ESTUDO COMPARATIVO ENTRE *Candida parapsilosis*
VAR. *intermedia* (IZ-A7) E LEVEDURAS NATURAIS DA "GOGA"
(MEL DE CACAU), QUE PRODUZEM UM FATOR COM CAPACIDADE
DE INIBIR O CRESCIMENTO DO FUNGO *Phytophthora capsici*

ZENIRA CARDOSO VILASBOAS VIANA
Química Industrial

Orientador: Prof. Dr. José Paulo Stupiello

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de
Concentração: Tecnologia de Ali-
mentos.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 1989

E R R A T A

- pg. iv - 21ª linha. Onde se lê deste, leia-se desde.
- pg. 06 - 4ª linha. Onde se lê apresetam-se, leia-se apre-
sentam-se.
- pg. 06 - 9ª linha. Onde se lê m, leia-se μ m.
- pg. 08 - 24ª linha. Onde se lê favorávei, leia-se favorável.
- pg. 12 - 4ª linha. Onde se lê fungistárico, leia-se fungis-
tático.
- pg. 15 - 23ª linha. Onde se lê adtinomicetos, leia-se acti-
nomicetos.
- pg. 23 - 14ª linha. Onde se lê dicionou-se, leia-se adicio-
nou-se.
- pg. 29 - 13ª linha. Onde se lê lavouras, leia-se leveduras.
- pg. 32 - 3ª linha. Onde se lê "ágar", leia-se "goga".
- pg. 34 - 9ª linha. Onde se lê *C. parapsilosis intermedia*,
leia-se *C. parapsilosis* var. *intermedia*.

V614e

Viana, Zenira Cardoso Vilasboas

Estudo comparativo entre *Candida parapsilosis* var. *intermedia* (IZ-A7) e leveduras naturais da "Goga" (mel de cacau), que produzem um fator com capacidade de inibir o crescimento do fungo *Phytophthora capsici*. Piracicaba, 1989.
64p.

Diss. (Mestre) - ESALQ.
Bibliografia.

1. Cacau - Doença - Controle Biológico
2. Fungo fitopatogênico - Controle biológico
3. Fungo fitopatogênico - Crescimento - Inibição
4. Levedura para controle biológico
5. Mel de cacau - Levedura.
6. Podridão parda do cacau - Controle biológico. I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CDD 632.4

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE *Candida parapsilosis*
VAR. *intermedia* (IZ-A7) E LEVEDURAS NATURAIS DA "GOGA"
(MEL DE CACAU), QUE PRODUZEM UM FATOR COM CAPACIDADE
DE INIBIR O CRESCIMENTO DO FUNGO *Phytophthora capsici*

Zenira Cardoso Vilasboas Viana

Aprovado em: 11/07/89

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. JOSÉ PAULO STUPIELLO

ESALQ/USP

Prof. Dr. JORGE HORII

ESALQ/USP

Profª Drª MARIA EDESINA AGUIAR

FACFAC/UFBA

Prof. Dr. José Paulo Stupiello
Orientador

À memória de meu pai
A minha mãe e irmãos
A João Aurélio, meu esposo

Ao João e à Mariana
pela inocente participação,

D E D I C O.

AGRADECIMENTOS

À ESALQ, aos professores do Curso de Tecnologia dos Alimentos, em especial ao Professor Doutor José Paulo Stupiello pela sua orientação, ao Professor Doutor Antonio Joaquim de Oliveira pelo estímulo durante o Exame de Qualificação e ao Professor Doutor Rodolpho de Camargo pelo fornecimento da cepa de *Candida parapsilosis* var. *intermedia*.

À UFBA, na pessoa do professor Milton Saback, Instituto de Química, que me orientou à Faculdade de Farmácia, cujas instalações foram oferecidas e colocadas à minha disposição pela sua Diretora Profª Florentina Santos Diez del Corral.

À Professora Doutora Maria Edesina Aguiar, Faculdade de Farmácia - UFBA, pela orientação constante e segura, gerando um desafio à realização deste trabalho, meu reconhecimento se dará por todo o tempo da minha existência.

À Professora Doutora Dyrce Franco de Araújo, Instituto de Ciências da Saúde - UFBA, pela sugestão do tema desta dissertação, pelo apoio e pela sua colaboração fornecendo a "goga" de cacau.

Ao Professor Doutor Metry Bacila, da Universidade Federal do Paraná, pelas valiosas críticas que em muito enriqueceram a formulação deste trabalho.

À Dra. Dilza Coelho Mendes, Fitopatologista - MS, do Instituto Biológico da Bahia, pela sua amizade e pela sua eficiência profissional atuando durante toda a fase experimental da pesquisa.

À Edna Marina Lima Barbosa, Assistente de Laboratório do Instituto Biológico da Bahia, à Alvacy, Damiana e Mônica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia - UFBA, pela participação desinteressada nos trabalhos práticos.

À Maria Luíza do Amaral Fernandes e Vanda Célia Freitas Ramos Sampaio da CEPLAC, pelas suas contribuições no levantamento bibliográfico.

À Maria Helena Freire de Mello, pelo carinho e denodo na revisão gramatical.

Ao Engº Agrº M.S. Gilênio Borges Fernandes, por toda contribuição e empenho emprestado à elaboração e revisão do conteúdo estatístico.

Ao Engº Agrº Agmael Eloí de Abreu, por toda colaboração e sobretudo pela amizade.

À Sybele do Instituto Biológico de São Paulo, pelo fornecimento da cepa de *Phytophthora capsici*.

À Luis Carlos Cordeiro do Amaral da CEPLAC, pelo fornecimento das cepas de *C. capsici* e *P. palmivora*.

Aos meus colegas pelo entusiasmo, ccompanheirismo e apoio deste o início do curso.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de estudos.

Meus sinceros agradecimentos, a todos aqueles que contribuíram em etapas diversas, tornando possível realizar esta dissertação.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xvii
SUMMARY	xx
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Características das espécies de <i>Phytophthora</i> isoladas de cacau	05
2.2. Fatores que afetam o desenvolvimento de <i>Phytophthora</i>	07
2.3. Efeitos nutricionais relacionados com <i>Phytophthora</i>	10
2.4. Ação das substâncias fenólicas sobre o <i>Phytophthora</i>	10
2.5. Controle químico de <i>Phytophthora</i>	12
2.6. Controle biológico de <i>Phytophthora</i>	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Material biológico	19
3.1.1. Microrganismos	19
3.1.2. Substrato natural	19
3.2. Meios de cultura	20
3.2.1. Meio de malte	20
3.2.1.1. Composição e preparo do meio	20
3.2.1.2. Inoculação e incubação	20
3.2.2. Sabouraud líquido	21
3.2.2.1. Composição e preparo do meio	21
3.2.2.2. Inoculação e incubação	21

	Página
3.2.3. Ágar-Sabouraud	22
3.2.3.1. Composição e preparo do meio	22
3.2.3.2. Inoculação e incubação	22
3.2.4. Meio de BDA	23
3.2.4.1. Composição e preparo do meio	23
3.2.4.2. Inoculação e incubação	23
3.2.5. Ágar-"goga" de cacau	24
3.2.5.1. Composição e preparo do meio	24
3.2.5.2. Inoculação e incubação	25
3.3. Estudo comparativo do crescimento dos fun- gos nos meios Sabouraud e BDA	25
3.4. Massa de leveduras	25
3.5. Testes de inibição do crescimento de <i>P. cap</i> <i>síci</i>	29
3.6. Determinação da concentração em proteínas nas células cultivadas	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Testes do crescimento de <i>P. capsíci</i>	31
4.2. Produção de massa celular de <i>C. parapsi-</i> <i>losis</i> var. <i>intermedia</i> e das leveduras na- turais na "goga" de cacau	32
4.3. Testes de inibição do crescimento de <i>P. cap</i> <i>síci</i>	34
4.4. Determinação da concentração em proteínas nas células cultivadas	54
5. CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº		Página
1	Fluxograma do procedimento seguido para se testar a inibição do crescimento de <i>P. capsici</i> com líquido fermentado, célula rompida e fração subcelular proveniente do crescimento de <i>C. parapsilosis</i> var. <i>intermedia</i> em Sabouraud líquido	27
2	Fluxograma do procedimento seguido para se testar a inibição do crescimento de <i>P. capsici</i> com líquido fermentado, célula rompida e fração subcelular proveniente do crescimento das leveduras naturais em Sabouraud líquido	28
3	pH do meio fermentado, proveniente da fermentação de <i>C. parapsilosis</i> var. <i>intermedia</i> (▲—▲) e de leveduras naturais da "goga" de cacau (●—●). O tempo de fermentação indicado corresponde ao período de crescimento das leveduras em Sabouraud líquido	35
4	Resultado de 24 horas do crescimento de <i>P. capsici</i> em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:10 e 1:5); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido pela <i>C. parapsilosis</i> var. <i>intermedia</i> . Nas placas-controle (BDA puro), o crescimento de <i>P.</i>	

capsici foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período de crescimento de *C. parapsilosis* var. *intermedia* em meio Sabouraud líquido ..

39

- 5 Resultado de 48 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:10 e 1:5); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido pela *C. parapsilosis* var. *intermedia*. Nas placas-controle (BDA puro), o crescimento de *P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período do crescimento de *C. parapsilosis* var. *intermedia* em meio Sabouraud líquido

40

- 6 Resultado de 72 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:10 e 1:5); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido pela *C. parapsilosis* var. *intermedia*. Nas placas-controle (BDA puro), o crescimento de

- P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavadas a 120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período do crescimento de *C. parapsilosis* var. *intermedia* em meio de Sabouraud líquido. 41
- 7 Resultado de 96 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:10 e 1:5); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido para *C. parapsilosis* var. *intermedia*. Nas placas-controle (BDA puro), o crescimento de *P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período do crescimento de *C. parapsilosis* var. *intermedia* em meio Sabouraud líquido 42
- 8 Resultado de 120 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:10 e 1:5); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido pela *C. parapsilosis* var. *intermedia*. Nas placas - controle (BDA puro), o crescimento de *P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos.

O tempo de fermentação indicado corresponde ao período do crescimento de *C. parapsilosis* var. *intermedia* em meio Sabouraud líquido

43

- 9 Resultado de 24 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:20 e 1:10); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido pelas leveduras naturais da "goga" de cacau. Nas placas - controle (BDA puro), o crescimento de *P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período do crescimento das leveduras naturais da "goga" de cacau em meio Sabouraud líquido

45

- 10 Resultado de 48 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:20 e 1:10); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido pelas leveduras naturais da "goga" de cacau. Nas placas - controle (BDA puro), o crescimento de *P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavadas a

120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período de crescimento das leveduras naturais da "goga" de cacau em meio Sabouraud líquido

46

- 11 Resultado de 72 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:20 e 1:10); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido pelas leveduras naturais da "goga" de cacau. Nas placas-controle (BDA puro), o crescimento de *P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período de crescimento das leveduras naturais da "goga" de cacau em meio Sabouraud líquido

47

- 12 Resultado de 96 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:20 e 1:10); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido pelas leveduras naturais da "goga" de cacau. Nas placas-controle (BDA puro), o crescimento de *P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares

e a fração subcelular foram autoclavadas a 120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período de crescimento das leveduras naturais da "goga" de cacau em meio Sabouraud líquido

48

- 13 Resultado de 120 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:20 e 1:10); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido pelas leveduras naturais da "goga" de cacau. Nas placas-controle (BDA puro), o crescimento de *P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavadas a 120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período do crescimento das leveduras naturais da "goga" de cacau em meio Sabouraud líquido

49

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		Página
1	pH do meio fermentado por <i>C. parapsilosis</i> var. <i>intermedia</i> e por leveduras naturais da "goga" de cacau	34
2	Percentual relativo de inibição do crescimento durante cinco dias consecutivos, de <i>P. capsici</i> em meio BDA homogeneizado com meio fermentado (1:10 e 1:5), autoclavado a 120°C durante 20 minutos, proveniente do crescimento de <i>C. parapsilosis</i> var. <i>intermedia</i> em meio Sabouraud líquido. Valores calculados em relação às placas-controle, considerando o crescimento de <i>P. capsici</i> de 100%	37
3	Percentual relativo de inibição do crescimento durante cinco dias consecutivos, de <i>P. capsici</i> em meio BDA homogeneizado com meio fermentado (1:20 e 1:10), autoclavado a 120°C durante 20 minutos, proveniente do crescimento das leveduras naturais da "goga" de cacau em meio Sabouraud líquido. Valores calculados em relação às placas-controle, considerando o crescimento de <i>P. capsici</i> de 100%	44

TABELA Nº

Página

4	Percentual relativo de inibição do crescimento durante cinco dias consecutivos, de <i>P. capsici</i> em meio BDA homogeneizado com restos celulares (1:10), autoclavado a 120°C durante 20 minutos, proveniente do crescimento de <i>C. parapsilosis</i> var. <i>intermedia</i> em meio Sabouraud líquido. Valores calculados em relação às placas-controle, considerando o crescimento de <i>P. capsici</i> de 100%	51
5	Percentual relativo de inibição do crescimento durante cinco dias consecutivos, de <i>P. capsici</i> em meio BDA homogeneizado com restos celulares (1:10), autoclavado a 120°C durante 20 minutos, proveniente do crescimento das leveduras naturais da "goga" de cacau em meio Sabouraud líquido. Valores calculados em relação às placas-controle, considerando o crescimento de <i>P. capsici</i> de 100%	52
6	Percentual relativo de inibição do crescimento durante cinco dias consecutivos, de <i>P. capsici</i> em meio BDA homogeneizado com fração subcelular (1:10), autoclavada a 120°C durante 20 minutos, proveniente do crescimento de <i>C. parapsilosis</i> var. <i>intermedia</i> em meio Sabouraud líquido. Valores calculados em relação às placas-controle, considerando o crescimento de <i>P. capsici</i> de 100%	53

TABELA Nº

Página

- 7 Percentual relativo de inibição do crescimento durante cinco dias consecutivos, de *P. capsici* em meio BDA homogeneizado com fração subcelular (1:10), autoclavada a 120°C durante 20 minutos, proveniente do crescimento das leveduras naturais da "goga" de cacau em meio Sabouraud líquido. Valores calculados em relação às placas-controle, considerando o crescimento de *P. capsici* de 100% 55
- 8 Determinação da concentração em proteínas nas amostras de *C. parapsilosis* var. *intermedia* e de leveduras naturais contidas na "goga" de cacau cultivadas em meio Sabouraud líquido em temperatura ambiente 56

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE *Candida parapsilosis*
VAR. *intermedia* (IZ-A7) E LEVEDURAS NATURAIS DA "GOGA"
(MEL DE CACAU), QUE PRODUZEM UM FATOR COM CAPACIDADE
DE INIBIR O CRESCIMENTO DO FUNGO *Phytophthora capsici*

Autor: Zenira Cardoso Vilasboas Viana
Orientador: Prof. Dr. José Paulo Stupiello

RESUMO

Com o objetivo de reduzir a podridão parda dos frutos do cacaueiro provocada por *P. capsici*, foram realizados experimentos com a finalidade de promover o controle biológico desse fungo. Seu crescimento foi efetuado em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) onde foi observado rápida esporulação.

A produção de massa celular de *C. parapsilosis* var. *intermedia* e das leveduras naturais provenientes da "goga" (mel de cacau), safra/87, foram obtidas em meio Sabouraud líquido. O crescimento das células foi interrompido com 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas consecutivas de fermentação, sendo realizados posteriormente, testes para avaliar a produção, por parte das leveduras, de um fator capaz de inibir o crescimento de *P. capsici*.

As células foram separadas do meio fermentado por centrifugação, sendo depois rompidas com material abrasivo.

vo, sob resfriamento, separando-se a fração subcelular dos seus restos celulares. Todas as frações obtidas (meio fermentado, restos celulares e fração subcelular) foram esterilizadas por autoclavagem.

Os testes de inibição do crescimento de *P. capsici* foram conduzidos em placas de Petri contendo meio BDA, onde foram adicionadas diferentes concentrações do meio fermentado, de células rompidas e de fração subcelular, respectivamente. Estas placas foram inoculadas com *P. capsici*, observando-se seu crescimento durante 5 (cinco) dias consecutivos em temperatura ambiente.

Os resultados obtidos mostraram que houve a produção de um fator inibidor do crescimento de *P. capsici* no meio fermentado de *C. parapsilosis* var. *intermedia* mais acentuado até cerca de 48 horas de fermentação. Mesmo após esse período, a produção do fator de inibição se manteve ligeiramente crescente até 144 horas de fermentação nas concentrações estudadas de 1:10 e 1:5. Já para as leveduras naturais da "goga" de cacau, o fator de inibição, produzido no meio com concentração 1:10 manteve-se ligeiramente crescente de 6 a 120 horas, aumentando vigorosamente até 100% após 144 horas, o que pode ser verificado mesmo em concentrações menores como 1:20.

O fator de inibição do crescimento de *P. capsici*, sendo produzido no interior das células no curso da fermentação, foi liberado para o meio fermentado, como pode

ser demonstrado nos experimentos com frações subcelulares e restos celulares, cuja inibição foi considerada insignificante em relação ao meio fermentado.

COMPARATIVE STUDY BETWEEN *Candida parapsilosis* VAR.
intermedia (IZ-A7) AND "GOGA" NATURAL YEASTS OF CACAO HONEY,
PRODUCING A FACTOR WITH THE CAPACITY TO INHIBIT THE
GROWTH OF THE *Phytophthora capsici*

Author: Zenira Cardoso Vilasboas Viana
Adviser: Prof. Dr. José Paulo Stupiello

SUMMARY

In order to reduce the "dark gray rottenness" of the cacao-tree fruits, caused by *P. capsici*, experiments were carried out to promote the biological control of this fungus. Its growth was accomplished in potato-dextrose - agar (PDA), showing a rapid sporulation.

The production of *C. parapsilosis* var. *intermedia* cell mass and natural yeasts from "goga" (cacao-honey), harvest/87, were obtained in liquid Sabouraud medium. The cells growth was interrupted with 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 consecutive hours of fermentation; posterior tests were made to evaluate the production of an inhibition factor, by yeasts, suitable to inhibit the *P. capsici* growth.

The cells were separated from the fermentated medium by centrifugation, and then, they were broken with abrasive material, by cooling; the subcell fraction was

separated from its cell rests. All the fractions obtained (fermentated medium, cell rests, and subcell fraction) were sterilized by autoclaving.

The inhibition tests of the *P. capsici* growth were conducted on Petri plates, containing PDA medium, adding different concentrations of the fermentated medium, broken cells and subcell fractions, respectively. These plates were inoculated with *P. capsici*; its growth was observed during five consecutive days at room temperature.

The obtained results showed that there was production of a *P. capsici* growth inhibitor factor in the *C. parapsilosis* var. *intermedia* fermentated medium, stronger until almost 48 hours of fermentation. Thus, after this period, the production of the inhibition factor maintained light increase until 144 hours of fermentation, at the 1:10 and 1:5 concentrations. Otherwise, the inhibition factor produced by cacao "goga" natural yeasts, in a medium with the concentration 1:10, maintained a light increase from 6 through 120 hours, augmenting strongly till 100%, after 144 hours, the same could be observed in concentrations smaller than 1:20.

The *P. capsici* growth inhibition factor produced inside the cells during the fermentation, was released to the fermentated medium, as could be demonstrated in the experiments with subcell fractions and cell rests, whose inhibition was considered insignificant in relation to the fermentated medium.

1. INTRODUÇÃO

O fruto do cacauzeiro é cultivado em várias regiões do mundo, como nos trópicos úmidos, e é utilizado na industrialização de inúmeros produtos alimentícios como chocolate, manteiga de cacau, bebidas e condimentos.

O cacauzeiro é contudo, passível de um grande número de enfermidades, embora, no Brasil a mais representativa, em termos de perda anual, seja a **podridão parda** que, sob condições ambientais favoráveis, pode atingir cerca de aproximadamente 35% da safra, com reflexos diretos na economia mundial.

As perdas estão relacionadas diretamente com a incidência da **podridão parda** nos períodos da colheita: de abril a agosto (safra menor ou cacau temporão) e de setembro a janeiro (safra principal). Se a moléstia se desenvolver desde o início do ano agrícola, ambas as safras poderão ser afetadas; se ocorrer tardiamente, só a safra principal será prejudicada.

A cultura do cacau, na Bahia, que responde por

cerca de 96% da produção brasileira, é também muito sensível a ataques de fungos. Até o presente, três espécies de *Phytophthora* foram identificadas como agentes causais da **podridão parda** nos cacauais sendo que os resultados dos levantamentos efetuados indicam *P. capsici* como a espécie predominante nos frutos, enquanto *P. palmívora* surge com menos frequência, ocorrendo, poucas vezes, a *P. citrophthora*.

Estes fungos atacam troncos, folhas, almofadas florais, ramos, raízes e frutos. Este último pode ser atacado independentemente da idade. Nos frutos, logo após serem infectados, as manchas pardas aparecem, aumentando rapidamente, podendo inclusive, tomar toda a sua superfície externa. Os frutos infectados não podem ser vendidos ou processados, ocasionando um grande percentual de perda na colheita.

O principal fator responsável pela disseminação das espécies de *Phytophthora*, a curta distância, é a chuva, pois a água carrega o esporo móvel pelos ramos e troncos. As formigas também atuam como disseminadoras. A curta e longa distâncias, durante as operações de poda e colheita, o homem é um eficiente agente dispersor. As formas não esporulantes são carregadas, principalmente, por ratos e macacos.

Em todos os países produtores de cacau, há uma preocupação dos técnicos em combater a doença, selecionando cultivares de cacau resistentes ao fungo; eliminando to-

dos os frutos do cacaueiro no fim da safra; praticando a poda; raleando as árvores da sombra; drenando o solo; removendo periodicamente todos os frutos infectados; amontoando o casqueiro e tratando-o com cal (somente o amontado das cascas já é uma medida preventiva, visto que, no interior dos montes, o acúmulo de CO_2 reduz a esporulação e a disseminação do patógeno) e, por fim, através do controle químico.

ARAÚJO et alii (1975), visando erradicar a **podridão parda**, estudaram o metabolismo de *P. palmivora* na "goga" de cacau, introduzido a meios básicos de cultura. Isolaram várias leveduras desse substrato natural, uma das quais foi identificada na Holanda (CENTRAL BUREAU VOOR SHIMMEL CULTURES; YEAST DIVISION, JULIANALAN), como *C. parapsilosis*. As leveduras revelaram um fator inibidor termoe estável, que foi retido em filtro Seitz, sendo que este não foi isolado nem identificado, razão pela qual o presente trabalho, teve como objetivos: obter um extrato livre de células de *C. parapsilosis* var. *intermedia*; um extrato livre de células de leveduras naturais da "goga" de cacau; o isolamento e a identificação da fração celular com propriedades de inibir o crescimento do fungo; e testes com meios fermentados com a finalidade de inibir o crescimento de *P. capsici*, com perspectivas de se estabelecer o controle biológico desse fitopatógeno. A respeito do metabolismo de *P. capsici*, vários pontos ainda estão obscuros, sendo o mecanismo de resistência, baseado na bioquímica do fungo pouco desenvolvido.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Theobroma cacao é uma planta que produz um grupo de flores em forma de "almofadas" sobre o tronco, geralmente por um longo período do ano. Cada fruto fica sobre a árvore por aproximadamente 5 meses e meio e, durante esse tempo, a casca do cacau poderá ser atacada pelo *Phytophthora*.

Este fungo se desenvolve às custas de células vivas, fixando-se, de preferência, nos tecidos jovens dos frutos do cacaueiro, causando, dessa forma, o maior dano, aos frutos ainda verdes, embora possa também atingir aqueles em quaisquer estágio de desenvolvimento. Inicialmente, um diminuto ponto preto se instala na casca e se desenvolve até que todo o fruto se torna escuro, ficando ainda sujeito a ataques posteriores de outros fungos; torna-se, então, esbranquiçado, podendo cair ou permanecer na árvore, ou ainda secar e mumificar-se.

ADEBAYO (1980) focalizou que cerca de 90% dos frutos infectados por *Phytophthora* não podem ter suas amên

doas fermentadas e, conseqüentemente, não são comerciáveis.

2.1. Características das espécies de *Phytophthora* isoladas de cacau

CAMPÊLO & MEDEIROS (1980) identificaram dois tipos morfológicos de *P. palmívora* (Butl) Butl: o tipo morfológico um (MF₁), apresentando esporângios com pedicelos curtos (<5 µm de comprimento) e o tipo morfológico quatro (MF₄), esporângios com pedicelos longos (<15 µm de comprimento).

O fungo *Phytophthora* anteriormente designado como *P. palmívora* (MF₄), foi identificado como *P. capsicí* Leonian, sendo evidenciada a sua predominância em cerca de 95% dos isolados, efetuados nas regiões cacaueiras. *P. palmívora sensu stricto* (*P. palmívora* MF₁) ocorreu em 3,0% dos isolados e *P. citrophthora* (Smith) Leonian, em 2%. Esses resultados demonstraram que *P. capsicí* é o principal agente causal da podridão parda nos frutos de cacau (CAMPÊLO & LUZ, 1981).

O *P. capsicí* apresenta o ápice do esporângio com 4,6 µm de abertura do poro. Esporângios abundantes em meio de cenoura-ágar (CA), decíduos, não proliferando internamente, medindo 37,2 x 22,7 µm, com comprimento/largura = 1,6 a 1,9, às vezes até 2,2. Pedicelos longos, com mais de

30 μm de comprimento, em média de 49 μm , às vezes com 250 μm . Oosporos formados em alturas pareadas, anterídeos sempre anfígenos. Clamidosporos raros. Culturas desenvolvidas em meio CA, com cinco dias de idade, apresetam-se petalóides com micélio denso e bordos não definidos (CAMPÊLO & LUZ, 1981).

O *P. palmivora* apresenta o ápice do esporângio com 4,7 μm de profundidade e abertura do poro com 4,7 μm . Esporângios abundantes em meio de CA, decíduos, não proliferando internamente, medindo cerca de 43,0 x 27,7 μm , com comprimento/largura = 1,6. Pedicelos curtos com menos de 5 μm (média de 3 μm) de comprimento. Oosporos formados em culturas pareadas, anterídios sempre anfígenos. Clamidosporos abundantes. Culturas crescendo em meio CA, com cinco dias de idade, apresentam-se estreladas com micélios escasso e bordos definidos (CAMPÊLO & LUZ, 1981).

O *P. citrophthora* apresenta o ápice do esporângio com 3 μm de profundidade. Esporângios abundantes em meio sólido, com formas variáveis, não decíduos, nem proliferando internamente, às vezes intercalares, medindo em média 66,0 x 38,0 μm , com comprimento/largura = 1,7. Esporângios podendo apresentar-se também com duas papilas. Clamidosporos abundantes. Nenhuma formação de anterídios e oogônio em cultura pura, mesmo quando pareadas com *P. capsici* ou *P. palmivora*. Culturas crescendo em meio CA, com 5 dias de idade, apresentaram-se em forma de crisântemo com micélio coto-noso (CAMPÊLO & LUZ, 1981).

CAMPÊLO et alii (1982) determinaram a virulência relativa de *Phytophthora* spp, sendo que o *P. citrophthora* mostrou-se mais virulento, enquanto que o *P. palmivora* ficou em um grupo intermediário. O *P. capsici* foi o menos virulento de todos os isolados testados. Estes dados alertaram para os perigos que o aumento das populações de *P. palmivora* ou *P. citrophthora* acarretariam à economia da cultura cacaueteira, caso ocorresse um desequilíbrio na distribuição populacional.

LUZ & CAMPÊLO (1985), estudaram a sensibilidade a fungicidas "in vitro" e o *P. capsici* apresentou maior sensibilidade aos produtos testados, maior tolerância a altas e baixas temperaturas, maior capacidade para produzir esporângios hábeis e liberar zoósporos que os demais citados. A capacidade demonstrada por esta espécie para maior produção e liberação de zoósporos, uma das causas de sua predominância na região, torna-se mais evidente na faixa de temperatura entre 18 e 23°C, de ocorrência comum na região durante a época de maior incidência da enfermidade, quando a produção de *P. capsici* é muito superior ao *P. palmivora* e ao *P. citrophthora*.

2.2. Fatores que afetam o desenvolvimento de *Phytophthora*

LEONIAN (1925) comentou que o fator limitante

para a produção do esporângio de *Phytophthora* é o acesso ao oxigênio atmosférico. Em presença de solução bem aerada ocorre formação abundante dos esporângios.

Segundo LELLIS (1952), a temperatura do ar, assim como o seu alto teor higrométrico, sempre presente nos vários meses do ano na região de plantio, quando em conjunção com as baixas temperaturas, criam um ambiente ótimo para a proliferação de *Phytophthora*.

MEDEIROS (1965) estudou diferentes métodos utilizados para rápida indução da esporulação de fungos e obteve intensa esporulação de *Phytophthora* em meio de ágar-batata-dextrose, contribuindo para que os trabalhos experimentais de campo e de laboratório, relacionados com essa séria enfermidade dos cacaueiros, não ficassem limitados aos meses mais frios e úmidos do ano.

ROCHA (1966) constatou que os zoosporângios germinam livremente em meio aquoso na faixa de pH ótimo 5,5 - 9,1. A quantidade de umidade requerida para a produção de esporângios varia com a espécie; MEDEIROS & ALVIM (1967) comentaram que uma concentração relativamente elevada de CO_2 na atmosfera inibe a formação de zoosporângios de *Phytophthora* em casca de frutos de cacau. Alta umidade relativa (próxima a 100%) também impede a esporulação. Em ausência de CO_2 , a umidade relativa mais favorável para a esporulação foi de 80%.

ZENTMYER & ERWIN (1969) demonstraram a rela-

ção entre a luz e esterol na produção de esporângios normais; o *P. palmívora* requer luz e colesterol para formação de um esporângio típico, normal. Na luz com esterol, somente pouco esporângio é formado precocemente. ROCHA & MACHADO (1973) verificaram que a esporulação é drasticamente reduzida na ausência de luz; na presença de luz, sua maior intensidade ocorre a 25°C e 80% de umidade relativa. A redução do sombreamento em leveduras comerciais diminuiu em mais de 40% a incidência de enfermidade.

SALGADO (1980) comentou que a intensidade dos sintomas varia com as condições climáticas, variedades do cacau e mesmo com o fungo. A penetração de *Phytophthora* nas árvores de cacau pode se dar diretamente através do tubo germinativo do zoósporo ou do esporângio. Os esporângios rapidamente germinam em água, não germinam em umidade relativa inferior a 95% e a observação em campo mostra que são formados na noite seguinte ao aparecimento do sintoma. Provavelmente, os primeiros esporângios são imediatamente viáveis para que o fungo possa infectar rapidamente os frutos sadios e assim produzirem grande número de esporos na superfície dos frutos, favorecendo sua disseminação.

LUZ & CAMPELO (1983), visando determinar as causas da predominância de *P. capsici* na região cacaueira da Bahia, estudaram, "in vitro", a influência da temperatura no crescimento micelial e produção de zoósporos por *P. capsici*, *P. palmívora* e *P. citrophthora*. O *P. palmívora* mostrou-se me

nos sensível às temperaturas mais elevadas (30-35°C) e mais sensível às temperaturas mais baixas (5-18°C) em relação às demais espécies. *P. capsici* apresentou a mais ampla faixa de temperatura para esporulação e maior produção de zoósporos que as demais espécies, tendo, a 27°C, produzido de duas a oito vezes mais que *P. palmivora* e *P. citrophthora*, respectivamente. Esta última espécie teve reduzida produção de zoósporos em relação às demais, embora se tenha observado formação de clamidosporos entre 15 e 18°C. Com base nos resultados obtidos, consideraram que a temperatura é um fator preponderante no equilíbrio e predominância de *P. capsici* na região cacaueira da Bahia.

2.3. Efeitos nutricionais relacionados com *Phytophthora*

OLIVEIRA (1971) mostrou que, para o *Phytophthora*, a fonte mais adequada de carbono é a glicose, a lactose e o amido, e o nitrogênio na forma de glicina ou alanina. O fungo aproveita melhor a glicose do que a lactose como fonte de carbono; este resultado prevê a presença de uma β -galactosidase.

2.4. Ação das substâncias fenólicas sobre o *Phytophthora*

SPENCE (1961) sugeriu a importância que tem

o sistema polifenol oxidase em tecidos de cacau em relação com o parasitismo de *P. palmívora*. Demonstrou ainda que as enzimas pectinolíticas desse fungo são inativadas pela atividade do sistema polifenol oxidase do hospedeiro e observou que essa atividade era maior em cultivar resistente que em cultivar suscetível. Já TURNER (1965) concluiu que a atividade da polifenol oxidase não é um fator que confere resistência ao fruto do cacau contra o *P. palmívora*.

Segundo ROCHA (1966), alguns pesquisadores em Trinidad concluíram que a atividade do sistema enzimático polifenol-oxidase nos tecidos do cacau é um fator preponderante na determinação de sua resistência. Já na África, os resultados das pesquisas são contrários. Este mesmo autor concluiu que a atividade da polifenol-oxidase não é um fator que confere resistência ao fruto do cacau contra o *P. palmívora*; que o epicárpio possui maior concentração de fenóis totais e orto-dihidroxifenóis; são baixos os conteúdos no mesocárpio e no endocárpio. Poucas substâncias fenólicas presentes no epicárpio de alguns frutos de cacau são as responsáveis pela inibição do crescimento deste fungo.

MEIFFREN & TANGUY (1967) observaram que a infecção dos vários tipos de amêndoas pelo *Phytophthora* produz um aumento no conteúdo de polifenóis, sobretudo de flavanas e especialmente de taninos nas zonas que envolvem o tecido infectado. Estas substâncias se revelaram fungistáticas, sendo favorecida a concentração mínima inibidora para algumas destas substâncias.

OLIVEIRA (1971) relatou que o halofenol inibe o crescimento do *Phytophthora* em cultivo artificial, explicando que produtos complexos da planta podem interferir, reduzindo o efeito fungicida e fungistático da substância e que o próprio fungo é mais resistente em virtude da sua defesa contra as substâncias tóxicas da planta, possivelmente compostos polifenólicos. O pentaclorofenol tem ação fungistática em células de *P. palmivora*. Um período "lag" inicial no desenvolvimento de uma célula, mesmo que depois o crescimento aumente com o tempo, é um índice de toxidez, sendo este o caso da ação do pentaclorofenol. Este mesmo autor mostrou a formação ou aumento de outras substâncias nos tubérculos de batata, na ação de defesa contra *P. infestans*. Estas substâncias são provavelmente o ácido clorogênico e seus componentes ácido caféico e ácido quínico, além de escopolina. Sendo o *P. palmivora* do mesmo gênero do patógeno da batata, presumiram que o ataque do fungo e a resposta do hospedeiro se façam de modo análogo.

2.5. Controle químico de *Phytophthora*

CHATT (1953) comentou que a pulverização com fungicida reduz significativamente a **podridão parda** e que a calda bordalesa tem sido mais efetiva que o Peronox. Na Nigéria, a moléstia foi controlada com pulverização, utilizando

do produtos químicos e removendo toda infecção durante o período crítico entre junho e agosto.

DANTAS (1954) sugeriu a necessidade de serem estudados novos fungicidas para substituir a calda bordale-sa, novos suplementos, maquinário adequado e cada situação especial da plantação, quer para polvilhamento, quer para aspersão e época mais adequada para execução dos tratamentos. Acredita o autor que um programa anual de pulverizações, compreendendo 6 (seis) tratamentos com intervalo médio de 15 dias, no intervalo compreendido entre a segunda quinzena de maio e a primeira de agosto, será provavelmente suficiente, podendo assegurar o lucro com pulverização eficiente.

O controle químico da **podridão parda**, através de pulverizações com fungicidas, diminui o potencial de esporos de *Phytophthora*. Isto ocorre porque se considera que a prática da remoção dos frutos infectados nas árvores tem destaque especial como fator decisivo na eficiência do controle químico (HISLOP & PARK, 1962).

MEDEIROS & ROCHA (1969) pesquisaram o iodo como fungicida e concluíram que este apresenta ação fungicida sobre a germinação indireta de *Phytophthora*, similar à do sulfato de cobre e superior à do fenol. Concluíram também que a toxicidade do iodo ao micélio vegetativo do fungo está em função da concentração da solução, e a do sulfato de cobre em função do tempo de contato. A avaliação do efeito tóxico de produtos químicos ao *Phytophthora*, através da germina-

ção indireta dos zoosporângios, é rápida e eficiente.

Na Jamaica, foram realizadas experiências visando a redução da perda do cacau devido à **podridão parda**. Todas as plantas foram fertilizadas e controladas, usando fungicida à base de cobre como Kocide e Cupravit, assim como também os fungicidas Duter e New Blitane. Em relação ao custo econômico, foi demonstrado que é mais que justificável qualquer custo, tendo como finalidade o controle da **podridão parda**. (NAYLOR, 1969).

Para um bom controle da doença e aumento da produção, foram utilizados, na América Latina, alguns fungicidas orgânicos contendo zinco. Na Sumatra, alguns pesquisadores realizaram ensaios para controlar a **podridão parda**, usando fungicida à base de zinco e concluíram que este pode ser usado em lugar do fungicida à base de cobre para o controle da enfermidade (PURBA & HUTAURUK, 1972).

MANÇO (1973) comentou que, com base em várias experiências, a aplicação de fungicidas à base de óxido cuproso na dosagem de 3% em janeiro, maio e junho e a 4% em fevereiro, março e abril, pode fornecer bons resultados no controle da **podridão parda**.

Segundo RAM & RAM (1973), trinta e um fungicidas de vários grupos químicos, inclusive nove formulações sistêmicas, foram ensaiadas contra o *Phytophthora* a diferentes concentrações em meios líquidos e sólidos. Os fungicidas, em geral, foram mais eficazes em meio líquido.

RAMOS & MEDEIROS (1977) pesquisaram sobre a proteção e erradicação da **podridão parda** do cacaueiro usando o Actidione e concluíram que a imersão, durante um minuto, na solução de Actidione a 1%, inibe totalmente o desenvolvimento da lesão, sem contudo afetar o poder germinativo das sementes.

FIGUEIREDO & LELLIS (1981), pesquisando sobre a ação de novas formulações de fungicidas à base de cobre, concluíram que Kauritol, Duriac e Coprantol 300 FW foram tão eficientes quanto o Cobre Sandoz no controle da **podridão parda**.

CAMPÊLO et alii (1984) estudaram o comportamento, "in vitro", de *P. capsici*, *P. palmivora* e *P. citrophthora* em relação a fungicidas. O *P. capsici* e o *P. citrophthora* tiveram inibição em 100% do seu crescimento micelial, na presença de Ridomil e Curzate CC. Em relação ao *P. palmivora*, utilizando uma maior concentração desses produtos, os resultados foram semelhantes. Outros produtos foram testados e observou-se que a predominância de *P. capsici*, na região caqueira da Bahia, não é devida à sua menor sensibilidade aos fungicidas utilizados no combate à **podridão parda**.

2.6. Controle biológico de *Phytophthora*

O controle biológico vem sendo estudado, envolvendo fungos e adtinomicetos antagônicos "in vitro", e os resultados visam bom retorno em produção com mínimo efeito colateral.

MATTA (1957), pesquisando alguns fungos antagônicos ao *P. palmívora*, constatou a ação inibidora de *Aspergillus tamaritii*, indicando a sua utilização como alternativa para o controle químico.

Aspergillus carbonarium e *A. ruber* foram testados por MEDEIROS (1964), e, aparentemente, produzem substâncias antibióticas ao *P. palmívora*.

MARAVALHAS (1965), utilizando técnicas cromatográficas, estudou diversas variedades de cacau, inclusive o "Catongo", e não encontrou a presença do ácido clorogênico (substância que aparentemente participa do mecanismo da resistência à enfermidade em outras espécies vegetais) em nenhuma das variedades estudadas.

JIMENEZ SÁENZ & ROCHA (1969) observaram que, nos tecidos de cacau susceptíveis, o *P. palmívora* destrói as substâncias que absorvem no espectro compreendido entre 250 e 360 μm . A acentuada diferença entre tecidos susceptíveis e resistentes indica a possibilidade de se desenvolver um método colorimétrico simples e eficiente para selecionar plantas jovens de cacau resistentes ao referido patógeno.

FIGUEIREDO et alii (1975), pulverizando os frutos de cacau com um filtrado parcialmente purificado de cultivo do fungo *A. tamaritii*, conseguiram impedir o desenvolvimento de lesões da **podridão parda**.

Foi realizada uma seleção, em áreas de cacau, de fungos antagônicos ao *Phytophthora*, pela coleta de espo-

ros dispersos no ar, e concluiu-se pela ocorrência normal de fungos antagônicos em cacauais, possibilitando futuramente o desenvolvimento de um controle biológico para total erradicação da **podridão parda** (FIGUEIREDO & MEDEIROS, 1977).

De acordo com LAWRENCE (1978), foi feita uma avaliação de 51 (cinquenta e um) cultivares de cacau, usando inoculação pontual com suspensão de zoósporos em frutos não destacados e sem ferimentos, e apenas 9 (nove) cultivares apresentaram grau de resistência ao *P. palmivora*.

FIGUEIREDO & ALMEIDA (1980) observaram os efeitos antagônicos de *Aspergillus* sp., *A. terreus*, *A. giganteus*, *Penicillium* sp. e *Eurotium* sp. sobre *P. capsici* inoculando, em frutos de cacau comum, culturas puras de *P. capsici* e esporos dos fungos em estudo. Após cinco dias de incubação, observou-se o aparecimento de lesões apenas nos frutos inoculados com culturas puras de *P. capsici*. Com relação ao efeito fungicida e fungistático de substâncias produzidas por estes fungos sobre o *P. capsici* apenas *Aspergillus* sp., *A. giganteus* e *A. terreus* apresentaram ação fungitóxica: *Penicillium* spp. e *Eurotium* sp. tiveram ação fungistática.

FIGUEIREDO & MEDEIROS (1981), pesquisando uma série de fungos antagônicos ao *Phytophthora*, isolados a partir de esporos dispersos no ar das plantações de cacau, observaram níveis elevados de antagonismos em *A. giganteus* Wehmer (80% de inibição). *A. tamaritii* Kita (63%) e *Penicillium purpurescens* Sopp (60%), podendo ser utilizados para o controle biológico da **podridão parda**.

BASTOS & FIGUEIREDO (1983) verificaram os efeitos do filtrado de cultura do *Cladobotryum amazonense* sobre o *P. palmivora*, *P. capsici* e *P. citrophthora*, que apresentou acentuado efeito tóxico às três espécies de *Phytophthora*, pois inibiu tanto o crescimento micelial "in vitro" como a capacidade de produzir lesões "in vivo".

BASTOS et alii (1986), isolaram do filtrado de cultura do fungo *C. amazonense*, um antibiótico antifúngico que mostrou, em testes realizados "in vitro", um efeito inibitório sobre o crescimento micelial de *Crinepellis perniciososa* (Stahel Singer) e *P. palmivora*. Também, o composto foi acentuadamente tóxico aos basiodiósporos de *C. perniciososa* e esporângios de *P. palmivora*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material biológico

3.1.1. Microrganismos

Cultura de levedura (*C. parapsilosis* var. *intermedia* IZ-A7), procedente do Instituto Zimotécnico "Prof. Jayme Rocha de Almeida" da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"; *P. capsici* do Instituto Biológico de São Paulo e *P. capsici* e *P. palmivora* da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC).

3.1.2. Substrato natural

"Goga" de cacau temporão, proveniente da Fazenda Divisão, localizada em Serradas, município de Itabuna-BA, e "goga" de cacau da safra/87, proveniente da Fazenda Serra Verde, localizada em Palmira, município de Jussari-BA, remetidas ao laboratório do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, sob refrigeração.

3.2. Meios de cultura

Foram utilizados os meios de cultura: malte, Sabouraud líquido, ágar-Sabouraud, batata-dextrose-ágar (BDA) e ágar-"goga" de cacau, descritos a seguir:

3.2.1. Meio de malte

Este meio foi utilizado para manutenção da cultura de *C. parapsilosis* var. *intermedia*.

3.2.1.1. Composição e preparo do meio

Extrato de malte	25 g
Ágar	17 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

O extrato de malte foi autoclavado com 500 ml de água destilada a 120°C, por 20 minutos, e o ágar autoclavado com o volume restante de água destilada a 120°C, por 20 minutos. Posteriormente, o meio foi preparado, misturando-se, assépticamente, o extrato de malte com o ágar. O meio em volume de 3 ml, foi distribuído em tubos de 16 x 160mm esterilizados, deixando-se solidificar em posição inclinada, onde se realizou o controle de esterilidade.

3.2.1.2. Inoculação e incubação

C. parapsilosis var. *intermedia* foi semeada

com agulha de platina, em toda a superfície do meio. Foi incubado em temperatura ambiente, sendo mantida a cultura através de transferências sucessivas a cada 5 meses.

3.2.2. Sabouraud líquido

Meio utilizado para a produção de massa celular, tanto de *C. parapsilosis* var. *intermedia*, como das leveduras naturais que contaminam a "goga" de cacau.

3.2.2.1. Composição e preparo do meio

Dextrose	40 g
Peptona	10 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Após o preparo, a solução foi autoclavada a 120°C, por 20 minutos. O meio foi distribuído assépticamente em alíquotas de 250 ml e acondicionadas em balão de fundo chato de 500 ml previamente esterilizados.

3.2.2.2. Inoculação e incubação

O inóculo de *C. parapsilosis* var. *intermedia* foi preparado em 3 etapas, por 6 (seis) dias e, finalmente, se acrescentou, em cada ensaio, concentrações variáveis de "goga" de cacau temporão (10, 20 e 40%). A incubação foi feita à temperatura ambiente, medindo-se a concentração de células

las, diariamente, em espectrofotômetro a 450 nm.

O crescimento de *C. parapsilosis* var. *intermedia* foi realizado em meio Sabouraud líquido com 100% da concentração em "goga" de cacau autoclavada, variando-se as condições de incubação: fase estacionária a temperatura ambiente, com agitação periódica a 28°C e com agitação constante (80 rpm) a 28° - 30°C.

3.2.3. Ágar-Sabouraud

Utilizado para o preparo das placas onde foram realizados os ensaios de crescimento de *P. capsici* e de *P. palmívora*.

3.2.3.1. Composição e preparo do meio

Dextrose	40 g
Peptona	10 g
Ágar	15 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

A solução foi aquecida até completa dissolução dos componentes e, posteriormente, foi autoclavada a 120°C, durante 20 minutos.

3.2.3.2. Inoculação e incubação

No meio distribuído em placas, contendo 10, 20

e 40% de "goga" de cacau autoclavada, foi inoculado o *P. capsici* e o *P. palmívora* a temperatura ambiente.

3.2.4. Meio de BDA

Este meio foi utilizado para manutenção dos fungos e para o preparo de placas, onde foram realizados o crescimento de *P. capsici* e *P. palmívora* e, posteriormente, os testes de inibição do crescimento de *P. capsici*.

3.2.4.1. Composição e preparo do meio

Batata inglesa	200 g
Dextrose	20 g
Ágar	17 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

A batata descascada e fragmentada foi fervida com água destilada por 15 minutos. Após a fervura, foi filtrada em gaze ou algodão e, ao filtrado, adicionou-se a dextrose e o ágar, completando o volume para 1000 ml com água destilada. A mistura, depois de totalmente dissolvida, foi autoclavada a 120°C, durante 20 minutos. Uma porção do meio foi distribuída em placas e porções de 3 ml foram distribuídas em tubos para a manutenção das culturas.

3.2.4.2. Inoculação e incubação

Nas placas contendo o meio a 10, 20 e 40% de

"goga" de cacau autoclavada, foi inoculado o *P. capsici* e o *P. palmivora* a temperatura ambiente.

Nos tubos com BDA, os fungos foram repicados, incubados à temperatura ambiente e, a cada 30 dias, novas transferências foram realizadas para manutenção da cultura.

3.2.5. Ágar-"goga" de cacau

Este meio foi utilizado para testar o crescimento dos fungos (ARAÚJO et alii, 1975).

3.2.5.1. Composição e preparo do meio

Mel de cacau	50 ml
Ágar	10 g
Água destilada q.s.p.	500 ml

A "goga" de cacau foi autoclavada a 120°C durante 20 minutos e através de teste de esterilidade, a "goga" de cacau foi considerada isenta de microrganismos, sendo identificado como "goga" de cacau autoclavada. O ágar dissolvido em água destilada foi autoclavado a 120°C por 20 minutos. Adicionou-se a "goga" de cacau ao ágar, sob condições assépticas. O pH final da "goga" de cacau autoclavada foi aproximadamente 3,0.

O meio foi distribuído em volumes de 10 ml em placas de Petri.

Na "goga" de cacau proveniente da Fazenda Serra Verde, foram feitos testes de esterilidade e observou-se a presença de leveduras. Este material foi refrigerado, preservando-se a população de leveduras, sendo utilizado como material contendo leveduras naturais.

3.2.5.2. Inoculação e incubação

Nas placas contendo este meio, inoculou-se o *P. capsici* e o *P. palmivora* onde se observou o crescimento do fungo durante 5 (cinco) dias consecutivos, em temperatura ambiente.

3.3. Estudo comparativo do crescimento dos fungos nos meios Sabouraud e BDA

Estes testes foram realizados inoculando o *P. capsici* e o *P. palmivora* em placas, contendo meio sólido de Sabouraud e de BDA com 10, 20 e 40% da concentração em "goga" de cacau, além de ágar-"goga" de cacau a 100%.

3.4. Massa de leveduras

A massa de células de *C. parapsilosis* var. *intermedia* e das leveduras naturais, proveniente da "goga"

de cacau, foi separada do meio fermentado (Sabouraud líquido) por centrifugação a 1000xg. O sobrenadante foi utilizado nos experimentos de inibição do crescimento de *P. capsici*. A massa de célula foi lavada com solução salina na proporção de volume de 1:1, até a eliminação total do meio fermentado, através de centrifugações sucessivas.

Para romper a massa de células das leveduras, empregou-se areia tamizada a 250 mesh, previamente tratada com HCl 2 N, por 24 horas, e, após esse período, o ácido foi totalmente esgotado até pH 7,0. Adicionou-se então NaOH 2N por 24 horas e o hidróxido foi totalmente esgotado com água destilada até pH final igual a 7,0. As células foram rompidas em gral. de porcelana com pistilo, sob refrigeração (-6°C), com uma relação de células cultivadas/areia de 1:1 até se obter uma massa pastosa de pH próximo de 6,0. A areia foi separada da célula rompida por centrifugação a 200xg.

O sobrenadante total foi centrifugado a 300xg. O sedimento, contendo os restos celulares, foi lavado duas vezes com solução salina, numa relação de volume 1:1, para eliminação total do sobrenadante que contém a fração subcelular. Os restos celulares foram separados da solução salina por centrifugação a 3000xg.

Todas as frações obtidas foram autoclavadas a 120°C por 20 minutos, sendo realizados os testes de inibição do crescimento de *P. capsici* em cada uma dessas frações (Figuras 1 e 2).

Figura 1. Fluxograma do procedimento seguido para se testar a inibição do crescimento de *P. capsici* com líquido fermentado, célula rompi da e fração subcelular proveniente do crescimento de *C. parapsilosis* var. *intermedia* em Sabouraud líquido.

Figura 2. Fluxograma do procedimento seguido para se testar a inibição do crescimento de *P. capsici* com líquido fermentado, célula rompida e fração subcelular proveniente do crescimento de leveduras naturais em Sabouraud líquido.

3.5. Testes de inibição do crescimento de *P. capsici*

C. parapsilosis var. *intermedia* e leveduras naturais contida na "goga" de cacau (safra/87) foram cultivadas em 16 balões distintos, contendo 250 ml do meio Sabouraud líquido a 37°C em aerobiose. Cada balão contendo os diferentes cultivos, foi analisado, variando o tempo de crescimento da massa da levedura às 6; 12, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas consecutivas de fermentação. Em cada meio fermentado, determinou-se o pH por potenciometria. Os testes de inibição do crescimento de *P. capsici* foi realizado em placas, contendo o meio BDA, as quais foram adicionadas diferentes concentrações do meio fermentado (1:10; 1:5 e 1:20; 1:10) para *C. parapsilosis* var. *intermedia* e para as lavouras naturais da "goga" de cacau respectivamente, e de fração subcelular (1:10), inoculando o *P. capsici*. Aos restos celulares obtidos dos diferentes cultivos, foi adicionado 3 ml de água destilada estéril, retirando alíquotas transferidas para as placas do meio BDA na proporção de 1:10, onde se inoculou o *P. capsici*. O inóculo foi obtido de placas contendo meio BDA, onde o fungo foi subcultivado, partindo-se da cultura pura obtida do Instituto Biológico de São Paulo.

O crescimento do fungo foi observado durante 5 (cinco) dias sucessivos, em temperatura ambiente.

Em placas controle com o meio BDA puro, foram considerados os crescimentos de *P. capsici* de 100%.

O crescimento do fungo foi determinado, utilizando-se o halo de crescimento nas respectivas placas (área do círculo), sendo registrada a média dos valores de crescimento normal e seu respectivo desvio padrão.

3.6. Determinação da concentração em proteínas nas células cultivadas

C. parapsilosis var. *intermedia* e leveduras naturais contidas na "goga" de cacau, foram cultivadas em meio Sabouraud líquido em temperatura ambiente. O tempo de crescimento da massa celular foi interrompido nos intervalos de 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas.

O teor de nitrogênio total foi avaliado pelo método de Micro Kjeldahl nos intervalos de 0, 6, 12, 24 e 48 horas, em alíquotas previamente separadas. Nos intervalos de 72 a 144 horas, a concentração de nitrogênio total foi realizada conjuntamente em alíquotas retiradas desses intervalos, constituindo portanto um "pool" de toda a massa celular cultivada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAMPÊLO & LUZ (1981), em estudos realizados na CEPLAC concluíram que o *P. capsici* é responsável por, aproximadamente, 95% da **podridão parda** do cacau, o *P. palmivora* por cerca de 3% e o *P. citrophthora* por 2%. Levando-se em consideração este fato, todo o trabalho que estava sendo realizado com *P. palmivora* e com *P. capsici*, passou a ser realizado unicamente com este último, em amostra proveniente do Instituto Biológico de São Paulo.

4.1. Testes do crescimento de *P. capsici*

O crescimento do fungo foi avaliado em meio ágar-Sabouraud, Sabouraud-"goga" de cacau a 10%, Sabouraud-"goga" de cacau a 20% e Sabouraud-"goga" de cacau a 40%. Em meio Sabouraud-"goga" de cacau a 10%, o crescimento do fungo foi maior quando comparado no Sabouraud-"goga" de cacau a 20% e 40%, mas não foi superior ao meio ágar-Sabouraud, considerado como controle.

MEDEIROS (1965) observou que o meio de BDA também favorece o crescimento de *P. capsici*. Analisando os meios BDA (controle), BDA-"agar" de cacau a 10%, BDA-"goga" de cacau a 20% e BDA-"goga" de cacau a 40%, verificou-se que o meio de BDA, mesmo quando comparado ao meio ágar-Sabouraud, possui melhores condições para o crescimento de *P. capsici*.

Os testes de inibição de *P. capsici* foram realizados, utilizando placas com meio BDA puro (placas controle) e placas contendo meio BDA homogeneizado com meio fermentado, restos celulares e fração subcelular, tanto de *C. parapsilosis* var. *intermedia* como das leveduras naturais.

4.2. Produção de massa celular de *C. parapsilosis* var. *intermedia* e das leveduras naturais na "goga" de cacau

Para a produção da massa celular das leveduras, foi utilizado o meio líquido de Sabouraud, onde se observou que a quantidade de massa celular produzida pelas leveduras naturais foi bem maior que a de *C. parapsilosis* var. *intermedia*. O crescimento das leveduras foi analisado por espectrofotometria durante 6 (seis) dias consecutivos.

Quando as leveduras foram cultivadas em meio líquido de "goga" de cacau pura, o crescimento não foi significativo em comparação com o meio Sabouraud líquido. Em tem-

peratura de 37°C, o crescimento celular foi maior que em temperatura ambiente.

Como foi necessário obter grande concentração de células, as leveduras foram cultivadas em meio líquido de Sabouraud puro. A *C. parapsilosis* var. *intermedia* e as leveduras naturais, assim cultivadas, foram utilizadas para se tentar isolar e identificar o fator de inibição que atua sobre o *P. capsici*.

Tanto o crescimento de *C. parapsilosis* var. *intermedia* como o das leveduras naturais foi realizado simultaneamente, nas mesmas condições de incubação. Em tempos pré-determinados, se retirou amostras de *C. parapsilosis* var. *intermedia* e das leveduras naturais. Nesse material, depois de separadas as células do meio fermentado, se determinou por potenciometria o pH desse último. Pela Tabela 1, observou-se que, com o aumento do tempo de fermentação, há um decréscimo de pH, isto devido a liberação para o meio de catabólitos ácidos, sendo possível que, dentre esses, possa estar o fator de inibição do crescimento de *P. capsici* (Figura 3). Observando-se a diferença entre as curvas de pH de *C. parapsilosis* var. *intermedia* e das leveduras naturais da "goga" de cacau verifica-se na última, inflexão de valores de pH, fato que poderia ser decorrente da variação de comportamento das espécies a diferentes pH. Assim, enquanto uma população se reduz a uma dada condição, outra passaria a predominar e produzir produtos entre os quais poderia estar o fator de ini-

bição. Essa variação de população em bactérias lácticas foi relatado em fermentação de malte por BRYAN-JONES (1975). Aliás, fato semelhante justificaria plenamente o alto poder de inibição do fermentado de leveduras naturais após 144 horas de fermentação, quando a substância inibidora estaria cumulativamente em sua mais alta concentração, como será comentado a seguir.

Tabela 1. pH do meio fermentado por *C. parapsilosis* *intermedia* e por leveduras naturais da "goga" de cacau.

Tempo de fermentação (horas)	0	6	12	24	48	72	96	120	144
	pH								
Microrganismos									
<i>C. parapsilosis</i>									
var. <i>intermedia</i>	5,3	4,9	4,9	4,4	3,8	3,6	3,4	3,3	3,3
Leveduras naturais	5,3	4,1	4,1	4,1	4,0	3,6	3,8	3,7	3,4

4.3. Testes de inibição do crescimento de *P. capsici*

Esses testes foram realizados com *C. parapsi*
losis var. *intermedia* e leveduras naturais, retirando-se amos

Figura 3. pH do meio fermentado, proveniente da fermentação de *C. parapsilosis* var. *intermedia* (▲—▲) e de leveduras naturais da "goga" de cacau (●—●). O tempo de fermentação indicado corresponde ao período de crescimento das leveduras em Sabouraud líquido.

tras, onde se variou o tempo de crescimento das leveduras con-
sideradas. Dessas amostras, foram separados o meio fermentado,
os restos celulares e a fração subcelular. O crescimento de *P. capsici* foi observado durante 5 (cinco) dias consecutivos a temperatura ambiente.

Quando se estudou o meio fermentado em que foi cultivada *C. parapsilosis* var. *intermedia*, pôde-se verificar que esse fator de inibição do crescimento de *P. capsici* é liberado, pois se observou uma inibição do crescimento do fungo de até 37% nas 48 horas de fermentação. Em placas contendo meio BDA homogeneizado com meio fermentado 1:10, autoclavado a 120°C durante 20 minutos (Tabela 2) verificou-se que há um aumento gradativo da inibição do crescimento de *P. capsici*, em função do tempo, até 48 horas de cultivo de *C. parapsilosis* var. *intermedia*. Já nas 72 horas de fermentação, o desenvolvimento é praticamente igual ao controle, pois inibe 10% do crescimento do fungo, mas, nos tempos de 96, 120 e 144 horas de fermentação, a inibição do crescimento do fungo passa a ser de aproximadamente 44%, devido, possivelmente, a liberação de catabólitos ácidos. Em relação às placas contendo meio BDA homogeneizado com meio fermentado 1:5, autoclavado a 120°C durante 20 minutos (Tabela 2), verificou-se o mesmo comportamento que o anterior: a inibição do crescimento do fungo aumentou até 48 horas de fermentação num máximo de 45%, quando comparado com as placas-controle. Nas 72 horas de fermentação, não se observou praticamente inibi-

Tabela 2. Percentual relativo de inibição do crescimento durante cinco dias consecutivos, de *P. capsici* em meio BDA homogeneizado com meio fermentado (1:10 e 1:5), autoclavado a 120°C durante 20 minutos, proveniente do crescimento de *C. parapsilosis* var. *intermedia* em meio Sabouraud líquido. Valores calculados em relação às placas-controle, considerando o crescimento de *P. capsici* de 100%.

Concentração		1:10					1:5				
Horas	Dias	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
6		22	15	17	16	17	28	25	27	26	30
12		33	20	19	23	22	46	30	38	18	16
24		28	14	13	16	19	51	39	32	31	32
48		41	37	38	33	34	51	46	46	41	42
72		22	11	09	06	02	23	03	04	04	08
96		37	42	47	44	41	54	55	54	55	54
120		41	48	48	38	38	51	59	63	57	55
144		59	50	45	39	40	53	58	61	57	56

ção do crescimento do fungo, chegando a ser de 8% quando comparado com as placas-controle. Mas nas 96, 120 e 144 horas, a inibição do crescimento do fungo chegou a ser de, aproximadadamente, 56%, possivelmente devido a eliminação de catabólitos ácidos (Figuras 4, 5, 6, 7 e 8).

Quando se estuda o meio fermentado onde foram cultivadas as leveduras naturais da "goga" de cacau esse comportamento não foi observado, visto que, a inibição do crescimento de *P. capsici* foi de 26% em relação às primeiras 12 horas, enquanto o crescimento médio do fungo nas próximas 48 horas foi de 83%. Após 72 horas, se observou que há uma inibição do crescimento do fungo de aproximadamente 40%, sendo crescente até chegar 144 horas, atingindo cerca de 79% quando se trabalhou com meio BDA homogeneizado com meio líquido fermentado (1:20), autoclavado a 120°C durante 20 minutos (Tabela 3). Com meio BDA-líquido fermentado (1:10), autoclavado a 120°C durante 20 minutos (Tabela 3), observa-se uma inibição do crescimento de *P. capsici* de 33% até 48 horas de fermentação, onde se concluiu que a inibição do crescimento do fungo foi maior com o aumento do tempo de fermentação pela ação das leveduras naturais. Após as 72 horas, se observou que a inibição do crescimento de *P. capsici* foi de aproximadamente 37%, crescendo até às 144 horas quando chegou a 100% (Figuras 9, 10, 11, 12 e 13).

Figura 4. Resultado de 24 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:10 e 1:5); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido pela *C. parapsilosis* var. *intermedia*. Nas placas-controladas (BDA puro), o crescimento de *P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período do crescimento de *C. parapsilosis* var. *intermedia* em meio Sabouraud líquido.

Figura 5. Resultado de 48 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:10 e 1:5); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido pela *C. parapsilosis* var. *intermedia*. Nas placas-controle (BDA puro), o crescimento de *P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período do crescimento de *C. parapsilosis* var. *intermedia* em meio Sabouraud líquido.

Figura 6. Resultado de 72 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:10 e 1:5); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido pela *C. parapsilosis* var. *intermedia*. Nas placas-controle (BDA puro), o crescimento de *P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período do crescimento de *C. parapsilosis* var. *intermedia* em meio Sabouraud líquido.

Figura 7. Resultado de 96 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:10 e 1:5); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido pela *C. parapsilosis* var. *intermedia*. Nas placas-controle (BDA puro), o crescimento de *P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período do crescimento de *C. parapsilosis* var. *intermedia* em meio de Sabouraud líquido.

Figura 8. Resultado de 120 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:10 e 1:5); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido pela *C. parapsilosis* var. *intermedia*. Nas placas - controle (BDA puro), o crescimento de *P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período do crescimento de *C. parapsilosis* var. *intermedia* em meio Sabouraud líquido.

Tabela 3. Percentual relativo de inibição do crescimento durante cinco dias consecutivos, de *P. capsici* em meio BDA homogeneizado com meio fermentado (1:20 e 1:10), autoclavado a 120°C durante 20 minutos, provenientes do crescimento das leveduras naturais da "goga" de cacau em meio Sabouraud líquido. Valores calculados em relação às placas-controle, considerando o crescimento de *P. capsici* de 100%.

Concentração		1:20					1:10				
Horas	Dias	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
6		09	11	16	13	16	29	35	27	25	23
12		39	29	21	20	21	28	27	27	27	29
24		20	15	15	13	17	30	32	33	34	36
48		19	15	15	17	19	28	36	33	32	35
72		28	22	25	20	19	60	47	41	34	33
96		27	27	25	19	19	35	34	38	34	35
120		07	15	27	16	19	41	40	40	35	34
144		100	83	77	71	66	100	100	100	100	100

Figura 9. Resultado de 24 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:20 e 1:10); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido pelas leveduras naturais da "goga" de cacau. Nas placas-contrôle (BDA puro), o crescimento de *P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período do crescimento das leveduras naturais da "goga" de cacau em meio Sabouraud líquido.

Figura 10. Resultado de 48 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:20 e 1:10); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido pelas leveduras naturais da "goga" de cacau. Nas placas-controle (BDA puro), o crescimento de *P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período de crescimento das leveduras naturais da "goga" de cacau em meio Sabouraud líquido.

Figura 11. Resultado de 72 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:20 e 1:10); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido pelas leveduras naturais da "goga" de cacau. Nas placas - controle (BDA puro), o crescimento de *P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período de crescimento das leveduras naturais da "goga" de cacau em meio Sabouraud líquido.

Figura 12. Resultado de 96 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:20 e 1:10); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação do meio Sabouraud líquido pelas leveduras naturais da "goga" de cacau. Nas placas-controle (PDA puro), o crescimento de *P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavadas a 120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período de crescimento das leveduras naturais da "goga" de cacau em meio Sabouraud líquido.

Figura 13. Resultado de 120 horas do crescimento de *P. capsici* em placas de meio BDA contendo meio fermentado (1:20 e 1:10); restos celulares (1:10) e fração subcelular (1:10) proveniente da fermentação de meio Sabouraud líquido pelas leveduras naturais da "goga" de cacau. Nas placas-controle (BDA puro), o crescimento de *P. capsici* foi considerado de 100%. O meio fermentado, os restos celulares e a fração subcelular foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos. O tempo de fermentação indicado corresponde ao período do crescimento das leveduras naturais da "goga" de cacau em meio Sabouraud líquido.

Em relação aos restos celulares da *C. parapsilosis* var. *intermedia* (Tabela 4), pôde-se observar que a inibição de *P. capsici* foi de, aproximadamente, 13% durante as 12 horas de cultivo e que este fator foi ainda perceptível até as 48 horas de fermentação. Após esse tempo, no intervalo das 72 até as 144 horas de fermentação, a inibição não foi praticamente observada. Esse fator, assim produzido, deve ter sido transferido para meio fermentado, visto que, no final da fermentação, atingiu 100% de sua atividade original, quando comparado com as placas-controle (Figuras 4, 5, 6, 7 e 8).

O fator de inibição do crescimento de *P. capsici* também pôde ser observado em baixa concentração nos restos celulares das leveduras naturais da "goga" de cacau (Tabela 5), pois houve um aumento da liberação desse fator nas primeiras 48 horas de fermentação e, após esse período, ocorreu uma diminuição da inibição do crescimento do fungo, sendo esta praticamente inexistente no decorrer da fermentação (Figuras 9, 10, 11, 12 e 13).

Após a centrifugação, o sobrenadante que continha mitocôndrias, microssomas e fração solúvel foi separado e testada a sua ação sobre o *P. capsici*. Observou-se que a fração subcelular de *C. parapsilosis* var. *intermedia* (Tabela 6), apresentava um máximo de inibição de 19% nas primeiras 12 horas de fermentação; após esse período, verificou-se uma diminuição da inibição do crescimento de *P. capsici*,

Tabela 4. Percentual relativo de inibição do crescimento durante cinco dias consecutivos de *P. capsici* em meio BDA homogeneizado com restos celulares (1:10), autoclavado a 120°C durante 20 minutos, proveniente do crescimento de *C. parapsilosis* var. *intermedia* em meio Sabouraud líquido. Valores calculados em relação à placa-controle, considerando o crescimento de *P. capsici* de 100%.

Horas \ Dias					
	1	2	3	4	5
6	21	07	07	03	07*
12	28	16	11	10	00*
24	06*	04*	01*	00*	00*
48	21	06	07	03	07
72	12	05	02	00	00
96	11	00	00	00	00
120	09	03	00	00	00
144	01	00	01	00	00

* Resultados da inibição do crescimento de *P. capsici* em meio BDA com 10% da concentração de "goga" de cacau autoclavada.

Tabela 5. Percentual relativo de inibição do crescimento durante cinco dias consecutivos, de *P. capsici* em meio BDA homogeneizado com restos celulares (1:10), autoclavado a 120°C durante 20 minutos, proveniente do crescimento das leveduras naturais da "goga" de cacau em meio Sabouraud líquido. Valores calculados em relação às placas-controle, considerando o crescimento de *P. capsici* de 100%.

Horas \ Dias					
	1	2	3	4	5
6	05*	00*	00*	00*	00*
12	19	03	06	01	00
24	38	12	12	06	06
48	21	19	22	15	12
72	01	00	00	00	00
96	00	00	00	00	00
120	00	00	00	00	00
144	12	02	02	01	00

* Resultados da inibição do crescimento de *P. capsici* em BDA com 10% da concentração de "goga" de cacau autoclavada.

Tabela 6. Percentual relativo de inibição do crescimento durante cinco dias consecutivos, de *P. capsici* em meio BDA homogeneizado com fração subcelular (1:10), autoclavada a 120°C durante 20 minutos, proveniente do crescimento de *C. parapsilosis* var. *intermedia* em meio Sabouraud líquido. Valores calculados em relação às placas-controle, considerando o crescimento de *P. capsici* de 100%.

Horas \ Dias	1	2	3	4	5
6	16*	16*	24*	09*	15*
12	36	21	16	11	12
24	07	28	08	09	09
48	07	08	09	08	08
72	03	06	-	-	-
96	10	13	09	05	03
120	08	10	05	03	04
144	01	02	01	01	00

* Resultados da inibição do crescimento de *P. capsici* em meio BDA com 10% da concentração de "goga" de cacau autoclavada.

isto porque esse fator de inibição parece ter sido levado ao meio de fermentação junto com catabólitos ácidos tendo em vista a queda de pH do meio fermentado (Figura 3). Após esse período, entre 24 e 144 horas de fermentação, não se observou praticamente, inibição do crescimento de *P. capsici*, pois notou-se um crescimento praticamente igual àquele encontrado nas placas-controle (Figuras 4, 5, 6, 7 e 8).

Em relação a fração subcelular das leveduras naturais da "goga" de cacau, a sua capacidade de inibir o crescimento de *P. capsici* ficou bem evidenciada nas 6 horas de fermentação, decrescendo desde então. Os pequenos incrementos verificados até 144 horas de fermentação podem não ser significativos (Tabela 7 e Figuras 9, 10, 11, 12 e 13).

4.4. Determinação da concentração de proteínas nas células cultivadas

A determinação da concentração de proteínas pode ser observada na Tabela 8, onde se registrou um aumento da concentração de proteínas em função do tempo de fermentação realizado.

Convém ressaltar que esses resultados foram obtidos com diferentes concentrações de proteínas, pois, com a *C. parapsilosis* var. *intermedia* se observou um teor de nitrogênio menor do que o encontrado com as leveduras naturais da "goga" de cacau.

Tabela 7. Percentual relativo de inibição do crescimento durante cinco dias consecutivos, de *P. capsici* em meio BDA homogeneizado com fração subcelular (1:10), autoclavada a 120°C durante 20 minutos, proveniente do crescimento das leveduras naturais de "goga" de cacau em meio Sabouraud líquido. Valores calculados em relação às placas-controle, considerando o crescimento de *P. capsici* de 100%.

Horas \ Dias					
	1	2	3	4	5
6	29	12	11	01	00
12	13	08	07	05	05
24	00	02	02	01	01
48	08	09	08	09	09
72	19	00	00	00	00
96	11	07	05	03	04
120	12	04	00	00	00
144	12	02	00	01	00

Tabela 8. Determinação da concentração em proteínas nas amostras de *C. parapsilosis* var. *intermedia* e de leveduras naturais contidas na "goga" de cacau cultivadas em meio Sabouraud líquido em temperatura ambiente.

Tempo (horas)	<i>C. parapsilosis</i> var. <i>intermedia</i>	Leveduras naturais
	Proteína (mg %)	Proteína (mg %)
0	0,325	0,875
6	1,138	1,138
12	1,013	1,550
24	1,600	2,763
48	2,280	2,913

5. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos através do trabalho realizado com o cultivo de leveduras em meio Sabouraud líquido e através de testes de inibição do crescimento de *P. capsici* cultivados em meio BDA, pode-se destacar as seguintes conclusões:

1. O fator de inibição é liberado diretamente ao meio fermentado, tanto pela ação das leveduras naturais da "goga" de cacau como pela ação de *C. parapsilosis* var. *intermedia* e esse fator é termoestável.

2. O meio fermentado proveniente da ação de *C. parapsilosis* var. *intermedia*, apresenta poder de inibição de 17 e 27% nas primeiras 6 horas de fermentação atingindo 47 e 57% em 144 horas, nas concentrações de 1:10 e 1:5 de meio fermentado em meio BDA, sobre o crescimento de *P. capsici*.

3. O meio fermentado proveniente da ação das leveduras naturais da "goga" de cacau apresenta poder de ini

bição de 13 a 28% nas primeiras 6 horas de fermentação atingindo 79 e 100% em 144 horas, nas concentrações de 1:20 e 1:10 de meio fermentado em meio BDA, sobre o crescimento de *P. capsici*.

4. Os restos celulares e fração subcelular proveniente de *C. parapsilosis* var. *intermedia* e das leveduras naturais da "goga" de cacau apresentam baixo poder de inibição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEBAYO, A.A. Cocoa pod rot diseases assessment of crop losses. Turrialba II (CA) 30(1): 57-61, jan. 1980.
- ARAÚJO, D.F.; PAULO, L.A.; BORGES, M.F.G. Da introdução de "goga" (mel do cacau) no cultivo do fitopatogênico *Phytophthora palmívora* (Butl) Butl. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia VI, Salvador, p.218, 27-31 julho, 1975.
- BASTOS, C.N. & FIGUEIREDO, J.M. de. Efeitos do filtrado de *Cladobotryum amazonense* Bastos, Evans e Samson sobre três espécies de *Phytophthora* isolados do cacaueiro. Theobroma, Ilhéus, 13(2): 113-7, 1983.
- BASTOS, C.N.; NEILL, S.J.; HORGAN, R. Effect of *Cladobotryum* antibiotic on the major pathogens of cacao in Brazil. Theobroma, Ilhéus, 16(4): 213-221, 1986.
- BRYAN-JONES, G. Lactic Acid Bacteria in Distillery Fermentations. In: Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food. Academic Press, London, 165-176, 1975.
- CAMPÊLO, A.M.F.L. & MEDEIROS, A.G. Tipos morfológicos de *Phytophthora palmívora* no Brasil. Theobroma, Ilhéus, 10(3): 141-147, 1980.

- CAMPÊLO, A.M.F.L. & LUZ, E.D.M.N. Etiologia da **podridão par**
da do cacaueiro nos Estados da Bahia e Espírito Santo, Bra
sil. Theobroma, Ilhéus, 6: 313-321, outubro 1981.
- CAMPÊLO, A.M.F.L.; LUZ, E.D.M.N.; RESNIK, F.C.Z. de. **Podri**
dão parda do cacaueiro no Estado da Bahia, Brasil. 1 - Vi
rulência das espécies de *Phytophthora*. Theobroma, Ilhéus,
12(1): 1-6, 1982.
- CAMPÊLO, A.M.F.L.; LUZ, E.D.M.N.; BEZERRA, J.L.; PEREIRA, J.
L. Sensibilidade das espécies de *Phytophthora* a fungici
das "in vitro". Theobroma, Ilhéus, 14(2): 57-84, 1984.
- CHATT, E.M. **Cocoa**, cultivation processing analysis, New
York, Interscience Publishers, 1953. 302p.
- DANTAS, B. Estudos experimentais sobre a **podridão parda** na
região cacaueira da Bahia. Boletim da S.A.I.C., Pernam
buco, p.45-66, 1954.
- FIGUEIREDO, J.M. de; SANTOS, A.L.L.; BASTOS, C.N. Inibição
de *Phytophthora palmívora* (Butl) Butl, "in vivo" e "in
vitro" com princípio ativo de *Aspergillus tamaris* Kita,
parcialmente purificado. Boletim do Instituto Biológico
da Bahia, Salvador, 14(1): 36-43, 1975.
- FIGUEIREDO, J.M. de & MEDEIROS, A.G. Alguns fungos antagôni
cos a *Phytophthora palmívora* (Butl) Butl em plantações de
cacao. Fitopatologia Brasileira, 2: 75-6, fev. 1977.
- FIGUEIREDO, J.M. de & ALMEIDA, O.C. de. Controle Biológico
à *Phytophthora* spp. II - Efeito fungicida e fungistâti
co de substâncias produzidas por antagônicos à *Phytophthora*
capsici. In: CENTRO DE PESQUISA DO CACAU, Itabuna, Infor
Técnico, Ilhéus, CEPLAC, 1980. p.116-7.

FIGUEIREDO, J.M. de & LELIS, W.T. Controle da **podridão parda** do cacaueiro com novas formulações de fungicidas à base de cobre empregados a alto e baixo volume. Theobroma, Ilhéus, 11(1): 3-38, 1981.

FIGUEIREDO, J.M. de & MEDEIROS, A.G. Algunos hongos antagonicos a *Phytophthora palmivora* (Butl) Butl en plantaciones de cacao. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE INVESTIGACION EN CACAO, 6^a, CARACAS, 1977. Actas. Lagos, Cocoa Producers' Alliance, 1981. p.240-4.

HISLOP, E.C. & PARK, P.O. Studies on the chemical control of *Phytophthora palmivora* (Butl) Butl on *Theobroma cacao* L. in Nigéria. II. Persistence of fungicides on pods. Annals of Applied Biology, 50: 67-76, 1962.

JIMENEZ SAENZ, E. & ROCHA, H.M. Aplicabilidad del análisis espectrofotométrico de extractos de tejidos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el estudio de la resistencia a *Phytophthora palmivora* (Butl) Butl. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISAS EN CACAU, 2^a, Salvador /Itabuna, Bahia, 19-26 de novembro, 1967. Memórias. Ilhéus, CEPLAC, p.181-6, 1969.

LAWRENCE, J.S. Screening of cacao cultivares for resistance to *Phytophthora palmivora* in the collection at CATIE, Costa Rica. Theobroma, Ilhéus, 8: 125-131, 1978.

LELLIS, W.T. A temperatura como fator limitante da **podridão parda** dos frutos do cacaueiro. Boletim Técnico, Instituto de Cacau da Bahia, 14p., 1952.

LEONIAN, L.H. Physiological studies on the genus *Phytophthora*. Amer. J. Bot., 12(7): 444-98, 1925.

- LUZ, E.D.M.N. & CAMPÊLO, A.M.F.L. Temperatura, fator preponderante no equilíbrio populacional das espécies de *Phytophthora* que causam **podridão parda** do cacaueiro na Bahia - Brasil. Theobroma, Ilhéus, 13(4): 361-75, 1983.
- LUZ, E.D.M.N. & CAMPÊLO, A.M.F.L. Dinâmica populacional de três espécies de *Phytophthora* na região cacaueira da Bahia. Theobroma, Ilhéus, 10: 9-16, fevereiro, 1985.
- MANÇO, G.R. Considerações gerais sobre as enfermidades do cacaueiro na Amazônia. Theobroma, Ilhéus, 3(1): 3-13, jan-mar., 1973.
- MARAVALHAS, N. Aspectos bioquímicos da resistência do cacau Catongo à **podridão parda**. Relatório Anual, 1964. p.54, 1965. Apud Cacau Atualidades, Ilhéus, 2(4): 52, jul.-ago., 1965. (Resumo).
- MATTA, E.A.F. Inibição de *Phytophthora palmívora* (Butl) Butl, por uma cepa de *Aspergillus tamarii* Kita "in vivo". Boletim do Instituto Biológico da Bahia, Salvador, 4(1): 6-11, 1957.
- MEDEIROS, A.G. Combate à **podridão parda** mediante o emprego de antibióticos. Informe Técnico, Ilhéus, p.31, 1964.
- MEDEIROS, A.G. Método para estimular a esporulação do *Phytophthora palmívora* (Butl) Butl em placas de Petri. In: COLÓQUIO BRASILEIRO DE MICOLOBIA E REUNIÃO NACIONAL DE PROFESSORES DE FITOPATOLOGIA, 1ª, RECIFE, Abril, 1964, Phyton. F.N.G.B.N., Argentine, 22(1): 73-7, março, 1965.

- MEDEIROS, A.G. & ALVIM, P. de T. Influência do gás carbônico e da umidade do ar na esporulação do *Phytophthora palmivora* (Butl) Butl. R. Interam. Ci. Agric., Turrialba, 17(1): 18-22, jan-mar, 1967.
- MEDEIROS, A.G. & ROCHA, H.M. Ação tóxica do iodo à *Phytophthora palmivora* (Butl) Butl. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISAS EM CACAU, 2ª, Salvador/Itabuna, Bahia, 19-26 de novembro, 1967. Memórias. Ilhéus, CEPLAC, 1969. p.229-32.
- MEIFFREN, M. & TANGUY, J. Sur le rôle des composés phénoliques au cours de l'infection des cabosses de *Theobroma cacao* L. par *Phytophthora palmivora* (Butl) Butl. Café, Cacao, Thé, Paris, 11(4): 337-42, oct-dec. 1967.
- NAYLOR, A.G. Cacao black pod disease control in Jamaica, Farmer, Jamaica, 74(4): 124-5, 127-8, 1969.
- OLIVEIRA, M.L.C. de. Metabolismo da glicose pelo fitopatogênico do cacaueiro *Phytophthora palmivora* e ação do pentaclorofenol. Rio de Janeiro, 1971. 118p. (Mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- PURBA, D. & HUTAURUK, C. Preliminary observations on the effect of zinc fungicide against pot rot disease (*Phytophthora* spp) of cocoa plants and its relation to pod production. In: Cocoa and Coconuts in Malaysia, Kuala Lumpur, 25-7, p.58-63, november, 1972.
- RAM, C. & RAM, A. Virulence of some selected isolates of *Phytophthora palmivora* in cacao. Theobroma, Ilhéus, 3(3): 12-6, jul-set. 1973.

- RAMOS, V.L. & MEDEIROS, A.G. Ação protetiva e erradicante do actidione contra a **podridão parda** do cacaueiro. Cacau Atualidades, Ilhéus, 14(2): 8-10, abr-jun. 1977.
- ROCHA, H.M. A bibliographical survey of cocoa varieties resistant to black pod disease. Second session of FAO Technical Working Party on Cocoa Production and Protection, Italy, p.1-9, 19-23, setembro, 1966.
- ROCHA, H.M. & MACHADO, A.D. Influência da luz, temperatura e umidade relativa na esporulação do *Phytophthora palmivora* (But1) But1 em frutos de cacau. Theobroma, Ilhéus, 3(1): 22-25, jan-mar, 1973.
- SALGADO, C.L. Doenças do cacaueiro. In: GALLI, F., Coord. Manual de Fitopatologia. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1980. v.2, p.121-27.
- SPENCE, J.A. Black - pod disease of cacao. II. A study host parasite. Annals of applied biology, 49(4): 723-34, 1961.
- TURNER, P.D. Comparative sporulation as an indication of resistance by cacao to *Phytophthora* pod rot. Trop. Agric, Trinidad and Tobago, 42(4): 305-9, 1965.
- ZENTMYER, G.A. & ERWIN, D.C. Development and reproduction of *Phytophthora*. In: Annual meeting of the North Central Division of the American Phytopathological Society, Columbia Missouri, 5 june. Sponsored by the University of Missouri the Stark Bros. Nurseries, and the American Phytopathology, 60: 1120-1127, 1969.