UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

HELOISA MALAGUETTA

**Extratos de resíduos agroindustriais para o controle de
fungos fitopatogênicos**

Piracicaba
2016

HELOISA MALAGUETTA

**Extratos de resíduos agroindustriais para o controle de
fungos fitopatogênicos**

**Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

**Área de Concentração: Química na Agricultura e
no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Severino Matias de
Alencar**

**Piracicaba
2016**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Malaguetta, Heloisa

Extratos de resíduos agroindustriais para o controle de fungos fitopatogênicos / Heloisa Malaguetta; orientador Severino Matias de Alencar. -- Piracicaba, 2016.

77 p. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Antifúngicos 2. Frutas 3. Microbiologia agrícola 4. Processamento de alimentos
5. Produtos naturais 6. Resíduos sólidos 7. Soja I. Título

CDU 631.576 (632.93 : 631.53.02)

Dedico este trabalho aos grandes amores da minha vida:

Meus pais Valdemir e Roselena,

meu irmão Henrique e

meu noivo Victor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, por ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho e permitir que eu chegasse até aqui.

Agradeço a minha família que sempre esteve ao meu lado, em especial aos meus pais, Valdemir e Roselena pelos esforços de uma vida inteira para vos ver felizes e para que pudéssemos realizar nossos sonhos, e ao meu irmão Henrique pela cumplicidade e carinho.

Agradeço ao meu noivo Victor por todo o amor, ajuda e paciência que teve comigo, principalmente nesse período e aos meus sogros, Téo e Fausto, que tanto me apoiaram.

Agradeço aos meus anjos Rosane (*in memorian*) e Dona Dita (*in memorian*), meus exemplos de força, fé, dedicação e simplicidade.

Ao meu orientador, Prof. Severino, pela oportunidade, por todo o aprendizado, confiança e amizade.

As amizades que ao longo desses anos a ESALQ me proporcionou. Como as antigas companheiras do LAN e do laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental, Juliana, Margarida, Patrícia, Maria Augusta, Ana Paula, Keityane, Mirian, Lucimara, Valéria, Lú Mourão e Lú Ferracini e os atuais, Priscila, Fernanda, Anna, Camila, Jaqueline, Talita, Luciano, além das técnicas Ivani e Adna, agradeço a todos pelo aprendizado, ajuda e pelos bons momentos que passamos juntos! Agradeço também as amizades do laboratório de Patologia de Sementes, em especial a Maria Heloisa, que muito me ajudou nessa etapa e, lá atrás, me deu a primeira oportunidade de estágio, contribuindo para a minha formação e paixão pela ciência, meu exemplo de profissional e grande amiga! Agradeço também ao Prof. Menten que mais uma vez me abriu as portas do seu laboratório e muito contribuiu para o meu mestrado!

Agradeço aos meus amigos-irmãos do Recreio, em especial Paulo (Salomão), Julia C., Julia M., Ana Paula, Gleison, Fini e Aline.

Aqueles que trago da época da faculdade, em especial Gabi, Renan, Juliana, Amanda e Débora.

Ao técnico do laboratório de Micotoxinas do LAN/ESALQ, Eduardo Micotti da Glória, que me ajudou muito com os testes de bioautografia.

A toda equipe do CENA, em especial aos funcionários da pós-graduação e biblioteca, Fábio, Daiane e Marília por toda paciência e auxílio.

Ao apoio financeiro dado pela CAPES.

"Quando a noite esconde a luz, Deus acende as estrelas"

Pe. Fábio de Melo

RESUMO

MALAGUETTA, H. **Extratos de resíduos agroindustriais para o controle de fungos fitopatogênicos.** 2016. 77 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

O Brasil tem uma posição de destaque mundial na produção de frutas e alguns grãos, os quais são comercializados *in natura* ou na forma de produtos processados. O processamento têm várias vantagens, porém gera grandes quantidades de resíduos, os quais têm sido aproveitados para a alimentação animal e geração de energia. Entretanto, muito tem sido relatado sobre o potencial bioativo desses materiais, dentre eles a ação fungitóxica de alguns de seus compostos sobre fungos fitopatogênicos. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de extratos de resíduos agroindustriais de abacate, uva, café, manga, abacaxi, maracujá e caju na inibição do crescimento micelial *in vitro* dos fungos *Fusarium pallidorozeum*, *Colletotrichum dematium*, *Rhizoctonia solani* e *Phomopsis* sp., bem como a composição química do resíduo mais promissor. Os resíduos foram liofilizados, moídos e submetidos a extração com etanol 80% (etanol:água; 8:2, v/v) em banho de ultrassom (extrato denominado bruto ou EB). O EB também foi tratado com a resina Amberlite XAD-2, visando à eliminação de açúcares e interferentes, dando assim origem ao extrato semi-purificado (EP). Os extratos que apresentaram alto rendimento foram avaliados quanto à atividade antifúngica *in vitro* e teor de compostos fenólicos totais. A amostra que apresentou os melhores índices de inibição foi selecionada para dar continuidade ao estudo, sendo a mesma fracionada em coluna de gel Sephadex LH-20. Os extratos e as frações ativas, detectadas pelo ensaio de bioautografia, foram analisadas quanto a composição química pelas técnicas de HPLC e GC/MS. Na análise de fenólicos totais os maiores teores encontrados foram para a casca de abacate, enquanto que para o ensaio de inibição de crescimento micelial *in vitro* o melhor resultado foi para a semente de abacate, tanto para o EB quanto para o EP. Desta maneira, a semente de abacate foi selecionada para as etapas posteriores. Para o fracionamento em gel Sephadex LH-20 foi eleito o EP para *F. pallidorozeum* enquanto que para os demais fungos foi eleito o EB. No fracionamento do EP obtiveram-se 13 frações, sendo que as frações 3 e 4 foram ativas, enquanto que no do EB obtiveram-se nove, sendo as frações 3, 4 e 5 ativas. Pela técnica de HPLC foram detectados em comum nas frações 3, 4 e 5 do EB dois compostos majoritários, e nas frações 3 e 4 do EP, sete compostos, os quais não puderam ser identificados pelos padrões comerciais disponíveis. Já pela técnica de GC/MS foi possível a identificação de quatro compostos em comum nas frações ativas do EB e de 11 nas frações do EP. Dentre os compostos presentes nas frações ativas, foram identificados ácidos graxos, os quais têm sido reconhecidos por apresentarem ação antifúngica. Assim, pode-se concluir que os resíduos agroindustriais estudados são fontes de compostos com atividade antifúngica, podendo assim ser uma alternativa para o controle de fungos fitopatogênicos à cultura da soja.

Palavras-chave: Antifúngico. *Fusarium pallidorozeum*. *Colletotrichum dematium*. *Phomopsis* sp.. *Rhizoctonia solani*.

ABSTRACT

MALAGUETTA, H. **Agroindustrial by-products extracts to control phytopathogenic fungi**. 2016. 77 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

Brazil holds an important position in the world production of fruit and some grains, which are commercialized *in natura* or in processed products. The processing has several advantages, but generates large amounts of by-products which have been used for animal feed and power generation. However, bioactive potential of these materials have been reported, including the fungitoxic effect. The goal of this study was to evaluate the potential of agro-industrial by-products extracts of avocado, grape, coffee, mango, pineapple, passion fruit and cashew to inhibit *in vitro* mycelial growth of fungi *Fusarium pallidorozeum*, *Colletotrichum dematium*, *Rhizoctonia solani* and *Phomopsis* sp. as well as the chemical composition of the most promising by-products. The by-products were freeze-dried, milled and the extraction was done with ethanol 80% (ethanol:water, 8:2, v/v) in an ultrasound bath (called crude extract or CE). The CE was also treated with Amberlite XAD-2 to eliminate sugars and interfering compounds so that the semi-purified extract (PE) could be obtained. Extracts with high yield were evaluated to *in vitro* antifungal activity and phenolic compounds content. Samples with the best inhibition rates were selected to continue this study, and it was fractioned on gel Sephadex LH-20. The extracts and the active fractions, detected by bioautography, were analyzed by HPLC and GC/MS. The highest phenolic content was found in the avocado peel, meanwhile for the mycelial growth inhibition *in vitro*, the best result was found in the avocado seeds for both extracts (CE and PE). Thus, avocado seed was selected for subsequent steps. For fractionation on Sephadex LH-20 gel, PE was chosen for *F. pallidorozeum* and CE for the other fungi. For PE, 13 fractions were obtained in which fractions 3 and 4 were active. For CE, 9 fractions were obtained and the actives were 3, 4 and 5. In CE, HPLC technique detected two major compounds in common in fractions 3, 4 and 5. In PE, seven major compounds were detected in fractions 3 and 4, which could not be identified by commercial available standards. By the GC/MS technique was possible to identify four compounds in common in the active CE fractions and 11 in PE. Among the compounds presented in the active fractions, fatty acids were identified. It has been reported that antifungal action has been found in these compounds. Therefore, the studied agroindustrial by-products are sources of compounds with antifungal activity and they can be used as an alternative to control phytopathogenic fungi on soybean.

Keywords: Antifungal. *Fusarium pallidorozeum*. *Colletotrichum dematium*. *Phomopsis* sp.. *Rhizoctonia solani*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Resíduos agroindustriais.....	17
2.2 Compostos vegetais bioativos.....	19
2.3 A cultura da soja e fitopatógenos associados as suas sementes	21
2.4 Potencial antifúngico de resíduos agroindustriais	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Isolados: obtenção e preservação	27
3.2 Matéria-prima: obtenção e tratamentos iniciais	27
3.3 Preparo dos extratos brutos (EB)	28
3.4 Purificação dos extratos (EB) com a resina Amberlite XAD-2	29
3.5 Incorporação dos extratos em meio de cultura e determinação da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	30
3.6 Análise do teor de compostos fenólicos totais	30
3.7 Seleção da amostra de trabalho	31
3.8 Fracionamento cromatográfico em gel Sephadex LH-20.....	32
3.9 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	32
3.10 Bioautografia	33
3.11 Análise do perfil cromatográfico através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (HPLC-RF).....	34
3.12 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS).....	34
3.13 Análise estatística.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Atividade antifúngica dos extratos brutos (EB) dos resíduos agroindustriais	37
4.2 Atividade antifúngica dos extratos brutos semi-purificados com a resina XAD-2	40
4.3 Compostos fenólicos totais	44
4.4 Seleção da amostra/extrato de trabalho	46
4.5 Fracionamento dos extratos de semente de abacate em gel Sephadex LH-20	48
4.6 Teste de bioautografia	52
4.7 Perfil químico dos extratos e frações por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	55
4.8 Análise por GC/MS.....	58
5 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
APÊNDICE A – Resultados da análise de GC/MS.....	76

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem uma posição mundial de destaque na produção de frutas e alguns grãos, os quais podem ser comercializados *in natura* ou na forma de produtos processados. O processamento tem várias vantagens, como o aproveitamento de frutos fora dos padrões para comercialização *in natura*, aumento da vida útil do produto, facilidade no transporte, obtenção de novos produtos, assim como a exploração de novos mercados (BARRET; SOMOGYI; RAMASWAMY, 2005; SANCHES; MATOS, 2013). Entretanto, gera grandes quantidades de resíduos, os quais, apesar de serem biodegradáveis, necessitam de descarte e tratamento adequados, visto que podem se tornar fontes de poluentes ambientais (LOUSADA JÚNIOR et al., 2005; CATANEO et al., 2008).

Atualmente, muitos desses resíduos são reaproveitados para o consumo humano, para alimentação animal, geração de energia e como fertilizantes e condicionadores de solos, entretanto, estudos recentes têm apontado o potencial bioativo de alguns compostos presentes nesses subprodutos, sugerindo um melhor aproveitamento desses materiais (BARRET; SOMOGYI; RAMASWAMY, 2005).

Os compostos secundários ativos mais comumente estudados em plantas são os fenólicos. A atividade antioxidante de alguns compostos tem atraído a atenção da comunidade científica, devido aos efeitos benéficos na proteção e tratamento de algumas doenças que afetam o ser humano, além do potencial destes na indústria de alimentos (MANDEL; YODIM, 2004; GANDHI; IGNACIMUTHU; PAULRAJ, 2011; SUN et al., 2015; HOHMANN et al., 2015). Na busca por produtos naturais, visando o controle alternativo de fitopatógenos de interesse agrônômico, alguns fenólicos e outros compostos também têm recebido destaque, visto a ação fungitóxica que apresentam (TEHRANIFAR et al., 2011; CHEN et al., 2013).

A cultura da soja é uma das mais importantes do Brasil em diversos setores e, para uma boa produtividade, muitos fatores devem ser considerados, entre eles a ocorrência de doenças, que podem causar perdas significativas em campo e em pós-colheita (HENNING et al., 2010; EMBRAPA, 2011; SEDIYAMA; SILVA; BORÉM, 2015). Os fungos estão entre os principais patógenos que atacam a cultura da soja, dentre eles estão aqueles que podem ser transportados e transmitidos pela semente, como é o caso de *Fusarium pallidorseum*, *Colletotrichum dematium*, *Phomopsis* spp. e *Rhizoctonia solani* (SOAVE; WETZEL, 1987; BRASIL, 2009; EMBRAPA, 2009; EMBRAPA, 2011). O tratamento de sementes é

amplamente difundido no país e apresenta várias vantagens, porém, o uso intensivo e inadequado de agroquímicos pode levar a contaminação da água, solos e sedimentos (FERNANDES NETO; SARCINELLI, 2009; HENNING et al., 2010; PASSOS; REIS, 2013).

Nesse sentido, muitos trabalhos têm relatado o potencial de produtos naturais como um método alternativo no controle de fungos fitopatogênicos, como é o caso de óleos essenciais, extratos vegetais e até mesmo de resíduos agroindustriais.

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de extratos de resíduos agroindustriais na inibição do crescimento micelial *in vitro* dos fungos fitopatogênicos da soja, *F. pallidoroseum*, *C. dematium*, *R. solani* e *Phomopsis* sp., bem como identificar os prováveis compostos responsáveis pela atividade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Resíduos agroindustriais

O crescimento acelerado da agroindústria brasileira tem contribuído para o aumento da geração de resíduos provenientes dos processos de industrialização. Muitos produtos que antes eram comercializados *in natura*, hoje passam por diversas etapas de processamento, e, embora os resíduos gerados sejam biodegradáveis, eles necessitam de descarte e tratamento adequados, visto que podem acarretar danos ao meio ambiente (LOUSADA JÚNIOR et al., 2005; CATANEO et al., 2008).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de frutas, as quais são comumente comercializadas frescas, porém, por serem altamente perecíveis, muitas são processadas e entram no mercado na forma de sucos, néctares, polpas, geleias e doces. Muitas são as vantagens do processamento, dentre elas o aproveitamento de frutos fora dos padrões para comercialização *in natura*, aumento da vida útil, facilidade no transporte, obtenção de novos produtos, assim como a exploração de novos mercados (BARRET; SOMOGYI; RAMASWAMY, 2005; SANCHES; MATOS, 2013). Entre os anos de 2003 e 2010, a proporção de frutas processadas em relação às frescas, destinadas ao mercado externo, cresceu de 47 para 59% (GUTIERREZ, 2012) e frutas como abacaxi, maracujá, manga, caju e uva destacam-se neste cenário.

Entre as cultivares de abacaxi de maior importância econômica atualmente, está a cv. Pérola e a Smooth Cayenne (havaiano), as quais correspondem a 88 e 12% da produção nacional, respectivamente. A cv. Pérola é destinada em maior parte ao consumo *in natura*, podendo também ser processada, enquanto que a Smooth Cayenne é mais utilizada para processamento, sendo comercializada em fatias ou na forma de suco (SANCHES; MATOS, 2013). Durante o processamento do fruto, o total de resíduos gerados varia de 45 a 65% (SAMSON, 1986) e é constituído por partes da fruta como casca, talo, coroa e cilindro (miolo do abacaxi), além da torta, resultante da prensagem da fruta (ROGÉRIO et al., 2007).

A maior parcela da produção nacional de maracujá é destinada ao consumo *in natura*, porém, grande parte é encaminhada para a indústria para ser transformada em suco e polpa (PIMENTEL et al., 2009). Durante o processamento da fruta, para a obtenção de suco, principal forma de comercialização da mesma, são descartados cerca de 65 a 70% da massa total do fruto, cujos resíduos são constituídos por cascas e sementes (FIGUEIREDO et al., 2009).

A manga é comercializada no mercado nacional quase que exclusivamente *in natura*, embora sucos e polpas também sejam encontrados (CORREIA; ARAUJO, 2010). No processamento da manga são gerados de 40 a 60% de resíduos, compostos de 12 a 15% de cascas, de 15 a 20% de sementes, além do bagaço resultante da prensa da polpa, sendo que as proporções dependem da variedade do fruto (MIRGHANI et al., 2009). Já o consumo *in natura* do fruto de caju é muito limitado, sendo o principal produto deste, a amêndoa proveniente da castanha (PAIVA; GARRUTI; SILVA NETO, 2000). O pedúnculo, por sua vez, é destinado principalmente à produção de suco, cujo processamento gera como resíduo um bagaço, o qual representa cerca de 20% da massa do pseudofruto (PAIVA; GARRUTI; SILVA NETO, 2000; SANTOS et al., 2007).

Em 2014 a produção nacional de uvas destinadas ao processamento para elaboração de vinhos, sucos e derivados foi de 46,89%, enquanto que o restante da produção, 53,11%, foi destinada ao consumo *in natura* (MELLO, 2014). A geração de resíduos em industriais vinícolas, por exemplo, representam cerca de 30% do volume de uvas utilizadas para a produção de vinho, sendo descartadas porções como bagaço (cascas e sementes) e engaço (pedúnculos e ramificações dos cachos), além da borra, proveniente do processo fermentativo (MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007).

Além das frutas citadas, outras têm merecido atenção, como o abacate que vem ganhando espaço em todo o mundo (MOUCO; COELHO; ARAÚJO, 2012). No Brasil, a produção se concentra na região sudeste, principalmente no estado de São Paulo, seguido do de Minas Gerais (AGRIANUAL, 2015). As cultivares Hass e Fuerte têm sido produzidas no país e se encontram disponíveis no mercado, embora a maior parte da produção seja exportada. Além do fruto *in natura*, são comercializados produtos como polpa e azeite (JAGUACY AVOCADO BRASIL, 2016). Em estudo realizado por Tango, Carvalho e Soares (2004), as porções de casca e semente do abacate Hass correspondem, em média, a 13,5 e 19% do fruto, respectivamente.

Além das frutas, outro setor da agroindústria responsável pela geração de grandes quantidades de resíduos é o de café, cuja produção mundial é liderada pelo Brasil, que na safra de 2013/14 produziu aproximadamente 2,7 mil toneladas de grãos (AGRIANUAL, 2015). O processamento do café gera resíduos sólidos e líquidos e, entre os sólidos, estão a casca e a polpa, que correspondem a cerca de 50% do grão seco (BAGGIO, 2006; BRUM, 2007).

Os resíduos gerados durante o processamento de frutas são bastante diversificados, devido a grande variedade de matérias-primas e processos utilizados, assim como a

multiplicidade de produtos que caracterizam a indústria. Esse tipo de processamento utiliza grandes volumes de água e gera quantidades significativas de resíduos sólidos, os quais necessitam de tratamento adequado ao final do processo. Muitos dos resíduos sólidos são reaproveitados, podendo ser destinados ao consumo humano (por serem fontes de fibras e pectina), à alimentação animal (devido ao seu alto valor nutricional), à recuperação para geração de energia (obtenção de etanol e metano) e obtenção de fertilizantes e condicionadores de solo. Entretanto, muitos estudos têm sido feitos visando um melhor aproveitamento desses materiais, visto o potencial bioativo que estes apresentam (BARRET; SOMOGYI; ROMASWAMY, 2005).

2.2 Compostos vegetais bioativos

O metabolismo das células vegetais é dividido em primário e secundário, sendo o metabolismo primário relacionado às funções essenciais do vegetal como crescimento e desenvolvimento, cuja distribuição é universal entre as plantas. Já o metabolismo secundário apresenta distribuição restrita no reino vegetal e está relacionado às interações entre planta e meio ambiente, envolvendo fatores bióticos e abióticos, como defesa contra herbívoros, patógenos e competidores, proteção contra radiação solar, além serem atrativos para polinizadores e dispersores de sementes (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2013; EVERT; EICHHORN, 2014).

Os metabólitos secundários são divididos em três grandes grupos, sendo eles os compostos nitrogenados, os terpenos e os compostos fenólicos. Os compostos nitrogenados englobam os metabólitos que possuem nitrogênio como parte de sua estrutura química como os alcaloides, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos e aminoácidos não proteicos, cuja função está relacionada principalmente à proteção contra herbivoria (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2013; EVERT; EICHHORN, 2014). A ação antifúngica de alguns desses compostos também já foi descrita. Em estudo realizado por Zamora-Natera et al. (2008), os autores verificaram efeito positivo *in vitro* do extrato de alcaloides proveniente de sementes de tremoço (*Lupinus mexicanus* Cerv. ex. Lag.) sobre o crescimento micelial dos fungos *R. solani* e *Sclerotium rolfsii*, sendo que o alcaloide mais abundante encontrado na semente foi a lupanina. Chen et al. (2014) isolaram de *Kopsia hainanensis* Tsiang, uma planta medicinal chinesa, 15 alcaloides, e verificaram potente atividade inibitória de dois deles no crescimento micelial *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense e *F. oxysporum* f. sp. Niveum.

Os terpenos constituem a maior classe de metabólitos, cujos compostos apresentam diversas funções, dentre elas a proteção contra herbívoros, fungos, bactérias e plantas competidoras, além de atração de polinizadores. São formados pela fusão de unidades isoprênicas de cinco carbonos e classificados de acordo com o número de unidades que possuem (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2013; EVERT; EICHHORN, 2014). Entre os terpenos, muitos trabalhos têm relatado o potencial antifúngico de óleos essenciais e saponinas. Zabka, Pavela e Slezakova (2009) analisaram a eficácia *in vitro* de óleos essenciais de 25 espécies de plantas medicinais contra os fungos *F. oxysporum*, *Fusarium verticillioides*, *Penicillium expansum*, *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*, e verificaram que todos os extratos testados foram capazes de afetar o crescimento dos fungos. Extratos ricos em saponinas de três espécies vegetais (*Balanites aegyptiaca*, *Quillja saponaria* e *Yucca schidigera*) foram testados por Chapagain, Wiesman e Tsrer (2007) visando o controle *in vitro* dos fungos fitopatogênicos, *Pythium ultimum*, *F. oxysporum*, *Alternaria solani*, *Colletotrichum coccodes* e *Verticillium dahliae*. Os autores verificaram efeito positivo dos três extratos contra os fungos, exceto para *C. coccodes*, o qual foi totalmente inibido somente pela maior concentração de *Y. schidigera*.

Entre os metabólitos secundários, os compostos mais estudados são as substâncias fenólicas. Quimicamente, esses compostos são formados por um grupo hidroxila ligado a um anel aromático, e apresentam diversas funções no vegetal, como proteção contra radiação UV, defesa contra insetos, fungos, bactérias e vírus, atrativos para polinizadores e dispersores de sementes e função alelopática (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2013; EVERT; EICHHORN, 2014). Trabalhos recentes envolvendo os compostos fenólicos têm focado a caracterização destes nas diferentes espécies vegetais, visando assim a sua aplicabilidade (BORRÁS-LINARES et al., 2015; XIAO et al., 2015; WANG et al., 2016).

Entre esses compostos, têm recebido grande destaque aqueles com capacidade antioxidante, devido os efeitos benéficos demonstrados para o ser humano, como a contribuição na prevenção de doenças causadas por danos oxidativos, como câncer (SUN et al., 2015) e doenças neurodegenerativas (MANDEL; YODIM, 2004). Efeitos antidiabéticos (GANDHI; IGNACIMUTHU; PAULRAJ, 2011) e na prevenção de doenças cardiovasculares (HOHMANN et al., 2015) também têm sido relatados.

Os antioxidantes também têm sido alvo de pesquisas que visam a utilização destes na indústria de alimentos, como uma alternativa para substituição aos sintéticos, como BHA (butil-hidroxianisol), BHT (butil-hidroxianisol) e TBHQ (terc-butilhidroquinona), os quais têm sido questionados quanto a sua toxicidade (RAMALHO; JORGE, 2006).

Outra área que tem explorado o potencial dos compostos fenólicos é a agrônômica, haja vista a ação fungitóxica de alguns, os quais são capazes de inibir o crescimento micelial e a germinação de esporos de fungos fitopatogênicos (TEHRANIFAR et al., 2011; CHEN et al., 2013). Nesse sentido, compostos como catequina, epicatequina, resveratrol, antocianinas, vanilina, ácido salicílico, ácido ferúlico, ácido cafeíco, entre outros, já foram descritos na literatura por apresentarem tal atividade (ADRIAN et al., 1997; TERRY et al., 2004; BÁIDEZ et al., 2006; MENDOZA et al., 2013a; ZABKA; PAVELA, 2013).

Além destes, muitos outros compostos têm sido relatados com alto potencial bioativo, principalmente, no que se refere à sua ação antifúngica. Entre eles, destacam-se, proteínas e peptídeos antifúngicos (FREIMAN; SABAA SRUR, 1999; TAIRA; TOMA; ISHIHARA, 2005; PELEGRINI et al., 2006; LAM; NG, 2009) e ácidos graxos. Em estudo realizado por Abdelillah et al. (2013), os autores verificaram ação antifúngica da fração de ésteres metílicos de ácidos graxos isolados da semente de *Linum usitatissimum* L., uma leguminosa, no crescimento micelial *in vitro* dos fungos *A. flavus* e *Aspergillus ochraceus*. Efeito antifúngico *in vitro* destes compostos também foram relatados por Walters et al. (2004), em que os autores verificaram efeito inibitório dos ácidos linolênico e linoleico sobre o crescimento micelial de *R. solani*, *P. ultimum*, *Pyrenophora avenae* e *Crinipellis perniciosa*.

2.3 A cultura da soja e fitopatógenos associados as suas sementes

A cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma das mais importantes do mundo, principalmente por ser fonte de proteínas e óleo (SEDIYAMA; SILVA; BORÉM, 2015). A produção mundial é liderada pelos Estados Unidos, seguido do Brasil, sendo o Mato Grosso, o Paraná e o Rio Grande do Sul os estados com as maiores produções (AGRIANUAL, 2015).

A partir do grão são obtidos vários produtos e subprodutos, os quais são bastante utilizados pela agroindústria, indústria química e de alimentos (EMBRAPA, 2004). Entre eles, podemos citar o óleo vegetal, utilizado na alimentação humana e produção de biodiesel e o farelo de soja, também utilizado para alimentação humana, animal e na fabricação de outros produtos (EMBRAPA, 2004; SEDIYAMA; SILVA; BORÉM, 2015).

O sucesso para o estabelecimento de uma cultura e, conseqüentemente, da produtividade, pode ser influenciado por diversos fatores, dentre eles a ocorrência de doenças. No Brasil já foram relatadas aproximadamente 40 doenças para a cultura da soja, sendo mais de 60% destas de origem fúngica (EMBRAPA, 2011).

Dentre os fungos fitopatogênicos, muitos podem ser transportados e transmitidos pelas sementes. Essa associação permite a introdução de patógenos em novas áreas ou mesmo a acumulação destes em áreas tradicionais de cultivo, gerando focos primários de infecção na fase inicial da cultura e sob condições propícias, o estabelecimento de doenças (SOAVE; WETZEL, 1987). Nesse sentido, para a cultura da soja, merecem destaque os fungos *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum truncatum* (sin. *C. dematium* var. *truncata*), *F. pallidoroseum* (antigamente denominado *F. semitectum*), *Macrophomina phaseolina*, *Phomopsis sojae*, *R. solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* (BRASIL, 2009; EMBRAPA 2009), além dos fungos de armazenamento *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.

Fungos do gênero *Fusarium* podem ser encontrados tanto no solo quanto associados a espécies vegetais (PAIVA, 1999). São extensivamente estudados, visto que várias espécies causam danos e perdas significativas em culturas economicamente importantes (CARVALHO et al., 2011; KUHNEM JÚNIOR et al., 2013; DOAN; DAVES, 2015). Além disso, certas espécies podem produzir metabólitos tóxicos, as micotoxinas, que quando ingeridas, podem causar diferentes efeitos toxicológicos no homem e em animais (SORIANO; DRAGACCI, 2004). Entre as espécies do gênero *Fusarium*, o mais comumente encontrado em sementes de soja é *F. pallidoroseum*, o qual pode causar a deterioração das mesmas, porém não é considerado patogênico à planta de soja (GOULART, 1997).

O gênero *Colletotrichum* possui várias espécies que causam doenças em plantas, tanto em pré quanto em pós colheita (ARAÚJO et al., 2009; PERES et al., 2002). O fungo é causador da antracnose, uma das principais doenças que afetam a cultura da soja, principalmente nos Cerrados brasileiros, devido às condições climáticas (EMBRAPA, 2011). Em soja, o fungo *C. dematium* pode causar deterioração da semente, a qual é o mais eficiente veículo de disseminação do patógeno, morte de plântulas e infecção sistêmica em plantas adultas (GOULART, 2005).

Phomopsis spp. é o agente causal da seca da haste e da vagem em soja, doença responsável pelo descarte anual de muitos lotes de sementes, sendo, os maiores danos, observados nos anos em que há temperaturas elevadas e grandes volumes de chuva durante a fase de maturação e/ou colheita (EMBRAPA, 2011). O fungo é responsável pela deterioração de sementes, as quais são os principais veículos de disseminação do patógeno (GOULART, 2005).

Outro importante fitopatógeno de solo, mas que pode ser transportado pela semente, é o fungo *R. solani*, o qual atinge uma ampla variedade de espécies vegetais de importância econômica (FENILLE; SOUZA, 1999; FENILLE, 2001; SCHURT et al., 2012;

MORATELLI et al., 2012), causando perdas significativas e sendo de difícil controle, uma vez que instalado em uma determinada área, o fungo é capaz de permanecer no solo na forma de estruturas de resistência (escleródios) ou mesmo de micélio em restos de cultura (GOULART, 2005). A principal doença causada pelo fungo é o tombamento de plântulas ou *damping off*, cujos sintomas ocorrem na fase inicial do desenvolvimento da soja, tanto em pré quanto em pós-emergência (GOULART, 2005).

O bom desenvolvimento da cultura em campo depende de diversas práticas, dentre elas a utilização de sementes de alta qualidade, o que engloba o estado fitossanitário destas. Os fungos associados às sementes, assim como os demais que afetam a cultura, são controlados, quase que exclusivamente, por meio de fungicidas químicos. Estima-se que o volume de sementes de soja tratadas no Brasil corresponda de 90 a 95% da área semeada (HENNING et al., 2010). O tratamento de sementes controla os patógenos por elas transmitidos, além de proteger as mesmas daqueles presentes no solo, permitindo boa germinação e emergência de plântulas (HENNING et al., 1991; GOULART, 1998; HENNING et al., 2010).

Apesar dos benefícios citados, o uso de agroquímicos apresenta também suas desvantagens, uma vez que a aplicação intensiva e inadequada destes leva à sua acumulação na água, no solo e em sedimentos, além da sua permanência nos produtos que serão consumidos ou destinados à indústria (FERNANDES NETO; SARCINELLI, 2009; PASSOS; REIS, 2013). A maior parte dos contaminantes químicos encontrados em águas subterrâneas e superficiais tem sido relacionada a fontes industriais e agrícolas. O tratamento de água convencional não é suficiente para retirar esses produtos da água que é destinada ao consumo humano, o que a torna uma importante fonte de exposição do homem aos agroquímicos, além dos prejuízos que pode causar ao meio ambiente (FERNANDES NETO; SARCINELLI, 2009).

Outra preocupação é a contaminação de alimentos. Em diversas pesquisas de monitoramento de resíduos desses produtos, em frutas e hortaliças, foram detectados agroquímicos não autorizados ou em doses acima das permitidas pela legislação (PASSOS; REIS, 2013). Além disso, ainda existe a preocupação com a intoxicação de trabalhadores pelo uso irregular e inadequado desses produtos (ÁVILA et al., 2009; TAVELLA et al., 2011).

Nesse sentido, muitos trabalhos têm relatado efeitos positivos do uso de medidas alternativas, como o uso de produtos naturais, para o controle de fungos fitopatogênicos. Entre estes, destacam-se os óleos essenciais (AGUILAR-GONZÁLEZ; PALOU; LÓPEZ-

MALO, 2015; SANTAMARINA et al., 2016), os extratos vegetais (TEGEGNE; PRETORIUS; SWART, 2008; CASTILLO et al., 2010; SALES et al., 2016) e os resíduos agroindustriais.

2.4 Potencial antifúngico de resíduos agroindustriais

Muitos trabalhos têm sido publicados relatando o potencial antifúngico de resíduos agroindustriais (OLIVEIRA et al., 2007; CHAVÉZ-QUINTAL et al., 2011; TEHRANIFAR et al., 2011).

Dentre os compostos presentes em abacaxi, já foram detectados compostos fenólicos como ácido gálico, catequina, epicatequina e ácido ferúlico, sendo apenas os dois últimos detectados na polpa e cilindro central da fruta (YI et al., 2006). Esses compostos já foram descritos como potenciais antifúngicos, sendo que os ácidos gálico e ferúlico já apresentaram efeito inibitório positivo *in vitro* contra espécies dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* (TERRY et al., 2004; BÁIDEZ et al., 2006; ZABKA; PAVELA, 2013). Catequina e epicatequina também já foram detectadas em frutos de abacate e manga (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006; TREMOCOLDI, 2015).

Além destes, já foram relatados efeitos de proteínas antifúngicas encontradas no fruto. Quitinases, extraídas e purificadas de folhas de abacaxi, apresentaram inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Trichoderma viride* (TAIRA; TOMA; ISHIHARA, 2005). Em estudo realizado por López-Garcia, Hernández e Segundo (2012), os autores verificaram efeito fungistático da bromelina, purificada de hastes de abacaxi, sobre o crescimento de diferentes espécies de *Fusarium*, dentre elas, *F. verticillioides*, *F. oxysporum* f. sp. *melonis* e *Fusarium proliferatum*. Essa enzima também é encontrada nas porções de casca, polpa e coroa do fruto (FREIMAN; SABAA SRUR, 1999).

Peptídeos antifúngicos têm sido comumente relacionados à ação fungitóxica encontrada para sementes de maracujá. Em estudo realizado por Pelegrini et al. (2006), os autores isolaram o peptídeo Pe-AFP1 (5.0 kDa) de um extrato de semente de maracujá e verificaram seu potencial antifúngico *in vitro* contra *Trichoderma harzeanum*, *F. oxysporum* e

A. fumigatus. Lam e Ng (2009) isolaram, também de sementes de maracujá, o peptídeo denominado *passiflin* (67 kDA) e verificaram *in vitro* o efeito inibitório deste sobre o crescimento micelial de *R. solani*.

Compostos antifúngicos foram detectados também, em concentrações fungitóxicas, em cascas de frutos verdes de manga (PRUSKY; KEEN, 1993). Lins et al. (2011) analisaram a eficácia do extrato de casca de manga cv. Tommy Atkins na inibição de *Lasiodiplodia theobromae*, e também verificaram a eficiência deste, tanto nos ensaios *in vitro*, analisando o crescimento micelial do patógeno, quanto *in vivo*, em relação à severidade da doença. Flavonoides isolados de folhas de manga também apresentaram atividade antifúngica contra os fungos *A. alternata*, *A. fumigatus*, *Aspergillus niger*, *M. phaseolina* e *Penicillium citrii* (KANWAL et al., 2010).

Em estudo realizado por Santos et al. (2011), os autores verificaram elevada atividade antifúngica *in vitro* de cinzas do bagaço do pedúnculo de caju contra algumas espécies do gênero *Fusarium*, dentre elas, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* e *Fusarium lateritium*. Atividade antifúngica *in vitro* também foi descrita por Kannan et al. (2009) para o líquido da casca da castanha de caju, sobre os fungos *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* e *Fusarium* sp.

A atividade antifúngica *in vitro* de compostos extraídos de uva tem sido analisada principalmente contra o fungo *Botrytis cinerea*, responsável pela podridão cinzenta nos frutos e por perdas significativas na cultura. Resultados positivos na inibição do patógeno já foram observados em estudos com extratos de bagaço de uva, de antocianinas extraídas do bagaço e com o composto resveratrol (ADRIAN et al., 1997; MENDOZA et al., 2013a; 2013b).

Compostos antifúngicos também já foram detectados em folhas e cascas de frutos imaturos de abacate, assim como na semente (PRUSKY et al., 1982; ADIKARAM et al., 1992; CARMAN; HANDLEY, 1999). Wehner, Bester e Kotzé (1982) analisaram *in vitro* o potencial antifúngico de diferentes partes do abacateiro, como folhas, frutos (porções de casca, semente e polpa) e raízes contra os fungos *Phytophthora cinnamomi*, *Cylindrocarpon destructans*, *Thyronectria pseudotrichia*, *Dothiorella aromatica*, *L. theobromae*, *Drechslera sorokiniana*, *Phytophthora citrophthora*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *R. solani*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* e *Phomopsis perseae* e verificaram diferentes graus de inibição, exceto para o fungo *T. pseudotrichia* com o extrato de folha, cujo efeito foi nulo.

De amostras de sementes de café, pesquisadores extraíram a cafeína, também presente na casca do fruto (BAGGIO, 2006), e observaram efeito inibitório *in vitro* da mesma sobre o crescimento de fungos dos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Helmintopodium* (hoje denominado *Phaeosphaeria*) e *Syncephalastrum* (RIZVI et al., 1980).

Em outro estudo, a atividade antifúngica *in vitro* de extratos de pó de café foi analisada contra espécies de fungos decompositores de madeira. O efeito inibitório observado pelos autores variou de moderado à máximo, dependendo de cada fungo, porém para todos foi detectado efeito positivo dos extratos (ARORA; OHLAN, 1997).

Visto o potencial antifúngico desses materiais, agregar valor aos mesmos tem várias vantagens, começando pelas empresas processadoras, visto que o correto descarte desses resíduos tem um alto custo, e principalmente, para o meio ambiente, tanto no sentido desses materiais serem fontes de contaminação ambiental, quanto pelo fato de ser uma alternativa para a redução do uso de agroquímicos sintéticos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Bioquímica e Análise Instrumental do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição e de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, ambos situados na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) em Piracicaba, São Paulo.

3.1 Isolados: obtenção e preservação

O isolado utilizado de *R. solani* pertencia ao Laboratório de Patologia de Sementes (ESALQ/USP), enquanto que os de *F. pallidorosem*, *C. dematium* e *Phomopsis* sp. foram obtidos diretamente de sementes de soja. Para obtenção destes, as sementes foram primeiramente, submetidas a um tratamento de assepsia superficial, em que foram imersas em uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante 3 minutos (BRASIL, 2009).

Em seguida, as sementes foram distribuídas uniformemente e equidistantes em placas de petri de plástico sobre folhas de papel filtro, esterilizadas e umedecidas com água destilada, de acordo com o método do papel de filtro modificado (BRASIL, 2009). As placas, assim preparadas, foram mantidas em câmara de incubação durante sete dias, sob temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, as sementes foram avaliadas quanto a incidência dos patógenos de interesse, com o auxílio de um microscópio estereoscópio e quando necessário, um microscópio composto.

Após identificação, os fungos foram repicados em placas de petri contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar – Merck, DE), as quais foram vedadas e mantidas em câmara de incubação até o crescimento dos mesmos (5 a 10 dias), quando novamente foram repicados, para a obtenção de colônias puras dos patógenos.

Os isolados foram preservados utilizando-se o método Castellani (DHINGRA; SINCLAIR, 1995), em que discos de 5 mm de diâmetro das colônias foram transferidos para frascos de vidro contendo água destilada esterilizada.

3.2 Matéria-prima: obtenção e tratamentos iniciais

Foram utilizados resíduos de frutos de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill - mistura de casca e bagaço), maracujá (*Passiflora edulis* Sims. - mistura de casca, albedo e semente), caju (*Anacardium occidentale* L. – bagaço), manga (*Mangifera indica* L. – bagaço),

uva (*Vitis vinifera* L. - engaço e bagaço), abacate (*Persea americana* Mill. - casca e semente) e café (*Coffea arabica* L. - casca), totalizando 10 amostras (Figura 1).

Os resíduos de abacaxi, maracujá, caju e manga foram cedidos por uma indústria de processamento de frutas, localizada na cidade de Jundiaí (SP). Os de uva pela Embrapa semiárido em Petrolina (PE). O de café, por uma indústria processadora localizada em Cornélio Procópio (PR). Por uma empresa localizada na cidade de Bauru, foram cedidos frutos inteiros de abacate da cultivar Hass, os quais foram abertos e separados manualmente em porções de casca, semente e polpa, sendo que foram utilizados para este estudo, somente os dois primeiros.

Após o recebimento dos materiais, os mesmos foram homogeneizados, liofilizados, moídos e armazenados à -20°C até o momento da extração.

Figura 1 - Amostras de resíduos coletadas. A. Junção de bagaço e casca de abacaxi; B. Junção de casca, albedo e semente de maracujá; C. Bagaço de caju; D. Bagaço de manga; E. Engaço de uva (cv. Chenin Blanc); F. Engaço de uva (cv. Petit Verdot); G. Bagaço de uva (cv. Petit Verdot); H. Semente de abacate (cv. Hass); I. Casca de abacate (cv. Hass); J. Casca de café

3.3 Preparo dos extratos brutos (EB)

Um dos métodos utilizados para a extração de compostos bioativos é a utilização de solventes orgânicos. Nesse estudo foi utilizado como solvente extrator etanol diluído em água (etanol:água, 8:2, v/v), pelo fato do mesmo apresentar extração eficaz desses compostos, fácil manipulação e não ser tóxico, contribuindo para a diminuição na geração de resíduos químicos.

A metodologia utilizada foi a descrita por Bloor (2001), em que 10 mL de etanol 80% (etanol:água, 8:2, v/v) foi adicionado a 1 g de amostra liofilizada e moída. A extração foi conduzida em banho de ultrassom por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida os extratos foram centrifugados a 5000 x g durante 10 minutos e filtrados, coletando-se o sobrenadante (denominado extrato bruto ou EB). Este foi submetido à evaporação sob baixa pressão a temperatura de 50°C, para retirada completa do solvente extrator, e então liofilizado. Os extratos assim preparados foram submetidos às análises e aos processos de purificação, os quais estão descritos a seguir.

3.4 Purificação dos extratos (EB) com a resina Amberlite XAD-2

Como algumas das amostras de trabalho continham quantidades significativas de açúcares, foram testados além dos EB, extratos semi-purificados (EP), visando a remoção desses possíveis interferentes. Pelo seu mecanismo de adsorção, a resina XAD-2 permite a eliminação de açúcares e compostos polares, possibilitando assim a obtenção de uma fração com maior concentração de compostos fenólicos (FERRERES et al., 1991).

A metodologia utilizada foi a descrita por Ferreres et al. (1991), com modificações, em que 100 mL dos extratos hidroalcoólicos, preparados conforme descrito no item 3.3, foram submetidos à evaporação sob baixa pressão a temperatura de 50°C para retirada completa do solvente extrator, sendo, em seguida, rediluídos em água até o volume inicial. Esses extratos aquosos foram acidificados até o pH 2 e misturados a 100 g da resina (Supelco, Bellefonte, PA – com poros de 9nm e partícula de 0,3-1,2mm), cuja mistura foi levada a agitação por 15 minutos, sendo em seguida colocada em uma coluna de vidro (40 x 4 cm). A coluna foi eluída primeiramente com 800 mL de água ácida (pH 2), seguida de 800 mL de água destilada (pH 7) e, por último, metanol P.A., cuja fração foi coletada até que não fosse mais possível observar coloração na mesma (extrato denominado semi-purificado ou EP). O solvente do extrato foi evaporado sob baixa pressão a temperatura de 50°C, e o mesmo foi liofilizado para ser utilizado nas análises.

Foram calculados os valores de rendimento tanto para os EB como para os EP.

3.5 Incorporação dos extratos em meio de cultura e determinação da atividade antifúngica *in vitro*

Os extratos liofilizados foram pesados e diluídos em etanol 80% (etanol:água, 8:2, v/v) de modo que as concentrações finais no meio de cultura fossem de 500 e 2000 ppm para os EB e de 50, 100, 500 e 1000 ppm para os EP. As placas controle foram preparadas somente com o solvente.

Os tratamentos assim preparados foram filtrados (filtros com microporos de 0,22 µm) e aplicados em meio de cultura BDA recém esterilizado, porém resfriado, conforme metodologia descrita por Tehranifar et al. (2011). Após homogeneização, a mistura foi vertida em placas de petri e, após o resfriamento do meio, foi feita a repicagem dos fungos, cujo procedimento consistiu em utilizar colônias de mesma idade (preparadas a partir dos isolados) e destas, retirar discos de 5 mm de diâmetro contendo micélio dos patógenos, os quais foram transferidos para o centro de cada placa contendo os respectivos tratamentos descritos acima. Essas placas foram vedadas e mantidas em câmara de incubação com temperatura entre 20±2°C e fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações foram feitas no momento em que o micélio da placa controle atingiu o crescimento de ¾ da placa. Após isto, foi feita a medida do diâmetro das colônias com o auxílio de um paquímetro digital e, ao final das medições, foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento micelial para cada extrato em relação ao controle por meio da fórmula:

$$\text{Inibição do crescimento micelial (\%)} = \frac{(\text{diâmetro do controle} - \text{diâmetro do tratamento})}{\text{diâmetro da controle}} \times 100$$

Foram feitas 4 repetições para cada tratamento, inclusive para o controle, e os resultados foram expressos em média de porcentagem de inibição.

3.6 Análise do teor de compostos fenólicos totais

O Folin-Ciocalteu é uma solução formada a partir de ácidos fosfomolibdicos e fosfotúngsticos. Esse método baseia-se na redução desses ácidos pelos fenólicos, em solução alcalina, produzindo uma coloração azul, a qual pode ser medida espectrofotometricamente na faixa de absorção visível no comprimento de onda de 735 nm

(MUNIZ; MATTOS; MORETTI, 2012). Embora alguns autores defendam que o método não é adequado para determinar o teor desses compostos, e sim a capacidade total de redução do Folin-Ciocalteu pelas amostras (MAGALHÃES et al., 2008), este método ainda é o mais utilizado para a determinação de compostos fenólicos em alimentos (MUNIZ; MATTOS; MORETTI, 2012).

Com o intuito de observar a relação entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antifúngica das amostras, os EB e EP foram analisados de acordo com a metodologia descrita por Al-Duais et al. (2009), com algumas adaptações. Dez miligramas dos extratos liofilizados foram diluídos em 1 mL de etanol 80% (etanol:água, 8:2, v/v) e rediluídos conforme descrito na Tabela 1. As análises foram feitas utilizando-se microplacas transparentes com 96 poços, sendo que em cada poço foram transferidas alíquotas de 20 µL do extrato/padrão e 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu 10% (Folin-Ciocalteu:água, 1:9, v/v). A mistura permaneceu em repouso por 5 minutos e, em seguida, 75 µL da solução de carbonato de sódio 7,5% (carbonato de sódio:água, 7,5:92,5, v/v) foram adicionados. O branco foi preparado substituindo-se o volume da amostra por igual volume do solvente dos extratos. A microplaca foi mantida em temperatura ambiente ao abrigo de luz por 40 minutos e, após esse período, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 740 nm. A curva analítica foi preparada a partir de uma solução de ácido gálico (AG) 500 µg/mL nas concentrações de 5, 10, 20, 40 e 80 µg/mL. As análises foram feitas em triplicata e os resultados expressos em mg AG/g de extrato.

Tabela 1 - Diluições dos extratos (EB e EP) utilizadas na análise do teor de compostos fenólicos totais

Resíduos	Diluições	
	EB	EP
Casca de abacate	1/50	1/100
Semente de abacate	1/50	1/100
Casca de café	1/10	1/5
Bagaço de uva (Petit Verdot)	1/50	1/50
Engaço de uva (Petit Verdot)	1/10	1/100
Engaço de uva (Chenin Blanc)	1/10	1/50

3.7 Seleção da amostra de trabalho

Após a incorporação dos extratos em meio de cultura e análise dos resultados, foi selecionado o resíduo que apresentou a maior porcentagem de inibição dos fungos, o qual seguiu para as etapas posteriores de fracionamento e análise.

3.8 Fracionamento cromatográfico em gel Sephadex LH-20

É uma técnica cromatográfica cuja separação de compostos é baseada no tamanho das moléculas, ou mais corretamente, no seu volume em solução. O gel utilizado no preenchimento da coluna forma poros de tamanhos variados, nos quais as moléculas, dependendo do seu tamanho (volume), conseguem ou não penetrar. Desse modo, moléculas grandes são incapazes de se difundir no gel, sendo eluídas mais rapidamente, enquanto que as intermediárias e menores conseguem penetrar nos poros em diferentes graus, de modo que, quanto menor a molécula, mais tardiamente ela será eluída da coluna (VOGEL et al., 2013).

O fracionamento dos extratos, EB e EP, visou concentrar o grupo de compostos ativos e foi realizado conforme o método descrito por Ferreres et al. (1991). Foi utilizada uma bureta de vidro de 25 mL (30 x 1,5 cm), na qual foi adicionado 7 g do gel (GE, Schenectady, EUA) diluído em metanol. Após o empacotamento, foi adicionado no topo da coluna 150 mg do extrato liofilizado e diluído em 1,5 mL de metanol. A eluição da coluna também foi feita com este solvente, coletando-se alíquotas a cada 3 minutos até que o eluato se apresentasse incolor. O monitoramento (observação de bandas fluorescentes) para o início da coleta foi feito com luz UV no comprimento de onda de 254 nm.

Após a coleta, as alíquotas foram aplicadas em placas de CCD conforme o item 3.9, visando o agrupamento das que apresentavam um mesmo comportamento físico-químico, denominadas posteriormente de frações.

3.9 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Essa técnica consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial, por meio de uma fase móvel, sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

As análises por CCD foram realizadas utilizando-se cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, DE), nas quais foram aplicados 20 µL das alíquotas coletadas da coluna com gel Sephadex LH-20. A fase móvel utilizada, baseada em testes preliminares, consistiu em uma mistura de acetato de etila, metanol, água e ácido acético (acetato de etila:metanol:água:ácido acético, 75:20:4:1, v/v/v/v). Após a eluição e secagem das placas, as mesmas foram analisadas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm e, em seguida, foram reveladas com anisaldeído sulfúrico, cuja solução foi preparada com 50 mL de ácido acético, 1 mL de ácido sulfúrico e 0,5 mL de anisaldeído (4-aldeído anísico).

O revelador assim preparado foi borrifado nas placas, as quais foram secas e levadas à estufa com temperatura de 100°C por 5 minutos, para então serem analisadas.

3.10 Bioautografia

O método alia duas técnicas, a de cromatografia em camada delgada (CCD) e um bioensaio. Basicamente, consiste na utilização de placas de CCD com as amostras de trabalho e, sobre estas, a aplicação de estruturas fúngicas (esporos ou micélio) juntamente com um meio nutritivo, permitindo a observação de zonas de inibição.

No presente estudo, a bioautografia foi utilizada como método qualitativo, apenas para identificação das frações com atividade antifúngica. As frações liofilizadas foram rediluídas em metanol na concentração de 1% e aplicadas nas placas de CCD nos volumes de 10 (*R. solani* e *C. dematium*) e 20 µL (*Phomopsis* sp. e *F. pallidoroseum*).

Para *R. solani*, *Phomopsis* sp. e *F. pallidoroseum* foi utilizado o método descrito por Plodpai et al. (2013), com adaptações. Após a completa secagem das placas de CCD, as mesmas foram esterilizadas em luz UV durante 10 minutos e, sobre estas, foi aplicado o meio de cultura BDA, com o auxílio de uma pipeta Pasteur descartável. Após 24 horas foram transferidos para as placas, discos de 5 mm contendo micélio dos respectivos fungos. As placas, assim preparadas, foram vedadas e mantidas em câmara de incubação com temperatura de 20±2°C e fotoperíodo de 12 horas. As avaliações de zonas de inibição de crescimento micelial foram feitas visualmente aos 4 (*R. solani* e *F. pallidoroseum*) e 10 (*Phomopsis* sp.) dias após a repicagem dos fungos.

Para *C. dematium*, o método descrito por Homans e Fuchs (1970), com adaptações, mostrou-se mais adequado. Inicialmente foi preparado um caldo nutritivo de batata e dextrose (10:1, g/g) esterilizado, ao qual foi incorporada uma solução com esporos do fungo, obtidos da raspagem de colônias do mesmo, cuja concentração final utilizada foi de 3,05×10⁶ esporos. As placas de CCD, secas e esterilizadas, foram imersas nessa solução e transferidas para um recipiente transparente, contendo água em seu interior, a fim de manter o ambiente úmido para o crescimento do patógeno. O recipiente foi vedado e mantido nas mesmas condições de incubação citadas acima e as avaliações foram feitas aos 4 dias.

3.11 Análise do perfil cromatográfico através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (HPLC-RF)

Esse tipo de cromatografia líquida emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados (fase estacionária) e uma fase móvel, eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Tanto as análises por HPLC quanto as por GC/MS foram realizadas com o intuito de identificar os possíveis compostos com atividade antifúngica presentes nos extratos e frações ativas.

Para a análise foi utilizado um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de ultravioleta (PDA) e uma coluna de fase reversa C18 (4,6 x 250 mm, com tamanho de partícula de 5 µm). O método utilizado foi o descrito por Melo et al. (2015), com volume de injeção de 20 µL. A fase móvel utilizada foi água:ácido fórmico (99,9:0,1, v/v) (solvente A) e acetonitrila:ácido fórmico (99,9:0,1, v/v) (solvente B), com vazão constante de 1 mL/min. O gradiente iniciou com 5% do solvente B, aumentando para 7% de B (7 min.), 20% de B (50 min.), 45% de B (70 min.), 100% de B (85 min.), mantido a 100% de B durante 10 minutos e diminuindo para 5% de B (100 min.). A coluna foi mantida sob temperatura constante de 28°C e os cromatogramas foram analisados utilizando-se o software Class-VP®.

3.12 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS)

A cromatografia gasosa é um método utilizado para a separação de compostos volatilizáveis de uma mistura. Inicialmente a amostra é vaporizada e injetada em uma coluna cromatográfica, eluindo através desta por meio de um gás de arraste (fase móvel) até ser transferida para um detector de espectrômetro de massas. Neste último, ocorre a ionização dos eluatos, cujos íons são fragmentados e posteriormente separados de acordo com os valores da razão massa/carga (m/z). Esses íons fragmentados e suas abundâncias representam um *fingerprint* do composto, permitindo assim, a identificação e determinação da concentração de elementos presentes na amostra (AQUINO NETO; SILVA; NUNES, 2003; SPARKMAN; PENTON; KITSON, 2011; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

3.12.1 Derivatização das amostras

A derivatização é um procedimento que antecede a análise em cromatografia gasosa, a qual permite aumentar a volatilidade de alguns compostos (SPARKMAN; PENTON; KITSON, 2011). Nesse tratamento, 2 mg de extrato/fração ativa foram adicionados em um *vial* e diluídos em 100 μL do reagente derivatizante (N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida). Esses *vials* foram mantidos em estufa durante 15 minutos a 70°C, e após esse período o reagente foi evaporado sob fluxo de gás nitrogênio. Em seguida, foram adicionados 600 μL de hexano em cada *vial*, sendo os mesmos agitados. Na sequência o sobrenadante coletado foi transferido para outro *vial* e, então, injetado no cromatógrafo gasoso.

3.12.2 Análise por GC/MS

Para esta análise a amostra foi injetada em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas. Foi utilizada uma coluna capilar (30m x 0,25 mm x 0,25 μm) e Hélio como gás de arraste. O volume de injeção foi de 0,4 μL no modo *splitless* e foi utilizada a seguinte programação de temperatura: início a 70°C durante 5 minutos, subindo de 10 em 10°C até 250°C, permanecendo por 10 minutos, e subindo novamente de 10 em 10°C até a temperatura de 310°C, totalizando 49 minutos de análise por amostra. As temperaturas do injetor, da interface e do detector foram de 250, 250 e 230°C, respectivamente. O detector operou no modo *scanning* (m/z 15-800) e a integração dos picos foi feita por meio do software LabSolutions-GCMS. Os compostos foram identificados por comparação com padrões e pela biblioteca Willey®8.

Para um melhor entendimento das etapas do presente trabalho, as mesmas foram apresentadas em um fluxograma na Figura 2.

Figura 2 - Fluxograma com as etapas do presente trabalho

3.13 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial, sendo 10x2 (10 resíduos x 2 concentrações) e 6x4 (6 resíduos x 4 concentrações) para os dados de porcentagem de inibição do crescimento micelial do EB e do EP, respectivamente, e 6x2 (6 resíduos x 2 extratos) para os dados da análise do teor de compostos fenólicos totais. Os resultados foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) e, na sequência, as médias foram comparadas através do teste de Tukey, a 10% de probabilidade. Em função da natureza dos dados, utilizou-se a transformação arcsen (raiz/100) para os resultados dos ensaios de inibição *in vitro*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade antifúngica dos extratos brutos (EB) dos resíduos agroindustriais

Após o processo de extração foi obtido o rendimento dos extratos para cada resíduo, cujos valores estão apresentados na Figura 3. O EB de caju apresentou o maior rendimento (49,1%), seguido dos extratos de semente de abacate (40%), engaço de uva Chenin Blanc (CB) (39%) e bagaço de manga (38,5%). Os menores valores foram encontrados para as amostras de casca de abacate (12,6%), bagaço de uva (13,8%) e maracujá (14,6%).

Figura 3 - Rendimento obtido dos extratos brutos (EB) dos resíduos agroindustriais

Esses extratos foram então aplicados em meio de cultura e avaliados quanto a capacidade de inibição do crescimento micelial dos fungos *Phomopsis* sp., *F. pallidroseum*, *C. dematium* e *R. solani*, cujos resultados estão apresentados na Tabela 2.

Analisando o efeito dos extratos por fungo, na concentração de 500 ppm, observou-se que para *Phomopsis* sp., a semente de abacate apresentou o maior índice de inibição com 35,53%, seguido dos resíduos de casca de abacate, abacaxi e maracujá, com 20,77, 16,48 e 16,30%, respectivamente. Tais valores decresceram com o aumento da concentração, exceto para os resíduos de semente de abacate e maracujá. Sendo assim, na concentração de 2000 ppm, o resíduo com o melhor resultado foi o de semente de abacate com 47,14%, seguido do de café, com 32,65% de inibição. Para os resíduos de caju, 500 ppm, e bagaço de uva, em ambas as concentrações, não foi observado nenhum efeito.

Tabela 2 - Porcentagem de inibição dos extratos brutos (EB) de resíduos agroindustriais para os fungos *Phomopsis* sp., *F. pallidroseum*, *C. dematium* e *R. solani* nas concentrações de 500 e 2000 ppm

Amostras	<i>Phomopsis</i> sp.		<i>F. pallidroseum</i>		<i>C. dematium</i>		<i>R. solani</i>	
	500	2000	500	2000	500	2000	500	2000
Abacate C. ¹	20,77 Aab	7,69 Ac	35,05 Aa	27,75 Ab	1,43 Ab	3,94 Ab	0,00 Bc	7,16 Ab
Abacate S. ²	35,52 Aa	47,14 Aa	30,92 Ba	49,05 Aa	14,90 Ba	35,50 Aa	60,10 Ba	94,12 Aa
Abacaxi	16,48 Aab	12,72 Abc	1,35 Ab	0,49 Ac	0,00 Ab	0,00 Ab	3,80 Abc	0,00 Ab
Café	9,91 Bbc	32,65 Aab	8,22 Ab	3,07 Ac	0,00 Ab	0,00 Ab	0,00 Ac	2,43 Ab
Caju	0,00 Bc	9,71 Ac	4,59 Ab	1,13 Ac	4,50 Ab	2,73 Ab	1,97 Ac	2,86 Ab
Manga	2,48 Ac	5,62 Ac	6,58 Ab	5,30 Ac	1,27 Ab	2,86 Ab	0,00 Ac	0,83 Ab
Maracujá	16,30 Aab	18,36 Abc	2,95 Ab	5,78 Ac	0,77 Ab	0,06 Ab	4,77 Ab	0,00 Ab
Uva BPV ³	0,00 Ac	0,00 Ac	0,45 Bb	34,93 Aab	4,05 Ab	7,05 Ab	0,00 Ac	0,00 Ab
Uva ECB ⁴	8,36 Abc	4,16 Ac	0,00 Ab	6,09 Ac	0,00 Ab	0,49 Ab	0,00 Ac	0,00 Ab
Uva EPV ⁵	11,91 Abc	10,64 Ac	2,35 Ab	6,37 Ac	0,00 Ab	0,00 Ab	0,00 Ac	0,38 Ab
CV	62,04		57,80		67,20		66,65	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas, para cada fungo, e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade.

¹Casca de abacate; ²Semente de abacate; ³Bagaço de uva cv. Petit Verdot; ⁴Engaço de uva cv. Chenin Blanc; ⁵Engaço de uva cv. Petit Verdot.

Compostos antifúngicos têm sido encontrados em abacate, destacando-se nas folhas e cascas de frutos imaturos (ADIKARAM et al., 1992; CARMAN; HANDLEY, 1999). Adikaram et al. (1992) analisaram frutos imaturos de abacate cv. Green e, destes isolaram e identificaram três compostos com atividade antifúngica, os quais, segundo os autores, já haviam sido detectados em extratos de sementes. Em experimento realizado por Prusky et al. (1982) os autores isolaram, de cascas de frutos verdes, um composto pré-formado (dieno), o qual inibiu *in vitro* o crescimento vegetativo e a germinação de esporos do patógeno *C. gloeosporioides*. Os autores verificaram ainda diferentes concentrações do composto entre cascas de frutos imaturos e maduros, sendo a concentração do mesmo maior em frutos verdes.

No presente trabalho foram analisados resíduos de frutos maduros de abacate, o que poderia justificar o fato de ter sido encontrado maior potencial antifúngico para a semente em relação à casca do fruto.

Atividade antifúngica também já foi relatada para amostras de maracujá e abacaxi. Encontrado em quantidades significativas em sementes de maracujá e em uvas cv. Cabernet Sauvignon (BAVARESCO et al., 2002; MATSUI et al., 2010), o estilbeno piceatannol

já foi descrito na literatura como sendo uma fitoalexina também presente em cana-de-açúcar, capaz de inibir o crescimento de *Colletotrichum falcatum* (BRINKER; SEIGLER, 1991). Em muitos trabalhos, peptídeos antifúngicos têm sido comumente relacionados à ação fungitóxica encontrada para sementes de maracujá (PELEGRINI et al., 2006; LAM; NG, 2009).

No estudo realizado por Yi et al. (2006), os autores encontraram na casca de abacaxi os compostos fenólicos, ácido gálico, catequina, epicatequina e ácido ferúlico, porém, na polpa e cilindro central da fruta foram detectados apenas os dois últimos. Zabka e Pavela (2013), analisando o potencial antifúngico *in vitro* de 21 compostos fenólicos verificaram efeito para os ácidos gálico e ferúlico sobre o crescimento micelial dos fungos *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *P. brevicompactum*, *P. expansum*, *A. flavus* e *A. fumigatus*, sendo que os maiores índices de inibição foram encontrados para o ácido ferúlico. Os compostos catequina e epicatequina também já foram relatados na literatura como potenciais antifúngicos (TERRY et al., 2004; BÁIDEZ et al., 2006). Além destes, o efeito de proteínas antifúngicas do fruto já foram descritos (TAIRA; TOMA; ISHIHARA, 2005; LÓPEZ-GARCIA; HERNÁNDES; SEGUNDO, 2012).

Rizvi et al. (1980) avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* do composto 1,3,7-Trimetilxantina (cafeína), isolado de sementes de café, contra fungos dos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Helmintoporum* (hoje denominado *Phaeosphaeria*) e *Syncephalastrum*. Este composto, também encontrado na casca de café (BAGGIO, 2006), foi capaz de inibir o crescimento micelial de todos os fungos testados na concentração de 4000 ppm.

De acordo com os resultados da Tabela 2, para *F. pallidroseum*, na concentração de 500 ppm, os maiores índices de inibição foram encontrados com a aplicação dos resíduos de casca e semente de abacate, sendo estes de 35,05 e 30,92%, respectivamente, os quais não diferiram estatisticamente, porém foram diferentes dos demais. Com o aumento da concentração para 2000 ppm, houve diminuição do efeito inibitório da casca, cujo resultado ficou abaixo dos observados para semente de abacate e bagaço de uva.

Mendoza et al. (2013b) estudaram a atividade antifúngica de extratos de bagaço de uva, de uma mistura de cultivares chilenas (Cabernet Sauvignon, Carménère e Syrah), como um método alternativo no controle de *B. cinerea*, fungo responsável por perdas significativas em videiras. Os autores avaliaram *in vitro* o efeito inibitório dos extratos sobre o crescimento micelial do fungo e germinação dos conídios e obtiveram resultados satisfatórios para o primeiro. Estudo semelhante foi realizado com antocianinas, extraídas do bagaço de uva, e resveratrol. Os autores verificaram efeito dos compostos na

inibição do crescimento micelial *in vitro* de *B. cinerea*, sendo que o resveratrol inibiu também a germinação de conídios (ADRIAN et al., 1997; MENDOZA et al., 2013a).

Para o fungo *C. dematium* (Tabela 2), o maior efeito inibitório encontrado, nas duas concentrações testadas, foi para o extrato de semente de abacate, os quais diferiram significativamente dos demais. Para os demais resíduos, nas concentrações de 500 e 2000 ppm, os resultados ficaram abaixo de 5 e 10% de inibição, respectivamente, sendo nulos para abacaxi, café e engaço de uva (PV) nas duas concentrações.

Para *R. solani* a maior porcentagem de inibição encontrada também foi referente a aplicação do extrato de semente de abacate, sendo que na concentração de 2000 ppm a inibição foi de quase 95%. Os demais resíduos apresentaram baixo ou nenhum efeito na inibição do patógeno (Tabela 2).

Wehner, Bester e Kotzé (1982) analisaram *in vitro* o efeito de extratos metanólicos de raízes, folhas e frutos (casca, mesocarpo e semente) de abacate, no controle do crescimento de patógenos radiculares e de pós-colheita da cultura. Os melhores resultados foram obtidos com o extrato de folha, sendo que para casca e semente, para os fungos *R. solani*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *C. gloeosporioides* e *P. perseae* o efeito foi nulo ou pouco significativo.

Portanto, os maiores índices de inibição para todos os fungos foram obtidos com a aplicação do extrato de semente de abacate. A única exceção foi para *F. pallidoroseum*, na concentração de 500 ppm, em que o efeito da casca de abacate foi estatisticamente igual ao da semente. Quanto as concentrações, quando estatisticamente diferentes, observou-se maiores índices de inibição para a de 2000 ppm.

4.2 Atividade antifúngica dos extratos brutos semi-purificados com a resina XAD-2

O rendimento dos extratos semi-purificados (EP), obtidos após o tratamento dos extratos brutos (EB) com a resina Amberlite XAD-2, estão apresentados na Figura 4. Com os maiores rendimentos ficaram os extratos de casca e semente de abacate, com 19,36 e 5,88%, respectivamente. Entre os de menor rendimento ficaram os resíduos de abacaxi, maracujá, manga e caju, cujos valores foram de 1,10, 1,10, 0,68 e 0,20%, respectivamente. Os demais resíduos mostraram resultados intermediários entre 1,23 e 1,92%.

O baixo rendimento encontrado para os resíduos de abacaxi, maracujá, manga e caju pode ser explicado pelo alto teor de açúcar encontrado nessas amostras. Nas análises do teor de açúcares totais realizadas por outros autores, foi observado cerca de 36% para bagaços de

abacaxi e caju, 8% para casca de maracujá e aproximadamente 10% para polpa de manga, enquanto que para polpa de abacate esse valor foi próximo de 6% (COSTA et al., 2007; UCHOA et al., 2008; FARAONI; RAMOS; STRINGHETA, 2009; GOUVEIA et al., 2015).

Figura 4 - Rendimento obtido dos extratos brutos submetidos à purificação com resina Amberlite XAD-2, denominados extratos semi-purificados (EP)

Dessa maneira, somente foram selecionados para as etapas seguintes os resíduos com rendimento igual ou superior a 1,2%, haja vista a limitação de material para a continuidade do trabalho. Assim, os EP dos resíduos de abacaxi, caju, maracujá e manga não foram analisados quanto à atividade antifúngica, enquanto que o resultado encontrado para os demais estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Porcentagem de inibição dos extratos semi-purificados (EP) de resíduos agroindustriais para os fungos *Phomopsis* sp., *F. pallidoroseum*, *C. dematium* e *R. solani* nas concentrações de 50, 100, 500 e 1000 ppm

Amostras	<i>Phomopsis</i> sp.				<i>F. pallidoroseum</i>				<i>C. dematium</i>				<i>R. solani</i>			
	50	100	500	1000	50	100	500	1000	50	100	500	1000	50	100	500	1000
Abacate C. ¹	19,19Aab	17,93Aa	6,72Ab	8,64Ab	4,61Bb	8,31Bbc	24,29Aab	31,34Ab	0,16Aa	1,69Aa	0,84Ab	5,83Ab	0Ac	0Ac	0Ab	1,39Ac
Abacate S. ²	24,76Aa	0,62Bab	42,12Aa	44,79Aa	16,57Ba	21,05Bab	53,30Aa	64,98Aa	5,21Ba	3,45Ba	15,71Aa	15,96Aa	18,5Ba	16,65Ba	53,02Aa	59,34Aa
Café	17,70Aab	13,57Aab	0Bb	10,47Ab	0Ab	0Ac	3,09Ac	9,16Ac	0Ba	0Ba	1,19Bb	7,81Ab	0Bc	0Bc	0Bb	6,26Ab
Uva BPV ³	7,45Ab	0Ab	0Ab	0Ab	0,70Bb	6,15Bbc	9,93Bbc	32,06Ab	0Ba	0,33Ba	10,10Aa	4,43ABb	0Ac	0Ac	0Ab	0Ac
Uva ECB ⁴	8,85Ab	0Ab	5,66Ab	0Ab	7,62Bab	40,87Aa	33,76Aa	33,50Ab	0Aa	0Aa	2,92Ab	4,04Ab	0Ac	0Ac	0Ab	0Ac
Uva EPV ⁵	8,76Ab	8,47Aab	6,37Ab	0,53Ab	4,83Bb	2,5Bc	15,33ABbc	21,64Abc	0Aa	0,71Aa	1,45Ab	0,91Ab	4,91Ab	2,66ABb	0,69Bb	0,04Bc
CV	71,2				40,38				69,51				39,87			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas, para cada fungo, e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade.

¹Casca de abacate; ²Semente de abacate; ³Bagaço de uva Petit Verdot; ⁴Engaço de uva Chenin Blanc; ⁵Engaço de uva Petit Verdot.

Para *Phomopsis* sp. os maiores índices de inibição foram encontrados para o extrato de semente de abacate, exceto para a concentração de 100 ppm, cujo resultado ficou abaixo de 1%. O extrato de bagaço de uva apresentou efeito inibitório nulo em todas as concentrações testadas, exceto na de 50 ppm, cuja porcentagem de inibição foi de 7,45%. Com exceção do extrato de semente de abacate (em 50, 500 e 1000 ppm), de maneira geral houve uma tendência de decréscimo da atividade antifúngica com o aumento de concentração para os demais resíduos (Tabela 3).

Para o fungo *F. pallidoroseum*, em geral, houve efeito positivo da concentração em relação à porcentagem de inibição. Em todas as concentrações testadas, os maiores efeitos inibitórios foram encontrados para o extrato de semente de abacate e engaço de uva (CB), exceto na de 1000 ppm, para a qual a semente diferiu significativamente das demais. Os efeitos inibitórios menos significativos foram encontrados para os resíduos de café, bagaço de uva e engaço (PV) em todas as concentrações exceto para a de 1000 ppm, em que apenas o café e o engaço de uva (PV) apresentaram os menores efeitos (Tabela 3).

Estatisticamente, para *C. dematium* houve diferença significativa entre os extratos a partir da concentração de 500 ppm, para a qual os extratos de semente de abacate e bagaço de uva apresentaram os maiores índices. Para 1000 ppm o melhor resultado foi obtido com o extrato de semente, o qual apresentou 15,96% de inibição.

Em relação ao fungo *R. solani* os maiores efeitos inibitórios foram observados com o extrato de semente de abacate, o qual atingiu aproximadamente 60% de inibição na concentração de 1000 ppm. Para este resíduo, houve a tendência de uma resposta linear entre concentração e porcentagem de inibição. O contrário foi observado para o engaço de uva (PV), em que o aumento da concentração refletiu em um decréscimo no controle do patógeno. Os extratos de engaço (CB) e bagaço de uva não inibiram, em nenhuma das concentrações testadas, o crescimento do patógeno (Tabela 3).

Dois seis resíduos selecionados, e observando a concentração de 500 ppm de ambos os extratos, EB e EP, verificou-se que as respostas foram diferentes para cada um dos fungos avaliados (Tabelas 2 e 3).

Para *C. dematium* e *R. solani* as diferenças encontradas entre os extratos (EB e EP) não foram evidentes, sendo que a maior delas para *C. dematium* foi observada entre os extratos de bagaço de uva, cujos EB e EP apresentaram 4,05 e 10,10% de inibição, respectivamente, enquanto que para *R. solani* esta foi observada entre os extratos de semente de abacate, cujas porcentagens de inibição foram de 60,10% para o EB e 53,02% para o EP.

Valores mais discrepantes foram observados para os fungos *Phomopsis* sp. e *F. pallidroseum*. Para *Phomopsis* sp. foram encontrados valores superiores para os EB, exceto para semente de abacate, em que o EB apresentou 35,52% e o EP 42,12% de inibição. O contrário foi observado para *F. pallidroseum*, para o qual o EP apresentou os maiores valores de inibição, exceto para os resíduos de casca de abacate e café.

A resina Amberlite XAD-2 é indicada para vários fins. Na área de produtos naturais é bastante utilizada para extração e fracionamento de compostos fenólicos, principalmente flavonoides, presentes em extratos de plantas e alimentos ricos em açúcares e compostos polares (FERRERES et al., 1991; TOMÁS-BARBERÁN; BLÁZKEZ; FERRERES, 1992; FERRERES et al., 1994;). Mesmo sendo uma boa alternativa, é interessante o conhecimento prévio da amostra e dos compostos de interesse, uma vez que juntamente com a retirada de açúcares podem ser também eliminados outros compostos (WESTON; MITCHELL; ALLEN, 1999). Gray (1978) verificou a incapacidade da resina em absorver proantocianidinas condensadas (taninos condensados), mostrando assim que está é incapaz de se ligar ao referido polifenol.

4.3 Compostos fenólicos totais

Os EB e EP selecionados foram analisados quanto ao teor de compostos fenólicos totais, cujos resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da análise do teor de compostos fenólicos totais, em mg equivalente ao ácido gálico (AG)/g de extrato, para os extratos brutos (EB) e semi-purificados (EP) de resíduos agroindustriais

Amostras	EB (mgAG/g)	EP (mgAG/g)
Abacate C. ¹	375,06 ± 7,75 Ba	550,97 ± 17,35 Aa
Abacate S. ²	357,17 ± 6,86 Ba	472,22 ± 7,89 Ab
Café	40,07 ± 0,81 Ad	47,56 ± 2,17 Af
Uva BPV ³	234,16 ± 11,23 Bb	376,04 ± 8,34 Ad
Uva ECB ⁴	55,27 ± 1,76 Bd	219,02 ± 4,19 Ae
Uva EPV ⁵	89,15 ± 2,10 Bc	429,92 ± 13,67 Ac

Médias ± desvio padrão

Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade.

¹Casca de abacate; ²Semente de abacate; ³Bagaço de uva Petit Verdot; ⁴Engaço de uva Chenin Blanc; ⁵Engaço de uva Petit Verdot.

Na análise do teor de compostos fenólicos, entre os EB, os melhores resultados foram obtidos para casca e semente de abacate, com 375,06 e 357,17 mg AG/g de extrato, respectivamente, cujas amostras não diferiram entre si, mas foram estatisticamente diferente das demais. Resultados intermediários foram encontrados para as amostras de bagaço e engaço de uva (PV), enquanto que as amostras de casca de café e engaço de uva (CB) apresentaram os menores valores.

Em estudo realizado por Moraes et al. (2015) os autores analisaram o teor de compostos fenólicos em diferentes porções de frutos tropicais, entre eles polpa, casca e semente de abacate. Os valores obtidos para casca (crua ou seca em estufa) foram superiores em relação a semente. O mesmo foi observado por Tremocoldi (2015) analisando porções de casca, polpa e semente de abacate cv. Hass. Melo (2010) em estudo com amostras de engaço e bagaço de uva, observou valores inferiores aos relatados por Tremocoldi (2015) para casca e semente de abacate, utilizando as mesmas condições de extração e método de análise descritos por este autor.

Quanto aos EP, o melhor resultado foi encontrado para a amostra de casca de abacate, com 550,97 mg AG/g de extrato, seguido da semente, com 472,22 mg AG/g de extrato. Os resíduos de uva apresentaram novamente resultados intermediários, enquanto o de café apresentou o menor teor, com 47,56 mg AG/g de extrato (Tabela 4).

Quando o EB e o EP foram comparados pode-se observar que a purificação levou a concentração de compostos fenólicos.

Ferreres et al. (1991) relataram o problema de interferentes, como açúcares e compostos polares, na análise e quantificação de flavonoides, visto que estes geralmente estão presentes em pequenas quantidades nas amostras. Segundo os autores, poucos flavonoides até então haviam sido detectados em mel, sendo que após a purificação e fracionamento dos compostos, aliando as técnicas da resina XAD-2 e do gel Sephadex LH-20, os autores conseguiram detectar 16 destes compostos em amostras de mel. Oldoni (2010) trabalhando com resíduos agroindustriais de uva (bagaço e engaço) e amendoim (película), também relatou a importância da remoção de interferentes por meio da resina XAD-2, para o isolamento de polifenóis bioativos.

A tendência observada na concentração de compostos fenólicos, quando do uso da resina XAD-2, não foi a mesma observada quando da avaliação da inibição do crescimento dos fungos *in vitro*. Neste, apesar das diferentes respostas observadas para cada fungo em relação aos extratos, os melhores resultados foram sempre obtidos para a semente de abacate.

Assim, o aumento do teor de fenólicos proporcionado pela resina XAD-2 para os outros resíduos, não refletiu necessariamente em aumento da atividade antifúngica.

Sagdic et al. (2011) analisaram, entre outros, o teor de compostos fenólicos totais e o potencial antifúngico de amostras de bagaço de uva de cinco cultivares, e, observaram que os melhores resultados para fenólicos foram obtidos, em ordem decrescente, para as cultivares Okuzgozu, Gamay, Kalecik karasi, Narince e Emir. Porém quanto à atividade antifúngica, as cultivares Gamay e Kalecik karasi foram as mais efetivas. Tehranifar et al. (2011), entretanto, observaram a mesma tendência entre os resultados da análise de compostos fenólicos e de atividade antifúngica, em estudo com extratos de casca, semente e folhas de romã.

4.4 Seleção da amostra/extrato de trabalho

Como mencionado anteriormente, os maiores índices de inibição foram encontrados para o extrato de semente de abacate (Tabelas 2 e 3), o qual foi então selecionado para dar continuidade ao estudo. Observou-se também, que os EB e EP obtidos a partir dessa amostra, apresentaram resultados variáveis para cada um dos fungos analisados. Sendo assim, foram escolhidos os melhores extratos para cada fungo.

Comparando os extratos na concentração de 500 ppm, observou-se que o EP apresentou maior inibição do fungo *F. pallidroseum*. O mesmo foi observado para *Phomopsis* sp. e *C. dematium*, apesar dos valores encontrados não terem sido tão discrepantes. Para *R. solani* a porcentagem de inibição obtida para o EB foi superior a do EP (Tabelas 2 e 3).

Dessa maneira, foi selecionado o EP para *F. pallidroseum* e o EB para os demais fungos (Figura 5). A escolha se justifica pelo fato da proximidade dos resultados e pela utilização deste ser economicamente mais viável, considerando uma futura aplicação.

Figura 5 - Crescimento micelial dos fungos. A. *R. solani* aos 6 dias após repicagem (DAR) em placa controle (esq.) e com extrato bruto de semente de abacate 2000 ppm (dir.). B. *Phomopsis* sp. aos 12 DAR em placas controle (esq.) e com extrato de semente de abacate 2000 ppm (dir.). C. *F. pallidoroseum* aos 6 DAR em placa controle (esq.) e com extrato semi-purificado de semente de abacate 1000 ppm (dir.). D. *C. dematium* aos 15 DAR em placa controle (esq.) e com extrato bruto de semente de abacate 2000 ppm (dir.)

4.5 Fracionamento dos extratos de semente de abacate em gel Sephadex LH-20

Os extratos selecionados, EB e EP de semente de abacate, foram submetidos ao fracionamento cromatográfico em gel Sephadex LH-20. Foram coletadas 100 alíquotas para cada um dos extratos, as quais, após revelação com anisaldeído sulfúrico e luz UV no comprimento de onda de 254 nm, foram agrupadas em nove frações para o EB (Figura 6) e 13 para o EP (Figura 7). Os valores referentes ao rendimento obtido para cada uma das frações estão apresentados nas Figuras 8 e 9.

As frações com maior rendimento foram FR 5, 8 e 4 do EB e FR 3 do EP.

Figura 6 - Placas de CCD com as alíquotas coletadas da coluna com gel Sephadex LH-20 após eluição do extrato bruto (EB) de semente de abacate. A revelação foi feita com anisaldeído sulfúrico e com luz UV a 254 nm, para agrupamento daquelas com mesmo comportamento físico-químico

Figura 7 - Placas de CCD com as alíquotas coletadas da coluna com gel Sephadex LH-20 após eluição do extrato semi-purificado (EP) de semente de abacate. A revelação foi feita com anisaldeído sulfúrico e com luz UV a 254 nm, para agrupamento daquelas com mesmo comportamento físico-químico

Figura 8 - Rendimento das frações do extrato bruto (EB) de semente de abacate obtidas através da coluna Sephadex LH-20

Figura 9 - Rendimento das frações do extrato semi-purificado (EP) de semente de abacate obtidas através da coluna Sephadex LH-20

4.6 Teste de bioautografia

Pelo teste de bioautografia verificou-se que as frações ativas, de ambos os extratos, se encontravam entre as primeiras coletadas durante o fracionamento (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 - Resultado do teste de bioautografia para as frações do extrato bruto (EB) de semente de abacate

	Frações	<i>R. solani</i>	<i>C. dematium</i>	<i>Phomopsis</i> sp.
EB	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	+	+	+
	4	+	+	+
	5	+	+	+
	6	-	-	-
	7	-	-	-
	8	-	-	-
	9	-	-	-

(-) ausência de inibição

(+) ocorrência de inibição

Tabela 6 - Resultado do teste de bioautografia para as frações do extrato semi-purificado (EP) de semente de abacate

	Frações	<i>F. pallidoroseum</i>
EP	1	-
	2	-
	3	+
	4	+
	5	-
	6	-
	7	-
	8	-
	9	-
	10	-
	11	-
	12	-
	13	-

(-) ausência de inibição

(+) ocorrência de inibição

As frações 3, 4 e 5 do EB, obtidas pelo fracionamento em gel Sephadex LH-20, mostraram-se ativas na inibição do crescimento micelial dos fungos *Phomopsis* sp. (Figura 10) e *R. solani* (Figura 11). Para *C. dematium*, observou-se além do efeito efetivo dessas frações, um efeito moderado das frações 2 e 6, nas quais houve crescimento do patógeno, porém em menor intensidade do que quando comparado as frações sem atividade (Figura 12).

Figura 10 - Teste de bioautografia para verificar a eficácia do EB de semente de abacate e frações obtidas pela coluna LH-20 no controle de *Phomopsis* sp. A. Em destaque, as frações ativas. B. Halos de inibição formados no local de aplicação dos extratos

Figura 11 - Teste de bioautografia para verificar a eficácia do EB de semente de abacate e frações obtidas pela coluna LH-20 no controle de *R. solani*. A. Em destaque, as frações ativas. B e C. Halos de inibição formados no local de aplicação dos extratos

Figura 12 - Teste de bioautografia para verificar a eficácia do EB de semente de abacate e frações obtidas pela coluna LH-20 no controle de *C. dematium*. A. Em destaque, as frações ativas. B. Frações 2 e 6 (de cima para baixo), mostrando efeito moderado no controle do patógeno. C e D. EB e FR4, respectivamente, mostrando efeito mais significativo na inibição do fungo

Das 13 frações obtidas do EP, apenas as frações 3 e 4 apresentaram efeito positivo no controle do crescimento micelial de *F. pallidroseum* (Figura 13).

Figura 13 - Teste de bioautografia para verificar a eficácia do EP de semente de abacate e frações obtidas pela coluna LH-20 no controle de *F. pallidroseum*. A. Em destaque, as frações ativas. B, C e D. Halos de inibição formados no local de aplicação dos extratos

4.7 Perfil químico dos extratos e frações por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-RF)

Tanto no EB quanto no EP, foi possível a identificação de somente dois compostos, sendo eles catequina e epicatequina (Figura 14), os quais já haviam sido descritos na literatura em amostras de abacate (WANG; BOSTIC; GU, 2010; VILLA-RODRÍGUEZ et al., 2011; TREMOCOLDI, 2015). Nas frações ativas, obtidas por meio do fracionamento com Sephadex-LH20, tanto do EB quanto do EP, não foi identificado nenhum destes compostos.

Figura 14 - Perfil cromatográfico obtido por HPLC do extrato bruto (A) e semi-purificado pela resina XAD-2 (B) de semente de abacate. As setas numeradas indicam os compostos identificados nos extratos: 1. Catequina e 2. Epicatequina

Nas frações ativas 3, 4 e 5 do EB foram detectados dois compostos majoritários em comum (Figura 15), porém não foi possível a identificação dos mesmos com os padrões disponíveis.

Figura 15 - Perfil cromatográfico obtido por HPLC das frações 3 (A), 4 (B) e 5 (C) do extrato bruto de semente de abacate obtidas por meio do fracionamento em LH-20. Os números indicam os compostos majoritários encontrados em comum nas respectivas frações ativas

A fração 3 do EB (Figura 15 A) apresentou o pico de número 1 no tempo de retenção (t_r) de 24,24 minutos e λ máx. = 265 nm, enquanto que o pico 2 no t_r de 47,94 min. e λ máx. = 264 nm, o que também corresponde a faixa espectral de absorção dos compostos fenólicos.

Já para as frações ativas do EP foram observados sete picos majoritários em comum (Figura 16), porém também não foi possível a identificação destes. Novamente, analisando a fração 3 do EP (Figura 16 B), tida como referência, obteve-se o tempo de retenção e λ máx. desses compostos. O t_r do pico 1 foi 15,39 min. e o λ máx. 280 nm, o do pico 2 foi 20,49 min. e λ máx. 275 nm, o do pico 3 foi 24,10 min. e λ máx. 266 nm, o do pico 4 foi 47,70 min. e λ máx. 263 nm, o do pico 5 foi 91,88 min. e λ máx. 263 nm, o do pico 6 foi 94,33 min. e λ máx. 265 nm e o do pico 7 foi 99,49 min. e λ máx. 264 nm. Neste caso, pode-se constatar compostos, aparentemente da classe dos fenólicos, e com um largo espectro de polaridade, haja vista os tempos de retenção que variaram de 15,39 min. para o pico 1 até 99,49 min. para o pico de número 7.

Figura 16 - Perfil cromatográfico obtido por HPLC das frações 3 (A) e 4 (B) do extrato semi-purificado da semente de abacate obtidas por meio do fracionamento em LH-20. Os números indicam os compostos majoritários encontrados em comum nas respectivas frações ativas

4.8 Análise por GC/MS

Os resultados obtidos na análise de GC/MS para o EB e o EP estão apresentados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7 - Resultado da análise de GC/MS para o extrato bruto (EB) de semente de abacate

T.R. ¹	Composto	m/z
6.071	Ácido oxálico, TMS	147(100) 73(34) 148(16) 44(14) 45(12)
13.612	Ácido succínico (TMS)	147(100) 73(73) 75(27) 148(16) 247(15)
16.805	Ácido tetrônico, tetraquis-O (Trimetilsilil)	73(100) 147(36) 292(25) 205(20) 220(16)
19.062	Ácido orótico (TMS)	254(100) 73(65) 357(62) 255(26) 358(19)
28.685	1 - Monopalmitina éter trimetilsilil	371(100) 73(86) 43(58) 57(43) 147(42)
33.603	Ácido octadecanóico, 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi] propil ester	399(100) 73(88) 57(68) 43(62) 147(50)
35.762	(-)-Epicatequina (silanizada)	368(100) 73(56) 355(46) 369(34) 650(24)
38.541	Ácido pentatrimetilsilil-trans-3- <i>o</i> -coumaroil-D-quínico	219(100) 345(79) 255(27) 147(26) 73(23)
39.989	Ácido hexatrimetilsilil-trans-3- <i>o</i> -cafeoil-D-quínico	307(100) 345(95) 447(38) 255(28) 73(21)

¹Tempo de retenção

Tabela 8 - Resultado da análise de GC/MS para o extrato semi-purificado (EP) de semente de abacate

T.R. ¹	Composto	m/z
6.019	Ácido oxálico, TMS	147(100) 73(34) 148(16) 44(14) 45(12)
13.609	Ácido bistrimetilsilil pirúvico	147(100) 73(75) 45(30) 217(17) 148(16)
16.942	Tetrasiloxano, decametil-	73(100) 207(56) 208(11) 295(10) 74(9)
19.525	6,11-Undecadieno, 1-acetoxi-3,7-dimetil-	81(100) 123(62) 41(25) 95(24) 67(20)
20.803	9-Ácido octadecenóico, 12-(acetiloxi)-, éster metílico, [R-(Z)]-	74(100) 87(70) 55(29) 41(24) 43(24)
21.044	Ácido- <i>o</i> -cumárico	293(100) 308(85) 73(78) 219(75) 249(62)
21.939	Ácido palmítico, éster trimetilsilil	73(100) 117(77) 75(73) 313(64) 132(50)
22.334	Santalol	94(100) 79(30) 122(29) 93(26) 41(19)
23.493	Ácido Linoleico (TMS)	75(100) 73(96) 81(70) 67(66) 95(50)
23.525	Ácido oleico (TMS)	73(100) 75(86) 117(66) 339(63) 129(46)
23.755	Ácido octadecanóico, TMS	73(100) 117(74) 75(70) 132(50) 43(43)
23.966	(-)-Isoaromadendreno-(V)	79(100) 41(84) 94(83) 81(78) 93(56)
25.748	Ácido deidroabiético, TMS	239(100) 73(54) 240(21) 43(16) 171(14)
28.680	1 - Monopalmitina éter trimetilsilil	371(100) 73(86) 43(58) 57(43) 147(42)
33.609	Ácido octadecanóico, 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi] propil ester	399(100) 73(88) 57(68) 43(62) 147(50)
35.816	(-)-Epicatequina (silanizada)	368(100) 73(56) 355(46) 369(34) 650(24)
38.302	Ácido pentatrimetilsilil-trans-4- <i>o</i> -coumaroil-D-quínico	219(100) 255(53) 73(19) 147(14) 401(9)
38.542	Ácido pentatrimetilsilil-trans-3- <i>o</i> -coumaroil-D-quínico	219 (100) 345(79) 255(27) 147(26) 73(23)
39.759	Ácido hexatrimetilsilil-trans-4- <i>o</i> -cafeoil-D-quínico	307(100) 255(51) 324(24) 73(17) 489(14)
40.008	Ácido hexatrimetilsilil-trans-3- <i>o</i> -cafeoil-D-quínico	307(100) 345(95) 447(38) 255(28) 73(21)

¹Tempo de retenção

Em ambos os extratos e frações ativas foram detectados açúcares, porém em quantidades menores no EP e suas frações. O mesmo foi observado por Tomás-Barberán, Blázquez e Ferreres (1992) em experimento para verificar a utilidade de resinas Amberlite XAD na retenção de flavonoides e remoção de açúcares. Os autores adicionaram em suas amostras 20% de sacarose e verificaram que, mesmo após a lavagem com água, vestígios de açúcar ainda eram encontrados nas frações finais.

Esses açúcares não foram descritos nos resultados, visto que o objetivo da presente análise era encontrar os possíveis compostos responsáveis pela atividade antifúngica das amostras. Este soluto, em quantidades elevadas, pode atuar na inibição do crescimento de alguns microrganismos devido ao aumento da pressão osmótica, o que diminui a disponibilidade de água e impede o desenvolvimento destes, porém, em quantidades moderadas pode aumentar a taxa de colonização de alguns fungos patogênicos, visto que são importantes fontes de carbono para os mesmos (VANDERPLANK, 1984; OETTERER; REGINATO-D'ARCE; SPOTO, 2006).

Dos compostos presentes em abacate, os que mais têm recebido atenção são os ácidos graxos, devido as suas propriedades nutricionais, e os compostos fenólicos (OLIVEIRA et al., 2013; DONETTI; TERRY, 2014; CALDERÓN-OLIVER et al., 2016; PEDRESCHI et al., 2016).

Em ambos os extratos foram identificados ácidos graxos, dentre eles os ácidos octadecanóico (ou ácido esteárico), palmítico, linoleico e oleico, sendo que somente o primeiro foi detectado no EB. Esses compostos foram identificados também por Tango, Carvalho e Soares (2004) em óleo extraído da polpa do fruto cv. Hass, dentre os quais predominou o ácido oleico. Massafra, Costa e Oliveira (2010) detectaram em polpas e sementes de abacate cv. Fortuna, Ouro verde e Princesa os ácidos graxos mirístico, miristoleico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico.

Os compostos fenólicos identificados em ambos os extratos foram a epicatequina, o ácido pentatrimetilsilil-trans-3-*o*-coumaroil-D-quínico e o ácido hexatrimetilsilil-trans-3-*o*-cafeoil-D-quínico. A epicatequina foi identificada, no presente estudo, tanto pela técnica de GC/MS quanto pela de HPLC. Tremocoldi (2015) analisando frações antioxidantes ativas de sementes de abacate cv. Hass e Fuerte detectou, entre outros, os compostos fenólicos epicatequina e ácido cafeoilquínico. A presença de epicatequina em amostras de casca e semente de abacate cv. Hass também foi relatada por Calderón-Oliver et al. (2016).

Os resultados referentes às frações ativas, de ambos os extratos, estão apresentados na íntegra no apêndice A. Nas Tabelas 9 e 10 estão os compostos encontrados em comum nesses materiais.

Tabela 9 - Resultado da análise em GC/MS. Compostos encontrados em comum nas frações ativas 3, 4 e 5 do extrato bruto (EB) da semente de abacate

Composto	m/z
Ácido oxálico, TMS	147(100) 73(34) 148(16) 44(14) 45(12)
Ácido palmítico, éster trimetilsilil	73(100) 117(77) 75(73) 313(64) 132(50)
1 - Monopalmitina éter trimetilsilil	371(100) 73(86) 43(58) 57(43) 147(42)
Ácido octadecanóico, 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi] propil ester	399(100) 73(88) 57(68) 43(62) 147(50)

Tabela 10 - Resultado da análise em GC/MS. Compostos encontrados em comum nas frações ativas 3 e 4 provenientes do extrato semi-purificado (EP) de semente de abacate

Composto	m/z
Ácido oxálico, TMS	147(100) 73(34) 148(16) 44(14) 45(12)
Ácido succínico (TMS)	147(100) 73(75) 45(30) 217(17) 148(16)
Tetrasiloxano, decametil	73(100) 207(56) 208(11) 295(10) 74(9)
Ácido tetrônico, tetraquis-O (Trimetilsilil)	73(100) 147(36) 292(25) 205(20) 220(16)
6,11-Undecadieno, 1-acetoxi-3,7-dimetil-	81(100) 123(62) 41(25) 95(24) 67(20)
9-Ácido octadecenóico, 12-(acetiloxi)-, éster metílico, [R-(Z)]-	74(100) 87(70) 55(29) 41(24) 43(24)
Ácido palmítico, éster trimetilsilil	73(100) 117(77) 75(73) 313(64) 132(50)
Santanol	94(100) 79(30) 122(29) 93(26) 41(19)
Ácido octadecanóico, TMS	73(100) 117(74) 75(70) 132(50) 43(43)
1 - Monopalmitina éter trimetilsilil	371(100) 73(86) 43(58) 57(43) 147(42)
Ácido octadecanóico, 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi] propil ester	399(100) 73(88) 57(68) 43(62) 147(50)

Nas três frações ativas do EB foram encontrados em comum o ácido oxálico, os ácidos graxos palmítico e octadecanóico, além do monoglicerídeo monopalmitina. O ácido oxálico, um ácido orgânico natural, tem sido descrito na literatura como um indutor de resistência (TOAL; JONES, 1999; DENG et al., 2015; ZHU et al., 2016). Em estudo realizado por Deng et al. (2015), os autores investigaram o efeito desse composto no tratamento da podridão rosa, causada por *Trichothecium roseum* na fase de pós colheita, e seus possíveis mecanismos de ação em meloeiro. Foi observada efetiva redução na severidade da doença em frutos inoculados com o patógeno, além da ativação de mecanismos de defesa, em que a atividade enzimática, o teor de metabólitos e a estrutura histológica foram significativamente melhorados ou reforçados.

Alguns ácidos graxos, por sua vez, têm sido relatados como potenciais antifúngicos. Em estudo realizado por Altieri et al. (2007) e Altieri et al. (2009), os autores verificaram efeito antifúngico variado dos ácidos graxos láurico, palmítico e mirístico, e seus monoglicerídeos monolaurina, monopalmitina e monomiristina, contra espécies de *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Efeito antifúngico de ácidos graxos também foi relatado por Walters, Walker e Walker (2003) visando a inibição do crescimento micelial de *R. solani* e *P. ultimum*.

Nas duas frações ativas do EP, entre os compostos com potencial antifúngico, novamente foram observados os ácidos graxos octadecanóico e palmítico, além do monoglicerídeo monopalmitina. Nestas também foi observada a presença de ácido tetrônico, ao qual, juntamente com seus derivados, são atribuídas várias atividades biológicas, dentre elas inseticida, antimicrobiana e antifúngica (HU et al., 2014; ABDOU et al., 2015). Hu et al. (2014) verificaram notável ação antifúngica *in vitro* de compostos derivados do ácido tetrônico contra o fungo *B. cinerea*, observando para estes, resultados muito próximos aos obtidos para o fungicida controle.

Com base nos resultados obtidos na análise de GC/MS, a atividade antifúngica encontrada para a amostra de semente de abacate poderia estar associada aos ácidos graxos e monoglicerídeos detectados tanto nos extratos como nas frações ativas, visto que esses compostos já foram relatados na literatura como potenciais antifúngicos.

5 CONCLUSÕES

Todos os resíduos agroindustriais analisados apresentam algum grau de inibição *in vitro* para os fungos *Fusarium pallidoroseum*, *Colletotrichum dematium*, *Phomopsis* sp. e *Rhizoctonia solani*. Entretanto, o resíduo mais efetivo frente aos microrganismos avaliados é o extrato da semente de abacate, principalmente para *R. solani*. Entre os compostos presentes nas frações ativas foram identificados ácidos graxos, os quais de fato têm sido reconhecidos por apresentarem atividade antifúngica. De qualquer forma, para uma efetiva elucidação dos compostos responsáveis pela atividade biológica encontrada, se faz necessário um estudo de fracionamento e isolamento bioguiado.

REFERÊNCIAS

- ABDELILLAH, A.; HOUCINE, B.; HALIMA, D.; MERIEL, C.S.; IMANE, Z.; EDDINE, S.D.; ABDALLAH, M.; DAOUDI, C.S. Evaluation of antifungal activity of free fatty acids methyl esters fraction isolated from Algerian *Linum usitatissimum* L. seeds against toxigenic *Aspergillus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, v. 3, n. 6, p. 443-448, 2013.
- ABDOU, M.M.; EL-SAEED, R.A.; ABOZEID, M.A.; ELATTAR, K.M.; ZAKI, E.G.; BARAKAT, Y.; IBRAHIM, V.; FATHY, M.; AMINE, M.; BONDOCK, S. Advancements in tetronic acid chemistry. Part 1: Synthesis and Reactions. **Arabian Journal of Chemistry**, Riyadh, 2015. doi:10.1016/j.arabjc.2015.11.004.
- ADIKARAM, N.K.B.; EWING, D.F.; KARUNARATNE, A.M.; WIJERATNE, M.K. Antifungal compounds from immature avocado fruit peel. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 93-96, 1992.
- ADRIAN, M.; JEANDET, P.; VENEAU, J.; WESTON, L.A.; BESSIS, R. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 23, n. 7, p. 1689-1702, 1997.
- AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2015. 480 p.
- AGUILAR-GONZÁLEZ, A.E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 32, p. 181-185, 2015.
- AL-DUAIS, M.; MULLER, L.; VOLKER, B.; JETSCHKE, G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostema digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 228, n. 5, p. 813-821, 2009.
- ALTIERI, C.; BEVILACQUA, A.; CARDILLO, D.; SINIGAGLIA, M. Antifungal activity of fatty acids and their monoglycerides against *Fusarium* spp. in a laboratory medium. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 44, p. 242-245, 2009.
- ALTIERI, C.; CARDILLO, D.; BEVILACQUA, A.; SINIGAGLIA, M. Inhibition of *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp. by fatty acids and their monoglycerides. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 5, p. 1206-1212, 2007.
- AQUINO NETO, F.R.; SILVA, D. NUNES, S. **Cromatografia princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 187 p.
- ARAÚJO, A.E.; MENTEN, J.O.M.; FERREIRA, A.C.B.; DIAS, C.T.S.; NÓBREGA, M.B.M.; MORELLO, C.L. Efeito de diferentes níveis de *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa, em plantas de algodão no campo e sua incidência nas sementes. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 4, p. 310-315, 2009.

ARORA, D.S.; OHLAN, D. *In vitro* studies on antifungal activity of tea (*Camellia sinensis*) and coffee (*Coffea arabica*) against wood-rooting fungi. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 37, n. 3, p. 159-165, 1997.

ÁVILA, R.A.; REZENDE, D.M.L.C.; RESENDE, I.L.C.; REZENDE, G.A.A. Trabalho rural e agrotóxicos: estudo de caso na microbacia do córrego Água Limpa, município de Campos Altos, Minas Gerais. **Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 19, p. 73-80, 2009.

BAGGIO, J. **Avaliação dos resíduos (casca e pó orgânico) de café (*Coffea arabica* L.) como provável fonte de substâncias bioativas**. 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BÁIDEZ, A.G.; GÓMEZ, P. DEL RIO, J.A.; ORTUÑO, A. Antifungal capacity of major phenolic compounds of *Olea europaea* L. against *Phytophthora megasperma* Drechsler and *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 69, n. 4-6, p. 224-229, 2006.

BARRET, D.M.; SOMOGYI, L.P.; RAMASWAMY, H.S. **Processing fruits: science and technology**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2005. 841 p.

BAVARESCO, L.; FREGONI, M.; TREVISAN, M.; MATTIVI, F.; VRHOVSEK, U.; FALCHETTI, R. The occurrence of the stilbene piceatannol in grapes. **Vitis. Journal of Grapevine Research**, Siebeldingen, Germany, v. 41, n. 3, p. 133-136, 2002.

BLOOR, S.J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. **Methods in Enzymology**, New York, v. 335, p. 3-14, 2001.

BORRÁS-LINARES, I.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; ARRÁEZ-ROMAN, D.; PALMEROS-SUÁREZ, P.A.; DEL VAL-DÍAZ, R.; ANDRADE-GONZÁLES, I.; FERNÁNDEZ-GUTIERREZ, A.; GÓMEZ-LEYVA, J.F.; SEGURA-CARRETERO, A. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidante and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 69, p. 385-394, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília, DF: Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009. 200 p.

BRINKER, A.M.; SEIGLER, D.S. Isolation and identification of piceatannol as a phytoalexin from sugarcane. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, n. 10, p. 3229-3232, 1991.

BRUM, S.S. **Caracterização e modificação química de resíduos sólidos do beneficiamento do café para a produção de novos materiais**. 2007. 152 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

CALDERÓN-OLIVER, M.; ESCALONA-BUENDÍA, H.B.; MEDINA-CAMPOS, O.N.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; PEDROZA-ISLAS, R.; PONCE-ALQUICIRA, E. Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado by-products. **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 65, p. 46-52, 2016.

CARMAN, R.M.; HANDLEY, P.N. Antifungal diene in leaves of various avocado cultivars. **Phytochemistry**, Oxford, v. 50, p. 1329-1331, 1999.

CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JUNIOR, M.; SILVA, M.S. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 36, n. 1, p. 28-34, 2011.

CASTILLO, F.; HERNÁNDEZ, D.; GALLEGOS, G.; MENDEZ, M.; RODRÍGUEZ, R.; REYES, A.; AGUILAR, C.N. *In vitro* antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 32, p. 324-328, 2010.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de fisiologia vegetal**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. 640 p.

CATANEO, C.B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L.V.; KUSKOSKI, E.M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial de produção de vinho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 93-102, 2008.

CHAPAGAIN, B.P.; WIESMAN, Z.; TSROR, L. *In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 109-115, 2007.

CHÁVEZ-QUINTAL, P.; GONZÁLES-FLORES, T.; RODRÍGUEZ-BUENFIL, I.; GALLEGOS-TINTORÉ, S. Antifungal activity in ethanolic extracts of *Carica papaya* L. cv. Maradol leaves and seeds. **Indian Journal of Microbiology**, Calcutta, v. 51, v. 1, p. 54-60, 2011.

CHEN, F.; LONG, X.; YU, M.; LIU, Z.; LIU, L.; SHAO, H. Phenolics and antifungal activities analysis in industrial crop Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) leaves. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 47, p. 339-345, 2013.

CHEN, J.; YANG, M.L.; ZENG, J.; GAO, K. New broad-spectrum antibacterial and antifungal alkaloids from *Kopsia hainanensis*. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v. 7, p. 156-160, 2014.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 453 p.

CORREIA, R.C.; ARAUJO, J.L.P. **Cultivo da mangueira**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2010. 4 p. (Sistemas de Produção, 2).

CORREIA, S.J.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1287-1300, 2006.

COSTA, J.M.C.; FELIPE, E.M.F.; MAIA, G.A.; BRASIL, I.M.; HERNANDEZ, F.F.H. Comparação dos parâmetros físico-químicos e químicos de pós-alimentícios obtidos de resíduos de abacaxi. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 38, n. 2, p. 228-232, 2007.

DENG, J.; BI, Y.; ZHANG, Z.; XIE, D.; GE, Y.; LI, W.; WANG, J.; WANG, Y. Postharvest oxalic acid treatment induces resistance against pink rot by priming in muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 106, p. 53-61, 2015.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 448 p.

DOAN, H.K.; DAVIS, R.M. Efficacy of seed treatments on viability of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* race 4 in infected cotton seed. **Crop Protection**, Guildford, v. 78, p. 178-184, 2015.

DONETTI, M.; TERRY, L.A. Biochemical markers defining growing area and ripening stage of imported avocado fruit cv. Hass. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 34, p. 90-98, 2014.

EMBRAPA. **Cultivo de soja no cerrado de Roraima**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2009. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/CultivodeSojanoCerradodeRoraima/>>

_____. **Tecnologias de produção de soja: região central do Brasil - 2005**. Londrina: Empresa Soja, 2004. 239 p. (Sistemas de Produção, 6). Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/download/publicacao/central_2005.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2015.

_____. **Tecnologias de produção de soja: região central do Brasil - 2012 e 2013**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 261 p. (Sistemas de Produção, 15). Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/download/SP15-VE.pdf>>. Acesso em: 05 dez. 2015.

EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Raven: biologia vegetal**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 876 p.

FARAONI, A.S.; RAMOS, A.M.; STRINGHETA, P.C. Caracterização da manga orgânica cultivar ubá. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 9-14, 2009.

FENILLE, R.C. **Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kuhn associado à soja no Brasil**. 2001. 152 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2001.

FENILLE, R.C.; SOUZA, N.L. Efeitos de materiais orgânicos e da umidade do solo na patogenicidade de *Rhizoctonia solani* Kuhn GA-4 HGI ao feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, n. 10, p. 1959-1967, 1999.

FERNANDES NETO, M.L.; SARCINELLI, P.N. Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição ao processo de atualização da legislação brasileira. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 69-78, 2009.

FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; SOLER, C.; GRACIA-VIGUERA, C.; ORTIZ, A.; TOMÁS-LORENTE, F. A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis. **Apidologie**, Paris, v. 25, n. 1, p. 21-30, 1994.

FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; GIL, M.I.; TOMÁS LORENTE, F. An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 56, p. 49-56, 1991.

FIGUEIREDO, L.P.; VALENTE, W.A.; DIAS, M.V.; BORGES, S.V.; PEREIRA, P.A.P.; PEREIRA, A.G.T.; CLEMENTE, P.R. Efeito da adição de suco de maracujá e tempo de cozimento sobre a qualidade de doces do albedo de maracujá em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 840-846, 2009.

FREIMAN, L.O.; SABAA SRUR A.U.O. Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelinas extraídas dos resíduos do abacaxizeiro (*Ananas comosus*, (L.) Merrill). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 170-173, 1999.

GANDHI, G.R.; IGNACIMUTHU, S.; PAULRAJ, M.G. *Solanum torvum* Swartz. fruit containing phenolic compounds shows antidiabetic and antioxidante effects in streptozotocin induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 49, p. 2725-2733, 2011.

GOULART, A.C.P. **Fungos em sementes de soja**: detecção e importância. Dourados: EMBRAPA, Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste, 1997. 51 p. (Documentos, 11).

_____. **Fungos em sementes de soja**: detecção, importância e controle. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005. 72p.

_____. **Tratamento de sementes de soja com fungicidas**: recomendações técnicas. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 1998. 32 p. (Circular técnica, 8).

GOUVEIA, H.L.; SCHAUN, J.S.; MASKE, A.; SCHEIK, L.K.; BORGES, C.D.; MENDONÇA, C.R.B. Abacate da variedade Breda: características físico-químicas e teor de lipídeos. In: SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR – ALIMENTAÇÃO E SAÚDE, 5., 2015, Bento Gonçalves. **Resumos...** Bento Gonçalves: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2015.

GRAY, J.C. Absorption of polyphenols by polyvinylpyrrolidone and polystyrene resins. **Phytochemistry**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 495-497, 1978.

GUTIERREZ, A.S.D. **Evolução do consumo de frutas processadas**. São Roque: Instituto Brasileiro de Qualidade em Horticultura - HortiBrasil, 2012. Disponível em: <http://www.hortibrasil.org.br/jnw/index.php?option=com_content&view=article&id=1026:evolucao-do-consumo-de-frutas-processadas &catid=50:comercializacao&Itemid=82>. Acesso em: 18 fev. 2014.

HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; LORINI, I. **Importância do tratamento de sementes de soja com fungicida na safra 2010/2011, ano de “La niña”**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 8 p. (Circular Técnica, 82).

HENNING, A.A.; KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J.B.; YORINORI, J.T. **Tratamento de sementes de soja com fungicidas**. Londrina: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa da Soja, 1991. 4 p. (Comunicado Técnico, 49).

HOHMANN, C.D.; CRAMER, H.; MICHALSEN, C.; KESSLER, C.; STECKHAN, N. CHOI, K.; DOBOS, G. Effects of high phenolic olive oil on cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. **Phytomedicine**, Jena, v. 22, p. 631-640, 2015.

HOMANS, A.L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 51, p. 325-327, 1970.

HU, Y.; WANG, J.; LU, A.; YANG, C. Synthesis, characterization, antifungal evaluation and 3D-QSAR study of phenylhydrazine substituted tetronic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 24, p. 3772-3776, 2014.

KANNAN, V.R.; SUMATHI, C.S.; BALASUBRAMANIAN, V.; RAMESH, N. Elementary chemical profiling and antifungal properties of cashew (*Anacardium occidentale* L.) nuts. **Botany Research International**, Deira, Dubai, v. 2, n. 4, p. 253-257, 2009.

KANWAL, Q.; HUSSAIN, I.; SIDDIQUI, H.L.; JAVAID, A. Antifungal activity of flavonoids isolated from mango (*Mangifera indica* L.) leaves. **Natural Product Research**, London, v. 24, n. 20, p. 1907-1914, 2010.

KUHNEM JUNIOR, P.R.; STUMPF, R.; SPOLTI, P.; DEL PONTE, E.M. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 4, p. 583-588, 2013.

LAM, S.K.; NG, T.B. Passiflin, a novel dimeric antifungal protein from seeds of the passion fruit. **Phytomedicine**, Jena, v. 16, p. 172-180, 2009.

LINS, S.R.O.; OLIVEIRA, S.M.A.; ALEXANDRE, E.R.; SANTOS, A.M.G.; OLIVEIRA, T.A.S. Controle alternativo da podridão peduncular em manga. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n. 3, p. 121-126, 2011.

LÓPEZ-GARCÍA, B.; HERNÁNDEZ, M.; SEGUNDO, B.S. Bromelian, a cysteine protease from pineapple (*Ananas comosus*) stem, is an inhibitor of fungal plant pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 55, p. 62-67, 2012.

LOUSADA JUNIOR, J.E.; NEIVA, J.N.M.; RODRIGUEZ, N.M.; PIMENTEL, J.C.M.; LÔBO, R.N.B. Consumo e digestibilidade de subprodutos do processamento de frutas em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n.2, p. 659-669, 2005.

MAGALHÃES, L.M.; SEGUNDO, M.A.; REIS, S.; LIMA, J.L.F.C. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 613, p. 1-19, 2008.

MAKRIS, D.P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N.K. Polyphenolic content and *in vitro* antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, p. 125-132, 2007.

MANDEL, S.; YODIM, M.B.H. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. **Free Radical Biology & Medicine**, Amsterdam, v. 37, n. 3, p. 304-317, 2004.

MASSAFERA, G.; COSTA, T.M.B.; DE OLIVEIRA, J.E.D. Composição de ácidos graxos do óleo do mesocarpo e da semente de cultivares de abacate (*Persea americana*, MILL.) da região de Ribeirão Preto, SP. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n. 2, p. 325-331, 2010.

MATSUI, Y.; SUGIYAMA, K.; KAMEI, M.; TAKAHASHI, T.; SUZUKI, T.; KATAGATA, Y.; ITO, T. Extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) seed coating high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, p. 11112-11118, 2010.

MELLO, L.M.R. de. **Vitivinicultura brasileira: Panorama 2014**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014. 6 p. (Comunicado Técnico, 175).

MELO, P.S. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais**. 2010. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; DENNY, C.; SANTOS, L.F.; FRANCHIN, M.; PEREIRA, G.E.; VIEIRA, T.M.F.S.; ROSALEN, P.S.; ALENCAR, S.M. Winery by-products: extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, Barking, v. 181, p. 160-169, 2015.

MENDOZA, L.; COTORAS, M.; VIVANCO, M.; MATSUHIRO, B.; TORRES, S.; AGUIRRE, M. Evaluation of antifungal properties against the phytopathogenic fungi *Botrytis cinerea* of anthocyanin rich-extracts obtained from grape pomaces. **Journal of the Chilean Chemical Society**, Concepción, v. 58, n. 2, p. 1725-1727, 2013a.

MENDOZA, L.; YAÑEZ, K.; VIVANCO, M.; MELO, R.; COTORAS, M. Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 43, p. 360-364, 2013b.

MIRGHANI, M.E.S.; YOSUF, F.; KABBASHI, N.A.; VEJAYAN, J.; YOSUF, Z.B.M. Antibacterial activity of mango kernel extracts. **Journal of Applied Sciences**, Faisalabad, v. 9, n. 17, p. 3013-3019, 2009.

MORAIS, D.R.; ROTTA, E.M.; SARGI, S.C.; SCHMIDT, E.M.; BONAFE, E.G.; EBERLIN, M.N.; SAWAYA, A.C.H.F.; VISENTAINER, J.V. Antioxidant activity, phenolics and UPLC-ESI(-)-MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. **Food Research International**, Essex, v. 77, p. 392-399, 2015.

MORATELLI, R.F.; THEODORO, G.F.; PRANDO, M.B.; SEHN, K.K.; RIBEIRO, S.G.S.P. Controle do tombamento de plântulas de algodoeiro, causado por *Rhizoctonia solani*, através do tratamento de sementes. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 4, p. 580-588, 2012.

MOUCO, M.A.; COELHO, R.C.; ARAUJO, J.L.P. Custo de produção e viabilidade econômica da exploração do abacate na região do vale do São Francisco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22., 2012, Bento Gonçalves. **Resumos...** Bento Gonçalves: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2012.

MUNIZ, L.B.; MATTOS, L.M.; MORETTI, C.L. **Protocolo de avaliação da qualidade química e física da cebola**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2012. 5 p. (Comunicado Técnico, 83).

OETTERER, M.; REGINATO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. 612 p.

OLDONI, T.L.C. **Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais**. 2010. 163p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

OLIVEIRA, M.C.; PIO, R.; RAMOS, J.D.; LIMA, L.C.O.; PASQUAL, M.; SANTOS, V.A. Fenologia e características físico-químicas de frutos de abacateiros visando a extração de óleo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 3, p. 411-418, 2013.

OLIVEIRA, M.S.; DORS, G.C.; SOUZA-SOARES, L.A.; BADIALE-FURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 18, n. 3, p. 267-275, 2007.

PAIVA, F.A. **Fusariose da cultura da soja**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 1999. 30 p. (Documentos, 8).

PAIVA, F.F.; GARRUTI, D.; SILVA NETO, R.M. **Aproveitamento industrial do caju**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical; SEBRAE/CE, 2000. 88 p. (Documentos, 38).

PASSOS, F.R.; REIS, M.R. Resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: revisão. **Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 23, p. 49-58, 2013.

PEDRESCHI, R.; HOLLAK, S.; HARKEMA, H.; OTMA, E.; ROBLEDO, P.; WESTRA, E.; SOMHORST, D.; FERREYRA, R.; DEFILIPPI, B.G. Impact of postharvest ripening strategies on "Hass" avocado fatty acid profiles. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 103, p. 32-35, 2016.

PELEGRINI, P.B.; NORONHA, E.F.; MUNIZ, M.A.R.; VASCONCELOS, I.M.; CHIARELLO, M.D.; OLIVEIRA, J.T.A.; FRANCO, O.L. An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seed with similarities to 2S albumin proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1764, p. 1141-1146, 2006.

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

PIMENTEL, L.D.; SANTOS, C.E.M.; FERREIRA, A.C.C.; MARTINS, A.A.; WAGNER JÚNIOR, A.; BRUCKNER, C.H. Custo de produção e rentabilidade do maracujazeiro no mercado agroindustrial da zona da mata mineira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 397-407, 2009.

PLODPAI, P.; CHUENCHITT, S.; PETCHARAT, V.; CHAKTHONG, S. VORAVUTHIKUNCHAI, S.P. Anti-*Rhizoctonia solani* activity by *Desmos chinensis* extracts and its mechanism of action. **Crop protection**, Guildford, v. 43, p. 65-71, 2013.

PRUSKY, D.; KEEN, N.T.; SIMS, J.J.; MIDLAND, S.L. Possible involvement of an antifungal diene in the latency of *Colletotrichum gloeosporioides* on unripe avocado fruits. **Postharvest Pathology and Mycotoxins**, St. Paul, v. 72, n.12, p. 1578-1582, 1982.

PRUSKY, D.; KEEN, N.T. Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, n. 2, p. 114-119, 1993.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RIZVI, S.J.H.; JAISWAL, V.; MUKERJI, D.; MATHUR, S.N. Antifungal properties of 1,3,7-Trimethylxanthine, isolated from *Coffea arabica*. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 67, p. 459-469, 1980.

ROGÉRIO, M.C.P.; BORGES, I.; NEIVA, J.N.M.; RODRIGUEZ, N.M.; PIMENTEL, J.C.M.; MARTINS, G.A.; RIBEIRO, T.P.; COSTA, J.B.; SANTOS, F.C.; CARVALHO, F.C. Valor nutritivo do resíduo da indústria processadora de abacaxi (*Ananas comosus* L.) em dietas para ovinos. 1. Consumo, digestibilidade aparente e balanços energético e nitrogenado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 3, p. 773-781, 2007.

SAGDIC, O.; OZTURK, I.; OZKAN, G.; YETIM, H.; EKICI, L.; YILMAZ, M.T. RP-HPLC-DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. **Food Chemistry**, Barking, v. 126, p. 1749-1758, 2011.

SALES, M.D.C.; COSTA, H.B.; FERNADES, P.M.B.; VENTURA, J.A.; MEIRA, D.D. Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, v. 6, n. 1, p. 26-31, 2016.

SAMSON, J.A. **Tropical fruits**. Essex: Longman Scientific & Technical, 1986. p. 44-56.

SANCHES, N.F.; MATOS, A.P. **Abacaxi: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2013. 196 p.

SANTAMARINA, M.P.; ROSELLÓ, J.; GIMÉNEZ, S.; BLÁZQUEZ, M.A. Commercial *Laurus nobilis* L. and *Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry essential oils against post-harvest phytopathogenic fungi on rice. **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 65, p. 325-332, 2016.

SANTOS, R.P.; SANTIAGO, A.A.X.; GADELHA, C.A.A.; CAJAZEIRAS, J.B.; CAVADA, B.S.; MARTINS, J.L.; OLIVEIRA, T.M.; BEZERA, G.A.; SANTOS, R.P.; FREIRE, V.N. Production and characterization of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Food Engineering**, London, v. 79, p. 1432-1437, 2007.

SANTOS, R.P.; MARINHO, M.M.; SÁ, R.A.; MARTINS, K.L.; TEIXEIRA, E.H.; ALVES, F.C.S.; RAMOS, V.S.C.; SOUZA, G.S.; CAVADA, B.S.; SANTOS, R.P. Compositional analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ash and its *in vitro* antifungal activity against *Fusarium* species. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 2, p. 200-205, 2011.

SCHURT, D.A.; RODRIGUES, F.A.; REIS, R.D.; MOREIRA, W.R.; SOUZA, N.F.A.; SILVA, W.A. Resistência física de bainhas de plantas de arroz supridas com silício e infectadas por *Rhizoctonia solani*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 37, n. 4, p. 281-285, 2012.

SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. **Soja: do plantio a colheita**. Viçosa: UFV, 2001. 333 p.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 628 p.

SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 480 p.

SORIANO, J.M.; DRAGACCI, S. Occurrence of fumonisins in foods. **Food Research International**, Essex, v. 37, p. 985-1000, 2004.

SPARKMAN, O.; PENTON, Z.; KITSON, F.G. **Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide**. Oxford: Elsevier Science & Technology, 2011. 611 p.

SUN, L.; LIU, Y.; CHEN, B.; LIU, Q. New phenolic compounds from the seeds of *Nigella glandulifera* and their inhibitory activities against human cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 25, p. 3864-3866, 2015.

TAIRA, T.; TOMA, N.; ISHIHARA, M. Purification, characterization, and antifungal activity of chitinases from pineapple (*Ananas comosus*) leaf. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 69, n. 1, p. 189-196, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TANGO, J.S.; CARVALHO, C.R.L.; SOARES, N.B. Caracterização física e química de frutos de abacate visando seu potencial de extração de óleo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 17-23, 2004.

TAVELLA, L.B.; SILVA, I.N.; FONTES, L.O.; DIAS, J.R.M.; SILVA, M.I.L. O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. **Agropecuária Científica no Semiárido**, Patos, v. 7, n. 2, p. 6-12, 2011.

TEGEGNE, G.; PRETORIUS, J.C.; SWART, W.J. Antifungal properties of *Agapanthus africanus* L. extracts against plant pathogens. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, p. 1052-1060, 2008.

TEHRANIFAR, A.; SELAHVARZI, Y.; KHARRAZI, M.; BAKHSH, V. J. High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 34, p. 1523-1527, 2011.

TERRY, L.A.; JOYCE, D.C.; ADIKARAM, N.K.B.; KHAMBAY, B.P.S. Preformed antifungal compounds in strawberry fruit and flower tissues. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 31, n. 2, p. 201-212, 2004.

TOAL, E.S.; JONES, P.W. Induction of systemic resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* by oxalic acid in oilseed rape. **Plant Pathology**, Oxford, v. 48, n. 6, p. 759-767, 1999.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; BLÁZKEZ, M.A.; FERRERES, F. Comparative study of different Amberlite XAD-2 resins in flavonoid analysis. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 3, p. 178-181, 1992.

TREMOCOLDI, M.A. **Caracterização, isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de abacates das cultivares Hass e Fuertes**. 2015. 113 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

UCHOA, A.M.A.; COSTA, J.M.C.; MAIA, G.A.; SILVA, E.M.C.; CARVALHO, A.F.F.U.; MEIRA, T.R. Parâmetros físico-químicos, teor de fibra bruta e alimentar de pós alimentícios obtidos de resíduos de frutas tropicais. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 58-65, 2008.

VANDERPLANK, J.E. **Disease resistance in plants**. London: Academic Press, 1984. 194 p.

VILLA-RODRÍGUEZ, J.A.; MOLINA-CORRAL, F.J.; AYALA-ZAVALA, J.F.; OLIVAS, G.I.; GONZALÉZ-AGUILAR, G.A. Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of “Hass” avocado. **Food Research International**, Essex, v. 44, p. 1231-1237, 2011.

VOGEL, A.I. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LCT, 2013. 868 p.

WALTERS, D.; RAYNOR, L.; MITCHELL, A.; WALKER, R.; WALKER, K. Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 157, n. 1, p. 87-90, 2004.

WALTERS, D.R.; WALKER, R.L.; WALKER, K.C. Lauric acid exhibits antifungal activity against plant pathogenic fungi. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p. 228-230, 2003.

WANG, W.; BOSTIC, T.R.; GU, L. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. **Food Chemistry**, Barking, v. 122, p. 1193-1198, 2010.

WANG, B.; HUANG, Q.; VENKITASAMY, C.; CHAI, H.; GAO, H.; CHENG, N.; CAO, W.; LV, X.; PAN, Z. Changes in phenolic compounds and their antioxidant capacities in jujube (*Ziziphus jujuba* Miller) during three edible maturity stages. **LWT- Food Science and Technology**, London, v. 66, p. 56-62, 2016.

WEHNER, F.C.; BESTER, S.; KÓTSE, J.M. Sensitivity of fungal pathogens to chemical substances in avocado trees. **South African Avocado Growers' Association Yearbook**, Tzaneen, v. 5, p. 32-34, 1982.

WESTON, R.J.; MITCHELL, K.R.; ALLEN, K.L. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. **Food Chemistry**, Barking, v. 64, p. 295-301, 1999.

XIAO, Z.; FANG, L.; NIU, Y.; YU, H. Effect of cultivar and variety on phenolic compounds and antioxidant activity of cherry wine. **Food Chemistry**, Barking, v. 189, p. 69-73, 2015.

YI, X.; WEI, B.; TENG, J.; GAO, C. Determination of the phenolic compounds in pineapple by high-performance liquid chromatography. **Shipin Yu Fajiao Gongye**, Beijing, v. 32, p. 99-101, 2006.

ZABKA, M.; PAVELA, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**, Oxford, v. 93, p. 1051-1056, 2013.

ZABKA, M.; PAVELA, R.; SLEZAKOVA, L. Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 250-253, 2009.

ZAMORA-NATERA, F.; GARCÍA-LÓPEZ, P.; RUIZ-LÓPEZ, M.; SALCEDO-PÉREZ, E. Composition of alkaloids in seeds of *Lupinus mexicanus* (Fabaceae) and antifungal and allelopathic evaluation of the alkaloid extract. **Agrociencia**, Montecillo, v. 42, n. 2, p. 185-192, 2008.

ZHU, Y.; YU, J.; BRECHT, J.K.; JIANG, T.; ZHENG, X. Pre-harvest application of oxalic acid increases quality and resistance to *Penicillium expansum* in kiwifruit during postharvest storage. **Food Chemistry**, Barking, v. 190, p. 537-543, 2016.

APÊNDICES

Apêndice A – Resultados da análise de GC/MS

Tabela 1 – Resultado da análise de GC/MS para a fração 3 do extrato bruto (EB) de semente de abacate

T.R. ¹	Composto	m/z
6.057	Ácido oxálico, TMS	147(100) 73(34) 148(16) 44(14) 45(12)
9.223	Trimetilsilil 3-(trimetilsililo)butanoato	73(100) 147(72) 117(48) 45(31) 75(28)
14.053	Ácido fumárico, Bis-TMS	245(100) 73(56) 147(37) 75(29) 246(21)
21.026	Ácido- <i>p</i> -cumárico	293(100) 308(85) 73(78) 219(75) 249(62)
21.913	Ácido palmítico, éter trimetilsilil	73(100) 117(74) 313(72) 75(71) 132(40)
22.070	Ácido cafeico (TMS)	73(100) 219(65) 396(49) 45(19) 397(18)
23.743	Ácido octadecanóico, TMS	73(100) 117(74) 75(70) 132(50) 43(43)
28.649	1 - Monopalmitina éter trimetilsilil	371(100) 73(86) 43(58) 57(43) 147(42)
33.576	Ácido octadecanóico, 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi] propil ester	399(100) 73(88) 57(68) 43(62) 147(50)
35.727	(-)-Epicatequina (silanizada)	368(100) 73(56) 355(46) 369(34) 650(24)
48.893	Quercetina	647(100) 648(62) 649(37) 73(21) 599(12)

¹Tempo de retenção

Tabela 2 – Resultado da análise de GC/MS para a fração 4 do extrato bruto (EB) de semente de abacate

T.R. ¹	Composto	m/z
6.006	Ácido oxálico, TMS	147(100) 73(34) 148(16) 44(14) 45(12)
9.223	Trimetilsilil 3-(trimetilsililo)butanoato	73(100) 147(72) 117(48) 45(31) 75(28)
13.598	Ácido succínico (TMS)	147(100) 73(73) 75(27) 148(16) 247(15)
16.991	Ácido tetrônico, tetraquis-O (Trimetilsilil)	73(100) 147(36) 292(25) 205(20) 220(16)
23.744	Ácido octadecanóico, TMS	73(100) 117(74) 75(70) 132(50) 43(43)
28.657	1 - Monopalmitina éter trimetilsilil	371(100) 73(41) 147(31) 239(28) 372(28)
29.652	Ácido palmítico, éter trimetilsilil	73(100) 117(74) 113(72) 75(71) 132(40)
33.576	Ácido octadecanóico, 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi] propil ester	399(100) 73(88) 57(68) 43(62) 147(50)

¹Tempo de retenção

Tabela 3 – Resultado da análise de GC/MS para a fração 5 do extrato bruto (EB) de semente de abacate

T.R. ¹	Composto	m/z
6.013	Ácido oxálico, TMS	147(100) 73(34) 148(16) 44(14) 45(12)
13.605	Ácido succínico (TMS)	147(100) 73(56) 247(21) 75(18) 148(15)
14.059	Ácido fumárico, Bis-TMS	245(100) 73(56) 147(37) 75(29) 246(21)
19.393	Ácido tetrônico, tetraquis-O (Trimetilsilil)	73(100) 147(36) 292(25) 205(20) 220(16)
28.672	1 - Monopalmitina éter trimetilsilil	371(100) 73(41) 147(31) 239(28) 372(28)
29.676	Ácido palmítico, éter trimetilsilil	73(100) 117(74) 113(72) 75(71) 132(40)
33.609	Ácido octadecanóico, 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi] propil ester	399(100) 73(88) 57(68) 43(62) 147(50)

¹Tempo de retenção

Tabela 4 – Resultado da análise de GC/MS para a fração 3 do extrato semi-purificado (EP) de semente de abacate

T.R. ¹	Composto	m/z
6.019	Ácido oxálico, TMS	147(100) 73(34) 148(16) 44(14) 45(12)
13.599	Ácido succínico (TMS)	147(100) 73(75) 45(30) 217(17) 148(16)
14.560	Ácido pentanodióico, 3-metil-3-[(trimetilsilil)oxi]-, Bis(trimetilsilil) éster	73(100) 147(34) 75(23) 247(20) 115(16)
16.932	Tetrasiloxano, decametil-	73(100) 207(56) 208(11) 295(10) 74(9)
16.992	Ácido tetrônico, tetraquis-O (Trimetilsilil)	73(100) 147(36) 292(25) 205(20) 220(16)
19.515	6,11-Undecadieno, 1-acetoxi-3,7-dimetil-	81(100) 43(96) 55(75) 82(63) 95(51)
20.794	9-Ácido octadecanóico, 12-(acetiloxi)-, éster metílico, [R-(Z)]-	74(100) 87(70) 55(29) 41(24) 43(24)
21.030	Ácido- <i>p</i> -cumárico	293(100) 308(85) 73(78) 219(75) 249(62)
21.931	Ácido palmítico, éter trimetilsilil	73(100) 117(77) 75(73) 313(64) 132(50)
22.326	Santalol	94(100) 79(30) 122(29) 93(26) 41(19)
22.876	Ácido cafeico (TMS)	73(100) 219(65) 396(49) 45(19) 397(18)
23.746	Ácido octadecanóico, TMS	73(100) 117(74) 75(70) 132(50) 43(43)
28.673	1 - Monopalmitina éter trimetilsilil	371(100) 73(86) 43(58) 57(43) 147(42)
33.601	Ácido octadecanóico, 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi] propil ester	73(100) 399(86) 57(54) 147(40) 55(32)

¹Tempo de retenção

Tabela 5 – Resultado da análise de GC/MS para a fração 4 do extrato semi-purificado (EP) de semente de abacate

T.R. ¹	Composto	m/z
6.017	Ácido oxálico, TMS	147(100) 73(34) 148(16) 44(14) 45(12)
13.609	Ácido succínico (TMS)	147(100) 73(73) 75(27) 148(16) 247(15)
13.794	Ácido etilmalônico 2TMS	147(100) 73(74) 55(34) 75(18) 148(16)
14.567	Ácido pentanodióico, 3-metil-3-[(trimetilsilil)oxi]-, Bis(trimetilsilil) éster	73(100) 147(34) 75(23) 247(20) 115(16)
16.938	Tetrasiloxano, decametil-	73(100) 207(88) 295(28) 208(20) 75(17)
16.998	Ácido tetrônico, tetraquis-O (Trimetilsilil)	73(100) 147(36) 292(25) 205(20) 220(16)
19.519	6,11-Undecadieno, 1-acetoxi-3,7-dimetil-	81(100) 43(96) 55(75) 82(63) 95(51)
20.801	9-Ácido octadecanóico, 12-(acetiloxi)-, éster metílico, [R-(Z)]-	74(100) 87(70) 55(29) 41(24) 43(24)
21.936	Ácido palmítico, éter trimetilsilil	73(100) 117(77) 75(73) 313(64) 132(50)
22.331	Santalol	94(100) 79(30) 122(29) 93(26) 41(19)
22.839	Ácido heptadecanóico, TMS	73(100) 117(71) 75(70) 132(48) 327(42)
23.494	Ácido linoleico (TMS)	73(100) 75(99) 67(65) 55(51) 81(50)
23.522	Ácido oleico (TMS)	73(100) 75(86) 117(66) 339(63) 129(46)
23.751	Ácido octadecanóico, TMS	73(100) 117(74) 75(70) 132(50) 43(43)
23.966	(-)-Isoaromadendreno-(V)	79(100) 41(84) 94(83) 81(78) 93(56)
25.751	Ácido deidroabiético, TMS	239(100) 73(54) 240(21) 43(16) 171(14)
28.682	1 - Monopalmitina éter trimetilsilil	371(100) 73(41) 147(31) 239(28) 372(28)
33.599	Ácido octadecanóico, 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi] propil ester	399(100) 73(88) 57(68) 43(62) 147(50)
38.044	Ácido hexatrimetilsilil-trans-3- <i>o</i> -cafeoil-D-quínico	307(100) 345(95) 447(38) 255(28) 73(21)
38.303	Ácido pentatrimetilsilil-trans-4- <i>o</i> -coumaroil-D-quínico	219(100) 255(53) 73(19) 147(14) 401(9)
38.544	Ácido pentatrimetilsilil-trans-3- <i>o</i> -coumaroil-D-quínico	219(100) 345(79) 255(27) 147(26) 73(23)

¹Tempo de retenção