



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

CATIELE SILVA DE OLIVEIRA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS EM ASSOCIAÇÃO COM SUBSTÂNCIAS GRAS
(*Generally recognized as safe*) PARA O CONTROLE DA ANTRACNOSE
(*Colletotrichum gloeosporioides*) EM MANGA PÓS-COLHEITA**

**Palmas, TO
2024**

Catiele Silva de Oliveira

Seleção de leveduras em associação com substâncias GRAS (*Generally recognized as safe*) para o controle da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em manga pós-colheita

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins (UFT), como requisito à obtenção do grau de Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador (a): Dr. Raphael Sanzio Pimenta

Coorientador(a): Dr^a Eskálath Morganna Silva Ferreira

**Palmas, TO
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- O48s Oliveira, Catielle Silva de.
Seleção de leveduras em associação com substâncias GRAS (Generally recognized as safe) para o controle da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em manga pós-colheita. / Catielle Silva de Oliveira. – Palmas, TO, 2024.
46 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2024.
Orientador: Raphael Sanzio Pimenta
Coorientador: Eskálath Morganna Silva Ferreira
1. Podridão por antracnose. 2. Controle da doença. 3. Leveduras amazônicas. 4. Carbonato de sódio. I. Título

CDD 664

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Catiele Silva de Oliveira

Seleção de leveduras em associação com substâncias GRAS (*Generally recognized as safe*) para o controle da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) pós-colheita em manga

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos foi avaliada para a obtenção do título de Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 09/07/2024

Banca Examinadora



Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales, UFT



Prof. Dr. Álvaro Carlos Gonçalves Neto, UFRPE



Prof. Dr. Raphael Sanzio Pimenta, UFT

À incessante busca pelo conhecimento, à superação de desafios e à perseverança que me trouxe até aqui. Aos que abrilhantaram meu caminho e aos desafios que moldaram meu percurso acadêmico.

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

À todos aqueles que me acompanharam ao longo do meu percurso acadêmico e na efetivação desta dissertação.

À todos os professores que fizeram parte do meu processo de aprendizagem durante esses dois anos. Em especial ao meu orientador Prof. Dr. Raphael Sanzio Pimenta e a Prof^ª. Dr^ª. Juliana Fonseca Moreira da Silva.

À minha coorientadora, Prof^ª. Dr^ª. Eskálath Morganna Silva Ferreira, por toda a sua dedicação, compreensão, disponibilidade e pelo conhecimento transmitido que foi fundamental para a realização da minha pesquisa.

Aos membros examinadores da minha banca, Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales, Prof. Dr. Harllen Sandro Alves Silva e Prof. Dr. Álvaro Carlos Gonçalves Neto, pela enorme contribuição.

À Universidade Federal do Tocantins, juntamente com a Capes, pelo incentivo dado aos alunos.

Agradeço também, a todos aqueles com que contactei e que tiveram um importante contributo para a realização da minha pesquisa, em especial aos meus IC's: Amanda, Eduardo, Guilherme, Rafael, Gisele e Ester, disponibilizando tempo e conhecimento para a sua concretização.

Finalmente, quero agradecer aos meus amigos do LMGA (Thais, Paulo, Diana, Fabrícia) pelo apoio dado durante todo o percurso da minha jornada dentro do laboratório. Aprendi muito com cada um. Vocês são especiais.

Muito obrigada!

RESUMO

A *Mangifera indica* L., conhecida popularmente como mangueira, é uma cultura pertencente à família *Anacardiaceae*, originária da Índia, cultivada, geralmente, em regiões tropicais e subtropicais, apresentando diversos fatores que influenciam diretamente na sua qualidade, tais como a escolha da variedade mais adequada para cada região, o controle de pragas e patógenos, a irrigação e a adubação. O controle de doenças pós-colheita em frutos tropicais e subtropicais desempenha um aspecto importante na prevenção das perdas durante o armazenamento e comercialização. Entretanto, a utilização indiscriminada de fungicidas químicos tem acarretado consequências adversas tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente. Diante desse cenário, o presente estudo objetivou avaliar uma estratégia para o controle do fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose, mediante a utilização de leveduras amazônicas associadas a substâncias GRAS, tanto na abordagem do controle clássico quanto integrado, visando a redução da incidência e severidade da antracnose em mangas pós-colheita. Foram selecionadas cepas de leveduras de três frutos amazônicos. Sendo reativadas um total de 300 isolados, dentre estas foram escolhidas três leveduras (LB29, LT76, LP101) e a substância carbonato de sódio como possíveis agentes controladores. A escolha das leveduras com potencial inibitório contra o patógeno, baseou-se na avaliação de teste de crescimento em diferentes temperaturas, verificação da produção das enzimas pectinase e celulase e observação da produção de substâncias antagônicas difusíveis e voláteis contra o fitopatógeno. Nos testes *in vivo* de controle clássico, as cepas LB29 e LT76 conseguiram reduzir de forma isolada a incidência da podridão causada por *C. gloeosporioides* em cerca de 20% e 30% e da severidade em 69% e 58%, respectivamente. Já no controle integrado à substância GRAS, o carbonato de sódio em conjunto com as cepas LB29 e LT76 diminuíram 50% da incidência e 69 e 58% da severidade, respectivamente. Por outro lado, o carbonato de sódio reduziu sozinho, a incidência e severidade em 90%. Portanto, foi verificada a eficácia das duas leveduras associadas à substância GRAS em reduzir um pouco mais de 50% da severidade da doença, bem como o carbonato de sódio, de forma isolada, reduzindo significativamente a incidência e severidade da doença. Isso evidencia que a seleção dessas leveduras e da substância pode ser uma estratégia promissora de controle contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* em manga pós-colheita.

Palavras-chaves: Podridão por antracnose. Controle da doença. Leveduras amazônicas. Carbonato de sódio.

ABSTRACT

Controlling post-harvest diseases in tropical fruits plays an important aspect in preventing losses during storage and marketing. The indiscriminate use of chemical fungicides has had adverse consequences for both human health and the environment. Given this scenario, the present study aimed to propose a strategy for controlling the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of anthracnose, exploring the potential for inhibiting this pathogen through the use of Amazonian yeasts associated with GRAS substances, both in the classical and integrated control approach, seeking to evaluate the reduction in the incidence and severity of pathology in post-harvest mangoes. Yeasts were selected from three Amazonian fruits. A total of 300 isolates were reactivated, among these, three yeasts (LB29, LT76, LP101) and the substance sodium carbonate were chosen as possible controlling agents. The choice of antagonistic biocontrol yeasts was based on the evaluation of growth tests at different temperatures, verification of the production of pectinase and cellulase enzymes and observation of the production of antagonistic substances against the phytopathogen. In *in vivo* tests of classical biological control, strains LB29 and LT76 were able to reduce the incidence of the disease caused by *C. gloeosporioides* by around 20 and 30% and 69 and 58% of severity, respectively, while in the integrated control the substance GRAS (sodium carbonate) together with strains LB29 and LT76 decreased incidence by 50 and 50% and severity by 69 and 58%, respectively. On the other hand, sodium carbonate alone reduced the incidence by 90% and the severity by 90%. After the experiment, the effectiveness of yeast associated with the GRAS substance in reducing a little more than 50% of the severity of the disease was verified, as well as just the GRAS substance significantly reducing the incidence and severity of the disease, through classical and integrated control. This shows that the selection of these yeasts and the GRAS substance can be a promising strategy for controlling anthracnose disease in mango.

Key-words: Anthracnose rot. Disease control. Amazonian yeasts. Sodium carbonate.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1 A Cultura da manga	12
2.2 Perdas pós-colheita	13
2.3 Colletotrichum gloeosporioides	13
2.4 Controle biológico	14
2.5 Controle integrado a substâncias GRAS	15
2.6 Potencial antagônico de leveduras amazônicas	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo Geral	16
3.1.1 Objetivos Específicos	16
4. METODOLOGIA	17
4.1 Colletotrichum gloeosporioides	17
4.2 Cultivo das leveduras	17
4.2.1 Identificação morfológica	17
4.3 Seleção de leveduras antagônicas	18
4.3.1 Teste de crescimento em diferentes temperaturas	18
4.3.2 Teste de produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas	18
4.3.3 Teste de produção de compostos difusíveis e voláteis	19
4.4 Atividade antifúngica de substâncias GRAS contra o patógeno	19
4.4.1 Teste de resistência das leveduras a substâncias GRAS	20
4.5 Uso de levedura e substância GRAS no controle do C.gloeosporioides (in vivo)	20
4.5.1 Controle biológico clássico	20
4.5.2 Controle integrado a substância GRAS	21
5. RESULTADOS E ANÁLISE	22
5.1 Reativação e caracterização morfológica	22
5.2 Seleção de leveduras amazônicas com potencial antagônico	24
5.2.1 Verificação de crescimento em diferentes temperaturas	24
5.2.2 Verificação da produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas	25
5.2.3 Verificação da produção de compostos difusíveis e voláteis	27
5.2.4 Verificação da atividade antifúngica de substâncias GRAS contra o patógeno	28
5.2.5 Verificação da resistência das leveduras a substâncias GRAS	31
5.3 Verificação da inibição de crescimento (in vivo) do C. gloeosporioides utilizando controle biológico e o controle integrado a substâncias GRAS	32
5.3.1 Leveduras LB29, LT76, LP101 e Carbonato de sódio	33
CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

Uma das principais espécies de fungos que infectam os frutos da mangueira na fase pós-colheita é o *Colletotrichum gloeosporioides* (MELO *et al.*, 2021), agente causal da antracnose, que ocasiona podridão no fruto (REZENDE *et al.*, 2020). Essa doença é conhecida mundialmente, principalmente por infectar frutos de origem tropicais tais como manga, mamão, uva, amoras, morangos, (OLIVEIRA *et al.*, 2019), entre outras. O *C. gloeosporioides* apresenta maior prevalência em mangas cultivadas e armazenadas em regiões de áreas com climas quentes e úmidos. Essas condições proporcionam um ambiente ideal para a germinação dos esporos, crescimento do micélio e posterior infecção (KAMEI *et al.*, 2020).

Para evitar perdas durante a conservação e o comércio de frutos tropicais, é de fundamental importância controlar patologias que surjam na fase pós-colheita (JOHN; BABU, 2021). Métodos inadequados de colheita e armazenamento facilitam a disseminação do fungo. Danos mecânicos durante a colheita e o armazenamento prolongado, em condições úmidas, também favorecem a penetração e proliferação do patógeno (SOUSA *et al.*, 2022). O entendimento desses fatores é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle e manejo da doença, visando mitigar os impactos negativos na produção e qualidade final dos frutos. (SANTOS *et al.*, 2022).

Historicamente, o uso de fungicidas químicos tem sido a estratégia mais empregada para o controle dessas patologias (ECULICA; DOMINGOS; SERRANO, 2021). No entanto, a aplicação indiscriminada desses fungicidas sintéticos têm um impacto negativo à saúde humana e ao meio ambiente (JOHN; BABU, 2021), podendo desencadear uma série de enfermidades graves ao homem, dentre as mais preocupantes estão: alterações nos hormônios da tireoide, câncer uterino, insuficiência renal crônica, e desenvolvimento de leucemia mieloide (BRAGA *et al.*, 2020). Quatro das maiores nações consumidoras de produtos químicos agrícolas, são os Estados Unidos, a União Europeia, a China e o Brasil (FREITAS, 2019). O uso indiscriminado de agrotóxicos afeta todos os continentes, desde pequenas áreas urbanas até grandes propriedades rurais (COUDEL *et al.*, 2021). O número de casos notificados de intoxicação por agrotóxicos registrou um aumento de duas vezes entre 2007 e 2016 (CARVALHO *et al.*, 2022), e diversas autoridades de saúde e órgãos ambientais alertaram sobre os riscos do uso excessivo. Acredita-se que, se a política agrícola não for alterada urgentemente, o custo ambiental para os agricultores e para os consumidores, pode acabar superando a produção agrícola (ALCANTARA *et al.*, 2019).

Estratégias estão sendo adotadas para substituição deste controle, incluindo abordagens químicas menos severas ou associadas com métodos menos nocivos, métodos físicos e, principalmente, os que envolvam a aplicação de agentes de biológicos (FONTANA *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2023).

Entre as diferentes abordagens, o controle biológico pós-colheita está se tornando cada vez mais popular no Brasil e em todo o mundo (SOUSA *et al.*, 2022). Essa técnica, envolve o uso de organismos vivos ou seus produtos com o objetivo de reduzir ou eliminar a atividade de pragas e patógenos (DWIASTUTI *et al.*, 2021). A prevalência do uso pode ser explicada pela crescente intersecção com as preocupações ambientais, maior segurança alimentar para o consumidor final, maiores exigências das regulamentações governamentais, inovação e avanços tecnológicos frequentes, além da alta procura dos consumidores por uma alimentação mais saudável e sustentável. Esses são os principais fatores estimulantes na disseminação e aplicação de abordagens mais seguras (SINGH *et al.*, 2023).

Uma ampla gama de microrganismos tem sido explorada quanto à aplicabilidade em controle biológico pós-colheita. No entanto, o emprego de leveduras antagonistas tem recebido atenção especial devido às suas características, como a presença natural na superfície dos frutos, capacidade de competir por nutrientes, colonizar rapidamente a superfície dos frutos e a sua tolerância a fungicidas (DROBY *et al.*, 2022). Ainda, as leveduras apresentam uma alta adaptação ao ambiente em que vivem, o que aumenta a probabilidade de resistirem às condições adversas encontradas comumente, como extremos de temperaturas e umidade (ELNAHAL *et al.*, 2022).

Geralmente, a eficácia do controle pode ser melhorada pela combinação da utilização de leveduras antagônicas com adição do uso de substâncias GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (CORRÊA, 2020). Substâncias definidas como conservantes alimentares que tem um longo histórico de uso seguro na alimentação humana ou que foram submetidas a avaliações de segurança e consideradas seguras para consumo. Essas avaliações incluem dados toxicológicos e informações sobre a exposição do consumidor ao uso (SHAHBAZ *et al.*, 2022).

A FDA (*Food and Drug Administration*) garante que as essas substâncias sejam isentas de preocupações relacionadas à presença de resíduos em produtos agrícolas (NOR; DING, 2020). Isso significa que, quando usadas de acordo com as diretrizes estabelecidas, não representam riscos de contaminação ou de efeitos adversos à saúde humana, tornando-se

uma estratégia em contraposição à aplicação de fungicidas químicos mais nocivos (FERREIRA *et al.*, 2019). Reduzindo os riscos de contaminação dos alimentos e os impactos negativos ao meio ambiente (BOLZANI, 2019).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A Cultura da manga

A *Mangifera indica* L., conhecida popularmente como mangueira, é uma cultura pertencente à família *Anacardiaceae*, originária da Índia (DEMARTELAERE *et al.*, 2021). Cultivada geralmente em regiões tropicais e subtropicais (BILL *et al.*, 2021), apresenta diversos fatores que influenciam diretamente na sua qualidade, como a escolha da variedade mais adequada para cada região, o controle de pragas e patógenos, a irrigação e a adubação (AHMAD *et al.*, 2019). Além disso, é importante que haja um controle dos padrões de colheita e de maturação, garantindo a qualidade e a durabilidade dos frutos colhidos (RAJAPAKSHA *et al.*, 2021).

A manga é uma fruta climatérica que possui grande relevância econômica, apreciada, principalmente, por suas características sensoriais tais como coloração (variando de verde a amarelo, laranja e vermelho), fragrância e sabor agradável. Seu consumo pode ser realizado como produto processado em sucos, sorvetes, doces, tanto como *in natura* (MAURÍCIO-SANDOVAL *et al.*, 2023). A fruta é rica em nutrientes, a exemplo de vitamina C, vitamina A, potássio, fibras e antioxidantes, que contribuem para o fortalecimento do sistema imunológico (AKBARI *et al.*, 2022).

Essa cultura constitui uma importante fonte de renda para muitos produtores rurais e exportadores do fruto (PARROT *et al.*, 2022). Entretanto, é considerada uma fruta altamente perecível, demandando cuidados especiais após a colheita para evitar perda de qualidade, redução do tempo de conservação e perda de valor de mercado (LE *et al.*, 2022). O armazenamento inadequado pode levar a uma rápida deterioração da fruta, ocasionando aparência desagradável, diminuição do sabor e textura, além da perda de nutrientes (NTSOANE *et al.*, 2019).

Outro aspecto importante para a conservação pós-colheita da manga, é a utilização de técnicas de processamento e embalagem adequadas. O processamento pode incluir a desinfecção, a remoção de impurezas e partes danificadas, o corte e a embalagem em atmosfera modificada, controle biológico pós-colheita, entre outros métodos (TAVASSOLI-KAFRANI *et al.*, 2022). Contudo, para garantir a sustentabilidade do cultivo e

a produção adequada da cultura, é necessário solucionar os desafios enfrentados, incluindo questões de saúde pública e socioambientais (BHATIA *et al.*, 2023).

2.2 Perdas pós-colheita

As perdas pós-colheita são um problema comum em muitas regiões produtoras da cultura da manga, especialmente em países tropicais e subtropicais (ZAKARIA, 2021). A antracnose é a doença de maior relevância nesta cultura, causada principalmente pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, podendo infectar todas as partes da planta, incluindo os frutos. Os sintomas caracterizam-se por manchas escuras e encharcadas na casca, que podem evoluir para feridas necróticas maiores, culminando na deterioração da polpa (PAUDEL *et al.*, 2022).

Essas perdas podem ocorrer devido à infecção pré-colheita ou pós-colheita da fruta. A infecção pré-colheita é comumente causada por esporos do fungo presentes no ar, no solo ou em material vegetal infectado. Já na fase pós-colheita, principalmente durante o armazenamento, as perdas podem ser agravadas por danos mecânicos no fruto, criando um ambiente propício para a proliferação do fungo. Além disso, condições inadequadas de temperatura e umidade também podem contribuir significativamente para o crescimento do patógeno e conseqüentemente a deterioração acelerada do fruto (KERSTEN *et al.*, 2023).

Em todos os casos, a prevenção é a melhor estratégia para reduzir as perdas pós-colheita por doenças fúngicas. A higiene e a limpeza dos equipamentos, embalagens e locais de armazenamento são fundamentais para evitar a contaminação (BHARDWAJ; LATA; GARG, 2023).

Contudo, é importante destacar que a prevenção e o controle das doenças fúngicas na manga devem ser uma atividade contínua, envolvendo toda a cadeia produtiva, desde os produtores até o consumidor final. A adoção de boas práticas agrícolas e o uso de tecnologias adequadas são fundamentais para garantir a qualidade e a segurança alimentar, além de assegurar a sustentabilidade da produção (BHARDWAJ; LATA; GARG, 2023).

2.3 *Colletotrichum gloeosporioides*

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* é um patógeno que afeta diversas culturas importantes, incluindo manga, mamão, banana, maracujá e abacate (ZAKARIA, 2021). Esse fungo é responsável por causar uma doença conhecida como antracnose, que causa lesões escuras nas folhas, frutos e caules das plantas afetadas (LOKARE; FÁTIMA; JAGDALE, 2021). Esse patógeno é uma espécie de ascomiceto que se reproduz sexualmente e

assexuadamente (TRONSMO *et al.*, 2020). A reprodução sexual ocorre por meio de esporos sexuais que são produzidos em estruturas denominadas peritécios, enquanto a reprodução assexual ocorre por meio de esporos aéreos chamados conídios (ALIYARUKUNJU; HARIDAS; SUGATHAN, 2023).

O controle da antracnose causada por *C. gloeosporioides* pode ser feito por meio de medidas preventivas, como a eliminação de fontes de infecção, a poda de ramos doentes e a utilização de fungicidas (KUMAR; SHARMA; BISEN, 2022). Além disso, também é importante realizar boas práticas agrícolas, como a rotação de culturas e a utilização de variedades de plantas resistentes (PAUDEL *et al.*, 2022).

É importante aderir por soluções estratégicas, além do uso de fungicidas químicos para eliminar essas doenças, por exemplo o uso de substâncias naturais tais como o uso de extratos vegetais e microrganismos com potencial de combater a ação do fungo fitopatígeno (EL KHETABI *et al.*, 2022). Essas abordagens podem ser uma alternativa aos fungicidas químicos, os quais apresentam efeitos colaterais prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana (THERA, 2021).

2.4 Controle biológico

A proteção de frutos contra doenças e deterioração durante o armazenamento e o transporte, podem ser alcançadas de maneira sustentável e eficaz com o uso do controle biológico (BHARDWAJ *et al.*, 2023). Esse método consiste na utilização de microrganismos antagonistas, como bactérias, fungos e leveduras, que competem com os patógenos, reduzindo sua incidência e severidade (DWIASTUTI *et al.*, 2021). Outros métodos incluem o uso de práticas culturais adequadas, como rotação de culturas e manejo integrado de pragas, bem como a aplicação de produtos fitossanitários de origem natural. Essas abordagens visam reduzir a incidência e a gravidade de patógenos, promovendo a qualidade e a durabilidade dos frutos durante o processo pós-colheita (SINGH *et al.*, 2023).

Os microrganismos antagonistas podem ser encontrados naturalmente nas superfícies dos frutos ou podem ser aplicados como agentes de controle, associados ou não a outras substâncias (LAHLALI *et al.*, 2022). Eles interagem com os patógenos por meio de diferentes mecanismos, como a produção de compostos antimicrobianos, competição por nutrientes e espaço, parasitismo e predatismo (SINGH *et al.*, 2023). Além disso, o controle também pode ser combinado com outras técnicas de manejo, como por exemplo o controle de temperatura, para aumentar a eficácia do controle e não aparecimento de doenças e melhorar a qualidade dos frutos (KUSSTATSCHER *et al.*, 2020).

2.5 Controle integrado a substâncias GRAS

Em frutos tropicais pós-colheita, o controle também pode ser realizado associado à aplicação de substâncias GRAS (*Generally recognized as safe* - Geralmente reconhecidas como seguras), que são substâncias comumente presentes em alimentos e que apresentam baixo risco à saúde humana (FERREIRA *et al.*, 2019).

O uso dessas substâncias é uma técnica de controle que envolve o uso de ácidos graxos e seus ésteres como agentes antimicrobianos (NOR; DING, 2020). Os ácidos graxos são compostos orgânicos encontrados naturalmente em óleos e gorduras animais e vegetais, e seus ésteres são derivados desses compostos (SALIH; SALIMON, 2021). A aplicação dessas substâncias pode ser realizada por meio de aplicação, imersão, pulverização ou revestimento (FU; DUDLEY, 2021).

Contudo, o controle utilizando substâncias GRAS em pós-colheita é uma técnica promissora na prevenção de doenças, extensão da vida útil e melhoria da qualidade dos frutos (NOR; DING, 2020). Tais substâncias são reconhecidas como seguras e eficazes no controle de pragas e patógenos (SHAHBAZ *et al.*, 2022). No entanto, o sucesso desta técnica depende da seleção adequada do tipo e concentração de ácido graxo ou éster utilizados, bem como ao método de aplicação e às condições de armazenamento empregados (SCHARFE; FLÖTER, 2020).

2.6 Potencial antagônico de leveduras amazônicas

A região amazônica é conhecida por abrigar uma grande diversidade de espécies vegetais, muitas das quais ainda são pouco estudadas. Dentre essas espécies encontram-se diversas frutas, algumas das quais são amplamente comercializadas tanto no mercado local quanto à nível de exportação (CAMACAM; MESSIAS, 2020).

Em relação às frutas amazônicas, algumas leveduras têm sido isoladas e avaliadas como agentes biocontroladoras (VEGAS *et al.*, 2020). Entre elas, destaca-se a *Pichia guilliermondii*, que tem demonstrado eficácia no controle de fungos como *Penicillium*, *Fusarium* e *Aspergillus* em diversas frutas, como abacaxi, banana, maracujá e cupuaçu (JAIBANGYANG; NASANIT; LIMTONG, 2020).

Outra espécie estudada para o controle de patógenos em frutas amazônicas é a *Candida guilliermondii*, que se mostrou eficaz contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de açaí (SENA *et al.*, 2022). Além disso, outras espécies como a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Debaryomyces hansenii* têm sido objeto de investigação (VEGAS *et al.*, 2020).

Apesar dos resultados positivos, é importante destacar que o sucesso do uso de leveduras como agentes de controle biológico depende de diversos fatores, como a seleção de microrganismos eficazes, o desenvolvimento de formulações adequadas e a otimização das condições de aplicação (ELNAHAL *et al.*, 2022). Além disso, é de fundamental importância, assegurar que a aplicação desses microrganismos não acarrete prejuízos à qualidade dos frutos e não comprometa a segurança alimentar dos consumidores (TEIXIDÓ; USALL; TORRES, 2022).

Entretanto, a aplicação de leveduras isoladas de frutas amazônicas pode exercer um efeito positivo na economia regional, promovendo a produção e a utilização de bioprodutos locais, além de potencialmente abrir novas oportunidades de negócios para os produtores (NASCIMENTO *et al.*, 2022). Dessa forma, a adoção de práticas agrícolas mais sustentáveis e isentas de agentes nocivos na produção de frutas pode contribuir significativamente para a preservação ambiental e a promoção da saúde pública (VEGAS *et al.*, 2020).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Selecionar e avaliar o potencial antagônico de leveduras isoladas de três frutos amazônicos para o controle da antracnose pós-colheita em manga utilizando o método de controle biológico e o método de controle associado a substâncias GRAS (*Generally recognized as safe*).

3.1.1 Objetivos Específicos

- Realizar testes de controle biológico utilizando as leveduras selecionadas para determinar sua eficácia na redução da incidência e severidade do fungo *Colletotrichum Gloeosporioides*;
- Avaliar a eficiência do método de controle associado a substâncias GRAS na redução da podridão por antracnose em manga pós-colheita;
- Comparar os resultados dos diferentes métodos de controle (biológico, químico e associado a substâncias GRAS) em termos de eficácia na redução da infecção pelo fungo e preservação da qualidade dos frutos testados.

4. METODOLOGIA

4.1 *Colletotrichum gloeosporioides*

O fungo *C. gloeosporioides*, foi obtido a partir da coleção de culturas Carlos Rosa do Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada (LMGA) da Universidade Federal do Tocantins (UFT). Para a reativação, transferiu-se um disco contendo o micélio fúngico que estava criopreservado, para placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA), com tempo de incubação de sete dias em temperatura controlada (BOD) de 25 °C.

4.2 Cultivo das leveduras

As 300 leveduras utilizadas no experimento foram obtidas da coleção de culturas microbiológicas mantidas no Laboratório de Microbiologia Geral (LMA) da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Palmas-TO. Para a reativação, cada cultura foi crescida por 48 h a 25 °C (BOD) em tubos contendo meio líquido GYMP (1% de glicose, 1% de extrato de levedura, 0,02% de fosfato de sódio monobásico e 0,5% de peptona). Posteriormente ao crescimento, as colônias foram estriadas em placas de Petri por técnica de esgotamento, contendo meio de cultura NYDA (Agar Nutriente Dextrose de Levedura) (composto por 1,8% de ágar, 3% de extrato de carne, 1% de glicose, 0,5% de extrato de levedura e 0,5% de peptona), e incubadas durante 48 h a 25°C (BOD). Ao final do processo, as colônias de leveduras foram avaliadas quanto a sua pureza, utilizando lâminas de verificação para visualização das suas características morfológicas. Contudo, após a realização de uma triagem, somente as leveduras que resistiram a todos os testes de classificação, foram selecionadas para seguir no experimento.

4.2.1 Identificação morfológica

Os isolados foram caracterizados a partir da visualização morfológica das colônias reativadas. As características das colônias, como tamanho, bordas, elevação, cor e aspectos específicos foram observadas para caracterizar o fenômeno macroscópico (KURTZMAN *et al.*, 2011). Em seguida, a visualização das características microscópicas foi avaliada com o uso de lâminas a fresco para observar o brotamento e a predominância da morfologia celular previamente existente para fins de comprovação. Para posterior armazenamento e conservação, cada amostra purificada dos isolados, foi preservada em tubos criogênicos contendo meio líquido GYMP (com 1% de glicose, 1% de extrato de levedura, 0,02% de fosfato de sódio

monobásico e 0,5% de peptona) adicionado de 20% de glicerol e mantidos a -80 °C de temperatura.

4.3 Seleção de leveduras antagônicas

Foram realizados testes prévios de seleção para observar a capacidade das leveduras quanto ao seu potencial antagônico ao fitopatógeno, tais como: crescimento e armazenamento dos isolados em diferentes temperaturas de crescimento; capacidade de produzir enzimas pectinolíticas e celulolíticas; capacidade de produção de compostos antifúngicos difusíveis e voláteis; e capacidade de resistência à diferentes substâncias GRAS. Somente as leveduras que apresentaram potencial inibitório contra o fungo causador da antracnose, foram selecionadas para seguirem no experimento.

4.3.1 Teste de crescimento em diferentes temperaturas

As leveduras restantes foram testadas quanto à capacidade de crescer em 10 °C, 25 °C e 37°C de temperatura, com finalidade de avaliar se as cepas eram capazes de resistir a temperaturas que geralmente são utilizadas no acondicionamento e armazenamento dos frutos. Para tanto, as leveduras foram estriadas em placas de Petri contendo meio de cultura NYDA e incubadas em cada temperatura citada anteriormente, para as temperaturas de 25°e 37°C as placas foram mantidas por um período de 72 horas de incubação em BOD, no entanto, as cepas submetidas a 10 °C foram mantidas em BOD por um período de 5 dias. (MARTINEZ *et al.*, 2016).

4.3.2 Teste de produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas

O método de Carrasco *et al.* (2012) foi utilizado para realizar o teste de produção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas, com algumas adaptações. O experimento começou com um pré-crescimento das leveduras em meio NYDA por 48 horas antes do início dos testes. Para o teste de enzimas celulolíticas, as leveduras foram estriadas em um meio de cultura sólido YNB (Yeast Nitrogen Base 0,67%) suplementado com 1% de celulose. As placas foram incubadas em BOD a 10 °C por 5 dias e a 25 °C e 37 °C por 72 hrs. Decorrido o período de incubação, a presença da enzima foi detectada usando uma solução reveladora de vermelho congo (0,1%) sobre a placa, seguida da lavagem com solução de NaCl 1M. A atividade enzimática foi considerada positiva quando houve formação de um halo claro em volta das colônias em um fundo avermelhado. Para avaliar se as leveduras eram produtoras de enzimas

pectinolíticas, foram cultivadas em placas de Petris contendo meio de cultura YNB, suplementado com 1% de pectina e pH ajustado para 6,0. As culturas foram incubadas em BOD a 10 °C por 5 dias e a 25 °C e 37 °C por 72 horas. Após a incubação, as culturas foram submetidas a um banho com uma solução de lugol a 1% para determinar a atividade enzimática. A atividade enzimática foi considerada positiva quando observado a formação de um halo claro em torno das colônias em um fundo amarronzado.

4.3.3 Teste de produção de compostos difusíveis e voláteis

Foi realizado um teste de antagonismo para verificação da produção de compostos difusos entre isolados de leveduras e *C. gloeosporioides*. Para tanto, as leveduras foram crescidas previamente em placas de Petri contendo meio de cultura NYDA utilizando a técnica de estrias em um dos lados da placa, e incubadas a 25 °C por 48 horas. Após o período de incubação e crescimento, um disco de 5 mm de diâmetro contendo micélio fúngico do fitopatógeno foi adicionado do lado oposto da placa. Para fins de controle, foram utilizadas placas contendo apenas o fungo causador da antracnose. Posteriormente, seguiu-se incubação a 25 °C por sete dias em BOD. O crescimento radial do patógeno foi medido em relação ao antagonista e posteriormente comparado ao raio da colônia controle.

Para determinação dos compostos voláteis, foi utilizado 50 µL de uma suspensão de células com 48 horas de crescimento a 10⁸ células/mL de cada cepa, determinada previamente por escala de Mcfarland, e espalhada uniformemente com alça de Drigalski em placas de Petri contendo meio NYDA. Em uma outra placa, depositou-se um disco de 5 mm de diâmetro do *C. gloeosporioides* contendo sete dias de crescimento. Ambas as placas foram juntadas e lacradas com duas camadas de Parafilme® com a finalidade de unir o conjunto de placas contendo o fungo e a levedura, simulando uma câmara fechada (ARRARTE *et al.*, 2017). O diâmetro das colônias foi mensurado na placa que continha o patógeno com auxílio de um paquímetro digital. Os diâmetros estimados foram comparados com o diâmetro observado no controle. O experimento foi realizado em triplicata.

4.4 Atividade antifúngica de substâncias GRAS contra o patógeno

A atividade antifúngica do ácido acético, ácido lático, ácido propiônico, bicarbonato de sódio, e carbonato de sódio frente ao fungo, foram analisados em conformidade com a

metodologia de Karaca *et al.* (2014) com algumas modificações. Para tanto, placas de Petri foram previamente preparadas contendo meio cultura NYDA e enriquecidas com os ácidos e sais nas concentrações de 1%, 3% e 5% (v/v). O *C. gloeosporioides* foi previamente ressuscitado em meio de cultivo NYDA e incubado a 25 °C por cinco dias. Após esse período, um disco micelial fúngico de 5 mm de diâmetro foi inserido no centro de cada placa contendo meio NYDA acrescido das substâncias GRAS, nas três concentrações selecionadas. Para fins de controle, foram utilizadas placas de Petri contendo o fitopatógeno sem a presença das substâncias. As culturas foram incubadas a 25 °C em BOD por 7 dias. O experimento foi realizado em triplicata e o resultado foi obtido pela mensuração do diâmetro da colônia fúngica em comparação com o diâmetro crescido no tratamento controle (KARACA *et al.*, 2014).

4.4.1 Teste de resistência das leveduras a substâncias GRAS

Utilizando as mesmas substâncias e concentrações selecionadas no ensaio anterior, procedeu-se à avaliação da sensibilidade dos isolados de leveduras restantes no experimento. Estas, foram previamente cultivadas em meio de cultura NYDA e incubadas a 25 °C durante 48 horas. As leveduras foram estriadas em meio NYDA enriquecido de substâncias GRAS: ácido acético, ácido láctico, ácido propiônico, bicarbonato de sódio e carbonato de sódio, nas concentrações de 1, 3 e 5% para cada substância avaliada. As culturas foram mantidas sob incubação a 25 °C por 48 horas em BOD.

4.5 Uso de levedura e substância GRAS no controle do *C.gloeosporioides* (*in vivo*)

4.5.1 Controle biológico clássico

Nesse experimento, foram utilizadas leveduras previamente selecionadas anteriormente, que apresentaram boas características como agentes de controle biológico, de acordo com os critérios estabelecidos no estudo. Foram utilizadas um total de 10 mangas para cada tratamento, incluindo: controle positivo, controle negativo e as concentrações de 1×10^7 e 1×10^8 células/mL de leveduras. Antes da inoculação de cada tratamento empregado, as mangas foram lavadas, sanitizadas e secas naturalmente. Em seguida, foi realizada uma lesão de aproximadamente 3 mm de largura e profundidade em cada fruto, onde foram depositados os inóculos.

Inicialmente, foi inoculada uma suspensão de células de leveduras de 10 μ L nas concentrações de 1x10⁷ e 1x10⁸ células/mL, a fim de determinar a cepa mais eficaz contra o fungo. Após a inoculação das leveduras, o fitopatógeno foi inoculado através da deposição de uma suspensão de conídios de 10 μ L do *Colletotrichum gloeosporioides* no local do ferimento. Os frutos foram colocados em bandejas de plástico, contendo chumaços de algodão embebido em água estéril, para manter a umidade relativa. Ao final do processo, os frutos foram então incubados a 25°C por 7 dias em uma câmara úmida utilizando uma bandeja plástica lacrada com tampa.

O controle positivo foi efetuado pela inoculação de 10 μ L da solução de esporos (1x10⁵ esporos/mL), enquanto o controle negativo foi produzido pela inoculação de 10 μ L de água destilada estéril. Após o período de incubação, a eficácia do controle foi avaliada através da interação entre o patógeno e as leveduras e/ou substância GRAS, determinando a incidência e severidade da doença.

A redução percentual da incidência e severidade da doença foram calculadas utilizando as equações propostas por Assis *et al.* (1999). A redução da incidência foi baseada na seguinte equação: $RID (\%) = (N^{\circ}Fd - N^{\circ}Ft) / N^{\circ}Fd \times 100$, onde N^oFd é o número de frutos afetados pela doença e N^oFt é o número de frutos tratados. Já a redução da severidade foi baseada pela equação: $RSD (\%) = (DLC - DLT) / DLC \times 100$, onde RSD representa a redução da severidade da doença, e DLC é o diâmetro da lesão no controle positivo, já DLT é o diâmetro das lesões dos frutos tratados.

4.5.2 Controle integrado a substância GRAS

O teste foi realizado buscando avaliar a eficácia da concentração de leveduras selecionadas integradas com substâncias GRAS, como medida de controle contra o fitopatógeno em frutos de manga. Para tanto, foram utilizados 10 frutos para cada tratamento, seguindo a metodologia descrita no item anterior. As frutas foram dispostas em bandejas de plástico lacradas, contendo algodão umedecido em água destilada estéril. Posteriormente, foram armazenados em temperaturas controladas de 25°C por 7 dias. Após o período de incubação, foi calculada a porcentagem de redução na incidência e a severidade da doença, seguindo as mesmas diretrizes do controle descrito no tópico anterior.

5. RESULTADOS E ANÁLISE

5.1 Reativação e caracterização morfológica

Foram obtidas 300 leveduras para uso no estudo, sendo 50% isoladas do fruto Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), 35% isoladas do fruto Pupunha (*Bactris gasipaes*) e 15% isoladas do fruto Bacupari (*Garcinia gardneriana*). A análise das características morfológicas das leveduras resultou em diferenças na elevação das colônias, com tipos de alta, plana, ondulada, inteira e côncava, variação na cor das colônias com tons de branco, creme, bege e salmão, e diferentes formas de bordas com características como regular, irregular, filamentosa, ondulada, circular e rizóides. As análises indicaram variação na aparência, com características cremosas, brilhantes e opacas (Tabela 1).

A alta biodiversidade da região amazônica, incluindo a presença de muitas espécies ainda não descobertas, pode explicar essa diversidade (COLLI; VIEIRA; DIANESE, 2020). Além disso, fatores ambientais, como temperatura, pH e nutrientes, podem influenciar na morfologia das leveduras. Múltiplas espécies de leveduras podem estar presentes em um mesmo fruto, contribuindo para a variedade observada (AGGARWAL; MISHRA, 2022).

Tabela 1: Caracterização morfológica de leveduras isoladas de frutos amazônicos

Código	Quantidade	Percentual	Elevação	Borda	Cor	Aspecto
Leveduras Tucumã						
LT	69	46%	Alta	Regular	Branca	Opaca
LT	30	20%	Plana	Filamentosa	Branca	Brilhante
LT	51	34%	Plana	Ondulada	Branca	Opaca
150						
Leveduras Pupunha						
LP	15	14,28%	Alta	Rizóide	Branca	Opaca
LP	57	54,29%	Ondulada	Circular	Branca	Brilhante
LP	29	27,62%	Inteira	Irregular	Branca	Opaca
LP	4	3,81%	Inteira	Filamentosa	Bege	Opaca
105						
Leveduras Bacupari						
LB	40	88,88%	Alta	Circular	Branca	Brilhante
LB	3	6,67%	Côncava	Irregular	Creme	Opaca
LB	2	4,45%	Alta	Irregular	Salmão	Cremosa
45						
TOTAL	300					

*LT: Levedura Tucumã *LP: Levedura Pupunha *LB: Levedura Bacupari

Atualmente, considera-se que a identificação de espécies baseada somente em suas características morfológicas, fisiológicas ou bioquímicas seja insuficiente (SUMBY; CALIANI; JIRANEK, 2021). A identificação precisa das espécies de leveduras é essencial para fins de conservação, biotecnologia e produção alimentícia (JAYAWARDENA *et al.*, 2021).

A análise molecular é uma abordagem altamente eficaz na identificação de microorganismos, devido à sua capacidade de discernir entre as variações genéticas presentes em diferentes populações. Por conseguinte, a aplicação da identificação molecular é essencial não apenas para a preservação da diversidade de leveduras, mas também para assegurar a segurança alimentar (CARRETÉ *et al.*, 2019). Esse método permite uma caracterização mais precisa e detalhada dos microorganismos, possibilitando uma compreensão mais abrangente de sua distribuição e diversidade genética. Assim, a sua utilização contribui para a conservação da biodiversidade microbiana e para a garantia da qualidade e segurança dos alimentos (FRAGA-CORRAL *et al.*, 2022).

5.2 Seleção de leveduras amazônicas com potencial antagônico

5.2.1 Verificação de crescimento em diferentes temperaturas

Os 300 isolados de leveduras foram avaliadas quanto à capacidade de crescimento nas temperaturas de 10 °C, 25 °C e 37 °C. Após o teste, resultou-se que todas as cepas apresentaram crescimento nas temperaturas de 25 °C e 37 °C. Com relação à temperatura de 10 °C apenas 50% da soma total obtiveram crescimento.

A ausência de crescimento observada nas cepas submetidas a temperatura de 10 °C pode ser atribuída à origem dos isolados de levedura, os quais foram obtidos a partir de frutos cultivados em uma região de clima quente e úmido, a região amazônica (VEGAS *et al.*, 2020). Essas condições climáticas explicam a falta de resistência ou adaptação das cepas a temperaturas extremamente baixas, como observado no presente estudo. Além disso, essas informações também justificam o crescimento das leveduras em temperaturas mais elevadas.

A faixa de temperatura para crescimento máximo e mínimo de um microrganismo pode variar consideravelmente entre diferentes espécies e linhagens (JUNIOR *et al.*, 2020). É de fundamental importância obter microrganismos com resistência a uma ampla gama de temperaturas, tanto baixas quanto altas, uma vez que isso pode aumentar sua capacidade de sobrevivência em frutos durante o armazenamento, seja em condições refrigeradas ou em temperaturas mais elevadas (MATOS *et al.*, 2021).

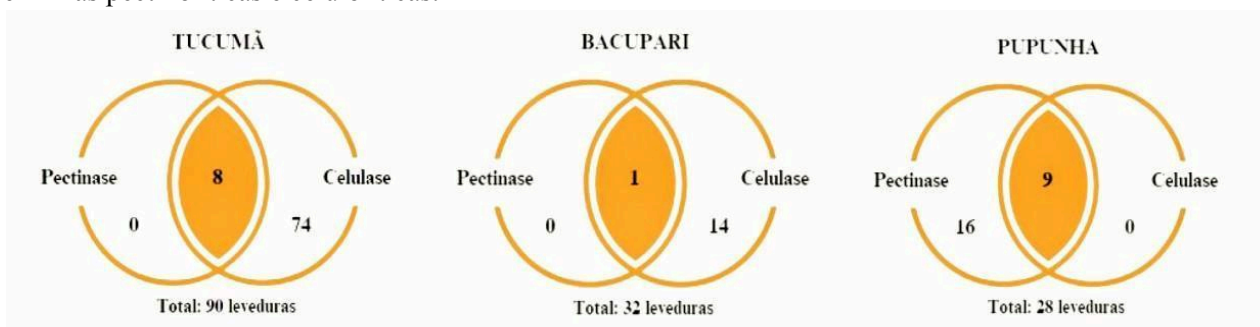
Considerando que as mangas são exportadas e armazenadas em baixas temperaturas, com finalidade de prolongar sua vida de prateleira, é de grande interesse identificar leveduras capazes de crescer em temperaturas mais baixas, como 10 °C, mesmo quando isoladas de regiões com temperaturas elevadas. Nesse contexto, a utilização de microrganismos capazes de sobreviver em temperaturas de refrigeração pode ser benéfica para o armazenamento de frutos que necessitam de períodos prolongados de conservação antes do consumo (VERO *et al.*, 2013; ALEGBELEYE *et al.*, 2022).

Portanto, ao término do teste, foram selecionadas apenas 50% do total de cepas de leveduras analisadas, pois foram as únicas que apresentaram crescimento tanto em temperatura de crescimento baixa quanto alta: 10 °C, 25 °C e 37 °C sucessivamente.

5.2.2 Verificação da produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas

Das 150 cepas de leveduras selecionadas para uso no teste, 90 correspondem aos isolados de tucumã, 32 cepas aos isolados de bacupari e 28 cepas aos isolados de pupunha. Da totalidade dos isolados do fruto tucumã, 74 cepas produziram apenas celulase, enquanto oito cepas produziram tanto celulase quanto pectinase, portanto, estas 82 cepas foram descartadas dos posteriores testes uma vez que foram positivas para produção de celulase e pectinase. Em se tratando da totalidade dos isolados do fruto bacupari, 14 cepas produziram apenas celulase e uma cepa produziu tanto celulase quanto pectinase, para tanto as 15 cepas também foram descartados dos posteriores testes. Com relação à totalidade dos isolados do fruto da pupunha, 16 cepas produziram pectinase e nove produziram tanto celulase quanto pectinase, contudo, 25 das cepas dos isolados de pupunha também foram descartados dos posteriores testes. Os dados estão demonstrados na Figura 1.

Figura 1: Seleção de leveduras com potencial antagonico submetidos aos testes de produção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas.



Totalidade de crescimento positivo e/ou negativo para produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas de leveduras amazônicas

A escolha de leveduras que não produzem as enzimas celulolíticas e pectinolíticas ocorreu com o objetivo de evitar a degradação dos frutos. A presença dessas enzimas pode levar à deterioração dos frutos devido à degradação da celulose e da pectina, componentes importantes das paredes celulares vegetais (SUPE, 2020). Portanto, a seleção de cepas não produtoras destas enzimas é fundamental para garantir a preservação da qualidade e da integridade dos frutos durante o armazenamento (VERO *et al.*, 2019).

Portanto, após a realização do teste de pectinase, foi observado que cepas da totalidade das leveduras testadas foram capazes de produzir essa enzima tanto de forma isolada quanto de forma conjunta, no entanto, sendo excluídas das análises

subsequentes. Essa observação é relevante, uma vez que a produção de enzimas pectinolíticas está associada à capacidade dos microrganismos de degradar pectina, componente importante das paredes celulares e espaços intercelulares dos tecidos vegetais (SHIN *et al.*, 2021).

A presença de uma ampla variedade de microrganismos capazes de produzir essas enzimas, incluindo bactérias, fungos filamentosos, leveduras, protozoários, insetos e nematoides, destaca a importância das mesmas na natureza e em processos biotecnológicos (RASTEGARI; YADAV; YADAV, 2020; SIVAKUMAR *et al.*, 2020).

De acordo com esses resultados sugere-se que as leveduras que foram excluídas por produzirem pectinase podem ter um potencial relevante na degradação de pectinas e, possivelmente, desempenhar um papel significativo na decomposição de materiais vegetais, no entanto, não sendo as leveduras desejadas para uso no estudo.

A presença de leveduras produtoras de pectinase tem sido relatada na literatura como uma consequência na deterioração de frutos. Essas enzimas degradantes desempenham um papel importante na evolução da degradação da pectina, resultando em uma mudança na consistência dos frutos, tornando-os moles ou com aspecto molhado (RANJBAR *et al.*, 2022). Podendo afetar negativamente a qualidade e a vida útil dos frutos, consequentemente, ocasionando perdas significativas para a indústria de alimentos (ATTA *et al.*, 2022).

Com isso, a seleção de leveduras não pectinolíticas tem se mostrado uma estratégia satisfatória para a conservação dos frutos e interessante para uso. Essas leveduras apresentam um potencial significativo, pois permitem a redução das perdas causadas pela deterioração e estende a disponibilidade dos frutos no mercado (FELICIA *et al.*, 2022). Além disso, essa abordagem pode contribuir para a sustentabilidade e a eficiência dos processos de produção de alimentos, evitando o desperdício e promovendo a utilização adequada dos recursos naturais (MUNHUWEYI; MPAI; SIVAKUMAR, 2020).

Após a realização do teste de celulase, foi observado que cepas de leveduras dos isolados dos três frutos amazônicos apresentaram a produção dessa enzima, tanto de forma isolada, quanto de forma conjunta, sendo, portanto, excluídas das análises subsequentes. Esses resultados foram satisfatórios, uma vez que o objetivo era selecionar cepas não produtoras destas enzimas. A celulase é uma enzima responsável pela degradação da celulose, um componente importante da parede celular vegetal. A celulose é um polissacarídeo não-ramificado composto exclusivamente por moléculas

de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (PANICKER; SAYYED, 2022.).

Contudo, cepas não produtoras de enzimas celulolíticas e pectinolíticas têm sido relatadas como possíveis agentes biocontroladoras. Isso significa que essas leveduras podem ser utilizadas no controle de microrganismos indesejáveis que causam a deterioração dos frutos, podendo contribuir para a redução de perdas pós-colheita e promover a conservação dos frutos de forma eficiente (JAISANI, 2020; SHARMA, 2021; GUPTA; SAXENA, 2023).

5.2.3 Verificação da produção de compostos difusíveis e voláteis

Foram realizados testes com as 28 cepas de leveduras selecionadas para avaliar sua capacidade de produzir compostos antagônicos, tanto difusíveis quanto voláteis, com o objetivo de determinar quais apresentaram algum grau de antagonismo contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (*in vitro*).

Na avaliação do antagonismo por difusão, observou-se que as taxas de crescimento do fitopatógeno variaram em comparação com o controle de 0% a 74,3% nos primeiros 7 dias de crescimento e de 5% a 78,3% nos últimos 14 dias. No entanto, foi constatado que três cepas de leveduras apresentaram um potencial antagônico significativo contra o patógeno. As leveduras LP 73, LP 101 e LT 76 foram as que mais inibiram o crescimento micelial do fungo, com taxas de crescimento de 5,0%, 6,7% e 7,9%, respectivamente, após 14 dias de incubação em comparação com o controle.

Posteriormente, também foram realizadas análises da produção de compostos antifúngicos voláteis com as 28 cepas de leveduras selecionadas, observando-se taxas de crescimento em comparação com o controle que variaram de 0% a 23,4% nos primeiros 7 dias e de 0% a 56,96% nos últimos 14 dias de incubação. No entanto, as cepas LB 29, LB 12, LB 6, LB 17 e LB 18 foram as que apresentaram as melhores capacidades inibitórias, com nenhuma taxa de crescimento das três primeiras cepas durante os 14 dias de incubação, e taxas de crescimento de 5,1% e 6,3% nas duas últimas cepas, respectivamente durante os últimos 14 dias de crescimento em comparação com o controle.

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) são substâncias de baixo peso molecular que são sintetizadas por fungos, bactérias e leveduras (BENNETT *et al.*, 2012). Esses compostos têm sido considerados como um potencial alternativo para o

controle de doenças que ocorrem após a colheita de frutos, especialmente em casos em que as mercadorias são armazenadas em contêineres fechados durante o transporte e o armazenamento (ARRARTE *et al.*, 2017). A produção desses compostos orgânicos voláteis com atividade antifúngica depende de vários fatores, incluindo o estágio de crescimento dos microrganismos envolvidos na sua síntese, a temperatura e o tempo de incubação desses microrganismos, bem como a composição dos compostos produzidos (DI FRANCESCO *et al.*, 2015).

O estudo dos compostos difusíveis na pós-colheita de frutos é importante para entender os mecanismos envolvidos na interação entre frutos, microrganismos e insetos. Isso pode levar ao desenvolvimento de estratégias de controles mais eficientes e sustentáveis, reduzindo a dependência de pesticidas químicos e minimizando os impactos nocivos ao meio ambiente (WEISSKOPF; SCHULZ; GARBEVA, 2021).

Além disso, o conhecimento sobre os compostos difusíveis pode ser aplicado no manejo pós-colheita de frutos, permitindo o desenvolvimento de técnicas de armazenamento e conservação que prolonguem a vida útil dos produtos agrícolas. Isto é de particular importância, considerando que uma grande quantidade de frutos é perdida durante o armazenamento e transporte devido ao amadurecimento acelerado, ataque de patógenos e infestação de pragas (LAMENEW; MEKONNEN; GASHAW, 2019).

Com base nos resultados dos ensaios antagônicos contra o *Colletotrichum gloeosporioides*, foram selecionadas oito cepas de leveduras (LP 73, LP 101, LT 76, LB 29, LB 12, LB 6, LB 17 e LB 18) que obtiveram a melhor capacidade de inibição pela produção de compostos difusíveis e voláteis, para prosseguirem nas etapas de seleção.

5.2.4 Verificação da atividade antifúngica de substâncias GRAS contra o patógeno

Para o experimento, foram utilizadas sete substâncias GRAS, incluindo dois sais (carbonato de sódio e bicarbonato de sódio) e cinco compostos orgânicos voláteis (ácido propiônico, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico e ácido ascórbico). O carbonato de sódio, o ácido acético e o ácido propiônico apresentaram resultados positivos na inibição do fungo *Colletotrichum Gloeosporioide*, alcançando 100% de inibição das colônias fúngicas patogênicas. Por outro lado, o bicarbonato de sódio, o ácido láctico, o ácido ascórbico e o ácido cítrico foram incapazes de inibir o

fitopatogéno nas menores concentrações testadas (1% 3% e 5%), conforme demonstrado na Tabela 4 e na Figura 2.

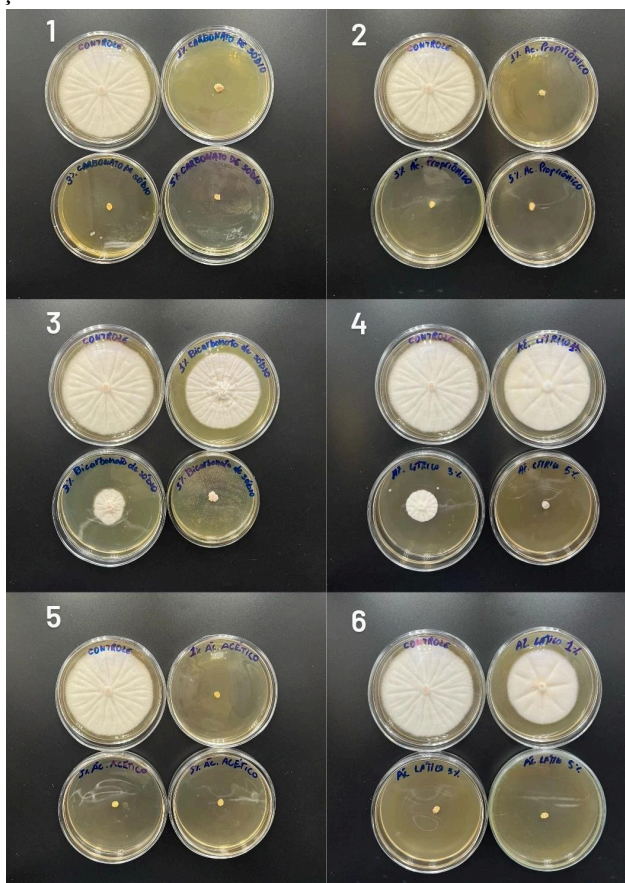
Tabela 4: Efeito das substâncias GRAS no desenvolvimento das colônias de *Colletotrichum Gloeosporioide* após 7 e 14 dias de crescimento.

Concentração	7 dias	14 dias
Ácido Propiônico		
0%	80a ± 2	90a ± 2
1%	5b ± 0	5b ± 0
3%	5b ± 0	5b ± 0
5%	5b ± 0	5b ± 0
Bicarbonato de Sódio		
0%	80a ± 2	90a ± 2
1%	56b ± 1	62b ± 2
3%	24c ± 2	41c ± 1
5%	5d ± 0	5d ± 0
Carbonato de Sódio		
0%	80a ± 2	90a ± 2
1%	5b ± 0	5b ± 0
3%	5b ± 0	5b ± 0
5%	5b ± 0	5b ± 0
Ácido Láctico		
0%	80a ± 2	90a ± 2
1%	56b ± 2	63b ± 3
3%	5c ± 0	13c ± 2
5%	5c ± 0	8d ± 1
Ácido Ascórbico		
0%	80a ± 2	90a ± 2
1%	64b ± 2	76b ± 2
3%	40c ± 1	50c ± 4
5%	24d ± 3	42d ± 2
Ácido Cítrico		
0%	80a ± 2	90a ± 2
1%	73b ± 3	90a ± 1
3%	23c ± 1	41b ± 1
5%	5d ± 0	8c ± 1
Ácido Acético		
0%	80a ± 2	90a ± 2
1%	5b ± 0	5b ± 0
3%	5b ± 0	5b ± 0
5%	5b ± 0	5b ± 0

Os dados de inibição do crescimento do patógeno são expressos pela média em milímetro (mm) de três repetições em comparação com o controle (0%), acompanhada do desvio padrão e diferença

significativa à nível de 5% pelo teste de Tukey.

Figura 2: Efeito inibitório de substâncias GRAS contra o fitopatógeno *C. gloeosporioide* (*in vitro*) após 14 dias de incubação.



Nº 1: Carbonato de sódio; Nº 2: Ácido propiônico; Nº 3: Bicarbonato de sódio; Nº 4: Ácido cítrico; Nº 5: Ácido acético; Nº 6: Ácido láctico. * A imagem representa os ensaios *in vitro* realizados. A ordem dos tratamentos para todos os números são: Controle, 1, 3 e 5% dos respectivos sais e ácidos testados.

As substâncias empregadas no presente estudo, foram previamente descritas na literatura por apresentarem atividade antifúngica e serem utilizadas na conservação de alimentos. O ácido acético, por exemplo, é empregado com o objetivo de prevenir o desenvolvimento fúngico e prolongar a vida útil de alimentos (ANGANE *et al.*, 2022; RIVERO-PINO *et al.*, 2023). De forma análoga, o carbonato de sódio tem sido relatado como capaz de inibir o crescimento do fungo *C. Gloeosporioide* em frutos de manga (GÓMEZ-MALDONADO *et al.*, 2020; GUERRERO-BARAJAS *et al.*, 2020).

As substâncias GRAS (*Generally recognized as safe*) são utilizadas como auxiliares na ação antagonista dos agentes biológicos, apresentando vantagens como disponibilidade, custo relativamente baixo e alta solubilidade em água (BADSHA *et*

al., 2022).

O Carbonato de sódio se destacou como o mais acessível economicamente e efetivo nos testes realizados no experimento. A menor concentração testada (1%) foi escolhida como a mais rentável para o produtor que deseja utilizá-la no controle fúngico, visto que apesar de todas as concentrações (1, 3 e 5%) inibirem o patógeno, a menor concentração é a opção mais viável economicamente. Os dados apresentados sugerem que o carbonato de sódio pode ser uma opção efetiva no controle de patógenos, especialmente quando se considera a viabilidade econômica da substância.

Em um estudo conduzido por Ferreira *et al.* (2015), foram avaliadas substâncias GRAS como possíveis agentes de controle de fungos fitopatogênicos que causam danos pós-colheita de frutos. De acordo com os resultados, o carbonato de sódio, utilizado em concentrações específicas, inibiu completamente o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*. Adicionalmente, o carbonato de sódio também foi eficaz em inibir o crescimento de *Fusarium guttiforme* em todas as concentrações testadas. Além disso, observou-se um efeito positivo do bicarbonato de sódio nas concentrações de 3% e 5%.

Em outra investigação realizada por Siddiqui e Ali (2014), cepas de *C. gloeosporioides* foram reduzidas em 75%, empregando-se carbonato de sódio como agente antifúngico. Estes achados corroboram a eficácia dos nossos resultados e demonstram a importância de um sal GRAS com propriedades antifúngicas, capaz de contribuir com o controle de doenças fúngicas e substituir, em parte ou completamente, a utilização de fungicidas sintéticos.

5.2.5 Verificação da resistência das leveduras a substâncias GRAS

A partir dos resultados de ensaios antagônicos anteriores, foram selecionadas as oito cepas de leveduras para avaliar sua resistência aos sais carbonato de sódio, bicarbonato de sódio e aos ácidos acético, propiônico, láctico, cítrico e ascórbico. Constatou-se que 87,5% das cepas não apresentaram resistência ao carbonato de sódio, ácido acético e ácido propiônico em nenhuma concentração respectivamente testada, mas foram resistentes ao ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido láctico e bicarbonato de sódio em pelo menos duas das concentrações utilizadas, conforme exposto na Tabela 5. É importante destacar que o ácido acético e o ácido propiônico causaram odor desagradável no meio de cultura após o término do tempo de crescimento, o que possivelmente também causaria odor desagradável no fruto se selecionado para

prosseguir, não sendo uma característica desejada pelo estudo.

Devido à alta resistência do fungo às substâncias GRAS, que também apresentaram crescimento positivo para a maioria das leveduras (ácido láctico, ácido cítrico, ácido acético e bicarbonato de sódio), as avaliações foram restritas a um conjunto limitado de cepas de leveduras, especificamente LT 73, LB 29 e LP 101, que demonstraram crescimento acentuado quando expostas a concentração de 1% de carbonato de sódio, selecionada, anteriormente, para os testes de antagonismo *in vivo*.

A seleção de uma variedade de leveduras resistentes a diferentes níveis de concentração de substâncias GRAS, resultou no reconhecimento do fato de que as cepas LT 73, LB 29 e LP 101 apresentaram robustez no seu aglomerado, mesmo quando cultivadas em meio NYDA enriquecido com carbonato de sódio, ácido acético e ácido propiônico, em concentrações de 1%. Tais cepas foram então escolhidas para os testes *in vivo* subsequentes.

O carbonato de sódio é um sal acessível comercialmente, de custo baixo, com boa disponibilidade no mercado e com grande facilidade de armazenamento, além de fácil manuseio e aplicação. O ácido acético e ácido propiônico por mais que tenham sido positivos para o teste de resistência, conferiram odor desagradável ao meio de cultura enriquecido e possivelmente acarretaria o mesmo problema no fruto. Sendo assim, o carbonato de sódio é indicativo de ser o mais promissor nos testes futuros.

Ferreira *et al* (2015) realizaram um estudo para avaliar a resistência de seus isolados de levedura contra substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS). Dentre as quatro cepas avaliadas, apenas uma foi capaz de sobreviver sete dias na presença de bicarbonato de sódio e carbonato de sódio em três concentrações testadas. Esses resultados demonstram a fragilidade desses isolados frente às substâncias testadas e a incompatibilidade de seu uso no controle integrado com essas leveduras que não apresentam resistência.

5.3 Verificação da inibição de crescimento (in vivo) do *C. gloeosporioides* utilizando controle biológico e o controle integrado a substâncias GRAS

Com base nos resultados preliminares, foram selecionados três isolados LB29, LT76 e LP101 para condução de experimentos *in vivo*, devido às suas características favoráveis, tais como a capacidade de crescimento em temperatura ótima, ausência de produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas, produção de compostos difusíveis e voláteis, e resistência a substâncias GRAS. Essas características foram tidas como determinantes na seleção das

leveduras com potencial inibitório do patógeno.

5.3.1 Leveduras LB29, LT76, LP101 e Carbonato de sódio

A Figura 3 exibe a incidência (A) e a severidade (B) da doença em frutos de manga tratados com leveduras e inoculados com o patógeno. Os resultados demonstram uma redução na incidência nos tratamentos LB29 e LB76, assim como na severidade da doença após a aplicação das três leveduras, independentemente da concentração utilizada. Entre as diferentes concentrações avaliadas, observaram-se os melhores resultados na concentração de 1×10^8 células/mL, onde ocorreram reduções na incidência e severidade da doença após uso das leveduras LB29 e LB76 em 20% e 69%, e 30% e 58%, respectivamente. A incidência é caracterizada como a proporção (frequência) de plantas ou partes de plantas afetadas por doenças em uma amostra ou população. Já a severidade é determinada como a proporção da área ou do volume de tecido ocupado por sintomas. (AMORIM, 1995).

Shen *et al.* (2019) e Liu *et al.* (2020) utilizaram concentrações de 10^6 , 10^7 , 10^8 , e 10^9 células/mL das leveduras *Sporidiobolus pararoseus* e *Pichia kudriavzevii* em seus estudos contra *B. cinerea* e *R. stolonifer*, respectivamente. Verificaram que a concentração de 1×10^8 foi a mais eficaz, sendo a selecionada para os ensaios *in vivo* integrados e clássicos.

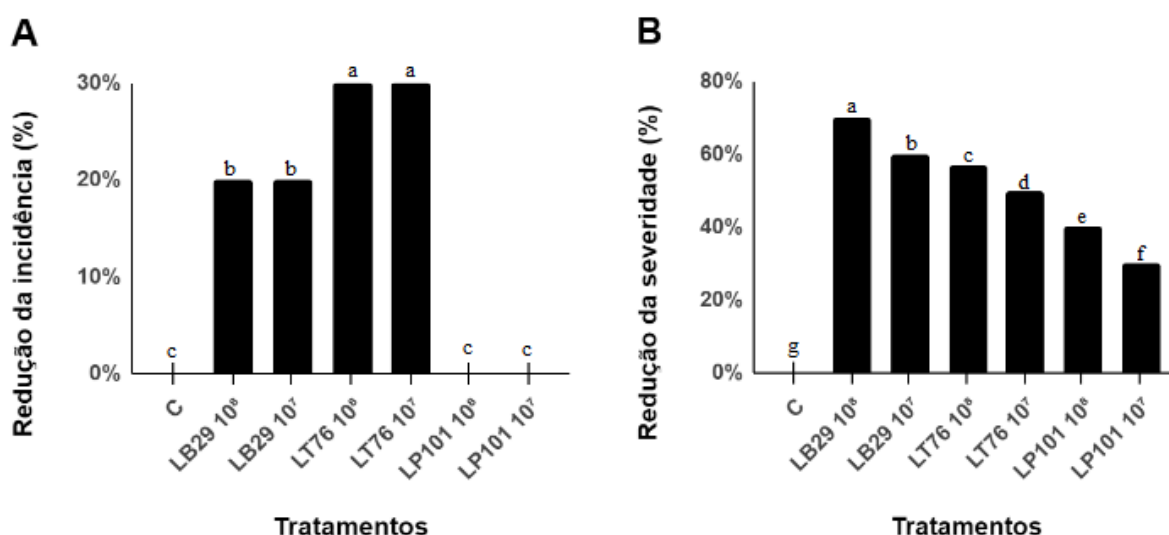


Figura 3. Redução da incidência e severidade de mangas tratadas com as leveduras LB29, LT76 e LP101 em duas diferentes concentrações e inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides*. O controle constituiu apenas do tratamento com o patógeno e a avaliação foi realizada após 7 dias de experimento a 25 °C. As barras do gráfico representam a média de cada tratamento (%). Semelhanças estatísticas são indicadas por letras idênticas, enquanto letras diferentes denotam diferenças significativas. O teste Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn foi empregado, considerando um valor de $p < 0,05$.

Após a definição da concentração da levedura de (10^8), foi realizado o teste de controle integrado das leveduras com a substância GRAS contra o fitopatógeno, conforme demonstrado na Figura 4. Os resultados obtidos indicam que os isolados selecionados (LB29, LT76 e LP101) foram capazes de reduzir de forma isolada a incidência e a severidade da doença causada por *Colletotrichum gloeosporioides* em cerca de 20 e 69%, 30 e 58%, 0 e 39% respectivamente, ao longo de um período de 7 dias de experimento a 25 °C. Por outro lado, o uso isolado de carbonato de sódio resultou em uma redução de 90% na incidência e na severidade da doença. Ao realizar o teste integrado das leveduras (LB29, LT76 e LP101) associadas ao carbonato de sódio, obteve-se uma redução de incidência de 50%, 50% e 30%, respectivamente, e uma redução de severidade de 69%, 58% e 39%, conforme observado na Figura 4- A1 e B1. Entretanto, houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores conforme indicado pelo teste de Kruskal-Wallis. Nesse contexto, é recomendável empregar as leveduras LB29 e LT76 associadas à substância GRAS para alcançar uma redução de incidência de no mínimo 50%. Por outro lado, o uso exclusivo da substância GRAS carbonato de sódio, demonstrou ser mais eficaz no controle da doença alcançando resultados positivos em comparação com os demais tratamentos.

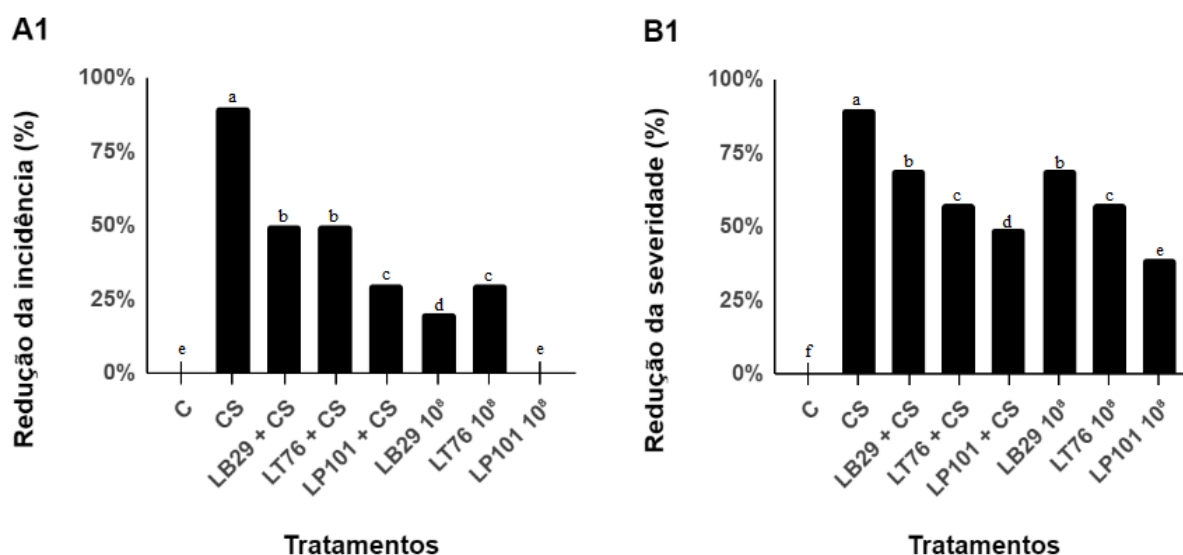


Figura 4. Redução da incidência e severidade de mangas tratadas com as leveduras LB29, LT76, LP101 e/ou substância GRAS carbonato de sódio e inoculadas com o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. O controle constituiu apenas na inoculação do patógeno, e as avaliações foram realizadas após 7 dias de experimento a 25°C. As barras no gráfico representam a média de cada tratamento. Semelhanças estatísticas são indicadas por letras idênticas, enquanto letras diferentes denotam diferenças significativas. O teste Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn foi empregado, considerando um valor de $p < 0,05$. (C)= controle; (CS)= carbonato de sódio; (LB29+CS) = levedura LB29 10^8 +carbonato de sódio; (LT76+CS) = levedura LT26 10^8 +carbonato de sódio;

(LP101+CS) = levedura LP101 10^8 +carbonato de sódio.

É recomendada a adoção de estratégias combinadas envolvendo dois ou mais métodos de controle de doenças pós-colheita. Para esse propósito, o aprimoramento dos mecanismos de ação é fundamental para uma eficaz implementação e obtenção de resultados satisfatórios. Zhang *et al.* (2018) destacaram que a combinação de compostos químicos não convencionais e agentes de controle biológico tem mostrado eficácia em diversos graus no controle de doenças pós-colheita. Os benefícios dessas abordagens dependem da seleção criteriosa dos agentes, levando em consideração o conhecimento detalhado de seus critérios de ação no sistema de controle.

Algumas leveduras antagonistas, devido à sua eficácia no controle biológico de patógenos, têm sido investigadas devido a seus mecanismos de ação que promovem a formação de biofilme na superfície de feridas em frutas. Esse biofilme é capaz de inibir a invasão de fungos patogênicos, impedindo sua colonização e subsequente infecção (YANG *et al.*, 2021). A utilização de leveduras como agentes de controle biológico é de suma importância, pois além de prevenir ou reduzir a deterioração microbiana nos frutos, também permite a redução do uso de fungicidas (MALTA *et al.*, 2019).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, este estudo demonstrou resultados promissores quanto à eficácia de duas cepas de leveduras (LB29 e LT76) como possíveis agentes de controle biológico para proteção de mangas contra o patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. A utilização dessas leveduras em conjunto com bicarbonato de sódio, e principalmente, o uso da substância carbonato de sódio de forma isolada, revelou-se uma alternativa promissora e segura para o controle da doença. No entanto, são necessárias investigações adicionais para compreender os mecanismos pelos quais essas leveduras exercem sua atividade antifúngica. Estes resultados têm o potencial de direcionar futuras abordagens visando um controle mais eficaz e sustentável da doença em frutos de manga pós-colheita.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M. S *et al.* Factors affecting postharvest quality of fresh fruits. **Postharvest quality assurance of fruits: practical approaches for developing countries**, p. 7-32, 2019.
- AKBARI, B *et al.* The role of plant-derived natural antioxidants in reduction of oxidative stress. **BioFactors**, v. 48, n. 3, p. 611-633, 2022.
- AL-ANI, L. K. T. The importance of endophytic fungi from the medicinal plant: Diversity, natural bioactive compounds, and control of plant pathogens. **Medically Important Plant Biomes: Source of Secondary Metabolites**, p. 189-238, 2019.
- ALCÂNTARA, D. B *et al.* Diagnostic detection systems and QuEChERS methods for multiclass pesticide analyses in different types of fruits: An overview from the last decade. **Food Chemistry**, v. 298, p. 124958, 2019.
- ALIYARUKUNJU, S; HARIDAS, B; SUGATHAN, S. Current Insights into Phylloplane Fungal Species Diversity in the Western Ghats and Its Perspective. In: **Microbial Biodiversity, Biotechnology and Ecosystem Sustainability**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. p. 295-394.
- AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, v. 1, p. 647-671. 1995.
- ANGANE, M *et al.* Essential oils and their major components: an updated review on antimicrobial activities, mechanism of action and their potential application in the food industry. **Foods**, v. 11, n. 3, p. 464, 2022.
- BADSHA, I *et al.* Polylysine: Natural Peptides as Antimicrobial Agents. A Recent Scenario in Food Preservation. **Handbook of Nutraceuticals and Natural Products: Biological, Medicinal, and Nutritional Properties and Applications**, v. 1, p. 257-272, 2022.
- BANO, A *et al.* Elicitation of Fruit Fungi Infection and Its Protective Response to Improve the Postharvest Quality of Fruits. **Stresses**, v. 3, n. 1, p. 231-255, 2023.
- Bharat L.; KHAN, S. A.; SRIVASTAVA, V. Current Scenario of GI Certified Mango Varieties in India. **Economic Affairs**, v. 67, n. 4, p. 681-690, 2022.
- BHARDWAJ, S; LATA, S; GARG, Rajni. Application of nanotechnology for preventing postharvest losses of agriproducts. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 98, n. 1, p. 31-44, 2023.
- BHATIA, L *et al.* Food Waste Utilization for Reducing Carbon Footprints towards Sustainable and Cleaner Environment: A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 3, p. 2318, 2023.

BILL, M *et al.*, Composição do microbioma endófito e epífito da manga durante o desenvolvimento do fruto e as fases pós-colheita. **Horticulturae**, v. 7, n. 11, pág. 495, 2021. See More.

BLANCAS-BENITEZ, F. J *et al.* Impact of edible coatings on quality of fruits: A review. **Food Control**, p. 109063, 2022.

BLANCAS-BENITEZ, F. J. *et al.* Natural compound/green nanoemulsions for disease control at postharvest stage in fruits. In: **Bio-Based Nanoemulsions for Agri-Food Applications**. Elsevier, p. 225-243.2022.

BLANCAS-BENITEZ, F. J *et al.* Impact of edible coatings on quality of fruits: A review. **Food Control**, p. 109063, 2022.

BOLZANI, V. S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 68, n. 1, p. 04-05, 2019.

BORÉM, A; MIRANDA, G. V.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Melhoramento de plantas**. Oficina de Textos, 2021.

BRAGA, A. R. C *et al.* Global health risks from pesticide use in Brazil. **Nature Food**, v. 1, n. 6, p. 312-314, 2020.

CAMACAM, B. L. M; OMENA MESSIAS, C M. B. Potencial alimentar de frutas e plantas da caatinga: revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. e39911931997-e39911931997, 2022.

CARMONA-HERNANDEZ, S *et al.* Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: a review. **Agronomy**, v. 9, n. 3, p. 121, 2019.

CARVALHO, K. P *et al.* Intoxicações exógenas por agrotóxicos no Espírito Santo, 2007-2016: distribuição espacial e tendências da taxa de incidência e letalidade dos casos notificados. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 31, 2022.

CORRÊA, Tatiana Maracaípe. Estratégia de controle de podridão mole (*Rhizopus Stolonifer*) em uva (*Vitis Vinifera* brs Carmem). **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Tocantins, Palmas-TO, 2020.

COUDEL, E. et al. Rendre visible les impacts des pesticides du soja: contributions et limites d'un observatoire de science citoyenne à Santarém, Amazonie brésilienne. **VertigO-la revue électronique en sciences de l'environnement**, v. 21, n. 3, 2021.

CUNHA, K. T; MENDES, T. S. R; COSTA, C. L. S. Detecção de carboidratos de baixo peso molecular em diferentes variedades de manga, em dois alcances de sucesso. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 11, n. 2, pág. e27411225664-e27411225664, 2022.

DEMARTELAERE, A. C. F *et al.* Utilização de extratos no controle da antracnose em pós-colheita de Mangifera indica. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 4872-4892, 2021.

DI GIANVITO, P *et al.* Bioprotection strategies in winemaking. **International Journal of Food Microbiology**, p. 109532, 2022.

DÍAZ, M. A *et al.* Killer yeasts for the biological control of postharvest fungal crop diseases. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1680, 2020.

DOMINGUES, B. C. *et al.* Suplementos Alimentares: Aspectos Químicos e Aplicações de Macro e Micronutrientes. **Rev. Virtual Quim**, v. 15, p. 1-41, 2023.

DROBY, S *et al.* Microbial antagonists from different environments used in the biocontrol of plant pathogens. In: **Microbial Biocontrol: Food Security and Post Harvest Management: Volume 2**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 227-244.

DROBY, S *et al.* O conceito de patobioma aplicado à patologia pós-colheita e sua implicação nas estratégias de biocontrole. **Biologia e Tecnologia Pós-colheita** , v. 189, p. 111911, 2022.

DWIASTUTI, M. E *et al.* Biological control strategy for postharvest diseases of citrus, apples, grapes and strawberries fruits and application in Indonesia. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, p. 1-12, 2021.

ECULICA, J. F; DOMINGOS, I. F. N; SERRANO, L. R. P. Efficiency of aqueous extract of the leaves of ricinus communis l. In the control of the lagarta spodoptera frugiperda (Original). **Redel. Revista Granmense de Desarrollo Local**, v. 5, n. 4, p. 342-352, 2021.

EL KHETABI, A *et al.* Role of plant extracts and essential oils in fighting against postharvest fruit pathogens and extending fruit shelf life: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 120, p. 402-417, 2022.

ELNAHAL, A. S. M *et al.* The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. **European Journal of Plant Pathology**, v. 162, n. 4, p. 759-792, 2022.

EZRARI, S *et al.* Dry root rot disease, an emerging threat to citrus industry worldwide under climate change: A review. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 117, p. 101753, 2022.

FENTA, L; MEKONNEN, H; KABTIMER, N. The Exploitation of Microbial Antagonists against Postharvest Plant Pathogens. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 1044, 2023.

FERREIRA, E. M. S *et al.* The use of psychrophilic Antarctic yeast in the biological control of post-harvest diseases of fruits stored at low temperatures. **Fungi of Antarctica: Diversity, Ecology and Biotechnological Applications**, p. 243-263, 2019.

- FONTANA, D. C *et al.* Using essential oils to control diseases in strawberries and peaches. **International Journal of Food Microbiology**, v. 338, p. 108980, 2021.
- FRANCO, M. F. S *et al.* Microrganismo endofíticos para conservação de produtos hortícolas. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e28111225761-e28111225761, 2022.
- FRATARI, S. C *et al.* Revestimentos comestíveis para conservação pós colheita de manga: uma revisão. **Verruck, S. Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 4, p. 444-467, 2021.
- FREITAS, R. E. United States, European Union, China, and Japan: demand for Brazilian agricultural exports. **Revista de Economia e Agronegócio**, v. 17, n. 3, p. 399-419, 2019.
- FU, Y; DUDLEY, E. G. Antimicrobial-coated films as food packaging: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 4, p. 3404-3437, 2021.
- GÓMEZ-MALDONADO, D *et al.* Antifungal activity of mango kernel polyphenols on mango fruit infected by anthracnose. **LWT**, v. 126, p. 109337, 2020.
- GUERRERO-BARAJAS, C *et al.* Bacillus mycoides A1 and Bacillus tequilensis A3 inhibit the growth of a member of the phytopathogen Colletotrichum gloeosporioides species complex in avocado. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 10, p. 4049-4056, 2020.
- HERNANDEZ-MONTIEL, L. G *et al.* A sustainable alternative for postharvest disease management and phytopathogens biocontrol in fruit: Antagonistic yeasts. **Plants**, v. 10, n. 12, p. 2641, 2021.
- JAIBANGYANG, S; NASANIT, R; LIMTONG, S. Biological control of aflatoxin-producing Aspergillus flavus by volatile organic compound-producing antagonistic yeasts. **BioControl**, v. 65, p. 377-386, 2020.
- JAYAWARDENA, R. S *et al.* What is a species in fungal plant pathogens?. **Fungal Diversity**, v. 109, n. 1, p. 239-266, 2021.
- JERONIMO, E. M *et al.* Conservação pós-colheita de mangas ‘Tommy Atkins’ armazenadas sob atmosfera modificada. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 3, p. 417-426, 2019.
- JOHN, D. A.; BABU, G. R. Lessons from the aftermaths of green revolution on food system and health. **Frontiers in sustainable food systems**, v. 5, p. 644559, 2021.
- JU, H *et al.* Identification and characterization of Lactobacillus paracasei strain MRS-4 antibacterial activity against Alicyclobacillus acidoterrestris. **Lwt**, v. 150, p. 111991, 2021.
- JUNIOR, A. S. E *et al.* Effect of antagonistic yeasts from cacao tissues on controlling growth and sporulation of Moniliophthora roreri. **Biological Control**, v. 172, p. 104956, 2022.

- KAMEI, S. H *et al.* Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose of annonaceous crops in the state of Alagoas, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 209-216, 2020.
- KANKAM, F *et al.* Anthracnose Disease of Mango: Epidemiology, Impact and Management Options. In: **Current and Emerging Challenges in the Diseases of Trees**. IntechOpen, 2022.
- KARGWAL, R *et al.* Principles of modified atmosphere packaging for shelf life extension of fruits and vegetables: An overview of storage conditions. **IJCS**, v. 8, n. 3, p. 2245-2252, 2020.
- KARUNANAYAKE, K. O. L. C; ADIKARAM, N. K. B. Stem-end rot in major tropical and sub-tropical fruit species. **Ceylon J Sci**, v. 49, n. 5, p. 327-336, 2020.
- KERSTEN, A. K *et al.* Pre-and Post-Harvest Infection of Pasteurized Pickles with Fungi and Their Pectinolytic Potential to Soften the Product. **Horticulturae**, v. 9, n. 3, p. 312, 2023.
- KONSUE, W; DETHOUP, T; LIMTONG, S. Biological control of fruit rot and anthracnose of postharvest mango by antagonistic yeasts from economic crops leaves. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 317, 2020.
- KONSUE, W; DETHOUP, T; LIMTONG, S. Biological control of fruit rot and anthracnose of postharvest mango by antagonistic yeasts from economic crops leaves. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 317, 2020.
- KUMAR, A; SHARMA, K. K; BISEN, S. Mango (*Mangifera indica* L.) Diseases in India: Perspective and Management Strategies. In: **Diseases of Horticultural Crops**. Apple Academic Press, 2022. p. 331-353.
- KUMAR, N. High Density Planting in Mango-Prospects and Problems. **Adv Agri Res Technol J**, v. 3, p. 47-53, 2019.
- KUSSTATSCHER, P *et al.* Microbiome approaches provide the key to biologically control postharvest pathogens and storability of fruits and vegetables. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 7, p. fiae119, 2020.
- LAHLALI, R *et al.* Biological control of plant pathogens: A global perspective. **Microorganisms**, v. 10, n. 3, p. 596, 2022.
- LAMENEW, F; MEKONNEN, H; GASHAW, T. Biocontrol potential of trichoderma and yeast against post harvest fruit fungal diseases: A review. **World News of Natural Sciences**, n. 27, p. 153-173, 2019.
- LE, T. D *et al.* Supply chain management of mango (*Mangifera indica* L.) fruit: A review with a focus on product quality during postharvest. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 571, 2022.
- LIU, X *et al.* *Pichia kudriavzevii* retards fungal decay by influencing the fungal community

succession during cherry tomato fruit storage. **Food microbiology**, v. 88, p. 103404, 2020.

LOKARE, P; FATIMA, S; JAGDALE, P. E. A review on the management practices of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. causes anthracnose disease of mango. **Int. J. Botany Stud**, v. 6, p. 742-746, 2021.

MALTA, C. M et al. Isolation of epiphytic yeasts from *Eugenia dysenterica* DC. fruits and evaluation of their antimicrobial activity against phytopathogenic fungi. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais**, v. 14, n. 2, p. 223-231, 2019.

MARQUES, A *et al.* Composição centesimal e de minerais de casca e polpa de manga (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. **Revista Brasileira de fruticultura**, v. 32, p. 1206-1210, 2020.

MATOS, Í. T. S. R *et al.* Yeasts with Fermentative Potential Associated with Fruits of Camu-Camu (*Myrciaria dubia*, Kunth) from North of Brazilian Amazon. **The Scientific World Journal**, v. 2021, 2021.

MAURICIO-SANDOVAL, E. A *et al.* Influence of the pulp of *Mangifera indica* and *Myrciaria dubia* on the bioactive and sensory properties of ice cream. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 7, p. 136, 2023.

MELETTI, L. M. M; SAMPAIO, A C; RUGGIERO, C. Avanços na fruticultura tropical no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 73-75, 2021.

MELO, T. A *et al.* Efeito do extrato hidroalcoólico e do óleo de nim (*Azadirachta indica*) sobre o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e na resistência induzida de quiabeiros à fusariose. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e7110212357-e7110212357, 2021.

MORALES-CEDENO, L. R. *et al.* Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre-and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. **Microbiological Research**, v. 242, p. 126612, 2021.

MWAURAH, P. W et al. Características físico-químicas, compostos bioativos e aplicações industriais do caroço de manga e seus produtos: uma revisão. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 5, pág. 2421-2446, 2020.

NAKAMURA, A. C; RANIERI, G. R. **Agricultura Urbana: agroecologia, alimentação, saúde e bem-estar**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2021.

NASCIMENTO, V. C. *et al.* Trichoderma: biological control efficiency and perspectives for the Brazilian Midwest states and Tocantins. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022.

NOR, S. M; DING, P. Trends and advances in edible biopolymer coating for tropical fruit: A review. **Food Research International**, v. 134, p. 109208, 2020.

NTSOANE, M. L *et al.* Quality assesment and postharvest technology of mango: A review of its current status and future perspectives. **Scientia Horticulturae**, v. 249, p. 77-85, 2019.

OLIVEIRA, E. N. A *et al.* Perfil microbiológico e sensorial de geleias convencionais de manga. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 2, p. 250-254, 2019.

OLIVEIRA, M. B *et al.* Structural and cytological aspects of mango floral induction using paclobutrazol. **Scientia Horticulturae**, v. 262, p. 109057, 2020.

OLIVEIRA, T. A *et al.* Qualidade pós-colheita de mangas Tommy Atkins revestidas com amido de mandioca e coberturas à base de quitosana. **Journal of Agricultural Science** , v. 10, n. 11 de 2019.

OLIVEIRA, T. S *et al.* Anthracnose Controlled by Essential Oils: Are Nanoemulsion-Based Films and Coatings a Viable and Efficient Technology for Tropical Fruit Preservation?. **Foods**, v. 12, n. 2, p. 279, 2023.

PARROT, L *et al.* Slicing the fruit five ways: An economic, social, and environmental assessment of five mango food supply chains in Burkina Faso. **Sustainable Production and Consumption**, v. 30, p. 1032-1043, 2022.

PAUDEL, A. *et al.* Insights on the Mango Anthracnose and its Management. **J Plant Pathol Res**, v. 4, n. 1, p. 81-90, 2022.

PERAZZOLI, V *et al.* Eficiência da aplicação pré-colheita de fungicidas para o controle da podridão da uva madura. **FRUSUL**. Simpósio de Fruticultura da Região Sul-ISSN 2526-9909, v. 3, n. 1, 2022.

QADRI, R *et al.* Conventional and modern technologies for the management of post-harvest diseases. **Plant Disease Management Strategies for Sustainable Agriculture through Traditional and Modern Approaches**, p. 137-172, 2020.

RAJAPAKSHA, L. *et al.* Reducing post-harvest losses in fruits and vegetables for ensuring food security—Case of Sri Lanka. **MOJ Food Process Technols**, v. 9, n. 1, p. 7-16, 2021.

RAJMOHAN, K. S; CHANDRASEKARAN, R; VARJANI, S. A review on occurrence of pesticides in environment and current technologies for their remediation and management. **Indian journal of microbiology**, v. 60, p. 125-138, 2020.

RAMOS, A. M; SOUSA, P. H. M; BENEVIDES, S. D. Tecnologia da industrialização da manga. **Manga: produção integrada, industrialização e comercialização**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v. 1, p. 571-604, 2020.

REZENDE, D. C *et al.* Mecanismos de ação do fosfito de potássio no crescimento e desenvolvimento de *Phytophthora nicotianae*, agente causal da gomose em citros. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e5369108822-e5369108822, 2020.

RIVERO-PINO, F *et al.* Antimicrobial plant-derived peptides obtained by enzymatic hydrolysis and fermentation as components to improve current food systems. **Trends in Food Science & Technology**, 2023.

RODRIGUES, P. L *et al.* Potencial de biocontrole das leveduras em pós-colheita de citros pela produção da enzima β -1, 3-glucanase e atividade killer: uma revisão. **Citrus Research & Technology**, v. 41, p. 1-18, 2020.

ROSSITER, K. W. L. Sistema de gestão de segurança de alimentos: uma abordagem da implantação da norma NBR ISO 22000: 2006 em uma indústria do Estado de Pernambuco. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco. 2019.

RUÍZ, A. E. L; OLIVEIRA, R. R; SOLÓRZANO, A. Buscando la Historia en los Bosques: el papel de los macrovestigios y de la vegetación en la Mata Atlántica. **Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v. 6, n. 1, p. 163-182, 2019.

SALIH, N; SALIMON, J. A review on eco-friendly green biolubricants from renewable and sustainable plant oil sources. **Biointerface Res. Appl. Chem**, v. 11, n. 5, p. 13303-13327, 2021.

SANTOS, A. M *et al.* Identification of the main proteins secreted by *Kluyveromyces marxianus* and their possible roles in antagonistic activity against fungi. **FEMS Yeast Research**, v. 23, p. foad007, 2023.

SANTOS, C. D *et al.* Extension of Solanaceae food crops shelf life by the use of elicitors and sustainable practices during postharvest phase. **Food and Bioprocess Technology**, v. 15, n. 2, p. 249-274, 2022.

SANTOS, S. F *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.

SARKAR, T *et al.* Minor tropical fruits as a potential source of bioactive and functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-45, 2022.

SCHARFE, M; FLÖTER, E. Oleogelation: From scientific feasibility to applicability in food products. **European journal of lipid science and technology**, v. 122, n. 12, p. 2000213, 2020.

SENA, I. S *et al.* *Euterpe oleracea* Mart (Açaizeiro) from the Brazilian Amazon: A Novel Font of Fungi for Lipase Production. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, p. 2394, 2022.

SHAHBAZ, M. U *et al.* Natural Plant Extracts: An Update about Novel Spraying as an Alternative of Chemical Pesticides to Extend the Postharvest Shelf Life of Fruits and Vegetables. **Molecules**, v. 27, n. 16, p. 5152, 2022.

SHEN, H *et al.* The marine yeast *Sporidiobolus pararoseus* ZMY-1 has antagonistic properties

against *Botrytis cinerea* *in vitro* and in strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 150, p. 1-8, 2019.

SIDDIQUI, Y; ALI, A. *Colletotrichum gloeosporioides* (Anthracnose). In: **Postharvest Decay**. Academic Press, 2014. p. 337-371.

SILVA, L. C. Terapêutica antioxidante ortomolecular como estratégia para uma saúde equilibrada Orthomolecular antioxidant therapy as a strategy for balanced health. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 4, p. 16370-16392, 2021.

SILVA, P. T. E *et al.* Principais espécies florestais utilizadas em sistemas agroflorestais na Amazônia. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 49, n. 1, p. 127-144, 2021.

SILVA, V. C. *et al.* TECNOLOGIAS CIBERCULTURAIS E EDUCAÇÃO EMPREENDEDORA: Caminhos em construção. **Revista Observatório**, v. 5, n. 5, p. 26-45, 2019.

SILVA, V. R *et al.* Pluriactivity and sustainability in rural communities of semiarid northeast. **Desenvolvimento E Meio Ambiente**, v. 35, p. 349-366, 2020.

SINGH, G *et al.* Current Status and Future Perspective on Enzyme Involving in Biocontrol of Plant Pathogen. **Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 12-17, 2022.

SINGH, J *et al.* Application of microbial antagonists for the preservation of fruits: An effective strategy to inhibit the postharvest disease. In: **Relationship Between Microbes and the Environment for Sustainable Ecosystem Services, Volume 3**. Elsevier, 2023. p. 261-288.

SOUZA, M. C *et al.* Application of biopolymers to preserve 'Pseudomonas fluorescens' cells and their efficiency in the biological control of 'Macrophomina' sp. **Australian Journal of Crop Science**, v. 16, n. 2, p. 280-285, 2022.

SRIVASTAV, A. L *et al.* Climate-resilient strategies for sustainable management of water resources and agriculture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 31, p. 41576-41595, 2021.

SUCUPIRA, N. R *et al.* Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2020.

SUN, G *et al.* Optimizing irrigation and fertilization at various growth stages to improve mango yield, fruit quality and water-fertilizer use efficiency in xerothermic regions. **Agricultural Water Management**, v. 260, p. 107296, 2022.

TAÏBI, A *et al.* Dynamics of bacterial and fungal communities of mango: From the tree to ready-to-Eat products. **Food Microbiology**, v. 108, p. 104095, 2022.

TAVASSOLI-KAFRANI, E *et al.* Edible films and coatings for shelf life extension of mango: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 9, p. 2432-2459, 2022.

TEIXIDÓ, N; USALL, J; TORRES, R. Insight into a successful development of biocontrol agents: Production, formulation, packaging, and shelf life as key aspects. **Horticulturae**, v. 8, n. 4, p. 305, 2022.

THAKOR, N. J. Indian mango–production and export scenario. **Peach**, v. 18, n. 107, p. 0-12, 2019.

THAKUR, N *et al.* Host-mediated gene engineering and microbiome-based technology optimization for sustainable agriculture and environment. **Functional & Integrative Genomics**, v. 23, n. 1, p. 57, 2023.

THERA, U. K. Chapter-9 Postharvest Diseases: A Threat to the Global Food Security. **Current Research and Innovations in Plant Pathology**, v. 27, p. 169, 2021.

TRONSMO, A. M *et al.* Plant pathogenic fungi. In: **Plant pathology and plant diseases**. Wallingford UK: CABI, 2020. p. 41-74.

TURQUETT, L. C. G. B *et al.* Avaliação da cobertura comestível elaborada a partir de quitosana, farelo de arroz e fécula de mandioca na conservação pós-colheita de morangos. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 33153-33171, 2021.

VARIZE, C. S *et al.* Biotechnological applications of nonconventional yeasts. **Yeasts in Biotechnology**, v. 46, p. 107674, 2019.

VEGAS, C *et al.* Yeasts Associated with Various Amazonian Native Fruits. **Polish journal of microbiology**, v. 69, n. 3, p. 251-261, 2020.

VERO, S *et al.* Microbial Biopesticides: Diversity, Scope, and Mechanisms Involved in Plant Disease Control. **Diversity**, v. 15, n. 3, p. 457, 2023.

WANI, A. M; SAHOO, G; GUPTA, S. Sacred Trees of India: Traditional Approach towards Plant Conservation. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 9, n. 2606, p. 13, 2020.

WEISSKOPF, L; SCHULZ, S; GARBEVA, P. Microbial volatile organic compounds in intra-kingdom and inter-kingdom interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 391-404, 2021.

YANG, H *et al.* Control of postharvest grey spot rot of loquat fruit with *Metschnikowia pulcherrima* E1 and potential mechanisms of action, **Biological Control** . v. 152 , p. 104-406, 2021.

YANG, Q *et al.* Unveiling ochratoxin a controlling and biotransformation molecular mechanisms: opportunities to secure foodstuffs from OTA contamination. **Food and Chemical Toxicology**, p. 113437, 2022.

YAP, K. M *et al.* *Mangifera indica* (Mango): A promising medicinal plant for breast cancer therapy and understanding its potential mechanisms of action. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, p. 471-503, 2021.

ZAKARIA, L. Diversity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in tropical fruit crops—A review. **Agriculture**, v. 11, n. 4, p. 297, 2021.

ZHANG, H *et al.* Unravelling the fruit microbiome: The key for developing effective biological control strategies for postharvest diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 5, p. 4906-4930, 2021.