

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Efeito de compostos orgânicos voláteis identificados a partir de
Saccharomyces cerevisiae sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e
Colletotrichum acutatum e no controle da antracnose em goiaba**

Dalilla Carvalho Rezende

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2010**

Dalilla Carvalho Rezende
Engenheiro Agrônomo

Efeito de compostos orgânicos voláteis identificados a partir de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* e no controle da antracnose em goiaba

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Rezende, Dalilla Carvalho

Efeito de compostos orgânicos voláteis identificados a partir de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* e no controle da antracnose em goiaba / Dalilla Carvalho Rezende. - - Piracicaba, 2010.
79 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Antracnose 2. Compostos voláteis 3. Fungos fitopatogênicos 4. Goiaba 5. Inibição
Leveduras 7. Pós-colheita I. Título

CDD 634.421
R467e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais,

Irani Rezende e Geraldo Francisco Rezende,

Pelo apoio, confiança, exemplo de vida e amor em todos os dias da minha vida.

DEDICO.

*A minha querida irmã **Sheila,***

pela amizade e carinho constantes.

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

“Devemos agradecer às pessoas que nos fazem felizes... São elas os jardineiros encantadores que fazem nossas almas florescerem!”

(Marcel Proust)

A Deus, fonte de toda sabedoria, pela vida, pela presença constante em meu caminho, pelas lições e obstáculos, pela família, pelos amigos e pela oportunidade de mais uma conquista.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização do curso.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio F. Pascholati pelos ensinamentos, amizade, confiança, conselhos e acolhida.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Maurício Fialho não apenas pela imensa ajuda na realização do trabalho, mas também pela amizade, força, confiança e exemplo.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica: André, Marisa, Greicy, Leonardo, Luciana Oharomari, Luciana Iurkiv, Luciana Brigati, Cíntia, Nívea, Nikolas, Rafael, Josué, Fúvia, Fernando e Ueliton pelos bons momentos de descontração.

A todos os colegas de curso, de modo especial a minhas queridas amigas: Caroline Rabelo, Rafaela Roma, Dra. Silvia Blumer e Simone Brand pela agradável convivência, pelas palavras de apoio, paciência, puxões de orelha e pelo auxílio nos trabalhos. A Luzia Miyata pelo companheirismo e amizade.

Ao Sr. Ricardo Kumagai pela atenção e fornecimento de goiabas da variedade Kumagai.

Aos colegas Ana Raquel e Wagner pelas dicas, colaboração e fornecimento dos isolados.

Ao Prof. Dr. Ângelo Jacomino (Depto Produção Vegetal – ESALQ/USP) pela disponibilização de equipamento no seu laboratório e em especial a doutoranda Ana Elisa Godoy pelas dicas e pronta ajuda na realização das análises de etileno.

As pesquisadoras Dra. Eliane Benato (ITAL) e Dra. Patrícia Cia (IAC) e suas equipes pelos ensinamentos e a Dra. Patricia Cia também pela disponibilização do Laboratório de Tecnologia Pós-Colheita (CEA/IAC - Jundiaí).

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia ESALQ/USP pelos ensinamentos.

Aos Funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia ESALQ/USP pela pronta ajuda. Em especial a Angélica, D. Carmem e Sirlene, pelos sorrisos e abraços que animavam os meus dias de trabalho.

Ao Prof. Dr. Fabrício Rodrigues e colegas do Laboratório Interação Planta-Patógeno-UFV, em especial a Dra. Vivian Carré Missio, pela amizade, pela valiosa participação na iniciação da minha vida acadêmica e científica e pelos constantes conselhos a mim fornecidos.

Ao Prof. Dr. Olinto Liparini - UFV pelo apoio e amizade durante a graduação e por despertar em mim o interesse pela patologia pós-colheita.

Ao pessoal do GOU (Grupo de Oração Universitário), de modo especial a Aninha pelas palavras de apoio, ajuda, orações e amizade.

Aos familiares pela torcida, orações e confiança durante todo esse tempo longe de casa.

Aos amigos hoje distantes, porém presentes em pensamento, com certeza hoje vocês brilham comigo.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

*“O que faz andar o barco não é a vela
enfundada, mas o vento que não se vê.”*

(Platão)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 DESENVOLVIMENTO	19
2.1 Revisão bibliográfica.....	19
2.1.1 Aspectos gerais da cultura da goiaba.....	19
2.1.2 Antracnose.....	20
2.1.3 Importância do manejo pós-colheita.....	22
2.1.4 Compostos orgânicos voláteis.....	24
2.1.4.1 Exemplos de microrganismos produtores de COVs e seus efeitos sobre outros organismos.....	25
2.1.4.2 Possíveis aplicações dos COVs no controle de fitopatógenos.....	29
2.2 Material e métodos.....	31
2.2.1 Obtenção e manutenção dos isolados de <i>Colletotrichum</i>	31
2.2.2 Obtenção dos COVs antimicrobianos.....	31
2.2.3 Avaliação <i>in vitro</i> do efeito dos COVs sobre o desenvolvimento de <i>Colletotrichum</i>	32
2.2.3.1 Efeito sobre o crescimento micelial.....	32
2.2.3.2 Efeito sobre a produção de biomassa.....	32
2.2.3.3 Efeito sobre a esporulação.....	33
2.2.3.4 Efeito sobre a germinação e formação de apressórios.....	33
2.2.4 Elucidação de alguns dos mecanismos de ação dos COVs.....	34
2.2.4.1 Efeito sobre a permeabilidade da membrana plasmática.....	34
2.2.4.2 Peroxidação lipídica.....	34
2.2.4.3 Efeito sobre a síntese de proteínas.....	36
2.2.5 Avaliação da utilização do volátil 3M1B no controle pós-colheita de frutos de goiaba.....	36
2.2.5.1 Obtenção e inoculação dos frutos.....	36

2.2.5.2 Tratamento dos frutos e avaliação do efeito sobre a taxa de expansão de lesão e incidência da antracnose.....	37
2.2.5.3 Efeito do volátil na produção de etileno pelos frutos.....	38
2.2.4.4 Efeito do tratamento com o volátil sobre a qualidade físico-química de frutos de goiaba.....	39
2.3 Resultados e discussão.....	40
2.3.1 Efeito dos COVs sobre o crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> e <i>C. acutaum</i>	40
2.3.2 Efeito dos COVs sobre a esporulação de <i>C. gloeosporioides</i> e <i>C. acutatum</i>	48
2.3.3 Efeito dos COVs sobre a germinação e formação de apressórios.....	53
2.3.4 Avaliação dos possíveis mecanismos de ação dos COVs.....	54
2.3.4 Avaliação da utilização do volátil 3M1B no controle pós-colheita de frutos de goiaba.....	60
2.3.4.1 Efeito do volátil na incidência e severidade da antracnose.....	60
2.3.4.2 Efeito do volátil na produção de etileno pelos frutos após tratamento com o volátil...	62
2.3.4.3 Efeito na qualidade físico-química de frutos de goiaba após tratamento com o composto volátil 3M1B.....	63
3 CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS.....	71

RESUMO

Efeito de compostos orgânicos voláteis identificados a partir de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* e no controle da antracnose em goiaba

A antracnose, que tem como agentes causais os fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. acutatum*, é uma das principais doenças que afetam a cultura da goiabeira. Não há no Brasil, fungicidas registrados para o controle da doença em pós-colheita. Em vista disso e da preocupação em relação à saúde humana e o respeito ao ambiente vem crescendo pesquisas envolvendo a utilização de agentes alternativos para o controle de doenças. Foi verificado em trabalho prévio que a levedura *S. cerevisiae*, apresentou atividade antagônica *in vitro* contra vários fitopatógenos, dentre eles *C. gloeosporioides*. Essa inibição foi atribuída à produção de uma mistura de compostos orgânicos voláteis (COVs), sendo que os álcoois 3-metil-1-butanol (3M1B) e 2-metil-1-butanol (2M1B) foram apontados como os principais responsáveis por essa atividade. Considerando a importância do manejo pós-colheita e o potencial da utilização de COVs no controle da antracnose, os objetivos desse trabalho foram avaliar o efeito *in vitro* dos COVs 3M1B e 2M1B identificados a partir de *S. cerevisiae* no desenvolvimento de *Colletotrichum sp.*, elucidar alguns dos possíveis mecanismos de ação atuantes no processo inibitório e avaliar a utilização dos COVs no controle pós-colheita da antracnose em frutos de goiaba. Foi observado aumento da inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos à medida que houve aumento da concentração dos compostos, chegando a 100% a partir da dose de $1\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar. Os menores valores de MIC₅₀ para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, foram 0,34 e 0,31 quando tratados com os compostos 3M1B e a mistura 3M1B:2M1B (10:1; v/v), respectivamente. Ambos os fitopatógenos retomaram o crescimento quando transferidos para novo meio na ausência dos COVs, caracterizando a natureza fungistática da inibição. A esporulação de *C. acutatum* também foi totalmente inibida nas doses testadas. Também foram observados efeitos negativos sobre a produção de biomassa fúngica por *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, em média 64,9% e 55,4% menores, respectivamente, após a exposição aos COVs. Com relação aos possíveis mecanismos de ação atuantes no processo inibitório, os ensaios indicam que os voláteis podem causar aumento na permeabilidade da membrana plasmática, tendo como consequência a perda de eletrólitos. Foram verificados maiores níveis de peroxidação dos lipídios de membrana quando expostos aos voláteis, indicando um possível processo de estresse oxidativo. Não foram verificadas alterações significativas no conteúdo de proteínas do micélio dos fitopatógenos. O potencial de utilização do 3M1B no controle da antracnose em pós-colheita foi avaliado em frutos inoculados com *C. acutatum* e posteriormente tratados com o volátil por 10h. A incidência e a severidade da doença nos frutos tratados alcançaram valores 5 e 6,25 vezes maiores, respectivamente, quando comparado com o controle no último dia de avaliação. Também foi avaliado o efeito do tratamento sobre qualidades físico-químicas dos frutos, e não foram observadas alterações em nenhum dos parâmetros avaliados. Os COVs utilizados nesse estudo são capazes de interferir no desenvolvimento de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, porém nas condições experimentais do trabalho, mostraram-se inadequados para o controle da antracnose em goiaba.

Palavras-chave: Pós-colheita; Inibição; Controle alternativo; Mecanismos de ação

ABSTRACT

Effect of volatile organic compounds identified from *Saccharomyces cerevisiae* on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum* and on the control of anthracnose of guava

The anthracnose, which has as causal agents the fungi *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum*, is one of the main diseases that affect guava plants. In Brazil, there are not fungicides registered for the control of the disease in post-harvest conditions. This aspect and the concern about human health and the environment, made increase researches involving the use of alternative agents to control diseases. In a previous study, it was shown that the yeast *S. cerevisiae* exhibited antagonistic activity *in vitro* against several pathogens, including *C. gloeosporioides*. This inhibition was attributed to the production of a mixture of volatile organic compounds (VOCs), and the alcohols 3-methyl-1-butanol (3M1B) and 2-methyl-1-butanol (2M1B) were identified as the main ones, responsible for the activity. Considering the importance of post-harvest management and the potential use of VOCs in the anthracnose control, the objectives of this study were the evaluation of the *in vitro* effect of 3M1B and 2M1B VOCs identified from *S. cerevisiae* on the development of *Colletotrichum*, the elucidation of some of the possible mechanisms acting during the inhibitory process and the evaluation of the use of VOCs in postharvest anthracnose control of guava fruits. An increased inhibition was observed in mycelial growth of the pathogens as the concentration of the compounds increased, reaching 100% of inhibition in the dose $1\mu\text{L mL}^{-1}$ of air. The lowest values of MIC_{50} for *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* were 0.34 and 0.31, respectively when treated with the compound 3M1B and the mixture 3M1B:2M1B (10:1; v/v). Both pathogens regained growth when transferred to a new medium in the absence of VOCs, thus characterizing the fungistatic nature of the inhibition. The sporulation of *C. acutatum* was also completely inhibited at all tested doses. There were negative effects on the production of fungal biomass by *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*, being 64.9% and 55.4% lower on average, respectively, after exposure to VOCs. Regarding the possible mechanisms acting in the inhibitory process, the results indicated that the volatiles could increase the permeability of the plasma membrane, resulting in the loss of electrolytes. It was observed higher levels of peroxidation of membrane lipids when exposed to volatiles, suggesting a oxidative stress process. There were not significant alterations in protein content of the pathogen mycelium. The potential use of 3M1B in postharvest anthracnose control was evaluated in fruits inoculated with *C. acutatum* and subsequently treated for 10h with the volatile. The incidence and severity of disease in the treated fruits showed values 5 and 6.25 higher, respectively, when compared to the control treatment on the last day of evaluation. The effect of treatment was evaluated on the physico-chemical quality of the fruits, and no changes were observed in any of the parameters. The VOCs used in this study are able to interfere on the development of *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*, but, under the experimental conditions of the work, the VOCs were not adequate to control the anthracnose of guava.

Keywords: Post-harvest; Inhibition; Alternative control; Mechanisms of action

1 INTRODUÇÃO

A cultura da goiaba é de grande expressão no mercado brasileiro, sendo que no ano de 2007 o país produziu cerca de 316 mil toneladas de frutos cultivados em 15 mil hectares (FNP, 2010). Esta produção está concentrada nos estados de Pernambuco e São Paulo que juntos respondem por cerca de 65% do volume produzido no país. O estado de São Paulo é o segundo maior produtor, com uma produção de 120 mil toneladas, responsável por 29,5% da produção nacional (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2009). Entretanto, a produção de goiabas destinadas ao mercado externo é inexpressiva. Em 2007, o país exportou somente 0,07% do total produzido, mas a procura por uma vida mais saudável está em evidência no comportamento dos principais consumidores do mundo, prova disso é o aumento da demanda por frutos exóticos por alguns países da Europa, em especial por frutos frescos (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS - IBRAF, 2009; SECRETARIA DE COMÉRCIO EXTERIOR - SECEX, 2010).

A antracnose, também conhecida como mancha chocolate é uma das principais doenças da goiabeira em todos os países produtores, causando perdas consideráveis em pós-colheita e por isso é um dos fatores limitantes à exportação de frutas. Na ausência de medidas de controle, sua incidência pode atingir 70 a 100 % dos frutos. Mesmo em frutos destinados à exportação, que recebem tratamento pós-colheita, a antracnose ainda é um importante problema (LIMA FILHO et al., 2003). Um único agente causal, *Colletotrichum gloeosporioides* (teleomorfo: *Glomerella cingulata*) (BOTELHO et al., 2000; PANDEY, 1988; MENEZES; HANLIN, 1966) esteve por muitos anos associado às lesões de antracnose, mas isolados de *Colletotrichum acutatum* (teleomorfo: *Glomerella acutata*) já foram encontrados atacando frutos na Índia (DAS; BORA, 1998) e, mais recentemente no Brasil (PERES et al., 2002).

Medidas de controle dessa doença na maioria das vezes são realizadas por meio de medidas culturais no campo. Além disso, pulverizações com fungicidas cúpricos são realizadas com a finalidade de reduzir o inóculo na área (PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005). Atualmente não há produtos registrados para uso em frutos de goiaba no Brasil para o manejo pós-colheita. Dessa forma, vários cuidados podem ser adotados durante o manejo pós-colheita com intuito de reduzir as perdas e aumentar a vida de prateleira dos frutos, dentre eles o cuidado no manuseio, transporte e armazenamento adequado dos frutos.

A qualidade e o respeito ao ambiente são preocupações atuais do mercado internacional atual de frutas e hortaliças. Assim, a preocupação mundial com relação à poluição ambiental e aos riscos à saúde promovidos pelos agrotóxicos, somado à resistência de patógenos a fungicidas e a retirada de alguns produtos do mercado, têm levado ao aumento das pesquisas envolvendo a utilização de agentes alternativos para o controle de doenças de pós-colheita (CIA et al., 2007).

Compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por microrganismos referem-se a produtos do metabolismo desses, que se apresentam como gases ou possuem alta pressão de vapor, e que em condições normais são liberados da célula. A diversidade de voláteis microbianos é muito extensa, ocorrendo em diferentes microrganismos e em diversas proporções. Apesar dos avanços no conhecimento sobre voláteis de origem microbiana, os mecanismos que governam as etapas desde o reconhecimento do volátil pelo microrganismo alvo até a expressão da resposta ainda não foram claramente explicados. A produção de COVs é dependente de diversos fatores, como disponibilidade de nutrientes, temperatura e fase de crescimento. Os fungos produtores de COVs mais estudados são os dos gêneros *Muscodor* e *Trichoderma*. Com relação ao modo de ação dos COVs, alguns autores sugerem que os mesmos atuam na alteração da expressão de proteínas e atividades de enzimas específicas, podendo refletir no crescimento. A busca por produtos livres de resíduos químicos faz com que agricultores e pesquisadores comecem a considerar o uso de métodos alternativos no combate a doenças. Em vista disso, a biofumigação de frutos utilizando microrganismos, ou mesmo a fumigação com misturas de voláteis pode ser uma alternativa viável no controle de fitopatógenos. Além do tratamento de frutos e vegetais, os compostos voláteis de origem microbiana podem ser utilizados no controle de patógenos associados a sementes e na fumigação de solos contaminados.

Foi verificado em trabalho prévio que a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, produz compostos voláteis de ação antimicrobiana capazes de inibir em até 87% o crescimento micelial de *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta do citros. Essa inibição foi atribuída à produção de uma mistura de compostos orgânicos voláteis (COVs), sendo que os álcoois superiores alifáticos 3-metil-1-butanol (3M1B) e 2-metil-1-butanol (2M1B) foram apontados como os principais responsáveis por essa atividade.

Considerando a importância do manejo pós-colheita de frutos de goiaba e o potencial da utilização de COVs produzidos por *S. cerevisiae*, os objetivos desse trabalho foram: (i) avaliar o efeito *in vitro* dos COVs 3M1B e 2M1B identificados a partir de *S. cerevisiae* no

desenvolvimento de *Colletotrichum sp.*, (ii) elucidar alguns dos possíveis mecanismos de ação atuantes no processo inibitório de *Colletotrichum sp.*, (iii) avaliar a utilização dos COVs no controle pós-colheita da antracnose em frutos de goiaba.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Aspectos gerais da cultura da goiaba

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é uma planta pertencente à família Myrtaceae e que possui cerca de 102 gêneros e 3.024 espécies conhecidas. É originária da América Tropical, possivelmente entre o México e o Peru, onde ainda pode ser encontrada em estado silvestre. No Brasil, a goiabeira encontra-se amplamente difundida da região Sul ao Nordeste. (MANICA et al., 2001; PEREIRA; MARTINEZ JÚNIOR, 1986). Essa grande difusão deve-se à sua facilidade em multiplicar-se por sementes, que são abundantes nos frutos, a rusticidade da planta, que se desenvolve sem dificuldades em solos com baixa fertilidade e com baixa retenção de umidade, além da larga disseminação graças à ação de pássaros, mamíferos e do homem. Os frutos são do tipo bagos globosos, com tamanho, forma e coloração da polpa variáveis, dependendo da cultivar (GONZAGA NETO; SOARES, 1995; MANICA et al., 2001).

A goiaba é um fruto bastante apreciado devido às suas características como sabor e aroma e pelo seu elevado valor nutritivo, sendo considerada uma das frutas mais completas e equilibradas, pois é rica em zinco, fibras, niacina, vitamina E e licopeno. Contém quatro vezes mais vitamina C do que a laranja, perdendo somente para a acerola, camu-camu e o caju, além de apresentar altas concentrações de selênio, cobre, fósforo, magnésio, cálcio, ferro, ácido fólico e de vitaminas A e do complexo B. As excelentes propriedades organolépticas a tornam aproveitável tanto para o consumo *in natura* quanto para a industrialização (MANICA et al., 2001).

O principal produtor comercial de goiaba no mundo é o Brasil, seguido pelo Chile, Argentina, México e Estados Unidos. Sua produção em escala industrial no País teve início na década de 70, quando grandes áreas tecnificadas foram implantadas com produção direcionada para os mercados nacional e internacional, na forma *in natura*, industrializada (doces e sucos) e desidratada (CHOUDHURY et al., 2001). Segundo dados do Agriannual (2010), no ano de 2007, o Brasil produziu cerca de 316 mil toneladas de frutos cultivados em 15 mil hectares. Esta produção está concentrada nos estados de Pernambuco e São Paulo que juntos respondem por cerca de 65% do volume produzido no país. O estado de São Paulo é o segundo maior produtor,

com uma produção de 120 mil toneladas, responsável por 29,5% da produção nacional (IBGE, 2009).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Frutas - IBRAF (2009) e Secretaria de Comércio Exterior – SECEX (2010), a produção de goiabas destinadas ao mercado externo é inexpressiva. Em 2007, o país exportou somente 0,07% do total produzido. Mas a procura por uma vida mais saudável está em evidência no comportamento dos principais consumidores do mundo, prova disso é o aumento da demanda por frutos exóticos por alguns países da Europa, em especial por frutos frescos. Esse fato estimula os produtores brasileiros a investir na produção de goiaba, pois o país apresenta imensas áreas de clima e solo favoráveis à produção comercial da goiabeira. Dessa forma, o aumento na produção de goiaba em nosso país representa perspectivas potenciais no incremento da produção agrícola, geração de empregos, ampliação da atividade industrial e no potencial de exportação dessa fruta.

A preferência do mercado externo é para o consumo de goiaba de polpa branca para mesa e do mercado interno, a opção é pela goiaba de polpa vermelha. Segundo Azzolini (2002), a alta perecibilidade da goiaba é o principal problema enfrentado pelos produtores na comercialização da fruta *in natura*, tanto no mercado nacional como internacional. A falta do emprego de tecnologias de conservação limita o período de comercialização e diminui a qualidade dos frutos, tendo por conseqüência, a redução do número de mercados consumidores. O incremento no consumo da goiaba como fruta fresca está condicionada à melhoria na qualidade dos frutos. Desta forma, a aplicação de tecnologias de conservação pós-colheita é prioridade para a cultura da goiaba.

2.1.2 Antracnose

O fungo filamentososo do gênero *Colletotrichum*, é considerado um dos principais fitopatógenos em todo mundo. Várias culturas de importância econômica em regiões temperadas, subtropicais e tropicais são acometidas por esse patógeno, causando significativas perdas. Cereais, legumes, plantas ornamentais e frutos podem ser seriamente afetados pelo patógeno. Embora muitas frutíferas cultivadas sejam infectadas por *Colletotrichum*, as perdas econômicas mais significativas ocorrem quando atacados em sua fase de frutificação (JUNQUEIRA et al., 2001; JUNQUEIRA et al., 2002; PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005).

Também conhecida como mancha chocolate, a antracnose é uma das principais doenças da goiabeira em todos os países produtores, causando perdas consideráveis em pós-colheita. Essa doença mostra-se problemática em pomares mal conduzidos e em cultivos de goiaba para indústria. A doença é importante em condições de produção onde os agricultores utilizam sacos de papel ou plástico para proteção dos frutos, gerando uma câmara úmida artificial, favorável ao patógeno (PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005). Por causar importantes perdas em pós-colheita, é um dos fatores limitantes à exportação de frutas. Nos meses mais quentes do ano, na ausência de medidas de controle, sua incidência pode atingir 70 a 100 % dos frutos. Mesmo em frutos destinados à exportação, que recebem tratamento pós-colheita, a antracnose ainda é um importante problema (LIMA FILHO et al., 2003).

Apesar do agente causal ser mundialmente aceito como sendo *Colletotrichum gloeosporioides* (teleomorfo: *Glomerella cingulata*) (BOTELHO et al., 2000; PANDEY, 1988; MENEZES; HANLIN, 1966), isolados de *Colletotrichum acutatum* (teleomorfo: *Glomerella acutata*) já foram encontrados atacando frutos na Índia (DAS; BORA, 1998) e, mais recentemente no Brasil (PERES et al., 2002). Assim, a antracnose da goiaba pode ser causada por infecções simples ou múltiplas dessas duas espécies fúngicas.

Conídios são as mais importantes formas pelas quais o patógeno é disseminado no campo. Eles são produzidos em lesões necróticas no fruto, ramos mortos, folhas e outros tecidos doentes do hospedeiro (LIM; MANICOM, 2003). A produção de esporos por esse patógeno é favorecida por temperaturas médias próximas de 23 a 27° C. Como os propágulos desse fungo são disseminados por respingos de água, a ação do patógeno é favorecida por alta umidade, principalmente chuvas abundantes. Chuvas brandas favorecem o progresso da doença numa mesma planta já infectada, enquanto que chuvas acompanhadas de ventos tendem a transportar o fungo para outras plantas. Em períodos de temperaturas mais baixas, a importância da doença diminui, sendo pequena sua incidência nos meses de inverno, mesmo quando há ocorrência de chuvas. O patógeno sobrevive em restos culturais, no próprio hospedeiro ou em plantas hospedeiras vizinhas dos pomares (RUGGIERO et al., 1996).

A infecção do hospedeiro pelo fungo se dá por ferimentos causados por insetos, por lesões que aparecem durante o manuseio do fruto ou também pode ser direta, com a formação de apressórios, os quais podem permanecer quiescentes até o momento mais favorável à infecção e colonização. A temperatura ideal para que ocorra a infecção situa-se entre 22 e 25° C. Em geral, a

podridão dos frutos processa-se em frutos maduros (PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005).

Os sintomas nas folhas e frutos consistem em lesões de formato mais ou menos circulares e de coloração escura, amarronzado, que aumentam de tamanho e tornam-se deprimidas. Em condições prolongadas de umidade, é possível se observar, sobre as lesões, sinais do patógeno, de coloração alaranjada que corresponde a uma matriz mucilaginosa onde se encontram os conídios. Nos frutos, onde os sintomas são mais severos, pode-se observar o surgimento de pequenas manchas circulares de coloração marrom, que aumentam de tamanho e tornam-se deprimidas. As lesões podem coalescer, formando uma grande mancha de formato irregular. Em decorrência da penetração do patógeno pelo botão floral, os frutos também podem apresentar sintomas de podridão, ocorrendo um escurecimento a partir do pedúnculo (PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005). Em casos severos, os frutos se apresentam mumificados ou apodrecidos. Esses sintomas comprometem de maneira importante o mercado de frutas *in natura*.

Os métodos de controle dessa doença muitas vezes são realizados por meio de medidas culturais ainda no campo, mantendo-se o bom arejamento das plantas, evitando a cobertura dos frutos com sacos de papel ou plástico, mantendo a limpeza do pomar e realizando a queima de todos os resíduos. Além disso, pulverizações com fungicidas cúpricos são realizadas com a finalidade de reduzir o inóculo na área (PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005). Atualmente, não há produtos registrados para uso em pós-colheita para a cultura da goiabeira no Brasil. Dessa forma, vários cuidados simples podem ser adotados durante o manejo pós-colheita com intuito de reduzir as perdas, principalmente em se tratando de manuseio e transporte adequado dos frutos.

2.1.3 Importância do manejo pós-colheita

A demanda mundial por frutas e hortaliças vem crescendo significativamente nos últimos anos, em virtude, principalmente, da conscientização da população acerca da importância de uma alimentação saudável. Um dos principais entraves na produção e comercialização desses produtos são as expressivas perdas pós-colheita.

Pelo fato de serem suculentas, as frutas e hortaliças constituem-se em excelentes substratos ao desenvolvimento microbiano, ficando também, sujeitas a danos físicos e fisiológicos, e como consequência, a infecções pós-colheita.

A grande perda de frutas e hortaliças após a colheita é uma realidade no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil. O nível das perdas poderia ser reduzido se práticas corretas de cultivo, de colheita e principalmente pós-colheita fossem adotadas. A falta de conhecimento dos processos fisiológicos dos frutos, a falta de infra-estrutura adequada e de uma logística de distribuição são os principais fatores responsáveis pelo elevado nível de perdas pós-colheita observados no Brasil (AZZOLINI, 2002).

O potencial de conservação de um fruto está diretamente relacionado, não só com o manejo adequado após a colheita, mas também, com as condições climáticas durante a produção e com as práticas culturais adotadas (CHITARRA; CHITARRA, 1990). Desta forma, a qualidade de um fruto é dependente da adoção de um conjunto de medidas que se iniciam na formação do pomar e terminam com a distribuição do fruto no mercado consumidor.

Em se tratando da comercialização de frutos de goiaba, o principal fator limitante é a alta perecibilidade dos frutos e, conseqüentemente, sua curta vida de prateleira (CARVALHO, 1994), pois seu processo de amadurecimento é rápido e caracterizado por acentuada elevação da taxa respiratória e de transformações bioquímicas. Nesse sentido, para manter a qualidade dos frutos e aumentar seu tempo de conservação após a colheita, as atenções têm sido dirigidas às operações de colheita e pós-colheita, que devem ser realizadas dentro de padrões específicos para cada espécie. Para frutos de goiabeira, a determinação do ponto ótimo de colheita e a realização de tratamentos pós-colheita dos frutos têm sido os principais aspectos estudados.

Embora o Brasil seja um dos maiores produtores de goiaba, a exportação dessa fruta ainda é inexpressiva quando comparado a outras frutas tropicais, como a banana, a manga e o melão, mas existe uma grande perspectiva no aumento da produção e possível crescimento da exportação de goiabas em nosso país. Entretanto, sob o enfoque de exigências internacionais de um mercado importador concentrado e exigente, protegido por barreiras fitossanitárias, as frutas brasileiras de clima tropical são pouco conhecidas e apresentam baixo padrão de qualidade, devido ao inadequado uso de agrotóxicos e à tecnologia deficiente de pós-colheita (ALMEIDA, 2002).

O mercado internacional atual de frutas e hortaliças valoriza cada vez mais a qualidade e respeito ao meio ambiente. Assim, a preocupação mundial com relação à

poluição ambiental e aos riscos à saúde promovidos pelos agrotóxicos, somado à resistência de patógenos a fungicidas e a retirada de alguns produtos do mercado, têm levado ao aumento das pesquisas envolvendo a utilização de agentes alternativos, para o controle de doenças de pós-colheita (CIA et al., 2007).

2.1.4 Compostos Orgânicos Voláteis

Os Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) antimicrobianos receberam pouca atenção, quando comparados ao antagonismo causado por substâncias difusíveis (CHAURASIA et al., 2005). No entanto, recentemente uma série de trabalhos tem focado atenção nesses produtos do metabolismo, que se apresentam como gases ou possuem alta pressão de vapor, e que em condições normais são liberados da célula (TARKKA; PIECHULLA, 2007). Esses compostos geralmente possuem baixa massa molecular, são ativos em baixas concentrações e podem pertencer a diversas classes químicas (WHEATLEY, 2002).

A diversidade de voláteis microbianos é extensa, ocorrendo em diferentes microrganismos e em diferentes proporções, não sendo possível encontrar uma tabela universal com todos os COVs. Entretanto, há um grupo de compostos que já foi estudado e é aceito como COVs. Esses compostos podem pertencer a diversas classes químicas como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, lactonas, terpenos e compostos de enxofre (WHEATLEY, 2002).

Apesar dos avanços no conhecimento sobre os voláteis de origem microbiana, os mecanismos que governam as etapas que vão desde o reconhecimento do volátil pelo microrganismo alvo até a expressão da resposta ainda não foram claramente explicados. O fenômeno de estímulo e/ou inibição do crescimento micelial e a germinação de esporos fúngicos por compostos presentes na fase gasosa parece ser de caráter multifuncional, ou seja, depende de uma série de eventos somados. Apesar dos profundos efeitos causados na dinâmica das relações entre microrganismos patogênicos e não patogênicos, e destes com as plantas, as discussões tem sido meramente especulatórias (FRENCH, 1992).

O primeiro fator a ser considerado para o entendimento da vulnerabilidade de estruturas fúngicas aos compostos voláteis é a relação das estruturas com o meio onde estão inseridas. Geralmente, os fungos possuem suas células vegetativas expostas ao ambiente onde desenvolvem parte do micélio e porções consideráveis dos órgãos reprodutivos no ar (FRIES,

1973), o que determina uma relação superfície/volume bastante alta. A interação via aérea tem se mostrado eficiente, visto que muitos compostos lipofílicos liberados diretamente no ar podem acumular-se mais rapidamente na membrana plasmática de uma célula receptora do que se estivessem na fase líquida (STOTZKY et al., 1976).

Devido à volatilidade, estes compostos são menos suscetíveis do que compostos não voláteis em solução a várias formas de inativação, como solvatação, sorção e alterações causadas por reações químicas que ocorrem na presença de água. Além disso, compostos se difundindo em meio líquido provavelmente estão mais expostos a concentrações elevadas de substâncias químicas inativadoras, e o movimento será limitado pela descontinuidade do filme aquoso. Conseqüentemente, a esfera de influência (raio de difusão) de compostos voláteis é muito maior. Com base nessas características, os COVs são considerados “infoquímicos” ideais (WHEATLEY, 2002).

Tem sido demonstrado que interações entre microrganismos mediadas por voláteis podem ser positivas, negativas ou neutras, para um ou mais microrganismos participantes da interação, podendo determinar vantagem seletiva para alguns membros da comunidade. Voláteis oriundos do metabolismo primário e secundário podem ultrapassar os limites do ambiente onde são produzidos, e interagir com um receptor sensível à apenas algumas poucas moléculas de um volátil particular, e afetar a fisiologia de um competidor ou outro membro da mesma espécie. Portanto, possuem papel importante durante a evolução dos microrganismos no contexto de comunidades, populações e dinâmica funcional (HUMPHRIS et al., 2002).

A maioria dos estudos relacionados à atividade antimicrobiana de compostos voláteis sobre microrganismos fitopatogênicos e deterioradores de madeira é voltada para *Muscodor albus* (GRIMME et al., 2007; STROBEL, 2006), *Trichoderma* spp (BRUCE et al., 2000; HUMPHRIS et al., 2002) e *Bacillus* spp (BRUCE et al., 2004; LEELASUPHAKUL et al., 2008).

2.1.4.1 Exemplos de microrganismos produtores de COVs e seus efeitos sobre outros organismos

Muscodor albus é um fungo endofítico, inicialmente isolado da árvore de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) em Honduras, sendo um reconhecido produtor de COVs com excepcional atividade antimicrobiana. A utilização do fungo ou da mistura artificial de voláteis inibiu ou matou uma ampla gama de patógenos (fungos, oomicetos e bactérias) de plantas e

humanos (STROBEL et al., 2001; WORAPONG et al., 2001), fitopatógenos associados ao solo (MERCIER; MANKER, 2005; STINSON et al., 2003), patógenos de frutos na pós-colheita (MERCIER; JIMÉNEZ, 2004; MERCIER; SMILANICK, 2005; SCHNABEL; MERCIER, 2006), fungos em sementes armazenadas (EZRA; STROBEL, 2003), insetos praga (LACEY et al., 2008), fitonematóides (RIGA et al., 2008) e mofo tóxico em prédios e materiais de construção (MERCIER; JIMÉNEZ, 2007). Dentre os fitopatógenos controlados pelos voláteis produzidos por *M. albus* encontramos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium ultimum* e *Verticillium dahliae* (STROBEL et al., 2001). Mercier e Jiménez (2004) verificaram que os voláteis de *M. albus* inibiram o desenvolvimento *in vitro* de *Penicillium digitatum*, *P. expansum*, *C. acutatum* e *C. coccodes*.

O fungo produz uma mistura constituída por cerca de 30 COVs, pertencentes a cinco classes químicas (álcoois, ésteres, cetonas, ácidos e lipídios). O composto mais bioativo individualmente foi o éster 3-metil-1-butanol acetato (STROBEL et al., 2001), porém, a atividade antimicrobiana completa só foi alcançada quando os compostos naftaleno, ácido isobutírico e 3-metil-1-butanol foram utilizados em conjunto, mimetizando o efeito inibitório causado pelo fungo produtor sobre os fitopatógenos (EZRA et al., 2004).

Com o objetivo de estudar a capacidade repelente do composto volátil naftaleno produzido por *Muscodor vitigenus*, Daisy et al. (2002) verificaram que o mesmo foi capaz de repelir *Cephus cinctus*, uma importante praga da cultura do trigo. Tanto os ensaios utilizando o fungo produtor de volátil, quanto o produto comercial foram capazes de repelir em média 80% dos insetos testados.

Muscodor crispans, uma nova espécie de *Muscodor*, foi recentemente descoberto vivendo endofiticamente em plantas de abacaxi selvagem na Amazônia Boliviana. Os autores identificaram uma série de COVs produzidos por esse microrganismo com ação antimicrobiana contra uma ampla gama de fitopatógenos, dentre eles fungos dos gêneros *Pythium*, *Phytophthora* e *Sclerotinia*. Também foi verificada a ação desses COVs no desenvolvimento de *Mycosphaerella fijiensis* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, agentes causais da sigatoka negra da bananeira e do cancro cítrico, consideradas hoje como doenças de grande importância em todo mundo (MITCHELL et al., 2010).

Gliocladium sp. é um fungo endofítico, com proximidade taxonômica a *Trichoderma* spp., isolado a partir de *Eucryphia cordifolia*. Possui um amplo espectro de atividade biológica, mas

geralmente não é observado efeito letal sobre os organismos alvo, com exceção de *P. ultimum* e *V. dahliae*. Alguns dos compostos bioativos produzidos por *Gliocladium* sp. são o 3-metil-1-butanol, feniletilalcool, ácido acético 2-feniletilester e diversos ésteres de ácido propanóico. No entanto, o principal composto produzido por este fungo é o anuleno, um composto explosivo nunca identificado anteriormente em uma fonte natural (STINSON et al., 2003).

Frutos produzidos por uma espécie de castanheira (*Terminalia catappa*) na Costa Rica são capazes de produzir substâncias aromáticas e essa aromaticidade foi atribuída à produção de vários ésteres e compostos orgânicos pelo endófito *Oidium* sp. (STROBEL et al., 2008). Os compostos voláteis produzidos por esse fungo, ao contrário de *M. albus*, não causaram efeito letal sobre os microrganismos avaliados, promovendo apenas uma redução no desenvolvimento destes. Foram identificados vários ésteres do ácido 2-metil propanóico, ácido 2-metil butanóico e ácido 3-metil butanóico (STROBEL et al., 2008).

Trichoderma spp. são fungos saprófitas e os mais estudados microrganismos produtores de compostos voláteis, sendo que a maior parte dos estudos envolve a inibição de fungos deterioradores de madeira (BRUCE et al., 2000). Wheatley et al. (1997) evidenciaram que os compostos 2-propanona, 2-metil-1-butanol, decanal, heptanal e octanal, produzidos por isolados de *T. pseudokoningii* e *T. viride*, foram os responsáveis pela atividade antimicrobiana contra fungos deterioradores de madeira. Posteriormente, Humphris et al. (2001) confirmaram que diversos basidiomicetos foram totalmente inibidos por heptanal e octanal, mesmo em baixas concentrações (2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ar).

Fusarium oxysporum (linhagem MSA 35) é um fungo não patogênico associado a solos supressivos para diferentes *formae speciales* causadoras de murcha. Minerdi et al. (2009) constataram que o antagonismo se deve a produção de compostos voláteis (sesquiterpenóides) capazes de inibir o crescimento micelial e reprimir a expressão de dois genes putativos relacionados a virulência (*fmk1* e *chsV*). Segundo os autores, essa repressão ocorreu particularmente em virtude da produção do composto α -humuleno.

Fialho (2008) e Fialho et al. (2010) relataram o potencial dos voláteis produzidos por seis linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas de processos fermentativos para produção de etanol. As leveduras produziram em meio BDA compostos voláteis de ação fungistática capazes de inibir em até 87% o crescimento micelial de *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta do citros. Posteriormente, foi identificada a produção de sete compostos pela linhagem CR-

1 de *S. cerevisiae*, sendo etanol o componente majoritário constituindo 85% da mistura gasosa, além de 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol e feniletilalcol. Também foi constatada a presença dos ésteres acetato de etila e octanoato de etila.

Uma mistura artificial de voláteis, mimetizou os efeitos causados pela levedura sobre *G. citricarpa* (FIALHO, 2008) e apresentou atividade sobre outros fitopatógenos pertencentes a uma ampla gama de grupos taxonômicos (basidiomicetos, zigomicetos, oomicetos e mitospóricos). Os fungos mais suscetíveis foram *S. sclerotiorum*, *G. citricarpa*, *C. lindemuthianum*, *P. digitatum*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Phomopsis citri* (inibição acima de 50%). No entanto, *A. niger*, *Cladosporium* sp e *P. italicum*, e nenhuma das bactérias avaliadas (*Bacillus subtilis*, *Erwinia caratovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas* sp e *X. axonopodis* pv. *phaseoli*) foram inibidas.

Os compostos 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol foram apontados como os principais envolvidos na inibição dos fitopatógenos fúngicos. O autor relatou ainda que sementes de feijão artificialmente inoculadas com *S. sclerotiorum* e fumigadas com a mistura artificial de voláteis exibiram redução na incidência fúngica de até 75% em relação ao tratamento controle. Além disso, a mistura também apresentou atividade nematicida sobre *Meloidogyne javanica* (FIALHO, 2008).

Estudos conduzidos com isolados de rizobactérias revelaram que esses microrganismos possuem alta capacidade de produção de compostos voláteis. Vespermann et al. (2007) constataram que voláteis produzidos por espécies de *Stenotrophomonas*, *Serratia* e *Bacillus* inibiram o crescimento micelial de vários fungos, dentre eles fitopatógenos importantes como *Rhizoctonia solani*, *Phoma betae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae* e espécies de *Penicillium*.

Muito pouco é conhecido sobre o modo de ação dos compostos voláteis no controle de microrganismos. É provável que os voláteis atuem na alteração da expressão de proteínas (HUMPHRIS et al., 2002) e atividade de enzimas associadas a morfogênese (GRIFFITH et al., 1994; FIALHO, 2008), alteração no metabolismo oxidativo (FIALHO, 2008) e efeito sobre a membrana plasmática (INGRAM; BUTTKE, 1984; SEWARD, 1996).

2.1.4.2 Possíveis aplicações dos compostos orgânicos voláteis no controle de fitopatógenos

Diversos tipos de fungicidas sintéticos têm sido utilizados no intuito de prevenir o desenvolvimento de doenças em plantas, a despeito de muitos serem classificados como potencialmente carcinogênicos pela EPA (Agência Norte Americana de Proteção Ambiental), e serem tóxicos para a vida selvagem e organismos não alvo. Fatos esses que irão trazer diversas restrições e limitações ao uso no futuro. Um exemplo é o brometo de metila, um composto biocida, utilizado na esterilização de solo e no controle de patógenos em pós-colheita. Em virtude da sua alta toxicidade e efeito deletério sobre a camada de ozônio, o seu uso já não é mais tolerado. Isso torna o uso de produtos voláteis de origem natural uma alternativa atraente no intuito de substituir não apenas o brometo de metila, mas também outros fungicidas sintéticos (STROBEL et al., 2004).

Uma gama limitada de fungicidas e fungistáticos têm uso permitido na pós-colheita, e apenas para algumas poucas *commodities*. Essa limitação deve-se ao nível residual nos produtos tratados ser de forma geral mais elevado quando comparado ao tratamento em pré-colheita. Esse fato ocorre primariamente devido ao curto período de tempo entre a aplicação e o consumo. Nas poucas circunstâncias em que fungicidas podem ser utilizados em pós-colheita, frutos ou vegetais são tratados através de aspersão, imersão ou ainda o fungicida pode ser aplicado associado à cera (STROBEL et al., 2004). O processo de aplicação é caro, demanda tempo e interrompe o fluxo do produto no armazenamento (SONG et al., 2000).

A aquisição de resistência por parte de fitopatógenos e os riscos à natureza e saúde humana inerente a utilização de fungicidas (DEISING et al., 2008), contribuiu para a intensificação de pesquisas relacionadas a métodos alternativos de controle que eventualmente levaram ao registro de biofungicidas como o Aspire[®] e Biosave[®] para uso na pós-colheita nos EUA (JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002). Leveduras e bactérias antagonistas são empregadas como biofungicidas primariamente para colonizar e proteger ferimentos presentes na superfície de frutos, resultando na exclusão ou inibição de fitopatógenos (JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002). No entanto, agentes de biocontrole geralmente tem a desvantagem de carecer de atividade curativa, e seu estabelecimento pode ser negativamente afetado pelo ambiente físico e químico do local a ser colonizado (BROWN et al., 2000; MERCIER; WILSON, 1995).

Após identificação dos COVs produzidos por *S. cerevisiae*, Fialho (2008) avaliou a ação antifúngica de cada composto individualmente contra vários fitopatógenos, dentre eles *C. gloeosporioides*. Foi constatado que os álcoois superiores alifáticos 3-metil-1-butanol (3M1B) e 2-metil-1-butanol (2M1B) foram os que proporcionaram os melhores resultados quanto a inibição do desenvolvimento micelial desse fitopatógeno (Figura 1).

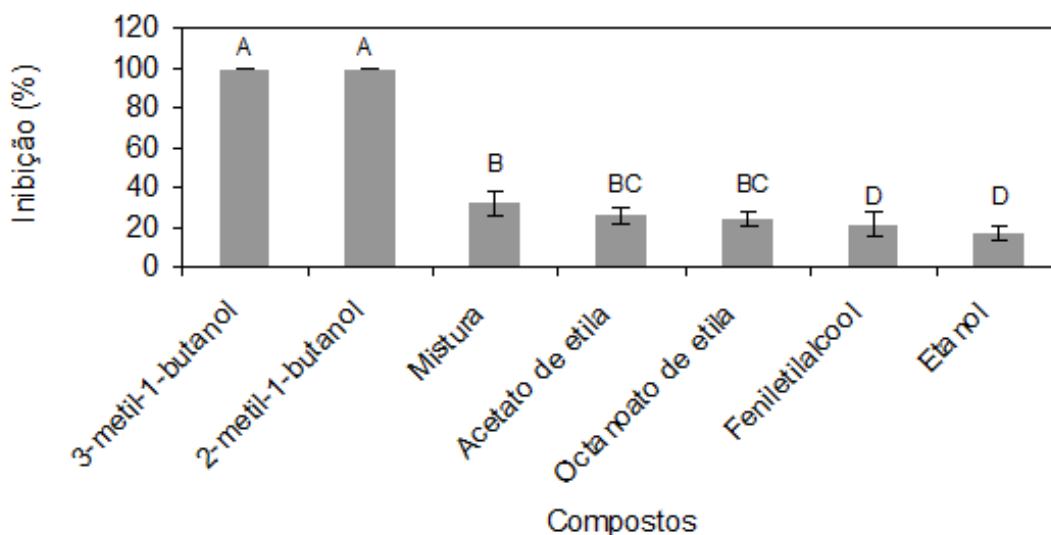


Figura 1 - Influência da adição de compostos orgânicos voláteis ($50 \mu\text{L}/\text{placa} = 1 \mu\text{L mL}^{-1}$ de ar), identificados em *S. cerevisiae*, sobre o desenvolvimento micelial de *C. gloeosporioides*. Os valores médios de 4 repetições (\pm DP) foram calculados como porcentagem de inibição, comparado as placas controle na ausência de voláteis. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,01$). Adaptado de (FIALHO, 2008)

Toffano (2010) utilizou os compostos 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, caprilato (octanoato de etila) e a mistura artificial dos COVs, identificados a partir de *S. cerevisiae*, no controle pós-colheita da mancha preta em laranja Valência. Os resultados revelaram que o 3-metil-1-butanol foi o composto que apresentou maior eficiência na inibição do aparecimento de novas lesões em relação ao controle. O composto 2-metil-1-butanol também se mostrou eficiente seguido do caprilato. Por outro lado, a mistura dos COVs foi menos eficiente do que os compostos aplicados individualmente.

A biofumigação de frutos utilizando microrganismos, ou mesmo a fumigação com misturas artificiais de voláteis, pode ser vantajosa no intuito de inibir ou matar patógenos em áreas fechadas durante o transporte e armazenamento. Os fumigantes são ideais para o tratamento na

fase de pós-colheita, visto ser um processo que minimiza a manipulação do produto. Além do dióxido de enxofre, há poucos fumigantes disponíveis para serem utilizados no controle de doenças na pós-colheita e esse gás não apresenta efetividade contra infecções pré-existentes (ADASKAVEG et al., 2002). Recentemente, tem-se verificado esforços no intuito de se descobrir fumigantes alternativos, como compostos naturais comumente reconhecidos como seguros.

Por definição métodos não residuais de controle excluem o uso de fumigantes ou atmosfera modificada, visto que nenhum deles é totalmente livre de resíduos. Entretanto, é consenso que o gás penetre e sofra sorção pelo produto, e então ao final do tratamento de exposição, o gás sofra completa desorção e pode ser completamente removido com a aeração. Portanto, a fumigação é uma alternativa viável ao uso de procedimentos de controle residuais (DONAHAYE, 2000). Além do tratamento de frutos e vegetais, os compostos voláteis de origem microbiana podem ser utilizados no controle de patógenos associados a sementes e na fumigação de solos contaminados (REZENDE et al., 2010).

2.2 Material e métodos

2.2.1 Obtenção e manutenção dos isolados de *Colletotrichum*

Os isolados de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* foram obtidos a partir de lesões em frutos de goiaba da variedade Pedro Sato sintomáticos, coletados no Estado de São Paulo, os quais foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (ESALQ/USP). Esses foram mantidos em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA: Infusão de 200 g L⁻¹ de batata, 20 g L⁻¹ de dextrose e 15 g L⁻¹ de ágar) a 25°C e fotoperíodo de 12h.

2.2.2 Obtenção dos compostos voláteis antimicrobianos

Conforme resultados obtidos por Fialho (2008), os compostos voláteis produzidos por *S. cerevisiae* que apresentaram maior atividade antimicrobiana contra diferentes fitopatógenos foram os álcoois superiores alifáticos 3-metil-1-butanol (3M1B) e 2-metil-1-butanol (2M1B). Dessa forma, padrões disponíveis comercialmente (SIGMA-ALDRICH) de ambos os compostos foram utilizados nos bioensaios.

2.2.3 Avaliação *in vitro* do efeito dos COVs sobre o desenvolvimento de *Colletotrichum sp.*

2.2.3.1. Efeito sobre o crescimento micelial

Foram utilizadas placas de poliestireno (60 mL de volume), disponíveis comercialmente, divididas ao meio. Em um dos lados da placa, contendo 10 mL de meio BDA, foi adicionado assepticamente, um disco de meio (5 mm) contendo micélio do fitopatógeno. No outro lado da placa, foi adicionado em um algodão volumes de 10, 25, 50 e 75 μL (que correspondem as doses de 0,2; 0,5; 1,0 e 1,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar, respectivamente) dos compostos 3M1B e 2M1B individualmente ou em mistura nas proporções de 1:1 e 1:10 (v/v) de ambos os compostos. O tratamento controle consistiu em placas contendo apenas algodão sem adição dos voláteis. As placas foram imediatamente vedadas com filme plástico e mantidas a 25 °C sob fotoperíodo de 12h.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada a cada 24 horas, através da média entre duas medições diametralmente opostas da colônia. O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma placa. A última avaliação foi realizada quando as colônias das placas controle atingiram os bordos das mesmas. Nesse experimento também foram determinados os valores de MIC_{50} , que corresponde a concentração inibitória mínima capaz de inibir o fitopatógeno em 50%. Ao término do experimento, os discos de meio contendo micélio (inóculo inicial) foram transferidos para placas contendo meio BDA na ausência dos compostos, a fim de se verificar a viabilidade do fitopatógeno.

2.2.3.2 Efeito sobre a produção de biomassa

Foram utilizadas placas de poliestireno (60 mL de volume), divididas ao meio, disponíveis comercialmente. Em um dos lados da placa, contendo 10 mL de meio BDA, foi adicionado assepticamente papel celofane e sobre este um disco de meio (5 mm) contendo micélio do patógeno. As placas foram vedadas e mantidas a 25 °C sob fotoperíodo de 12h. Decorridos 72h foi adicionado em um algodão, no lado oposto da placa, 50 μL (1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar), os compostos 3M1B e 2M1B individualmente ou em mistura nas proporções de 1:1 e 1:10 (v/v). O tratamento controle consistiu em placas contendo apenas algodão sem adição dos compostos. As placas foram novamente vedadas com filme plástico e mantidas por mais 72h. Em seguida, o papel

celofane juntamente com o micélio foram retirados e pesados, determinando-se, portanto a biomassa fresca produzida pelos fitopatógenos.

2.2.3.3 Efeito sobre a esporulação

Foram utilizadas placas de poliestireno (60 mL de volume), disponíveis comercialmente, divididas ao meio. Em um dos lados da placa, contendo 10 mL de meio de Aveia-Ágar (TUIITE, 1969), o qual favorece a esporulação (DHINGRA; SINCLAIR, 1985), foi adicionado assepticamente, um disco de meio (5 mm) contendo micélio do fitopatógeno. No outro lado da placa, em um algodão, foram adicionados os compostos nas doses e proporções mencionadas no item 2.2.3.2. O tratamento controle consistiu em placas contendo apenas algodão, sem adição dos voláteis. As placas foram imediatamente vedadas com filme plástico e mantidas a 25 °C sob fotoperíodo de 12h.

Decorridos oito dias, foram adicionados 10 mL de água destilada sobre a cultura fúngica, onde os esporos foram removidos com auxílio de uma alça de Drigalsky, obtendo-se uma suspensão de esporos. Para determinação do número de esporos, 150 µL da suspensão foi transferida para uma câmara de Neubauer onde foi realizada a contagem dos esporos com auxílio de um microscópio de luz. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma placa.

2.2.3.4 Efeito sobre a germinação e formação de apressórios

Foram adicionadas em placas de poliestireno (60 mL de volume) três gotas de 50 µL da suspensão de esporos de *C. acutatum* (5×10^5 esporos mL⁻¹). No centro da placa foi adicionado um algodão contendo os compostos 3M1B e 2M1B, individuais e em misturas nas proporções mencionadas no item 2.2.3.1, nas doses de 0,2 e 1 µL mL⁻¹ de ar. O tratamento controle consistiu de placas contendo apenas algodão sem adição dos compostos. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas a 25 °C no escuro por 16h. Após este período, foi acrescida uma lamínula de vidro para avaliação. A porcentagem de esporos germinados e apressórios formados foram obtidas através da contagem desses com auxílio de microscópio de luz. Com a finalidade de investigar o efeito fungistático ou fungicida dos tratamentos sobre a germinação dos esporos,

após a contagem de 16h, as placas foram incubadas novamente sob as mesmas condições, agora na ausência dos compostos e reavaliadas após 24 e 48h. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma placa.

2.2.4 Elucidação de alguns dos mecanismos de ação dos COVs

2.2.4.1. Efeito sobre a permeabilidade da membrana plasmática

Com o objetivo de avaliar as alterações provocadas pelos voláteis na permeabilidade da membrana plasmática das células fúngicas, foram utilizadas placas de poliestireno (60 mL de volume), divididas ao meio, disponíveis comercialmente. Em um dos lados da placa, contendo 10 mL de meio BDA, foi adicionado papel celofane e sobre este um disco de meio (5 mm) contendo micélio do fitopatógeno. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas a 25 °C sob fotoperíodo de 12h. Decorridos 72h foi adicionado em um algodão 50 µL (1,0 µL mL⁻¹ de ar), os compostos 3M1B e 2M1B individualmente ou em mistura nas proporções de 1:1 e 1:10 (v/v). As placas foram novamente vedadas com filme plástico e mantidas por mais 72h. Os tratamentos controle consistiram em placas contendo apenas algodão sem adição dos voláteis, sendo que para o controle negativo, além da adição da solução de sacarose, também foi adicionado 10 µL de detergente (Triton X-100). As placas foram novamente vedadas e mantidas por mais 72h. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma placa.

O micélio foi coletado, pesado e colocado em copos plásticos (110 mL) contendo 10 mL de solução de sacarose 0,2 M. Decorrido 60 min, as soluções foram transferidas para tubos e realizada a medição da condutividade elétrica das soluções com auxílio de um condutivímetro (HI 9043, Hanna Instruments) com o objetivo de detectar a perda de eletrólitos por parte do micélio. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma placa. Os resultados foram expressos em mS.g micélio⁻¹.

2.2.4.2 Peroxidação lipídica

Foram utilizadas placas de poliestireno (60 mL de volume), divididas ao meio, disponíveis comercialmente. Em um dos lados da placa, contendo 10 mL de meio BDA, foi adicionado

asépticamente papel celofane e sobre este um disco de meio (5 mm) contendo micélio do fitopatígeno. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas a 25 °C sob fotoperíodo de 12h. Decorridos 72h foi adicionado em um algodão 50 µL (1,0 µL mL⁻¹ de ar), os compostos 3M1B e 2M1B individualmente ou em mistura nas proporções de 1:1 e 1:10 (v/v). As placas foram novamente vedadas com filme plástico e mantidas por mais 72h. O tratamento controle consistiu em placas contendo apenas algodão sem adição dos compostos. As placas foram novamente vedadas com filme plástico e mantidas por mais 72h.

Objetivando avaliar as alterações provocadas pelos voláteis nos lipídeos constituintes da membrana plasmática das células fúngicas, a peroxidação de lipídeos foi avaliada através da produção de metabólitos reativos a ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente malonaldeído (MDA), conforme descrito por de Heath e Packer (1968) e Cakmak e Host (1991). O micélio desenvolvido sobre o papel celofane foi coletado e pesado, sendo 300mg macerado em 1,3mL de ácido tricloroacético (TCA 0,1%) utilizando almofariz e pistilo congelados. Após a homogeneização, 1,4 mL foram transferidos para tubos tipo eppendorf para centrifugação a 10000 g por 15 minutos a 4° C. Em tubos de vidro com tampa, contendo 1,5 mL da solução recém preparada de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,5% em TCA 20%), foi adicionado 500 µL do sobrenadante. Na referência (branco), ao invés de amostra, foi adicionado 500 µL de TCA 0,1%. Os tubos foram incubadas a 90° C em banho-maria por 20 minutos e em seguida resfriados em banho de gelo. As amostras foram transferidas para tubos tipo eppendorf e centrifugadas a 16000 g por 4 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 535 nm. A concentração de MDA foi determinada através da seguinte fórmula:

Abs= B x C, onde

B= Coeficiente de absorvidade - para o MDA equivale a 155 mM⁻¹ cm⁻¹

C= Concentração, assim

C= (Abs/B) = mM MDA

Portanto:

MDA= { [(Abs/155)*2]*(1700/500) } / MF } *1000, onde

MF = massa fresca

Os dados foram expressos em nmol g^{-1} micélio fresco

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma placa.

2.2.4.3 Efeito sobre a síntese de proteínas

Foram utilizadas placas de poliestireno (60 mL de volume), divididas ao meio, disponíveis comercialmente. Em um dos lados da placa, contendo 10 mL de meio BDA, foi adicionado assepticamente papel celofane e sobre este um disco de meio (5 mm) contendo micélio do fitopatógeno. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h. Decorridos 72 h foi adicionado em um algodão 50 μL (1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar), os compostos 3M1B e 2M1B individualmente ou em mistura nas proporções de 1:1 e 1:10 (v/v). As placas foram novamente vedadas com filme plástico e mantidas por mais 72 h. O tratamento controle consistiu em placas contendo apenas algodão sem adição dos compostos. As placas foram novamente vedadas com filme plástico e mantidas por mais 72 h.

A extração das proteínas solúveis foi obtida do micélio desenvolvido sobre o papel celofane através de maceração do mesmo na presença de nitrogênio líquido, seguido pela adição de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de EDTA e 3 mM de ditioneitol, na proporção de 8 mL g^{-1} de micélio fresco. O material foi centrifugado a 4 °C durante 45 min a 15000 g. O sobrenadante constituiu o extrato protéico que teve a concentração de proteínas determinada segundo Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (ASB) como padrão. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma placa.

2.2.5 Avaliação da utilização do volátil 3M1B no controle pós-colheita de frutos de goiaba

2.2.5.1 Obtenção e inoculação dos frutos

Foram utilizadas goiabas de polpa branca da variedade Kumagai oriundas da propriedade do Sr. Ricardo Kumagai, em Campinas, SP, selecionadas de acordo com o estágio de maturação, o qual foi relacionado com a cor do fruto. Os frutos foram higienizados com solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % por 1 minuto e posteriormente lavados em água corrente, a fim de

retirar o excesso do produto e em seguida, deixados secar a temperatura ambiente. Cada fruto recebeu uma marcação em círculo com auxílio de caneta permanente, sendo que dentro dele foi realizado um ferimento com agulha histológica. Alíquotas de 30 μL de uma suspensão de conídios de *C. acutatum*, obtidos de cultura pura em placas de Petri contendo meio aveia-ágar, ajustadas para concentração de 10^6 conídios/mL foram depositadas sobre cada ferimento. Em seguida, os frutos foram acondicionados em caixas plásticas com tampa com capacidade de dois litros (dois frutos por caixa). Foi adicionado no interior das caixas um pedaço de algodão umedecido com água destilada e em seguida os mesmos foram fechados hermeticamente e mantidos em incubadora tipo BOD a 25° C, no escuro por 24 h (Figura 2A).

2.2.5.2 Tratamento dos frutos e avaliação do efeito sobre a taxa de expansão da lesão e a incidência da antracnose

Após a inoculação e incubação dos frutos, o algodão de cada caixa foi retirado e substituído por um copo plástico contendo um chumaço de algodão onde foi adicionado 855 μL ($0,5 \mu\text{L}^{-1}$ de ar) do volátil 3M1B. O tratamento controle consistiu em caixas contendo apenas algodão sem adição do volátil. As caixas foram vedadas com auxílio de fita adesiva e acondicionadas em incubadora tipo BOD, a 25° C durante 10 h. Após esse período, as caixas foram abertas e mantidas durante 12 h em sala (temperatura e UR médias de 20° C e 60%, respectivamente), contendo sistema de exaustão para facilitar a aeração e a saída do volátil. Em seguida, as caixas contendo os frutos tratados voltaram para incubadora a 25° C, onde permaneceram abertas até o fim do experimento (11 dias).

A taxa de expansão das lesões da doença foi avaliada diariamente, a partir do aparecimento da primeira lesão até a senescência dos frutos e a incidência (porcentagem de frutos doentes) foi realizada no último dia de avaliação. Para determinação da taxa de expansão das lesões, as mesmas foram medidas com auxílio de paquímetro digital.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado consistindo de dois tratamentos, sendo um contendo o volátil 3M1B e outro o controle. Cada tratamento foi representado por 13 caixas contendo duas goiabas cada, perfazendo um total de 26 frutos por tratamento em um total de 52 frutos. O ensaio foi realizado duas vezes.

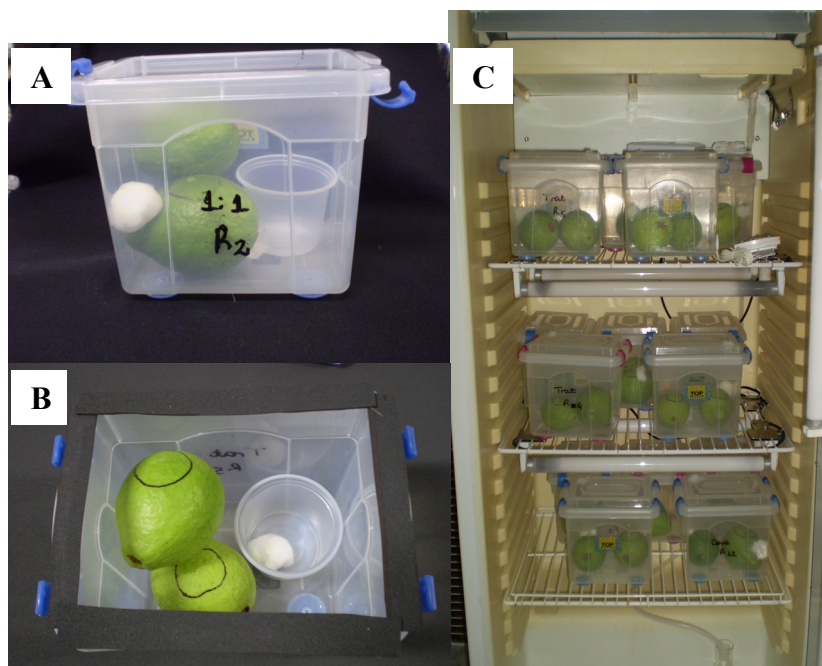


Figura 2 – Ilustração da metodologia utilizada nos ensaios *in vivo*. Disposição dos frutos de goiaba em caixas plásticas com adição do algodão umedecido após inoculação (A); após adição do algodão contendo o composto 3-metil-1-butanol (B); disposição das caixas durante a incubação dos frutos (C)

2.2.5.3 Efeito do volátil na produção de etileno pelos frutos

O ensaio foi realizado no Laboratório de Pós-Colheita de Produtos Hortícolas do Departamento de Produção Vegetal, ESALQ/USP. Para a determinação da produção de etileno, os frutos foram colocados em caixas plásticas (capacidade de 2L), hermeticamente fechadas com tampas contendo septos de silicone. As condições experimentais empregadas foram as mesmas descritas no item 2.2.5.2. Após 1 h, foram coletadas amostras de 1 mL de ar do interior das caixas através do septo de silicone, com auxílio de uma seringa de 2,5 mL (Hamilton, modelo Gastight). As amostras foram injetadas e analisadas em Cromatógrafo a Gás marca Thermo Finnigan, modelo Trace2000GC, equipado com detectores de ionização de chama (FID) regulados para 250°C, injetores regulados para 100°C e coluna Porapack N (coluna C₂H₄ - 1,8 m) reguladas para 100°C, tendo nitrogênio como gás de arraste. O tempo de corrida de cada amostra foi de 90 s e etileno comercial na concentração de 580 ppm foi utilizado como padrão. A produção de etileno foi calculada levando-se em consideração o volume da caixa, a massa do fruto e o tempo que as

caixas permaneceram fechadas (60 minutos). Os resultados foram expressos em μL de etileno $\text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado consistindo de dois tratamentos, sendo um contendo o volátil 3M1B e outro o controle. Cada tratamento foi representado por 13 caixas contendo duas goiabas cada, perfazendo um total de 26 frutos por tratamento em um total de 52 frutos.

2.2.5.4 Efeito do tratamento com o volátil sobre a qualidade físico-química de frutos de goiaba

As análises físico-químicas dos frutos foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Pós-Colheita, CEA-IAC, Jundiaí, SP. Os frutos foram higienizados com solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % por 1 minuto, a seguir, lavados em água corrente para retirar o excesso do produto e em seguida, deixados secar a temperatura ambiente. Foram utilizadas caixas plásticas com capacidade de dois litros e com tampas. Foram colocados dois frutos em cada caixa e adicionado um copo plástico contendo um chumaço de algodão onde foram adicionados 855 μL ($0,5 \mu\text{L}^{-1}$ ar) do volátil 3M1B. O tratamento controle consistiu em caixas contendo apenas algodão sem adição do volátil. As caixas foram hermeticamente fechadas e acondicionadas em câmara a 25°C por 10h. Após esse período, os frutos foram avaliados quanto aos atributos físico-químicos: coloração de casca e polpa, firmeza de polpa, sólidos solúveis, pH e acidez titulável, conforme as metodologias descritas a seguir:

Cor de casca e polpa: em colorímetro Mini Scan XE PLUS 45/O-L, sistema *L C H* onde *L* representa luminosidade, *C* representa cromaticidade e *H* (Hue), o ângulo de cor em três pontos na região equatorial dos frutos, antes e após a retirada da casca.

Firmeza: em Penetrômetro UNITEL FT 327, utilizando-se ponteira de 8 mm efetuadas em quatro pontos opostos na região equatorial dos frutos, após a retirada da casca.

Sólidos solúveis: determinado no suco da fruta, obtido pela centrifugação de dois frutos por repetição, utilizando-se refratômetro manual, marca Atago PAL-1, os dados foram obtidos em $^\circ\text{Brix}$.

pH: determinado potenciométricamente em pHmetro Micronal B-274, no suco da fruta (1:9), obtido pela centrifugação de dois frutos por repetição, segundo a metodologia de Carvalho et al. (1990).

Acidez titulável: determinada nas amostras anteriormente preparadas para determinação de pH, empregando-se NaOH (0,2 N) para titulação até atingir pH 8,1. O resultado foi expresso em % de ácido cítrico (CARVALHO et al., 1990).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado consistindo de dois tratamentos, sendo um contendo o volátil 3M1B e outro o controle. Cada tratamento foi representado por 6 caixas contendo duas goiabas cada e três dias de avaliação, perfazendo um total de 12 frutos por tratamento em um total de 36 frutos.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Efeito dos compostos orgânicos voláteis sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*

O presente trabalho evidenciou que a exposição de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* a diferentes concentrações dos compostos 3M1B e 2M1B, inibiu significativamente o crescimento micelial (Figuras 3 e 4).

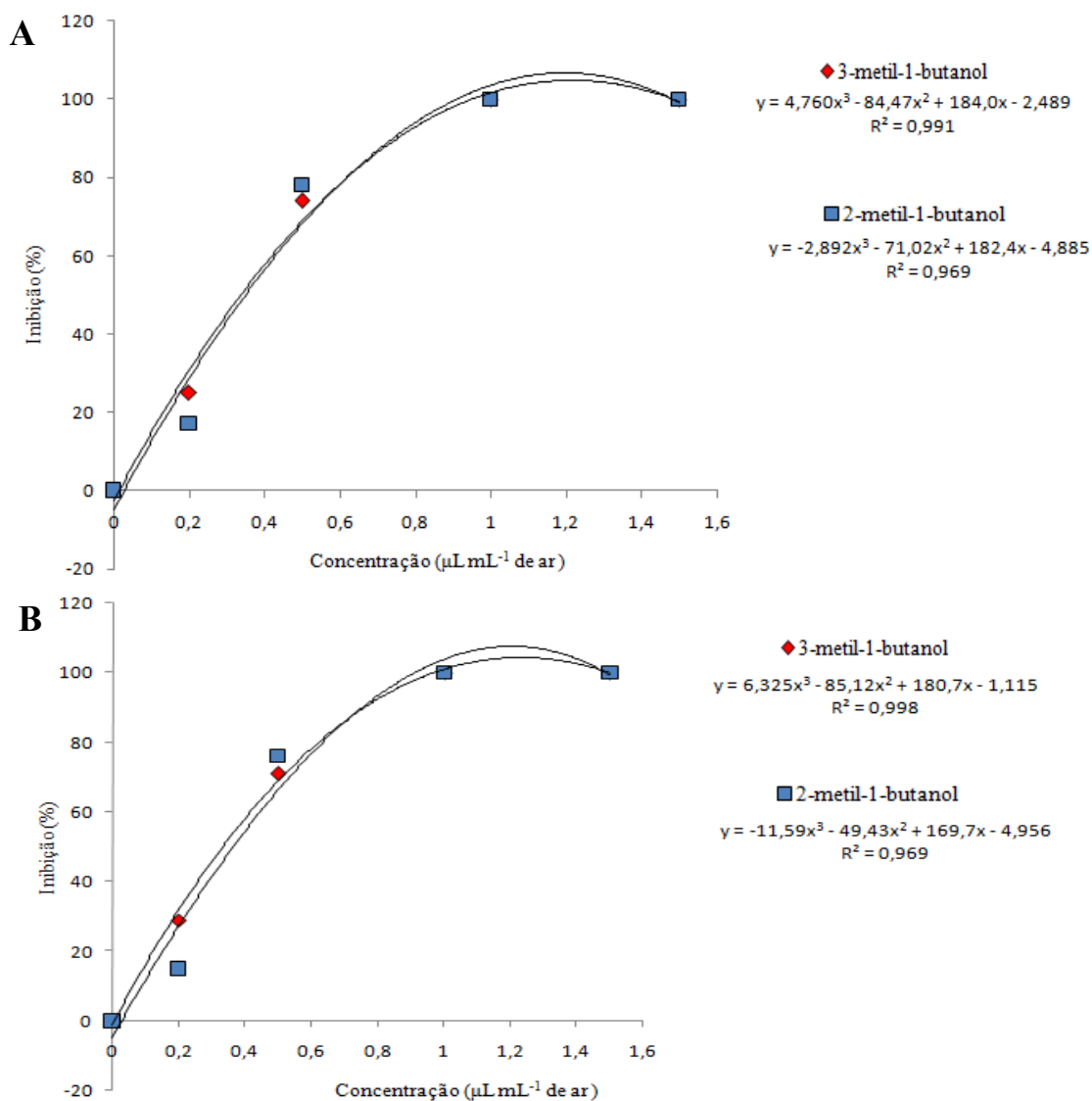


Figura 3 - Inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* (A) e *C. acutatum* (B) cultivados em meio BDA, quando expostos aos compostos orgânicos voláteis 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol. Os valores médios de quatro repetições foram calculados como porcentagem de inibição comparado às placas controle na ausência dos compostos

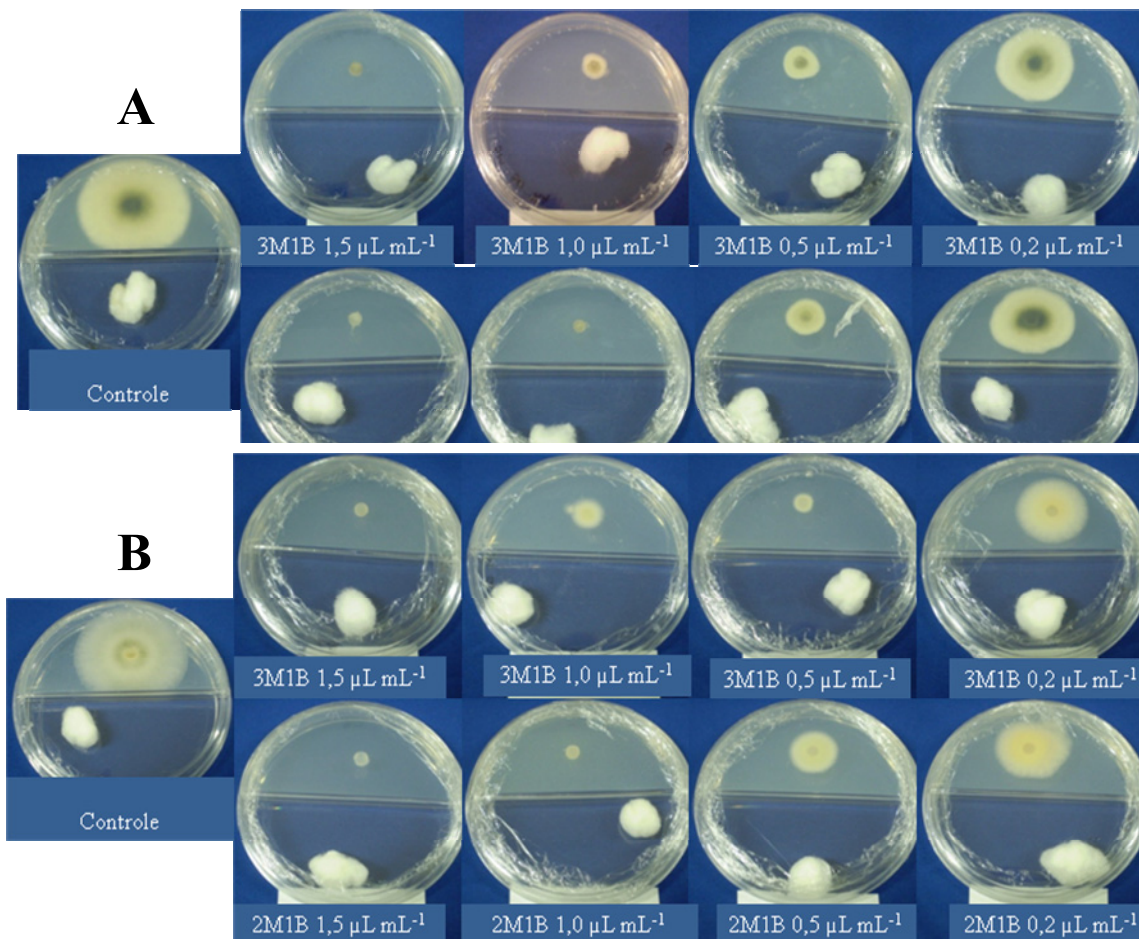


Figura 4 - Efeito dos compostos orgânicos voláteis 3-metil-1butanol e 2-metil-1butanol aplicados individualmente, sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* (A) e *C. acutatum* (B) após 72 e 96h, respectivamente

A inibição causada pelos dois compostos foi semelhante para ambos os fungos e proporcional ao aumento da concentração. A inibição do desenvolvimento em resposta aos dois compostos foi observada a partir da concentração de 0,2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar, variando entre 15 e 20%, além disso, a inibição total foi observada a partir da concentração de 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar. Como observado no presente trabalho, Fialho et al. (2010) também relataram que o crescimento micelial de *Guignardia citricarpa* foi inibido à medida que este foi tratado com doses crescentes da mistura artificial de COVs identificados a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, alcançando inibição de 88% na concentração de 1,6 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar.

Há na literatura diversos relatos sobre a eficiência de COVs produzidos por fungos e bactérias contra inúmeros microrganismos, principalmente fitopatógenos, demonstrando o potencial desses COVs no manejo de importantes enfermidades em plantas. Kai et al. (2007) estudaram o efeito de COVs produzidos por diversos isolados de rizobactérias sobre o

crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*. Os autores verificaram que a inibição do patógeno variou entre 8 e 94%, dependendo do isolado de rizobactéria utilizado. COVs produzidos pelo fungo *Nodulisporium* sp. CF016 inibiram e inviabilizaram uma ampla gama de fitopatógenos importantes na pós-colheita. Após três dias de exposição aos voláteis produzidos pelo fungo, o crescimento micelial de *Botrytis cinerea* foi totalmente inibido, no entanto, a inibição máxima de *Penicillium expansum* foi de 80% (PARK et al., 2010). Li et al. (2010) observaram a inibição completa do fitopatógeno *P. italicum* quando exposto aos voláteis dimetil dissulfido, dimetil trissulfido e acetofenona, identificados a partir de *Streptomyces globisporus*, na dose de $0,1 \mu\text{L mL}^{-1}$ de ar, após cinco dias de exposição.

A utilização dos dois compostos em mistura causou efeito inibitório semelhante sobre os fungos, quando comparado a inibição causada pelos compostos aplicados individualmente (Figuras 5 e 6). A inibição máxima (100%) também ocorreu a partir da concentração de $1,0 \mu\text{L mL}^{-1}$ de ar e a inibição mínima também foi verificada a partir da menor concentração avaliada ($0,2 \mu\text{L mL}^{-1}$ de ar). Na concentração de $0,2 \mu\text{L mL}^{-1}$ de ar foi observado maior inibição do desenvolvimento de *C. gloeosporioides* quando exposto à mistura 3M1B:2M1B (1:1; v/v), seguido das misturas 3M1B:2M1B (10:1; v/v) e 2M1B:3M1B (10:1; v/v), assumindo valores de 25, 20 e 8%, respectivamente. Para *C. acutatum*, foi observado inibição crescente das misturas 3M1B:2M1B (1:1; v/v), 3M1B:2M1B (10:1; v/v) e 2M1B:3M1B (10:1; v/v), variando de 20 a 30%. Ao contrário do observado nesse estudo, Tunc et al. (2007), ao estudarem compostos orgânicos voláteis, etanol e carvacrol, verificaram que houve efeito sinérgico entre os compostos na inibição de *P. notatum*, indicando o potencial dessa combinação na conservação e manutenção das propriedades organolépticas de alimentos. Apesar do composto carvacrol ser obtido a partir de plantas e não de microrganismos, o etanol assim como o 3M1B e 2M1B, encontra-se no grupo dos álcoois e pode ser encontrado como componente de misturas de COVs produzidos por vários fungos, como os do gênero *Muscodor* (EZRA; STROBEL, 2003; MITCHELL et. al., 2010).

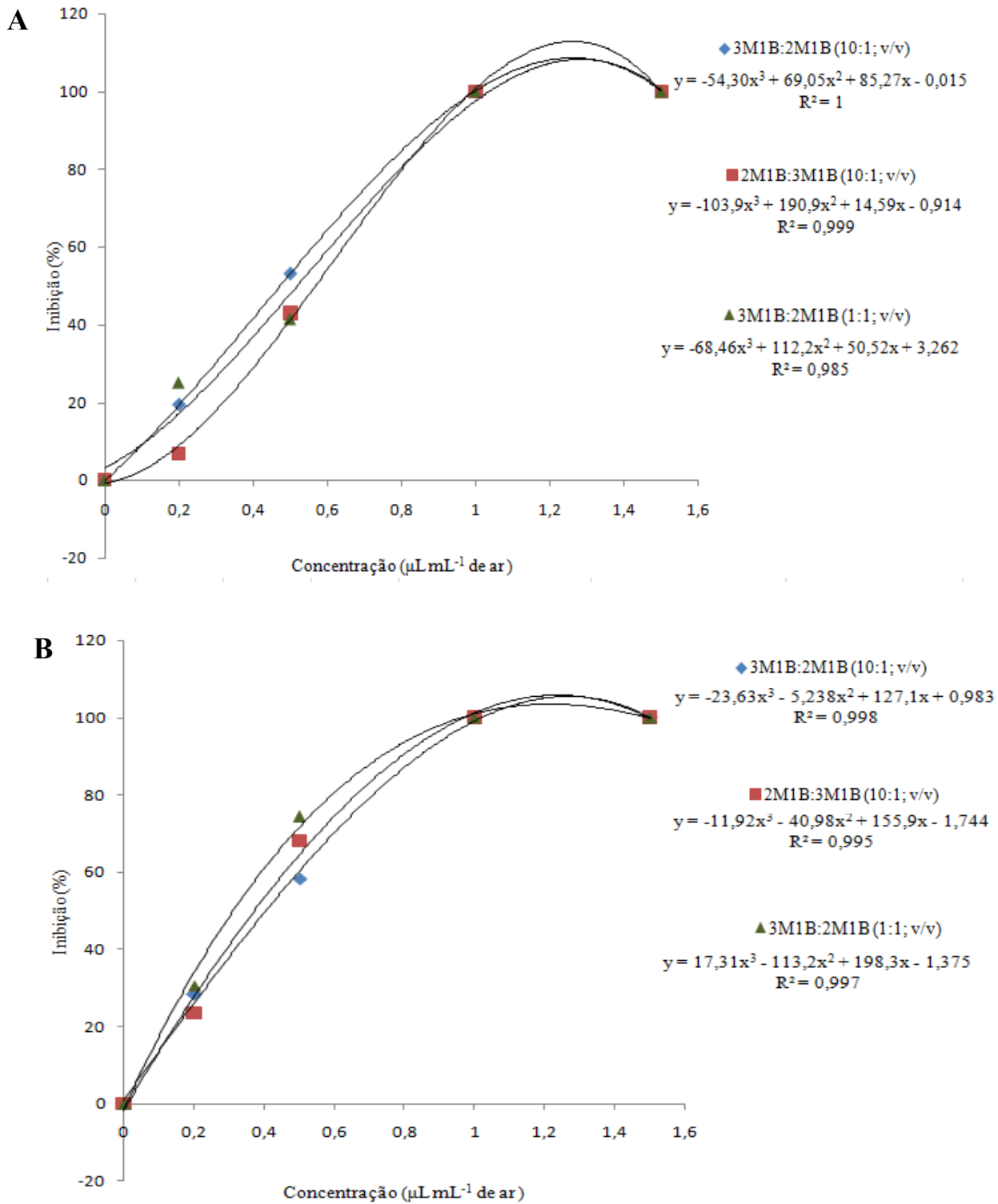


Figura 5 - Inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* (A) e *C. acutatum* (B) cultivados em meio BDA, quando expostos a mistura dos compostos orgânicos voláteis 3-metil-1-butanol (3M1B) e 2-metil-1-butanol (2M1B). Os valores médios de quatro repetições foram calculados como porcentagem de inibição comparado às placas controle na ausência dos compostos

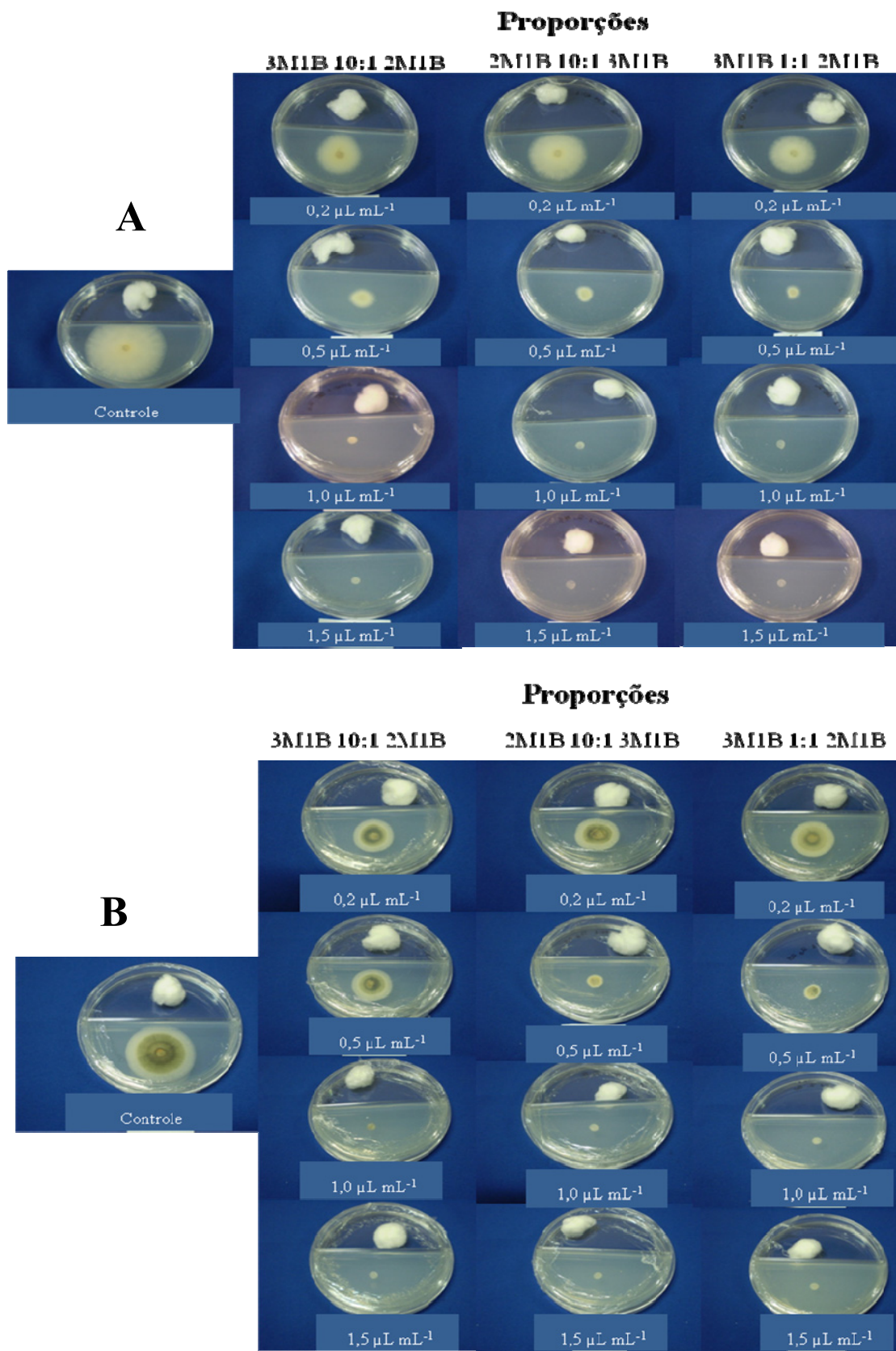


Figura 6 - Efeito dos compostos orgânicos voláteis 3-metil-1butanol (3MIB) e 2-metil-1butanol (2MIB), aplicados em mistura, sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* (A) e *C. acutatum* (B) após 72 e 96h de crescimento, respectivamente

Também foram determinados os valores de MIC₅₀, que corresponde à concentração inibitória mínima da mistura artificial, em µL por mL de ar na placa, requerida para reduzir em 50% o crescimento micelial (Tabela 1). Para *C. gloeosporioides*, os valores de MIC₅₀ para os compostos individuais foram 0,34 e 0,35 µL mL⁻¹ de ar, para 3M1B e 2M1B, respectivamente, já para *C. acutatum* esses valores foram estimados em 0,33 e 0,37 µL mL⁻¹ de ar, respectivamente. Portanto, os fungos apresentaram sensibilidade semelhante aos compostos. Para a combinação dos compostos, os valores de MIC₅₀ também estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de MIC₅₀ dos compostos 3-metil-1-butanol (3M1B) e 2-metil-1-butanol (2M1B) sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*

Patógeno	Tratamento	MIC ₅₀ *
<i>C. gloeosporioides</i>	3M1B	0,34
	2M1B	0,35
	3M1B:2M1B (1:1; v/v)	0,52
	3M1B:2M1B (10:1; v/v)	0,47
	2M1B:3M1B (10:1; v/v)	0,57
<i>C. acutatum</i>	3M1B	0,33
	2M1B	0,37
	3M1B:2M1B (1:1; v/v)	0,40
	3M1B:2M1B (10:1; v/v)	0,31
	2M1B:3M1B (10:1; v/v)	0,37

*µL mL⁻¹ de ar

Com base nos resultados de crescimento micelial dos fitopatógenos (Figuras 3 e 5) e observando a Tabela 1, não foram verificadas diferenças significativas de inibição sobre os fitopatógenos, quando comparadas as diferentes combinações e proporções de misturas avaliadas. Entretanto, *C. acutatum* se mostrou mais sensível aos tratamentos quando comparado com *C. gloeosporioides*. Para ambos patógenos, os maiores valores de MIC₅₀ foram observados quando os compostos foram combinados na proporção 1:1 (v/v), indicando que nessa situação, esses compostos apresentam menor efeito inibitório. Ambos fitopatógenos retomaram o crescimento, quando transferidos para meio BDA na ausência dos COVs testados, caracterizando a natureza fungistática dos mesmos.

Atmosukarto et al. (2005) avaliaram a sensibilidade de diversos fungos à mistura artificial de voláteis constituída por 20 compostos identificados em *Muscodor albus*. O MIC₅₀ para *C. gloeosporioides* foi de 0,3 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar e o crescimento foi totalmente inibido na concentração de 1,2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar, resultados semelhantes aos alcançados nesse trabalho. Heipieper et al. (2000), estudando a tolerância e adaptação dos ácidos graxos da membrana em mutantes de *Kluyveromyces lactis* ao etanol verificaram que o MIC para os isolados testados variou entre 8 e 10% de etanol (w/v).

Em função dos resultados obtidos nos ensaios de crescimento micelial, foi selecionada a dose de 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar no intuito de se avaliar o efeito dos compostos (individualmente e em mistura) sobre a produção de massa fresca pelos fitopatógenos (Figura 7).

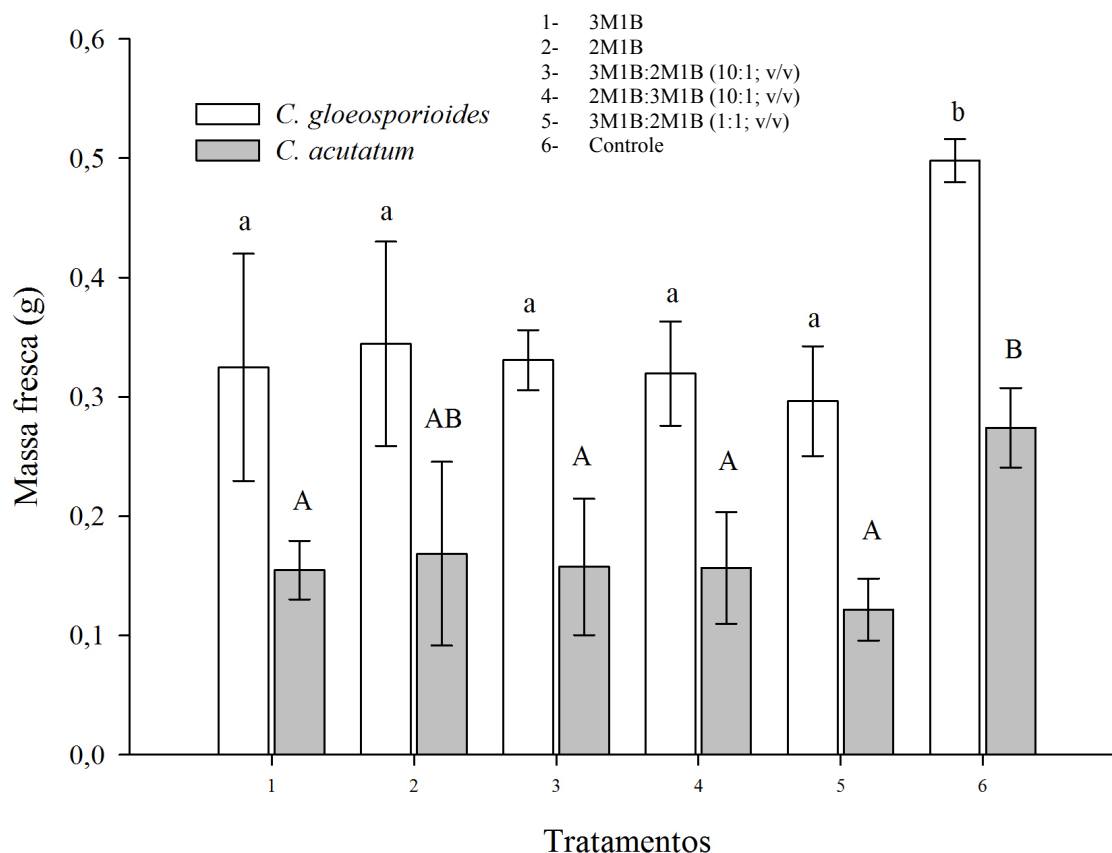


Figura 7 - Influência dos compostos 3-metil-1-butanol (3M1B) e 2-metil-1-butanol (2M1B) na concentração de 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar, sobre a produção de biomassa por *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, cultivados em meio BDA, após 72h de exposição. Os valores são médias de 4 repetições (\pm DP). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Foi observado que o fungo *C. gloeosporioides* produziu maior quantidade de biomassa quando comparado com *C. acutatum*, no entanto, ambos os fungos foram inibidos de forma semelhante quando expostos aos voláteis (Figura 7). Além disso, não houve diferença significativa de resposta utilizando-se os compostos individuais ou em mistura. Para *C. gloeosporioides*, a inibição média causada pelos tratamentos foi de 64,9%, enquanto que para *C. acutatum* a inibição foi em média de 55,4%.

Humpris et al. (2001) verificaram o efeito de COVs específicos produzidos por *Trichoderma* spp., contra fungos apodrecedores da madeira, dentre eles, o 2M1B. Os autores observaram que esse composto na concentração de 2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ar foi capaz de reduzir em aproximadamente 80% a produção de biomassa de quatro isolados fúngicos (*Neolentinus lepideus*, *Postia placenta*, *Gloeophyllum trabeum* e *Trametes versicolor*).

Trabalhos evidenciando o efeito antimicrobiano de COVs produzidos por outros microrganismos contra patógenos de importância na pós-colheita também se mostram promissores. O estudo sobre o efeito de COVs e metabólitos secundários, produzidos por cepas de *Bacillus subtilis*, sobre o crescimento micelial de *P. digitatum*, revelou que a exposição do fungo aos voláteis produzidos pela bactéria causou inibição que variou entre 30 e 70%. No entanto, o patógeno recuperou o crescimento após o micélio ter sido transferido para placas contendo apenas meio BDA, demonstrando o efeito fungistático desses compostos (LEELASUPHAKUL et al., 2008).

2.3.2 Efeito dos compostos orgânicos voláteis sobre a esporulação de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*

Foi avaliada a capacidade de esporulação dos fitopatógenos *C. gloeosporioides* (Figura 8A) e *C. acutatum* (Figura 8B), quando expostos aos compostos individualmente.

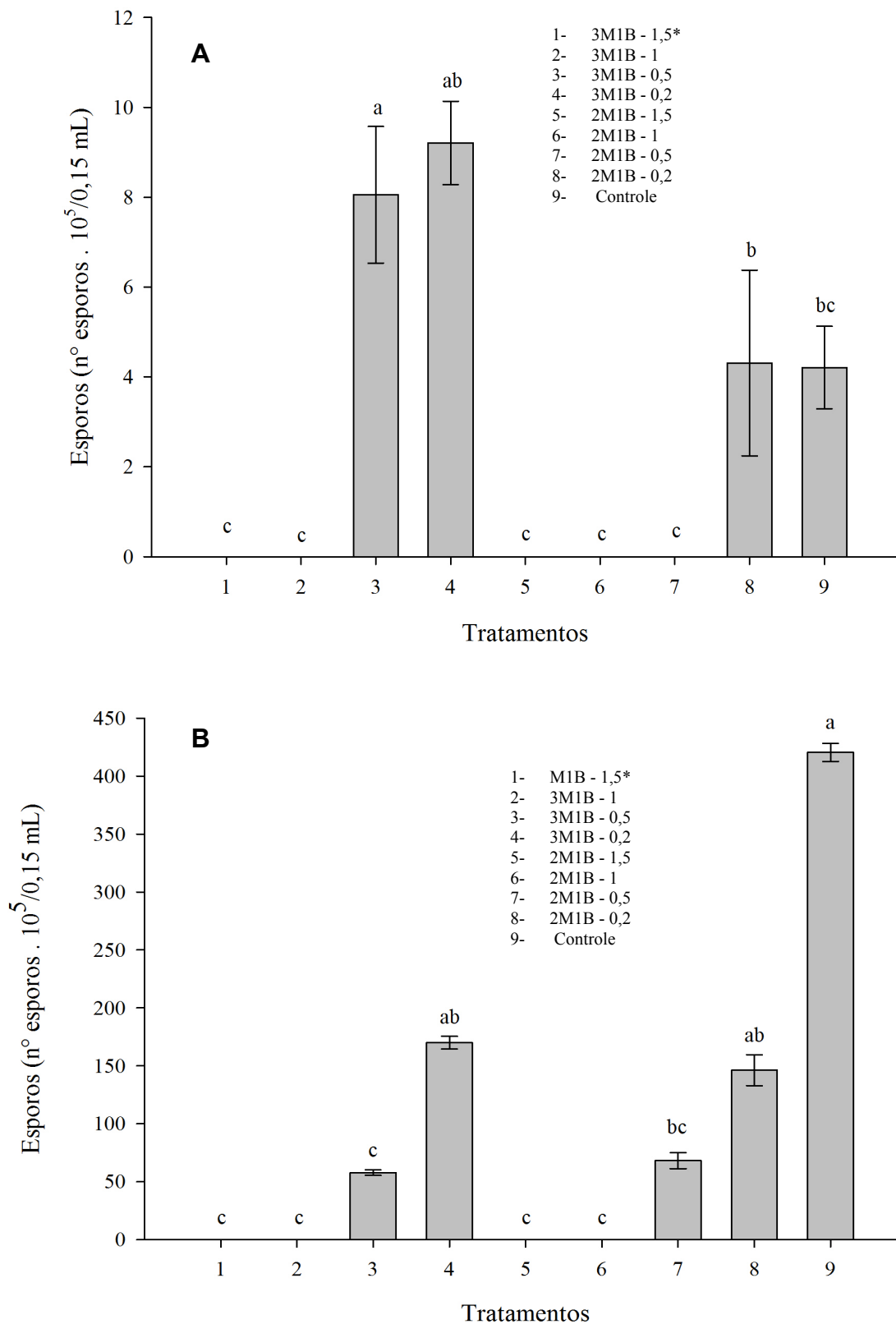


Figura 8 - Influência dos voláteis 3-metil-1-butanol (3M1B) e 2-metil-1-butanol (2M1B) nas concentrações 0,2; 0,5; 1,0 e 1,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar, sobre a esporulação de *C. gloeosporioides* (A) e *C. acutatum* (B), cultivados em meio Aveia-Ágar, após 8 dias de exposição. Os valores são médias de 4 repetições (\pm DP). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,0$). *Dose em $\mu\text{L mL}^{-1}$

É possível verificar que os compostos 3M1B e 2M1B, nas doses de 1,5 e 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar inibiram completamente a produção de esporos de ambos os fitopatógenos. A esporulação por *C. gloeosporioides* foi inibida completamente pelo composto 2M1B na dose 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar, enquanto que na dose de 0,2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ não houve diferença significativa com relação ao controle. Interessantemente, nas doses de 0,5 e 0,2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ o composto 3M1B estimulou a produção de esporos. Por outro lado, *C. acutatum* não teve a esporulação estimulada em nenhuma das doses avaliadas. Na dose de 0,2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ o número de esporos foi em média 2,5 vezes maior quando comparado a dose de 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para os dois compostos, enquanto que nas concentrações de 1 e 1,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar, a esporulação foi completamente inibida pelos compostos.

Não é possível encontrar na literatura, o efeito de COVs fúngicos específicos, como 3M1B e 2M1B sobre a produção de esporos de fitopatógenos. No entanto, trabalho demonstrando o efeito de VOCs produzidos por bactéria contra importante enfermidade em pós-colheita de laranja apresentou resultados interessantes. Oito COVs, identificados a partir de *Streptomyces globisporus*, aplicados em diferentes concentrações, foram testados sobre a esporulação de *P. italicum*. A produção de esporos pelo fitopatógeno foi afetada à medida que se aumentou a concentração dos COVs, ocorrendo inibição total quando expostos aos compostos dimetil dissulfeto, dimetil trissulfeto e acetofenona a partir da dose de 0,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar (LI et al., 2010).

No presente trabalho, a exposição de ambos os patógenos às diferentes combinações dos compostos 3M1B e 2M1B, inibiu completamente a produção de esporos nas doses de 1,5 e 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (Figura 9).

A esporulação de *C. gloeosporioides* foi estimulada pelos compostos 3M1B e 2M1B na menor dose avaliada (0,2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar), no entanto, a partir da dose de 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ a esporulação foi inibida, sendo inversamente proporcional ao aumento da concentração (Figura 9A). Esse resultado, assim como aqueles obtidos para o composto 3M1B, testado individualmente nas doses 0,2 e 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (Figura 8A), pode estar associado a um mecanismo de sobrevivência do fungo, onde o mesmo pode passar a produzir maior quantidade de esporos quando submetido a uma condição de estresse e desta maneira, garantir a perpetuação da espécie. Por sua vez a esporulação por *C. acutatum* também foi reduzida à medida que as doses dos compostos foram aumentadas. A produção de esporos nas placas controle foi em média 1,7 vezes maior quando comparada a menor dose avaliada (0,2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar) (Figura 9B).

Arrebola et al. (2009) estudaram o potencial de controle de COVs produzidos por bactérias sobre podridão pós-colheita em citros. Os autores verificaram redução significativa na produção de esporos por *P. crustosum*, quando exposto aos COVs produzidos por *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e pela combinação dos antagonistas, após três dias de incubação quando comparado ao controle. Entretanto, não foi observada diferença significativa na esporulação do patógeno na presença de COVs produzidos pelas bactérias ou pela combinação delas do segundo ao décimo dia de incubação. O efeito de metabólitos voláteis produzidos por bactérias sobre a esporulação de vários fungos onde foi avaliado por Moore-Landeker e Stotzy (1972), *Agrobacterium radiobacter* reduziu em 66 e 53% a produção de esporos por *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* e *Penicillium viridicatum*, respectivamente. Enquanto que, *Aerobacter aerogenes* reduziu apenas 7% da esporulação de *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*. Os voláteis produzidos por *Sarcina lutea* não interferiram na produção de esporos por *P. viridicatum*.

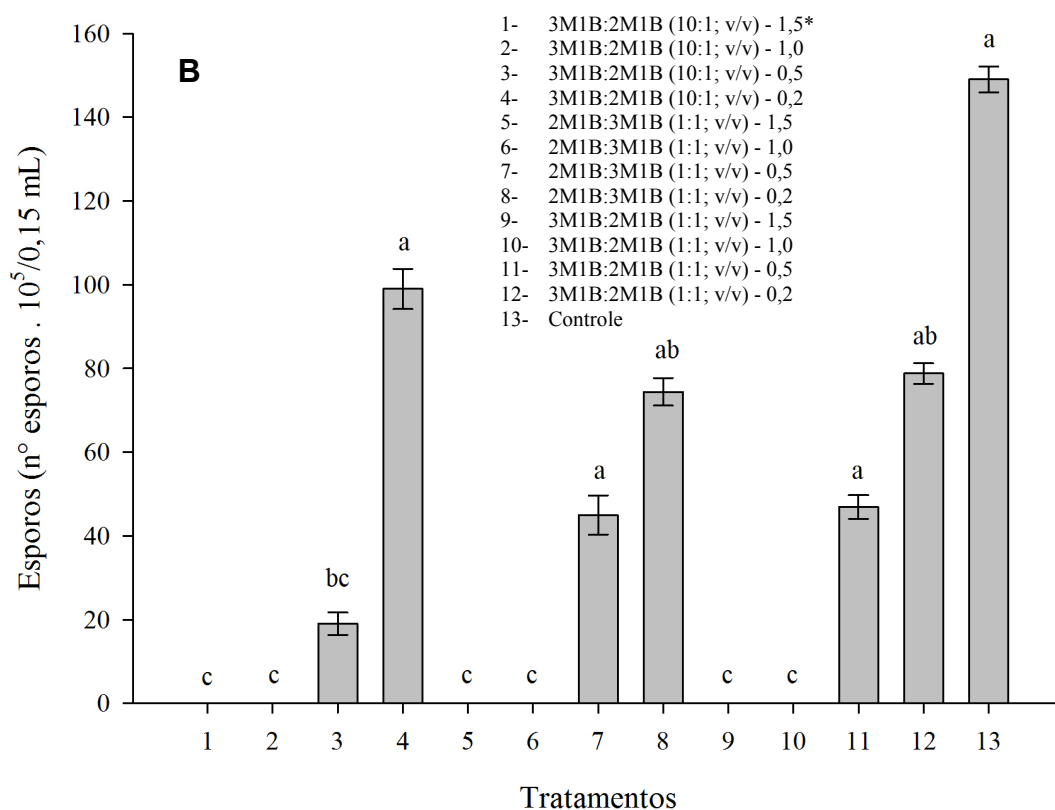
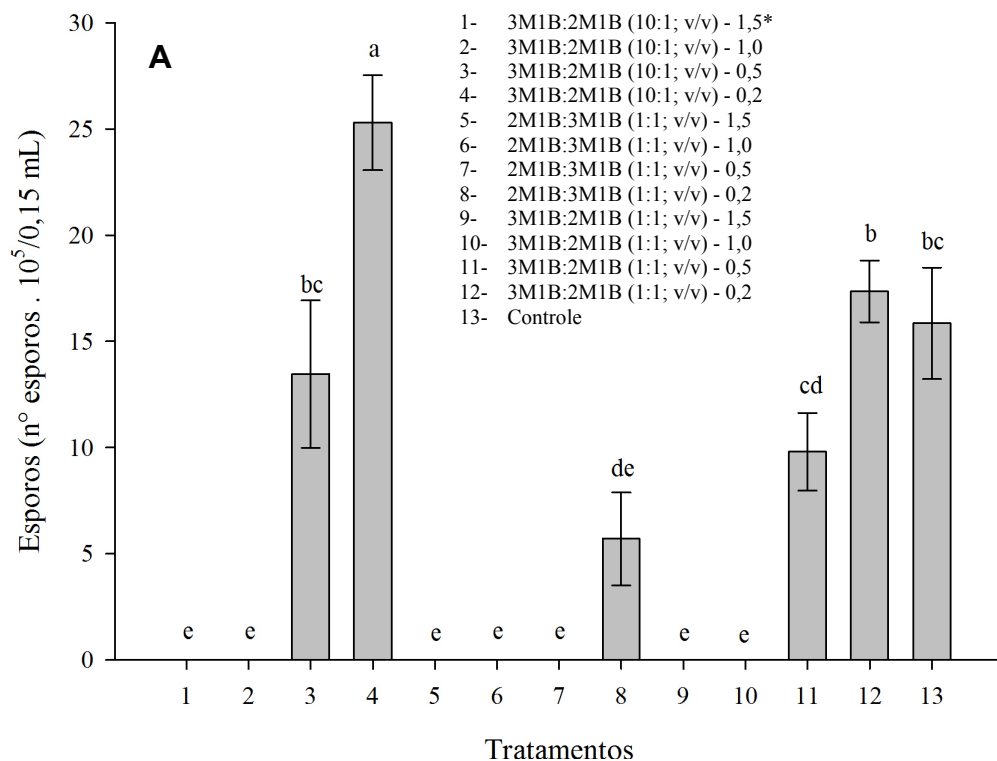


Figura 9 - Influência dos compostos voláteis 3-metil-1-butanol (3M1B) e 2-metil-1-butanol (2M1B) nas doses de 0,2; 0,5; 1,0 e 1,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar, nas proporções de 1:1 e 1:10 (v/v) sobre a esporulação de *C. gloeosporioides* (A) e *C. acutatum* (B) cultivados em meio Aveia-Ágar, após 8 dias de exposição. Os valores são médias de 4 repetições (\pm DP). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). *Dose em $\mu\text{L mL}^{-1}$

2.3.3 Efeito dos compostos orgânicos voláteis sobre a germinação e formação de apressórios

A germinação dos conídios de *C. acutatum* foi totalmente inibida por todos os compostos e suas combinações em todas as doses testadas, após 16 h de incubação (Tabela 2). Com o intuito de verificar a ação fungicida ou fungistática dos compostos, os mesmos foram retirados das placas e essas foram novamente incubadas por mais 48 h. Não foi observado conídios germinados, o que indica efeito fungicida dos compostos 3M1B e 2M1B, sugerindo o potencial do uso desses compostos num sistema de fumigação em pós-colheita, onde atuariam sobre a germinação de esporos que se encontram na superfície dos frutos.

Tabela 2 – Efeito dos compostos 3-metil-1-butanol (3M1B) e 2-metil-1-butano (2M1B), aplicados individualmente ou em mistura nas doses de 0,2 e 0,3 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar, durante 16h, sobre a germinação e formação de apressórios de *C. acutatum*

	Tratamento	Conídios germinados (%) ^x	Apressórios formados (%) ^x
<i>C. acutatum</i>	3M1B - 0,2*	0 a	0 a
	3M1B - 0,5	0 a	0 a
	2M1B - 0,2	0 a	0 a
	2M1B - 0,5	0 a	0 a
	3M1B:2M1B (10:1; v/v) - 0,2	0 a	0 a
	3M1B:2M1B (10:1; v/v) - 0,5	0 a	0 a
	2M1B:3M1B (10:1; v/v) - 0,2	0 a	0 a
	2M1B:3M1B (10:1; v/v) - 0,5	0 a	0 a
	3M1B:2M1B (1:1; v/v) - 0,2	0 a	0 a
	3M1B:2M1B (1:1; v/v) - 0,5	0 a	0 a
	Controle	76 b	61 b

^x Média de quatro repetições. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$).

*Dose aplicada em $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar

Resultados semelhantes foram observados por Ramin et al. (2005), onde o efeito dos compostos voláteis produzidos por *M. albus* e de outros três compostos, incluindo 2M1B, foram testados contra a germinação de esporos de patógenos pós-colheita. Nos tratamentos utilizando

maiores concentrações do antagonista aliado ao sistema de circulação de ar, houve inibição de 100% da germinação dos conídios de *B. cinerea* e *P. expansum*. O 2M1B mostrou-se eficiente na inibição da germinação dos conídios desses mesmos patógenos, causando inibição completa quando expostos a dose de 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ de ar. Da mesma forma, Goates e Mercier (2009) verificaram que COVs produzidos por *M. albus* foram capazes de inviabilizar completamente a germinação de teliósporos de três espécies do gênero *Tilletia*, agentes causais da cárie do arroz e trigo e carvão do trigo. Segundo os autores, esse resultado encoraja a possível utilização desses voláteis no tratamento de sementes ou até mesmo de formulações que poderiam ser aplicadas em sulcos no campo para o controle dessas doenças.

2.3.4 Avaliação dos possíveis mecanismos de ação dos COVs

Após a confirmação da atividade inibitória do 3M1B e 2M1B sobre o desenvolvimento de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, a próxima etapa do trabalho foi verificar possíveis mecanismos de ação desses compostos sobre os fitopatógenos.

Muito pouco é conhecido sobre o modo de ação dos compostos voláteis no controle de microrganismos. É provável que os voláteis atuem na alteração da expressão de proteínas (HUMPHRIS et al., 2002) e atividade de enzimas específicas (WHEATLEY, 2002), podendo refletir no crescimento. Os mecanismos de ação de COVs produzidos por espécies de *Muscodor*, dentre eles 2M1B e 3M1B, contra fungos e bactérias é desconhecido. Entretanto, resultados preliminares indicam que os COVs possuem capacidade de induzir algum tipo de dano ao DNA das células do organismo alvo (MITCHELL et al., 2010).

Splivallo et al. (2007) investigaram os possíveis mecanismos de ação de COVs produzidos por trufas, dentre eles o 3M1B, sobre o crescimento de *Arabidopsis thaliana*. Os autores verificaram que alguns dos COVs induziram a produção de espécies reativas de oxigênio, demonstrando que esses voláteis fúngicos são capazes de inibir o desenvolvimento e modificar o metabolismo oxidativo de *A. thaliana*. Embora plantas e microrganismos sejam organismos filogeneticamente distintos, algumas características desses organismos são semelhantes e por essa razão alguns alvos de ação dos COVs podem coincidir.

Por se tratar de álcoois superiores alifáticos, seria pertinente sugerir que os compostos 3M1B e 2M1B pudessem estar envolvidos com a desorganização da bicamada lipídica

constituente da membrana plasmática, alterando, portanto sua permeabilidade. Frente a essa hipótese, foram realizados ensaios para se determinar a perda de eletrólitos e a peroxidação dos lipídios da membrana dos fitopatógenos em estudo (Figuras 11 e 12).

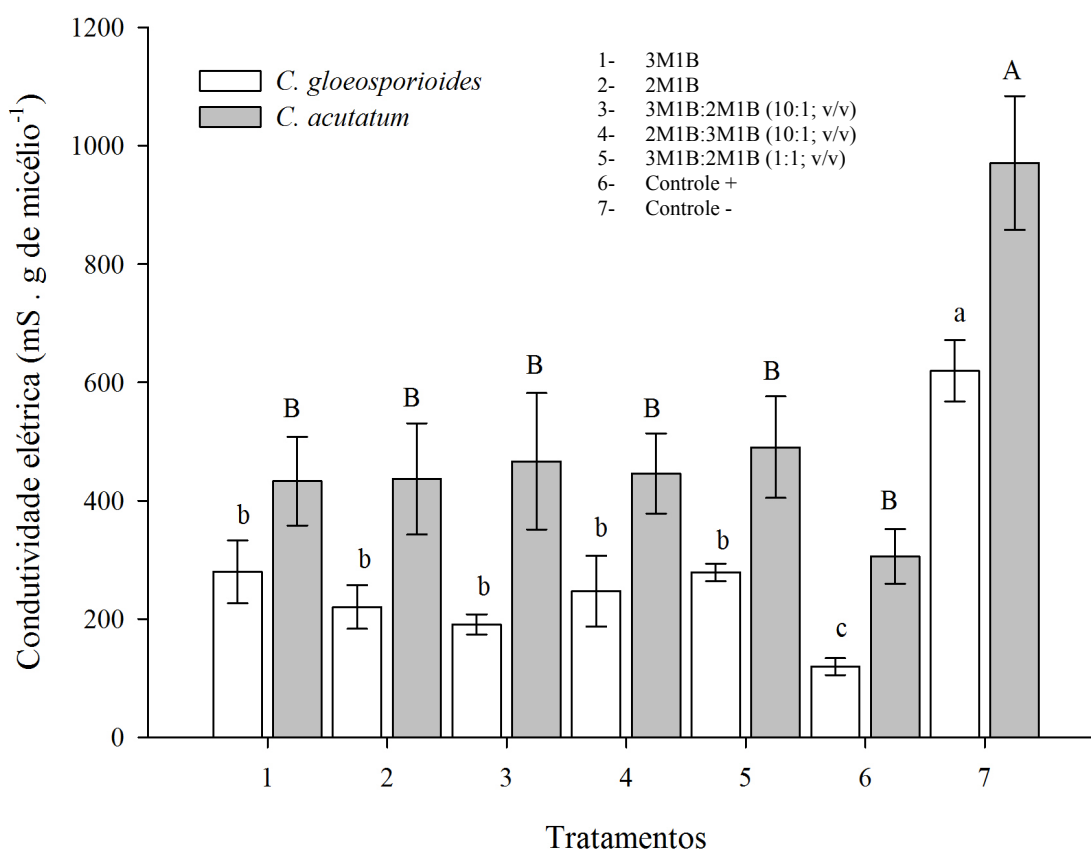


Figura 11 - Influência dos compostos 3-metil-1-butanol (3M1B) e 2-metil-1-butanol (2M1B) na dose de 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar, sobre a perda de eletrólitos de micélio de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* cultivados em meio BDA, após 72h de exposição. Os dados estão expressos em micro-Simens (mS) em função das diferenças na condutividade da membrana na solução de sacarose onde o micélio foi imerso; controle (+) representa somente micélio e (-) micélio imerso em detergente (Triton X-100). Os valores são médias de 4 repetições (\pm DP). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Em condições normais, *C. gloeosporioides* apresentou condutividade elétrica de aproximadamente 150 mS, enquanto que nos demais tratamentos, a condutividade elétrica variou de 200 a 300 mS. O mesmo ocorreu com *C. acutatum*, onde a condutividade elétrica dos tratamentos atingiu em média valores três vezes maiores quando comparadas ao controle. Esses resultados forneceram subsídio à hipótese levantada a respeito da alteração da permeabilidade da

membrana plasmática. Heipieper et al. (2000) relatam que o principal alvo da toxicidade de álcoois é a membrana. Assim como outros solventes orgânicos, eles inibem o crescimento celular por desarranjar a integridade das membranas, levando a permeabilização não específica.

Com relação à peroxidação lipídica dos componentes da membrana plasmática pode ser observado, na Figura 12 que, a peroxidação de lipídios aumentou em *C. gloeosporioides*, após o tratamento como os voláteis variando entre 10 e 13 mmol de MDA g⁻¹ micélio fresco. O mesmo padrão também foi observado para *C. acutatum*, apresentando maiores valores de peroxidação lipídica, quando exposto aos voláteis, variando entre 25 e 36 mmol de MDA g⁻¹ mf. Esses resultados sugerem que esses álcoois superiores são capazes de desorganizar a estabilidade da membrana plasmática dos fungos comprometendo, portanto o desenvolvimento dos mesmos.

As espécies reativas de oxigênio (EAOs) são produtos gerados pelo metabolismo dos organismos aeróbios e provocam estresse oxidativo devido à ação tóxica e mutagênica sobre as células. As EAOs são altamente reativas e citotóxicas, podendo reagir com os ácidos graxos insaturados da membrana, promovendo a peroxidação lipídica (ANGELOVA et al., 2000; MALLICK; MOHN, 2000). A peroxidação da membrana celular pode afetar sua funcionalidade resultando em danos irreversíveis às funções celulares. Desse modo, a peroxidação lipídica pode ser um indicativo de que há indução de danos na membrana e que pode estar havendo supressão da atividade de enzimas antioxidantes, como peroxidase, catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (SCANDALIOS, 1994).

Fialho (2008) verificou aumento da atividade das enzimas SOD e CAT em micélio de *G. citricarpa* quando exposto a mistura artificial de voláteis identificados a partir de *S. cerevisiae*. Malolepsza (2004) verificou que a CAT é um importante fator na infecção de *B. cinerea* em plantas de tomate. Um flavonóide comumente presente no hospedeiro inibiu em até 50% a atividade da CAT, no fungo reduzindo sua capacidade em detoxificar o H₂O₂ gerado no hospedeiro.

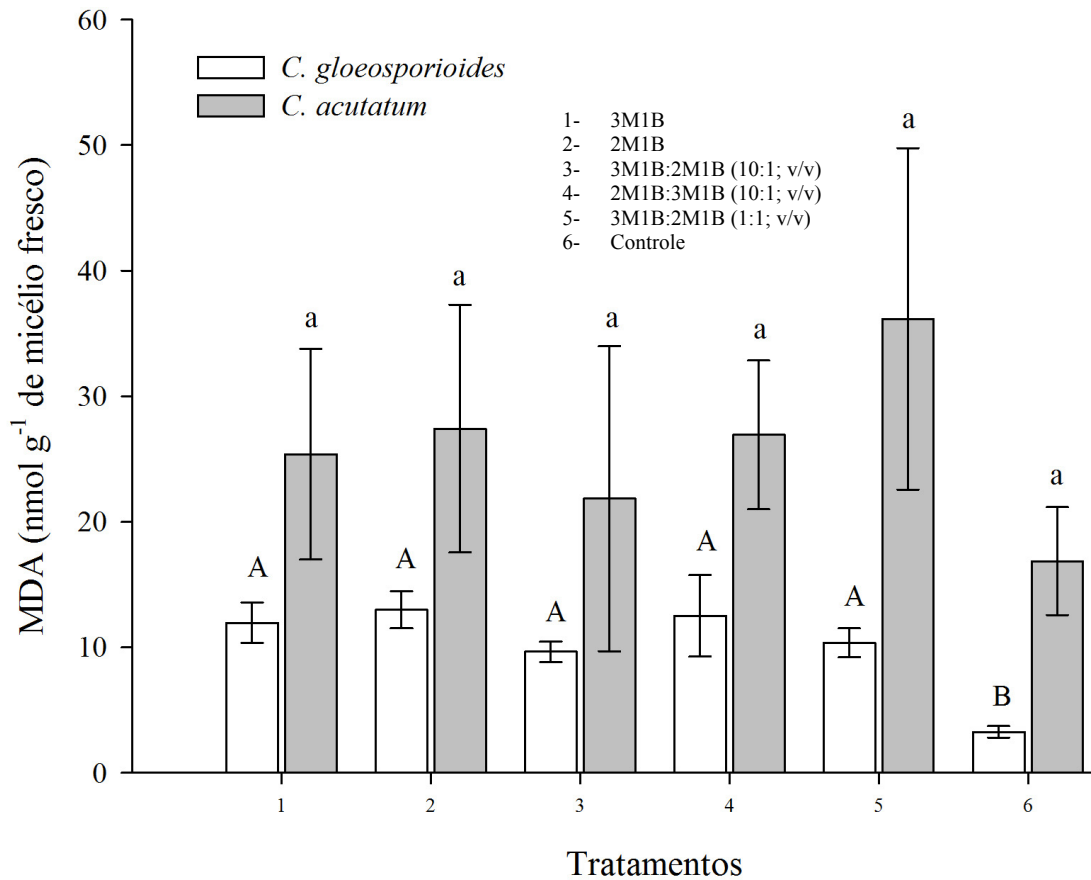


Figura 12 - Influência da mistura artificial de voláteis 3-metil-1-butanol (3M1B) e 2-metil-1-butanol (2M1B) na dose de $1,0 \mu\text{L mL}^{-1}$ de ar, sobre a peroxidação lipídica de micélio de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* cultivados em meio BDA, após 72h de exposição. Os dados estão expressos em quantidade de MDA (mmol/g^{-1} mf) de micélio. Os valores são médias de 4 repetições (\pm DP). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

O efeito dos álcoois sobre microrganismos foi sumarizado por Ingram e Buttke (1984). O autor descreve que em eucariotos, esses são capazes de interferir no crescimento, morfogênese, sistema de transporte, perda de metabólitos, composição e biossíntese de lipídeos. Álcoois de cadeias longas e curtas como pentanol e metanol, respectivamente, podem causar aumento na fluidez da membrana de microrganismos.

Redução no número de células viáveis foi observado em trabalho sobre o efeito de álcoois no crescimento de leveduras (SEWARD et al., 1996). Interferência no pH intracelular e redução na produção de energia foram observados, indicando efeitos negativos dos álcoois na integridade

da membrana plasmática desses organismos. Ingram (1976), estudando o efeito de álcoois nos lipídios componentes da membrana plasmática de *Escherichia coli* K-12, verificou que altas concentrações de álcoois causaram inibição de 30 a 40% do crescimento da bactéria. Esse mesmo autor também observou que a cultura bacteriana exposta a etanol, voltava a crescer quando ocorria a recuperação da alteração da composição dos ácidos graxos da membrana.

No presente trabalho, não foi constatado diferença significativa na produção de proteínas do micélio por ambos os patógenos (Figura 13). Embora não haja diferença significativa, nota-se uma tendência de aumento na concentração de proteínas dos fitopatógenos, quando os mesmos foram expostos aos compostos, individualmente ou em mistura, com relação aos controles. Entretanto, Fialho (2008) observou menor conteúdo de proteínas no micélio de *G. citricarpa*, quando exposto a mistura artificial de voláteis, constituída por seis compostos, incluindo 3M1B e 2M1B, quando comparado ao controle. Esse resultado poderia sugerir que algum componente da mistura dos voláteis, não utilizado no presente estudo, é capaz de interferir na produção de proteínas podendo ainda haver um efeito sinérgico desses compostos sobre o microrganismo quando esses são utilizados em mistura. Além disso, *Colletotrichum* e *Guignardia* tratam-se de fungos de gêneros diferentes, podendo dessa forma responder de maneira distinta frente aos tratamentos. Duas espécies de *Penicillium* exibiram respostas distintas quando expostos a mistura artificial de COVs identificados em *S. cerevisiae*, onde o crescimento micelial de *P. italicum* não foi inibido, e a inibição de *P. digitatum* foi de 60% (FIALHO, 2008). De maneira geral, os resultados desse estudo revelam que, de alguma forma, os compostos 3M1B e 2M1B são capazes de interferir no metabolismo protéico desses fungos.

Estudando o efeito de compostos orgânicos voláteis, produzidos por três espécies de *Trichoderma*, sobre o crescimento micelial e a síntese de proteínas de dois isolados do basidiomiceto *Serpula lacrymans*, Humpris et al. (2002) verificaram a redução do desenvolvimento fúngico associada à inibição da síntese de proteínas de 29,1 kDa, desencadeada por *T. aureoviride* e *T. viride*. Por outro lado, *T. pseudokoninii* não foi capaz de reduzir o crescimento micelial e a síntese protéica de *S. lacrymans*.

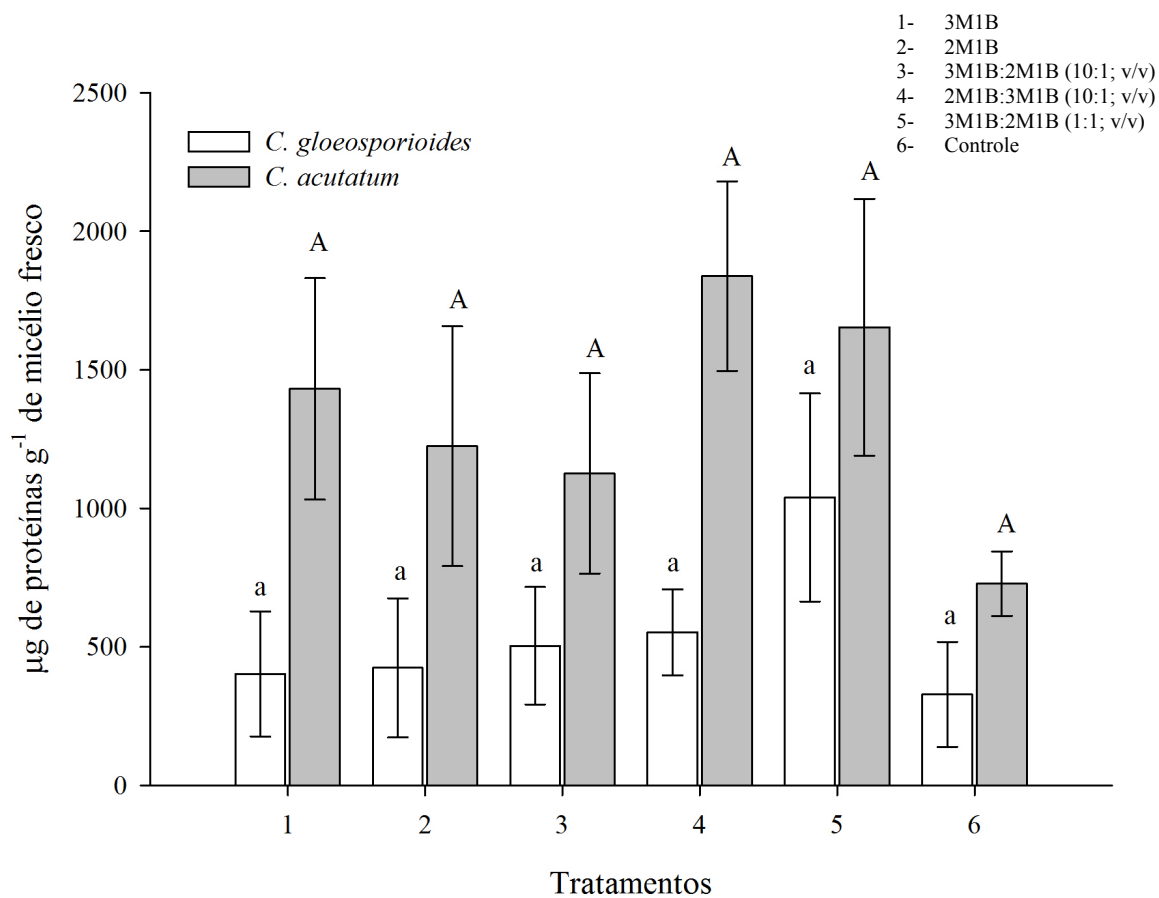


Figura 13 - Influência dos compostos 3-metil-1-butanol (3M1B) e 2-metil-1-butanol (2M1B) na dose de $1,0 \mu\text{L mL}^{-1}$ de ar, sobre o conteúdo de proteínas solúveis de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* cultivados em meio BDA, após 72h de exposição. Os valores são médias de 4 repetições (\pm DP). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

2.3.4 Avaliação da utilização do volátil 3M1B no controle pós-colheita de frutos de goiaba

2.3.4.1 Efeito do volátil na incidência e severidade da antracnose

O volátil 3M1B, na concentração de $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ de ar, aplicados em frutos de goiaba expostos durante 10h, não foi efetivo no controle da antracnose, não sendo capaz de reduzir a severidade e a incidência da doença nos frutos (Tabelas 3 e 4). A incidência da doença e o tamanho das lesões aumentaram em função do tratamento com o composto, quando comparado ao controle no decorrer do tempo. Após sete dias de incubação, a incidência e a severidade aumentaram 2 e 2,5 vezes, respectivamente, em relação ao controle. Após 11 dias, a incidência e a severidade aumentaram 5 e 6,25 vezes, respectivamente, em relação ao controle.

Tabela 3 - Severidade (tamanho da lesão) da antracnose em goiabas ‘Kumagai’ inoculadas com *C. acutatum* e tratadas com 3-metil-1-butanol (3M1B) na dose de $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ de ar, por 10h, e armazenadas a 25°C por onze dias

Tratamento	Severidade (cm) ^x				
	7 dias	8 dias	9 dias	10 dias	11 dias
Controle	0,20 a	0,34 a	0,49 a	0,81 a	1,30 a
3M1B	0,50 a	2,00 a	4,18 b	5,56 b	8,13 b

^x Média de 13 repetições compostas de dois frutos como unidade experimental. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si ($P \geq 0,05$)

Tabela 4 - Incidência da antracnose em goiabas ‘Kumagai’ inoculadas com *C. acutatum* e tratadas com 3-metil-1-butanol (3M1B) na dose de $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ de ar, por 10h, e armazenadas a 25°C por onze dias

Tratamento	Incidência ^x				
	7 dias	8 dias	9 dias	10 dias	11 dias
Controle	3,84	7,69	11,53	11,53	11,53
3M1B	7,69	23,00	46,15	53,84	57,69

^x Média de treze repetições, compostas de dois frutos como unidade experimental.

Diferente do resultado obtido neste trabalho, Mercier e Jiménez (2004) observaram que a micofumigação de maçãs, utilizando COVs produzidos por *M. albus* que apresenta em sua composição compostos como 2M1B, foi capaz de reduzir em 100% o mofo azul causado por *P. expansum* e em 93% o mofo cinzento causado por *B. cinerea*. Trabalho similar foi conduzido por Park et al. (2010), que testaram compostos voláteis produzidos por *Nodulisporium* sp. e que apresentaram atividade antifúngica contra *B. cinerea* e *P. expansum* também em maçãs. Houve supressão de 35 a 68% das lesões causadas por *B. cinerea* e 38 a 76% das lesões causadas por *P. expansum* após a micofumigação com *Nodulisporium* sp.

Voláteis de *M. albus* também se mostraram eficientes no controle de duas doenças pós-colheita em limões, o bolor verde e a podridão ácida, causadas por *P. digitatum* e *Geotrichum citri-aurantii*, respectivamente. Verificou-se que em frutos fumigados imediatamente após a inoculação, houve controle de 100% do bolor verde em limões, enquanto que baixos níveis de infecção foram encontrados em frutos fumigados 24 h após inoculação com os patógenos (MERCIER; SMILANICK, 2005). O mesmo ocorreu com frutos de maçã tratados com *M. albus* contra espécies de *Penicillium* causadoras do bolor cinza e azul. Não foi observada nenhuma infecção em frutos fumigados logo após a inoculação com os patógenos (MERCIER; JIMÉNEZ, 2004). Esses resultados corroboram com os resultados obtidos no ensaio *in vitro* de germinação e formação de apressórios por *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, onde a menor dose dos compostos voláteis 3M1B e 2M1B foi capaz de inibir 100% da germinação dos conídios de ambos os patógenos. Portanto, esses resultados demonstram o potencial antimicrobiano dos COVs sobre esporos que podem se encontrar na superfície do fruto, prontos para iniciar o processo de infecção.

Arrebola et al. (2009), estudando o efeito de compostos voláteis produzidos por bactérias, dentre eles 3M1B, contra podridão pós-colheita em citros, verificaram redução significativa na incidência e severidade da doença em frutos biofumigados com espécies de *Bacillus*.

2.3.4.2 Efeito do volátil na produção de etileno pelos frutos

Os resultados revelaram que o composto volátil 3M1B altera a fisiologia dos frutos de goiaba. Maiores concentrações de etileno foram observadas nos frutos tratados, comparados aos frutos do controle, favorecendo o amadurecimento mais rápido dos mesmos (Figura 14). O avanço no amadurecimento de frutos climatéricos leva a redução na concentração de compostos antifúngicos, como compostos fenólicos, desencadeando o processo de quebra de quiescência de esporos de vários patógenos, dentre eles, espécies do gênero *Colletotrichum*. Desse modo, o etileno, conhecido como hormônio do amadurecimento, pode atuar também como um sinalizador para o processo da quebra de quiescência, participando da ativação de genes envolvidos nos processos de germinação, formação de apressórios e fatores de patogenicidade de fitopatógenos (PRUSKY, 1996).

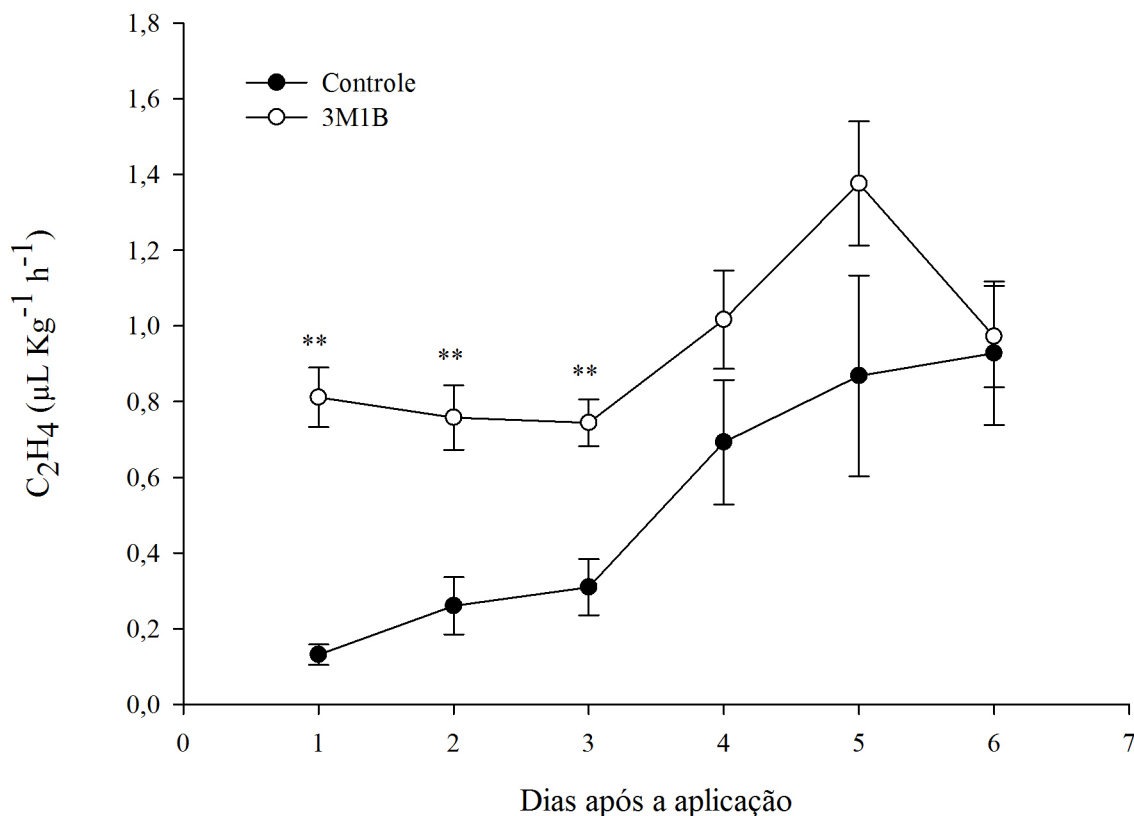


Figura 14 - Concentração de etileno produzido por frutos de goiaba tratados com 0,5 μL mL⁻¹ de ar do volátil 3-metil-1-butanol (3M1B), durante 10h e armazenados em a 25°C por 7 dias. Os valores são médias de treze repetições (± EP). ** indica os valores que diferem significativamente do controle pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

2.3.4.3 Efeito na qualidade físico-química de frutos de goiaba após tratamento com o composto volátil 3M1B

Alterações na coloração da casca e da polpa, na textura, nos níveis de ácidos e na síntese dos compostos voláteis, normalmente ocorrem durante o amadurecimento do fruto, concomitantemente com o período climatérico (PAULL, 1993). O ângulo de cor (H°) pode variar de 0° a 360° , sendo que 0° corresponde a cor vermelha, 90° corresponde ao amarelo, 180° ao verde e 270° ao azul. Em goiabas, o ângulo de cor expressa de forma significativa as mudanças da cor da casca. As goiabas verdes apresentam ângulo de cor maior do que goiabas maduras. A coloração da casca é um importante atributo de qualidade, contribuindo para uma boa aparência e influenciando a preferência do consumidor (CLYDESDAL, 1993).

Observa-se na Tabela 5 que, 1, 3 e 6 dias após a aplicação do volátil em frutos de goiaba armazenados a 25°C , não houve diferença significativa entre os valores de luminosidade (L), ângulo de cor (H°) e cromaticidade (*Chroma*) da casca quando comparados ao controle. A partir desses resultados, pode-se inferir que embora havendo grande produção de etileno pelos frutos tratados nos dois primeiros dias após a aplicação do volátil, o mesmo não interferiu na qualidade visual dos frutos.

Tabela 5 - Cor de casca e de polpa de goiabas 'Kumagai' tratadas com o volátil 3-metil-1-butanol (3M1B) na dose de 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar, por 10h e armazenadas a 25 °C por seis dias

Tratamentos	Cor da casca ^x			Cor da polpa ^x		
	<i>L</i>	<i>H</i> ^o	<i>Chroma</i>	<i>L</i>	<i>H</i> ^o	<i>Chroma</i>
Dia 0						
	59,35	40,98	107,95	78,70	38,83	105,91
Dia 1						
Controle	60,24 a	42,70 a	107,28 a	77,97 a	33,86 a	106,77 a
3M1B	58,59 a	41,73 a	107,41 a	77,64 a	34,58 a	105,74 a
Dia 3						
Controle	70,87 a	48,78 a	108,04 a	94,14 a	35,37 a	103,57 a
3M1B	72,54 a	47,87 a	106,70 a	93,26 a	35,01 a	104,44 a
Dia 6						
Controle	62,38 a	45,67 a	104,78 a	82,81 a	27,53 a	94,41 a
3M1B	59,59 a	42,40 a	104,92 a	76,93 b	32,68 b	105,24 b

^xEm colorímetro Mini Scan XE PLUS 45/O-L, sistema *L C H*, onde *L** representa luminosidade (0=preto a 100=branco), *C* representa cromaticidade e *H* (Hue), o ângulo de cor (0° a 360° - 0°: vermelha, 90°: amarelo, 180°: verde e 270°: azul). Média de seis repetições. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, no mesmo dia, não diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$).

A ação do etileno promove aumento na atividade das enzimas clorofilase e oxidase, e resulta na degradação da clorofila (SHIMOKAWA; SHIMADA; YAE0, 1978; YAMAUCHI et al., 1997). Ao mesmo tempo, o etileno estimula a carotenogênese, o que promove o aparecimento da cor amarela ou laranja (STEWART; WHEATON, 1972). A coloração é utilizada como parâmetro para a seleção de muitos produtos em classes ou categorias comerciais, entretanto, a quantificação dos pigmentos, ou de outros constituintes pode prover uma melhor forma indicadora de qualidade, pois se relaciona mais diretamente com a percepção da aparência pelo consumidor, ao passo que a concentração dos pigmentos pode estar mais diretamente relacionada com a maturidade do produto (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Não foi possível observar diferença significativa na coloração da polpa entre os frutos tratados e não tratados nos dias 1 e 3 após a aplicação do volátil (Tabela 5). No entanto, após 6 dias de armazenamento, houve diferença nos três parâmetros analisados, *L*, *C* e *H*^o. Frutos tratados

com o 3M1B apresentaram maiores valores de L , C e H^p comparados aos frutos do controle, indicando que os mesmos permaneceram verdes por mais tempo. Esse resultado contradiz com os resultados encontrados no ensaio de incidência e severidade de frutos tratados e não tratados com o volátil, onde esse fato pode ser explicado pela ausência do patógeno no ensaio de qualidade físico-química, pois com o patógeno presente nos tecidos esses são submetidos a maior estresse e como consequência sua fisiologia é alterada, ou pela diferença de maturidade entre os frutos utilizados no ensaio.

Os teores de ácido ascórbico, sólidos solúveis (SS) e acidez são características importantes na qualidade organoléptica e nutricional de frutos. Dessa forma, esses atributos foram avaliados após tratamento dos frutos com o volátil 3M1B (Tabela 6).

Os sólidos solúveis indicam a quantidade dos sólidos como açúcares, vitaminas, ácidos, aminoácidos e algumas pectinas que se encontram dissolvidos no suco ou polpa das frutas. Não foi observada diferença significativa no teor de SS entre o tratamento e o controle nos três dias de avaliação (Tabela 6). Esse resultado revela que não houve interferência do 3M1B na produção de SS pelos frutos e que os valores desse atributo aumentaram à medida que os frutos amadureceram. Comumente, a porcentagem de sólidos solúveis apresenta tendência de aumento com o avanço da maturação (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Os açúcares solúveis representam de 50% a 90% do teor de sólidos solúveis em goiabas (CHITARRA et al., 1981; RATHORE, 1976), tendo como principal açúcar a frutose, e portanto, fatores que afetam a síntese da frutose, podem afetar o teor de SS. O amido poderia ser outra fonte de variação dos SS, mas, em goiabas representam apenas 1-3% do total dos carboidratos não estruturais (ALI; LAZAN, 1997). A partir dessas informações, pode-se inferir que o volátil 3M1B não possui a capacidade de interferir na síntese de frutose e amido em frutos de goiaba, pois não houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle, em nenhuma das avaliações.

A acidez titulável de um fruto é representada pela presença de ácidos orgânicos. A goiaba apresenta sabor moderado e bem aceito para consumo de mesa, sua acidez é devida à presença do ácido málico e cítrico e em menores quantidades, dos ácidos galacturônico e fumárico (GERHARDT et al., 1997). Embora os valores obtidos nesse estudo tenham apresentado um ligeiro aumento ao longo dos dias, Chitarra e Chitarra (1990) relataram que esses valores, com poucas exceções, diminuem com o amadurecimento, em decorrência do processo respiratório ou de sua conversão em açúcares, sendo o período do amadurecimento o de maior atividade

metabólica. Houve diferença significativa entre frutos tratados e não tratados apenas no último dia de avaliação (6º dia de incubação), onde menor valor de acidez titulável foi observado nos frutos tratados com 3M1B comparado ao controle. Como já discutido anteriormente, os frutos tratados com o volátil apresentam amadurecimento precoce em relação ao controle, devido à maior produção de etileno pelos mesmos. Desse modo, menores valores de acidez eram esperados nos frutos expostos ao 3M1B (Tabela 6).

O amadurecimento dos frutos é acompanhado pelo amolecimento dos tecidos (HUBER, 1983; FICHER; BENNETT, 1991). Esse amolecimento é o resultado das modificações das texturas que ocorrem durante o amadurecimento pós-colheita para praticamente todas as frutas (MANRIQUE; LAJOLO, 2004), devido às mudanças estruturais da pectina, hemicelulose e celulose, que juntas, são responsáveis pelas modificações na estrutura da parede celular (HUBER, 1983; SEYMOUR et al., 1990). Não houve diferença significativa entre os valores de firmeza dos frutos tratados e não tratados nos dias 1 e 3 (Tabela 6). Embora fosse esperada redução da firmeza nos frutos tratados, no último dia de avaliação foi observado o contrário. Frutos expostos ao 3M1B apresentaram maior valor de firmeza, possivelmente porque os frutos utilizados nesse tratamento apresentavam-se menos maduros do que os demais.

Tabela 6 - Sólidos solúveis (SS), acidez titulável, pH e firmeza de polpa de goiabas 'Kumagai' tratadas com 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar o volátil 3-metil-1-butanol (3M1B), por 10h, e armazenadas a 25 °C por seis dias

Tratamento	SS (%) ^x	Acidez titulável (% ác. cítrico) ^x	pH ^x	Firmeza (N) ^x
Dia 0				
	7,80	0,59	3,92	87,82
Dia 1				
Controle	7,83 a	0,62 a	3,85 a	84,72 a
3M1B	7,85 a	0,61 a	3,83 a	92,85 a
Dia 3				
Controle	8,46 a	0,71 a	4,01 a	90,16 a
3M1B	8,54 a	0,71 a	3,81 b	87,32 a
Dia 6				
Controle	9,04 a	0,78 a	3,94 a	55,79 a
3M1B	8,31 a	0,68 b	3,96 a	84,44 b

^x Média de seis repetições. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, no mesmo dia, não diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$).

3 CONCLUSÕES

Os compostos orgânicos voláteis 3-metil-1-butanol (3M1B) e 2-metil-1-butanol (2M1B) possuem efeito inibitório sobre o desenvolvimento de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Alguns dos possíveis mecanismos de ação envolvem o aumento na permeabilidade seletiva da membrana plasmática, além da interferência no metabolismo oxidativo dos fitopatógenos.

O composto volátil 3M1B, na dose de $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ de ar, aumenta a incidência e a severidade da antracnose em frutos de goiaba, sendo que o composto também interfere na fisiologia dos frutos, promovendo o amadurecimento precoce dos mesmos. Por outro lado, as qualidades físico-químicas não são afetadas pelo tratamento com o volátil.

Trabalhos envolvendo diferentes condições experimentais, como menores doses e tempos de exposição aos compostos 3M1B e 2M1B, podem ser conduzidos a fim de se verificar o potencial de controle de fitopatógenos em frutos por meio de fumigação durante o transporte e armazenamento.

REFERÊNCIAS

- ADASKAVEG, J.E.; FÖRSTER, H.; SOMMER, N.F. Principles of post harvest pathology and management of decays of edible horticultural crops. In: KADER, A.A. (Ed.). **Postharvest technology of horticultural crops**. Oakland: University of California Publication, 2002. p. 163-195.
- ALI, Z.M.; LAZAN, H. Guava. In: MITRA, S.K. **Postharvest of physiology and storage of tropical and subtropical fruits**. Wallingford: CAB International, 1997. p.145-165.
- ALMEIDA, J.G.F. Barreira às exportações de frutas tropicais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. S7-S10, 2002. Suplemento.
- ANGELOVA, M.B.; PASHOVA, S.B.; SLOKOSKA, L.S. Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus nidulans* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, p. 544-549, 2000.
- ARREBOLA, E.; SIVAKUMAR, D.; KORSTEN, L. Effect of volatile compounds produced by Bacillus strains on postharvest decay in citrus. **Biological Control**, St Paul, 2009. In press.
- ATMOSUKARTO, I.; CASTILLO, U.; HESS, W.M.; SEARS, J.; STROBEL, G. Isolation and characterization of *Muscodor albus* I-41.3s, a volatile antibiotic producing fungus. **Plant Science**, Amsterdam, v. 169, p. 854-861, 2005.
- AZZOLINI, M. **Fisiologia pós-colheita de goiabas ‘Pedro Sato’ estádios de maturação e padrão respiratório**. 2002. 100 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- BAUMGARTNER, J. G; SILVA, J.R. da; NAKAMURA, K.I.; FERREIRA, M.E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V.P. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: EMBRAPA, 1996. 64 p.
- BOTELHO, R.V.; SOUZA, N. L.; PERES, N. A. Efeito do tratamento pós-colheita com cloreto de cálcio, pelo método da temperatura diferenciada, no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiabas ‘Branca de Kumagai’. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 26, p. 268-271, 2000.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-257, 1976.
- BROWN, G.E.; DAVIS, C.; CHAMBERS, M. Control of citrus green mold with Aspire is impacted by the type of injury. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 18, p. 57-65, 2000.

BRUCE, A.; VERRALL, S.; HACKETT, C.A.; WHEATLEY, R.E. Identification of volatile organic compounds (VOCs) from bacteria and yeast causing growth inhibition of sapstain fungi. **Holzforschung**, Berlin, v. 58, p. 193-198, 2004.

BRUCE, A.; WHEATLEY, R.E.; HUMPHRIS, S.N.; HACKETT, C.A.; FLORENCE, M.E.J. Production of volatile organic compounds by *Trichoderma* in media containing different amino acids and their effect on selected wood decay fungi. **Holzforschung**, Berlin, v. 54, p. 481-486, 2000.

CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 83, p. 463-468, 1991.

CARVALHO, C.R.L.; MANTOVANI, D.M.B.; CARVALHO, P.R.N.; MORAES, R.M.M. **Análises químicas de alimentos**. Campinas: ITAL, 1990. 121 p.

CARVALHO, V.D. Qualidade e conservação pós-colheita de goiabas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, n. 179, p. 48-54, 1994.

CHAURASIA, B.; PANDEY, A.; PALNI, L. M. S.; TRIVEDP, I.; KUMAR, B.; COLVIN, N. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 160, p. 75-81, 2005.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL; FAEPE, 1990. 320p.

_____. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL; FAEPE, 2005. 783 p.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B.; CARVALHO, V.D. Algumas características dos frutos de duas cultivares de goiabeira (*Psidium guajava* L.) em fase de maturação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6., 1981, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981. v. 2, p. 771-780.

CHOUDHURY, M.M. **Goiaba: pós-colheita**. Brasília: Embrapa, 2001. 45 p. (Frutas do Brasil, 19).

CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; BENATO, E.A. Indução de resistência no manejo de doenças pós-colheita. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS A PATÓGENOS, 3., 2007, Viçosa. **Indução de resistência em plantas a patógenos: anais...** Viçosa: UFV, 2007. v. 1, p. 245-268.

CLYDESDAL, F.M. Color as a factor in food choice. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 33, n. 1, p. 83-101, 1993.

DAISY, B.H.; STROBEL, G.A.; CASTILLO, U.; EZRA, D.; SEARS, J.; WEAVER, D.K.; RUNYON, J.B. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, London, v. 148, p. 3737–3741, 2002.

DAS, M.; BORA, K. N. Ultrastructural studies on infection processes by *Colletotrichum acutatum* on guava fruit. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 51, p. 353-356, 1988.

DEISING, H.B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S.F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 286-295, 2008.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton: CRC Press, 1985. 355 p.

DONAHAYE, E.J. Current status of non-residual control methods against stored product pests. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, p. 571-576, 2000.

EZRA, D.; STROBEL, G.A. Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 165, p. 1229-1238, 2003.

FIALHO, M.B. **Mecanismos de ação de compostos orgânicos voláteis antimicrobianos produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* sobre o desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. 2008. 120 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FIALHO, M.B.; TOFFANO, L.; PEDROSO, M.P.; AUGUSTO, F. & PASCHOLATI, S.F. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the *in vitro* development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, p. 925–32, 2010.

FISHER, R.L.; BENNETT, A.B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 675-703, 1991.

FRENCH, R.C. Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. **Mycologia**, New York, v. 84, p. 277-288, 1992.

FRIES, N. Effects of volatile organic compounds on the growth and development of fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 60, p. 1-21, 1973.

GERHARDT, L.B.A.; MANICA, I.; KIST, H.; SIELER, R.L. Características físico-químicas dos frutos de quatro cultivares e três clones de goiabeira em Porto Lucena, RS. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 185-192, 1997.

GOATES, B.J.; MERCIER, J. Effect of biofumigation with volatiles from *Muscodor albus* on the viability of *Tilletia* spp. Teliospores. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 55, p. 203-206, 2009.

GONZAGA NETO, L.; SOARES, J.M. **A cultura da goiaba**. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1995. 75 p.

GRIFFITH, G.S.; RAYNER, A.D.M.; WILDMAN, H.G. Interspecific interactions and mycelial morphogenesis of *Hypholoma fasciculare* (Agaricaceae). **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 5, p. 47-75, 1994.

GRIMME, E.; ZIDACK, N.K.; SIKORA, R.A.; STROBEL, G.A.; JACOBSEN, B.J. Comparison of *Muscodor albus* volatiles with a biorational mixture for control of seedling diseases of sugar beet and root-knot nematode on tomato. **Plant Disease**, St Paul, v. 91, p. 220-225, 2007.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry Biophysics**, New York, v. 125, p. 189-198, 1968.

HEIPIEPER, H.J.; ISKEN, S.; SALIOLA, M. Ethanol tolerance and membrane fatty acid adaptation in *adh* multiple and null mutants of *Kluyveromyces lactis*. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p. 777-784, 2000.

HUBER, D.J. Polyuronide degradation and hemicelulose modifications in ripening tomato fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n. 3, p. 405-409, 1983.

HUMPHRIS, S.N.; BRUCE, A.; BUULTJENS, T.E.J.; WHEATLEY, R.E. The effects of volatile secondary metabolites on protein synthesis in *Serpula lacrymans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 210, p. 215-219, 2002.

HUMPHRIS, S.N.; WHEATLEY, R.E.; BRUCE, A. The effects of specific volatile organic compounds produced by *Trichoderma* spp. on the growth of wood decay basidiomycetes. **Holzforschung**, Berlin, v. 55, p. 233-237, 2001.

INGRAM, L.O. Adaptation of membrane lipids to alcohols. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 125, p. 670-678, 1976.

INGRAM, L.O. ; BUTTKE, T.M. Effects of alcohols on microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 25, p. 253-300, 1984.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Estatísticas**. Disponível em:
<http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp> Acesso em: 25 ago. 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de recuperação automática produção agrícola**. Disponível em:
<www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric>. Acesso em: 25 ago. 2010.

JANISIEWICZ, W.J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 411-441, 2002.

JUNQUEIRA, N.T.V.; COSTA, H. Controle das doenças da goiabeira In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; MONTEIRO, A.J.A.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. v. 2, p. 1247-1277.

JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M.; PEREIRA, M.; LIMA, M.M.; CHAVES, R.C. **Doenças da goiabeira no Cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001. 31 p. (Circular Técnica, 15).

KAI, M.; EFFMERT, U.; BERG, G.; BIRGIT, P. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 187, p. 351-360, 2007.

LACEY, L.A.; HORTON, D.R.; JONES, D.C. The effect of temperature and duration of exposure of potato tuber moth (Lepidoptera: Gelechiidae) in infested tubers to the biofumigant fungus *Muscodor albus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 97, p. 159-164, 2008.

LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEEA, P.; CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 48, p. 113-121, 2008.

LI, Q.; NING P.; ZHENG, L.; HUANG, J.; LI, G.; HSIANG, T. Fumigant activity of volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on *Citrus microcarpa*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.58, p. 157-165, 2010.

LIM, T.-K.; MANICOM, B.Q. Diseases of guava. In: PLOETZ, R.C. (Ed.). **Diseases of tropical fruit crops**. Oxon: CAB International, 2003. chap. 12, p. 275-289.

LIMA FILHO, R.M.; OLIVEIRA, S.M.A.; MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 620-625, 2003.

MALLICK, N.; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response of alga cells. **Journal of Plant Physiology**, Germany, v. 157, p. 183-193, 2000.

MANICA, I.; ICUMA, I.M.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SALVADOR, J.O.; MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E. **Goiaba do plantio ao consumidor: tecnologia de produção, pós-colheita, comercialização**. Porto Alegre: Cinco Continentes. 2001. 124 p.

MANRIQUE, G.D.; LAJOLO, F.M. Cell-wall polysaccharide modifications during postharvest ripening of papaya fruit (*Carica papaya*) **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.33, p.11-26, 2004.

MENEZES, M.; HANLIN, R. T. Apressoria of Brazilian isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. Causal agent of anthracnoses diseases. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, p.247-251, 1996.

MERCIER, J.; JIMÉNEZ, J.I. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 31, p. 1-8, 2004.

_____. Potential of the volatile-producing fungus *Muscodor albus* for control of building molds. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, p. 404-410, 2007.

MERCIER, J.; MANKER, D.C. Biocontrol of soil-borne diseases and plant growth enhancement in glasshouse soilless mix by the volatile-producing fungus *Muscodor albus*. **Crop Protection**, Guildford, v. 24, p. 355-362, 2005.

MERCIER, J.; SMILANICK, J.L. Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. **Biological Control**, Orlando, v. 32, p. 401-407, 2005.

MERCIER, J.; WILSON, C.L. Effect of wound moisture on the biocontrol by *Candida oleophila* of gray mold rot (*Botrytis cinerea*) of apple. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 6, p. 9-15, 1995.

MINERDI, D.; BOSSI, S.; GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A. Volatile organic compounds: a potential direct long-distance mechanism for antagonistic action of *Fusarium oxysporum* strain MSA 35. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 11, p. 844-854, 2009

MITCHELL, A.M.; STROBEL, G.A.; MOORE, E.; ROBISON, R.; SEARS, J. Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, London, v. 156, p. 270-277, 2010.

MOORE-LANDECKER, E.; STOTZKY, E. Inhibition of fungal growth and sporulation by volatile metabolites from bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 18, p. 957-962, July 1972.

PANDEY, R.R. Effect of foliar applications of fungicides on the phylloplane mycoflora and fungal pathogens of guava. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 123, p. 52-62, 1988.

PARK, M.S.; AHN, J.; CHOI, J.G.; CHOI, Y.H.; JANG, K.S.; KIM, J-C. Potential of the volatile-producing fungus *Nodulisporium* sp. CF016 for the control of postharvest disease of apple. **Plant Pathology Journal**, London, v. 26, p. 253-259, 2010.

PAULL, R.E. Pineapple and papaya. In: SEYMOUR, G.B.; TAYLOR, J.E.; TUCKER, G.A. (Ed.). **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 291-323.

PEREIRA, F.M.; MARTINEZ JR., M. **Goiabas para industrialização**. Jaboticabal: Legis Suma, 1986. 142 p.

PERES, N.A.R.; KURAMAE, E.E.; DIAS, M.S.C.; SOUZA, N.L.de. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, p. 128-134, 2002.

PICCININ, E.; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO, R.M. Doenças da goiabeira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo Ceres, 2005. v. 2, cap. 44, p. 401-409.

PRUSKY, D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 413-434, 1996.

RAMIN, A.A.; BRAUN P.G.; PRANGE, R.K.; DELONG, J.M. In vitro effects of *Muscodor albus* and three volatile components on growth of selected postharvest microorganisms. **Hortscience**, Stanford, v. 40, p. 2109-2114, 2005.

RATHORE, D.S. Effect of season on growth and chemical composition of guava (*Psidium guajava* L.) fruits. **Journal of Horticultural Science**, London, v. 51, p. 41-47, 1976.

REZENDE, D.C.; FIALHO, M.B.; SARRIA, G.A.; BLUMER, S; TOFFANO, L., PASCHOLATI, S.F. Compostos orgânicos voláteis fúngicos no controle de fitopatógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 18, p. 276-302, 2010.

RIGA, E.; LACEY, L.A.; GUERRA, N. *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. **Biological Control**, Orlando, v. 45, p. 380-385, 2008.

SCANDALIOS, J.G. Regulation and properties of plant catalases. In: FOYER, C.H.; MULIUNEAUX, P.M. (Ed.). **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 275-315.

SCHNABEL, G.; MERCIER, J. Use of *Muscodor albus* pad delivery system for the management of brown rot of peach in shipping cartons. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 42, p. 121-123, 2006.

SECRETARIA DE COMÉRCIO EXTERIOR. Disponível em:
<<http://www.desenvolvimento.gov.br/portalmdic/sitio/>>. Acesso em: 18 out. 2010.

SEWARD, R.; WILLETTS, J.M.; DINSDALE, M.G.; LLOYD, D. The effects of ethanol, hexan-1-ol, and 2-phenylethanol on cider yeast growth, viability, and energy status; synergistic inhibition. **Journal of the Institute of Brewing**, Washington, v. 102, p. 439-43, 1996.

SEYMOUR, G.B.; COLQHOUN, I.J.; DUPONT, M.S.; PARSLEY, K.R.; SELVENDRAN, R.R. Composition and structural feature of cell wall polysaccharides from tomato fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 725-731, 1990.

SHIMOKAWA, K.; SHIMADA, S.; YAEAO, K. Ethylene-enhanced chlorophyllase activity during degreening of Citrus unshiu Marc. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 8, n. 2, p. 129-135, 1978.

SONG, J.; BEAUDRY, R.M.; FAN, L.; DENG, W.; LEEPIPATTANAWIT, R. (United States). **Method for the inhibition of fungal growth in fruits and vegetables U.S. 6045844**. 4 Apr. 2000.

SPLIVALLO, R.; NOVERO, M.; BERTEA, C.M.; BOSSI, S.; BONFANTE, P. Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, Lancaster, v. 175, p. 417-424, 2007.

STEWART, I.; WHEATON, T.A. Carotenoids in citrus: their accumulation induced by ethylene. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 20, n. 2, p. 448- 449, 1972.

STINSON, M.; EZRA, D.; HESS, W.M.; SEARS, J.; STROBEL, G. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. **Plant Science**, Amsterdam, v. 165, 913-922, 2003.

STOTZKY, G.; SCHENCK, S.; PAPAVIDAS, G.C. Volatile organic compounds and microorganisms. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 4, p. 333-382, 1976.

STROBEL, G.A. *Muscodor albus* and its biological promise. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 33, p. 514-522, 2006.

STROBEL, G.A.; DIRKSE E.; SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus **Microbiology**, Reading, v. 147, p. 2943-2950, 2001.

STROBEL, G.A.; MANKER, D.C.; MERCIER, J.; JIMENEZ, J.; LIN, J.; THURSTON, J.; KERSTING, B. (United States) **Compositions related to a novel endophytic fungi and methods of use. U.S. 20040141955**. 22 Jul. 2004.

STROBEL, G.A.; SPANG, S.; KLUCK, K.; HESS, W.M.; SEARS, J.; LIVINGHOUSE, A.; SYNERGISMAMONG, T. Volatile organic compounds resulting in increased antibiosis in *Oidium* sp. **FEMS Microbiology Letters**, Paris, v. 283, p.140–145, 2008

TARKKA, M.T.; PIECHULLA, B. Aromatic weapons: truffles attack plants by the production of volatiles. **The New Phytologist**, London, v. 175, p. 381-383, 2007.

TOFFANO, L. **Efeito dos extratos do albedo de *Citrus cinensis*, *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei* e dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* no controle da mancha preta dos citros**. 2010. 79 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess Publ., 1969. 239 p.

TUNC, S.; CHOLLET, E.; CHALIER, P.; PREZIOSI-BELLOY, L.; GONTARD, N. Combined effect of volatile antimicrobial agents on the growth of *Penicillium notatum* **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, p. 263-270, 2007.

VESPERMANN, A.; KAI, M.; PIETCHULLA, B. Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 73, p. 5639-5641, 2007.

WHEATLEY, R.E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 357-364, 2002.

WHEATLEY, R.E.; HACKETT, C.; BRUCE, A.; KUNDZEWICZ, A. Effect of substrate composition on the production of volatile organic compounds from *Trichoderma* spp. inhibitory to wood decay fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 39, p. 199-205, 1997.

WORAPONG, J.; STROBEL, G.; FORD, E.J.; LI, J.Y.; BAIRD, G.; HESS, W.M. *Muscodor albus* anam. gen. et sp. nov., an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 79, p. 67-79, 2001.

YAMAUCHI, N.; AKIYAMA, Y.; KAKO, S.; HASHINAGA, F. Chlorophyll degradation in Wase satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit with on-tree maturation and ethylene treatment. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 71, n. 1/2, p. 35-42, 1997.