



# LEVEDURAS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO DE PATÓGENOS DE PÓS-COLHEITA EM CITROS

Katia Cristina Kupper<sup>1,2,\*</sup>, Vanessa Santos Moura<sup>2</sup>,  
Fernanda Barbosa Francisco de Paula<sup>2</sup>

## RESUMO

Considerando a importância da citricultura para o país, este setor do Agro brasileiro enfrenta inúmeros problemas fitossanitários que afetam a quantidade e a qualidade dos frutos, e consequentemente os valores de mercado. Os fungos são considerados a principal causa de perdas de frutas na pós-colheita, sendo que as principais doenças que afetam os citros são: o bolor azul (*Penicillium italicum*), o bolor verde (*P. digitatum*) e a podridão azeda (*Geotrichum citri-aurantii*). O controle químico com emprego de Imazalil é o método mais efetivo para o controle dos bolores, porém, o seu uso excessivo e indiscriminado tem levado à proliferação de linhagens resistentes dos fungos, além da persistência de resíduos desse fungicida nos frutos. Embora os fungicidas guazatine e propiconazole controlem a podridão azeda, eles só apresentam registros em países da Europa, África do Sul e Austrália. Esta revisão trata, especificamente, do uso de leveduras como agentes de controle biológico como alternativa ao controle químico, sendo abordados: (i) seus principais mecanismos de ação, como competição por espaço e nutrientes; (ii) produção de sideróforos; (iii) formação de biofilme; (iv) produção de compostos antifúngicos, enzimas hidrolíticas e toxina *killer*; (v) micoparasitismo; e (vi) indução de resistência. Além disso, são apresentados e discutidos os procedimentos para o desenvolvimento e registro de bioprodutos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Geotrichum citri-aurantii*, mecanismos de ação, *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, registro de bioprodutos.

## ABSTRACT

Considering the importance of citriculture for the country, this segment of Brazilian agribusiness faces phytosanitary problems that affect quantity and quality of the fruits, reducing nutritional and market values. Fungi are considered the main cause of fruit losses in the post-harvest, and the main diseases that affect citrus are: blue mold (*Penicillium italicum*), green mold (*P. digitatum*) and sour rot (*Geotrichum citri-aurantii*). Chemical control using Imazalil is the most effective method for controlling molds, however, its excessive and indiscriminate use has led to the proliferation of resistant strains, in addition to the persistence of residues of this fungicide on the fruits. Although the fungicides guazatine and propiconazole control the sour rot, they are only registered in

YEASTS  
AS BIOLOGICAL  
CONTROL AGENTS  
OF POST-HARVEST  
PATHOGENS IN  
CITRUS

<sup>1</sup>Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento de Citricultura Sylvio Moreira, Instituto Agrônomo de Campinas, 13492-442, Cordeirópolis, SP, Brasil, <sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" /Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil. \*autor de correspondência: katia@ccsm.br

countries in Europe, South Africa and Australia. Our review deals with the use of yeasts as biological control agents as an alternative to chemical control, covering: (i) their main mechanisms of action, such as competition for space and nutrients; (ii) production of siderophores; (iii) biofilm formation; (iv) production of antifungal compounds, hydrolytic enzymes and killer toxin; (v) mycoparasitism; and (vi) resistance induction. In addition, procedures for the development and registration of bioproducts are presented and discussed.

**KEYWORDS:** *Geotrichum citri-aurantii*, mechanisms of action, *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, registration of bioproducts.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, seguido da China, União Europeia e Estados Unidos, com uma produção estimada de 16.019.990 de toneladas para a safra de 2021 (FEITOZA & GASPAROTTO 2020; IBGE 2022). Considerando a relevância econômica da citricultura para o país, é importante que se tenha conhecimento dos problemas fitossanitários que o setor enfrenta, acarretando redução da qualidade e quantidade dos frutos, afetando os valores nutricionais e, como consequência, os valores de mercado. As principais doenças que ocorrem na pós-colheita de citros são ocasionadas por fungos (SPADARO & DROBY 2016) com perdas que podem chegar a 25% e 50% da produção total, em países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente (NUNES 2012).

A fase de pós-colheita de citros é o período que transcorre desde a colheita dos frutos no campo até o seu consumo em estado *in natura*, preparado ou transformado industrialmente. Para manter a qualidade dos frutos frescos após a colheita, os mesmos devem ser armazenados sob temperatura (°T) e umidade relativa (UR) adequadas. Os frutos de laranja quando armazenados em temperaturas de 3 a 9 °C e UR de 85-90% podem esperar de 3 a 8 semanas para serem consumidos, porém, em temperatura de 20 °C, nas mesmas condições de UR, o tempo de armazenamento cai para 7 dias (VIGNEAULT & SOBRAL 2008).

Segundo Dantas et al. (2003), em um levantamento envolvendo doenças na pós-colheita de laranja Pêra, comercializada na Central de Abastecimento de Recife, observou-se uma incidência de 22% de podridões fúngicas, após cinco dias de armazenamento dos frutos em condições de temperatura ambiente. Acredita-se que, somente por meio

de um rigoroso controle de temperatura e umidade, durante o armazenamento, é que se pode obter um produto de boa qualidade ao final do período. Além disso, é importante uma adequada limpeza e desinfestação dos locais de armazenamento dos frutos, de forma a diminuir os riscos com inóculos de patógenos que acompanham a superfície da fruta originária do campo (VERO et al. 2016). Para Fischer et al. (2008), a quantidade de esporos presentes em *packing-houses* de citros influi decisivamente nos níveis de podridões, especialmente, nas provocadas por patógenos que penetram por fermento.

As principais doenças que ocorrem na fase de pós-colheita dos citros são os bolores verde e azul, causados por *Penicillium digitatum* Sacc e *P. italicum* Wehmer, respectivamente, e a podridão azeda, causada pelo fungo leveduriforme *Geotrichum citri-aurantii* (Ferraris) R. Cif. & F. Cif. (Sinônimo *Geotrichum candidum* Link) (PITT & HOCKING 1997). A ocorrência dessas doenças depende das condições climáticas e da forma de manipulação dos frutos, desde o pomar até chegar ao consumidor. A penetração dos fungos nos frutos se dá por ferimentos, ocasionados durante o manuseio, transporte e armazenamento. A colonização no sítio de infecção se dá pela liberação de enzimas, que irão atuar na decomposição de substâncias mais complexas do fruto, tornando-as assimiláveis para o fungo e, conseqüentemente, permitindo o desenvolvimento das doenças (LIU et al. 2013; NASCIMENTO et al. 2014; SPADARO & DROBY 2016; BAZIOLI et al. 2019).

O bolor verde é a principal doença de pós-colheita, ocorrendo em todas as regiões produtoras de citros do mundo, afetando principalmente laranjas e tangerinas. A infecção ocorre através de ferimentos que atuam como porta de entrada para o patógeno (LIU et al. 2013; NASCIMENTO et al. 2014). Os sin-

tomas iniciais são pontos aquosos e moles na casca do fruto, que progridem com o aparecimento de micélio branco e estruturas fúngicas, que sintetizam enzimas que degradam a parede celular do fruto (ISMAIL & ZHANG 2004). O sintoma típico é verificado com o progresso da doença com a formação de conídios de coloração verde-oliva dando o aspecto de bolor verde aos frutos (Figura 1). A temperatura ótima para desenvolvimento da doença está entre 20 e 25 °C (BURITICÁ et al. 2019).

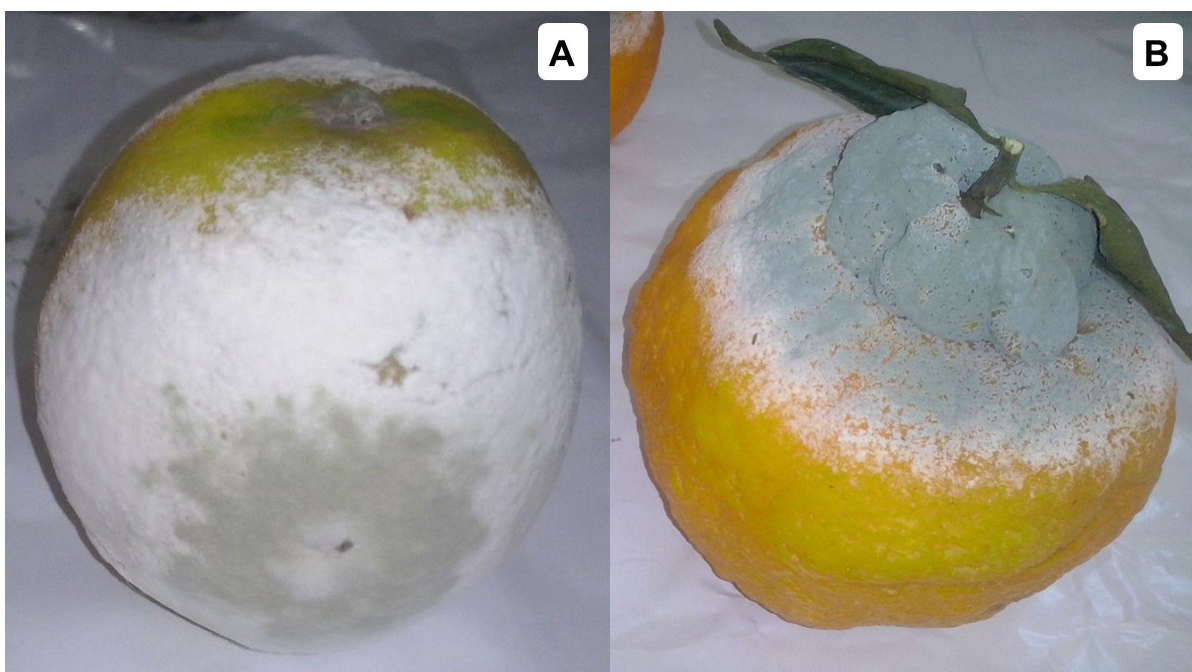
O bolor azul ocorre em todas as regiões produtoras de citros do mundo, porém em regiões com temperaturas mais elevadas (acima de 10°C) a doença é menos prevalente do que o bolor verde. Os sintomas iniciais são lesões aquosas e moles na casca do fruto, que, com o desenvolvimento de colônia de coloração branca no centro da lesão, se expandem progredindo para o rápido surgimento de esporulação de coloração azul, sempre cercado por uma fina faixa de colônia branca (Figura 1). Com o tempo, a casca da fruta é completamente envolvida pelo fungo (ISMAIL & ZHANG 2004; PALOU 2014; BURITICÁ et al. 2019). A doença tem o seu desenvolvimento ótimo em temperaturas de 22 a 24 °C, porém, é mais comum em frutas mantidas em armazenamento refrigerado, pois seus conídios podem germinar em temperaturas de até 0°C (TIMMER et al. 2000; ISMAIL & ZHANG 2004; PLAZA et al. 2003).

As espécies de *Penicillium* sobrevivem saprofiticamente em pomares e em outros ambientes, sobre vários tipos de substratos orgânicos, na fase

de conídios (LARANJEIRA et al. 2002). As infecções se originam de conídios carregados pelo vento que atingem os frutos e penetram através de ferimentos. Os bolores também podem ocorrer em pomares nos frutos em sua fase final de maturação (KIMATI et al. 1997).

A podridão azeda ou podridão ácida é favorecida por longos períodos chuvosos ou por um longo período de armazenamento e é relatada em todos os países produtores, afetando todas as espécies e cultivares de citros, principalmente as tangerinas (TALIBI et al. 2011). A doença é prevalente em condições favoráveis de 25-30 °C e umidade elevada na fase de maturação do fruto. A infecção dos frutos ocorre através de ferimentos se estendendo para o albedo. O sintoma inicial da doença ocorre pelo surgimento de lesão com aspecto de encharcamento e de coloração amarelo-escuro. Nas áreas lesionadas, a cutícula se desprende mais facilmente da epiderme formando camadas enrugadas com subsequente formação de colônia branca ou creme (Figura 2), apresentando um odor azedo característico da doença, podendo levar o fruto a uma degradação total em até quatro ou cinco dias (SUPRAPTA et al. 1995; TOURNAS 2005; LIU et al. 2009; PALOU et al. 2009).

Em uma safra, sob condições favoráveis, a porcentagem de frutos cítricos com podridões causadas por fungos pode chegar a 50% (FISCHER et al. 2007). As podridões se expressam desde a colheita até a mesa do consumidor, porém, várias medi-



**Figura 1:** Sintomas de bolores em frutos cítricos. A- Bolor verde (*Penicillium digitatum*), B- Bolor azul (*P. italicum*).





**Figura 2:** Sintoma de podridão azeda (*Geotrichum citri-aurantii*) em fruto de laranja. Fonte Mariana Nadjara Klein.

das podem ser adotadas para a redução das perdas com essas doenças e, dentre essas, o cuidado para se evitar ferimentos nos frutos durante a colheita, transporte, embalagem, armazenamento e comercialização é uma das primeiras medidas de controle. A maioria dos fungos causadores de doenças em pós-colheita encontra-se, inicialmente, no campo, na pré-colheita. Portanto, boas práticas agrícolas, como fertilização adequada, controle de pragas e podas de limpeza das plantas podem reduzir a matéria orgânica e, indiretamente, a fonte de inóculo de fitopatógenos (FISCHER et al. 2007).

Práticas sanitárias que visem eliminar frutos infectados e outras fontes de inóculo existentes nos pomares, veículos, equipamentos, materiais de colheita e transporte são medidas importantes que podem ser adotadas para minimizar a ocorrência de doenças, assim como, a higienização dos locais onde os frutos são processados e armazenados. A forma de disseminação dos patógenos é muito eficiente, podendo os conídios serem levados facilmente pelo ar e água, dentre outros veículos de transporte, tornando-se abundante nos *packing-houses*. A desinfestação dos frutos com hipoclorito de sódio tem sido uma prática usual para a diminuição da concentração de inóculo nas câmaras de armazenamento. No entanto, alguns países têm restringido o uso de produtos à base de cloro, devido à formação de produtos tóxicos quando entram em contato com ma-

teriais orgânicos, uma vez que subprodutos como os ácidos haloacéticos, compostos organoclorados e trihalometanos (THMs) são carcinogênicos (PARISH et al. 2003; CHIATTONE et al. 2008). A descontaminação de frutas cítricas com hipoclorito de sódio foi proibida pela União Europeia a partir de setembro de 2019 (Comissão de Regulamentação Europeia 2021).

O produto químico Imazalil (IMZ) ainda é o mais efetivo no controle dos bolores. Este fungicida é utilizado há mais de 25 anos, o que contribui para a proliferação de linhagens dos fungos resistentes ao princípio ativo (KINAY et al. 2007). Outro dilema se observa nos mercados importadores globalizados que vêm controlando os resíduos em produtos agrícolas e dando preferência aos frutos livres de agrotóxicos (VÉRAS 2014). Com relação à podridão azeda, embora os fungicidas guazatine e propiconazole controlem a doença, eles só apresentam registros em países da Europa, África do Sul e Austrália, não tendo registros aqui no Brasil (KELLERMAN et al. 2018; MCKAY et al., 2012; ISMAIL & ZHANG 2004). Em virtude desses problemas, muitas pesquisas e programas de controle de doenças e pragas vêm sendo priorizados tanto na pré quanto na pós-colheita e, dentre esses, a busca por métodos alternativos que potencializam, sozinhos ou, em combinação, o controle de doenças na pós-colheita de citros (DROBY et al. 2009; MOURA et al. 2019).

Dentre as alternativas ao emprego de produtos químicos, encontra-se o controle biológico, que consiste, de uma maneira simples e objetiva, no controle de um patógeno por outro microrganismo antagonista de forma direta ou indireta, pela produção de substâncias antimicrobianas ou sua ação direta sobre a planta, ativando os seus mecanismos de defesa. Quando se analisa o controle biológico no contexto da fitopatologia, deve-se entender como um processo de interação entre planta, patógeno, ambiente e uma variedade de não patógenos, que se encontram no sítio de infecção, apresentando potencial para limitar o desenvolvimento do fitopatógeno ou, induzir resistência no hospedeiro.

Dentre os agentes de biocontrole, as leveduras são potencialmente mais efetivas para o controle de patógenos que ocorrem na fase de pós-colheita, pois são mais adaptadas a esses nichos, além de serem hábeis na colonização por competirem por espaço e nutrientes (LIU et al. 2013; SPADARO & DROBY 2016).

Alguns produtos à base de leveduras já são comercializados, como Shemer®, produto a base de *Metschnikowia fructicola*, registrado em Israel e comercializado para doenças pós-colheita de batata-doce, uva, morango, pimenta e cenoura (KURTZMAN & DROBY 2001; DROBY et al. 2009). O bioproduto Nexy® (*Candida oleophila*), desenvolvido pela empresa Bionext, está registrado na Bélgica e tem sido utilizado comercialmente para controle de doenças de pós-colheita em maçã, banana e citros (ZHANG et al. 2020). Duas cepas de *Aureobasidium pullulans* foram formuladas no mesmo bioproduto, Boni-Protect® registrado na Alemanha para controle de patógenos de pós-colheita, sendo eficiente, principalmente, para *Monilia fructigena*, *P. expansum* e *Botrytis cinerea*, em maçã (WAGNER et al. 2013).

Segundo dados publicados pelo MAPA (2019), a produção de produtos biológicos para controle de pragas e fitopatógenos no Brasil cresceu mais de 70% em 2018, movimentando mais de R\$ 464 milhões, valor que supera o percentual apresentado pelo mercado internacional, sendo, o mesmo, classificado como o quarto país com melhor desempenho na produção de produtos biológicos, respondendo por 7% da comercialização mundial.

## PRINCÍPIOS BÁSICOS DA PESQUISA DE BIOCONTROLE NA PÓS-COLHEITA

Uma planta é considerada sadia quando não há alterações de suas funções fisiológicas, tais como: divisão celular, absorção e transporte de água e nutrientes, fotossíntese, etc.. Entretanto, a alteração em uma ou mais funções ocasiona seu desequilíbrio energético, e o processo contínuo dessas alterações caracteriza uma planta doente. Ressalta-se, porém, que o processo que desencadeia a doença não é a regra e, sim, a exceção (VÉRAS 2014).

O controle biológico tem como princípio básico a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença por um patógeno, realizada por meio de um ou mais organismo que não o homem (COOK & BAKER 1983). Esse tipo de controle tem se mostrado como uma alternativa promissora em substituição total ou parcial ao uso do controle químico (ZHIMO et al. 2016; MORETTO et al. 2014).

Os antagonistas são agentes de controle biológico com potencial para interferir nos processos vitais dos fitopatógenos. Podendo ser definido como **microbiocidas**, quando matam especificamente o fi-

topatógeno causador da doença; **microbiostáticos**, quando interrompem o metabolismo do patógeno sem matá-lo; **“anti-esporulantes”**, quando inibem ou previnem a produção de esporos, sem afetar o crescimento vegetativo do fitopatógeno (GARCIA 1999; MARIANO et al. 2005).

A atividade antagonista de agentes de biocontrole contra patógenos fúngicos resulta da combinação de diferentes mecanismos de ação, como: competição por espaço e nutrientes, produção de sideróforos, formação de biofilme, produção de compostos antifúngicos, produção de enzimas hidrolíticas, micoparasitismo, produção de toxina *killer* e indução de resistência. A detecção de atividade antagonista pode ser feita por meio do pareamento de colônias em placas com ágar utilizando diferentes substratos e medindo as zonas de inibição; mediante triagem dos filtrados de cultura para inibição do crescimento vegetativo e germinação de esporos de patógenos fúngicos *in vitro*; ou ainda, por intermédio de utilização de frutos e/ou folhas artificialmente feridos e co-inoculados com os antagonistas e os patógenos (EL-TARABILY & SIVASITHAMPARAM 2006). Estes ensaios *in vitro* e *in vivo* representam uma abordagem padrão e necessária para a prospecção de potenciais antagonistas, porém, nem sempre os resultados dos testes são satisfatórios, dada a complexidade das interações entre os microrganismos antagonistas e o hospedeiro e dos efeitos do ambiente (temperatura e umidade), dificultando a obtenção de bioprodutos.

Considerando as doenças que ocorrem na pós-colheita de frutas e hortaliças, as leveduras são candidatas em potencial para emprego em biocontrole, pois: (i) apresentam capacidade de colonizar facilmente os ferimentos em frutos; (ii) adaptam-se facilmente a condições de alta concentração de açúcares, alta pressão osmótica e baixo pH; (iii) não são organismos tóxicos; e (iv) podem ser tolerantes quanto à presença de fungicidas (FILONOW 1998; COELHO et al. 2003; LAHLALI et al. 2011; SPADARO & DROBY 2016).

Alguns grupos de pesquisa têm obtido resultados promissores para controle biológico de fitopatógenos de citros na pós-colheita por meio de leveduras (FERRAZ et al. 2016; CUNHA et al. 2018; KLEIN & KUPPER 2018), associadas ou não com fungicidas (LIMA et al. 2013; MORETTO et al. 2014; ZHIMO et al. 2016), contribuindo para uma produção de alimentos mais sustentável. A eficiência do uso

de leveduras no controle de patógenos causadores de doenças em frutos foi avaliada em diversos trabalhos realizados no Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa de Citrus Sylvio Moreira/IAC (Cordeirópolis/SP) e foram incluídos na Tabela 1.

## MECANISMOS DE AÇÃO DE LEVEDURAS ANTAGONISTAS COMPETIÇÃO POR ESPAÇO E NUTRIENTES

A competição é a interação entre dois ou mais organismos empenhados na mesma ação e ocorre por nutrientes (carboidratos, nitrogênio e fatores de crescimento) ou por espaço e oxigênio. É considerado o principal mecanismo de ação de leveduras contra patógenos fúngicos em pós-colheita (BLEVE et al. 2006).

Geralmente os fungos que ocorrem na pós-colheita necessitam de uma via de entrada (ferimentos, estômatos, etc.) para atingirem o tecido da planta, a fim de colonizar e causar a doença. Agentes de biocontrole devem ser capazes de competir efetivamente com o patógeno por esses locais de infecção, sendo que a falta de nutrientes, espaço ou oxigênio podem inibir a germinação, o crescimento do fitopatógeno e, conseqüentemente, diminuir a infecção. Espécies de leveduras, que atuam com-

petindo por nutrientes e espaço têm sido utilizadas como agentes de biocontrole contra vários patógenos que ocorrem em frutos na pós-colheita (DROBY et al. 2009; KUPPER et al. 2013; MORETTO et al. 2014; TALIBI et al. 2014).

De Paula (2020), ao avaliar dois isolados de *Candida stellimalicola* (ACBL-05 e ACBL-10), ambos com potencial antagonista contra *P. italicum*, verificou que um dos possíveis mecanismo de ação do isolado ACBL-05 é a competição por nutrientes, uma vez que a levedura competiu com o fungo pela fonte de carbono (sacarose a 1%). Tal fato não ocorreu quando outro isolado (ACBL-10) foi avaliado. Neste caso, a levedura inibiu a germinação de conídios do fungo em meio ágar-água, independente da adição de nutrientes. Cunha et al. (2018), ao avaliarem oito isolados de leveduras de diferentes espécies, verificaram que todos inibiram a germinação de conídios de *P. italicum* independente da concentração de glicose. Resultados similares foram relatados por Ferraz et al. (2016) em seu estudo sobre os mecanismos de ação de isolados de levedura contra *G. citri-aurantii*. Segundo esses autores, a competição por nutrientes não foi uma estratégia de biocontrole usada pelas leveduras, que apresentaram a atividade *killer* e a produção de enzimas hidrolíticas como os principais mecanismos envolvidos biocontrole.

**Tabela 1:** Exemplos do uso de espécies de leveduras no controle biológico de doenças de pós-colheita de citros

Doença/Fitopatógeno	Antagonista	Modo de ação	Referência
Bolor verde / <i>Penicillium digitatum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ACB-K1 e ACB-CR1)	Competição por espaço e nutrientes e Inibição da germinação	KUPPER et al. 2013
Bolor verde / <i>P. digitatum</i>	<i>S. cerevisiae</i> (ACB-K1)	Competição por espaço e nutrientes	MORETTO et al. 2014
Podridão azeda / <i>Geotrichum citri-aurantii</i>	<i>Rhodotorula minuta</i> , <i>Candida azyma</i> , e <i>Aureobasidium pullulans</i> (ACBL-23, ACBL-44 e ACBL-77, respectivamente)	Competição por espaço e nutrientes; Atividade <i>killer</i> e Produção de enzimas hidrolíticas	FERRAZ et al. 2016
Bolor verde / <i>P. digitatum</i>	<i>S. cerevisiae</i> (ACBL-52)	Produção de compostos voláteis	SOUZA et al. 2018
Bolor verde / <i>P. digitatum</i>	<i>S. cerevisiae</i> (ACBL-80 e ACBL-82) e <i>Meyerozyma caribbica</i> (ACBL-86)	Atividade <i>killer</i> ; Atividade enzimática e Inibição da germinação	FERRAZ et al. 2018
Bolor azul / <i>P. italicum</i>	<i>Candida stellimalicola</i> (ACBL-04, ACBL-05 e ACBL-08)	Atividade <i>killer</i> ; Produção de quitinase e Inibição da germinação	CUNHA et al. 2018
Podridão azeda / <i>G. citri-aurantii</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> (ACBL-77)	Produção de biofilme	KLEIN & KUPPER 2018
Bolor verde ( <i>P. digitatum</i> ) Podridão azeda ( <i>G. citri-aurantii</i> )	<i>A. pullulans</i> (ACBL-77)	Toxina <i>killer</i>	MOURA et al. 2021

Em estudos de Di Francesco et al. (2017 e 2018), isolados de *A. pullulans* L1 e L8 competiram por aminoácidos e por espaço com os fitopatógenos *Monilia laxa* e *B. cinerea*.

### PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS

De acordo com Chi (2012), o ferro é um elemento essencial para os microrganismos, no entanto, a forma mais abundante do elemento na natureza, é o íon férrico  $Fe^{3+}$ , que não é disponível aos microrganismos. Algumas bactérias, fungos e leveduras produzem sideróforos (do grego: “portadores de ferro”), que são quelantes específicos de íon ferro ( $Fe^{3+}$ ) de baixo peso molecular. A principal função desse composto é capturar o ferro do meio ambiente e tornar esse mineral disponível para a célula microbiana (NEILANDS 1995). Sendo assim, esta substância garante o crescimento dos microrganismos, em condições competitivas em que o ferro é um fator limitante no ambiente. Uma vez quelado este elemento no sideróforo, as células desses microrganismos recuperam o ferro por absorção (WINKELMANN 2002; THIEKEN & WINKELMANN 1992; CALVENTE et al. 2001).

Dentre os microrganismos que sintetizam sideróforos estão incluídas várias bactérias entéricas, patogênicas a humanos, a animais, a fungos e a plantas; cianobactérias e algas superiores; bactérias fixadoras de nitrogênio e alguns tipos de leveduras (BENITE et al. 2002).

Sansone et al. (2005) demonstraram que o ácido rhodotorúlico, um sideróforo produzido pela levedura *Rhodotorula glutinis*, inibiu a germinação de conídios de *B. cinerea*, causador do mofo cinzento em maçãs. Segundo Castro (2020), *A. pullulans*-ACBL-77 produz sideróforos e sua produção é aumentada com a adição de sacarose (2,5%) em meio de cultivo da levedura. De acordo com a autora, o sideróforo produzido pela levedura inibiu em 79,4% a germinação dos conídios de *P. digitatum*. Para Parafati et al. (2015) a competição por ferro foi o principal mecanismo de ação adotado pela levedura *Metschnikowia pulcherrima* contra *B. cinerea*.

### FORMAÇÃO DE BIOFILME

Para a colonização das frutas, as leveduras antagônicas devem ter propriedades específicas que facilitem sua adesão, colonização e multiplicação. Na maioria dos casos, essas características estão associadas à formação de biofilme (CHI et al. 2015). O

biofilme pode ser descrito como uma comunidade espacialmente estruturada de microrganismos, geralmente incorporada em uma matriz extracelular e aderida a uma superfície viva ou inerte (COSTERTON et al. 1999; O'TOOLE et al. 2000). A capacidade dos agentes de controle biológico de formar biofilme, criando uma barreira mecânica interposta entre a superfície da lesão e o patógeno, tem sido proposta como uma forma das leveduras interferirem na aquisição de recursos importantes para o desenvolvimento do patógeno ou pela geração de compostos com efeitos inibitórios sobre o patógeno (VERO et al. 2013; SPADARO & DROBY 2016; CAVALHEIRO & TEIXEIRA 2018; KLEIN & KUPPER 2018).

Em estudos realizados por Klein & Kupper (2018) foi possível encontrar uma correlação positiva do aumento na quantificação de biofilme produzido por *A. pullulans* (ACBL-77) em função da fonte de nutriente (sulfato de amônio a 1%), com o aumento da sua atividade antagônica contra *G. citri-aurantii* (Figura 3). Outros relatos na literatura têm mostrado o efeito da adição de micronutrientes, em meio de cultivo da levedura, na produção de biofilmes. Segundo De Paula (2020), a utilização de cloreto de cobalto (1 mM) em meio de cultivo (batata-dextrose), além de favorecer a produção de células de *C. stellimalicola* (ACBL-10), aumentou três vezes mais a produção de biofilme pela levedura e proporcionou uma maior definição dos períodos correspondentes à curva de crescimento do microrganismo; por outro lado, o isolado de *C. stellimalicola* (ACBL-05) apresentou um aumento significativo na formação de biofilme, quando cultivada em meio batata-dextrose sem acréscimo de fonte nutricional. Quando *Sporobolomyces koalae* foi cultivada em meio Sabouraud, com a adição de sulfato de cobre e/ou de sacarose, verificou-se uma maior produção de biofilme, favorecendo a atividade antagônica da levedura contra *G. citri-aurantii* (ESTEVAM 2019). Zhou et al. (2018) verificaram, por meio de microscopia eletrônica de varredura, que *Debaryomyces nepalensis* produziu biofilme na superfície do fruto de manga e que as células da levedura se uniram umas às outras se incorporando nas paredes das hifas de *Colletotrichum gloeosporioides*. Segundo os autores, a combinação de diferentes mecanismos de ação da levedura, somada à sua produção de biofilme, aumentou a sua capacidade de controlar o fitopatógeno. Wang et al. (2020) observaram que *Metschnikowia citriensis* aderiu firmemente nos fe-



rimentos de frutos cítricos, formando uma camada densa que evitou a infecção por *G. citri-aurantii*. Para os autores, os resultados indicaram que a formação de biofilme, durante a colonização do fermento, foi um importante mecanismo de ação adotado pela levedura contra o fitopatógeno.

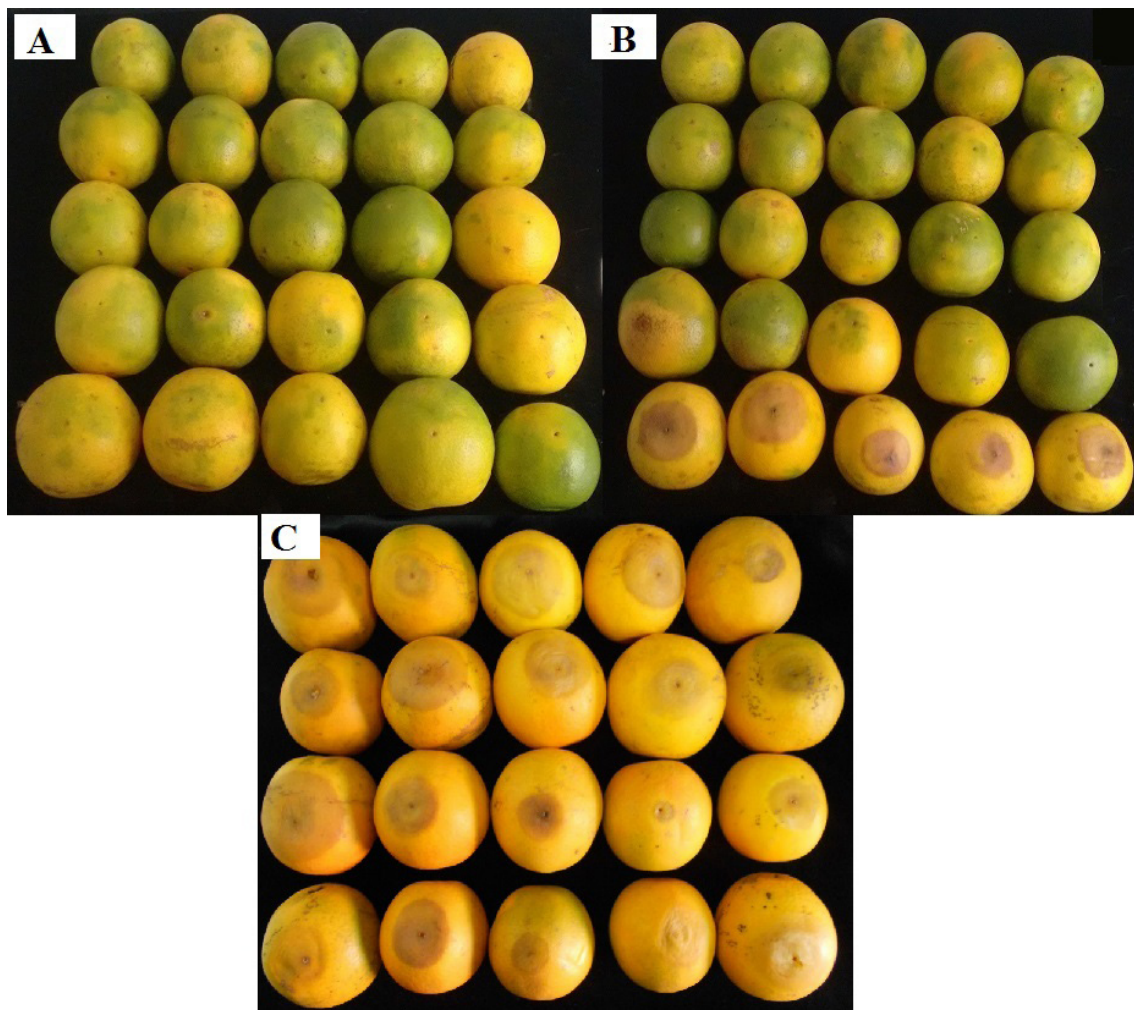
### PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS

A antibiose refere-se à produção de metabólitos secundários tóxicos por um microrganismo que apresenta efeito danoso sobre o fitopatógeno, inibindo, portanto, o seu desenvolvimento (ARRAS & ARRU 1997). Esses metabólitos podem ser denominados compostos orgânicos voláteis (COV) ou não voláteis (ASARI et al. 2016) e apresentam potencial contra diversos patógenos de pós-colheita (ALAMRI 2015; YAMAMOTO et al. 2015; ZOHORA et al. 2016).

Os COVs são substâncias antimicrobianas

produzidas por leveduras, fungos e bactérias durante seu metabolismo primário e secundário. Esses compostos apresentam baixo peso molecular, baixa polaridade e alta pressão de vapor (CONTARINO et al. 2019), podendo atuar na promoção de crescimento, indução do mecanismo de defesa da planta contra doenças ou inibir o crescimento de fitopatógenos (ZHANG et al. 2019). A produção dos COVs é biologicamente dinâmica e fortemente influenciada pela espécie microbiana, suas condições e fase de crescimento (KORPI et al. 2009). A aplicação desses compostos pode ser promissora e estável, uma vez que não é necessário o contato entre o agente de biocontrole e o patógeno para que a atividade antimicrobiana seja exercida (CONTARINO et al. 2019).

Souza et al. (2018) verificaram, por meio da análise de componentes principais, uma correlação dos perfis de metabólitos voláteis produzidos por *S.*



**Figura 3.** Frutos de laranja Pera inoculados com *Geotrichum citri-aurantii*, e tratados preventivamente com: A – *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 cultivada em meio YMM acrescido de 1% de sulfato de amônio; B - *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 cultivada em meio YMM C – testemunha (sem tratamento). Meio YMM (contendo 1 mL da solução estoque de 1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2,2%  $CaCl_2 \cdot 5H_2O$ , 2,2%  $K_2HPO_4$ , 0,2%  $FeCl_3$  em 0,1 M HCl + 10 mL de 11%  $C_5H_8NO_4Na$  + 100 mL de 10% glicose, com o volume ajustado para 1 L). Fonte: Mariana Nadjara Klein.



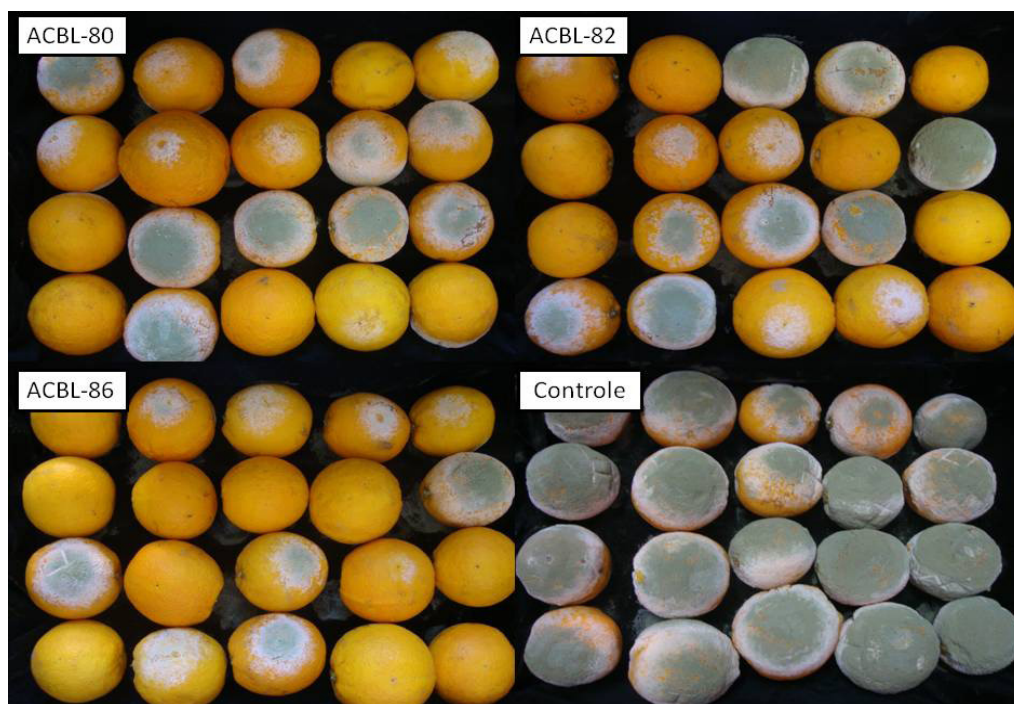
*cerevisiae* (ACBL-52) e a atividade antifúngica contra *P. digitatum*. Nove compostos foram associados ao metaboloma volátil do isolado com maior ação antagonista: propionato de etila, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, butirato de etila, acetato de 3-metilbutila, propionato de 3-metilbutila, butirato de n pentila, álcool feniletílico e acetato de 2-feniltol. Também foi relatado por outros autores que os compostos etanol, 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol de *S. cerevisiae* inibem completamente o crescimento micelial, a formação de apressório e a germinação de *Phyllosticta citricarpa* e *Guignardia citricarpa*, agentes causais da mancha preta em citros (FIALHO et al. 2011; TOFFANO et al. 2017).

Outros compostos orgânicos voláteis, obtidos a partir de leveduras, são descritos na literatura, como o acetato de etila produzido por *M. pulcherrima*, *Wickerhamomyces anomalus* e *S. cerevisiae*, que controlou o mofo cinzento (*B. cinerea*) em morango (ORO et al. 2018), e o álcool 2-feniltol produzido por *A. pullulans* no controle da podridão parda em frutos de caroço (cereja, pêssigo e damasco), causada por *Monilinia* spp. (DI FRANCESCO et al. 2020). Por outro lado, Ferraz et al. (2016) observaram que o isolado *A. pullulans*-ACBL-77 não produziu substâncias antifúngicas em quantidades suficientes para inibir o desenvolvimento de *G. citri-aurantii*.

## PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

A parede celular de fungos é composta por carboidratos, quase todos sob a forma de polissacarídeos (80 a 90%), tais como quitina,  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6-glucanas, além de proteínas e lipídios, em quantidades significativas. Entre os infortúnios ambientais enfrentados pela parede celular do microrganismo, a pressão dos antagonistas é o mais emblemático, que, em alguns casos, apresentam mecanismos para romper a parede celular e/ou interromper processos relacionados à sua síntese (PUNJA & UTKHEDE 2003).

Alguns antagonistas produzem enzimas hidrolíticas que degradam componentes da parede celular de fungos fitopatogênicos desempenhando um papel importante no processo antagonista (LIMA et al. 2000). No caso específico das leveduras, a produção e secreção dessas enzimas, com papel relevante no biocontrole, dependem do isolado do antagonista. Para Machado & Linardi (1990), o potencial de produção enzimática está mais fortemente relacionado à característica de cada isolado do que à espécie da levedura. Ferraz et al. (2018) mostraram que a produção da enzima hidrolítica quitinase pode ter sido um dos mecanismos de ação dos isolados ACBL-82 (*S. cerevisiae*) e ACBL-86 (*Meyerozyma caribbica*) contra *P. digitatum*. Tais isolados diminuíram a se-



**Figura 4** Frutos de laranja lima após aplicação dos tratamentos preventivos e inoculação com *Penicillium digitatum*. Frutos armazenados por 7 dias a 22 °C e 90% de UR. ACBL-80 (*Saccharomyces cerevisiae*); ACBL-82 (*S. cerevisiae*); ACBL-86 (*Meyerozyma caribbica*) e Controle (sem tratamento). Frutos da Empresa Lucato (packing-house). Fonte: Tatiane da Cunha.

verdade e a incidência do bolor verde em frutos de laranja Lima, quando aplicados de forma preventiva (Figura 4) (CUNHA et al. 2020).

### MICOPARASITISMO

De acordo com Owley & Windham (2010), o micoparasitismo é uma forma de parasitismo em que microrganismos fúngicos atacam outros organismos. O parasitismo depende do contato e do reconhecimento entre o antagonista e o fitopatógeno, da secreção de enzimas líticas e do crescimento do parasita no interior do hospedeiro (SPADARO & GULLINO 2004). Arras et al. (2002) observaram uma rápida colonização do micélio de *P. digitatum* por *Candida famata*, com ação lítica e fagocítica da levedura contra a hifa do fitopatógeno. A levedura *C. saitoana* apresentou parasitismo direto sobre as hifas de *P. italicum* (EL-GHAOUTH et al. 2000).

Klein & Kupper (2018) verificaram que a aplicação de *A. pullulans*, previamente cultivada em meio acrescido de sulfato de amônio (1%), favoreceu a sobrevivência da levedura em ferimentos de frutos cítricos inoculados com *G. citri-aurantii*. Por meio de microscopia eletrônica de varredura, os autores observaram acúmulo de matriz extracelular e aglomeração de células de levedura ao redor do ferimento e ao redor de hifas deformadas de *Geotrichum*, indicando um possível micoparasitismo.

Segundo Talibi et al. (2014) a ligação de antagonistas aos patógenos fúngicos combinada com a atividade de enzimas, que degradam a parede celular dos fungos permitindo a invasão pelos micoparasitas, apresentam um papel importante no biocontrole.

### PRODUÇÃO DE TOXINA KILLER

O fenômeno *killer* foi relatado pela primeira vez em isolados da levedura *S. cerevisiae* e sua associação fenotípica com a presença de herança citoplasmática viral do tipo RNA de cadeia dupla (dsRNA) marcando o início da pesquisa em virologia de levedura no início da década de 1970 (SHIMITT & BREINIG 2006). Esses autores relataram que as leveduras que secretavam toxinas proteicas eram letais para cepas sensíveis, sendo designadas como leveduras *killer*. Outros estudos evidenciaram a presença da atividade *killer* em outras espécies de levedura e fungos, incluindo, *Zygosaccharomyces bailii*, *Hanseniaspora uvarum* e *Ustilago maydis* (MAGLIANI et al. 1997; SCHMITT et al. 2002). Schaffrath & Meinhar-

dt (2005) verificaram que o fenótipo *killer* não está exclusivamente associado aos vírus de dsRNA, sendo também codificado por plasmídeos dsDNA lineares, como em *Kluyveromyces lactis* e *Pichia acácia*. Podem também ser codificados cromossomicamente e identificados em *Pichia farinosa* (SUZUKI 2005).

As vantagens de se utilizar levedura *killer* como agente de controle biológico baseiam-se em suas características adaptativas, no baixo custo para produção de grandes quantidades da levedura, na ausência de produção de compostos tóxicos e na sua capacidade de colonizar e sobreviver na superfície do fruto por longos períodos de tempo e em várias condições ambientais (KANASHIRO et al. 2020).

A eficiência da levedura *killer Saccharomyces schoenii* contra três espécies de *Penicillium* foi avaliada e os resultados mostraram uma redução de 36% na severidade da doença em frutos de laranja (KANASHIRO et al. 2020). Em estudos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Centro Avançado de Pesquisa de Citros Sylvio Moreira/IAC (Cordeirópolis/SP) observou-se a produção de toxina *killer* por *Saccharomyces cerevisiae* e *Meyerozyma caribbica*, *C. stellimalicola* e *A. pullulans* como sendo um dos mecanismos de ação empregados para o controle de *P. digitatum*, *P. italicum* e *G. citri aurantii*, respectivamente (LOPEZ et al. 2015; FERRAZ et al. 2016 e 2018; CUNHA et al. 2018; 2020). Posteriormente, pesquisas realizadas por Moura et al. (2021) com a levedura *A. pullulans*-ACBL-77 confirmaram a ação da atividade *killer* contra *G. citri-aurantii* e *P. digitatum* e relataram que a proteína *killer* produzida pertence à família das ubiquitinas. Entretanto, a atividade do fenótipo *killer* das leveduras ainda não foi elucidada, sendo um campo aberto para novas pesquisas (BAZIOLI et al. 2019).

### INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Os microrganismos podem atuar como elicitores de mecanismos de defesa das plantas, podendo reagir mais eficientemente às tentativas de colonização de fitopatógenos virulentos. O processo é desencadeado quando um sinal externo (elicitor) se liga a um possível receptor na superfície da célula vegetal e, através dele o sinal primário é transmitido para o interior da célula, ativando os mensageiros secundários, que amplificam o sinal e regulam a expressão de genes específicos, determinando o desenvolvimento de interações compatíveis (doença) ou incompatíveis (resistência) (LEITE et al. 1997).

Em síntese, a indução de resistência como mecanismo de ação de um agente de controle biológico é a capacidade de um antagonista (ou de algum metabólito produzido por ele) provocar uma resposta de defesa na planta hospedeira por meio de várias reações químicas ou bioquímicas, incluindo mudanças na estrutura do tecido e produção de proteínas relacionadas à patogênese, que podem ser expressas de forma local ou sistêmica (BAHADDU et al. 2018).

Na pós-colheita, a indução de resistência tem sido considerada como uma estratégia para promover a resistência do fruto a fitopatógenos e, conseqüentemente, reduzir os prejuízos da doença (LU et al. 2013). O aumento da resistência pela planta hospedeira, ou pelo fruto, pode ser estimulado não só pela aplicação direta dos agentes de biocontrole, mas também pela produção de suas substâncias antifúngicas (DROBY et al. 2002; NANTAWANIT et al. 2010; WELLING 2001).

A indução da resposta de defesa da planta envolve: (i) a produção de diferentes enzimas e metabólitos, como proteínas associadas à patogênese (proteínas PR), que incluem glucanases, quitinases, peroxidases, inibidores de proteínas ou proteínas de transporte de lipídios; (ii) a formação de papilas constituídas por calose e lignina depositada na parede celular, garantindo, assim, o seu fortalecimento; e (iii) a produção de compostos com atividade antimicrobiana, como fitoalexinas (CARMONA-HERNANDEZ et al. 2019). Rodov et al. (1994) observaram que a levedura *Pichia guilliermondii* induziu resistência ao bolor verde ao produzir fitoalexinas, como escoparona e escopoletina.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) com função de sinalização e efeito antimicrobiano direto (XU & TIAN 2008), o fechamento estomático (HACQUARD et al. 2017; GUO et al. 2018) e o aumento dos níveis de ácido jasmônico e ácido salicílico, hormônios que mediam as defesas da planta induzindo a expressão de genes relacionados com a patogênese (PENG et al. 2012), são alguns dos fatores que sinalizam a ocorrência do (s) mecanismo (s) de indução de defesa pela planta. O sucesso do fungo ou da planta é, em grande parte, determinado pela interação entre os distintos mecanismos de defesa (SHAH et al. 2012; DELAUNOIS et al. 2014).

Droby et al. (2002) relataram que a aplicação de *Candida oleophila* em fermentos superficiais em frutos de toranja induziu resistência sistêmica con-

tra *P. digitatum*. De acordo com os autores, a aplicação de células da levedura nos frutos aumentou a biossíntese de etileno, a atividade de fenilalanina amônia liase, o acúmulo de fitoalexina e o aumento nos níveis das enzimas quitinase e  $\beta$ -1,3-endoglucanase. Lu et al. (2013) observaram que o tratamento de pós-colheita de citros com *Rhodospiridium paludigenum* aumentou, significativamente, a atividade das enzimas relacionadas com a defesa da planta, incluindo  $\beta$ -1,3-glucanase, fenilalanina amônia liase, peroxidase e polifenoloxidase. Segundo os autores, o tratamento diminuiu a incidência e a severidade do bolor verde, resultando em reduções das infecções por *P. digitatum* de 50 a 52%.

As leveduras *Wickerhamomyces anomalus*, *M. pulcherrima* e *A. pullulans* aumentaram as atividades de peroxidase e superóxido dismutase em frutos de tangerinas, reduzindo a incidência e severidade do bolor azul (PARAFATI et al. 2016).

Moretto et al. (2014) observaram que aplicações preventivas com isolados de espécies diferentes de antagonistas, *S. cerevisiae* (ACB-K1 e ACB-CR1) e *Bacillus subtilis* (ACB-69 e ACB-84) proporcionaram controle do bolor verde em frutos de lima ácida Tahiti, sugerindo que os modos de ação empregados pelos isolados poderiam ser a competição ou a indução de resistência, considerando a especificidade da relação hospedeiro-antagonista, em relação ao controle do fitopatógeno.

## DESENVOLVIMENTO DE BIOPRODUTOS E PERSPECTIVAS PARA A INDÚSTRIA

Estudos visando à seleção de agentes de biocontrole e o desenvolvimento de formulações a base destes microrganismos podem ser uma alternativa para uma agricultura mais sustentável, com diminuição total ou parcial do uso de produtos químicos, que aplicados de modo intensivo e indiscriminado causam danos ao meio ambiente, afetando a saúde animal e humana. No entanto, o desenvolvimento de uma formulação adequada de um bioproduto é complexo, e devem ser observados aspectos, tais como: (i) tipo e características do propágulo utilizado como ingrediente ativo; (ii) condições de fermentação; (iii) características químicas e físicas dos inertes; (iv) compatibilidade dos componentes da formulação para o microrganismo; (v) estabilidade do ingrediente ativo durante o armazenamento; (vi) aumento do número de células do microrganismo; e (vii) sua eficácia após a adição de alguns revestimen-



tos e adjuvantes. Além disso, um dos fatores mais importantes é conhecer a biologia de cada microrganismo antes de iniciar qualquer processo de formulação (ABADIAS et al. 2003; MORANDI & BETTIOL 2009; CARBÓ et al. 2017).

De modo geral, a eficiência de muitos antagonistas contra patógenos da pós-colheita está diretamente relacionada com o número de propágulos aplicados sobre o fermento dos frutos (SPADARO et al. 2010). Segundo Spadaro et al. (2002), houve uma crescente redução da germinação de *B. cinerea* quando se aumentou o número de células da levedura *M. pulcherrima* aplicadas sobre frutos de maçã. Uma maneira simples de se aumentar a eficiência de um bioproduto é a aplicação de um maior número de células do microrganismo, desse modo, a produção de biomassa de leveduras é uma etapa essencial na confecção e comercialização de um biofungicida (SPADARO et al. 2010).

Os meios de cultura, assim como as condições de operação (aeração, agitação, pH e temperatura) para a produção do antagonista em escala comercial, podem afetar a qualidade e a quantidade do microrganismo. Inicialmente, para aumentar a produção de biomassa de uma levedura antagonista (em condições de laboratório) é essencial que se otimizem as condições de cultivo, utilizando diferentes fontes de nutrientes. É importante encontrar as condições ótimas para estabilização e formulação, além de desenvolver um sistema de controle de qualidade (SPADARO et al. 2010).

Outro fator importante em relação ao desenvolvimento de bioprodutos é o conhecimento dos mecanismos de ação dos antagonistas. Tal conhecimento possibilita a confecção de formulações: (i) com maior atividade antagonista e potencial de controle; (ii) mais viáveis; (iii) que permitam a elaboração de protocolos adequados de aplicação do produto; e (iv) que apresentem potencial de registro para o uso comercial (CHANCHAICHAOVIVAT et al. 2008; DI FRANCESCO et al. 2016; FERRAZ et al. 2018).

Formulações são obtidas por meio de diferentes métodos, podendo ser sólidas ou líquidas. Em relação à temperatura de armazenamento, formulações em estado desidratado ou liofilizado podem ser armazenadas em temperatura ambiente, enquanto as formulações líquidas precisam ser mantidas sob refrigeração (DROBY et al. 2016). Os produtos de formulação sólida são obtidos a partir de processos

de secagem. A secagem por spray é considerada a mais viável, devido ao baixo custo, possibilidade de armazenamento, produção em grandes quantidades, além da facilidade de transporte (AGUIRRE-GÜITRÓN et al. 2019). Nas formulações líquidas, as células dos microrganismos são acondicionadas em soluções à base de água ou óleo com diferentes protetores, aditivos e mantidas em baixa temperatura. Nessas condições, vários processos são evitados ou atrasados como, por exemplo, a divisão celular microbiana e a taxa metabólica, o esgotamento de nutrientes, o acúmulo de metabólitos tóxicos e a perda de umidade, favorecendo o armazenamento do formulado a longo prazo (MEJRI et al. 2013).

No caso específico das leveduras, algumas são formuladas na forma líquida refrigerada ou, como produtos congelados (ABADIAS et al. 2001; 2003). As formulações granulares podem ser usadas para proteger os agentes de controle biológico de condições ambientais adversas, com maior persistência, permitindo a liberação controlada do microrganismo-a partir da formulação (SHABANA et al. 2003). De acordo com Carlile et al. (2005), uma formulação granulada à base de *S. cerevisiae* (Meyen ex E.C. Hansen) proporcionou células viáveis da levedura por mais de um ano, sob armazenamento refrigerado. Kinay & Yildiz (2008) verificaram que uma formulação granular contendo as leveduras *M. pulcherrima* (M1/1) e *Pichia guilliermondii* (P1/3) mantiveram a viabilidade das células das leveduras por até seis meses de vida de prateleira e eficácia no controle dos bolores verde e azul em frutos de tangerina Satsuma e pomelo.

Por fim, para o uso comercial, o sucesso de um agente de controle biológico depende em grande parte da qualidade da formulação (JANISIEWICZ & KORSTEN 2002).

## REGISTRO DE PRODUTOS BIOLÓGICOS

Para que os protocolos possam ser adotados, durante o registro de produtos biológicos, são necessários os testes das propriedades físico-químicas dos produtos à base de microrganismos, os mesmos que são adotados para produtos químicos. Quando se leva em consideração a estabilidade do produto, o parâmetro adotado para produtos biológicos é o número de unidades formadoras de colônias (UFC), sendo este medido no início e no final do teste. Estes protocolos, internacionalmente aceitos, estão descritos pela Organização para Cooperação e De-

envolvimento Econômico (OCDE). O guia da OCDE para avaliação da segurança ambiental dos agentes microbianos de biocontrole trata, portanto, de pesticidas biológicos e tem o objetivo de fornecer orientação tanto para a indústria, quanto para as autoridades reguladoras, no contexto da aprovação dos agentes de controle biológico e de registro dos produtos (OCDE, 2021).

O registro de produtos biológicos é realizado em conjunto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). São exigidos requisitos e estudos que constam da legislação que regula o registro de agrotóxicos em geral, a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, transporte, armazenamento, comercialização, propaganda comercial, utilização, importação, exportação, destino final dos resíduos e embalagens, registro, classificação, controle, inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, que são regidos pela Lei Nº 7.802, de 11 de julho de 1989 e regulamentada, posteriormente, pelo Decreto Nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. No caso de produtos de controle biológico constituídos por agentes microbiológicos, o registro é regulado especificamente pela Instrução Normativa Conjunta MAPA/ANVISA/IBAMA Nº 3, de 10 de março de 2006.

Embora um número razoável de estudos leve em consideração a exploração de novos produtos biológicos que possam atuar contra fitopatógenos de citros, poucos produtos chegam à comercialização e são amplamente comercializados. Alguns fatores podem ser relacionados para explicar o porquê de poucos produtos biológicos chegarem à comercialização. Primeiro, com recursos muitas vezes limitados, as empresas nacionais precisam sanar problemas inerentes aos produtos biológicos, tais como, as condições de armazenamento e transporte que devem ser diferenciadas, tratando-se de um microrganismo. Em segundo lugar, os agricultores desconhecem as estratégias de uso e o modo de ação dos bioprodutos sobre os patógenos alvos. E, finalmente, existem alguns investidores oportunistas com pessoal pouco qualificado na área de produtos biológicos, que produzem e comercializam produtos de baixa qualidade, o que leva a um descrédito dos agricultores por bioprodutos (LOPES 2009).

O fluxo de trabalho que se inicia com a desco-

berta de um determinado antagonista até a elaboração efetiva do produto biológico final ainda é bastante complexo e, geralmente, é um processo longo que envolve várias etapas (BAZIOLI et al. 2019).

Outra dificuldade para o aumento de bioprodutos no Brasil é o alto custo para o registro (LOPES 2009). Além disso, é importante enfatizar que o bom desempenho do controle biológico de uma determinada doença não depende só da disponibilidade do produto biológico no mercado, mas da conscientização do agricultor de que o produto está dentro de um sistema de manejo integrado, ou seja, dentro de uma tecnologia ou, de um processo de controle. Muitas vezes, embora o resultado seja positivo, nem sempre é aceito de imediato pelo agricultor, uma vez que o uso de uma molécula química, com eficiência comprovada, apresenta um retorno de controle mais rápido e sem a necessidade de mudanças no manejo, quando comparado com o uso do produto biológico. Além disso, a viabilidade econômica de um sistema de produção é um fator que afeta diretamente o agricultor e, portanto, será o primeiro a ser considerado quando da aceitação do controle biológico (LOPES 2009).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Visando à comercialização de produtos biológicos para o controle de doenças de plantas, é necessário que algumas limitações sejam superadas, incluindo a dificuldade de produção em massa e a formulação contendo o microrganismo antagonista. Embora haja um número grande de pesquisas que confirma a eficiência do uso de leveduras no controle biológico, poucos produtos são comercializados. Um dos entraves se encontra nas dificuldades relativas aos respectivos registros dos produtos para o controle biológico pelos órgãos competentes e, conseqüentemente, a disponibilização desses produtos. Como exemplo, encontram-se as exigências de estudos do impacto ambiental dos agentes de controle biológico, que embora sejam necessárias, de maneira a se obter formulações seguras e controladas, muitas vezes, acabam retardando a sua adoção comercial.

Outro obstáculo é que ainda há poucas instituições de pesquisa com pesquisadores se dedicando ao uso de controle biológico na agricultura, como uma alternativa sustentável. De modo geral, as possibilidades de utilização do controle biológico ainda são pouco exploradas, tendo, como ênfase, a

conscientização dos danos causados com o uso dos agrotóxicos à saúde e ao meio ambiente, além de levantar a importância do uso de insumos alternativos, como parte integrante do manejo de doenças de plantas (VÉRAS 2014).

Mais pesquisas devem ser desenvolvidas com relação ao modo de ação dos antagonistas, para que se possa compreender a complexidade das interações fitopatogêno-antagonista-hospedeiro. Neste contexto, o uso de técnicas moleculares, que contribuam para aumentar o conhecimento dos mecanismos antagônicos do agente de controle biológico (ACB), deve ser enfatizado. Além disso, a busca por novos antagonistas deve ser constante, de maneira a ampliar a utilização de qualquer ACB na pós-colheita de citros.

No entanto, apesar das dificuldades, o mercado de produtos biológicos tem crescido e ampliado um novo modelo de agricultura que atenda às exigências do consumidor, que almeja por produtos mais saudáveis e livres de resíduos de agrotóxicos e que contribua para minimizar os riscos ambientais. É importante ressaltar, também, que o produto biológico obtido seja compatível com a condição econômica do agricultor, para que se tenha uma relação custo-benefício positiva.

## AGRADECIMENTOS

Ao suporte financeiro da FAPESP (Fundação de pesquisa do São Paulo) para realização de pesquisas relacionadas neste artigo (Processos: n.2019/07296-9; n. 2014/25067-3; n.2011/13006-1), INCT Citros (Proc. CNPQ465440/2014-2 e FAPESP 2014/50880-0) e Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo provimento de bolsas para Vanessa S. Moura (Proc.n.88882.433677/2019-01) e Fernanda Barbosa Francisco de Paula (Proc.n.88882.433646/2019-01).

## REFERÊNCIAS

- ABADIAS M, BENABARRE A, TEIXIDÓ N, USALL J, VIÑAS I (2001). Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology* 65: 173–182. ([https://doi:10.1016/S0168-1605\(00\)00513-4](https://doi:10.1016/S0168-1605(00)00513-4)).
- ABADIAS M, USALL J, TEIXIDÓ N, VIÑAS I (2003). Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in isotonic solutions. *Phytopathology* 93: 436–442. (<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.4.436>).
- AGUIRRE-GÜITRÓN L, CALDERÓN-SANTOYO M, BAUTISTA-ROSALES PU, RAGAZZO-SÁNCHEZ JA (2019). Application of powder formulation of *Meyerozyma caribbica* for postharvest control of *Colletotrichum gloeosporioides* in mango (*Mangifera indica* L.). *Food Science and Technology* 113:1-6. (<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108271>).
- ALAMRI SA (2015). Enhancing the efficiency of the bioagent *Bacillus subtilis* JF419701 against soil-borne phytopathogens by increasing the productivity of fungal cell wall degrading enzymes. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 48: 159-170. (<https://doi.org/10.1080/03235408.2014.884671>).
- ARRAS G, ARRU S (1997). Mechanism of action of some microbial antagonists against fungal pathogens. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia* 47: 97-120.
- ARRAS G, SCHERM B, MIGHELI Q (2002). Improving biocontrol activity of *Pichia guilliermondii* against post-harvest decay of oranges in commercial packing-houses by reduced concentrations of fungicides. *Biocontrol Science and Technology* 12: 547-553. (<https://doi.org/10.1080/0958315021000016216>).
- ASARI S, MATZÉN S, PETERSEN MA, BEJAI S, MEIJER J (2016). Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiology Ecology* 92: p. fiw070. (<https://doi.org/10.1093/femsec/fiw070>).
- BAHADOU AS, OUIJJA A, KARFACH A, TAHIRI A, LAHLALI R (2018). New potential bacterial antagonists for the biocontrol of fire blight disease (*Erwinia amylovora*) in Morocco. *Microbial Pathogenesis* 117: 7–15. (<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.011>).
- BAZIOLI JM, SOUZA JRB, COSTA JH, AKIYAMA DY, PONTES JGM, KUPPER KC, AUGUSTO F, CARVALHO JE, FILL TP. Review. (2019). Biological control of citrus postharvest phytopathogens. *Toxins* 11:1-22. (<https://doi:10.3390/toxins11080460>).
- BENITE AMC, MACHADO SP, MACHADO BC (2002). Sideróforos. Uma resposta dos microrganismos. *Química Nova, São Paulo* 25:1155-1164. (<https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000700016>).
- BLEVE G, GRIECO F, COZZI G, LOGRIECO A, VIS-



- CONTI A (2006). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology* 108: 204-209. (<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.004>).
- BURITICÁ JR, ALFONSO CAA, ZAPATA JC (2019). Guia ilustrada de enfermedades en poscosecha de frutas y verduras y sus agentes causantes em Colombia. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Bogotá, D.C., v.38, 506p.
- CALVENTE V, DE ORELLANO ME, SANSONE G, BENUZZI D, SANZ DE TOSETTI MI (2001). Effect of nitrogen source and pH on siderophore production by *Rhodotorula* strains and their application to biocontrol of phytopathogenic moulds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26: 226–229. (<https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000117>).
- CARBÓ A, TORRES R, USALL J, FONS E, TEIXIDÓ N (2017). Dry formulations of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 using fluidised bed drying to control the main postharvest diseases on fruits. *Journal Sci Food Agricultura* 9: 3691–3698. (<https://doi.org/10.1002/jsfa.8229>).
- CARLILE MJ, WATKINSON SC, GOODAY GW (2005). *The Fungi*, 2<sup>th</sup> Ed. Elsevier Academic Press.
- CARMONA-HERNANDEZ S, REYES-PÉREZ JJ, CHIQUITO-CONTRERAS RG, RINCON-ENRIQUEZ G, CERDAN-CABRERA CR, HERNANDEZ-MONTIEL LG (2019). Biocontrol of Postharvest Fruit Fungal Diseases by Bacterial Antagonists: A Review. *Agronomy* 9: 121. (<https://doi.org/10.3390/agronomy9030121>).
- CASTRO N (2020). Busca de uma estratégia de controle para bolores em frutos de laranja. 48 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agropecuária), Unesp, Jaboticabal, SP, Brasil.
- CAVALHEIRO M, TEIXEIRA MC (2018). Review: *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Frontiers in Medicine* 5: Article 28. (<https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>).
- CHANCHAICHAOVIVAT A, PANIJPAN B, RUENWONGSA P (2008). Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chili anthracnose after harvest. *Biological Control* 47: 207–215. (<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.07.018>).
- CHI M, LI G, LIU Y, LIU G, LI M, ZHANG X, LIU J (2015). Increase in antioxidante enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. *Biological Control* 90: 113-119. (<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.06.006>).
- CHI Z, WANG XMZ, BUZDAR MA, CHI ZM (2012). The unique role of siderophore in marine-derived *Aureobasidium pullulans* HN6.2. *Biometals* 25:219-230. (<https://doi.org/10.1007/s10534-011-9499-1>).
- CHIATTONE PV, TORRES LM, ZAMBIAZI RC (2008). Application of ozone in industry of food. *Alimentos e Nutrição* 19:341-349.
- Comissão de Regulamentação Europeia. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32020R0749>. Site acessado em 15-09-2021.
- CONTARINO R, BRIGHINA S, FALLICO B, CIRVILLERI G, PARAFATI L, RESTUCCIA C (2019). Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. *Food Microbiology* 82: 70-74. (<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.008>).
- COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322. (<https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>).
- CUNHA T, FERRAZ LP, SOUSA-JÚNIOR GS, KUPPER KC (2020). The action of yeast strains as biocontrol agents against *Penicillium digitatum* in Lima sweet oranges. *Citrus Research & Technology* 41: e1054. (<https://doi.org/10.4322/crt.18819>).
- CUNHA T, FERRAZ LP, WEHR PP, KUPPER KC (2018). Antifungal activity and action mechanisms of yeasts isolates from citrus against *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology* 276: 20-27. (<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.019>).
- DELAUNOIS B, JEANDET P, CLÉMENT C, BAILLIEUL F, DOREY S, CORDELIER S (2014). Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplastic proteomic studies. *Frontiers in Plant Science* 5 (249). (<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00249>).
- DE PAULA FBF (2020). *Candida stellimalicola* e *Rhodotorula minuta* para o biocontrole do bolor azul em frutos cítricos. 105 f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia agropecuária, Unesp, Jaboticabal, SP, Brasil.
- DI FRANCESCO A, MARTINI C, MARI M (2016). Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action? *European Journal of Plant Pathology*

- 145: 711–717. (<https://doi.org/10.1007/s10658-016-0867-0>).
- DI FRANCESCO A, UGOLINI L, D’AQUINO S, PAGNOTTA E, MARI M (2017). Biocontrol of *Monilia laxa* by *Aureobasidium pullulans* strains: Insights on competition for nutrients and space. *International Journal Food Microbiology* 248: 32-38. (<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.007>).
- DI FRANCESCO A, DI FOGGIA M, BARALDI E (2020). *Aureobasidium pullulans* volatile organic compounds as alternative postharvest method to control brown rot of stone fruits. *Food Microbiology* 87: 103395. (<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103395>).
- DI FRANCESCO A, MARI M, UGOLINI L, BARALDI E (2018). Effect of *Aureobasidium pullulans* strains against *Botrytis cinerea* on kiwifruit during storage and on fruit nutritional composition. *Food Microbiology* 72: 67-72. (<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.010>).
- DROBY S, VINOKUR V, WEISS B, COHEN L, DAUS A, GOLDSCHMIDT EE, PORAT R (2002). Induction of Resistance to *Penicillium digitatum* in Grapefruit by the Yeast Biocontrol Agent *Candida oleophila*. *Biological Control* 92: 393-399. (<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.4.393>).
- DROBY S, WISNIEWSKI M, MACARISIN D, WILSON C (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology* 52: 137–145. (<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>).
- DROBY S, WISNIEWSKI M, TEIXIDÓ N, SPADARO D, JIJAKLI MH (2016). The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology* 122:22–29. (<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.006>).
- EL-GHAOUTH A, SMILANICK JL, WILSON CL (2000). Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycochitosan for control of postharvest decay of apple and citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 19: 249–253. ([https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00076-4](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00076-4)).
- ESTEVAM DMDP (2019). *Sporobolomyces koalae* como um novo agente de controle biológico. 63 f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia agropecuária, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.
- FEITOZA FS, GASPAROTTO MAS (2020). Estudo Sobre a Produção Nacional De Suco De Laranja Concentrado. *Rev. Interface Tecnológica* 17: 625–634. (<https://doi.org/10.31510/infav.17i1.768>).
- FERRAZ LP, CUNHA T, KUPPER KC (2018). Mecanismos de ação de isolados de leveduras envolvidos no biocontrole de *Penicillium digitatum*, agente causal do bolor verde em frutos cítricos. *Citrus Research & Technology* 39: e-1033. (<http://dx.doi.org/10.4322/crt.17101>).
- FERRAZ LP, CUNHA T, SILVA AC, KUPPER KC (2016). Biocontrol Ability and Putative Mode of Action of Yeasts Against *Geotrichum citri-aurantii* in Citrus Fruit. *Microbiological Research* 188: 72–79. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.012>).
- FIALHO MB, FERREIRA LFR, MONTEIRO RTF, PASCHOLATI SF (2011). Antimicrobial volatile organic compounds affect morphogenesis-related enzymes in *Guignardia citricarpa*, causal agent of citrus black spot. *Biocontrol Science Technology* 21:7979-807. (<https://doi.org/10.1080/09583157.2011.580837>).
- FISCHER IH, LOURENÇO SA, AMORIM L (2008). Doenças pós-colheita em citros e caracterização da população fúngica ambiental no mercado atacadista de São Paulo. *Tropical Plant Pathology* 33: 219-226.
- FISCHER IH, TOFFANO L, LOURENÇO SA, AMORIM L (2007). Caracterização dos Danos Pós-Colheita em Citros Procedentes de “Packinghouse”. *Fitopatologia Brasileira* 32:304-310.
- GARCIA A (1999). Fungicidas I: utilização no controle químico de doenças e sua ação contra os fitopatógenos. Porto Velho: EMBRAPA-CPAF Rondônia, p. 32 (EMBRAPA-CPAF Rondônia. Documentos, 46).
- GUO H, NOLAN TM, SONG G, LIU S, XIE Z, CHEN J, SCHNABLE PS, WALLEY JW, YIN Y (2018). FERONIA receptor kinase contributes to plant immunity by suppressing jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 28:3316–3324. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.078>).
- HACQUARD S, SPAEPEN S, GARRIDO-OTER R, SCHULZE-LEFERT P (2017). Interplay between innate immunity and the plant microbiota. *Annual Review of Phytopathology* 55: 565–589. (<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035623>).
- IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=re>

- sultados. Site acessado em 04-02-2022.
- ISMAIL M, ZHANG J (2004). Post-harvest citrus diseases and their control. *Outlooks on Pest Management* 15: 29–35. (<https://doi.org/10.1564/15feb12>).
- KANASHIRO AM, AKIYAMA DY, KUPPER KC, FILL TP (2020). *Penicillium italicum*: An Underexplored Postharvest Pathogen. *Frontiers in Microbiology* 11: Article 606852. (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.606852>).
- KELLERMAN M, LIEBENBERG E, NJOMBOLWANA N (2018). Postharvest dip, drench and wax coating application of pyrimethanil on citrus fruit: Residue loading and green mould control. *Crop Protection* 103:115-129. (<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.10.001>).
- KINAY P, YILDIZ M (2008). The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. *Biological Control* 45: 433-440. (<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.03.001>).
- KIMATI H, AMORIM L, BERGAMIN FILHO A, CAMARGO LEA, REZENDE LEA (eds.) (1997). *Manual de Fitopatologia*. Vol. 2. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo, SP: Editora Agronômica Ceres Ltda.
- KINAY P, MANSOUR MF, MIKOTA GABLER F, MARGOSAN DA, SMILANICK JL (2007). Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Protection* 26:647-656. (<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.06.002>).
- KLEIN MN, KUPPER KC (2018). Biofilm production by *Aereobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. *Food Microbiology* 69:1-10. (<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.008>).
- KORPI A, JÄRNBERG J, PASANEN AL (2009). Microbial volatile organic compounds. *Critical Reviews in Toxicology* 39: 139-193. (<https://doi.org/10.1080/10408440802291497>).
- KUPPER KC, CERVANTES ALL, KLEIN MN, SILVA AC (2013). Avaliação de microrganismos antagonísticos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. *Revista Brasileira de Fruticultura* 35: 425-436. (<https://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452013000200011>).
- KURTZMAN CP, DROBY S (2001). *Metschnikowia fructicola*, a new ascospore yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Systematic and Applied Microbiology* 24:395–399. (<https://doi.org/10.1078/0723-2020-00045>).
- LARANJEIRA FF, AMORIM L, BERGAMIN FILHO A, AGUILAR-VILDOSO CI (2002). Controle das doenças causadas por fungos e bactérias em citros. In: Zambolim L, Ribeiro do Vale FX, Monteiro AJA, Costa H. *Controle de doenças de plantas frutíferas*. Viçosa 2. pp. 141-214.
- LEITE B, RONCATO LD, PASCHOLATI SF, LAMBAIS MR (1997). Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. In: Luz CW, Fernandes J MS, Prestes AM, Picinini EC (Eds.). *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Passo Fundo: RAAP 5. pp. 235-280.
- LIMA LHC, MARCO JL, FELIX CR (2000). Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: Melo IS, Azevedo JL (Org.). *Controle biológico*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2. pp. 263-304.
- LIMA JR, GONÇALVES LRB, BRANDÃO LR, ROSA CA, VIANA FMP (2013). Isolation, identification, and activity in vitro of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *Journal of Basic Microbiology* 53:590-599. (<http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201200049>).
- LIU J, SUI Y, WISNIEWSKI M, DROBY S, LIU Y (2013). Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology* 167: 153–161. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004>).
- LIU X, WANG LP, LI YC, LI HY, YU T, ZHENG XD (2009). Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* in vitro and in vivo. *Journal of Applied Microbiology* 107: 1450–1456. (<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04328.x>).
- LOPES RB (2009). A indústria no Controle Biológico: Produção e Comercialização de Microrganismos no Brasil. In: Bettiol W, Morandi MAB (Org.). *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente 1ª. ed. pp.341.
- LOPES MR, KLEIN MN, FERRAZ LP, SILVA AC, KUPPER KC (2015). *Saccharomyces cerevisiae*: a novel and efficient biological control agent for *Colletotrichum acutatum* during pre-harvest. *Microbiological Research* 175: 93–99. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.04.003>).
- LU L, LU H, WU C, FANG W, YU C, YE C, SHI Y, YU T, ZHENG X (2013). *Rhodosporidium paludige-*



- num* induces resistance and defense-related responses against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 85: 196-202. (<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.06.014>).
- MACHADO KMG, LINARDI VR (1990). Production of amylase and beta-galactosidase by yeasts. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 33: 247-253.
- MAGLIANI W, CONTI S, GERLONI M, BERTOLOTTI D, POLONELLI L (1997). Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews* 10: 369-400. (<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.10.3.369>).
- Mapa - Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (2019). Mercado de biodefensivo cresce mais de 70% no Brasil em um ano. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/asuntos/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil> > Acesso em: 24/08/2021.
- MARIANO RLR, SILVEIRA EB, GOMES AMA (2005). Controle Biológico de doenças Radiculares. In: Michereff SJ, Andrade DEGT, Menezes M. (Eds.) *Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais*. Recife, Brasil. UFRPE, Imprensa Universitária, pp. 398.
- MCKAY AH, FÖSTER H, ADASKAVEG JE (2012). Distinguishing *Galactomyces citri-aurantii* from *G. geotrichum* and characterizing population structure of the two postharvest sour rot pathogens of fruit crops in California. *Phytopathology* 102: 528-538. (<http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-05-11-0156>).
- MEJRI D, GAMALERO E, SOUISSI T (2013). Formulation development of the deleterious rhizobacterium *Pseudomonas trivialis* X33d for biocontrol of brome (*Bromus diandrus*) in durum wheat. *Journal Applied Microbiology* 114: 219-228. (<http://dx.doi.org/10.1111/jam.12036>).
- MORANDI MAB, BETTIOL W (2009). Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: Bettiol W, Morandi MAB (Org.). *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna, Brasil. Embrapa Meio Ambiente 1ª. ed. pp.341.
- MORETTO CM, CERVANTES ALL, FILHO AB, KUPPER KC (2014). Integrated control of green mold to reduce chemical treatment in post-harvest citrus fruits. *Scientia Horticulturae* 165: 433-438. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.019>).
- MOURA VS, MORETTO RK, MACHADO BI, KUPPER KC (2019). Alternativas de controle de doenças de pós-colheita em citros. *Citrus Research & Technology* 40: 1-11. (<https://doi.org/10.4322/crt.17819>).
- MOURA VS, POLLETTINI FL, FERRAZ LP, MAZZI MV, KUPPER KC (2021). Purification of a killer toxin from *Aureobasidium pullulans* for the biocontrol of phytopathogens. *Journal Basic Microbiology* 61:77-87. (<https://doi.org/10.1002/jobm.202000164>).
- NASCIMENTO LM, KLUGE RA, DEL AGUILA JS (2014). Colheita e pós-colheita de citros. 1ª Ed. São Paulo/Rio de Janeiro: Livre Expressão.
- NANTAWANIT N, CHANCHAICHAOVIVAT A, PANIJAN B, RUENWONGSA P (2010). Induction of defense response against *Colletotrichum capsici* in chili fruit by the yeast *Pichia guilliermondii* strain R13. *Biological Control* 52: 145-152. (<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.10.011>).
- NEILANDS JB (1995). Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry* 270: 26723-26726. (<https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26723>).
- NUNES, CA (2012). Biological control of post-harvest diseases of fruit. *European Journal of Plant Pathology* 133: 181-196. (<https://doi.org/10.1007/s10658-011-9919-7>).
- OCDE - Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico. <http://portal.mec.gov.br/encceja-2/480-gabinete-do-ministro-1578890832/assessoria-internacional-1377578466/20746-organizacao-para-a-cooperacao-e-desenvolvimento-economico-ocde>. Site acessado em 15-09-2021.
- ORO L, FELIZIANI E, CIANI M, ROMANAZZI G, COMMITINI F (2018). Volatile organic compounds from *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* inhibit growth of decay causing fungi and control postharvest diseases of strawberries. *International Journal Food Microbiology* 265: 18-22. (<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.027>).
- O'TOOLE G, KAPLAN HB, KOLTER R (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews Microbiology* 54: 49-74. (<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>).
- OWLEY BH, WINDHAM MT (2010). Controle biológico de fitopatógenos. In: Trigiano RN, Windham MT, Windham AS (Eds.). *Fitopatologia: Conceitos e exercícios de laboratório*. 2ª ed. Porto Alegre:

- Artmed, pp. 447-460.
- PALOU L. (2014). *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green Mold, Blue Mold). In: Bautista-Baños S (Ed.). Postharvest Decay: Control Strategies. Elsevier, Mexico 2: pp.45-102.
- PALOU L, SMILANICK JL, CRISOSTO CH (2009). Evaluation of food additives as alternative or complementary chemicals to conventional fungicides for the control of major postharvest diseases of stone fruit. *Journal of Food Protection* 72:1037-1046. (<https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.5.1037>).
- PARAFATI L, VITALE A, RESTUCCIA C, CIRVILLERI G (2016). The effect of locust bean gum (LBG)-based edible coatings carrying biocontrol yeasts against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* causal agents of postharvest decay of mandarin fruit. *Food Microbiology* 58: 87–94. (<https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.03.014>).
- PARISH ME, BEUCHAT LR, SUSLOW TV, HARRIS LJ, GARRETT EH, FARBER JN, BUSTA FF (2003). Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2: 161–173, (<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00033.x>).
- PENG L, YANG S, CHENG YJ, CHEN F, PAN S, FAN G (2012). Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium italicum*. *Food Science and Biotechnology* 21: 1533–1539. (<https://doi.org/10.1007/s10068-012-0204-0>).
- PITT JI, HOCKING AD (1997). *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professional, London, 2<sup>a</sup> Ed.
- PLAZA P, USALL J, TEIXIDO N, VINAS I (2003). Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. *Journal of Applied Microbiology* 94: 594-554. (<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01909.x>).
- PUNJA ZK, UTKHEDE RS (2003). Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology* 21: 400-407. ([https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00193-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00193-8)).
- RODOV V, BEN-YEHOSHUA S, FANG D, D'HALLEWIN G, CASTIA T (1994). Accumulation of phytoalexins scoparone and scopoletin in citrus fruits subjected to various postharvest treatments. *Acta Horticulturae* 381: 517–525. (<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1994.381.69>).
- SANSONE G, REZZA I, CALVENTE V, BENUZZI D, TOSETTI MIS (2005). Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. *Postharvest Biology and Technology* 35: 245-251. (<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.09.005>).
- SCHAFFRATH R, MEINHARDT F (2005). *Kluyveromyces lactis* zymocin and related plasmid-encoded yeast killer toxins. In: Schmitt, M. J. & Schaffrath, R. (Eds.) *Topics in Current Genetics: Microbial Protein Toxins*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p.133–155.
- SCHMITT MJ, BREINIG F (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews* 26: 257-276. (<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00614.x>).
- SCHMITT MJ, BREINIG F (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews Microbiology* 4: 212-221. (<https://doi.org/10.1038/nrmicro1347>).
- SHABANA YM, STOVER DM, SAUERBORN, J (2003). Granular Pesta formulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* for biological control of sunflower broomrape: efficacy and shelf-life. *Biological Control* 26: 189–201. ([https://doi:10.1016/S1049-9644\(02\)00130-5](https://doi:10.1016/S1049-9644(02)00130-5)).
- SHAH P, POWELL ALT, ORLANDO R, BERGMANN C, GUTIERREZ-SANCHEZ G (2012). A Proteomic Analysis of Ripening Tomato Fruit Infected by *Botrytis cinerea*. *Journal of Proteome Research* 11: 2178- 2192. (<https://doi.org/10.1021/pr200965c>).
- SOUZA JRB, KUPPER KC, AUGUSTO F (2018). In vivo investigation of the volatile metabolome of antiphytopathogenic yeast strains active against *Penicillium digitatum* using comprehensive two-dimensional gas chromatography and multivariate data analysis. *Microchemical Journal* 141: 204–209. (<https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.05.036>).
- SPADARO D, CIAVORELLA A, DIANPENG Z, GARIBALDI A, GULLINO ML (2010). Effect of culture media and pH on the biomass production and biocontrol efficacy of a *Metschnikowia pulcherrima* strain to be used as a biofungicide for postharvest disease control. *Canadian Journal Microbiology* 56: 128-137. (<https://doi10.1139/W09-117>).
- SPADARO D, DROBY S (2016). Development of bio-

- control products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology* 47: 39-49. (<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>).
- SPADARO D, GULLINO ML (2004). State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal Food Microbiology* 91: 185-194. ([https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00380-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00380-5)).
- SPADARO D, VOLAR, PIANO S, GULLINO ML (2002). Mechanisms of action, efficacy and possibility of integration with chemicals of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Technology* 24: 123–134. ([https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00172-7](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00172-7)).
- SUPRAPTA DN, ARAI K, IWAI H (1995). Distribution of *Geotrichum candidum* citrus race in citrus groves and non-citrus fields in Japan. *Mycoscience* 36: 277-282. (<https://doi.org/10.1007/BF02268602>).
- SUZUKI C. (2005). Acidiphilic structure and killing mechanism of the *Pichia farinosa* killer toxin SMTK. In: Schmitt, M. J. & Schaffrath, R (Eds.). *Topics in Current Genetics: Microbial Protein Toxins*. Springer- Verlag, Berlin Heidelberg. pp.189–214.
- TALIBI I, ASKARNE L, BOUBAKER H, BOUDYACH EH, AOUMAR AAB (2011). *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of organic and inorganic salts against citrus sour rot agent *Geotrichum candidum*. *Plant Pathology Journal* 10: 138-145. (<https://doi.org/10.3923/ppj.2011.138.145>).
- TALIBI I, BOUBAKER H, BOUDYACH EH, AIT BEN AOUMAR A (2014). Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. *Journal Applied Microbiology* 117: 1-17. (<https://doi.org/10.1111/jam.12495>).
- THIEKEN A, WINKELMANN G (1992). Rhizoferrin: A complexone type of siderophores of the Mucorales and Entomophthorales (Zygomycetes). *FEMS Microbiology Letters* 94: 37-42. (<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05285.x>).
- TIMMER L W, GARNSEY SM, GRAHAM JH (2000). *Compendium of postharvest diseases*. 2ª. Ed. St Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society.
- TOFFANO L, FIALHO MB, PASCHOLATI SF (2017). Potential of fumigation of orange fruits with volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* to control citrus black spot disease at postharvest. *Biological Control* 108: 77-82. (<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.02.009>).
- TOURNAS VH (2005). Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. *Critical Reviews in Microbiology* 31: 33–44. (<https://doi.org/10.1080/10408410590886024>).
- VÉRAS SM (2014). *Doenças de plantas: controles convencional e alternativo*. 1ª Ed. Manaus: EDUA, v.1000: 70p.
- VERO S, GARMENDIA G, GONZALEZ NB, BENTANCUR O, WISNIEWSKI W (2013). Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malus x domestica*). *FEMS Yeast Research* 13: 189–199. (<https://doi.org/10.1111/1567-1364.12021>).
- VERO S, GARMENDIA G, SANGORRIN M, VARGAS M (2016). Controle biológico de doenças em pós-colheita. IN: de Almeida halfeld-vieira, Bernardo et al. *Defensivos Agrícolas Naturais: uso e perspectivas*. Brasília, DF: Embrapa. E-book no formato PDF.
- VIGNEAULT C, SOBRAL D (2008). Pré-resfriamento e refrigeração em pós-colheita de citros. In: Nascimento LM, De Negri JD, Mattos Júnior D (Org.). *Tópicos em Qualidade e Pós-colheita de frutos*. Campinas: Instituto Agrônomo e Fundag. pp.285.
- WAGNER A, HETMAN B, KOPACKI M, JAMIOŁKOWSKA A, KRAWIEC P, LIPA T (2013). Laboratory effect of Boni Protect containing *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnoud in the control of some fungal diseases of apple fruit. *ACTA Agrobotanica* 66: 77–88. (<https://doi.org/10.5586/aa.2013.009>).
- WANG S, RUAN C, YI L, DENG L, YAO S, ZENG K (2020). Biocontrol ability and action mechanism of *Metschnikowia citriensis* against *Geotrichum citri-aurantii* causing sour rot of postharvest citrus fruit. *Food microbiology* 87: 103375. (<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103375>).
- WELLING LL (2001). Induced resistance: from the basic to the applied. *Trends Plant Science* 6: 445–447. ([https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02046-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02046-5)).
- WINKELMANN G (2002) Microbial siderophore-mediated transport. *Biochemical Society Transactions*



- tions 30: 691-696. (<https://doi.org/10.1042/bst0300691>).
- WINKELMANN G (2001) Siderophore transport in fungi. *Microbial transport Systems*. Wiley-VCH, Weinheim. pp. 463-480. (<https://doi.org/10.1002/3527600728.ch21>).
- WYATT MK, PARISH ME (1995). Spore germination of citrus juice-related fungi at low temperatures. *Food Microbiology* 12: 237–243 ([https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(95\)80103-0](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(95)80103-0)).
- XU XB, TIAN SP (2008). Reducing oxidative stress in sweet cherry fruit by *Pichia membranaefaciens*: a possible mode of action against *Penicillium expansum*. *Journal Applied Microbiology* 105: 1170–1177. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03846.x>).
- YAMAMOTO S, SHIRAISHI S, KAWAGO EY, MOCHIZUKI M, SUZUKI S (2015). Impact of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 on control of bacterial wilt and powdery mildew in tomato. *Pest Management Science* 71: 722-727. (<https://doi.org/10.1002/ps.3837>).
- ZHANG X, LI B, ZHANG Z, CHEN Y, TIAN S (2020). Antagonistic Yeasts: A Promising Alternative to Chemical Fungicides for Controlling Postharvest Decay of Fruit. *Journal of Fungi* 6:158. (<https://doi.org/10.3390/jof6030158>).
- ZHANG Y, LI T, LIU Y, LI X, ZHANG C, FENG Z, PENG X, LI, Z, QIN S, XING K (2019). Volatile Organic Compounds Produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* SPS-41 as Biological Fumigants to Control *Ceratocystis fimbriata* in Post-harvest Sweet Potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67: 3702-3710. (<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00289>).
- ZHIMO VY, BHUTIA DD, SAHA J (2016). Biological control of post-harvest fruit diseases using antagonistic yeasts in India. *Journal of Plant Pathology* 98: 275-283. (<https://www.jstor.org/stable/44280446>).
- ZHOU Y, LI W, ZENG J, SHAO Y (2018). Mechanisms of action of the yeast *Debaryomyces nepalensis* for control of the pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mango fruit. *Biological Control* 123: 111-119. (<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.05.014>).
- ZOHORA US, ANO T, RAHMAN MS (2016). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* K1 by Iturin A Producer *Bacillus subtilis* RB14 Seed Treatment in Tomato Plants. *Advances in Microbiology* 6: 424-431. (<https://doi.org/10.4236/aim.2016.66042>).