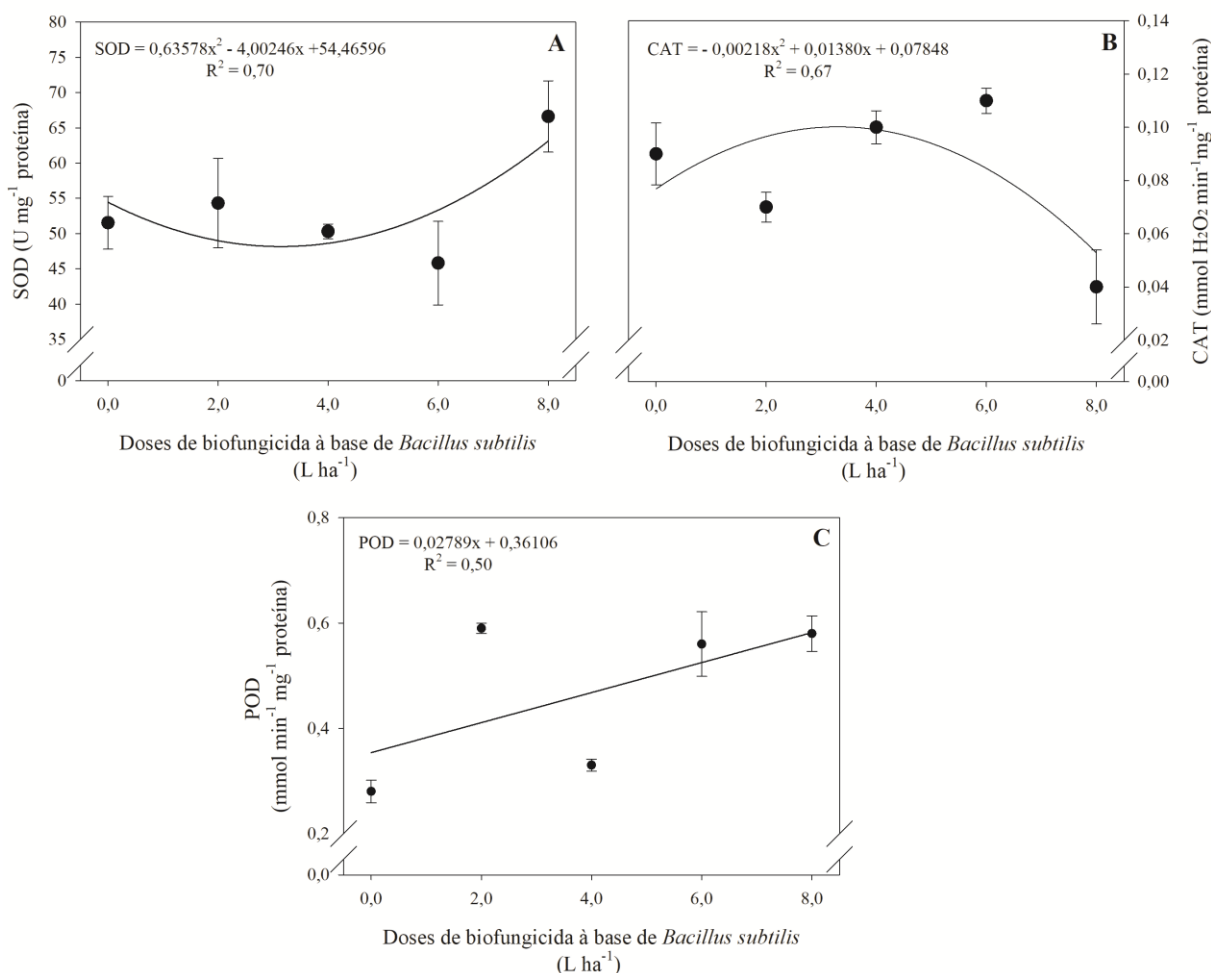


Fig 5. Atividade das enzimas superóxido dismutase-SOD (A), catalase-CAT (B) e peroxidase-POD (C) em frutos de tomates tratados com diferentes doses de biofungicida à base de *Bacillus subtilis* aplicadas em pré-colheita. As barras mostram o desvio padrão. n=4 (número de repetições).

A presença de *B. subtilis* no biofungicida promoveu redução nos teores de AR, com ajuste quadrático da curva resposta, na qual observa-se menor teor de AR na dose de 5,14 L ha⁻¹, com redução de 28% em relação aos frutos não tratados com *B. subtilis* (Fig 6A.). Por outro lado, o teor de amido aumentou em função das doses aplicadas, com acréscimo até a dose de 3,67 L ha⁻¹ do produto, com incremento de 46% em comparação ao controle (Fig 6B.). Além disso, os frutos tratados com doses de biofungicida apresentaram taxa de respiração mais elevada em comparação com os frutos do grupo controle (Fig 6C.).

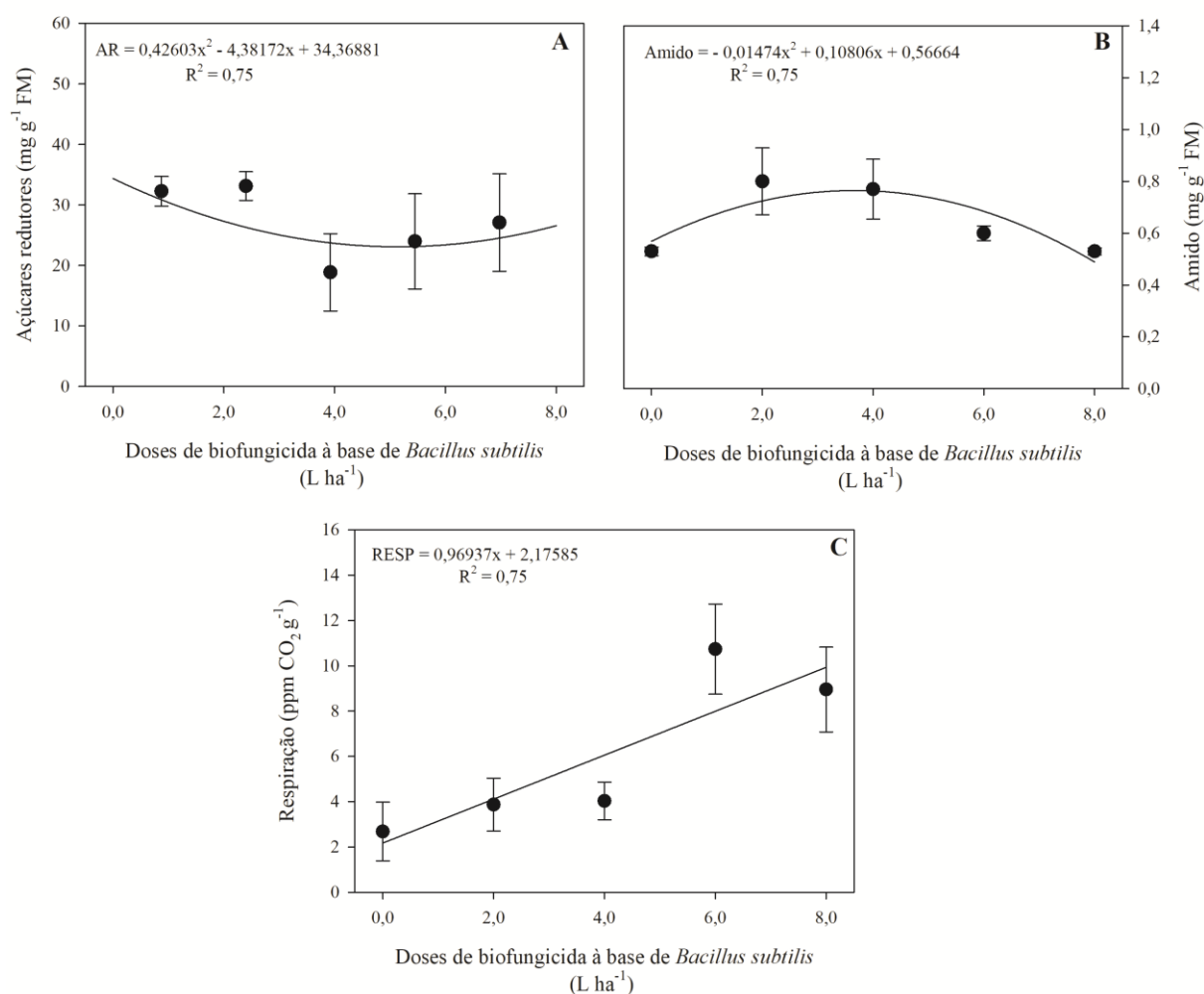


Fig 6. Teores de açúcares redutores-AR (A), amido (B) e respiração (C) em frutos de tomates tratados com diferentes doses de biofungicida à base de *Bacillus subtilis* aplicadas em pré-colheita. As barras mostram o desvio padrão. n=4 (número de repetições).

A Análise de Componentes Principais (PCA) de 19 características de frutos de tomate submetidos as 5 doses de biofungicida à base de *B. subtilis* permitiu a observação global dos dados (Tabela 2).

Tabela 2. Matriz de carga, autovalores e proporção de variação associada aos dois componentes principais (CP) da PCA de 19 características de frutos em 5 doses de biofungicida à base de *Bacillus subtilis* no cultivo de tomate.

Variáveis	CP 1	CP 2
Teores de sólidos solúveis (SS)	0,362	0,052
pH (pH)	- 0,208	- 0,097
Teor de acidez titulável (TA)	0,322	-0,201
SS/AT (RATIO)	-0,304	0,237
Teor de ácido ascórbico (AA)	0,304	-0,075
Teor de ácido cítrico (CA)	0,274	-0,253
Firmeza (FIRM)	0,013	-0,394
Teor de compostos fenólicos totais (TPC)	0,295	0,196
Capacidade antioxidante (DPPH)	0,168	0,088
Peroxidação de lipídios (LP)	-0,221	-0,244
Teor de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	0,237	0,259
Atividade da SOD (SOD)	-0,039	0,424
Atividade da CAT (CAT)	0,048	-0,423
Atividade da POD (POD)	0,113	0,198
Teores de açúcares solúveis totais (TSS)	-0,215	-0,034
Teores de açúcares redutores (RS)	-0,320	0,081
Teores de Amido (STA)	0,113	-0,103
Taxa de respiração (RESP)	0,219	0,094
Teor de etileno (ET)	0,122	0,259
Autovalores	7,359	5,456
Percentual (%)	38,737	28,717
Percentual acumulado (%)	38,737	67,453

A variabilidade total foi explicada por quatro componentes principais (CP). Porém, dois deles foram considerados os mais importantes, pois apresentaram autovalores > 4,0. Desses quatro CP, os dois primeiros (CP1 e CP2) representaram 67,45% da variação total. O CP1 representou 38,7% da variação total e separou efetivamente os frutos tratados com 4, 6 e 8 L ha⁻¹ das demais doses do biofungicida (Fig 7A.). A análise das cargas de CP1 (Fig 7B.) sugere que esta separação é atribuída a parâmetros como sólidos solúveis (SS), ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (CA), firmeza (FIRM), compostos fenólicos totais (TPC), capacidade antioxidante (DPPH),

peróxido de hidrogênio (H₂O₂), catalase (CAT), peroxidase (POD), amido (STA) e respiração (RESP), pois exibiram cargas positivas. Os escores e cargas do CP1 revelaram que doses de 4 e 6 L ha⁻¹ levaram a maior atividade da enzima CAT, FIRM, concentração de AA, CA e STA, bem como maior TA em frutos de tomate devido a fortes correlações positivas. Enquanto a dose de 8 L ha⁻¹ de biofungicida apresentou aumento na atividade de POD e DPPH, concentração de SS e TPC. No entanto, resultou em maior conteúdo de ET, taxa de RESP, bem como aumento dos níveis de H₂O₂.

No score plot, o CP2 foi crucial para separar os tratamentos 2 e 8 L ha⁻¹ dos demais, pois esses tratamentos exibiram cargas positivas (Fig 7A). O CP2 representou 28,7% da variação total e foi associado principalmente à atividade da enzima SOD, teor de RS e ratio em frutos tratados com 2 L ha⁻¹ (Fig 7B). O tratamento controle (A) causou maiores danos à membrana (LP), pH e concentração de SST.

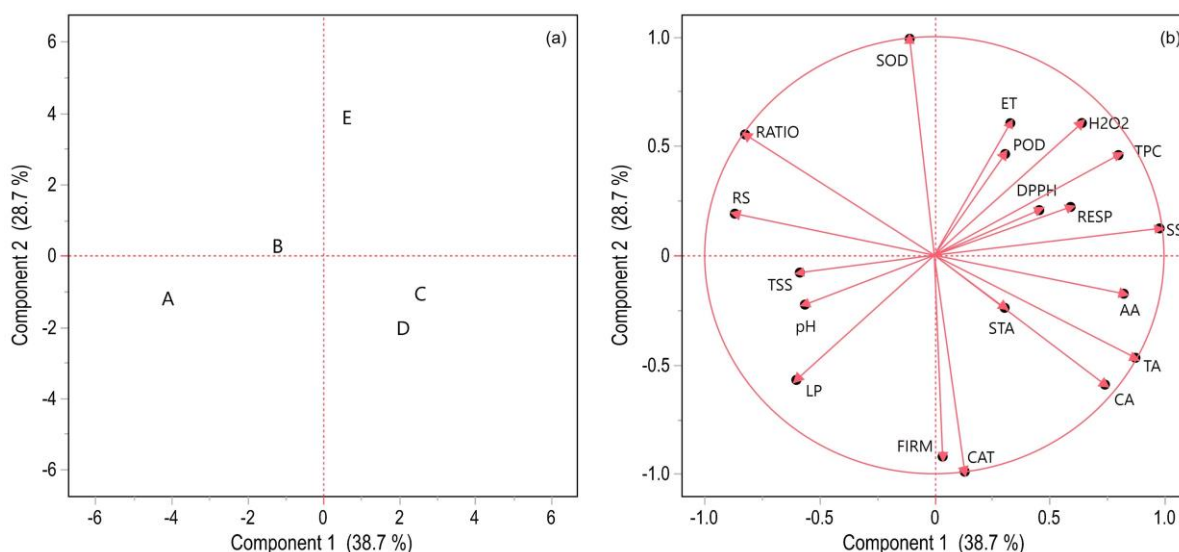


Fig 7. Gráfico de pontuação (a) e gráfico de carga (b) da análise de componentes principais (CP) de 19 características de frutos de tomate sob 5 doses de biofungicida à base de *Bacillus subtilis*. Legenda do gráfico de pontuação: 0 L ha⁻¹ (controle – A), 2 L ha⁻¹ (B), 4 L ha⁻¹ (C), 6 L ha⁻¹ (D) e 8 L ha⁻¹ (E). Legenda das características do gráfico de cargas (b): teores de sólidos solúveis (SS), pH (pH), teor de acidez titulável (TA), SS/AT (RATIO), teor de ácido ascórbico (AA), teor de ácido cítrico (CA), firmeza (FIRM), teor de compostos fenólicos totais (TPC), capacidade antioxidante (DPPH), peroxidação de lipídios (LP), teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), atividade da SOD (SOD), atividade da CAT (CAT), atividade da POD (POD), teores de açúcares solúveis totais (TSS), teores de açúcares redutores (RS), teores de Amido (STA), taxa de respiração (RESP), teor de etileno (ET).

1.4 DISCUSSÃO

O controle biológico surgiu como uma alternativa eficaz para combater grandes perdas pós-colheita de frutos através do tratamento pré-colheita. A aplicação pré-colheita de *Bacillus subtilis*, como agente de biocontrole, é evidenciada como uma estratégia para melhorar o rendimento e a qualidade dos frutos/vegetais, a fim de produzir um suprimento de alimentos estável e lucrativo (Bu et al., 2021; Punja et al., 2019). A eficácia de *B. subtilis* na produção de frutos com alta qualidade pode ser devido à melhoria da fitossanidade, resultante de aumento no suprimento de elementos nutricionais (Chávez et al., 2019).

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a aplicação do biofungicida à base de *B. subtilis* intensifica os parâmetros qualitativos dos frutos de tomate através da manutenção físico-química, integridade da membrana celular, ativação do sistema antioxidante e incremento dos compostos bioativos.

Por ser um fruto climatérico, durante o período pós-colheita, o amadurecimento do tomate pode provocar uma série de transformações físico-químicas que são caracterizadas por alterações fisiológicas e bioquímicas no fruto, como: mudança de cor, firmeza, aparência, teor de sólidos solúveis, pH e acidez titulável entre outros (Li et al., 2019). Logo, estes parâmetros são grandes indicadores quando se trata da qualidade dos frutos.

O pH dos frutos do tomate pode decrescer significativamente nos primeiros sinais de maturação e está relacionado com a perda de acidez dos frutos e sua capacidade de sintetizar ácidos orgânicos (Ferreira et al., 2004); contudo, neste estudo os tratamentos aplicados não influenciaram nesse índice, possivelmente porque todos os frutos se encontravam em estágio verde-maduro.

A acidez titulável (AT) é um indicador fundamental da qualidade dos frutos de tomate, exercendo influência direta sobre sua adstringência e sabor. Dado que a AT é determinada pela composição genética do fruto, seus níveis podem variar consideravelmente (Chitarra; Chitarra, 2005; Nascimento et al., 2013). Estudos anteriores, conduzidos por Castro et al. (2005), indicaram que frutos de tomate geralmente apresentam leve aumento na AT após a colheita, seguido por redução durante o armazenamento prolongado. Esse declínio subsequente na AT pode ser atribuído a uma maior taxa de respiração conforme os frutos amadurecem. Durante o processo respiratório, os ácidos orgânicos nos frutos servem como substrato (Lurie;

Klein, 1990), explicando assim, as taxas respiratórias mais elevadas registradas. No entanto, apesar das taxas respiratórias mais elevadas, a presença de *B. subtilis* nos frutos de tomate no início do período pós-colheita pode ter desempenhado papel na desaceleração da hidrólise dos ácidos orgânicos, como observado neste estudo e confirmado por Ruiz-Cisneros et al. (2020) que identificaram que a acidez titulável foi mais elevada nos frutos das plantas tratadas com as três cepas de *Bacillus* em comparação com os controles. Esse aumento pode indicar desaceleração nas reações bioquímicas, no uso de substratos e na alocação de energia para atividades metabólicas, o que pode prolongar o tempo de conservação desses frutos (Taiz; Zeiger, 2018).

Assim como a acidez titulável (AT), o teor de sólidos solúveis (SS) também influencia na qualidade do sabor dos frutos e é considerado indicador do amadurecimento, bem como da quantidade de minerais solúveis e açúcares presentes nos alimentos frescos (Al-Dairi et al., 2021). No caso dos tomates, os valores médios de SS são geralmente em torno de 4,5 °Brix. Valores menores de SS indicam perda de qualidade, sendo desejáveis valores mais elevados para melhores rendimentos. Em estudos realizados por Dudás et al. (2017) e Katsenios et al. (2021), foi destacado que o uso de produtos de controle biológico de plantas (BPCP), especificamente *Bacillus subtilis*, aumentou os teores de sólidos solúveis em frutos de tomate. Esses resultados indicam que a aplicação de *B. subtilis* pode melhorar a qualidade dos tomates ao aumentar os teores de sólidos solúveis. Além disso, em estudo realizado por Efthimiadou et al. (2020) observou que o tratamento com *B. subtilis* também aumentou o teor de sólidos solúveis em sementes de milho, reforçando a eficácia desse micro-organismo na melhoria da qualidade dos produtos agrícolas.

O sabor de qualquer produto fresco é obtido através da relação entre o SS e AT (*ratio*), que é a presença de concentrações adequadas de açúcares solúveis e ácidos orgânicos e pode afetar diretamente a qualidade dos alimentos. Além disso, alterações nessa relação podem estar relacionadas com a atividade respiratória dos frutos (Al-Dairi et al., 2021). No presente estudo, embora algumas doses do biofungicida à base de *B. subtilis* tenham reduzido essa variável, os valores da razão SS/AT permaneceram acima de 10, conforme estipulado por Kader et al. (1978), o que é considerado um bom indicador de qualidade. Mesmo com níveis mais elevados de AT, a qualidade dos frutos não foi comprometida. Por outro lado, este resultado sugere que o *B. subtilis* pode estar retardando o amadurecimento dos frutos, uma vez

que valores maiores de SS/AT são típicos de frutos maduros, que naturalmente tendem a reduzir os teores AT e elevam os teores de SS e, conseqüentemente, diminui o tempo de prateleira desses produtos (Mohammed et al., 1999).

Semelhante à AT e SS, os teores de ácidos ascórbico (AA) e cítrico (AC) apresentaram aumento progressivo em função das doses. O teor de ácido ascórbico (AA) é a forma predominante de vitamina C nos frutos, sendo um nutriente extremamente sensível e comumente utilizado como indicador sensorial e de qualidade (Babu et al., 2015). Além disso, outras funções podem ser estabelecidas para o ácido ascórbico, como a influência na expansão e divisão celular, atuação como cofator de enzimas como a oxidase do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, que está envolvida na rota de síntese do etileno (Foyer et al., 2020). Dos ácidos orgânicos presentes no tomate, o AC é dominante e de forma semelhante aos açúcares diminui durante o período pós-colheita, contudo, a presença de ácido cítrico pode promover redução na contaminação microbiana além de prevenir o escurecimento e manter a qualidade dos vegetais frescos, aumentando seu prazo de validade (Liu et al., 2016). O aumento dos teores de AA e AC obtidos nesse estudo, aliados ao potencial de controle biológico do *B. subtilis*, pode resultar em maior vida útil desses frutos, sobretudo, nas doses entre 4 e 6 L ha⁻¹ do biofungicida testado.

Os compostos fenólicos totais (CFT) desempenham papel essencial na resistência e defesa das plantas contra fitopatógenos, que estão intimamente ligados a espécies reativas de oxigênio (ERO) e contribuem para a qualidade dos frutos de tomate, pois estão envolvidos na cor, sabor e aroma dos frutos (Mahboubi et al., 2014). Assim como investigado neste estudo, Chandrasekaran et al. (2019) também constataram que frutos de tomate tratados com *B. subtilis* apresentam maior quantidade de CFT. De acordo com Ruiz-Cisneros (2022), a presença de *Bacillus* ou outros micro-organismos não patogênicos podem contribuir expressivamente para a síntese de CFT por sua influência no crescimento vegetal.

Licopeno, ácido ascórbico, diversos ácidos fenólicos e os flavonoides são responsáveis pela capacidade antioxidante (DPPH) dos frutos, sendo esta constituída, principalmente, por compostos fenólicos (Vega-López et al., 2022). Considerando que os polifenóis são capazes de eliminar os radicais livres e são os principais compostos bioativos da planta com atividade antioxidante, quanto maior o DPPH do fruto, maior será a taxa de eliminação do radical livre e melhor é a sua qualidade, visto que, o

acúmulo de radicais livres durante o período pós-colheita pode gerar danos nos tecidos e envelhecimento de órgãos (Jin et al., 2022).

Durante o período pós-colheita, os frutos tendem a aumentar a produção de ERO em função do amadurecimento, que pode refletir numa vida útil mais curta (Meitha et al., 2020). O excesso de ERO ataca e danifica os tecidos celulares, exacerbando a peroxidação da membrana plasmática e levando a danos no sistema de membrana celular (Ma et al., 2022). Em função da eliminação de radicais livres por diversos compostos bioativos endógenos presentes nos frutos, notamos que a atividade dos sistemas antioxidantes para extinguir as ERO é inversamente proporcional aos níveis de peroxidação lipídica (PL) (Suzuki; Mittler, 2006). A PL pode ser indicada pela medição do conteúdo de malondialdeído (MDA). Os resultados desta pesquisa indicam redução dos níveis de MDA em frutos de tomate sob aplicação do biofungicida testado, indicando que *B. subtilis* pode retardar a deterioração dos frutos de tomate. As alterações nos níveis de PL em um tecido podem ser indicadores da integridade estrutural da membrana celular. Logo, redução no nível de MDA indica prevenção do dano oxidativo, proteção dos componentes da membrana e manutenção da sua funcionalidade (El-Gendi et al., 2022; Imahori et al., 2016).

Por outro lado, o conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) aumentou na presença de *B. subtilis*. Dentro das ERO amplamente analisadas nos tecidos vegetais, o H_2O_2 é uma delas, sendo comumente produzido em células em condições normais ou sob estresse (Sharma et al., 2012). O H_2O_2 pode facilmente atravessar a membrana e causar danos oxidativos longe do seu local de origem, entretanto, a depender da concentração pode ser considerado uma molécula de sinalização intracelular (Affandi et al., 2021). Conforme mencionado anteriormente, nos processos pós-colheita, processos de oxidação e dano de membrana estão associados ao excesso de ERO e o aumento no teor de H_2O_2 já foi observado em vários frutos durante o amadurecimento e senescência (Guo et al., 2020; Qin et al., 2009; Ren et al., 2016). No entanto, neste estudo, o teor de H_2O_2 não influenciou no dano de membrana e a capacidade do sistema antioxidante dos frutos, portanto, o seu aumento, possivelmente, pode estar relacionando à sinalização do início do amadurecimento e/ou indução de estresse mecânico (Polychroniadou et al., 2022; Torun; Uluisik, 2022), causado pela aplicação do biofungicida com *B. subtilis*.

Assim como os compostos bioativos (flavonoides, compostos fenólicos totais, ácidos orgânicos) outros parâmetros também compõem o sistema antioxidante dos

vegetais, como a bateria de enzimas antioxidantes das quais fazem parte as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD), que interferem na concentração de ERO presente na célula (Buatista-Rosales et al., 2022). A SOD é uma enzima que protege contra danos oxidativos, representando a linha primária de resistência do sistema antioxidante, a qual realiza a quebra do radical superóxido em H_2O_2 , enquanto as enzimas CAT e POD agem sinergicamente para desintegrar H_2O_2 em água e oxigênio promovendo a desintoxicação celular (Tan et al., 2020).

Apesar do aumento da atividade das enzimas CAT e POD, responsáveis pela remoção do H_2O_2 , os níveis desse composto foram elevados nos frutos tratados com *B. subtilis*. Contudo, a peroxidação lipídica foi reduzida nesses frutos, isto pode ser atribuído à capacidade do micro-organismo *B. subtilis* de modular a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Esta habilidade pode ser interpretada como uma adaptação eficaz contra o excesso de H_2O_2 , conforme indicado por Padró et al. (2021).

Conforme dito anteriormente o fato de os níveis de H_2O_2 não diminuírem, mesmo com alta atividade das enzimas CAT e POD, pode ser explicado por vários fatores relacionados à dinâmica celular e ao papel do H_2O_2 na fisiologia das plantas. Primeiro, a produção de H_2O_2 em diferentes organelas celulares (mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos) pode ser elevada, especialmente sob condições de estresse, como no período pós-colheita, durante o amadurecimento e senescência, que envolve processos de oxidação, dano de membrana e excesso de ERO. Se a taxa de produção de H_2O_2 exceder a capacidade das enzimas antioxidantes CAT e POD para degradá-lo, os níveis de H_2O_2 permanecerão elevados (Hasanuzzaman et al., 2021). Além disso, o H_2O_2 atua como uma molécula de sinalização importante nas plantas, regulando processos como a resposta aos estresses bióticos e abióticos, a transdução de sinais hormonais e a defesa contra patógenos. As plantas podem manter níveis elevados de H_2O_2 para facilitar essas funções de sinalização (Affandi et al., 2021).

A compartimentalização celular também é um fator relevante, onde o H_2O_2 pode ser produzido em uma organela específica e ter sua degradação regulada em outra. As enzimas CAT e POD, embora eficientes na decomposição do H_2O_2 , podem ter sua atividade limitada por fatores como disponibilidade de substratos e cofatores e localização específica dentro da célula (Ramasarma, 1990). A atividade de CAT é predominantemente nos peroxissomos, enquanto a POD pode estar distribuída em várias partes da célula (Kesawat et al., 2023). A manutenção de níveis elevados de H_2O_2 pode ser uma resposta adaptativa desses frutos, induzindo a expressão de

genes de defesa e a ativação de outras enzimas antioxidantes (Davies, 2000). Assim, o equilíbrio entre produção e degradação de H_2O_2 é dinâmico e complexo, explicando por que seus níveis permanecem elevados, mesmo com alta atividade de CAT e POD. Portanto, a aplicação de *B. subtilis* em frutos de tomate, como observado, pode estar relacionada à via de sinalização de H_2O_2 no início do amadurecimento e/ou à indução de estresse mecânico, sem necessariamente causar danos oxidativos irreparáveis.

Muitos frutos são colhidos no estágio inicial de maturação e condicionados a atingir estágio comestível durante o período pós-colheita. Na qualidade pós-colheita os açúcares atuam como substâncias energéticas e moléculas de sinalização, regulando o grau de doçura dos frutos e vários processos fisiológicos, que vão desde o amadurecimento até a senescência (Li et al., 2021). No decorrer do amadurecimento há declínio da textura e acúmulo dos açúcares, afetando diretamente sua qualidade e vida de prateleira, devido à relação direta com os componentes químicos ligados à parede celular (Cui et al., 2019). Neste estudo a firmeza e os teores de açúcares solúveis totais dos frutos de tomate permaneceram inalterados pelas doses de *B. subtilis*, isto sugere que a aplicação de *B. subtilis* não compromete a integridade estrutural dos frutos e nem afeta negativamente o conteúdo de açúcares solúveis.

Os teores de açúcares redutores (AR), constituídos dos monossacarídeos glicose e frutose, acumulam com o amadurecimento dos frutos, enquanto o conteúdo de amido é reduzido ao longo da maturação com crescente conversão em açúcares simples, elevando os teores de açúcares totais (Gao et al., 2019). Neste estudo, os frutos tratados com *B. subtilis* apresentaram menor conteúdo de açúcares redutores com a aplicação de 6 L ha^{-1} do biofungicida e maior conteúdo de amido até a dose de $3,67 \text{ L ha}^{-1}$, em relação ao controle, evidenciando ação benéfica do produto utilizado na qualidade pós-colheita dos frutos de tomate. De fato, o alto teor de amido e o menor de açúcares redutores em tomate sinaliza a qualidade pós-colheita dos frutos e maior vida de prateleira (Li et al., 2021).

Todavia, o processo respiratório é o principal responsável pela degradação de açúcares acumulados durante o crescimento do fruto, em virtude do consumo de reservas como o amido. Por ser um fruto climatérico, o tomate geralmente é usado como modelo para estudar o metabolismo pós-colheita. Durante o amadurecimento, esses frutos apresentam pico de produção de etileno, acompanhado pelo aumento da taxa respiratória (Gamrasni et al., 2020). Contudo, o teor de etileno dos tomates não foi afetado pelos tratamentos testados, enquanto a taxa respiratória aumentou.

Em contrapartida a aplicação de *B. subtilis* melhorou a vida pós-colheita dos frutos de tomates mesmo sem influenciar a síntese de etileno e aumentar a taxa respiratória, provavelmente por aperfeiçoar a defesa antioxidante dos frutos. A aplicação de *B. subtilis* promoveu o acúmulo de compostos bioativos e antioxidantes, como ácidos ascórbico e fenólicos, que neutralizam as espécies reativas de oxigênio (ERO), reduzindo danos celulares. Também elevou as atividades das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, POD), mantendo a integridade das membranas celulares e reduzindo a peroxidação lipídica. Membranas mais intactas resultam em menor perda de água e nutrientes e melhor resistência contra patógenos.

Além disso, o uso de *B. subtilis* ajudou a manter os teores de açúcares solúveis e ácidos orgânicos, melhorando a qualidade sensorial e nutricional dos frutos. A relação entre açúcares solúveis e acidez titulável (SS/AT) permaneceu dentro dos padrões desejáveis, resultando em frutos com sabor mais equilibrado. O aumento do teor de amido e manutenção dos níveis adequados de açúcares redutores retardou o amadurecimento e a senescência, contribuindo para uma vida útil mais longa. Adicionalmente, o aumento dos níveis de H_2O_2 pode atuar como uma molécula de sinalização que ativa mecanismos de defesa e adaptação dos frutos ao amadurecimento.

Em síntese, *B. subtilis* teve um impacto positivo nas características físico-químicas dos frutos de tomate ao aprimorar a defesa antioxidante e manter a integridade celular. Consequentemente, pode fornecer proteção contra estresses bióticos, sendo um agente de biocontrole, aumentando a resistência contra patógenos, embora isso não seja o foco deste estudo. Esses fatores compensam o aumento da taxa respiratória e a ausência de influência direta na síntese de etileno, contribuindo para a obtenção de frutos de tomate com melhor qualidade e maior durabilidade.

1.5 CONCLUSÃO

A utilização do biofungicida à base de *B. subtilis* em pré-colheita, sobretudo, nas doses de 4 e 6 L ha⁻¹, melhora as características físico-químicas e qualitativas da qualidade pós-colheita de frutos de tomate, pela regulação do metabolismo fisiológico dos frutos ao potencializar o sistema antioxidante, preservar a integridade do tecido vegetal e acréscimos nos teores de sólidos solúveis, acidez titulável, ácido ascórbico,

ácido cítrico, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, indicando a viabilidade desta abordagem para melhorar a qualidade do período pós-colheita dos frutos de tomate.

REFERÊNCIAS

- Affandi FY, Verschoor JA, Paillart MJM, Verdonk JC, Woltering EJ, Schouten RE (2021) Low Oxygen Storage Improves Tomato Postharvest Cold Tolerance, Especially for Tomatoes Cultivated with Far-Red LED Light. *Foods*. 10(8):1699. <https://doi.org/10.3390/foods10081699>
- Al-Dairi M, Pathare PB, Al-Yahyai R (2021) Effect of Postharvest Transport and Storage on Color and Firmness Quality of Tomato. *Horticulturae*. 7(7):1-15. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7070163>.
- Alexiava V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ*. 24(12):1337–1344. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>.
- Babu I, Ali MA, Shamim F, Yasmin Z, Asghar M, Khan AR (2015) Effect of calcium chloride treatments on quality characteristics of loquat fruit during storage. *Int. J. Adv. Res*. 3:602–610.
- Barbosa JC, Maldonado JW (2015) *AgroEstat—Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos*; FCAV/UNESP: Jaboticabal, Brazil.
- Bautista-Rosales PU, Ochoa-Jiménez VA, Casas-Junco PP, Balous-Morales R, Rubio-Melgarejo A, Díaz-Jassi AE, Berumen-Varela G (2022) *Bacillus mojavensis* enhances the antioxidant defense mechanism of soursop (*Annona muricata* L.) fruits during postharvest storage. *Arch. Microbiol*. 204(9):1-10. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03199-9>.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 7(72):248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT*. 28(1):25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- Brasil (2000) Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº1, de 7 de janeiro de 2000. Complementa padrões de identidade e qualidade para polpas de fruta. Brasília, 18p.
- Brasil (2005) Ministério da Saúde. Agência Nacional de vigilância Sanitária. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Brasília, 1018p.
- Castro LR, Vigneault C, Charles MT, Cortez LA (2005) Effect of cooling delay and

- cold-chain breakage on 'Santa Clara' tomato. J Food Agric. Environ. 3(1):49–54.
- Cawoy H, Bettiol W, Fickers P, Ongena, M (2011) *Bacillus*-based biological control of plant diseases, in Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management, ed Stoytcheva (InTech Academic Press), 273–302.
<https://doi.org/10.5772/17184>.
- Chandrasekaran M, Chun SC, Oh JW, Paramasivan M, Saini RK, Sahayarayan JJ (2019) *Bacillus subtilis* CBR05 for Tomato (*Solanum lycopersicum*) Fruits in South Korea as a Novel Plant Probiotic Bacterium (PPB): Implications from Total Phenolics, Flavonoids, and Carotenoids Content for Fruit Quality. Agronomy. 9(12):1-12. <https://doi.org/10.3390/agronomy9120838>.
- Chitarra MIF (1998) Fisiologia e qualidade de produtos vegetais. In: BOREN, F.M. (Ed.). Armazenamento e processamento de produtos agrícolas Lavras: Ufla/SBEA, pp.1-57.
- Chitarra MIF, Chitarra AB (2005) Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2ª. ed. Lavras: UFLA, 783p.
- Choy TK, Quattrone JR, Elefant M (1963) Non-aqueous spectrophotometric determination of citric acid. Anal. Chim. Acta. 29:114-119.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88590-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88590-6).
- Collins EJ, Bowyer C, Tsouza A, Chopra M (2022) Tomatoes: An Extensive Review of the Associated Health Impacts of Tomatoes and Factors That Can Affect Their Cultivation. Biology. 1(2):11-44. <https://doi.org/10.3390/biology11020239>.
- Davies KJA (2000) Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. IUBMB Life. 50:279–289.
- Dudás A, Szalai ZM, Vidéki E, Wass-Matics H, Kocsis T, Végvári Gy, Kotroczó Zs, Biró B (2017) Sporeforming bacillus bioeffectors for healthier fruit quality of tomato in pots and field. Appl. Ecol. Environ. Res. 15:1399–1418. https://doi.org/10.15666/aeer/1504_13991418
- Efthimiadou A, Katsenios N, Chanioti S, Giannoglou M, Djordjevic N, Katsaros G (2020) Effect of Foliar and Soil Application of Plant Growth Promoting Bacteria on Growth, Physiology, Yield and Seed Quality of Maize under Mediterranean Conditions. Sci. Rep. 10:21060. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78034-6>
- El-Gendi H, Al-Askar AA, Király L, Samy MA, Moawad H, Abdelkhalek A (2022) Foliar Applications of *Bacillus subtilis* HA1 Culture Filtrate Enhance Tomato Growth and Induce Systemic Resistance against *Tobacco mosaic virus* Infection.

- Horticulturae. 8(4):1-21. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8040301>.
- Ferreira MD, Franco ATO, Nogueira MFM, Almeida RVC, Tavares M (2004) Avaliação da Etapa da Colheita em Tomates de Mesa cv. Débora. Braz. J. Food Technol. 7:173-178.
- Foyer CH, Kyndt T, Hancock RD (2020) Vitamin C in plants: novel concepts, new perspectives and outstanding issues. Antioxid. Redox Signal. 32(7):1-70. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7819>.
- Gamrasni D, Feldmesser E, Ben-Arie R, Raz A, Asiag AT, Glikman M, Aharoni A, Goldway M (2020) Gene Expression in 1- ethylcyclopropene (1-MCP) Treated Tomatoes during Pre-Climacteric Ripening Suggests Shared Regulation of Methionine Biosynthesis, Ethylene Production and Respiration. Agronomy. 10(11):1-15. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111669>.
- Gao YM, Tian P, Li J, Cao YN, Xu WR, Li JS (2019) Transcriptional changes during tomato ripening and influence of brackish water irrigation on fruit transcriptome and sugar content. Plant Physiol. Biochem. 145:21–33. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.10.025>.
- Giannopolitis CN, Reis SK (1997) Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol. 59(2):309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>.
- Guo DL, Wang ZG, Pei MS, Guo LL, Yu YH (2020) Transcriptome analysis reveals mechanism of early ripening in Kyoho grape with hydrogen peroxide treatment. BMC Genom. 21(784):1-18. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07180-y>.
- Hasanuzzaman M, Raihan MRH, Masud AAC, Rahman K, Nowroz F, Rahman M, Nahar K, Fujita M (2021) Regulation of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Salinity. Int. J. Mol. Sci. 22(17):9326. <https://doi.org/10.3390/ijms22179326>
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125(1):189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1).
- Kader AA, Morris LL, Stevens, MA, Albright-Holton M (1978) Composition and flavor quality of fresh market tomatoes as influenced by some postharvest handling procedures. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 103(1):6-13, 1978.
- Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiol. 57(2):315-319. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315>.

- Katsenios N, Andreou V, Sparangis P, Djordjevic N, Giannoglou M, Chanioti S, Stergiou P, Xanthou MZ, Kakabouki I, Vlachakis D, Djordjevic S, Katsaros G, Efthimiadou A (2021) Evaluation of Plant Growth Promoting Bacteria Strains on Growth, Yield and Quality of Industrial Tomato. *Microorganisms*. 9(10):2099. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102099>
- Kesawat MS, Satheesh N, Kherawat BS, Kumar A, Kim HU, Chung SM, Kumar M (2023) Regulation of Reactive Oxygen Species during Salt Stress in Plants and Their Crosstalk with Other Signaling Molecules-Current Perspectives and Future Directions. *Plants (Basel)* 12(4):864. <https://doi.org/10.3390/plants12040864>
- Lahlali R, Ezrari S, Radouane N, Kenfaoui J, Esmael Q, El Hamss H, Belabess Z, Barka EA (2022) Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. *Microorganisms*. 10(3):1-33. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>.
- Lastochkina O, Seifikalhor M, Aliniaiefard S, Baymiev A, Pusenkova L, Garipova S, Kulabuhova D, Maksimov I (2019) *Bacillus* Spp.: Efficient Biotic Strategy to Control Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. *Plants*. 8(4):1-24. <https://doi.org/10.3390/plants8040097>
- Li J, Min D, Li Z, Fu X, Zhao X, Wang J, Zhang X, Li F, Guou Y (2022) Regulation of Sugar Metabolism by Methyl Jasmonate to Improve the Postharvest Quality of Tomato Fruit. *J. Plant Growth Regul.* 41:1615-1626. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10415-1>.
- Li S, Chen K, Grierson D (2019) A critical evaluation of the role of ethylene and MADS transcription factors in the network controlling fleshy fruit ripening. *New Phytol.* 221:1724–1741. <https://doi.org/10.1111/nph.15545>
- Liu KD, Liu JX, Li HL, Yuan CC, Zhong JD, Chen Y (2016) Influence of postharvest citric acid and chitosan coating treatment on ripening attributes and expression of cell wall related genes in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) fruit. *Sci. Hortic.* 198:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.008>.
- Lurie S, Klein J (1990) Heat treatment on ripening apples: differential affect on physiology and biochemistry. *Plant Physiol* 78:181–186.
- Ma Q, Xu YQ, Li D, Wu XW, Zhang XC, Chen YP, Li L, Luo ZS (2022) Potential epigenetic regulation of RNA 5'-terminal NAD decapping associated with cellular energy status of postharvest *Fragaria × ananassa* in response to *Botrytis cinerea* invasion. *Postharvest Biol. Technol.* 186:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.111840>.

- Meiramkulova K, Devrishov D, Adylbek Z, Kydyrbekova A, Zhangazin S, Ualiyeva R, Temirbekova A, Adilbektegi G, Mkilima T (2023) The Impact of Various LED Light Spectra on Tomato Preservation. *Sustainability*. 15(2):1-22. <https://doi.org/10.3390/su15021111>.
- Meitha K, Pramesti Y, Suhandono S (2020) Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Postharvest Vegetables and Fruits. *Int. J. Food Sci.* 2020:1-11. <https://doi.org/10.1155/2020/8817778>.
- Miller GL (1959) Modified DNS method for reducing sugars. *Anal. Chem.* 31:426-428.
- Mohammed M, Wilson LA, Gomes PL (1999) Postharvest sensory and physiochemical attributes of processing and non-processing tomato cultivar. *J. Food. Qual.* 22:167–182.
- Nascimento AR, Soares Júnior MS, Caliari M, Fernandes PM, Rodrigues JPM, Carvalho WT (2013) Qualidade de tomates de mesa cultivados em sistema orgânico e convencional no estado de Goiás. *Hortic. Bras.* 31(4):628-635. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362013000400020>.
- Padró MDA, Caboni E, Morin KAS, Mercado MAM, Olalde-Portugal V (2021) Effect of *Bacillus subtilis* on antioxidant enzyme activities in tomato grafting. *PeerJ*. 9:1-28. <https://doi.org/10.7717/peerj.10984>.
- Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'Anna R, Mosquim PR, Moreira MA (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 11(3):137-143.
- Polychroniadou C, Michailidis M, Adamakis IDS, Karagiannis E, Ganopoulos I, Tanou I, Bazakos C, Molassiotis A (2022) Mechanical stress elicits kiwifruit ripening changes in gene expression and metabolic status. *Postharvest Biol. Technol.* 194:1-18. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112102>.
- Punja ZK, Rodriguez G, Tirajoh A (2016) Effects of *Bacillus subtilis* strain QST 713 and storage temperatures on post-harvest disease development on greenhouse tomatoes. *Crop Prot.* 84:98-104. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.02.011>.
- Qin G, Meng X, Wang Q, Tian S (2009) Oxidative damage of mitochondrial proteins contributes to fruit senescence: a redox proteomics analysis. *J. Proteome Res.* 8(5):2449–2462. <https://doi.org/10.1021/pr801046m>.
- Ramasarma T Many faces of superoxide dismutase, originally known as erythrocuprein. *Curr. Sci.* 92(2):184–191.
- Ren Y, He J, Liu H, Liu G, Ren X (2016). Nitric oxide alleviates deterioration and

preserves antioxidant properties in 'tainong' mango fruit during ripening. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 58:27–37. <https://doi.org/10.1007/s13580-017-0001-z>.

Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Olivas-Orozco GI, Acosta-Muñiz CH, Salas-Marina MA, Molina-Corral FJ, Berlanga-Reyes DI, Fernández-Pavía SP, Cambero-Campos OJ, Rios-Velasco C (2022). Effect of rhizosphere inoculation with *Bacillus strains* and phytopathogens on the contents of volatiles and human health-related compounds in tomato fruits. *Food Sci. Technol.* 42:1-12. <https://doi.org/10.1590/fst.51120>.

Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Olivas-Orozco GI, Acosta-Muñiz CH, Sepúlveda-Ahumada DR, Zamudio-Flores PB, Berlanga-Reyes DI, Salas-Marina MA, Cambero-Campos OJ, Rios-Velasco C (2020) Effect of *Bacillus strains* alone and in interaction with phytopathogenic fungi on plant growth and tomato fruit quality. *Revista bio ciências* 6:1–17. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e541>

Samaras A, Roumeliotis E, Ntasiou P, Karaoglanidis G (2021) *Bacillus subtilis* MBI600 Promotes Growth of Tomato Plants and Induces Systemic Resistance Contributing to the Control of Soilborne Pathogens. *Plants.* 10(6):1-17. <https://doi.org/10.3390/plants10061113>.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 299:152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).

Sinha SR, Singha A, Faruquee M, Jiku MAS, Rahaman MA, Alam MA, Kader MA (2019) Post-harvest assessment of fruit quality and shelf life of two elite tomato varieties cultivated in Bangladesh. *Bull. Natl. Res. Cent.* 43(185):1-12. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0232-5>.

Sparovek G, Van Lier QDJ, Dourado Neto D (2007) Short Communication Computer assisted Koeppen climate classification: a case study for Brazil. *Int. J. Climatol.* 27:257–266. <https://doi.org/10.1002/joc.1384>.

Suzuki N, Mittler R (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plant.* 126:45–51. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2005.00582.x>.

Taiz L, Zeiger E, *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018. 820 p.

Tan XL, Zhao YT, Shan W, Kuang JF, Lu WJ, Su XG, Tao NG, Lakshmanan P, Chen JY (2020) Melatonin delays leaf senescence of postharvest Chinese flowering cabbage through ROS homeostasis. *Food Res. Int.* 138:1-11.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109790>.

Teisseire H, Guy V (2000) Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). Plant Sci., 153(1):65–72.

[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00257-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00257-5).

Trani PE, Kariya EA, Hanai SM, Anbo RH, Bassetto Júnior OB, Purquerio LFV, Trani AL (2015) Calagem e adubação do tomate de mesa. Campinas: Instituto Agrônômico. (Boletim Técnico IAC, 215).

Tressler DK, Joslyn MA (1961) Fruits and vegetables juice processing technology. Westport: AVI, 1028p.

Vega-López B, Carvajal-Miranda Y, Brenes-Peralta L, Gamboa-Murillo M, Venegas-Padilla J, Rodríguez G, Jiménez-Bonilla P, Álvarez-Valverde V (2022) Phytonutraceutical evaluation of five varieties of tomato (*Solanum lycopersicum*) during ripening and processing. LWT. 164:1-8.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113592>.

Yemm EW, Willis AJ (1954) The estimation of carbohydrates in plants extracts by anthrone. Biochem. J. 57(3):508-514. <https://doi.org/10.1042/bj0570508>

CAPÍTULO 2 – EFEITO DA APLICAÇÃO PRÉ-COLHEITA DE *Bacillus subtilis* NA VIDA ÚTIL DE FRUTOS DE TOMATE ²

Isabelly Cristina da Silva Marques^a, Dayane Mércia Ribeiro Silva^b, Eduardo Santana Aires^a, Francisco Gilvan Borges Ferreira Freitas Júnior^a, Fernanda Nery Vargens^a, Vinicius Alexandre Ávila dos Santos^a, Francisco de Assis de Oliveira^c, Elizabeth Orika Ono^d, João Domingos Rodrigues^d

^a Departamento de Horticultura, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu 18618-000, Brasil; e.aires@unesp.br (E.S.A.); freitas.jr@unesp.br (F.G.B.F.F.J.); fernanda-nery.vargens@unesp.br (F.N.V.); vinicius.alexandre@unesp.br (V.A.A.d.S.)

^b Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Arapiraca 57309-005, Brasil; dayannemercia@hotmail.com (D.M.R.S.)

^c Departamento de Ciências Agrárias e Florestais, Universidade Federal Rural do Semiárido (Ufersa), Mossoró 59625-900, Brasil; thikaoamigao@ufersa.edu.br (F.d.A.d.O.)

^d Departamento de Biodiversidade e Bioestatística, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Botucatu 18618-000, Brasil; elizabeth.o.ono@unesp.br (E.O.O.); joao.domingos@unesp.br (J.D.R.)

Resumo: Os tomates são amplamente consumidos em todo o mundo, mas sua elevada perecibilidade exige métodos de armazenamento seguros para mitigar as perdas pós-colheita. Esta pesquisa teve como objetivo investigar o impacto de um biofungicida à base de *Bacillus subtilis* nas características pós-colheita dos frutos de tomate durante o armazenamento. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com 4 blocos e parcelas subdivididas. As parcelas principais incluíram três doses de biofungicida à base de *B. subtilis* (0, 4 e 6 L ha⁻¹) aplicadas em pré-colheita, e as subparcelas corresponderam ao tempo de armazenamento dos frutos (0, 4, 8 e 12 dias). A aplicação pré-colheita de *B. subtilis* na dose de 6 L ha⁻¹ modulou efetivamente a atividade de várias enzimas: fenilalanina amônia-liase que aumentou em até 52%, polifenoloxidase até 75%, superóxido dismutase 1,2 vezes, catalase 2,6 vezes e peroxidase 3,6 vezes, em comparação com o controle. Além disso, essa dose reduziu os danos à membrana em até 30% e reduziu a atividade das enzimas pectinolíticas em até 27%. Esses efeitos resultaram na manutenção dos níveis de compostos fenólicos, aumento da capacidade antioxidante em até 69% e maior

² Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico Scientia Horticulturae.

firmeza dos frutos em 21%, preservando atributos qualitativos e mitigando a deterioração pós-colheita. Portanto, a aplicação pré-colheita de *B. subtilis* na dose de 6 L ha⁻¹ se mostrou eficaz em minimizar o processo natural de senescência, prolongando a vida útil dos tomates durante o armazenamento.

Palavras-chave: biofungicida; pós-colheita; *shelf-life*; *Solanum lycopersicum*.

Abstract: Tomatoes are widely consumed worldwide, but their high perishability necessitates safe storage methods to mitigate post-harvest losses. This research aimed to investigate the impact of a *Bacillus subtilis*-based biofungicide on the post-harvest characteristics of tomatoes during storage. The experimental design was a randomized block design with 4 blocks and split plots. The main plots included three doses of *B. subtilis*-based biofungicide (0, 4, and 6 L ha⁻¹) applied pre-harvest, and the subplots corresponded to the storage time of the fruits (0, 4, 8, and 12 days). Pre-harvest application of *B. subtilis* at a dose of 6 L ha⁻¹ effectively modulated the activity of several enzymes: phenylalanine ammonia-lyase increased by up to 52%, polyphenol oxidase by up to 75%, superoxide dismutase by 1.2 times, catalase by 2.6 times, and peroxidase by 3.6 times, compared to the control. Additionally, this dose reduced membrane damage by up to 30% and decreased the activity of pectinolytic enzymes by up to 27%. These effects resulted in maintaining phenolic compound levels, increasing antioxidant capacity by up to 69%, and enhancing fruit firmness by 21%, thus preserving qualitative attributes and mitigating post-harvest deterioration. Therefore, pre-harvest application of *B. subtilis* at a dose of 6 L ha⁻¹ proved effective in minimizing the natural senescence process, extending the shelf life of tomatoes during storage.

Keywords: biofungicide; post-harvest; *shelf-life*; *Solanum lycopersicum*.

2.1 INTRODUÇÃO

O tomate é um fruto comercializado mundialmente, sendo grande fonte de nutrientes, vitaminas, carotenoides e polifenóis. É comumente destinado ao mercado *in natura* e colhido em diferentes estádios de maturação, a depender da logística de transporte (Ali et al., 2021).

Por ser fruto climatérico, o tomate apresenta vida útil pós-colheita muito curta, perdendo sua qualidade e capacidade de resistência ao armazenamento em razão de muitos fatores ambientais, tais como altas taxas de respiração e transpiração, ataque de patógenos e senescência (Bu et al., 2021; Khatri et al., 2020).

Após a colheita, os produtos hortícolas são metabolicamente ativos e altamente perecíveis, passando por processos de maturação e senescência, os quais devem ser controlados para prorrogar sua vida de prateleira (Corato, 2020). Deste modo, o manejo inadequado resulta em danos aos atributos nutricionais e qualitativos, provocando perdas ao longo da cadeia de abastecimento, do produtor até o consumidor final (Delgado et al., 2021). No tomate, o processo de maturação incide sobre mudanças de ordem fisiológicas e bioquímicas na cor, sabor, firmeza e compostos aromáticos dos frutos (Wu et al., 2018).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), as perdas de alimentos em função da deterioração pós-colheita somam aproximadamente 33% do que é produzido (Palumbo et al., 2022). Portanto, pesquisas focadas na redução do desperdício de frutos e hortaliças são de suma importância para melhorar a segurança, promover a sustentabilidade e reduzir os custos de produção.

Durante o manuseio pós-colheita ideal, várias técnicas podem ser empregadas como gerenciamento da temperatura, umidade, embalagens e uso de produtos químicos que podem auxiliar a retardar os processos fisiológicos da maturação e senescência, assim como, restringir o crescimento microbiano (Ali et al., 2018; Palumbo et al., 2022). Tradicionalmente, o manejo pós-colheita é feito pela aplicação de fungicidas, entretanto, questões ambientais e de saúde, assim como, resistência microbiana, requerem o desenvolvimento de estratégias que possam reverter esse quadro; dessa forma, a aplicação de agentes de biocontrole tem sido alternativa ao uso de produtos sintéticos (Bazioli et al., 2019).

Estudo realizado por Gutter e Littauer (1953) relatou pela primeira vez o uso de *Bacillus subtilis* capaz de combater o ataque de patógenos em frutos cítricos e reduzir a decomposição pós-colheita, devido à capacidade de biocontrole de micro-organismos, o que atraiu atenção para esse protagonista.

O *B. subtilis* é considerado umas das rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), pertencente ao gênero *Bacillus* e pode ser encontrado em vários habitats (Souza et al., 2015). Originalmente, as BPCP foram associadas apenas ao

crescimento radicular, mas há evidências que essas bactérias podem funcionar como biofertilizantes ou agentes de biocontrole ao promover o crescimento de plantas, aumentar seu rendimento e melhorar respostas fisiológicas a condições ambientais adversas (Gouda et al., 2018; Hashem et al., 2019; Samaras et al., 2021; Tejera-Hernández et al., 2013).

Descobertas recentes revelaram que seu uso como agente de biocontrole pode melhorar a conservação pós-colheita de frutos de tomate, através da preservação das características organolépticas (cor, sabor, textura) e modulação de reações bioquímicas, minimizando o ataque de patógenos (Bu et al., 2021; Chandrasekaran et al., 2019; Padró et al., 2021). Contudo, estudos que avaliem a sua influência em processos fisiológicos e bioquímicos de pós-colheita de frutos sadios ainda são escassos, o que gera maior interesse no possível envolvimento dessas bactérias na conservação natural de produtos agrícolas.

Considerando a capacidade de micro-organismos em influenciar o desenvolvimento das plantas, a hipótese desta pesquisa é que a aplicação de biofungicida à base de *B. subtilis*, influencia positivamente nas reações enzimáticas e nas características físico-químicas de frutos de tomate, promovendo redução na deterioração dos frutos e aumentando a qualidade pós-colheita. Para responder à hipótese levantada, o presente estudo foi realizado com o objetivo de investigar o efeito de *B. subtilis* aplicado em pré-colheita na qualidade de frutos de tomate armazenados em temperatura ambiente.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Área experimental

O experimento foi conduzido em campo, na cidade de Mogi Guaçu - SP, com as seguintes coordenadas geográficas: 22°22'15" S de latitude, 46°56'38" W de longitude e altitude de 638 m. O clima da região é do tipo Cwa: clima mesotérmico com inverno seco, com temperatura média de 18 °C nos meses mais frios e 22 °C nos meses mais quentes e precipitação média de 1400 mm (Sparovek et al., 2007).

2.2.2 Material vegetal e condições de cultivo

O híbrido de tomate utilizado na pesquisa foi STVE4466 da Seminis®. As mudas de tomate foram transplantadas em espaçamento de plantio de 1,2 m de largura e 4,5 m de comprimento, contendo 26 plantas por parcela, com 2 linhas de plantio e

espaçamento de 75 cm entre linhas e 35 cm entre plantas. Nas linhas de plantio foram instalados mourões para que as plantas de tomate fossem conduzidas através de tutoramento vertical com auxílio de fitilho à medida que cresciam. As capinas e o controle fitossanitário foram realizados sempre que necessário.

O solo foi classificado como Latossolo Vermelho Arenoso apresentando as seguintes propriedades químicas: pH (CaCl₂)= 5,1; M.O= 23,0 g dm⁻³; P(resina)= 29,0 mg dm⁻³; H⁺+Al³⁺= 28,0 mmol_c dm⁻³; K⁺= 2,5 mmol_c dm⁻³; Ca²⁺= 22,0 mmol_c dm⁻³; Mg²⁺= 10 mmol_c dm⁻³; CTC= 62,7 mmol_c dm⁻³ e V= 55%. A adubação e correção do solo foi realizada de acordo com a análise e recomendações para a cultura do tomateiro (Trani et al. 2015). O sistema de irrigação foi conduzido por gotejamento em estação de controle com sistema de tubos de polietileno flexível e uma linha de gotejadores para cada linha de plantio.

2.2.3 Delineamento experimental e aplicação foliar

O delineamento experimental adotado foi blocos casualizados, com 4 blocos, em parcelas subdivididas, considerando como parcela principal três doses de biofungicida à base de *Bacillus subtilis*: T1 – (Controle – sem aplicação do biofungicida), T2 – 4,0 L ha⁻¹ e T3 – 6,0 L ha⁻¹ aplicadas em pré-colheita (via foliar) e as subparcelas correspondente aos dias de armazenamento dos frutos (0, 4, 8 e 12 dias).

A aplicação de *B. subtilis* foi realizada através do produto comercial Serenade® (Bayer S.A) que é um biofungicida e tem como fonte o agente biológico *Bacillus subtilis* QST713, à concentração de 13,68 g L⁻¹ (1,37% - 10⁹ UFC g⁻¹) do ingrediente ativo e formulação em suspensão concentrada.

O protocolo de aplicação envolveu quatro aplicações prévias à colheita, sendo realizadas de forma semanal, aos 21, 14, 7 e 1 dia antes da colheita. O processo ocorreu das 8:00 às 10h, utilizando pulverizador pressurizado de operação de trabalho de 2,5 kgf cm⁻², com bico tipo 110.01, espaçamento dos bicos de 40 cm, largura da barra de 1,2 m e altura da barra de 40 cm. As aplicações iniciaram no estágio fenológico de desenvolvimento dos frutos, os quais foram previamente identificados ao longo das pulverizações, visando a uniformidade dos frutos até a colheita.

2.2.4 Colheita e armazenamento

Os frutos foram colhidos em julho de 2021 quando apresentavam estágio “de vez” com 30 a 50% de coloração vermelha e transportados para o Departamento de

Horticultura da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), na Universidade Estadual Paulista (UNESP), em Botucatu - SP (22°51'01" LS e 48°25'55" LW e 786 m de altitude).

Na recepção, os frutos foram previamente higienizados para retirada de resíduos da colheita, como galhos, caules, insetos e solo. Posteriormente, todos os lotes foram acondicionados em bandejas retangulares de poliestireno e colocados em bancadas à temperatura ambiente (20°C) e umidade relativa média de 41%, permanecendo dessa forma ao longo do tempo de avaliação, sendo que a cada quatro dias os frutos eram retirados aleatoriamente e destinados às diferentes análises bioquímicas, físico-químicas e qualitativas.

2.2.5 Variáveis bioquímicas

Os frutos foram previamente identificados, imersos e macerados em nitrogênio líquido para completa paralização de reações enzimáticas e mantidos em ultra freezer à -80 °C até a realização das seguintes análises: atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenoloxidase (PPO), teor de compostos fenólicos totais (CFT), capacidade antioxidante (DPPH), peroxidação de lipídios (PL), teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT e peroxidase - POD), teor de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e amido e atividade das enzimas pectinolíticas (pectinametilesterase – PME e poligalacturonase – PG). Todo o processo de pesagem do material foi realizado com tubos e pinças pré-resfriados para evitar o descongelamento das amostras.

A extração enzimática, para mensurar a atividade da enzima PAL, foi realizada a partir de 0,1 g da polpa do fruto de tomate homogeneizado em almofariz gelado com 10 mL de solução tampão borato de sódio 0,1 M (pH 8,8). A amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para medir a atividade da PAL, estimada a partir da reação de 1,0 mL de tampão borato de sódio a 0,2 M e 1,0 mL de fenilalanina. A atividade da enzima foi expressa em mmol min⁻¹ g⁻¹ de massa fresca (Peixoto et al., 1999).

A extração para a determinação da atividade da enzima PPO foi realizada a partir de 0,5 g da polpa de fruto de tomate homogeneizado em almofariz gelado com 5 mL de solução tampão com pH 6,7, e centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para medir a atividade da PPO a partir da reação em tubo

de ensaio contendo catecol a 0,1 M e os resultados expressos em $\mu\text{mol catecol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de massa fresca (Kar; Mishra, 1976).

A concentração dos CFT dos frutos foi determinada pelo método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999), com a utilização de espectrofotômetro UV-visível. Os resultados foram expressos em μg de ácido gálico. g^{-1} de amostra.

O DPPH foi determinado de acordo com a metodologia de Brand-Williams et al. (1995), onde a solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi inicialmente preparada em metanol 80% (10 mg em 50 mL). Após a pesagem, as amostras foram extraídas em 10 mL de metanol (80%) e permaneceram por 15 minutos em banho ultrassom, na sequência foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos sob temperatura de 5 °C. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e armazenadas em ambiente protegido da luz por 1 hora, para posterior leitura em UV-visível e os resultados expressos %DPPH reduzido.

Para a determinação da PL foram utilizados 300 mg de material fresco congelado em 5 mL de solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,25% e ácido tricloroacético (TCA) a 10%. A solução extraída foi incubada em banho-maria a 90°C por 60 minutos. Após o resfriamento, a solução foi centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos, à temperatura ambiente (25°C). O sobrenadante coletado de cada amostra foi submetido à leitura de absorbância em espectrofotômetro a 560 e 600 nm. Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar do malondialdeído ($155 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), cujos resultados são expressos em nmol g^{-1} de massa fresca (Heath; Packer, 1968).

O teor de H_2O_2 foi medido utilizando 0,1 g de amostras maceradas e congeladas em nitrogênio líquido com adição de 1 mL de TCA a 0,1%. Em seguida, o concentrado foi centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. A reação iniciou-se com a adição de 0,5 mL de extrato, 0,5mL de tampão fosfato 0,1 M de pH 7,0 e 2,0 mL de iodeto de potássio a 1M. O conteúdo foi incubado no escuro por uma hora e a leitura das amostras em espectrofotômetro foi realizada a 390 nm. Calculou-se a concentração de peróxido de hidrogênio nas amostras através de curva padrão de peróxido de hidrogênio, cujos resultados foram expressos em $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$ de massa fresca (Alexiava et al., 2001).

A atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e POD) foi avaliada de acordo com metodologia proposta por Kar e Misha (1976), onde foi adicionado 5 mL de

solução tampão fosfato de potássio refrigerado (0,1 M – pH 6,7) e 1% de polivinilpolipirrolidona para obtenção do extrato (sobrenadante) centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Para determinar a atividade específica de enzimas antioxidantes, a quantificação de proteínas solúveis totais de cada extrato enzimático foi previamente realizada de acordo com Bradford (1976).

A atividade da enzima SOD foi obtida através da capacidade da enzima para inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), segundo metodologia proposta por Giannopolitis e Ries (1977). Uma unidade de atividade SOD foi definida como a quantidade necessária de enzima para inibir a fotoredução de NBT em 50% sob condições de ensaio, expressa em U mg⁻¹ de proteína.

Para determinar a atividade da enzima CAT utilizou-se metodologia proposta por Peixoto et al. (1999). Portanto, as leituras foram realizadas a cada 20 segundos durante 80 segundos, em 240 nm, na qual foi monitorado o consumo de peróxido via espectrofotômetro. A variação de absorção foi calculada utilizando coeficiente molar de 39,4 mM⁻¹ cm⁻¹ e os resultados foram expressos em mmol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da enzima POD foi quantificada conforme metodologia proposta por Teisseire e Guy (2000). O sistema de reação foi composto pela adição de 30 µL do extrato enzimático, tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ a pH 6,5, pirogalol (1,2,3-benzenotriol) 20 mmol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 5 mmol L⁻¹, totalizando 1 mL, avaliados a 430 nm e a atividade expressa em mmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Para determinação dos teores de açúcares (AST e AR) foram pesadas 100 mg das amostras dos frutos congeladas e maceradas em Eppendorfs de 2 mL. Os teores de açúcares solúveis totais (AST) e amido foram quantificados segundo metodologia descrita por Yemm e Willis (1954) e os resultados foram calculados com base na curva padrão de glicose e expressos em mg g⁻¹ de massa fresca. Os açúcares redutores (AR) foram quantificados segundo metodologia de Miller (1959) e os resultados foram calculados com base na curva padrão de glicose e expressos em mg g⁻¹ de massa fresca. Os açúcares solúveis totais são carboidratos de baixo peso molecular, responsáveis pela determinação do sabor doce dos frutos, dentre esses, sacarose, glicose, frutose, lactose, maltose, enquanto os açúcares redutores são glicose, frutose, maltose, lactose e galactose.

Para a quantificação da atividade das enzimas pectinolíticas (PME e PG), seguiu-se a metodologia descrita por Hagerman & Austin (1986), onde 5,0 g de

amostras frescas trituradas (Turrax) foram homogeneizadas em 20 mL de NaCl 1M (pH – 5,8) e acondicionadas sob agitação em banho de gelo durante 1h. A obtenção do extrato enzimático foi realizada por centrifugação a 6000 g por 30 minutos.

Para a determinação da atividade da pectinametilesterase (PME) seguiu-se metodologia sugerida por Hultin et al. (1966) com modificações, onde 1 mL do extrato enzimático foi adicionado a 25 mL de NaCl 0,2M contendo 1% de pectina cítrica. Na sequência, sob agitação, NaOH 0,01 N foi adicionado constantemente para manter o pH em 7,0 durante 10 min. O volume de NaOH 0,01 N gasto para manutenção do pH foi utilizado para calcular a atividade da PME, sendo uma unidade de atividade (U) definida como a quantidade de enzima capaz de desmetilar pectina, correspondente ao consumo de 1 nmol de NaOH min g⁻¹ massa fresca⁻¹, cujos resultados foram expressos em U min⁻¹ g⁻¹ de massa fresca.

A atividade de poligalacturonase (PG) foi determinada por meio da adaptação do método descrito por Pressey & Avants (1973). O sistema de reação foi composto de 50 µL extrato enzimático, 50 µL de solução do ácido poligalacturônico a 0,4% contendo 0,05% de albumina e 100 µL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 4,5) a 37°C, por 2 horas, sob agitação. A reação foi interrompida em banho-maria (100 °C) e os grupos redutores liberados foram determinados segundo técnica de Somogyi adaptada por Nelson (1944), usando-se glicose anidra como padrão. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a capacidade da enzima catalisar a formação de um nanomol de açúcar redutor por minuto de reação por grama de amostra, nas condições de ensaio, onde os resultados foram expressos em U min⁻¹ g⁻¹ de massa fresca.

2.2.6 Variáveis físico-químicas e qualitativas

As características físico-químicas dos frutos de tomate foram obtidas por meio da homogeneização de dois frutos por unidade experimental. Os frutos passaram por um mixer e com a polpa foram determinados: os teores de sólidos solúveis (SS) com o uso de refratômetro digital Atago e os resultados expressos em °Brix. Para a determinação da acidez titulável (AT), expressa em gramas de ácido cítrico por 100 g de polpa, utilizou-se também a recomendação das normas do Instituto Adolfo Lutz, publicadas em Brasil (2005) e os resultados foram obtidos por meio de titulação de 5 g de polpa homogeneizada e diluída para 100 mL de água destilada, com solução padronizada de hidróxido de sódio a 0,1 N, tendo como indicador a fenolftaleína. A

relação SS/AT (*ratio*) foi determinada através da relação entre o teor de sólidos solúveis e acidez titulável (Tressler; Joslyn, 1961).

A firmeza dos frutos foi medida em dois frutos inteiros com casca, em dois pontos centrais de cada fruto, utilizando-se penetrômetro digital modelo PTR-500 da Instrutherm®, sendo os resultados expressos em kgf cm⁻².

O conteúdo de ácido ascórbico (AA) foi determinado a partir de 10 g de polpa, por titulação em ácido oxálico a 0,5% com 2,6-diclorofenolindofenol (DCFI) a 0,01 N, com resultados expressos em mg g⁻¹ de amostra (Brasil, 2000) e a quantificação de ácido cítrico (AC) obtida de acordo com metodologia proposta por Choy et al. (1963) e os resultados expressos em g 100 g⁻¹ de amostra.

2.2.7 Análise estatística

Para a análise estatística os dados foram previamente submetidos ao teste de normalidade de Anderson-Darling através do programa Minitab®. Verificada a normalidade dos dados procedeu-se a análise de variância (teste F), sendo as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa Agroestat® (Barbosa; Maldonado, 2015). Os gráficos foram construídos através do software SigmaPlot®.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Variáveis bioquímicas

A interação dos fatores doses de biofungicida à base de *Bacillus subtilis* e tempo de armazenamento foi significativa para todas as variáveis bioquímicas: atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenoloxidase (PPO), teor de compostos fenólicos totais (CFT), capacidade antioxidante (DPPH), peroxidação de lipídios (PL), teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD), teor de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e amido e atividade das enzimas pectinametilesterase (PME) e poligalacturonase (PG).

A aplicação de biofungicida à base de *B. subtilis* mostrou-se eficiente na modulação da atividade de importantes enzimas como a PAL e PPO (Fig. 1A e 1B), o que resultou no aumento da atividade das enzimas em relação às doses aplicadas. A dose de 6 L ha⁻¹ favoreceu a elevação da atividade da PAL nos frutos de tomate ao longo do tempo, com aumento expressivo aos 4 e 12 dias de armazenamento,

correspondente a 52 e 75%, em relação ao controle, respectivamente. Já a enzima PPO, na mesma dose, apresentou maior atividade nos frutos no início do período de armazenamento, 23% em comparação ao controle (Fig. 1).

A aplicação do biofungicida não influenciou nos teores de CFT aos 0, 4 e 12 dias de armazenamento dos frutos; por outro lado, aos 8 dias de conservação, os teores de CFT foram superiores nos frutos não tratados com *B. subtilis* (Fig. 1C). A capacidade antioxidante dos frutos de tomate foi elevada ao longo do tempo de conservação. Os frutos do tratamento controle apresentaram maior DPPH no 4º dia, entretanto, a aplicação do biofungicida permitiu que o sistema antioxidante se mantivesse ativo até o 12º dia de armazenamento, não diferindo entre as doses de 4 e 6 L ha⁻¹, mas superior ao controle em 53 e 69%, respectivamente (Fig. 1D).

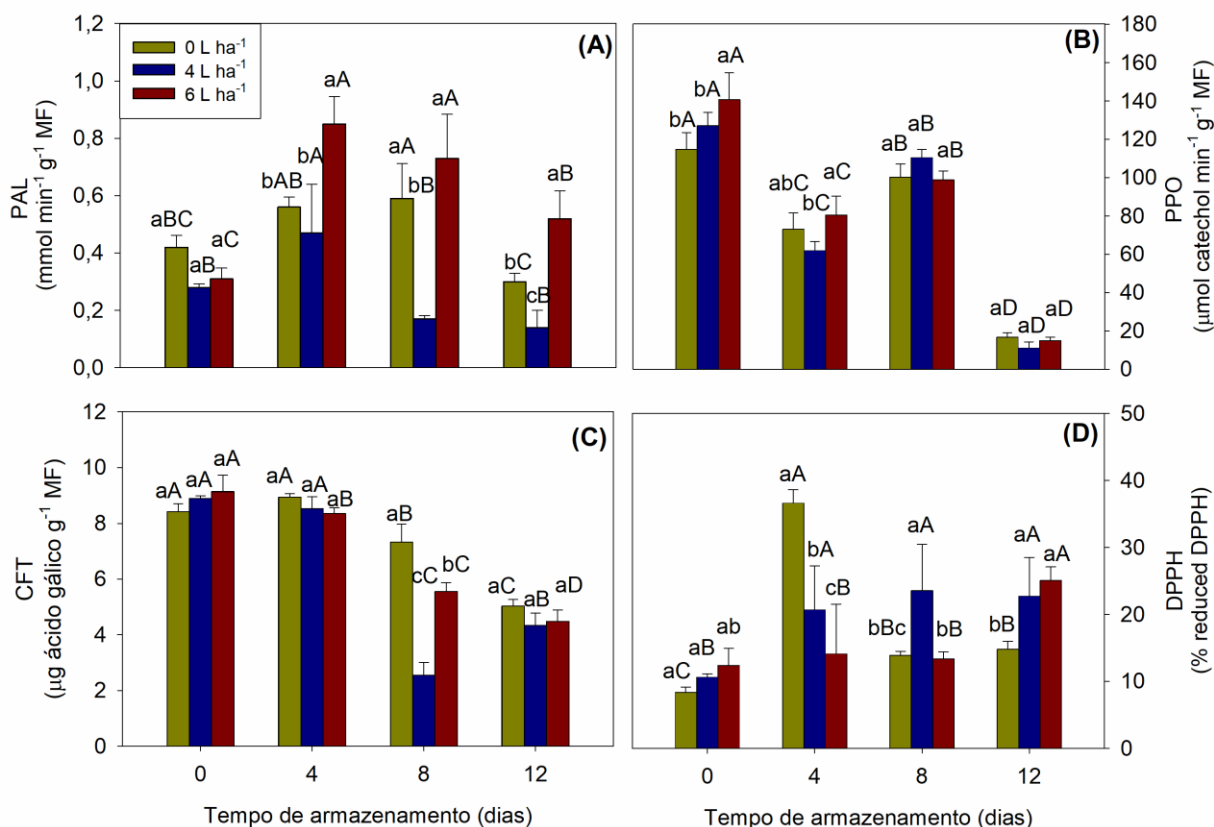


Fig. 1. Atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase-PAL (A) e polifenoloxidase-PPO (B), teor de compostos fenólicos totais-CFT (C) e capacidade antioxidante-DPPH (D) de frutos de tomate submetidos à aplicação de biofungicida à base de *Bacillus subtilis* em diferentes tempos de armazenamento. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula dentro de cada tempo de armazenamento e maiúscula entre cada tempo de armazenamento, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras mostram o desvio padrão. $n = 4$ (número de repetições).

A aplicação do biofungicida não influenciou os níveis de PL até o 4º dia de armazenamento dos frutos. No entanto, aos 8 e 12 dias de acondicionamento o dano oxidativo das membranas (PL) foi inferior em frutos de tomate tratados com *B. subtilis*, resultando em decréscimo de 27 e 31% para a dose de 4 L ha⁻¹ e 24 e 30% de 6 L ha⁻¹, em relação ao controle, mas não diferiram entre si (Fig. 2A). O conteúdo de H₂O₂ foi favorecido pela aplicação de biofungicida, porém com redução desta variável ao longo do tempo de conservação dos frutos. No início e final do armazenamento, a aplicação de 4 L ha⁻¹ aumentou o conteúdo de H₂O₂ em relação às demais. Por outro lado, a aplicação de 6 L ha⁻¹ favoreceu as menores reduções desse composto e no tempo máximo de conservação dos frutos (12 dias) foi observado redução de 61% em relação ao controle e de 4,5 vezes em relação à dose de 4 L ha⁻¹ (Fig. 2B).

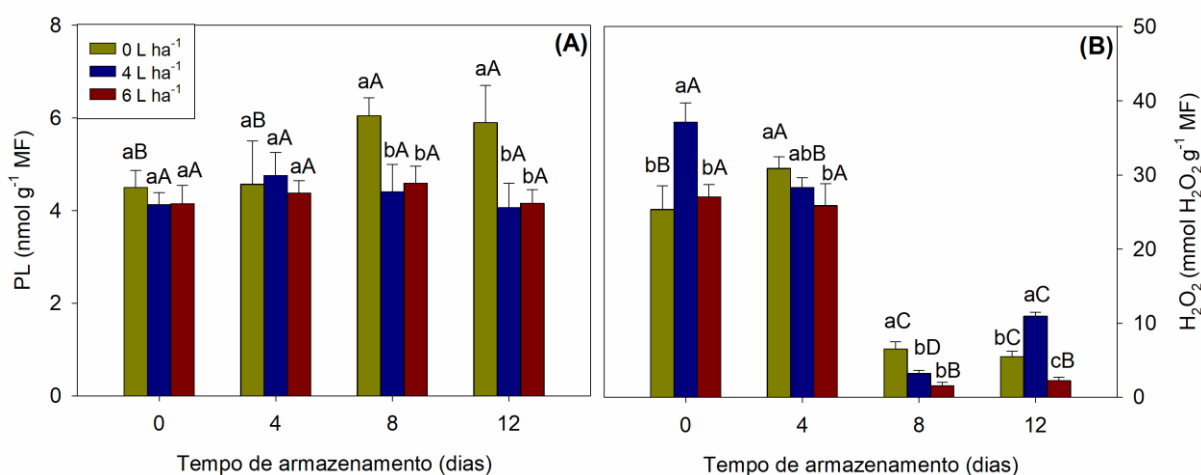


Fig. 2. Peroxidação de lipídios-PL (A) e teor de peróxido de hidrogênio- H₂O₂ (B) de frutos de tomate submetidos à aplicação de biofungicida à base de *Bacillus subtilis* em diferentes tempos de armazenamento. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula dentro de cada tempo de armazenamento e maiúscula entre cada tempo de armazenamento, não diferem entre si pelo teste Tukey (p<0,05). As barras mostram o desvio padrão. n = 4 (número de repetições).

A atividade das enzimas antioxidantes aumentou ao longo do período de armazenamento dos frutos (Fig. 3). Para a enzima SOD a maior atividade foi observada aos 12 dias após a colheita (DAC), com aumento de 1,07 e 1,2 vezes maior com aplicação de 4 e 6 L ha⁻¹ de biofungicida, em relação ao controle (Fig. 3A). A atividade da enzima CAT foi reduzida ao longo do período pós-colheita nas doses de 0 e 4 L ha⁻¹. Entretanto, frutos sob aplicação de 6 L ha⁻¹ de biofungicida apresentaram maior atividade da CAT e aos 12 DAC, aumento de 2,6 vezes em relação ao controle

(Figura 3B). Semelhante ao que foi observado para a enzima SOD, a atividade da POD foi aumentada nos frutos de tomate em função das doses de biofungicida aplicadas e do tempo de conservação, com aumento de 93% sob aplicação de 6 L ha⁻¹ no dia da colheita e de 3,6 vezes aos 4 DAC, em relação ao controle. Já ao final do período de armazenamento, a atividade da POD aumentou 37% com a aplicação de 4 L ha⁻¹, em relação à testemunha (Fig. 3C).

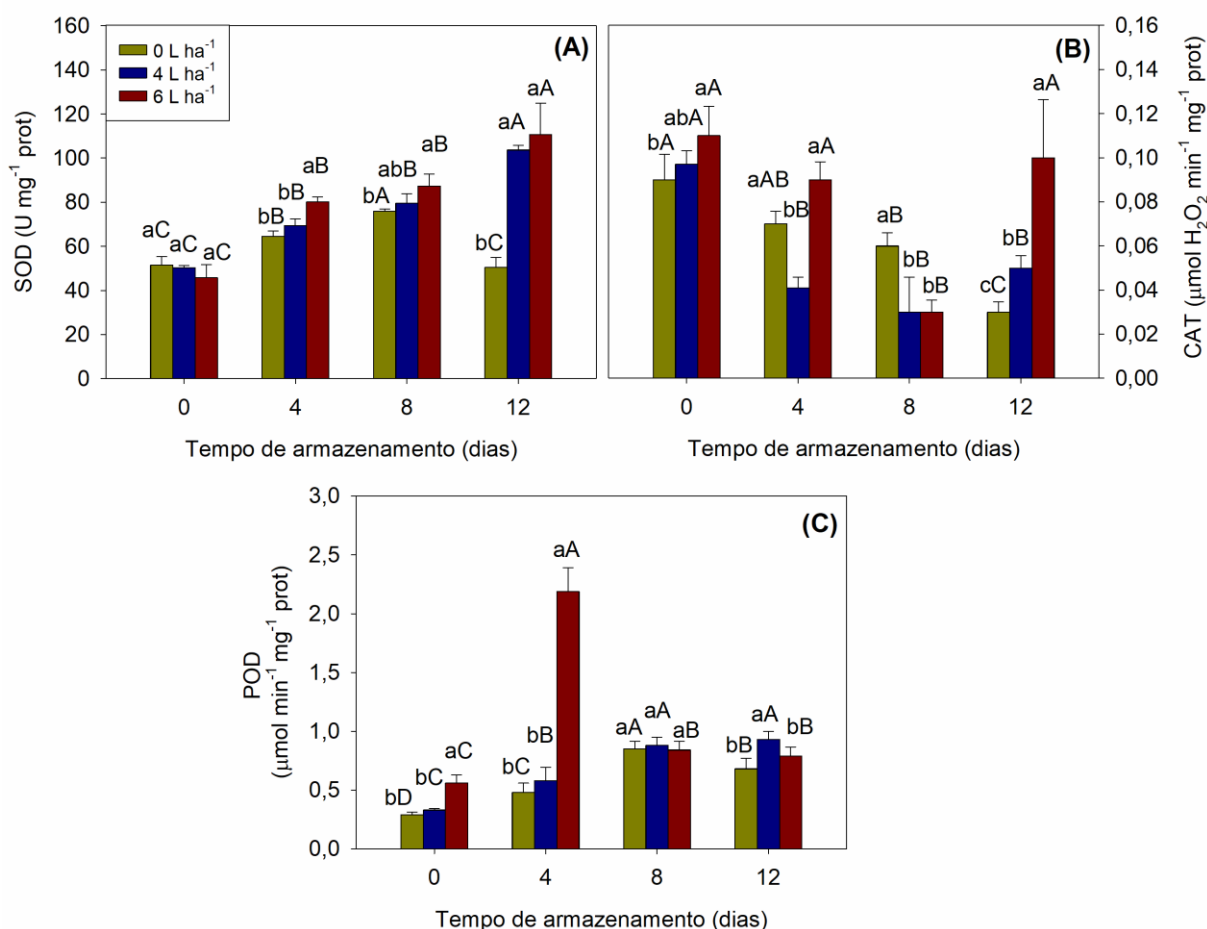


Fig. 3. Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase-SOD (A) catalase-CAT (B) e peroxidase-POD (C) de frutos de tomate submetidos à aplicação de biofungicida à base de *Bacillus subtilis* em diferentes tempos de armazenamento. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula dentro de cada tempo de armazenamento e maiúscula entre cada tempo de armazenamento, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras mostram o desvio padrão. $n = 4$ (número de repetições).

Observa-se que as doses de biofungicida à base de *B. subtilis* promoveram redução da atividade das enzimas pectinolíticas (PME e PG) ao longo do armazenamento dos frutos (Fig. 4). A atividade da enzima PME não apresentou diferença significativa entre as doses testadas entre o 1º e 8º dia de armazenamento

dos frutos, entretanto, houve redução de 10 e 13% da atividade enzimática da PME aos 12 DAC com aplicação de 4 e 6 L ha⁻¹ do produto biológico, não diferindo entre si, em comparação ao controle (Fig. 4A). De modo semelhante, a atividade da enzima PG apresentou diferença significativa entre as doses apenas no maior período de armazenamento dos frutos, com menor atividade da enzima nas doses de 4 e 6 L ha⁻¹, com redução de 23 e 27% em relação aos frutos controle, respectivamente, mas semelhante entre si (Fig. 4B).

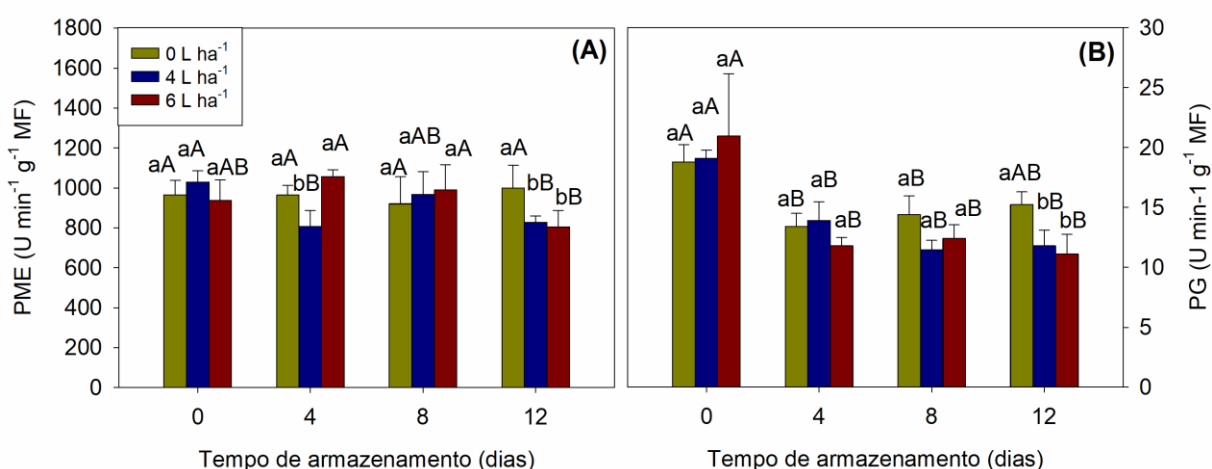


Fig. 4. Atividade das enzimas pectinolíticas pectinametilesterase-PME (A) e poligalacturonase-PG (B) de frutos de tomate submetidos à aplicação de biofungicida à base de *Bacillus subtilis* em diferentes tempos de armazenamento. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula dentro de cada tempo de armazenamento e maiúscula entre cada tempo de armazenamento, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras mostram o desvio padrão. $n = 4$ (número de repetições).

O teor dos AST e AR aumentou durante o período pós-colheita dos frutos de tomate, no entanto, o teor de amido foi reduzido ao longo do armazenamento (Fig. 5). Os AST apresentaram diferenças significativas até o 8º dia de conservação dos frutos entre as doses aplicadas. Maior teor de AST dos frutos foi obtido no 4º dia com a aplicação de 4 L ha⁻¹, com aumento de 1,9 vezes em relação ao controle. De outro modo, frutos não tratados com o biofungicida apresentaram maiores teores de AST no primeiro dia em relação à dose de 4 L ha⁻¹ e no 8º dia em relação às doses contendo *B. subtilis* (Fig. 5A).

Os teores de AR foram maiores nos frutos não tratados com *B. subtilis* até o 8º dia de armazenamento, não diferindo da dose de 6 L ha⁻¹ de biofungicida ao final do amadurecimento dos frutos (12 DAC) (Fig. 5B). Por outro lado, o maior teor de amido

foi obtido no início do período pós-colheita, na qual a dose de 4 L ha⁻¹ promoveu aumento de 45% desse carboidrato nos frutos, em comparação ao controle. No 4º dia de armazenamento, os frutos concentraram maior teor de amido sob a dose de 6 L ha⁻¹, com aumento de 37% em relação ao controle e nos demais tempos não houve diferença entre as doses (Fig. 5C).

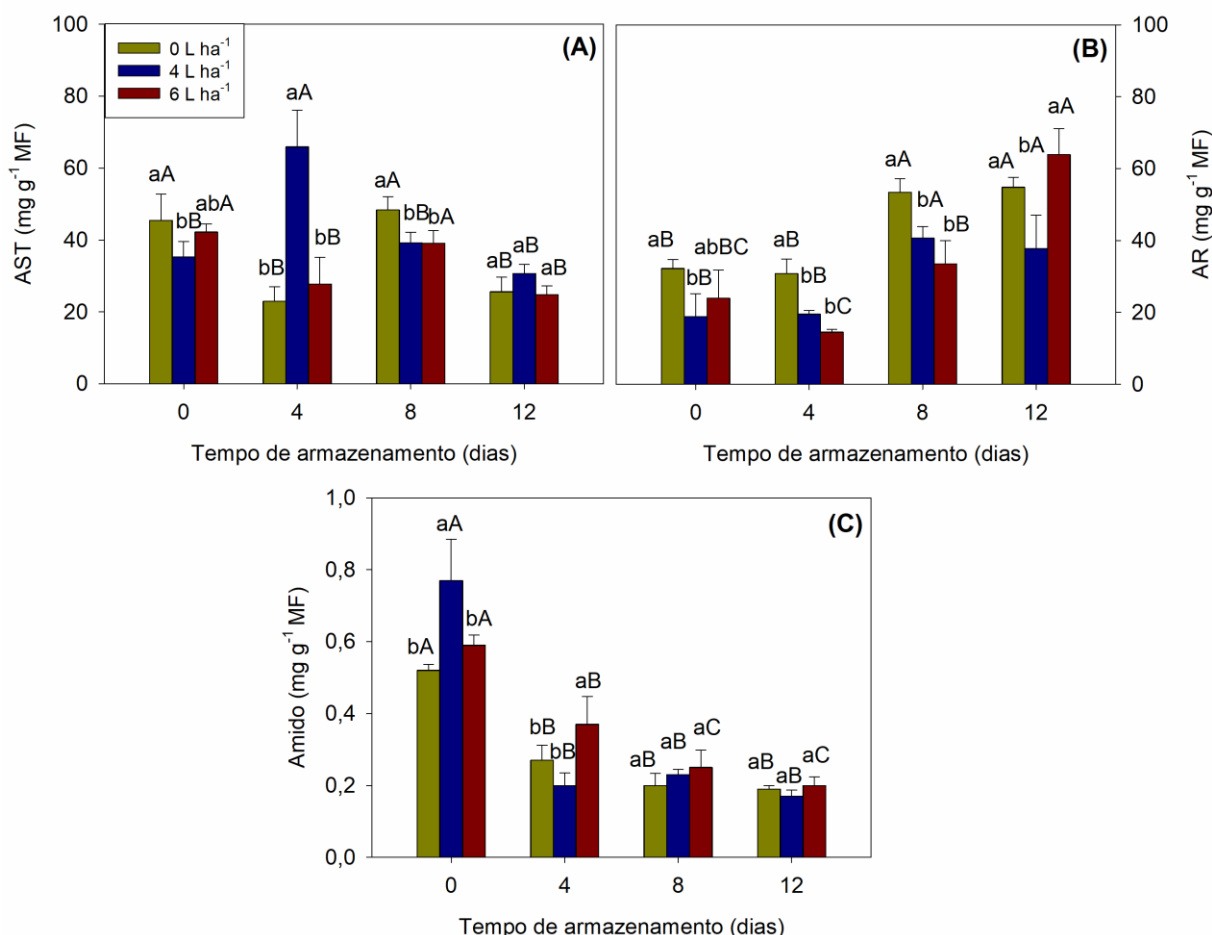


Fig. 5. Teor de açúcares solúveis totais-AST (A), açúcares redutores-AR (B) e amido (C) de frutos de tomate submetidos à aplicação de biofungicida à base de *Bacillus subtilis* em diferentes tempos de armazenamento. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula dentro de cada tempo de armazenamento e maiúscula entre cada tempo de armazenamento, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras mostram o desvio padrão. n = 4 (número de repetições).

2.3.2 Variáveis físico-químicas e qualitativas

Houve efeito da interação entre os fatores doses de biofungicida à base de *B. subtilis* e tempo de armazenamento para o teor de acidez titulável (AT), *ratio* (SS/AT), firmeza, teores de ácido cítrico (AC) e ácido ascórbico (AA). O teor de sólidos solúveis

(SS) foi significativo quando considerados os fatores separadamente e a perda de massa dos frutos sofreu influência apenas do tempo de armazenamento (Figura 6).

O teor de SS apresentou resposta linear crescente em função dos dias de armazenamento dos frutos e a aplicação das doses de biofungicida promoveram maior teor de SS nos frutos de tomate em relação ao controle (Fig. 6A e 6B). Aos 12 dias de armazenamento foi observado aumento de 2 vezes na AT com aplicação de 4 e 6 L ha⁻¹ de biofungicida, em relação ao controle, mas sem diferença entre si (Fig. 6C). Já a relação desses índices SS/AT só apresentou diferença significativa entre as doses avaliadas no estágio inicial de maturação dos frutos, em que a maior relação SS/AT foi obtida para os frutos não tratados com *B. subtilis* (Fig. 6D).

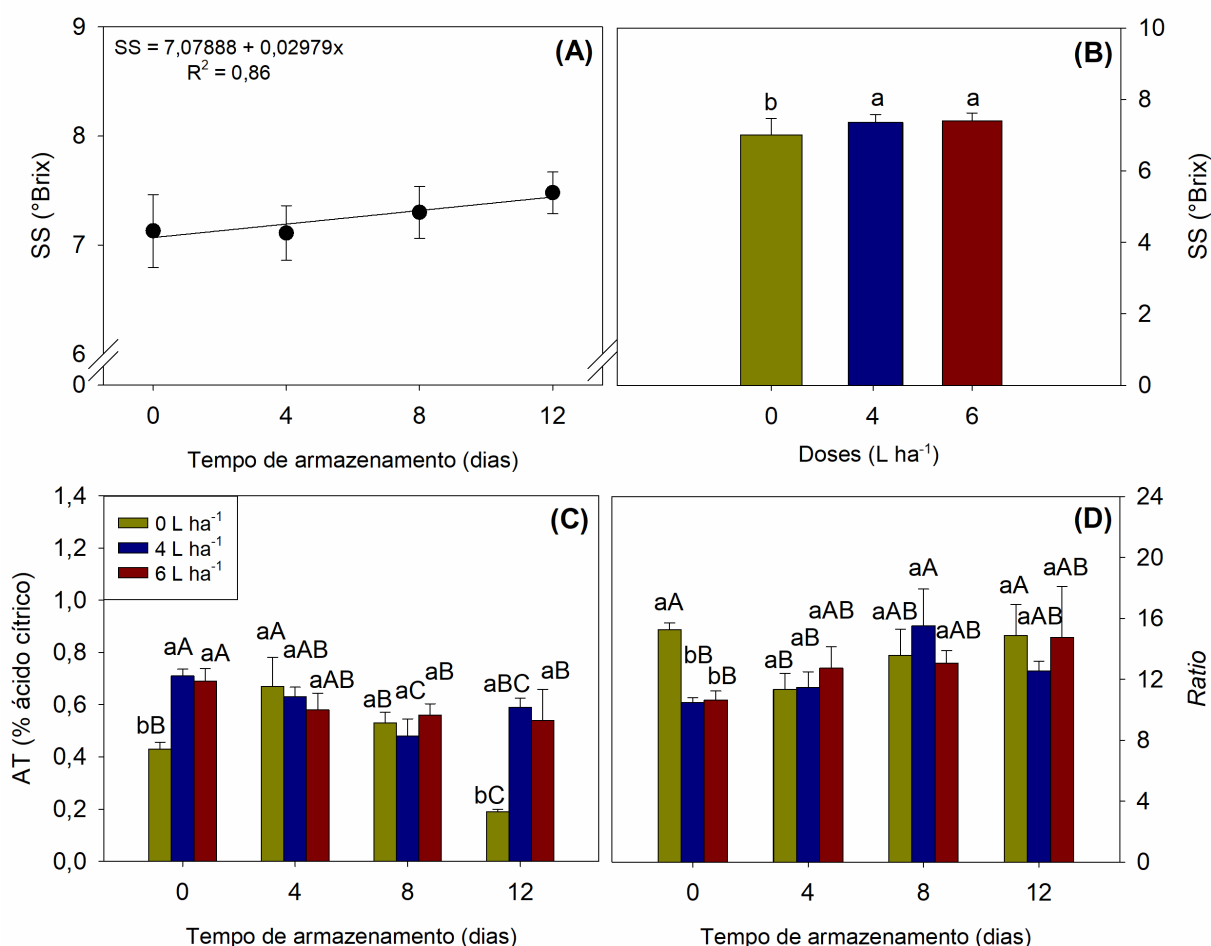


Fig. 6. Teor de sólidos solúveis - SS (A e B), acidez titulável - AT (C) e *ratio* (D) de frutos de tomate submetidos à aplicação de biofungicida à base de *Bacillus subtilis* em diferentes tempos de armazenamento. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula dentro de cada tempo de armazenamento e maiúscula entre cada tempo de armazenamento, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras mostram o desvio padrão. $n = 4$ (número de repetições).

Assim como observado na AT, o teor de AC foi influenciado positivamente pelas concentrações de *B. subtilis* no início do armazenamento, com maior concentração de AC nos frutos de tomate nas doses de 4 e 6 L ha⁻¹ e aumento de 23 e 20% em relação ao controle, respectivamente, não diferindo entre si. Ao final do armazenamento (12 DAC), os frutos tratados com 6 L ha⁻¹ apresentaram aumento no conteúdo de AC em 26% quando comparado aos frutos controle, mas não diferindo da dose de 4 L ha⁻¹ (Fig. 7A). O teor de AA teve seu pico nos primeiros dias de armazenamento (0 e 4 DAC), com aumento de 43% na concentração desse ácido orgânico com aplicação de 6 L ha⁻¹ após a colheita; já aos 4 DAC observou-se aumento de 41% do teor de AA com a dose de 4 L ha⁻¹ de biofungicida comparado ao controle (Fig. 7B).

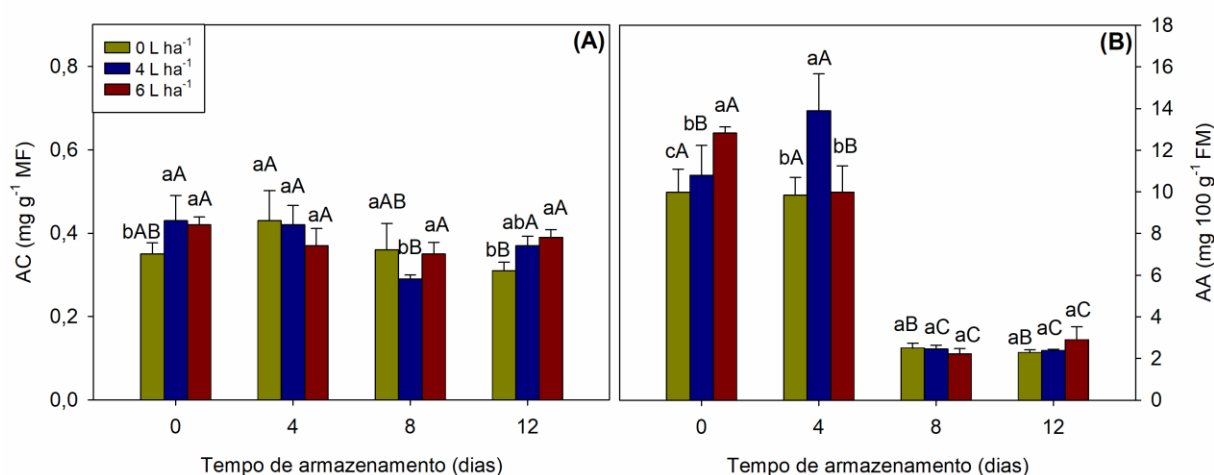


Fig. 7. Teor ácido cítrico-AC (A) e ácido ascórbico-AA (B) de frutos de tomate submetidos à aplicação de biofungicida à base de *Bacillus subtilis* em diferentes tempos de armazenamento. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula dentro de cada tempo de armazenamento e maiúscula entre cada tempo de armazenamento, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras mostram o desvio padrão. $n = 4$ (número de repetições).

Maior firmeza dos frutos foi observada com aplicação de 4 e 6 L ha⁻¹ de biofungicida, as quais não apresentaram diferença estatística entre si, mas foram superiores ao controle, com aumento de 14 e 21%, respectivamente, aos 12 dias de armazenamento (Fig. 8A).

A perda de massa dos frutos, independente das doses de biofungicida aplicadas, foi crescente com o período de armazenamento, evidenciando maior perda de água no máximo tempo de armazenamento decorrido do estágio de amadurecimento dos frutos de tomate (Fig. 8B).

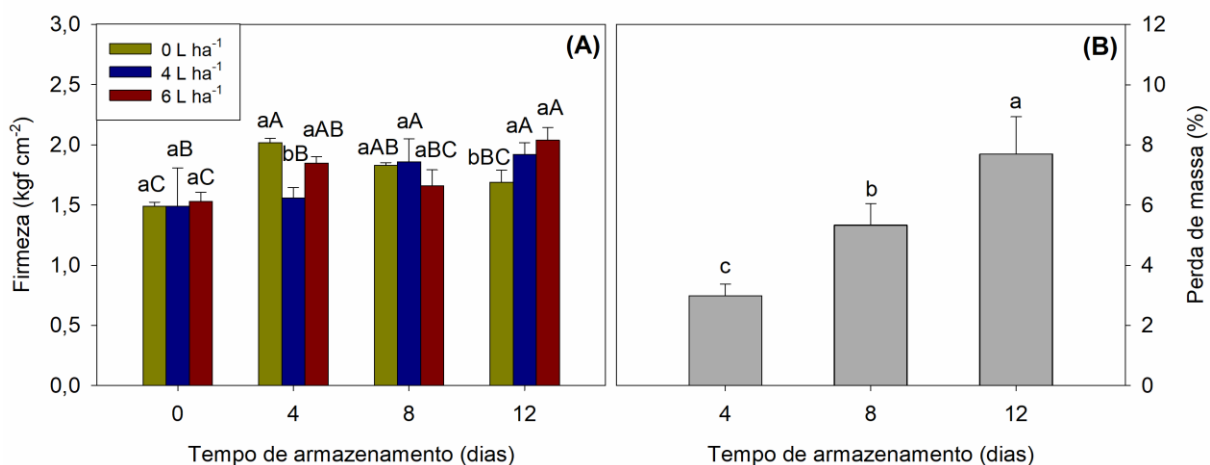


Fig. 8. Índice de Firmeza (A) e percentagem de perda de massa (B) de frutos de tomate submetidos à aplicação de biofungicida à base de *Bacillus subtilis* em diferentes tempos de armazenamento. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula dentro de cada tempo de armazenamento não difere entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) (A). Médias seguidas pela mesma letra, minúscula dentro de cada tempo de armazenamento e maiúscula entre cada tempo de armazenamento, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) (B). As barras mostram o desvio padrão. $n = 4$ (número de repetições).

Conforme a Figura 9, podemos visualizar o efeito positivo do *B. subtilis* nas diferentes doses testadas para conservação pós-colheita do fruto de tomate, controlando o amadurecimento e senescência dos frutos.

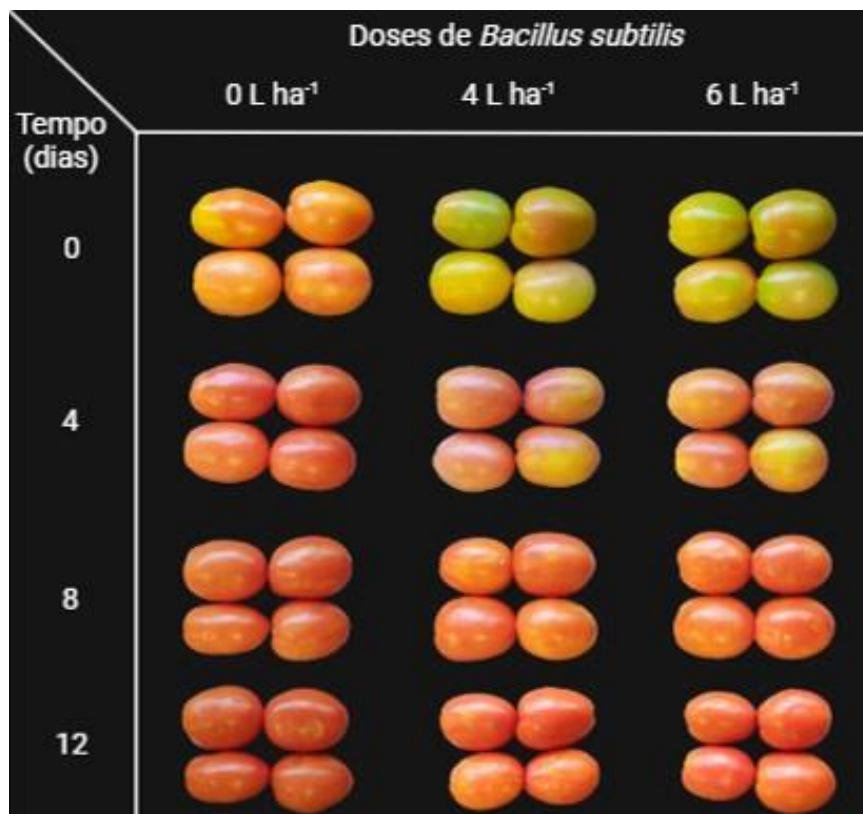


Fig. 9. Frutos de tomates tratados com *Bacillus subtilis* em diferentes tempos de armazenamento.

2.4 DISCUSSÃO

Durante o amadurecimento, os frutos de tomate passam por diversas mudanças na cor, textura, sabor e aroma, que podem limitar sua vida útil. A vida útil dos alimentos compreende o período durante o qual um produto armazenado permanece adequado para o consumo, em função do grau de amolecimento, murchamento e podridão (Brujin et al., 2023), sendo para o tomate, a manutenção de qualidade dos frutos um dos maiores problemas quando armazenado em temperatura ambiente (Sinha et al., 2019). Os resultados desta pesquisa mostram que a vida útil dos frutos de tomate não tratados com biofungicida à base de *Bacillus subtilis* foi seriamente afetada durante o período de armazenamento.

Para gerenciar e minimizar as perdas pós-colheita de frutos de tomate os resultados obtidos no presente estudo mostram que o produto testado à base de *B. subtilis* pode ser utilizado como alternativa aos fungicidas sintéticos na conservação de alimentos de forma eficaz, ecológica e de biossegurança, preservando e fortalecendo os processos fisiológicos e bioquímicos dos frutos.

Nesse contexto, a aplicação em pré-colheita de *B. subtilis* em frutos de tomate se mostrou eficiente na modulação da atividade de importantes enzimas como a

fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenoloxidase (PPO), o que garantiu manutenção dos teores de compostos fenólicos totais e maior capacidade antioxidante, ao final do período de avaliação. Do mesmo modo, intensificou o sistema antioxidante, garantindo a integridade do tecido vegetal, reduzindo a atividade das enzimas pectinolíticas que aceleram o processo de amadurecimento e contribuiu para a conservação dos atributos físico-químicos dos frutos de tomate durante os estádios pós-colheita.

A PAL e a PPO são duas importantes enzimas envolvidas na via dos fenilpropanóides e estão ligadas ao metabolismo dos compostos fenólicos. Além disso, a enzima PAL atua na biossíntese de lignina, tanino e melanina e a enzima PPO participa da oxidação dos compostos fenólicos e pode ocasionar o escurecimento dos frutos (Amri et al., 2021). Em algumas datas de avaliação observou-se que a aplicação do biofungicida intensificou a atividade das enzimas PAL e PPO, entretanto, a ação da PPO não foi capaz de degradar os compostos fenólicos e não provocou escurecimento dos frutos promovendo maior tempo de prateleira. Em estudo realizado por Yu et al. (2021), foi observado que o tratamento com *Bacillus* em frutos de morango induziu o acúmulo das enzimas PAL e PPO, o que influenciou positivamente na capacidade de armazenamento durante o período pós-colheita. A atividade aumentada dessas enzimas contribuiu para a resistência a doenças, redução do estresse oxidativo e prolongamento da vida útil dos frutos.

Os compostos fenólicos presentes em frutos e vegetais frescos podem ser produzidos de forma rápida para promover a síntese de lignina como resposta a condições adversas. Dessa maneira, alguns fatores como dano mecânico, cortes, temperatura de armazenamento e outros podem estimular o aumento do teor de compostos fenólicos durante a conservação dos alimentos (Pérez-López et al., 2018; Surjadinata; Cisneros-Zevallos, 2012). Os resultados desta pesquisa sugerem que a aplicação de 6 L ha⁻¹ de biofungicida favoreceu a conservação dos frutos de tomate através da ativação da enzima PAL, importante nesse processo, conforme já relatado.

Durante o período de armazenamento e distribuição pós-colheita, a síntese de espécies reativas de oxigênio (ERO) em frutos e vegetais pode ser intensificada, em resposta ao metabolismo natural de senescência, deterioração e via de sinalização ao ataque de patógenos (Meitha et al., 2020). Contudo, a superprodução de ERO como o radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e outros, resultam em alterações irreversíveis e deletérias às células, sobretudo, pelo aumento no conteúdo

de malondialdeído (MDA), provocando danos à membrana plasmática devido à produção descontrolada ou eliminação ineficiente de ERO (Sachdev et al., 2021). Nessas circunstâncias, o aumento do conteúdo de MDA leva à redução de fluidez das membranas e o vazamento de eletrólitos através da peroxidação lipídica, além de provocar danos secundários às proteínas de membranas (Halliwell; Gutteridge, 2006). Entretanto, observa-se que a aplicação de *B. subtilis* reduziu a peroxidação lipídica dos frutos de tomate, uma vez que estes apresentaram menor dano de membrana até 12 DAC em relação aos frutos controle, através da estabilidade da membrana celular e aumento na resistência do fruto, prolongando seu tempo de prateleira. Resultados no mesmo sentido foram observados durante o armazenamento de frutos de pêssigo e tubérculos de batata (Zhou et al., 2019; Lastochinka et al., 2020).

O menor dano oxidativo de membrana foi evidenciado como consequência da redução do conteúdo de H_2O_2 nos frutos de tomate tratados com o biofungicida, principalmente, na dose de 6 L ha^{-1} . O H_2O_2 é um forte oxidante que pode iniciar o dano oxidativo localizado e, conseqüentemente, interrupção das funções metabólicas e a perda da integridade celular nos locais onde se acumula (Mansoor et al., 2022). Todavia, os resultados obtidos nesta pesquisa sugerem que o pré-tratamento dos frutos com *B. subtilis* pode mitigar os danos oxidativos do amadurecimento do fruto de tomate e manter sua qualidade a longo prazo.

Nos frutos tratados com *B. subtilis*, a redução no conteúdo de H_2O_2 e menor dano de membrana foi alcançado pela eficácia do mecanismo de defesa antioxidante, que é composto por diversas enzimas como SOD, POD e CAT, as quais catalisam a degradação de ERO, reduzindo as perdas pós-colheita, conforme as condições estabelecidas neste estudo.

A SOD é a primeira enzima a atuar nesse sistema, incidindo na dismutação do ânion superóxido para formação de H_2O_2 e, dessa maneira, minimiza o dano inicial ocasionado pelas ERO, provenientes do processo de amadurecimento natural dos frutos. Para que o subproduto da SOD, o H_2O_2 , seja eliminado é necessária a atuação das enzimas CAT e POD, que agem em diversos compartimentos celulares e removem o peróxido de hidrogênio reduzindo-o em duas moléculas de H_2O (Tan et al., 2020). De acordo com Campos et al. (2004), semelhante à PAL, aumento na atividade da POD pode indicar aumento na biossíntese de lignina, que atua como uma barreira à infecção microbiana e manutenção da firmeza dos frutos. Nossos resultados mostram que a presença do *B. subtilis* nas doses de 4 e 6 L ha^{-1} de biofungicida

reduziu a concentração de ERO, aumentando a atividade das enzimas SOD, CAT e POD, para desacelerar o rápido amadurecimento dos frutos e mantê-los sadios por mais tempo.

Outro aspecto de grande relevância no estudo pós-colheita de frutos é a maturação e uma das características tipicamente associada a esse processo é o amolecimento dos frutos. Este estágio propicia informações comerciais importantes, considerando que frutos mais firmes poderão ser disponibilizados por um período mais longo. Por se tratar de fruto climatérico, o tomate continua a sofrer mudanças durante o período pós-colheita, o que pode condicionar a redução da firmeza com o amadurecimento dos frutos (Alonso-Salinas et al., 2022). Em meio a esse processo, há muitas enzimas na participação da degradação das substâncias pécticas, entre elas, as mais importantes são a pectinametilesterase (PME) e poligalacturonase (PG) (Fonseca, 1974), envolvidas na integridade do tecido, textura e amolecimento de frutos durante o amadurecimento (Brummell; Harpster, 2001).

A pectina é o principal componente da lamela média e parede celular primária em espécies eudicotiledôneas, atuando na adesão celular, bem como, nas características mecânicas e texturais dos órgãos das plantas (Mohnen, 2008). A estrutura da pectina sofre mudanças durante o crescimento e desenvolvimento que incluem desesterificação através de enzimas pectinolíticas, como a PME. A enzima PME atua na catalisação da desmetilação do grupo carboxílico dos resíduos de galacturosil, desesterificando-os, para que assim, a enzima PG catalise a hidrólise das ligações α -1,4 do ácido galacturônico (HGA) (Fischer; Bennett, 1991). Logo, a hidrólise da pectina é dependente da PME, a qual é fundamental em todas as etapas de desenvolvimento do tecido vegetal, contudo, assim como a PG, o aumento em sua atividade só é evidenciado durante o amadurecimento (Changwal et al., 2021; Hobson, 1962; Pressey; Avants, 1982). Deste modo, verifica-se que a atividade enzimática da PME tem grandes reflexos na atividade da PG. Neste estudo, a relação entre essas enzimas foi constatada, visto que ao final do período de avaliação (12 DAC), observou-se que a aplicação pré-colheita de *B. subtilis* manteve a textura dos frutos de tomate através da redução da atividade enzimática da PME e PG. Este resultado indica efeito promissor do biofungicida no retardamento da senescência dos frutos e na integridade da parede celular, corroborando com os dados de firmeza encontrados neste estudo, visto que, maturação e firmeza estão intimamente

associadas. Assim, o prolongamento da firmeza é desejável para a extensão do período de armazenamento dos frutos (Pereira et al., 2015).

O aumento nos teores de açúcares totais (AST) e, principalmente, nos teores de açúcares redutores (AR), bem como, redução nos teores de amido é reflexo do amadurecimento dos frutos. Já, na fase final do amadurecimento, ocorre redução dos teores desses compostos, como indicativo da perda de qualidade do fruto. Isto sugere que durante o período pós-colheita o acúmulo de açúcares e amido tem consequências para a vida de prateleira e qualidade dos frutos. Os resultados obtidos neste estudo mostram que a aplicação pré-colheita de *B. subtilis* determinou maior tempo de prateleira dos frutos, apresentando menor teor de AST e AR e alto teor de amido até o 4º dia, indicando frutos mais verdes.

Assim como o teor de carboidratos, outros índices como teor de SS, AT e a relação SS/AT podem influenciar mudanças dinâmicas na qualidade e tempo de prateleira dos frutos. O teor de SS compreende apenas 65% dos açúcares presentes nos frutos e seu acúmulo se dá na fase final de maturação, enquanto a AT é um importante indicador da qualidade de frutos, pois atua na conservação pós-colheita prevenindo o ataque de patógenos e inibindo a atividade de enzimas de degradação; contudo, a melhor forma de avaliar o sabor característico dos frutos está atrelado à relação entre esses dois fatores SS/AT (Chitarra; Chitarra, 2005; Nascimento et al. 2013). No presente estudo, o teor de SS, que é medida indireta da quantidade de açúcares, aumentou com o avanço do amadurecimento do tecido vegetal, sendo a maior concentração dessa variável identificada nos frutos que receberam as doses do biofungicida, bem como, os níveis de AT. Enquanto a relação SS/AT foi inferior apenas na primeira avaliação pós-colheita, em função da maior acidez, semelhante ao que foi encontrado por Abd-Allah et al. (2011). Assim, a elevação do teor de sólidos solúveis, em função do avanço da maturação e início da senescência é esperada (Agostini et al., 2014), em compensação, a manutenção dos altos níveis de AT podem ser benéficos para a qualidade pós-colheita, mantendo os frutos frescos e reduzindo a deterioração.

Em conjunto com os parâmetros citados anteriormente, os ácidos orgânicos também desempenham papel importante na determinação da qualidade organoléptica do fruto sendo que os teores desses compostos podem sofrer alterações na qualidade pós-colheita em função do transporte e armazenamento (Tao et al., 2022). A acidez presente no tomate influencia no seu sabor e os produtos decorrentes dele (Cherono;

Workneh, 2018). Deste modo, com foco no maior tempo de prateleira, foi constatado que aos 12 DAC a aplicação de *B. subtilis*, independente da dose, apresentou maior concentração de ácido cítrico (AC) em relação à testemunha. Por outro lado, o teor de ácido ascórbico (AA) se sobressaiu até o 4º DAC nos frutos de tomateiro que receberam 4 L ha⁻¹ de biofungicida, mantendo-se estável ao final do período de armazenamento. Os frutos de tomate podem apresentar altos níveis de AA para regulação de diversas funções fisiológicas e metabólicas da vida vegetal, sendo destacado como um dos antioxidantes mais vitais, que auxilia na eliminação de ERO (Das; Roychoudhury, 2014; Khatri et al., 2020); isto indica que, até metade do período de armazenamento, a alta concentração de AA contribuiu para retardar o amadurecimento dos frutos.

A perda de massa dos frutos apresentou comportamento crescente em função do tempo de armazenamento, independente das doses de biofungicida aplicadas. Em frutos e vegetais, a perda de água tem impacto variável em relação ao seu tipo, estando seu comportamento ligado às funções metabólicas como transpiração e respiração, que são responsáveis por desencadear a redução de água disponível no tecido vegetal (Chitarra; Chitarra, 2005). Resultados semelhantes aos apresentados neste estudo também foram relatados por Manureto et al. (2018) e Candéo et al. (2020).

Dentro do contexto da elevada perecibilidade dos frutos de tomate e da necessidade de tecnologias que aumentem a vida de prateleira desses frutos, pode-se sugerir a aplicação de *B. subtilis*, pois este funcionou como bioativador de importantes enzimas como PAL e PPO, sendo que a primeira atuou diretamente na manutenção da firmeza dos frutos de tomate que permaneceram com textura firme, aceitável, até os 12 DAC. Além disso, o uso do biofungicida potencializou o sistema antioxidante dos frutos, promovendo redução do dano de membranas e atuando na manutenção da integridade do tecido vegetal, bem como, reduziu a atividade das enzimas pectinolíticas que aceleram a senescência e, conseqüentemente, propiciou atraso no amadurecimento dos frutos (Figura 9).

2.5 CONCLUSÃO

A aplicação pré-colheita de 6 L ha⁻¹ do biofungicida à base de *Bacillus subtilis* mostrou-se promissora para a conservação pós-colheita de tomate. Observou-se influência positiva nas reações enzimáticas, na manutenção dos teores de compostos

fenólicos, na capacidade antioxidante e na firmeza dos frutos até o final do período de avaliações. Além disso, houve aumento na vida de prateleira e na qualidade dos frutos armazenados, mantendo a qualidade comercial e prolongando o tempo de comercialização.

REFERÊNCIAS

- Agostini, J.S.; Scalon, S.P.Q.; Lescano, C.H.; Silva, K.E; Garcete, G.J., 2014. Nota científica: Conservação pós-colheita de laranjas Champagne (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*). Braz. J. Food Technol. 17, 177-184.
- Alexiava, V.; Sergiev, I.; Mapelli, S.; Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant, Cell Environ. 24, 1337–1344. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>
- Ali, A.; Xia, C.; Ouattara, N.; Mahmood, I.; Faisal, M., 2021. Economic and environmental consequences' of postharvest loss across food supply Chain in the developing countries. J. Clean Prod. 323, 129146. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.129146>.
- Ali, A.; Yeoh, W.K.; Forney, C.; Siddiqui, M.W., 2018. Advances in Postharvest Technologies to Extend the Storage Life of Minimally Processed Fruits and Vegetables. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 58, 2632–2649. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1339180>
- Barbosa, J.C.; Maldonado, J.W., 2015. AgroEstat—Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos; FCAV/UNESP: Jaboticabal, Brazil.
- Bazioli, J.M.; Belinato, J.R.; Costa, J.H.; Akiyama, D.Y.; Pontes, J.G.M.; Kupper, K.C.; Augusto, F.; Carvalho, J.E.; Fill, T.P., 2019. Biological Control of Citrus Postharvest Phytopathogens. Toxins 11, 460. <https://doi.org/10.3390/toxins11080460>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C.L.W.T, 1995.. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT 28, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brasil. 2000. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº1, de 7 de janeiro de 2000. Complementa padrões de identidade e qualidade para polpas de fruta. Brasília, 18p.
- Brasil. 2005. Ministério da Saúde. Agência Nacional de vigilância Sanitária. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Brasília, 1018p.
- Bu, S.; Munir, S.; He, P.; Li, Y.; Wu, Y.; Li, X.; Kong, B.; He, P.; He, Y., 2021. *Bacillus*

subtilis L1-21 as a biocontrol agent for postharvest gray mold of tomato caused by *Botrytis cinerea*. BiolControl 157, 8.

<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104568>

Chandrasekaran, M.; Chun, S.C.; Oh, J.W.; Paramasivan, M.; Saini, R.K.; Sahayarayan, J.J., 2019. *Bacillus subtilis* CBR05 for Tomato (*Solanum lycopersicum*) Fruits in South Korea as a Novel Plant Probiotic Bacterium (PPB): Implications from Total Phenolics, Flavonoids, and Carotenoids Content for Fruit Quality. Agronomy 9, 1-12. <https://doi.org/10.3390/agronomy9120838>

Choy, T.K.; Quattrone, J.R.; Elefant, M., 1963. Non-aqueous spectrophotometric determination of citric acid. Anal. Chim. Acta 29, 114-119. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88590-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88590-6)

Corato, U., 2020. Improving the Shelf-Life and Quality of Fresh and Minimally-Processed Fruits and Vegetables for a Modern Food Industry: A Comprehensive Critical Review from the Traditional Technologies into the Most Promising Advancements. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 60, 940–975. <https://10.1080/10408398.2018.1553025>

Delgado, L.; Schuster, M.; Torero, M., 2021. Quantity and quality food losses across the value Chain: A Comparative analysis. Food Policy 98, 16. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2020.101958>

Giannopolitis, C.N.; Reis, S.K., 1977. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol. 59, 309-314. <https://10.1104/pp.59.2.309>

Gouda, S.; Kerry, R.G.; Das, G.; Paramithiotis, S.; Shin, H.S.; Patra, J. K., 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. Microbiol. Res. 206, 131–140. <http://10.1016/j.micres.2017.08.016>

Gutter, Y.; Littauer, F., 1953. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* against citrus fruit pathogens Bull. Res. Council. Israel 33, 192-197.

Hagerman, A.E.; Austin, P.J., 1986. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. J.Agric. Food Chem. 34, 440– 444.

Hashem, A.; Tabassum, B.; Abd _Allah, E.F., 2019. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. Saudi. J. Biol. Sci. 26, 1291-1297. <http://10.1016/j.sjbs.2019.05.004>.

Heath, R.L.; Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125, 189-

198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hultin, H.O., 1966. Pectin methyl esterases of the banana. Purification and properties. J. Food Sci. 31, 320-327.
- Kar, M.; Mishra, D., 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant physiol. 57, 315-319.
<https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315>
- Khatrri, D.; Panigrahi, J.; Prajapati, A.; Bariya, H., 2020. Attributes of Aloe vera gel and chitosan treatments on the quality and biochemical traits of post-harvest tomatoes. Sci. Hortic. 259, 8. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108837>
- Miller, G.L., 1959. Modified DNS method for reducing sugars. Anal Chem. 31, 426-428.
- Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153, 375.
- Padró, M.D.A.; Caboni, E.; Morin, K.A.S.; Mercado, M.A.M.; Olalde-Portugal, V., 2021. Effect of *Bacillus subtilis* on antioxidant enzyme activities in tomato grafting. PeerJ. 9,10984. <https://10.7717/peerj.10984>.
- Palumbo, M.; Attolico, G.; Capozzi, V.; Cozzolino, R.; Corvino, A.; de Chiara, M.L.V.; Pace, B.; Pelosi, S.; Ricci, I.; Romaniello, R.; Cefola, M., 2022. Emerging Postharvest Technologies to Enhance the Shelf-Life of Fruit and Vegetables: An Overview. Foods 11, 3925. <https://doi.org/10.3390/foods11233925>
- Peixoto, P.H.P.; Cambraia, J.; Sant'Anna, R.; Mosquim, P.R.; Moreira, M.A., 1999. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. Rev. Bras. Fisiol. Veg. 11, 137-143.
- Pressey, R.; Avants, J.K., 1973. Separation and characterization of endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peaches. Plant Physiol. 52, 252-256. <https://10.1104/pp.52.3.252>
- Samaras, A.; Roumeliotis, E.; Ntasiou, P.; Karaoglanidis, G., 2021. *Bacillus subtilis* MBI600 Promotes Growth of Tomato Plants and Induces Systemic Resistance Contributing to the Control of Soilborne Pathogens. Plants 10, 1113.
<https://doi.org/10.3390/plants10061113>
- Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Meth. Enzymol. 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

- Souza, R.D.; Ambrosini, A.; Passaglia, L.M., 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet. Mol. Biol.* 38, 401-419.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Sparovek, G.; Van Lier, Q.D.J.; Dourado Neto, D., 2007. Short Communication Computer assisted Koeppen climate classification: a case study for Brazil. *Int J Climatol* 27, 257–266. <https://doi.org/10.1002/joc.1384>
- Teisseire, H.; Guy, V., 2000. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Sc.* 153, 65–72.
[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00257-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00257-5)
- Tejera-Hernández, B.; Heydrich-Pérez, M.; Rojas-Badía, M. M., 2013. Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agronomía Mesoamericana* 24, 357–364. <https://doi.org/10.15517/AM.V24I2.12535>
- Trani, P.E.; Kariya, E. A.; Hanai, S.M.; Anbo, R.H.; Bassetto Júnior, O.B.; Purquerio, L.F.V.; Trani, A.L., 2015. Calagem e adubação do tomate de mesa. Campinas: Instituto Agrônômico. (Boletim Técnico IAC, 215).
- Tressler, D.K.; Joslyn, M.A., 1961. Fruits and vegetables juice processing technology. Westport: AVI, 1028p.
- Wu, Q.; Tao, X.Y.; Ai, X.Z.; Luo, Z.H.; Mao, L.C.; Ying, T.J.; Li, L., 2018. Contribution of abscisic acid to aromatic volatiles in cherry tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit during postharvest ripening. *Plant Physiol. Biochem.* 130, 205-214.
<https://10.1016/j.plaphy.2018.06.039>
- Yemm, E.W.; Willis, A.J., 1954. The estimation of carbohydrates in plants extracts by anthrone. *Biochem. J.* 57, 508-514. <https://doi.org/10.1042/bj0570508>.
- Yu, Y.Y., Dou, G.X., Sun, X.X., Chen, L., Zheng, Y., Xiao, H.M., Wang, Y.P., Li, H.Y., Guo, J.H., Jiang, C.H., 2021. Transcriptome and Biochemical Analysis Jointly Reveal the Effects of *Bacillus cereus* AR156 on Postharvest Strawberry Gray Mold and Fruit Quality. *Front. Plant Sci.*, 12, 700446.
<https://10.3389/fpls.2021.700446>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP), como *Bacillus subtilis*, pode induzir várias características fisiológicas no tecido vegetal além de promover a resistência a doenças e tolerância ao estresse biótico, podendo ser altamente empregado durante o manuseio, transporte e armazenamento pós-colheita. Deste modo, o *B. subtilis* possui potencial para aumentar a resistência e a qualidade de frutos e hortaliças durante as condições adversas do período pós-colheita.

No estudo I, a aplicação de diferentes doses do biofungicida à base de *Bacillus subtilis* causou mudanças significativas nas características físico-químicas dos frutos de tomate, indicando potencial para prolongar sua vida de prateleira. Foi observado que o biofungicida influenciou os níveis de sólidos solúveis, acidez, ácido ascórbico e cítrico, compostos fenólicos, capacidade antioxidante, peroxidação de lipídios, níveis de peróxido de hidrogênio, atividade de várias enzimas (como superóxido dismutase, catalase e peroxidase), açúcares redutores, amido e taxa de respiração.

Após a determinação das doses ótimas, como 4 e 6 L ha⁻¹, foi possível avaliar com maior precisão o efeito do *Bacillus* na conservação pós-colheita de frutos armazenados. A aplicação pré-colheita de *B. subtilis* teve impacto positivo na fisiologia pós-colheita dos frutos de tomate, desencadeando uma série de respostas bioquímicas. Isso incluiu a ativação da enzima fenilalanina amônia-liase, envolvida na síntese de compostos fenólicos, e da enzima polifenoloxidase, ambas contribuindo para a resistência dos frutos, bem como enzimas relacionadas ao sistema antioxidante, como superóxido dismutase, catalase e peroxidase. Consequentemente, essa influência promoveu aumento na resistência dos frutos, prolongando assim o tempo de armazenamento.

Além disso, em ambos os estudos, a presença de *B. subtilis* foi eficiente na redução dos danos de membrana nos frutos de tomate, diminuindo a peroxidação lipídica. Com a manutenção da integridade do tecido vegetal, os frutos apresentaram maior estabilidade da membrana celular e firmeza, o que reduziu sua deterioração. O tempo de prateleira dos frutos, que apresentavam maior retenção da textura, foi favorecido pela restrição das enzimas pectinolíticas, responsáveis pelo amolecimento e estas foram significativamente menores sob a ação do biofungicida.

Os resultados desta pesquisa indicam que a dose de 6 L ha⁻¹ de biofungicida contendo *B. subtilis*, aplicada em pré-colheita, é eficaz na promoção desses efeitos

benéficos nas características que influenciam o tempo de conservação dos frutos. Contudo, são necessários estudos adicionais e a implementação generalizada desta abordagem em práticas agrícolas em outros locais, com diferentes cultivares e formas de aplicação do biofungicida (pós-colheita ou em associação pré e pós-colheita), para definir melhor a atuação da BPCP nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos de frutos sadios, fornecendo assim mais informações sobre o potencial impacto positivo deste biofungicida e contribuindo para avanços significativos no setor agrícola.

Vale ressaltar que algumas dificuldades foram enfrentadas durante o estudo, como a logística com o transporte dos frutos do local de armazenamento até o local das análises, o número de análises a serem realizadas entre os intervalos de avaliações e a infraestrutura limitada. Apesar desses desafios, os resultados foram promissores e trouxeram muitas respostas e inovações ao meio científico, destacando o potencial do uso de *B. subtilis* na conservação pós-colheita de tomates.

REFERÊNCIAS

- AMBRICO, A.; TRUPO, M. Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus subtilis* ET-1, an Iturin A producer strain, on biocontrol of green and gray mold. **Postharvest Biology and Technology**, v. 134, p. 5-10, 2017.
- ARROYAVE-TORO, J. J.; MOSQUERA, S.; VILLEGAS-ESCOBAR, V. Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. **Biological Control**, v. 114, p. 195-200, 2017.
- BACKER, R. *et al.* Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. **Frontier in Plant Science**, v. 9, p. 1-17, 2018.
- BELAY, Z. A.; CALEB, O. J. *et al.* Role of integrated omics in unravelling fruit stress and defence responses during postharvest: A review, Food Chemistry: **Molecular Sciences**, v. 5, p. 1-9, 2022.
- CHANDRASEKARAN, M. *et al.* *Bacillus subtilis* CBR05 for Tomato (*Solanum lycopersicum*) Fruits in South Korea as a Novel Plant Probiotic Bacterium (PPB): Implications from Total Phenolics, Flavonoids, and Carotenoids Content for Fruit Quality. **Agronomy**, v. 9, p. 1-12, 2019.
- CHEN, J. *et al.* Effects of procyanidin treatment on the ripening and softening of banana fruit during storage. **Scientia Horticulturae**, v. 292, p. 1-8, 2022.
- DIOUF, IA. *et al.* Water deficit and salinity stress reveal many specific QTL for plant growth and fruit quality traits in tomato. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-13, 2018.
- FAN, Y. *et al.* Cell-Free Supernatant of *Bacillus subtilis* Reduces Kiwifruit Rot Caused by *Botryosphaeria dothidea* through Inducing Oxidative Stress in the Pathogen. **Journal of Fungi**, v. 9, p. 1-17, 2023.
- FAOSTAT. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Acesso em 15 de abril de 2023.
- FAROOQ, S. *et al.* Physicochemical and nutraceutical properties of tomato powder as affected by pretreatments, drying methods, and storage period. **International Journal of Food Properties**, v. 23, n. 1, p. 797–808, 2020.
- GAO, H. *et al.* Isolation, identification and characterization of *Bacillus subtilis* CF-3, a bacterium from fermented bean curd for controlling postharvest diseases of peach fruit. **Food Science and Technology Research**, v. 22, n. 3, p. 377-385, 2016.
- GARGANESE, F. *et al.* Pre - and postharvest application of alternative means to control *Alternaria* Brown spot of citrus. **Crop Protection**, v. 121, p. 73-79, 2019.
- HENZ, GP. Postharvest losses of perishables in Brazil: what do we know so far? **Horticultura Brasileira**, v. 35: p. 006-013, 2017.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estatísticas Econômicas**. 2024. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/39369-em-fevereiro-ibge-preve-safra-de-300-7-milhoes-de-toneladas-para-2024>. Acesso em 08 mai 2024.

INESTROZA-LIZARDO, C. *et al.* Hyperbaric pressure combined with refrigeration vs conventional refrigeration: Ripening and senescence processes of tomatoes, **Scientia Horticulturae**, v. 289, p. 1-7, 2021.

IQBAL, N. *et al.* Ethylene Role in Plant Growth, Development and Senescence: Interaction with Other Phytohormones. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-19, 2017.

KILANI-FEKI, O. *et al.* Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. **Biological. Control**, v. 95, p. 73-82, 2016.

LASTOCHKINA, O. *et al.* *Bacillus* Spp.: Efficient Biotic Strategy to Control Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. **Plants**, v. 8, n. 97, p. 1-24, 2019.

LASTOCHKINA, O. *et al.* Effects of Endophytic *Bacillus Subtilis* and Salicylic Acid on Postharvest Diseases (*Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*) Development in Stored Potato Tubers. **Plants**, v. 9, n. 76, p. 1-22, 2020.

LI, R. *et al.* Comparative Analyses of Ripening, Texture Properties and Cell Wall Composition in Three Tropical Fruits Treated with 1-Methylcyclopropene during Cold Storage. **Horticulturae**, v. 9, p. 1-14, 2023.

LI, Y. *et al.* Can the world's favorite fruit, tomato, provide an effective biosynthetic chassis for high-value metabolites. **Plant Cell Reports**, v. 37, p. 1443–1450, 2018.

NAZAR, R. *et al.* Involvement of ethylene in reversal of salt-inhibited photosynthesis by sulfur in mustard. **Physiologia Plantarum**, v. 152, 331-344, 2014.

NICOSIA, M. G. L. D. *et al.* Control of postharvest fungal rots on citrus fruit and sweet cherries using a pomegranate peel extract. **Postharvest Biology Technology**, v. 114, pp. 54-61, 2016.

PATEL, M. K. *et al.* Phenylalanine: A promising inducer of fruit resistance to postharvest pathogens. **Food**, v. 9, n. 6, p. 1-12, 2020.

POTT, D. M.; VALLARINO, J. G.; OSORIO, S. Metabolite Changes during Postharvest Storage: Effects on Fruit Quality Traits. **Metabolites**, v. 10, n. 5, p.1-24, 2020.

QUINET, M. *et al.* Tomato Fruit Development and Metabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1-23, 2019.

RAIOLA, A. *et al.* Enhancing the health-promoting effects of tomato fruit for biofortified food. **Mediators Inflammation**, p. 1-16, 2014.

REZK, A. *et al.* Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Breeding Strategies for Biotic and Abiotic Stresses. In: Al-Khayri, J.M., Jain, S.M., Johnson, D.V. (eds) **Advances in Plant Breeding Strategies: Vegetable Crops**. Springer, Cham., 2021.

SANTOS, S. F. D. *et al.* Post-harvest losses of fruits and vegetables in supply centers in Salvador, Brazil: Analysis of determinants, volumes and reduction strategies. **Waste Management**, v. 101, p. 161-170, 2020.

SARMA B.K. *et al.* Bacteria in Agrobiology: Stress Management. Springer; Berlin/Heidelberg, Germany: **Rhizobacteria mediated induced systemic tolerance in plants: Prospects for abiotic stress management**; p. 225–238, 2012.

SCHREUDER, W. *et al.* Postharvest fungicide treatments and cold storage control citrus black spot infections, **Crop Protection**, v. 12, p. 332-342, 2018.

SHEHATA, S. A. *et al.* Extending Shelf Life and Maintaining Quality of Tomato Fruit by Calcium Chloride, Hydrogen Peroxide, Chitosan, and Ozonated Water. **Horticulturae**, v. 7, p. 1-15 , 2021.

SHIMSHONI, J. A. *et al.* Postharvest fungicide for avocado fruits: antifungal efficacy and peel-t-pulp distribution kinetics. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 124, 2020.

SIDRA – SISTEMA BRASILEIRO DE RECUPERAÇÃO AUTOMÁTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. 2022. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. Acesso em: 18 abr 2023.

WANG, X. *et al.* Investigating the resistance responses to *Alternaria brassicicola* in 'Korla' fragrant pear fruit induced by a biocontrol strain *Bacillus subtilis* Y2. **Postharvest Biology and Technology**, v. 199, p. 1-13, 2023.

WARRA, A. A; PRASAD, M. N. V. Chapter 16 - **African perspective of chemical usage in agriculture and horticulture—their impact on human health and environment**, Editor(s): Majeti Narasimha Vara Prasad, Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation, Butterworth-Heinemann, p. 401-436, 2020.

WISNIEWSKI, M. *et al.* Alternative management technologies for postharvest disease control: The journey from simplicity to complexity. **Postharvest. Biology Technology**, v. 122: p. 3–10, 2016.

YUN, Z. *et al.* Comparative transcriptomics and proteomics analysis of citrus fruit, to improve understanding of the effect of low temperature on maintaining fruit quality during lengthy post-harvest storage. **Journal Experimental Botany**, v. 63, n. 8, p.2873–2893, 2012.

ZHOU, M. *et al.* *Bacillus subtilis* CF-3 Volatile Organic Compounds Inhibit *Monilinia fructicola* Growth in Peach Fruit. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1-11, 2019.

ZHOU, Q. *et al.* Application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* NCPSJ7 against *Botrytis cinerea* in postharvest red globe grapes. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 1499– 1508, 2020.