

Argus Cezar da Rocha Neto

**MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO NO  
CONTROLE DO BOLOR AZUL (*Penicillium expansum*) EM  
FRUTOS DE MAÇÃ**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia e Biociências da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para obtenção do Grau de  
Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Robson Marcelo  
di Piero

Florianópolis, SC  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rocha Neto, Argus Cezar da

Mecanismos de ação do ácido salicílico no controle do bolor azul (*Penicillium expansum*) em frutos de maçã / Argus Cezar da Rocha Neto ; orientador, Robson Marcelo Di Piero - Florianópolis, SC, 2014.

172 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Patologia pós-colheita de frutos. 3. Controle alternativo de doenças. I. Di Piero, Robson Marcelo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

"Mecanismos de ação do ácido salicílico no controle do bolor azul (*Penicillium expansum*) em frutos de maçã."

por

Argus Cezar da Rocha Neto

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 06/PPGBTC/2014) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências- UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:



Dr(a) Robson Marcelo Di Piero (FIT/CCA/UFSC)

Banca examinadora:



Dr(a) Cassandro Vidal Talamini do Amarante (Agronomia/CAV/UDESC)



Dr(a) Marciel João Stadnick (FIT/CCA/UFSC)



Dr(a) Marcelo Maraschin (FIT/CCA/UFSC)

Coordenação:



Prof(a). Dr(a). Marcelo Maraschin

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 28 de fevereiro de 2014.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e sabedoria. Por me rodear de pessoas especiais, por guiar os meus passos e, principalmente, por ter dado seu filho para nos salvar. OBRIGADO SENHOR!

À Universidade Federal de Santa Catarina e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, pelo conhecimento passado ao longo dos anos;

À CAPES, pelo suporte financeiro;

Ao professor Dr. Robson Marcelo Di Piero, pela amizade, paciência, dedicação e orientação em todas as etapas do trabalho;

Aos professores Dr. Cassandro Amarante, Dr. Marciel Stadnik, Dr. Marcelo Maraschin e Dr. Márcio Rossi, que prontamente aceitaram o convite para participar da banca examinadora;

Aos meus queridos pais, Argus Filho e Mariza. Amo vocês de coração! Não seria hoje quem sou se não fosse pelo exemplo de vocês. Exemplo de vida. De trabalho. De caráter. De cristianismo. De verdade, obrigado por tudo! Principalmente por serem meus pais!

À minha querida irmã Talita. Obrigado por tudo bibi! Principalmente por estar sempre do meu lado. Me apoiando, brigando comigo quando estou errado, e me fazendo voltar nos trilhos. Obrigado por ser minha irmã! Amo muito você!

À minha noiva Alanny Oliveira. Por todos os momentos de carinho. De companheirismo. Por todos os gestos de amor. Por estar sempre ao meu lado e tornar a minha vida mais feliz! Mas principalmente por mais uma vez fazer parte da minha vida. Amo muito você!

Ao meu sogro e minha sogra, Sonir Oliveira e Eude Oliveira. Por terem me acolhido como um filho. Obrigado por cuidarem de mim tão bem quanto um filho e por todo o carinho e amizade.

Aos jovens Caroline L., Ricardo, Zamira, Juliane, Kelly, Aline, Mateus, Caroline H., Felipe, Mathias, Catarina, Josiane, Nathalie, Carmem, Tarsis, Giana, Vanessa, Cezar, Alessandro pelo tempo de qualidade que passamos juntos, pelas dicas de laboratório e, principalmente, pela amizade!

Ao pessoal do LMBV, Fê, Regis, Monis, Bruno e Claudia; Ao pessoal do LFDGV, Montagna e Doriva; Ao Éder do LCM; E aos demais pesquisadores que, por ventura tenha esquecido, muito obrigado pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho. Pelas parcerias fixadas e, principalmente, pela dedicação e ensino!

Aos meus amigos Gustavinho, Digão, Rafiks, Allam, Cauã, Titi. Vocês são mais do que família, são meus irmãos! Obrigado por tudo, desde as conversas mais sérias às zoações, desde uma passeata ao sushi! “Felas”, amo vocês!

Às minhas lindonas Jehehssica e Marjoriezinha! Obrigado por todo incentivo. Por todo carinho! Obrigado por sempre estarem comigo, nos bons e nos maus momentos! Amo vocês.

“Os mais poderosos intelectos da Terra não podem compreender a Deus. Os homens podem estar sempre a pesquisar, sempre a aprender, e ainda há, para além, o infinito.”

(WHITE, E. G).



## RESUMO

ROCHA NETO, A. C. **Mecanismos de ação do ácido salicílico no controle do bolor azul (*Penicillium expansum*) em frutos de maçã.** Florianópolis; 2014. [Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da UFSC].

O bolor azul causado por *P. expansum* é uma doença de grande importância em pós-colheita de frutos de maçã, sendo considerada nos países produtores a doença mais importante na perda da qualidade e quantidade dos frutos armazenados. A aplicação de ácido salicílico (AS) em pós-colheita de frutos pode representar uma eficiente forma de controle alternativo de doenças. Este trabalho objetivou avaliar o efeito do AS no desenvolvimento do fitopatógeno e da doença visando a proteção dos frutos de maçã cv. Fuji das categorias 1, 2 e 3 contra o bolor azul, além de elucidar os mecanismos de ação pelo qual o AS poderia atuar. *In vitro*, esporos de *P. expansum* tiveram sua germinação reduzida em 80% quando o AS foi aplicado a 0,5 mM, chegando a 100% de inibição a uma dose de 2,5 mM em contato com os esporos por 60 minutos, equivalendo-se ao cloro ativo. A atividade antimicrobiana do AS foi dependente do pH da solução, com maior redução da germinação de *P. expansum* em pH em torno de 3 e perda total da atividade quando o pH foi elevado a 6. Com o aumento do tempo de contato do AS a 2,5 mM com os esporos, notou-se um aumento linear na liberação de espécies reativas de ácido tiobabútrico (ATB), atingindo um valor máximo de 6000 pmol de ATB por mg de proteína após 120 minutos de contato. De forma semelhante, após a exposição do micélio de *P. expansum* ao AS (2,5 mM) por 120 minutos, observou-se um extravasamento de 3,2 µg de proteína solúvel por g de micélio, duas vezes maior do que o apresentado pelo micélio do fungo submetido ao tratamento com água destilada. Tais resultados corroboraram os obtidos por microscopia de fluorescência e eletrônica de transmissão, evidenciando danos do AS associados à membrana plasmática do fungo sem, por outro lado, afetar sua parede celular. Quando aplicado nos frutos de maçã, o AS apresentou apenas efeito erradicante, reduzindo a incidência do bolor azul em até 100% no tratamento em que os esporos de *P. expansum* permanecerem em contato por 30 min em solução de AS (2,5 mM) antes da imersão dos frutos. A atividade de peroxidases, polifenoloxidasas e glucanases dos frutos, assim como o teor de compostos fenólicos e de flavonóides foram pouco influenciados pelo tratamento com o AS a 2,5 mM ou pela inoculação com o fitopatógeno durante as primeiras 80 h, sem diferir também entre as

categorias de maçã. Nas características físico-químicas dos frutos, o AS a 2,5 mM promoveu a manutenção da massa, dos teores de sólidos solúveis e da acidez titulável nas maçãs a valores próximos àqueles encontrados no início do experimento, contra alterações de até 50% nos frutos da testemunha. Os resultados do presente estudo mostram a capacidade do AS de controlar doenças pós-colheita como o bolor azul, principalmente através dos danos à membrana plasmática de *P. expansum*, e de proporcionar a manutenção das características fisiológicas dos frutos de maçã, possibilitando um aumento no tempo de prateleira.

**Palavras-chave:** Ácido salicílico. Controle alternativo. Danos de membrana. Físico-química. *P. expansum*. Proteínas relacionadas à patogênese. Pós-colheita.

## ABSTRACT

ROCHA NETO, A. C. **Mechanisms of action of salicylic acid for the control of blue mold (*Penicillium expansum*) on apple fruits.** Florianópolis, 2014. [Dissertation - Graduate Program in Biotecnology and Bioscience UFSC].

The blue mold caused by *P. expansum* is a disease of great importance in apple post-harvest, being considered the most important disease in the loss of quality and quantity of stored fruits in producing countries. The application of salicylic acid (SA) in postharvest fruit can be an efficient form of control the disease alternatively. This study evaluated the effect of AS on the pathogen and disease development, by protecting the apple fruit of categories 1, 2 and 3 against the blue mold, besides elucidating the mechanisms by which AS could act. *In vitro*, spores of *P. expansum* had their germination reduced by 80 % when AS was applied at 0.5 mM, reaching 100 % of inhibition at a dose of 2.5 mM in contact with the spores for 60 minutes, equivalent to the active chlorine. The antimicrobial activity of AS depends of the pH of the solution, exhibiting total reduction of the *P. expansum* germination in pH around 3 and a total waste of activity when the pH was raised to 6. With the increase of the time of contact between the spores and AS (2.5 mM), a linear increase in the release of thiobabituric acid reactive species was noted, reaching a maximum of 6000 thiobabituric acid per pmol per mg protein after 120 minutes of contact. Similarly, after exposure with AS at 2.5 mM for 120 minutes, there was a leakage of 3.2 mg of soluble protein per g of the mycelium of *P. expansum*, twice greater than that presented by mycelia treated with distilled water. These results corroborate to those obtained from fluorescence and transmission electron microscopy, showing that the damage was associated with the plasma membrane of the fungus without, moreover, damaging its cell wall. When applied in apple fruit, AS (2.5 mM) only showed eradivative effect, reducing the incidence of the blue mold by up to 100% in the treatment in which the spores of *P. expansum* remain in contact for 30 minutes in a AS (2.5 mM) solution after the fruits immersion. The activity of peroxidases, polyphenoloxidases, glucanases and accumulation of phenolic compounds and flavonoids were little influenced by AS treatment or inoculation with the pathogen during the first 80 hours without differ between apple categories. Considering the physico-chemical characteristics of fruits, AS at 2.5 mM promoted the maintenance of mass, soluble solids and titratable acidity until the end of

the experiments, against changes of 50% in the fruits treated with control-treatment. The results of this study show the ability of AS to control postharvest diseases such as blue mold, mainly through damage to the plasma membrane of *P. expansum* and providing maintenance of the physiological characteristics of apple fruit, allowing an increased shelf life.

Keywords: Alternative control. Membrane damage. Pathogenesis-related proteins. *Penicillium expansum*. Physical chemistry. Postharvest. Salicylic acid.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Limites de tolerância e defeitos permitidos por categoria de frutos de maçã. ....87
- Tabela 2. Efeito de concentrações do ácido salicílico (0, 0,5 mM e 2,5 mM) sobre a incidência, severidade e velocidade de crescimento da lesão do bolor azul de *P. expansum* em frutos de maçã de diferentes categorias. As suspensões de esporos permaneceram 10 minutos em contato com os tratamentos antes da imersão dos frutos. ....105
- Tabela 3. Efeito do pH (3 e 6) sobre o modo de atuação erradicante do ácido salicílico (2,5 mM) para o controle do bolor azul em frutos de maçã de diferentes categorias. As suspensões de esporos permaneceram 10 min em contato com os tratamentos antes da imersão dos frutos. ..106
- Tabela 4. Efeito do AS a 2,5 mM, da água acidificada a pH 3 e do hipoclorito (0,5% cloro ativo) para o controle do bolor azul em frutos de maçã de diferentes categorias. As suspensões de esporos permaneceram 30 minutos em contato com os tratamentos antes da imersão dos frutos. ....107
- Tabela 5. Efeito da água destilada estéril, do AS (2,5 mM), da suspensão de esporos de *P. expansum* e da mistura de AS com suspensão de esporos sob o bolor azul em frutos de maçã de diferentes categorias. As suspensões de esporos permaneceram 30 minutos em contato com o tratamento ante da imersão dos frutos.....112
- Tabela 6. Composição e concentração ( $\mu\text{g}$ ) de compostos fenólicos presentes em frutos de maçã cv. Fuji categoria 1 imersos em suspensão de esporos de *P. expansum* preparada em água destilada ou em solução de AS a 2,5 mM, no início (0 h) e ao final do experimento (80 h). ....129
- Tabela 7. Composição e concentração ( $\mu\text{g}$ ) de compostos fenólicos presentes em frutos de maçã cv. Fuji categoria 2 imersos em suspensão de esporos de *P. expansum* preparada em água destilada ou em solução de AS a 2,5 mM, no início (0 h) e ao final do experimento (80 h). ....130
- Tabela 8. Composição e concentração ( $\mu\text{g}$ ) de compostos fenólicos presentes em frutos de maçã cv. Fuji categoria 3 imersos em suspensão

de esporos de *P. expansum* preparada em água destilada ou em solução de AS a 2,5 mM, no início (0 h) e ao final do experimento (80 h)..... 130

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conídios e conidióforos de *P. expansum* corados com azul de Amann e visualizados sob microscopia de luz (a). Colônia do fitopatógeno em meio de cultura (b). Sintomas do bolor azul em frutos de maçã ‘Fuji’ (c). .....39

Figura 2. Porcentagem de germinação de esporos de *P. expansum* em água destilada e em diferentes concentrações de suco de maçã. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância nos diferentes tempos. \*Experimento representativo de uma série de dois realizados nos mesmos moldes. ....59

Figura 3. Porcentagem de germinação (A) e comprimento do tubo germinativo (B) de esporos do fungo *P. expansum* submetidos a diferentes ácidos fenólicos à concentração de 2,5 mM. O controle se refere aos esporos germinados em suco de maçã a 4%, sem adição de fenólicos. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de 5% de significância. \*Experimento representativo de uma série de dois realizados nos mesmos moldes. ....61

Figura 4. Porcentagem de germinação (A) e comprimento do tubo germinativo (B) de esporos do fungo *P. expansum* submetidos a diferentes concentrações de AS (0; 1; 2,5; 5 mM). Observou-se um efeito significativo de doses de acordo com o teste F ( $p < 0,05$ ). \*Experimento representativo de uma série de três realizados nos mesmos moldes. ....62

Figura 5. Velocidade de atuação do AS a 2,5 mM na porcentagem de germinação (A) e no desenvolvimento do tubo germinativo (B) dos esporos de *P. expansum*. O controle refere-se aos esporos germinados em suco de maçã a 4%. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância nos diferentes tempos. \*Experimento representativo de uma série de três realizados nos mesmos moldes. ....64

Figura 6. Porcentagem de germinação (A) e comprimento do tubo germinativo (B) de esporos do fungo *P. expansum* submetidos aos

tratamentos AS (2,5 mM) ou cloro (0,05%) em diferentes pH. O controle refere-se aos esporos germinados em suco de maçã a 4%. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância. \*Experimento representativo de uma série de três realizados nos mesmos moldes. ....66

Figura 7. Porcentagem de germinação (A) e comprimento do tubo germinativo (B) de esporos do fungo *P. expansum* submetidos ao tratamento com AS a 2,5 mM em diferentes pH. pH 2,8 – pH padrão do AS. O controle refere-se aos esporos germinados em suco de maçã a 4%. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância nos diferentes pH. \*Experimento representativo de uma série de três realizados nos mesmos moldes. ....68

Figura 8. Porcentagem de germinação (A) e comprimento do tubo germinativo (B) de esporos de *P. expansum* submetidos ao AS ou AAS a 2,5 mM em diferentes pHs. pH 2,8 – pH padrão do ácido salicílico. pH 4 – pH padrão do AAS. O controle refere-se aos esporos germinados em suco de maçã a 4%. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância. \*Experimento representativo de uma série de dois realizados nos mesmos moldes. ....70

Figura 9. Morfologia da parede celular dos esporos de *P. expansum* suspensos em suco de maçã a 4% por 0 h (A), 8 h (B), 10 h (C) e 12 h (D) em microscopia de fluorescência, após coloração com Calcofluor White Stain; morfologia da parede celular dos esporos de *P. expansum* tratados com AS (2,5 mM) por 2 h (E) em microscopia de fluorescência após coloração com Calcofluor White Stain. \*Campos representativos de uma série de dois experimentos realizados nos mesmos moldes. ....72

Figura 10. Efeito do AS (2,5 mM) sobre a morfologia (parede celular) dos esporos de *P. expansum* visualizados em microscopia de luz visível. Esporos de *P. expansum* germinados ou não tratados por 0 min (A), 5 min (B), 15 min (C), 30 min (D), 60 min (E) ou 120 min (F). \*Campos representativos das diferentes repetições. \*\*Campos representativos de uma série de dois experimentos realizados nos mesmos moldes. ....73

Figura 11. Efeito do AS (2,5 mM) sobre a morfologia (parede celular) dos esporos de *P. expansum* visualizados em microscopia de fluorescência, correspondente à figura 10. Esporos de *P. expansum* germinados ou não tratados por 0 min (A), 5 min (B), 15 min (C), 30 min (D), 60 min (E) ou 120 min (F). \*Campos representativos das diferentes repetições. \*\*Campos representativos de uma série de dois experimentos realizados nos mesmos moldes. ....74

Figura 12. Efeito do AS (2,5 mM) sobre a morfologia (membrana plasmática) dos esporos de *P. expansum* visualizados em microscopia de luz visível. Esporos de *P. expansum* germinados ou não, tratados por 0 min (A), 5 min (B), 15 min (C), 30 min (D), 60 min (E) ou 120 min (F). \*Campos representativos das diferentes repetições. \*\*Campos representativos de uma série de dois experimentos realizados nos mesmos moldes. ....76

Figura 13. Efeito do AS (2,5 mM) sobre a integridade da membrana plasmática dos esporos de *P. expansum* observados em microscopia de fluorescência. Os esporos foram tratados por 0 min (A), 5 min (B), 15 min (C), 30 min (D), 60 min (E) ou 120 min (F) com AS e corados com iodeto de propídeo. Esporos em vermelho perderam a integridade da membrana. \*Campos representativos das diferentes repetições. \*\*Campos representativos de uma série de dois experimentos realizados nos mesmos moldes. ....77

Figura 14. Efeito do AS a 2,5 mM na integridade da membrana plasmática dos esporos de *P. expansum* após diferentes tempos de contato. O controle se refere aos esporos germinados em suco de maçã a 4%. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância nos diferentes tempos. ....78

Figura 15. Espécies reativas de ATB (pmol.mg de proteína<sup>-1</sup>) a partir de esporos de *P. expansum* tratados com AS 2,5 mM por diferentes tempos, indicando estresse oxidativo das membranas celulares. O controle refere-se aos esporos tratados com água destilada estéril. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância nos diferentes tempos. \*Experimento representativo de uma série de dois realizados nos mesmos moldes. ....79

Figura 16. Extravasamento de proteínas de micélios de *P. expansum* tratados com AS (2,5 mM) por diferentes tempos. O controle refere-se aos micélios tratados com água destilada estéril. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância nos diferentes tempos. \*Experimento representativo de uma série de três realizados nos mesmos moldes. .... 80

Figura 17. Microscopia eletrônica de transmissão dos esporos de *P. expansum* tratados com água (a – c) ou com AS 2,5 mM (d – h). (a) esporo de *P. expansum* organizado com a presença de um vacúolo central (V) e organelas no citoplasma (Ci). (b) detalhe da presença de mitocôndrias (M), de retículo endoplasmático rugoso (Rer) e fina parede celular (PC) em esporos de *P. expansum*. (c) detalhe do citoplasma com inúmeros ribossomos livres em esporo de *P. expansum*. (d) esporo de *P. expansum* com morfologia irregular após tratamento com AS 2.5 mM; (e) detalhe do esporo de *P. expansum* com a formação de grande quantidade de vacúolos; (f–h) detalhes da desorganização das estruturas celulares presentes no citoplasma dos esporos de *P. expansum* e do aumento da espessura das paredes celulares após exposição ao AS. .... 81

Figura 18. Efeito do ácido salicílico a 2,5 mM aplicado em diferentes formas nos frutos de maçã de diferentes categorias, sobre a incidência, severidade (diâmetro da lesão em cm) e velocidade de crescimento da lesão do bolor azul. Os frutos com inóculo foram incubados por 12 dias a 25°C. O controle se refere ao tratamento com água destilada realizado de forma preventiva. Letras maiúsculas nos gráficos indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (5%). Os valores de % acima das barras no gráfico “velocidade de crescimento da lesão” indicam a incidência do bolor azul ao final do experimento. .... 96

Figura 19. Efeito do ácido salicílico a 2,5 mM, aplicado em diferentes formas nos frutos de maçã das diferentes categorias, sobre a incidência, severidade (diâmetro da lesão) e velocidade de crescimento da lesão do bolor azul. Os frutos com inóculo foram incubados por 40 dias a 4°C. O controle refere-se ao tratamento com água destilada feito de forma preventiva. Letras maiúsculas nos gráficos indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (5%). Os valores de % acima das barras no gráfico

“velocidade de crescimento da lesão” indicam a incidência do bolor azul ao final do experimento.....97

Figura 20. Massa média dos frutos (g) de maçã de diferentes categorias, submetidos aos tratamentos com água destilada (controle) ou solução de AS (2,5 mM) e expostos ao fitopatógeno *P. expansum*, no início e ao final do período de incubação (12 dias a 25°C e 40 dias a 4°C). Letras maiúsculas indicam diferença estatística dentro do tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%.....99

Figura 21. Teores de sólidos solúveis (°Brix) de frutos de maçã de diferentes categorias, submetidos aos tratamentos com água destilada (controle) ou solução de AS (2,5 mM) e expostos ao fitopatógeno *P. expansum*, no início e ao final do período de incubação (12 dias a 25°C e 40 dias a 4°C). Letras maiúsculas indicam diferença estatística dentro do tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%.....101

Figura 22. Acidez titulável (%) de frutos de maçã de diferentes categorias, submetidos aos tratamentos com água destilada (controle) ou solução de AS (2,5 mM) e expostos ao fitopatógeno *P. expansum*, no início e ao final do período de incubação (12 dias a 25°C e 40 dias a 4°C). Letras maiúsculas indicam diferença estatística dentro do tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%.....103

Figura 23. Massa média dos frutos (g) de maçã de diferentes categorias, no início e ao final do período de incubação (12 dias a 25°C). Os frutos foram submetidos aos tratamentos com água destilada em pH normal e pH 3 (controles), solução de AS (2,5 mM) e hipoclorito (0,5% cloro) e expostos ao fitopatógeno *P. expansum*. Letras maiúsculas indicam diferença estatística dentro do tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%.....108

Figura 24. Sólidos solúveis (°Brix) de frutos de maçã de diferentes categorias, no início e ao final do período de incubação (12 dias a 25°C). Os frutos foram submetidos aos tratamentos com água destilada em pH normal e pH 3 (controles), solução de AS (2,5 mM) e hipoclorito (0,5% cloro) e expostos ao fitopatógeno *P. expansum*. Letras maiúsculas

indicam diferença estatística dentro do tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%. ..... 110

Figura 25. Acidez titulável (%) de frutos de maçã de diferentes categorias, no início e ao final do período de incubação (12 dias a 25°C). Os frutos foram submetidos aos tratamentos com água destilada em pH normal e pH 3 (controles), solução de AS (2,5 mM) e hipoclorito (0,5% cloro) e expostos ao fitopatógeno *P. expansum*. Letras maiúsculas indicam diferença estatística dentro do tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%. ..... 111

Figura 26. Massa média dos frutos (g) de maçã de diferentes categorias, no início e ao final do período de incubação (12 dias a 25°C). Os frutos foram submetidos aos tratamentos com água destilada, solução de AS (2,5 mM), suspensão de esporos de *P. expansum* e mistura de AS (2,5 mM) com suspensão de esporos (30 minutos de contato). Letras maiúsculas indicam diferença estatística dentro do tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%. ..... 114

Figura 27. Sólidos solúveis (°Brix) de maçã de diferentes categorias, no início e ao final do período de incubação (12 dias a 25°C). Os frutos foram submetidos aos tratamentos com água destilada, solução de AS (2,5 mM), suspensão de esporos de *P. expansum* e mistura de AS (2,5 mM) com suspensão de esporos (30 minutos de contato). Letras maiúsculas indicam diferença estatística dentro do tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%. ..... 116

Figura 28. Acidez titulável (%) de maçã de diferentes categorias, no início e ao final do período de incubação (12 dias a 25°C). Os frutos foram submetidos aos tratamentos com água destilada, solução de AS (2,5 mM), suspensão de esporos de *P. expansum* e mistura de AS (2,5 mM) com suspensão de esporos (30 minutos de contato). Letras maiúsculas indicam diferença estatística dentro do tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%. ..... 118

Figura 29. Atividade de peroxidases em frutos de diferentes categorias de maçã cv. Fuji tratados com água destilada estéril. Barras de erros

indicam o desvio padrão. Não houve diferenças significativa a 5% pelo teste F. ....119

Figura 30. Atividade de peroxidases em frutos de maçã cv Fuji das categorias 1, 2 e 3 tratados com água destilada, AS (2,5 mM), suspensão de esporos em água destilada e suspensão de esporos em AS a 2,5 mM (AS+esporos). Barras de erros indicam o desvio padrão. Não houve diferenças significativa a 5% pelo teste F. ....120

Figura 31. Atividade de polifenoloxidasas em frutos de diferentes categorias de maçã cv. Fuji tratados com água destilada estéril. Barras de erros indicam o desvio padrão. Não houve diferenças significativa a 5% pelo teste F. ....121

Figura 32. Atividade de polifenoloxidasas em frutos de maçã cv Fuji das categorias 1, 2 e 3 tratados com água destilada, AS (2,5 mM), suspensão de esporos e AS (2,5 mM) de forma erradicante. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância no tempo indicado. ....122

Figura 33. Atividade de glucanases em frutos de diferentes categorias de maçã cv. Fuji tratados com água destilada estéril. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância no tempo indicado. ....123

Figura 34. Atividade de glucanases em frutos de maçã cv Fuji das categorias 1, 2 e 3 tratados com água destilada, AS (2,5 mM), suspensão de esporos e AS (2,5 mM) de forma erradicante. Barras de erros indicam o desvio padrão. ....124

Figura 35. Conteúdo de compostos fenólicos totais em frutos de diferentes categorias de maçã cv. Fuji tratados com água destilada estéril. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância no tempo indicado. ....125

Figura 36. Conteúdo de compostos fenólicos totais em frutos de maçã cv Fuji das categorias 1, 2 e 3 tratados com água destilada, AS (2,5 mM),

suspensão de esporos e AS (2,5 mM) de forma erradicante. Barras de erros indicam o desvio padrão. Não houve diferenças significativa a 5% pelo teste F. .... 126

Figura 37. Conteúdo de flavonóides em frutos de diferentes categorias de maçã cv. Fuji tratados com água destilada estéril. Barras de erros indicam o desvio padrão. Não houve diferenças significativa a 5% pelo teste F. .... 127

Figura 38. Conteúdo de flavonóides em frutos de maçã cv Fuji das categorias 1, 2 e 3 tratados com água destilada, AS (2,5 mM), suspensão de esporos e AS (2,5 mM) de forma erradicante. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância no tempo indicado. .... 128

## LISTA DE SIGLAS

AS - Ácido Salicílico  
AT - Acidez Titulável  
ATB - Ácido Tiobabítúrico  
ATC - Ácido Tri-cloro Acético  
BDA - Batata Dextrose Ágar  
CEPA - Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola  
CFT - Compostos Fenólicos Totais  
CF - Concentração Final  
CTG - Comprimento do Tubo Germinativo  
DO - Densidade óptica  
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético  
FAO - Food and Agriculture Organization  
FLA - Flavonóides  
GLU -  $\beta$ -1,3 Glucanases  
HCl - Ácido Clorídrico  
HTB - Hidroxitolueno Butilato  
IA - Ingrediente Ativo  
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
MAPA - Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento  
MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão  
mM - Milimolar  
NaOH - Hidróxido de Sódio  
pH - Potencial de hidrogênio  
PMF - Perda de Massa dos Frutos  
POX - Peroxidases  
SST - Sólido Solúveis Totais  
PPO - Polifenoloxidasas



## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	27
<b>OBJETIVOS</b> .....	31
<b>Objetivo Geral</b> .....	31
<b>Objetivos Específicos</b> .....	31
<b>HIPÓTESES</b> .....	33
<b>CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DO PATOSSISTEMA E MEDIDAS ALTERNATIVAS DE CONTROLE DE DOENÇAS</b> ...35	
<b>1. A CULTURA DA MACIEIRA E O BOLOR AZUL</b> .....	35
1.1. Aspectos históricos, botânicos e fisiológicos da maçã.....	35
1.2. Importância econômica e nutricional da macieira.....	37
1.3. <i>Penicillium expansum</i> .....	38
<b>2. MÉTODOS DE CONTROLE ALTERNATIVO</b> .....	40
2.1. Conceitos e definições.....	40
2.2. Utilização de compostos fenólicos no controle de doenças de plantas .....	42
2.2.1. Ácido salicílico.....	43
2.3. Mecanismos de defesa.....	44
<b>CAPÍTULO 2 – POTENCIAL ANTIFÚNGICO E MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO CONTRA <i>PENICILLIUM EXPANSUM</i></b> .....	49
<b>2.1 INTRODUÇÃO</b> .....	49
<b>2.2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	51
2.2.1. Obtenção e manutenção do isolado de <i>Penicillium expansum</i> .....	51
2.2.2. Obtenção dos compostos fenólicos .....	51
2.2.3. Padronização da metodologia de germinação de <i>P.expansum</i> .....	51
2.2.4. Efeito de ácidos fenólicos na germinação de <i>P. expansum</i> .....	52
2.2.5. Mecanismos de ação antimicrobiana do ácido salicílico sobre <i>P. expansum</i> .....	54
2.2.6. Análise estatística.....	57
<b>2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	58
<b>CAPÍTULO 3 – POTENCIAL DO ÁCIDO SALICÍLICO NO CONTROLE DO BOLOR AZUL EM FRUTOS DE MAÇÃ FUJI DE DIFERENTES CATEGORIAS</b> .....	85
<b>3.1. INTRODUÇÃO</b> .....	85
<b>3.2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	86
3.2.1. Condições de cultivo e frutos de maçã.....	86
3.2.2. Obtenção e manutenção do isolado de <i>Penicillium expansum</i> .....	87
3.2.3. Obtenção do ácido salicílico .....	88

3.2.4. Efeito erradicante, protetor e curativo do AS em frutos de maçã cv. Fuji de diferentes categorias.....	88
3.2.4.1. Caracterização físico-química dos frutos de maçã cv Fuji das diferentes categorias.....	89
3.2.5. Efeito erradicante do AS em frutos de maçã cv. Fuji de diferentes categorias .....	90
3.2.6. Ensaios bioquímicos dos frutos de maçã cv. Fuji .....	91
3.2.6.1. Tratamentos.....	91
3.2.6.2. Amostragem.....	91
3.2.6.3. Determinação das atividades enzimáticas.....	91
3.2.6.4. Determinação de proteínas totais .....	93
3.2.6.5. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides totais .....	93
3.2.7. Análise Estatística.....	95
<b>3.3. RESULTADOS.....</b>	<b>95</b>
3.3.1. Efeito erradicante, protetor e curativo do AS contra o bolor azul em frutos de maçã cv. Fuji de diferentes categorias .....	95
3.3.2. Efeito erradicante do AS contra o bolor azul em frutos de maçã cv. Fuji de diferentes categorias.....	104
3.3.3. Efeito do AS nos mecanismos de defesa .....	112
<b>3.4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>130</b>
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>143</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>145</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>163</b>

## APRESENTAÇÃO

As frutas são alimentos de grande importância nutricional, sendo excelentes fontes de água, vitaminas, sais minerais, fibras e compostos bioativos. Um dos desafios atuais no âmbito das cadeias produtivas de frutos é a ampliação do consumo *per capita* da fruta *in natura* e de seus derivados. No Brasil, o consumo de frutos *in natura* é na ordem de 57 kg de frutas/pessoa/ano, muito abaixo do recomendado pela OMS, que sugere um consumo de 146 kg de frutas/pessoa/ano (OMS, 2005). Nessa perspectiva, a maçã é um importante fruto, sendo a terceira fruta mais consumida pelas famílias brasileiras, perdendo apenas para a banana e frutas cítricas (IBGE, 2012).

A maçã é o fruto da macieira (*Malus domestica*), muito apreciada desde a antiguidade e costumeiramente retratada como “o fruto” da árvore do bem e do mal. Atualmente, essa cultura é de grande importância no mercado mundial, atingindo cerca de 70 milhões de toneladas produzidas em 6 milhões de hectares cultivados em 2010, sendo crescente o seu volume vendido aos principais centros consumidores mundiais. No mercado de produção de frutos, dos cerca de noventa países produtores de maçã, vinte são responsáveis por aproximadamente 85% da produção mundial. O Brasil é o 9º nesta lista (FAO, 2011).

Diversas são as causas das perdas dos frutos de maçã, sendo as principais relacionadas ao incorreto manuseio dos frutos desde a colheita ao processamento, resultando no esmagamento dos seus tecidos e propiciando o aparecimento de doenças fúngicas (RESENDE & MACHADO, 2000).

Nesse sentido, estimam-se perdas na ordem de 20% do total produzido, dependendo do ano e da cultivar em questão (MARTINS *et al.*, 2007). Devido à alta suscetibilidade da maçã ao fungo *Penicillium expansum*, é comum a utilização de grandes quantidades de produtos químicos em pré e em pós-colheita. Por outro lado, a aplicação indiscriminada de agrotóxicos, além de aumentar o custo de produção, causa diversos impactos ambientais, danos aos seres vivos, além do favorecimento da seleção de raças resistentes aos ingredientes ativos. De acordo com Janisiewicz (1996), Campanhola & Bettiol (2003), Sanhueza *et al.*, (2003), Yu & Zheng (2006) e Stadnik (2009) a produção de alimentos livres de resíduos tóxicos tem aumentado durante os últimos anos, inclusive devido à restrição ao uso de produtos químicos no processo de pós-colheita de frutos para consumo *in natura*.

Dessa forma, inúmeras são as pesquisas que vêm sendo realizadas para a obtenção de métodos alternativos de controle dos fitopatógenos, com substância menos agressivas ao ambiente, que apresentam efeito antimicrobiano ou mesmo sendo capazes de induzir resistência a partir da ativação dos mecanismos de defesa latentes, tais como os compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos fazem parte de uma das principais classes de metabólitos secundários em vegetais (TAIZ & ZEIGER, 2004), sendo muito importantes tanto para as plantas como para os seres humanos, protegendo-as contra fatores de estresse bióticos e abióticos e trazendo benefícios à saúde humana, prevenindo o desenvolvimento de câncer, doenças cardíacas, além de Alzheimer e disfunções urinárias (RUIZ-GARCÍA & GOMES-PLAZA, 2013).

Dentre eles, pode-se destacar o ácido salicílico (AS): um ácido monohidroxi benzóico, presente em todas as plantas, em menor ou maior escala, com características analgésicas e anti-inflamatórias, além de ser capaz de prevenir doenças cardiovasculares, desenvolvimento de câncer e doenças crônicas, como as auto-imunes, sendo ainda um dos ácidos fenólicos mais promissores como alternativa ao controle de doenças, em pré e pós-colheita pelo seu potencial antimicrobiano e de elicitar respostas de defesa, além da capacidade de manutenção das características físico-químicas dos alimentos (ALI *et al.*, 2013; CID *et al.*, 2014).

Por exemplo, Shabana *et al.* (2008) observaram a completa inibição do crescimento *in vitro* do fungo *Bipolaris oryzae* quando em contato com o ácido salicílico a 9 mM. Por outro lado, estudos vêm demonstrando que o ácido salicílico possui, além da ação antimicrobiana, potencial elicitor de moléculas de defesa, sendo capaz de aumentar, por exemplo, a atividade de  $\beta$ -1,3 glucanases e quitinases em plântulas de feijão, resultando em uma menor severidade da doença causada por *Colletotrichum lindemuthianum* e, conseqüentemente, retardando a velocidade de crescimento das lesões (CAMPOS *et al.*, 2009). Além disso, quando aplicado exogenamente, o AS prolongou o tempo de prateleira e manteve os atributos nutricionais de frutos de cereja através da inibição dos mecanismos de senescência e maturação (YAO & TIAN, 2005).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido salicílico para o controle do bolor azul da maçã, bem como avaliar o mecanismo de ação e o potencial elicitor deste composto fenólico. O

trabalho está organizado em três capítulos, compreendendo um capítulo teórico e dois experimentais.



## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Avaliar o efeito do ácido salicílico (AS) sobre o fungo *Penicillium expansum* e na proteção dos frutos de maçã de diferentes categorias contra o bolor azul.

### Objetivos Específicos

- Verificar o efeito de diferentes doses do ácido salicílico sobre o crescimento *in vitro* de *Penicillium expansum*, observando a influência do intervalo de exposição do fitopatógeno ao AS;
- Avaliar os mecanismos de ação antifúngica do ácido salicílico sobre *Penicillium expansum*;
- Verificar o efeito de diferentes doses do ácido salicílico sobre o a incidência e a severidade do bolor azul em frutos de maçã de diferentes categorias;
- Observar a influência do ácido salicílico em parâmetros fisiológicos: acidez titulável, sólidos solúveis e perda de massa dos frutos de maçã de diferentes categorias;
- Determinar a atividade de peroxidases, polifenoloxidasas, glucanases, assim como o teor de compostos fenólicos totais, o conteúdo e as concentrações de compostos fenólicos e os teores de flavonóides em frutos de maçã de diferentes categorias, tratados com ácido salicílico e desafiados com *Penicillium expansum*.



## HIPÓTESES

- O ácido salicílico é capaz de reduzir a incidência do bolor azul em frutos de maçã das diferentes categorias;
- O ácido salicílico possui ação antifúngica sobre os esporos de *Penicillium expansum*;
- O ácido salicílico preserva as características fisiológicas dos frutos de maçã;
- O ácido salicílico ativa os mecanismos de defesa e as respostas bioquímicas dos frutos de maçã relacionados à patogênese, além de conservar as características físico-químicas dos frutos de maçã.



# CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DO PATOSSISTEMA E MEDIDAS ALTERNATIVAS DE CONTROLE DE DOENÇAS

## 1. A CULTURA DA MACIEIRA E O BOLOR AZUL

### 1.1. Aspectos históricos, botânicos e fisiológicos da maçã

A macieira tem como centro de origem a região entre o Cáucaso, cadeia de montanhas da Ásia com altitudes de 2000 m, e o leste da China. O início do cultivo se deu possivelmente pelos gregos, mas foi no Império Romano que a cultura foi amplamente difundida. Nos dias atuais mais de 7 mil variedades de maçãs são cultivadas, sendo que apenas 40 delas possuem importância econômica (BLEICHER, 2002).

A macieira, *Malus domestica*, é uma planta da família Rosaceae, com cerca de 100 gêneros e mais de 2000 espécies espalhadas por todo o mundo. A macieira pertence à subfamília Pomoideae, caracterizando-se por possuir um receptáculo profundo em forma de taça, cujas paredes inferiores se unem aos carpelos que, por sua vez, unem-se entre si, contendo geralmente dois óvulos. Seu fruto é um pomo, constituído por um receptáculo carnudo e desenvolvido, envolvendo os ovários de endocarpo coriáceo, contendo uma única semente. As plantas são árvores lenhosas, de clima temperado, com folhas simples, alternadas e caducas, de flores hermafroditas brancas ou rosas (LUCHI, 2002).

Para o cultivo comercial da macieira, diversos fatores devem ser levados em consideração, tais como temperatura, umidade relativa, vento, pluviosidade, insolação, tipos de solo, topografia, entre outros. Dentre tais elementos, a temperatura é de longe o mais crítico, influenciando não apenas o período de dormência da planta, mas também a fase de crescimento vegetativo. Nesse sentido, tanto as temperaturas de inverno, como as da primavera e verão são importantes, já que podem influenciar diretamente o desenvolvimento da cultura. Com isso, temperaturas na faixa de 21°C durante a fase vegetativa são indispensáveis para que as plantas reiniciem um ciclo normal, sem anomalias na brotação e floração. Por outro lado, quando o frio não é suficiente para a superação de dormência das plantas, diminuindo a concentração dos inibidores de crescimento e garantindo uma frutificação uniforme, métodos artificiais podem ser utilizados, como a aplicação de produtos químicos, a exemplo do óleo mineral associado à cianamida hidrogenada (PETRI, 2002).

Fuji e Gala estão entre as principais cultivares produzidas no Brasil e no mundo. A Gala é uma das cultivares que mais vem

crescendo em popularidade ao redor do globo, devido a sua alta qualidade gustativa e boa aparência dos frutos. Esta tem sua origem na Nova Zelândia, adaptando-se facilmente em regiões com altitudes acima de 1.300 m, sendo necessário a utilização de métodos artificiais para a superação de dormência em regiões de menor altitude. É uma cultivar precoce, com início da colheita entre a segunda quinzena de janeiro e a segunda quinzena de fevereiro, que sofre pouca alternância de produção e que apresenta maturação dos frutos desuniforme. Seus frutos são de coloração vermelho-rajado sob fundo amarelo, liso e brilhante, de tamanho médio a pequeno, de formato cônico e polpa crocante e succulenta. Frutos sombreados, contudo, se tornam pouco coloridos. É muito suscetível à sarna (*Venturia inaequalis*) ao bolor azul (*P. expansum*) e a outras doenças, como a podridão amarga (*Colletotrichum gloeosporioides*). Em câmara fria, os frutos podem ser conservados por até 3 meses sem perder seu sabor e textura, ao passo que em condições de atmosfera controlada, este prazo se estende por até 5 meses (CAMILO & DENARDI, 2002).

Por outro lado, a cultivar Fuji está listada entre as quatro cultivares mais promissoras no contexto mundial, devido às suas excelentes qualidades organolépticas e alta produtividade, sendo responsável por mais de 40% das vendas no mercado mundial. Essa cultivar surgiu no Japão e foi introduzida no Brasil no ano de 1967. É uma planta vigorosa, altamente produtiva, tardia em comparação à precocidade da 'Gala', e muito exigente em frio hibernal, necessitando da superação de dormência por mecanismos artificiais em altitudes inferiores a 1.300 m. Seus frutos são de tamanho médio a grande, arredondados a oblongos, sendo achatados e menores em regiões com altitudes inferiores a 1.300 m. Sua epiderme é fina, de coloração rosa-pálida, com cor de fundo amarelada quando próximo ao ponto de maturação. A polpa é fortemente aromática, de textura firme, crocante e succulenta. É suscetível à podridão amarga (*Glomerella cingulata*) e ao bolor azul (*P. expansum*). De forma semelhante à cultivar Gala, os frutos podem ser armazenados em câmaras frias ou sob condições de atmosfera controlada, por períodos de até 6 ou 12 meses, respectivamente (CAMILO & DENARDI, 2002).

A velocidade de crescimento, forma e tamanho dos frutos, tempo e homogeneidade de maturação variam de acordo com a cultivar a ser plantada e o local em que será estabelecido o pomar. Nesse sentido, o fruto em seu desenvolvimento fisiológico passa primeiramente por um aumento do metabolismo e respiração devido ao intenso processo de

divisão celular. Posteriormente, há uma diferenciação dos tecidos, havendo um aumento no tamanho total das células, proporcionando um crescimento dos frutos. Em seguida, há maturação fisiológica e, por fim, ocorre a maturação comercial do fruto, com a oxidação de ácidos orgânicos e hidrólise do amido, juntamente com a modificação da coloração da epiderme e produção de antocianinas e carotenóides, variando de acordo com cada cultivar e as condições a que estão sujeitas (LUCHI, 2002). Assim como outros frutos climatéricos, a maçã sofre um rápido aumento da taxa respiratória e síntese de etileno depois de sua maturação fisiológica, quando armazenados a temperatura ambiente, apresentando uma alta atividade respiratória e produzindo grandes quantidades de etileno que, relacionados a outros fatores, aceleram o amadurecimento dos frutos (KADER, 1992).

## **1.2. Importância econômica e nutricional da macieira**

A maçã é uma das principais frutas produzidas no mundo, contribuindo no ano de 2010 com 9,5% do total de produção de frutas, com uma produção mundial de 69.511.975 toneladas (FAO, 2011).

A concentração da produção brasileira de maçãs está na região sul do Brasil, principalmente nos locais que se assemelham às regiões do centro de origem da cultura. Santa Catarina é o principal estado produtor de maçãs, produzindo um total de 660 mil toneladas, em uma área de aproximadamente 20 mil hectares, correspondendo a 49,3% da produção nacional de maçã em 2012 (CEPA, 2013). No cenário nacional, a produção total de frutos de maçã para o ano de 2012 foi de 1.339.771 toneladas, elevando o Brasil à posição de um dos principais produtores mundiais de maçã, na 9<sup>o</sup> colocação (IBGE, 2012).

Por se tratar de uma cultura perene e necessitar de cuidados constantes durante o ciclo, do plantio à colheita, contribui intensamente no desenvolvimento econômico e social da região. Isso fica evidenciado em regiões produtoras como São Joaquim e imediações, onde a atividade e produção se dão principalmente por um grande número de pequenos produtores e empresas cooperativas, movimentando cerca de 70% da economia do município (IBGE, 2009).

Somado ao destaque econômico, os frutos de maçã além de saborosos, possuem um considerável valor nutritivo, inestimáveis à saúde humana, além de quantidades consideráveis de vitaminas dos complexos A, B e C, além de sais minerais como cálcio, fósforo, ferro e cobre. A esses, soma-se o baixo teor de lipídios, elevada quantidade de

água, quercetina, taninos e flavonóides. Além disso, um estudo realizado demonstrou que, dentre as frutas mais consumidas, a maçã é a que apresenta a segunda maior quantidade total de compostos fenólicos e a primeira em compostos fenólicos solúveis (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Com todos esses atributos, não é de se estranhar que à maçã tenha se atribuído o slogan “one apple a day keeps the doctor away”.

Por ser uma cultura de grande importância econômica e nutricional, a maçã é acometida por diversas doenças que podem restringir sua qualidade comercial e nutricional, destacando-se o bolor azul (*Penicillium expansum*), o mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) e a podridão amarga (*Colletotrichum* spp.), entre outras (MONDINO *et al.*, 2009).

### 1.3. *Penicillium expansum*

O gênero *Penicillium* pertence à ordem Eurotiales da subdivisão Ascomycotina, sendo muito comum na fase de pós-colheita, podendo produzir micotoxinas nos órgãos atacados, como a patulina, um composto polar produzido por todos os isolados de *P. expansum* (FRISVAD & SAMSON, 2004; SANZANI *et al.*, 2009; KOZLOVSKII *et al.*, 2013).

*P. expansum* é um fungo cosmopolita, não específico, que ataca diversas culturas, tais como maçãs e peras, provocando uma podridão mole, sendo nos países produtores de maçã a doença mais importante na perda da qualidade e quantidade dos frutos armazenados (JANISIEWICZ, 1999), não existindo cultivares resistentes ao ataque do fitopatógeno.

A podridão mole causada tem aspecto aquoso, de coloração castanho-clara, podendo a cor variar de uma fruta a outra, e o tecido afetado separa-se facilmente das partes sadias. A esporulação do fitopatógeno é abundante nas regiões infectadas, apresentando coloração esbranquiçada (esporos imaturos) a azulada (esporos maduros) nos frutos de maçã, tornando a doença conhecida como bolor azul. Por ser incapaz de atravessar a cutícula dos frutos, a penetração do fungo ocorre a partir de ferimentos ou de aberturas naturais, onde cada fruto contaminado apresenta inóculo capaz de infectar de 12 a 15 novos frutos sadios (KIMATI *et al.*, 1997; MONDINO *et al.*, 2009).

Quando a umidade relativa é alta, a podridão se desenvolve rapidamente, com uma grande produção de esporos assexuais do tipo conídios na superfície da lesão. Os conídios são extremamente

resistentes a secas, sobrevivendo na superfície de caixas de colheita, nas câmaras de armazenamento e outros equipamentos sendo impossível a completa eliminação dos esporos do ambiente (MORALES *et al.*, 2010). No entanto, a germinação dos esporos de *P. expansum* encontra seu ótimo sob temperaturas entre 21° a 25°C, e umidade relativa superior a 80%.

Figura 1. Conídios e conidióforos de *P. expansum* corados com azul de Amann e visualizados sob microscopia de luz (a). Colônia do fitopatógeno em meio de cultura (b). Sintomas do bolor azul em frutos de maçã ‘Fuji’ (c).



Fontes: (a) Blancard, 2013. Disponível em: [ephytia.inra.fr](http://ephytia.inra.fr). Acesso em: 11 de Janeiro de 2014 (b-c) O autor.

Nesse sentido, métodos culturais de controle são de extrema importância, tais como a desinfestação das caixas de colheita com hipoclorito de sódio a 100 ppm de cloro ativo, e dos locais de armazenamento com pastilhas de tiabendazole. É importante que se tomem cuidados durante todo o processo, evitando-se causar danos mecânicos nos frutos e também a contaminação cruzada, realizando-se limpezas periódicas dos locais de armazenamento, e evitando-se a colheita dos frutos em condições favoráveis de infecção (MONDINO *et al.*, 2009).

Tratamentos pós-colheita podem ser realizados com fungicidas registrados, como os do grupo dos benzimidazóis, além de iprodione e imazalil, devendo a água utilizada no tratamento estar isenta de partículas de argila e matéria orgânica (MAPA, 2013).

No entanto, com uma crescente demanda social por produtos menos impactantes ao ambiente e à saúde humana, somado à ineficiência que o controle químico por agrotóxicos vem apresentando, têm-se buscado cada vez mais agentes alternativos ou produtos de interesse dentro do contexto da sustentabilidade e da agricultura economicamente proveitosa, como os compostos fenólicos, que são produtos sintetizados pelas plantas, capazes de erradicar os fitopatógenos por antibiose ou mesmo elicitando as respostas de defesa (CHITARRA & CHITARRA, 2005).

## 2. MÉTODOS DE CONTROLE ALTERNATIVO

### 2.1. Conceitos e definições

A necessidade do homem em controlar as doenças que ocorrem em plantas exploradas economicamente vem causando graves danos ao ambiente. Com o uso indiscriminado de produtos químicos sintéticos complexos, é crescente a contaminação dos alimentos, de animais, reservas hídricas e também do solo, contribuindo para a redução da qualidade e expectativa de vida da população mundial (BONALDO *et al.*, 2005).

Por outro lado, ao longo do tempo, em seu processo adaptativo, os seres vivos desenvolveram mecanismos próprios de defesa de modo a impedir a infecção por agentes patogênicos, e com as plantas não foi diferente. Nesse sentido, as plantas ao não permitirem a entrada passiva de fitopatógenos em seu interior celular, desenvolveram diferentes mecanismos de defesa, agrupados em pré e pós-formados. Ou seja, mecanismos existentes antes do contato do microrganismo com o hospedeiro e mecanismos ativados após o contato do fitopatógeno com o hospedeiro, respectivamente (PASCHOLATI, 1995; SOARES & MACHADO, 2007).

A ativação dos mecanismos de defesa induzidos pelos fitopatógenos pode ser alcançada por diferentes vias, sendo essas ativadas isoladamente ou concomitantemente. Dessa maneira, a velocidade com que a planta reconhece a presença do fitopatógeno ou

do elicitor é que irá desencadear uma ou mais respostas de defesa (BONALDO *et al.*, 2005).

Os fitopatógenos possuem a capacidade de detectar a presença de plantas hospedeiras em seu ambiente sendo capacitados a reconhecer características específicas da superfície do hospedeiro, para proceder com a infecção. Em contrapartida, as plantas possuem mecanismos complexos para detectar a infinidade de agentes fitopatogênicos em seu ambiente além da capacidade de ativação de defesas na presença de um determinado microrganismo ou elicitor.

Contudo, quando um fitopatógeno não é reconhecido pelas plantas, suas respostas de defesa latentes acabam não sendo ativadas e, por isso, há o desenvolvimento da doença, culminando na redução da produtividade, na alteração do metabolismo vegetal, na morte da planta ou mesmo na perda de qualidade dos seus frutos (METRAUX, 2001; CLUZET *et al.*, 2004).

A indução de resistência é um desses mecanismos, ocorrendo quando há uma proteção local no vegetal a partir de uma molécula elicitora ou de forma sistêmica, manifestando-se em local diferente àquele de aplicação (MORAES, 1992), entendendo-se por elicitores os agentes indutores de origem biótica ou abiótica, capazes de ativar ou induzir alguma resposta de resistência no vegetal (SMITH, 1996).

Outro mecanismo pelo qual as plantas são capazes de se defender dos ataques dos fitopatógenos é a antibiose, onde a partir do contato de compostos orgânicos de baixo peso molecular e em baixas concentrações, há um efeito deletério no crescimento, desenvolvimento ou outras atividades metabólicas relacionadas ao fitopatógeno (FRAVEL, 1988).

Os compostos tóxicos produzidos constitutivamente pelas plantas, independente do ataque de fitopatógenos, variam quanto ao grau de seletividade antimicrobiana bem como seu modo de atuação nos microorganismos, atuando na inibição da síntese da parede celular, na corrosão da parede celular, alterando a permeabilidade da membrana plasmática, causando corrosões na membrana plasmática, inibindo a síntese de ácidos nucleicos ou na síntese protéica, além de atuarem como antagonistas metabólicos (MAYER, 2011). Com isso, cresce a investigação científica relacionada a estes, seja para descoberta de novos antibióticos, extraídos das plantas, seja para o desenvolvimento de novas moléculas sintéticas.

Dessa maneira, por possuir efeitos antagônicos aos fitopatógenos ou mesmo por induzir resistência no hospedeiro sem alterar o genoma

da planta a partir de agentes externos, diversos são os estudos realizados com diferentes moléculas, tais como compostos presentes em extratos de plantas (COLPAS, 2009), exopolissacarídeos bacterianos (CASTRO & BACH, 2004), ácido salicílico (CIPOLLINI, 2003), acibenzolar-S-metil (HEIL, 2002), entre outros.

Nesse sentido, entender os mecanismos pelos quais as plantas controlam as doenças é um evento chave para o desenvolvimento e melhorias das diferentes estratégias de aplicação dos compostos de interesse, onde a utilização de compostos alternativos tornou-se uma medida promissora ao controle das diversas doenças vegetais, frente a uma ampla gama de fitopatógenos, a partir de diferentes mecanismos de ação (CAVALCANTI *et al.*, 2005).

## **2.2. Utilização de compostos fenólicos no controle de doenças de plantas**

As plantas se defendem bioquimicamente dos estresses bióticos e abióticos de diversas formas, como a partir da biossíntese de compostos orgânicos tóxicos aos microrganismos, por mudanças fisiológicas decorrentes da biossíntese de sinalizadores de respostas de defesa ou mesmo pela biossíntese de compostos formadores de barreiras vegetais (CHITARRA & CHITARRA, 2005).

Nessas diferentes formas encontram-se as principais classes de metabólitos secundários produzidos nas plantas, como os terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ & ZEIGER, 2004). Os compostos fenólicos sintetizados apresentam efeitos protetores contra a exposição aos altos níveis de radiação solar e também exercendo ação protetora, antioxidante e antimicrobiana (antibiose) contra fungos e bactérias, além de serem importantes para a estrutura celular, na pigmentação e sinalização das respostas de defesa dos vegetais (SHETTY *et al.*, 2008). Esses compostos possuem um ou mais grupos hidroxila ligados a um anel aromático, podendo ter diversos grupos substituintes, como carboxilas, metoxilas, estruturas cíclicas não aromáticas, entre outros. Dentro das diversas classes de compostos fenólicos existentes nos vegetais superiores, encontram-se os compostos não flavonóides como os ácidos gálico, protocatéico, cumárico, caféico e ferúlico (FARAH & DONANGELO, 2006).

Tais propriedades, de ação protetora, antimicrobiana e de sinalização de respostas de defesa, têm sido muito estudadas por pesquisadores das diversas áreas ao redor do globo, sendo constatadas

pela eficiência dos inúmeros compostos presentes, principalmente, em plantas medicinais. No intuito de utilizar os compostos fenólicos em substituição aos produtos químicos, Manso *et al.* (2013) observaram uma redução de 50% no desenvolvimento *in vitro* de *Aspergillus flavus* quando submetido ao óleo essencial de cinamomo contendo cinamaldeído ( $900 \text{ mg.g}^{-1}$ ), um composto fenólico presente nas folhas de cinamomo.

O potencial antimicrobiano dos compostos fenólicos foi relatado em estudos de Yu & Zheng (2006); Almeida (2007) e Sanzani *et al.* (2009) que demonstraram a eficiência dos ácidos salicílico, caféico, ferúlico, cinâmico e giberélico contra fitopatógenos, atuando como fungicidas em concentrações próximas a 5 mM.

Os compostos fenólicos apresentam ainda benefícios aos seres humanos, desde que ingeridos em doses adequadas, tais como ações anti-inflamatórias, anti-alérgicas, anti-carcinogênicas e anti-hepatotóxica, atuando também como antioxidantes, através da eliminação de radicais livres pela capacidade de doação dos grupamentos hidroxila posicionados ao redor do anel aromático (SILVA *et al.*, 2009). Nesse sentido, segundo Shetty (2008), há evidências que sugerem que a ingestão de compostos fenólicos via frutas e vegetais está relacionada à redução dos riscos de se ter doenças crônicas, como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer.

### 2.2.1. Ácido salicílico

Dentre os compostos fenólicos, o ácido salicílico (AS) ou orto-hidroxi ácido benzóico é um ácido fenólico, com um anel aromático ligado a um grupamento hidroxil ou derivado funcional, amplamente distribuído na natureza, presente em todo o reino vegetal, sendo muito utilizado e vendido como droga sintética em países como a Alemanha, Brasil e EUA. Em vegetais, o AS é considerado um forte fito-hormônio, presente nas diversas vias metabólicas (HAYAT *et al.*, 2010), atuando também como regulador endógeno de crescimento vegetal. No seu estado livre, o AS é encontrado em pó, com pH de 2,4 a 2,8, tendo como propriedade a capacidade de formar conjugados com uma ampla variedade de moléculas, por glicolisação ou esterificação (POPOVA *et al.*, 1997).

O ácido salicílico é considerado ainda como uma importante molécula de sinalização envolvida em respostas de defesa locais e sistêmicas frente a uma ampla gama de fitopatógenos, sendo também

relacionado à modulação das respostas das plantas a uma séria de estresses oxidativos (HAYAT *et al.*, 2010).

Em estudo desenvolvido por Yao & Tian (2005) o ácido salicílico foi capaz de reduzir o crescimento micelial em 64% e a germinação do fungo *Monilinia fructicola* em 60%, a uma concentração de 2 mM. Fato também relatado por Iqbal (2010) sobre *Penicillium sp.*, o qual observou o efeito fungicida do ácido salicílico com reduções de 60% e 100% na germinação de esporos quando utilizado a 2 e 6 mM, respectivamente.

Por outro lado, a capacidade do AS de elicitar os mecanismos de defesa em plantas foi relatada por Vieira & Valle (2006), os quais observaram o aumento da atividade de peroxidases em plantas de cacau suscetíveis à vassoura de bruxa (*Moniliophthora perniciosa*), reduzindo em 50% a intensidade da doença após a aplicação exógena de AS a 15 mM.

Além disto, pesquisas têm demonstrado que com a aplicação exógena de AS o processo de produção de etileno em frutos e, conseqüentemente, o processo de amadurecimento, é diminuído a partir da redução da produção e da atividade das enzimas ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) sintase e ACC oxidase, responsáveis pela conversão do ACC em etileno (ASHARI *et al.*, 2010). Avaliando os efeitos do AS sobre a qualidade dos frutos de maçã armazenados sob refrigeração, Kazemi *et al.* (2011) demonstraram que a imersão dos frutos em AS a 1,5 e 3 mM preservou importantes características como firmeza de polpa, sólidos solúveis e massa fresca.

### 2.3. Mecanismos de defesa

Os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas correlacionadas às mudanças na atividade de enzimas-chave dos metabolismos primário e secundário dos vegetais, além da produção de uma variada gama de substâncias que mostram-se tóxicas aos fitopatógenos no interior celular (STANGARLIN *et al.*, 2005). Destas, destacam-se as peroxidases, polifenoloxidases,  $\beta$ -1,3 glucanases e os flavonóides.

As peroxidases (POX) são glicoproteínas associadas à membrana, presentes em diversos tecidos, tanto de animais, plantas e microrganismos, facilitando o processo de oxi-redução entre o peróxido de hidrogênio e os compostos redutores (HIRAGA *et al.*, 2001).

As POX apresentam uma gama variada quanto às funções na defesa celular, atuando nos processos de lignificação, suberização e

metabolismo da parede celular, sendo classificadas como proteínas relacionadas à patogênese pertencentes à família PR-9 (VAN LOON & VAN STRIEN 1999). Estas enzimas são também responsáveis pela deterioração de diversos materiais vegetais durante o armazenamento, estando envolvidas em outros processos biológicos, tais como nos processos de oxidação, ligações de polissacarídeos, cicatrizações de ferimentos, estresse fisiológico, oxidação de fenóis, entre outras (FREITAS *et al.*, 2008).

No processo de indução de resistência, as POX são amplamente estudadas devido ao seu papel central nos processos de defesa onde, na maioria dos casos, um aumento na sua atividade pode ser diretamente relacionado à redução da severidade da doença. Isso foi verificado por Alavifard *et al.* (2012) que, ao aplicarem *Candida membranifaciens* ( $1 \times 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>) em frutos de maçã, observaram uma redução na severidade e incidência do mofo cinzento (*Botrytis cinerea*), além do significativo aumento na atividade das enzimas peroxidases, glucanases e catalases.

Por outro lado, as polifenoloxidasas (PPO) agrupam um conjunto de enzimas responsáveis pela catálise do processo de oxidação de polifenóis em quinonas. Estas enzimas estão amplamente distribuídas em todas as espécies vegetais, sendo encontradas ainda em bactérias, fungos e algas. Em plantas, estão presentes em toda a sua estrutura, podendo estar mais concentradas em algum órgão/tecido, assim como seu nível pode variar de acordo com as condições ambientais a que estão sujeitas, podendo sua expressão ser induzida por ferimentos ou pela aplicação exógena de metil-jasmonato (CONSTABEL *et al.*, 1995).

As PPO são alojadas no interior celular, em sua maioria no estado inativo, compartimentalizadas nos tilacóides dos cloroplastos e separadas dos compostos fenólicos que, por sua vez, estão compartimentalizados nos vacúolos ou extracelularmente em pequenas quantidades. À medida em que ocorrem rupturas celulares, decorrentes de ferimentos, ações de fitopatógenos ou mesmo senescência, as PPO são liberadas ao meio e iniciam o processo de oxidação dos compostos fenólicos em quinonas, possibilitando a formação de produtos mais tóxicos aos microrganismos do que o fenol original (LIU *et al.*, 2005; ALVARENGA *et al.*, 2011).

Na área alimentícia, as PPO têm sido muito estudadas devido às suas características negativas, isto é, a formação de quinonas responsáveis pelo escurecimento de frutos e vegetais, resultando em alteração das propriedades organolépticas de alimentos, como em

maçãs, peras, entre outros. Por outro lado, esta mesma propriedade é desejável em alguns alimentos, tais como café, cacau e ameixa seca, dando uma coloração característica aos produtos (ARAUJO, 2004).

Em experimento realizado por Liu *et al.* (2005), foi verificado que a indução de resistência com acibenzolar-S-metil, um análogo do ácido salicílico, resultou no aumento da atividade de PPO e na redução da severidade do bolor azul em pêssegos armazenados.

As  $\beta$ -1,3 glucanases (GLU) são enzimas amplamente distribuídas entre as plantas superiores e que hidrolisam os polímeros de glucanas  $\beta$ -1,3, que, juntamente com a quitina, são os principais componentes de resistência da parede celular de fungos. Nesse sentido, conjuntamente às quitinases, as  $\beta$ -1,3 glucanases representam hidrolases com potencial antifúngico, atuando de forma sinérgica para a inibição do crescimento fúngico, além de liberar fragmentos glicosídicos do fitopatógeno e da parede celular para o meio, os quais podem se constituir em elicitores de outras defesas do hospedeiro (MARKOVICH & KONONOVA, 2003; BAUERMEISTER *et al.*, 2010).

No processo de indução de resistência, as quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases atuam simultaneamente, onde uma pequena quantidade de  $\beta$ -1,3 glucanase é sintetizada e liberada para a lamela média celular e, a partir do crescimento fúngico nesse espaço, a enzima inicia o processo de degradação do tecido da parede celular do fungo. Esses fragmentos liberados pela ação enzimática funcionam como exo-elicitors, de forma a induzir a síntese de grandes quantidades de quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases, sendo acumuladas nos vacúolos. A partir da penetração celular, os vacúolos são rompidos e grandes quantidades dessas enzimas são liberadas, reprimindo a ação do fitopatógeno (MAUCH & STAEHELIN, 1989). Ao realizar o tratamento térmico de frutos de pêssego por 10 minutos, Liu *et al.* (2012) observaram um aumento na atividade enzimática de  $\beta$ -1,3 glucanases e de quitinases, resultando na diminuição de incidência e severidade da podridão parda (*Monilinia fructicola*).

Os flavonóides, por sua vez, representam o grupo mais comum e de maior abrangência de compostos fenólicos presentes em frutos, sendo formados basicamente por dois anéis aromáticos ligados por 3 carbonos. Devido às variações estruturais, o sistema em que os carbonos são organizados e pela sua via de biossíntese, os flavonóides são divididos em diversas famílias como as flavonas, antocianinas, chalconas, entre outros (PALIYATH *et al.*, 2008).

Nos frutos, os flavonóides atuam principalmente protegendo-os contra os danos provenientes da luz ultra-violeta, pela inibição da germinação e infecção dos fungos fitopatogênicos, além de estarem relacionados à coloração e sabor dos frutos. Além disso, estudos têm demonstrado o potencial benéfico dos flavonóides à saúde humana quando ingeridos, diminuindo o desenvolvimento de doenças como câncer, alzheimer, entre outras doenças crônicas (BOYER & LIU, 2004; CUSHNIE & LAMB, 2005).



## **CAPÍTULO 2 – POTENCIAL ANTIFÚNGICO E MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO CONTRA *Penicillium expansum***

### **2.1 INTRODUÇÃO**

A maçã é uma das frutas mais consumidas e produzidas no mundo, sendo responsável, em 2010, por 9,5% do total de frutas produzidas (FAO, 2011). Os frutos, além de saborosos, possuem um alto valor nutritivo, são constituídos por complexos vitamínicos, sais minerais e alto teor de água, além de apresentarem baixo teor lipídico e alta quantidade de compostos fenólicos solúveis (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Diversas são as moléstias que acometem os frutos de maçã, entre as quais o bolor azul tem destaque, uma vez que não existem cultivares resistentes ao ataque do fitopatógeno. O bolor azul é causado pelo fungo fitopatogênico *Penicillium expansum*, um microrganismo altamente agressivo, cosmopolita, resistente às condições adversas do ambiente, de rápida disseminação e capaz de produzir uma série de micotoxinas, com efeitos tóxicos à saúde humana, tais como a patulina (QUAGLIA *et al.*, 2011).

Desde a colheita ao armazenamento, os frutos de maçã deveriam passar por uma série de procedimentos que, caso bem executados, diminuiriam consideravelmente a incidência do bolor azul, pois o fitopatógeno necessita de pequenos ferimentos na epiderme dos frutos ou de aberturas naturais, como estômatos e lenticelas, para infectá-los (FILONOW, 2005; MONDINO *et al.*, 2009).

Assim, medidas adotadas a campo como a eliminação de pragas, adubação equilibrada e a remoção de fontes de inóculo, e em pós colheita, como a desinfestação dos meios de transporte e o armazenamento dos frutos em câmaras frias associadas à atmosfera controlada, deveriam ser adotadas visando à diminuição das perdas ocasionadas pelo fitopatógeno (SANT'ANA *et al.*, 2008).

Como grande parte destas medidas são negligenciadas, os fungicidas são utilizados como uma das principais ferramentas para o combate dos fitopatógenos em pós-colheita de frutos (KARABULUT *et al.*, 2002; CALVO *et al.*, 2007). Formulações comerciais contendo os grupos químicos dos imidazóis e das dicarboximidas estão disponíveis para a utilização no Brasil, sendo permitidos e recomendados para o tratamento de maçãs no pós-colheita (MAPA, 2013).

Outra medida muito utilizada para o controle da doença é a adição de cloro ativo na água de lavagem dos frutos. No entanto, estudos apontam que a relação entre o uso do cloro em locais com presença abundante de compostos orgânicos livres, isto é, resíduos orgânicos, podem acarretar na formação de trihalometanos, compostos com efeitos negativos à saúde humana, capazes de causar, entre outros males, câncer (MEYER, 1994).

Dessa maneira, a seleção de fitopatógenos resistentes aos produtos comumente utilizados, associada à crescente preocupação sobre a saúde humana e poluição ambiental, tem estimulado a busca por novas formas de proteção dos frutos contra podridões (QUAGLIA *et al.*, 2011). Dentre essas novas estratégias, a utilização de compostos fenólicos tem chamado a atenção, não apenas por desempenharem um importante papel nas plantas em resposta aos estresses abióticos ou bióticos, mas também por apresentarem benefícios à saúde humana, tal como seus efeitos antioxidantes (SANZANI *et al.*, 2010).

O ácido salicílico (AS), um ácido fenólico que apresenta um anel aromático ligado a um grupamento hidroxil ou derivado funcional, destaca-se por ser um hormônio vegetal endógeno que faz parte de diferentes aspectos centrais no desenvolvimento e crescimento dos vegetais, e também por se constituir em uma importante molécula sinalizadora na via de biossíntese de compostos relacionados à defesa, como os polifenóis e proteínas relacionadas à patogênese (TIAN *et al.*, 2007; ASGHARIA & AGHDAM, 2010).

Além disso, diversas são as pesquisas demonstrando o efeito antifúngico do AS sobre fitopatógenos, inibindo a germinação de esporos de *P. expansum* (YU & ZHENG, 2006), *Penicillium* spp. (IQBAL, 2010), *Botrytis cinerea* (WANG *et al.*, 2011) e *Rhizopus stolonifer* (PANAHIRAD *et al.*, 2012). Por outro lado, os mecanismos de ação pelos quais o AS atua contra os fitopatógenos não foram totalmente elucidados.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antifúngico do AS sobre a germinação e o desenvolvimento de *P. expansum*, e elucidar os mecanismos de ação desse composto fenólico relacionados à viabilidade dos esporos. A elucidação desses mecanismos é fundamental para que sejam desenvolvidas estratégias alternativas eficientes e seguras no controle do bolor azul em frutos de maçã.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1. Obtenção e manutenção do isolado de *Penicillium expansum*

O fitopatógeno *Penicillium expansum*, isolado de frutos de maçã infectados, foi cedido pela pesquisadora Dra. Rosa Maria Valdebenito Sanhueza, sendo armazenado na micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o código MANE 138. O isolado foi crescido e mantido em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA), a 25°C, sob luz fluorescente.

*P. expansum* foi repicado periodicamente e, quando utilizadas, as suspensões de esporos ( $1 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>) foram obtidas de culturas com duas semanas de idade.

### 2.2.2. Obtenção dos compostos fenólicos

O ácido salicílico (AS), fórmula química C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>, foi adquirido junto à empresa Sigma (Sigma-Aldrich, EUA) em pó, sendo utilizado em diferentes concentrações nos diferentes experimentos realizados. Para a sua dissolução, foi utilizado água destilada estéril (SHALMASHI & ELIASSI, 2008).

Os ácidos fenólicos *trans*-cinâmico, caféico, siríngico e clorogênico foram adquiridos juntos à empresa Sigma (Sigma-Aldrich, EUA), em pó, sendo utilizados na concentração final de 2,5 mM. Utilizou-se água destilada estéril para a dissolução dos ácidos.

Aspirina®, produto comercial da Bayer contendo ácido acetil salicílico, foi adquirida em tablete, triturada e utilizada somente no momento do tratamento, à concentração de 2,5 mM de ingrediente ativo (i.a) AS, em pH 3 e 4. Para sua dissolução, utilizou-se água destilada estéril.

### 2.2.3. Padronização da metodologia de germinação de *P. expansum*

Determinou-se a concentração ideal de suco de maçã bem como o tempo de incubação dos esporos para a germinação do fitopatógeno. O suco foi preparado a partir da trituração de um fruto de maçã previamente desinfestado em juicer (Wallita), obtendo-se um extrato bruto que, posteriormente, foi diluído com água destilada. Para a padronização, esporos de *P. expansum* foram suspensos em diferentes concentrações de suco de maçã (0%, 4%, 8%, 12%, 16% ou 20%) à

concentração final (c.f) de  $1 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>, sendo depositados 25 µL das suspensões em cavidades de lâminas escavadas. Após a preparação das lâminas, estas foram dispostas no interior de placas de Petri e incubadas durante diferentes tempos (0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h ou 20 horas), com fotoperíodo de 12 horas de luz, e temperatura de  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , sob alta umidade relativa. O desenvolvimento dos esporos foi paralisado pela adição de 5 µL de lactofenol à suspensão. Foram feitas ao menos 4 repetições por tratamento e o experimento realizado duas vezes para a confirmação dos resultados. Em cada repetição, representada por uma cavidade da lâmina escavada, foram avaliados 100 esporos quanto à porcentagem de germinação com o auxílio de microscópio óptico (FWL1500T, Feldmann Wild Leitz).

#### 2.2.4. Efeito de ácidos fenólicos na germinação de *P. expansum*

**Potencial antifúngico dos ácidos fenólicos.** Inicialmente, foi avaliado o efeito de diferentes compostos fenólicos sobre a germinação de *P. expansum*. Uma suspensão de esporos do fitopatógeno foi preparada em suco de maçã a 8% e alíquotas de 25 µL dessa suspensão foram depositadas em cavidades de lâminas escavadas. A essas alíquotas, foram adicionados 25 µL de uma solução dos ácidos salicílico, *trans*-cinâmico, caféico, siríngico ou clorogênico, chegando à concentração final de  $1 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup> e 2,5 mM de um ácido fenólico em cada cavidade. Alíquotas de 25 µL de água destilada estéril e de hipoclorito (0,5% c.f de cloro) foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. Após a preparação das lâminas, essas foram dispostas no interior de placas de Petri e incubadas por 20 horas, com fotoperíodo de 12 horas de luz e temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , sob alta umidade relativa. O desenvolvimento dos esporos foi paralisado pela adição de 5 µL de lactofenol à suspensão. Foram feitas 4 repetições por tratamento e o experimento realizado duas vezes para a confirmação dos resultados. Em cada repetição, representada por uma cavidade da lâmina escavada, foram avaliados 100 esporos quanto à porcentagem de germinação e 20 esporos quanto ao comprimento do tubo germinativo (CTG) com auxílio de ocular micrométrica em microscópio óptico (FWL1500T, Feldmann Wild Leitz).

Posteriormente, avaliaram-se diferentes concentrações do AS (0, 1, 2,5 ou 5 mM) sobre a germinação de *P. expansum*, conforme os moldes anteriores, sendo o experimento realizado três vezes.

**Velocidade de atuação do AS.** De modo a se verificar a velocidade de atuação do AS sobre a germinação de *P. expansum*, seguiu-se a metodologia de Liu *et al.* (2007) com adaptações. Para tanto, a 10 mL de uma suspensão de esporos ( $2 \times 10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup>) preparada em suco de maçã a 8% foram adicionados 10 mL de água destilada estéril, AS (c.f. 2,5 mM) ou hipoclorito (c.f. 0.5%), sendo mantidas sob agitação constante e incubadas a temperatura ambiente. Alíquotas de 500 µL foram retiradas aos 0, 5, 15, 30, 60 ou 120 minutos após a incubação, e centrifugadas a 8000 g, por 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados lavados com tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7), novamente centrifugados (8000 g., 5 min) e lavados com água destilada estéril, sendo re-suspensos em suco de maçã a 4% a uma concentração final de  $1 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>. Finalmente, as suspensões de esporos obtidas foram submetidas ao teste de germinação em lâmina escavada conforme descrito anteriormente. O experimento foi realizado três vezes.

**Efeito da acidificação e alcalinização dos controles e do AS sobre a germinação de *P. expansum*.** Em um primeiro momento, foi avaliada a influência dos diferentes pH do AS e dos controles sobre a germinação dos esporos de *P. expansum*. Uma suspensão de esporos de *P. expansum* foi preparada em suco de maçã a 8% e, a esta, adicionados na proporção 1:1 (v/v) uma solução de AS, água destilada estéril ou hipoclorito, chegando à concentração final de  $1 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>, 2,5 mM de AS ou 0,5% de cloro ativo (controle negativo), com os pH modificados pela adição de HCl 0,05 N ou NaOH 2 N (pH final das soluções de 2, 3, 4 ou 8). Alíquotas de 25 µL destas soluções foram colocadas em lâminas escavadas e estas dispostas no interior de placas de Petri e incubadas por 20 horas, com fotoperíodo de 12 horas de luz e temperatura de 25°C ± 1°C, sob alta umidade relativa. O desenvolvimento dos esporos foi interrompido pela adição de 5 µL de lactofenol à suspensão. Foram feitas 4 repetições por tratamento e o experimento realizado três vezes. Em cada repetição, representada por uma cavidade da lâmina escavada, foram avaliados 100 esporos quanto à porcentagem de germinação e 20 esporos quanto ao comprimento do tubo germinativo (CTG) com auxílio de ocular micrométrica em microscópio óptico.

Em um segundo momento avaliou-se o potencial antifúngico do AS a 2,5 mM (c.f. adicionado à suspensão de esporos de *P. expansum* (c.f.)  $1 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup> na proporção de 1:1 (v/v), nos pH finais de 2; 2,5; 2,8; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5 ou 6, ajustados a partir da adição de HCl

(0,05 N) ou NaOH (2 N) à solução. Como controle utilizou-se suco de maçã a 4% nos diferentes pH, seguindo os demais moldes do experimento anterior e o bioensaio sendo repetido três vezes.

Posteriormente, para se avaliar o efeito do grupamento acetil no potencial antifúngico do AS, utilizou-se AS a 2,5 mM (c.f) ou ácido acetil salicílico (AAS) a 2,5 mM (c.f de AS) na avaliação da germinação de esporos. Suco de maçã a 4% foi utilizado como controle, sendo os pH das soluções ajustados para 3 pela adição de HCl (0,05 N). O experimento seguiu os moldes descritos anteriormente e foi conduzido duas vezes para confirmação dos resultados.

### **2.2.5. Mecanismos de ação antimicrobiana do ácido salicílico sobre *P. expansum***

**Efeito do AS sobre a parede celular de *P. expansum*.** A avaliação do efeito do AS sobre a parede celular do fitopatógeno foi realizada conforme metodologia proposta por Cerioni *et al.* (2010), com modificações. Assim, suspensões contendo  $2 \times 10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup> de *P. expansum* foram preparadas em suco de maçã a 8% e, a essas, adicionadas na proporção de 1:1 (V/V) solução de AS a 2,5 mM (c.f) ou água destilada estéril (controle), e mantidas sob constante agitação à temperatura ambiente. Amostras de 500 µL foram coletadas nos tempos 0, 5, 15, 30, 60 ou 120 minutos de contato, centrifugadas (8000 g., 5 min, a 4°C), lavadas duplamente com solução tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7) e água destilada estéril, centrifugadas novamente (8000 g., 5 min, a 4°C) e re-suspensas em suco de maçã a 4% à concentração final de  $1 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>. Aliquotas de 50 µL desses materiais foram transferidos para lâminas escavadas para permitir a germinação do fitopatógeno, sendo incubadas por 20 horas, com fotoperíodo de 12 horas de luz e temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , sob alta umidade relativa. Após o período de incubação, amostras de 25 µL das suspensões de esporos foram transferidas para lâminas lisas, adicionando-se 10 µL (50 µg.mL<sup>-1</sup>) do reagente Calcofluor White Stain (Sigma, EUA), e 10 µL de hidróxido de potássio (10%), com incubação por 15 minutos sob escuro. Os esporos foram visualizados e avaliados quanto à sua morfologia em microscópio de fluorescência (Eclipse 50i, Nikon) nos comprimentos de onda 395 nm (excitação) e 440 nm (emissão) e as imagens realizadas com auxílio de câmera digital Nikon (Coolpix P500). O experimento foi repetido duas vezes.

Em um segundo experimento, avaliou-se o desenvolvimento do fungo *P. expansum* nos tempos 0, 8, 10 e 12 horas após incubação em suco de maçã a 4%. O experimento seguiu os procedimentos descritos acima, sendo repetido por duas vezes.

**Efeito do AS sobre a membrana plasmática de *P. expansum*.** O efeito do AS sobre a membrana plasmática do fitopatógeno foi realizado conforme proposto por Liu *et al.* (2007), com modificações. Suspensões de esporos de *P. expansum* ( $2 \times 10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup>) foram preparadas em suco de maçã 8% e, a essas, adicionadas solução de AS a 2,5 mM (c.f) ou água destilada estéril (controle), sendo mantidas sob constante agitação à temperatura ambiente. Amostras de 500 µL foram coletadas nos tempos 0, 5, 15, 30, 60 ou 120 minutos, centrifugadas (8000 g., 5 min, a 4°C), lavadas duplamente com solução tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7) e água destilada estéril, novamente centrifugadas (8000 g., 5 min, a 4°C) e ressuspensas em água destilada estéril à concentração final de  $1 \times 10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup>. As suspensões de esporos foram coradas com iodeto de propídeo ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (Sigma, EUA) por 5 minutos a 30°C, centrifugadas (8000 g., 5 min, a 4°C) e duplamente lavadas com solução tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7), seguido de nova centrifugação (8000 g., 5 min, a 4°C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado recolhido e re-suspensão em água destilada estéril à concentração final de  $1 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>. Aliquotas de 30 µL das suspensões de esporos foram colocadas em lâminas lisas e visualizadas em microscópio de fluorescência, nos comprimentos de onda de 546 nm (excitação) e 590 nm (emissão) e as imagens feitas com auxílio de câmera digital Nikon, sendo o experimento repetido duas vezes para confirmação dos resultados. Foram avaliados 100 esporos sob luz visível e sob fluorescência, em diferentes campos para cada um dos tempos, e calculada a integridade de membrana plasmática, por meio da equação:

$$\text{Integridade Membrana} = [(\text{Número total de esporos} - \text{número de esporos corados}) / \text{número total de esporos}] \times 100.$$

O dano do AS sobre a membrana plasmática do fitopatógeno foi determinado quantitativamente pela metodologia de Cerioni *et al.* (2010) e Rice-Evans *et al.* (1991), com modificações. A um volume de 100 mL de suspensão de esporos de *P. expansum* ( $2 \times 10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup>) foram adicionados 100 mL de água destilada estéril ou AS 2,5 mM (c.f).

Essas foram incubadas sob agitação constante em temperatura ambiente, retirando-se alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  aos 0, 5, 15, 30, 60 ou 120 minutos após a incubação, seguidas de centrifugação (2000 g., 5 min) e dupla lavagem com solução tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7), sendo centrifugadas novamente (2000 g., 5 min). Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados re-suspensos em 1 mL de água destilada estéril à concentração final de  $5 \times 10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup>. Os esporos obtidos foram rompidos em banho de ultra-som (10 minutos), obtendo-se os extratos finais de esporos. A 1 mL destes extratos foram adicionados 1 mL de ácido tri-cloro acético (ATC) a 20% (m/V) para precipitação a 4°C, seguidos de centrifugação (19800 g, 5 min). Aos sobrenadantes resultantes, foram adicionados 2 mL de solução saturada contendo ácido tiobarbitúrico (ATB) em HCl (0.1 mol.L<sup>-1</sup>) e hidroxitolueno butilato (HTB) (10 mmol.L<sup>-1</sup>), seguindo da incubação em banho maria a 100°C por 60 minutos. Os extratos recolhidos foram resfriados em banho de gelo por 10 minutos, e os valores de absorbância lidos a 535 nm em multileitora microplacas (Spectramax Paradigm Molecular Devices), sendo utilizado como branco a mistura sem o extrato final de esporos. As concentrações finais de espécies reativas de ATB foram determinadas a partir do coeficiente de extinção molar de 156 mmol.cm<sup>-1</sup>, e expressas em pmol.mg proteína<sup>-1</sup>. O experimento foi repetido duas vezes para confirmação dos resultados.

**Determinação do extravasamento protéico de *P. expansum*.** O extravasamento de proteínas intracelulares de *P. expansum* foi determinado conforme Liu *et al.* (2010), com modificações. Para isso, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de esporos ( $1 \times 10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup>) foram transferidos para frascos cônicos (250 mL) contendo 100 mL de meio líquido batata-dextrose, obtendo-se uma concentração final de  $5 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>. Os frascos foram incubados a 200 rpm, a 25°C, sob escuro. Após três dias de incubação, foram coletados 3 g (massa úmida) de micélio de *P. expansum* por filtração em papel filtro com poros de 0,2  $\mu\text{m}$ , os quais foram lavados duplamente com água destilada estéril e transferidos para frascos cônicos (50 mL) contendo 30 mL de água destilada estéril ou AS 2,5 mM (c.f). Após 0, 5, 15, 30, 60 ou 120 minutos de incubação a 200 rpm, sob temperatura ambiente, alíquotas de 4 mL da suspensão micelial foram novamente retiradas e filtradas em papel filtro (0,2  $\mu\text{m}$ ). O conteúdo de proteínas solúveis totais foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (Sigma-aldrich, EUA) como padrão e os filtrados recolhidos para a

determinação do extravasamento protéico intracelular total. As leituras de absorvância (595 nm) foram feitas em multileitora de microplacas e os resultados expressos em  $\mu\text{g}$  de proteína solúvel por  $\text{g}^{-1}$  de micélio úmido, sendo o experimento repetido três vezes.

**Análise ultra-estrutural de esporos *P. expansum*.** A análise ultra-estrutural dos esporos de *P. expansum* foi realizada com base na metodologia de Schmidt *et al.* (2009), com modificações. Para tanto, suspensões de esporos de *P. expansum* ( $2 \times 10^8$  esporos. $\text{mL}^{-1}$ ) foram preparadas em água destilada estéril (controle) ou AS 2.5 mM (concentração final) e mantidas nos tratamentos por 60 minutos, sob constante agitação e a temperatura ambiente. Em seguida, alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  foram retiradas e centrifugadas a 8000 g, por 5 minutos, a 4°C e lavadas com solução tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7), novamente centrifugadas e re-suspensas em água destilada estéril. Para a observação em microscopia eletrônica de transmissão (MET), amostras provenientes dos diferentes tratamentos foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5%, sacarose 2% e tamponadas com cacodilato 0.1 M (pH 7.2), pós-fixadas com tetróxido de ósmio por 4 horas e desidratadas em séries de soluções aquosas de concentrações crescentes de acetona. Após a desidratação, o material foi filtrado com resina Spurr. As secções ultrafinas foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol (JEM 1011. JEOL Ltda., Tokyo, Japão, a 80 kV), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

### 2.2.6. Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos sob delineamento completamente casualizado, com 4 repetições por tratamento. Com auxílio do software Statistica 10.0, os dados foram submetidos ao teste de Levene ou Cochran para verificar a homogeneidade das variâncias (*factorial* e *one-way*) dos tratamentos. Em caso positivo, realizou-se a análise de variância e o respectivo F-teste (5%). Quando o F-teste foi significativo, fez-se o teste de separação de médias de Tukey ao nível 5% de significância.

Para verificação do efeito de concentrações (doses, pH, etc.), aplicou-se a análise de regressão linear pelo software Sisvar 5.0, observando o modelo que melhor se ajustava aos resultados, com base nos valores do teste-t ao nível de significância de 5%.

Os gráficos foram construídos com o software Prism 5 for Mac OS X.

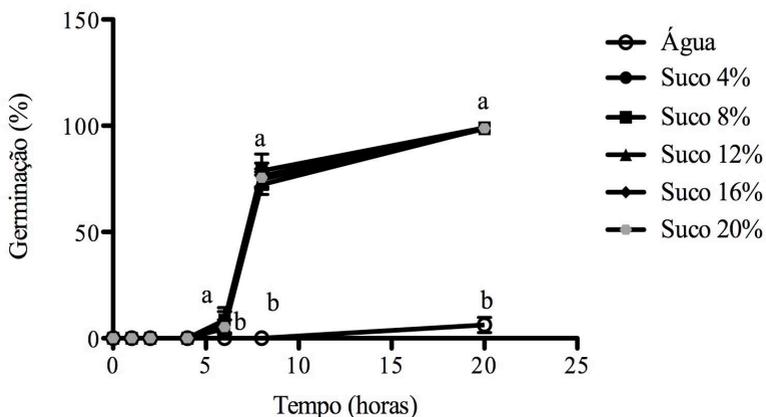
## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O bolor azul é uma das doenças mais importantes que acometem os frutos de maçã em pós-colheita. O fitopatógeno responsável por esta doença, o fungo *P. expansum*, é capaz de comprometer a produtividade e a qualidade do produto. Estudos relacionados à doença apontam que, por ser extremamente agressivo, mesmo as baixas temperaturas utilizadas como principal ferramenta de combate ao fitopatógeno não são suficientes para um bom nível de controle ao longo do tempo de armazenamento, pois um único fruto infectado pode ser fonte de inóculo para a infecção de 12 a 15 novos frutos sadios em um mesmo ambiente (MONDINO *et al.*, 2009; WELKE *et al.*, 2009).

Por terem amparo legal na legislação brasileira e mundial, o uso de fungicidas à base dos ingredientes ativos dos grupos imidazóis e dicarboximidas são permitidos e frequentemente utilizados no pós-colheita em todo o globo, ocorrendo o mesmo com o cloro ativo. Por outro lado, a crescente conscientização popular acerca dos malefícios causados por essas substâncias incentivam novas pesquisas em busca de métodos alternativos de controle para a doença, visando a diminuição do uso de produtos que agridem o ambiente e a saúde humana (MAXIN *et al.*, 2012).

No presente estudo, determinou-se primeiramente as condições ideais para que os esporos de *P. expansum* se desenvolvessem, de forma a se atingir níveis satisfatórios de germinação em condições artificiais. Utilizando-se a água destilada estéril para o preparo da suspensão de esporos, o fitopatógeno teve uma germinação muito baixa (10%), mesmo após 20 horas de incubação. Diferentemente, em suco de maçã filtrado a 4%, cerca de 80% dos esporos germinaram após 8 horas de incubação, alcançando 100% de germinação após 20 horas de incubação. Não houve, no entanto, diferenças significativas entre as doses de suco utilizadas nos diferentes tempos (FIGURA 2).

Figura 2. Porcentagem de germinação de esporos de *P. expansum* em água destilada e em diferentes concentrações de suco de maçã. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância nos diferentes tempos. \*Experimento representativo de uma série de dois realizados nos mesmos moldes.



Verificou-se assim que *P. expansum* é incapaz de alcançar níveis adequados de germinação em água destilada estéril, necessitando de condições ambientais e nutricionais minimamente favoráveis para sua germinação e desenvolvimento.

Tal observação foi constatada por Filonow (2005), o qual relatou que apenas os frutos de maçã, cultivares Golden Delicious, Granny Smith e Red Delicious, que sofreram injúrias mecânicas e que, dessa forma, permitiram o acesso às condições mínimas nutritivas necessárias para o desenvolvimento do fungo, foram infectados pelos fitopatógenos *P. expansum* e *Botrytis cinerea*. Nessa mesma linha, Amiri *et al.* (2005) relataram que, apesar do desconhecimento acerca dos mecanismos de adesão e germinação do *P. expansum*, a disponibilidade de nutrientes nos ferimentos e nas lenticelas dos frutos de maçã contribuem positivamente tanto para a adesão quanto para o desenvolvimento do fitopatógeno, corroborando com os resultados do presente estudo. Portanto, uma vez presentes no ambiente e quando em contato com os

frutos, os esporos de *P. expansum* poderiam ocasionar grandes prejuízos à produção de maçãs.

Buscando-se alternativas aos métodos tradicionais utilizados para o controle do bolor azul em frutos de maçã, avaliou-se o potencial antifúngico de alguns ácidos fenólicos, substâncias notadamente conhecidas por serem produzidas pelas plantas em resposta a um estresse biótico ou abiótico e que muito têm sido difundidas para a manutenção da qualidade dos frutos em pós-colheita (TAREEN *et al.*, 2012).

Dentre os ácidos fenólicos estudados nesse trabalho, os ácidos siríngico e clorogênico, a 2,5 mM, inibiram em aproximadamente 80% a germinação dos esporos de *P. expansum* e em cerca de 70% o desenvolvimento do tubo germinativo do fitopatógeno, quando comparados ao controle (FIGURA 3A e 3B).

O ácido salicílico, por sua vez, apresentou a maior atividade antimicrobiana, inibindo 100% da germinação do fungo quando aplicado a 2,5 mM (FIGURA 3A e 3B), sendo testado posteriormente em diferentes concentrações.

À medida que a concentração do AS decresceu, observou-se uma redução de sua eficiência, partindo de 100% de inibição da germinação a 2,5 mM para 80% de inibição da germinação a 1 mM (FIGURA 4A e 4B), correlacionando o poder antifúngico do AS com a dose utilizada.

Figura 3. Porcentagem de germinação (A) e comprimento do tubo germinativo (B) de esporos do fungo *P. expansum* submetidos a diferentes ácidos fenólicos à concentração de 2,5 mM. O controle se refere aos esporos germinados em suco de maçã a 4%, sem adição de fenólicos. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de 5% de significância. \*Experimento representativo de uma série de dois realizados nos mesmos moldes.

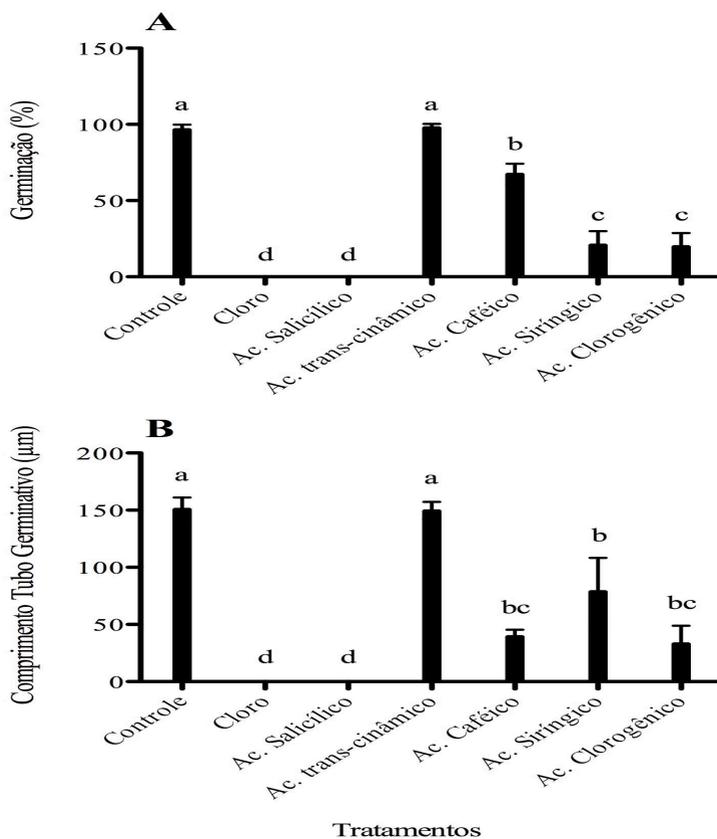
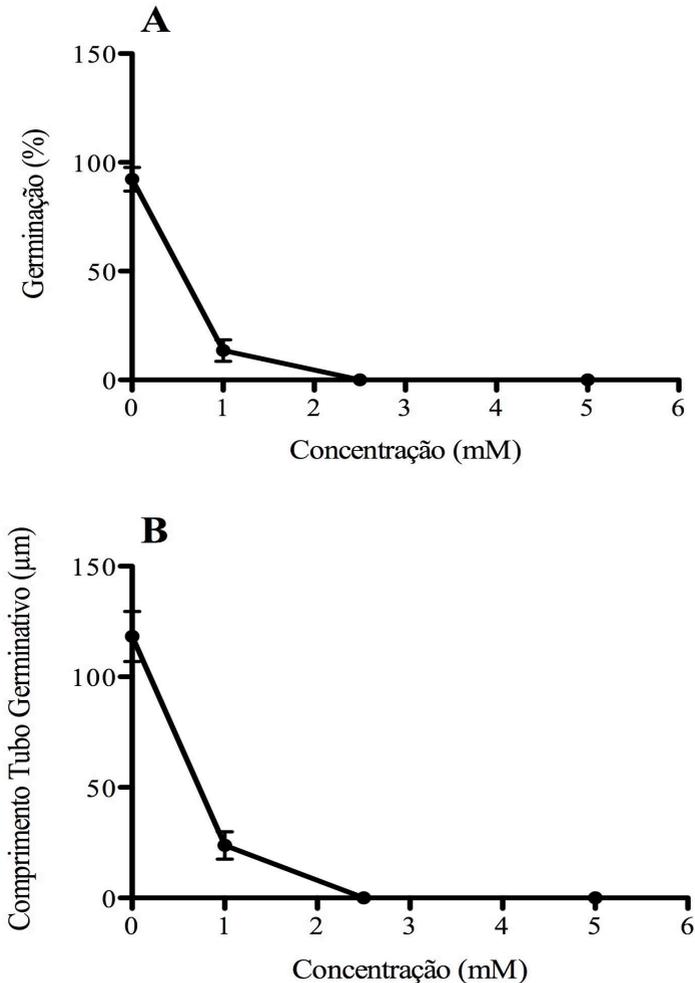


Figura 4. Porcentagem de germinação (A) e comprimento do tubo germinativo (B) de esporos do fungo *P. expansum* submetidos a diferentes concentrações de AS (0; 1; 2,5; 5 mM). Observou-se um efeito significativo de doses de acordo com o teste F ( $p < 0,05$ ). \*Experimento representativo de uma série de três realizados nos mesmos moldes.



Resultados similares foram encontrados contra os fitopatógenos *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*,

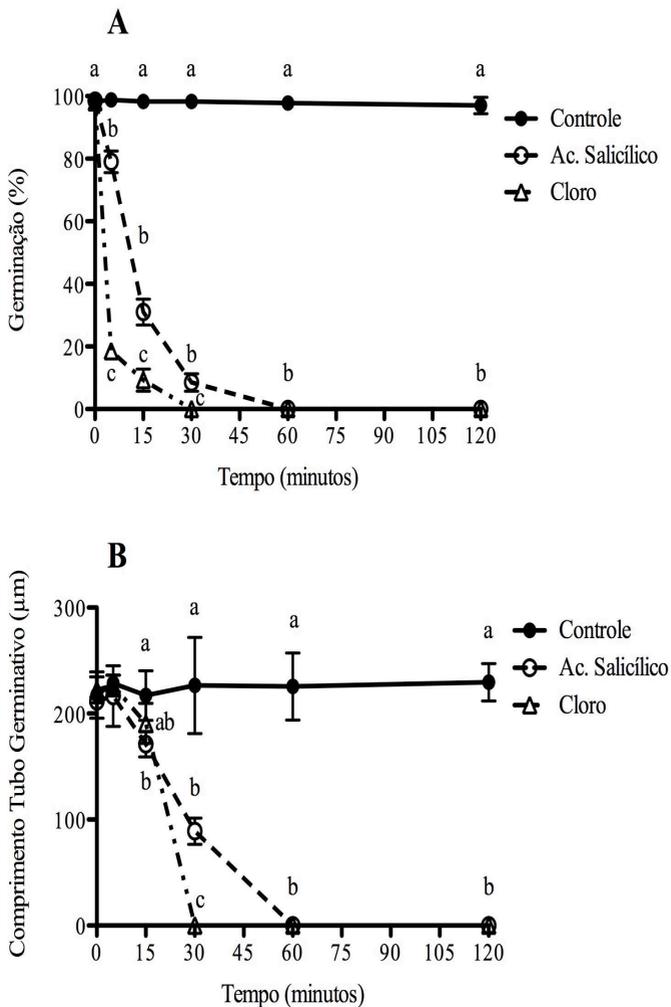
*Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolinae*, *Pythium sp.* e *Phytophthora sp.*, os quais tiveram a germinação e o desenvolvimento inibidos em cerca de 70% quando tratados com AS na concentração de 2,5 mM ou 5 mM (PANAHIRAD *et al.*, 2012; EL-MOHAMEDY *et al.*, 2013).

O AS também é responsável por importantes papéis regulatórios em plantas, modulando e elicitando respostas específicas de defesa após estresses bióticos e abióticos ou mesmo trazendo efeitos benéficos quando aplicado exogenamente, aumentando, por exemplo, a eficiência do controle biológico por leveduras como *Cryptococcus laurentii* em peras (YU *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2009) e maçãs (YU & ZHENG, 2006).

Com isto, propõe-se que o AS além de possuir um forte efeito antimicrobiano contra uma vasta gama de fitopatógenos, parece ser também importante para a manutenção da microbiota da superfície dos frutos de maçã e para eliciação das respostas de defesa, se tornando uma alternativa aos métodos tradicionais de controle.

Além disso, quando os esporos de *P. expansum* foram submetidos aos tratamentos com hipoclorito (i.a 0,5% cloro ativo) e AS (2,5 mM), os mesmos apresentaram padrões semelhantes quanto à velocidade da germinação e desenvolvimento. O hipoclorito foi capaz de inibir 100% da germinação do fitopatógeno após 30 minutos de contato, ao passo que o AS inibiu neste mesmo período cerca de 90% da germinação (FIGURA 5A). Por sua vez, em relação ao desenvolvimento do tubo germinativo, o hipoclorito atuou mais rapidamente, inibindo completamente o desenvolvimento do tubo germinativo aos 30 minutos, ao passo que o AS somente foi capaz de inibir o desenvolvimento em 100% aos 60 minutos (FIGURA 5B).

Figura 5. Velocidade de atuação do AS a 2,5 mM na porcentagem de germinação (A) e no desenvolvimento do tubo germinativo (B) dos esporos de *P. expansum*. O controle refere-se aos esporos germinados em suco de maçã a 4%. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância nos diferentes tempos. \*Experimento representativo de uma série de três realizados nos mesmos moldes.



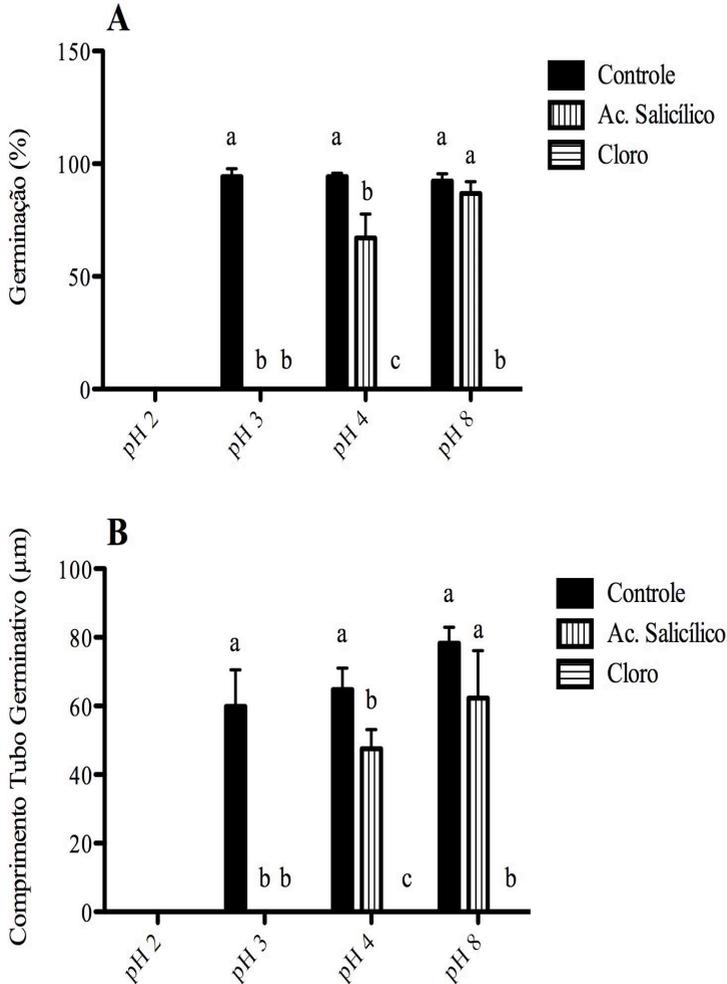
Por outro lado, mesmo apresentando um alto efeito antifúngico contra *P. expansum*, verificou-se que a atuação do AS está condicionada quimicamente à sua estrutura molecular e, conseqüentemente ao seu pH padrão, de 2,8 (FIGURA 6A e 6B). Nas suspensões de esporos que tiveram o pH ajustado para 2, o fungo teve a germinação completamente inibida, independente do tratamento. Em suco de maçã 4%, nos pH de 3, 4 e 8, por outro lado, o fungo teve uma germinação de 100%, desenvolvendo o tubo germinativo normalmente. Em solução de AS, no pH 3, ou sob hipoclorito nos diferentes pH, novamente o fungo não germinou, ao passo que em AS nos pH 4 e 8, o fitopatógeno teve uma germinação de cerca de 70% e considerável desenvolvimento do tubo germinativo (FIGURA 6A e 6B).

Avaliando-se o efeito do pH em intervalos menores, foi observado que, quando aplicado em solução com pH de até 3, o AS inibiu completamente a germinação do fitopatógeno, confirmando os resultados anteriores.

À medida que o seu pH foi sendo alcalinizado, de 3,5 à 6, houve um declínio no potencial antifúngico do AS, de forma que em pH 5,5 não houve diferenças significativas na germinação dos esporos suspensos em AS comparado ao controle com suco de maçã (FIGURA 7A e 7B). Isto pode estar relacionado ao fato de que, uma vez alcalinizado o pH da solução de AS, o composto pode estar perdendo suas características fenólicas, a partir da associação dos grupamentos hidroxilas aos prótons do anel aromático, levando a uma diminuição do seu potencial antifúngico, de penetração e corrosão, além do potencial antioxidante.

Outros compostos químicos também apresentaram alteração na atividade biológica em função do pH do meio. Trabalhando com o patossistema *P. digitatum* e citros, Smilanick *et al.* (2005) mostraram que o potencial antimicrobiano do fungicida imazalil é dependente do pH da solução, de forma que em soluções alcalinas (pH 9), à concentração  $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , o fungicida inibe 100% da germinação dos esporos, ao passo que em pH ácido (pH 4), na mesma concentração, o fungicida foi capaz de inibir apenas 10% da germinação dos esporos de *P. digitatum*. Nesse mesmo sentido, Palmer *et al.* (1997) já haviam demonstrado que a utilização de bicarbonato de sódio para o controle de *B. cinerea* é dependente do pH da solução. Assim, quando o bicarbonato de sódio é acidificado, ele se torna ineficiente, e o fitopatógeno germina 100%.

Figura 6. Porcentagem de germinação (A) e comprimento do tubo germinativo (B) de esporos do fungo *P. expansum* submetidos aos tratamentos AS (2,5 mM) ou cloro (0,05%) em diferentes pH. O controle refere-se aos esporos germinados em suco de maçã a 4%. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância. \*Experimento representativo de uma série de três realizados nos mesmos moldes.



Para os esporos suspensos em suco de maçã, apenas situações extremas (pH 2) foram capazes de inibir completamente a germinação e desenvolvimento do fitopatógeno (FIGURA 7A e 7B). Segundo relataram Smilanick *et al.* (2005), nessas situações (pH 2), os esporos de *P. expansum* são inativados mas não destruídos, sendo pouco afetados em soluções de pH acidificado (pH 4).

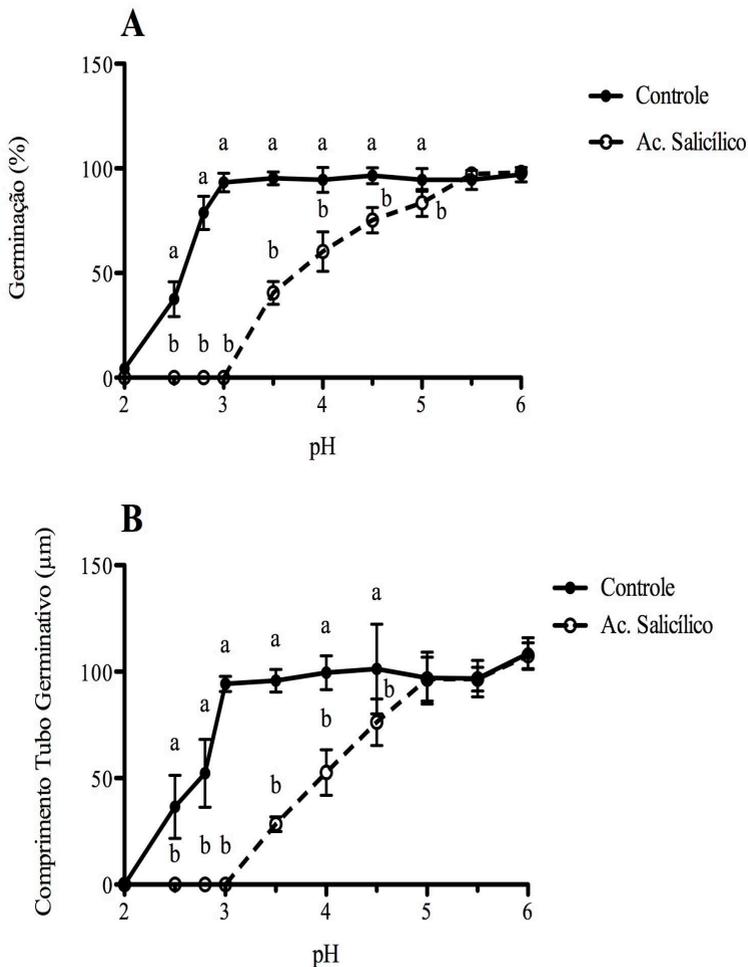
Isso foi comprovado pelo trabalho de Li *et al.* (2010), onde ao tratarem os esporos de *P. expansum* com soluções muito ácidas (pH 2), neutras (pH 5) e alcalinas (pH 8), encontraram uma inibição da germinação dos esporos de 80% nas soluções muito ácidas, demonstrando por ensaios bioquímicos e por análises de proteômica que o pH do ambiente afeta internamente o pH dos esporos do fungo e os níveis de ATP inibindo, conseqüentemente, a germinação dos esporos de *P. expansum*.

Tomados conjuntamente, esses dados sugerem que o estresse causado pela acidificação extrema do ambiente muda o pH interno dos esporos, afetando o metabolismo e o consumo energético e, por outro, afetando a regulação da expressão de proteínas e dos genes como sinalizadores, corroborando com os dados encontrados no presente estudo, onde a utilização de meios extremos, com pH 2, inibiu completamente a germinação dos esporos de *P. expansum*, sejam tratados com água destilada estéril ou com AS 2,5 mM.

No entanto, quando o pH se torna levemente acidificado, na faixa de 2,5 a 2,8, os esporos de *P. expansum* reconhecem o ambiente propício, voltando a germinar completamente quando o pH chegou ao valor 3 em presença de suco de maçã a 4%, mas não sob a ação do AS (FIGURA 7A e 7B).

Isso pode estar relacionado ao fato de que *P. expansum* é um fitopatógeno ácido, isso é, que acidifica o tecido do hospedeiro pela secreção de ácidos orgânicos, tais como o ácido D-glucônico (pH 3,5) e ácido cítrico, para com isso infectar e colonizar os tecidos (BARAD *et al.*, 2014). Nesse sentido, isolados de *P. expansum* capazes de expressar maiores atividades da enzima glucose oxidase e, dessa forma, secretar mais ácidos orgânicos aos tecidos, têm um maior progresso na colonização, ao passo que, com a diminuição do acúmulo do ácido glucônico, há uma diminuição na colonização dos tecidos (HADAS *et al.*, 2007).

Figura 7. Porcentagem de germinação (A) e comprimento do tubo germinativo (B) de esporos do fungo *P. expansum* submetidos ao tratamento com AS a 2,5 mM em diferentes pH. pH 2,8 – pH padrão do AS. O controle refere-se aos esporos germinados em suco de maçã a 4%. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância nos diferentes pH. \*Experimento representativo de uma série de três realizados nos mesmos moldes.



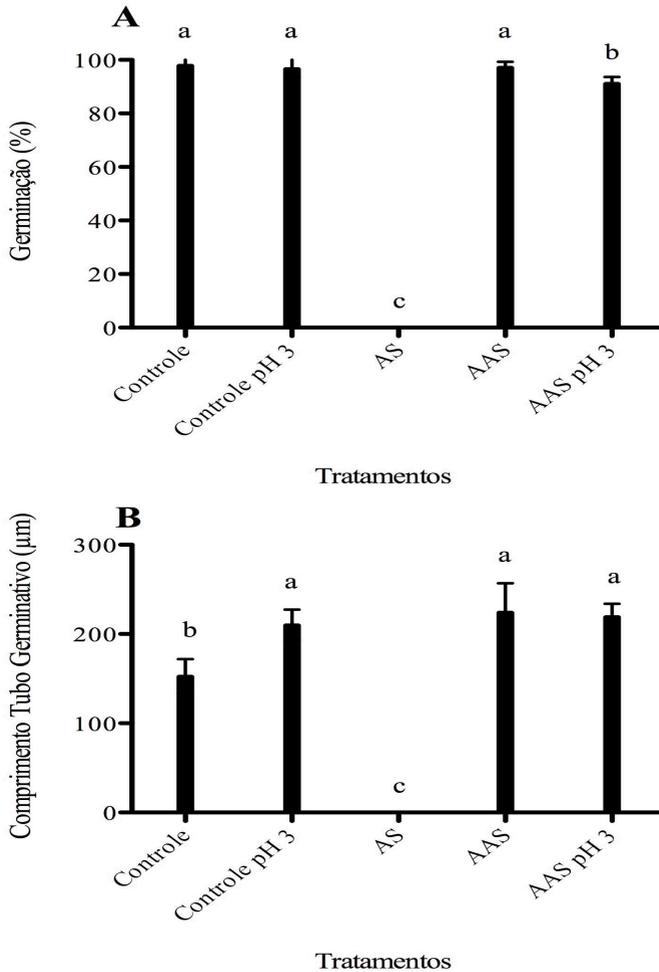
De forma semelhante, quando o ácido salicílico (AS) é conjugado ao acetato, formando uma molécula de ácido acetil salicílico (AAS), ele

não foi capaz de inibir significativamente a germinação dos esporos de *P. expansum*, igualando-se ao tratamento controle, onde 100% dos esporos germinaram. Mesmo em pH 3, o AAS inibiu somente 10% da germinação do fitopatógeno, ao passo que o AS em pH padrão (2,8) inibiu a germinação dos esporos em 100% (FIGURA 8A e 8B).

A diminuição do efeito antifúngico do AS pode estar relacionada à incorporação de um grupamento acetil na molécula do ácido salicílico, transformando-o quimicamente em ácido acetilsalicílico (aspirina), tornando-o em uma molécula sem atividade antimicrobiana, como observado em nosso estudo.

Mesmo sem apresentar efeito antifúngico sobre *P. expansum*, o AAS foi capaz de impedir a formação de biofilmes de *Candida albicans* e *C. parapsilosis in vitro* (ZHOU *et al.*, 2012). Além disso, sua aplicação exógena foi capaz de atrasar o amadurecimento de cerejas e de manter as qualidades físico-químicas e de compostos bioativos nos frutos, quando comparados ao tratamento controle feito com água, em um estudo realizado por Valero *et al.* (2011).

Figura 8. Porcentagem de germinação (A) e comprimento do tubo germinativo (B) de esporos de *P. expansum* submetidos ao AS ou AAS a 2,5 mM em diferentes pHs. pH 2,8 – pH padrão do ácido salicílico. pH 4 – pH padrão do AAS. O controle refere-se aos esporos germinados em suco de maçã a 4%. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância. \*Experimento representativo de uma série de dois realizados nos mesmos moldes.



Em conjunto, tais resultados associados aos de outros estudos relacionados, demonstram a importância das pesquisas envolvendo

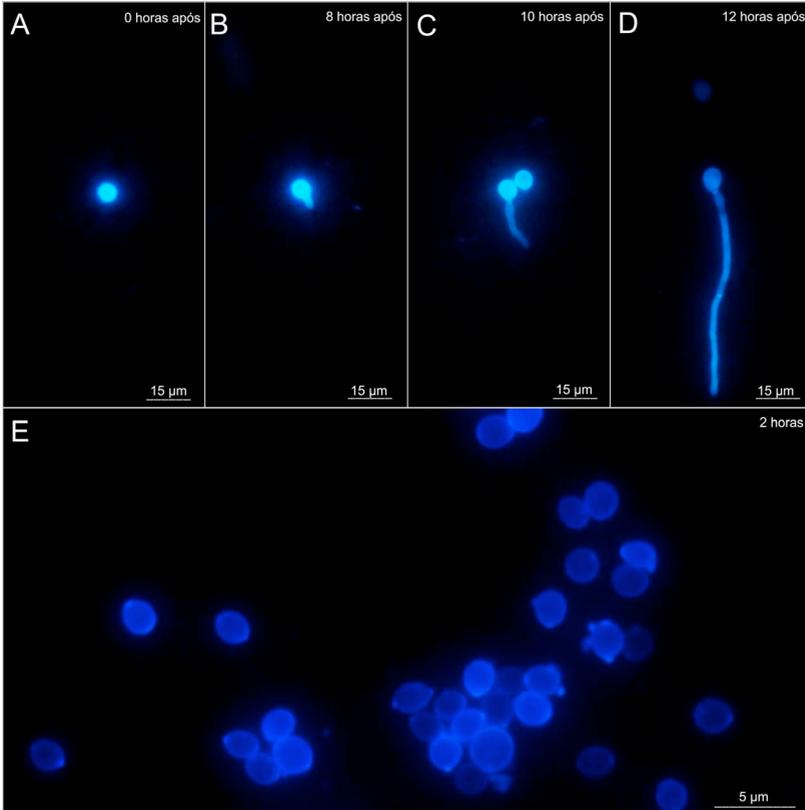
ácidos fenólicos para a substituição de métodos convencionais de controle, tais como o emprego do hipoclorito, muito eficiente na erradicação de esporos de *P. expansum* em tanques de lavagem, mas que pode causar sérios danos à saúde humana e ao ambiente, através da formação de complexos tóxicos com compostos orgânicos, formando trihalometanos, compostos sabidamente cancerígenos (MEYER, 1994).

Por sua vez, o AS apresenta-se dentre os ácidos fenólicos como uma alternativa viável à substituição dos produtos convencionais, apresentando efeitos antimicrobianos mesmo em baixas concentrações, de forma rápida e eficiente, além de ser capaz de catalisar os efeitos dos microorganismos utilizados para o controle biológico em pós-colheita, de elicitar as respostas de defesa frente aos estresses sofridos e de manter as características naturais dos frutos (YU & ZHENG, 2006; ASGHARI *et al.*, 2010; KAZEMI *et al.*, 2011). Além disso, mesmo com modificações em sua estrutura química, o AS mantém características desejáveis, sendo capaz de manter as qualidades físico-químicas dos frutos e de apresentar potencial antimicrobiano contra outros fitopatógenos.

Para se estudar os mecanismos de ação bioquímicos do AS e tentar entender como ele age sobre o fungo, primeiramente, esporos de *P. expansum* foram germinados em suco de maçã a 4% ou em solução de AS (2,5 mM c.f) e corados com o reagente Calcofluor White Stain para o acompanhamento do seu desenvolvimento por meio da visualização morfológica da parede celular.

Notou-se que mesmo após duas horas de aplicação do AS sobre os esporos do fungo, não foram observadas diferenças morfológicas na estrutura da parede celular do fitopatógeno em comparação ao tratamento controle, observando-se uma homogênea coloração da parede celular (FIGURA 9).

Figura 9. Morfologia da parede celular dos esporos de *P. expansum* suspensos em suco de maçã a 4% por 0 h (A), 8 h (B), 10 h (C) e 12 h (D) em microscopia de fluorescência, após coloração com Calcofluor White Stain; morfologia da parede celular dos esporos de *P. expansum* tratados com AS (2,5 mM) por 2 h (E) em microscopia de fluorescência após coloração com Calcofluor White Stain. \*Campos representativos de uma série de dois experimentos realizados nos mesmos moldes.



De forma semelhante, mesmo após a incubação dos esporos em solução contendo AS a 2,5 mM, sob diferentes tempos, ou em suco de maçã a 4%, novamente não foram observadas modificações morfológicas na parede celular dos esporos de *P. expansum*, germinados ou não, sob microscopia de luz (FIGURA 10) ou fluorescência (FIGURA 11).

Figura 10. Efeito do AS (2,5 mM) sobre a morfologia (parede celular) dos esporos de *P. expansum* visualizados em microscopia de luz visível. Esporos de *P. expansum* germinados ou não tratados por 0 min (A), 5 min (B), 15 min (C), 30 min (D), 60 min (E) ou 120 min (F). \*Campos representativos das diferentes repetições. \*\*Campos representativos de uma série de dois experimentos realizados nos mesmos moldes.

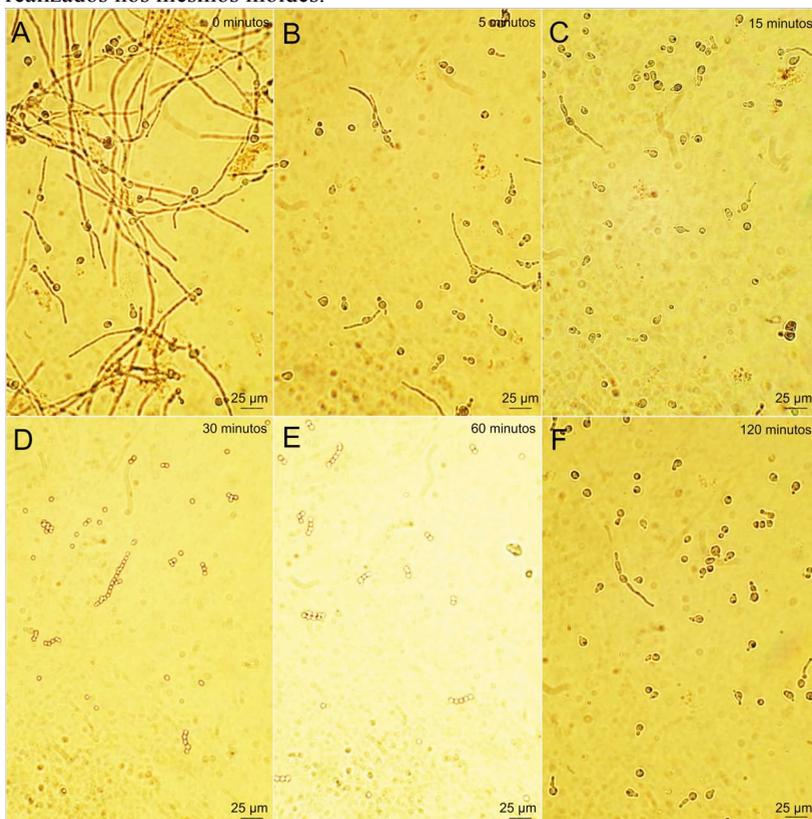
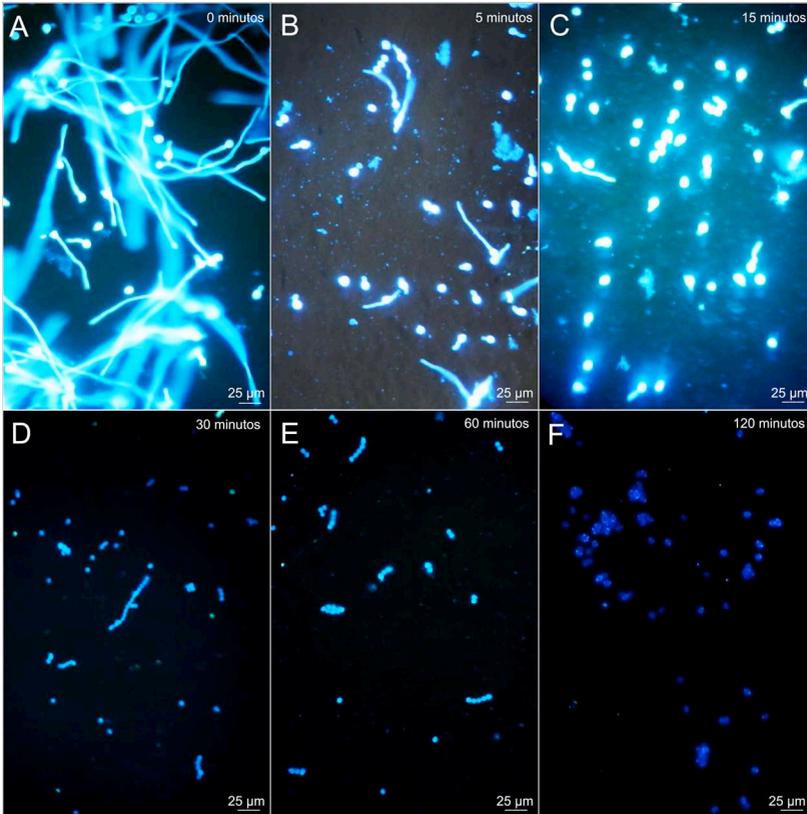


Figura 11. Efeito do AS (2,5 mM) sobre a morfologia (parede celular) dos esporos de *P. expansum* visualizados em microscopia de fluorescência, correspondente à figura 10. Esporos de *P. expansum* germinados ou não tratados por 0 min (A), 5 min (B), 15 min (C), 30 min (D), 60 min (E) ou 120 min (F). \*Campos representativos das diferentes repetições. \*\*Campos representativos de uma série de dois experimentos realizados nos mesmos moldes.



Esporos de *P. digitatum* tratados com doses letais ( $100 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) de peróxido de hidrogênio (SOT) tiveram a germinação completamente inibida, porém não apresentaram danos na parede celular quando avaliados por microscopia de fluorescência e eletrônica de transmissão (CERIONI *et al.*, 2010), de forma similar à ação do AS. Dessa forma, observa-se que, possivelmente, tanto tratamentos anti-oxidantes como oxidantes não são capazes de danificar a parede celular dos esporos de fitopatógenos, devido às suas características morfológicas.

A integridade da membrana plasmática dos esporos de *P. expansum* foi analisada quali e quantitativamente a partir das diferenças entre o tratamento com AS a 2,5 mM e o controle. Qualitativamente, nos esporos de *P. expansum* tratados com AS 2,5 mM, ocorreu uma gradual penetração do corante celular iodeto de propídeo em função do tempo de contato entre a suspensão de esporos e o AS. Isso está relacionado à permeabilidade seletiva celular, uma vez que o iodeto de propídeo é comumente utilizado na identificação de células mortas, intercalando-se entre as bases no DNA ou RNA, não penetrando em células vivas devido à permeabilidade seletiva das membranas (WANG *et al.*, 2014).

Quando os esporos de *P. expansum* apresentaram danos na membrana plasmática, o iodeto de propídeo foi capaz de penetrar na célula e emitir uma coloração avermelhada sob microscopia de fluorescência (FIGURA 13). A partir dos esporos de *P. expansum* observados nos campos das figuras 12 e 13, foi quantificado a porcentagem de esporos que apresentavam danos na membrana plasmática após a exposição aos tratamentos (FIGURA 14).

Após 30 minutos de contato com a solução de AS a 2,5 mM, 100% dos esporos apresentaram danos na membrana plasmática, ao passo que no controle, praticamente a totalidade dos esporos manteve a membrana íntegra ao longo do experimento (FIGURA 14).

Figura 12. Efeito do AS (2,5 mM) sobre a morfologia (membrana plasmática) dos esporos de *P. expansum* visualizados em microscopia de luz visível. Esporos de *P. expansum* germinados ou não, tratados por 0 min (A), 5 min (B), 15 min (C), 30 min (D), 60 min (E) ou 120 min (F). \*Campos representativos das diferentes repetições. \*\*Campos representativos de uma série de dois experimentos realizados nos mesmos moldes.

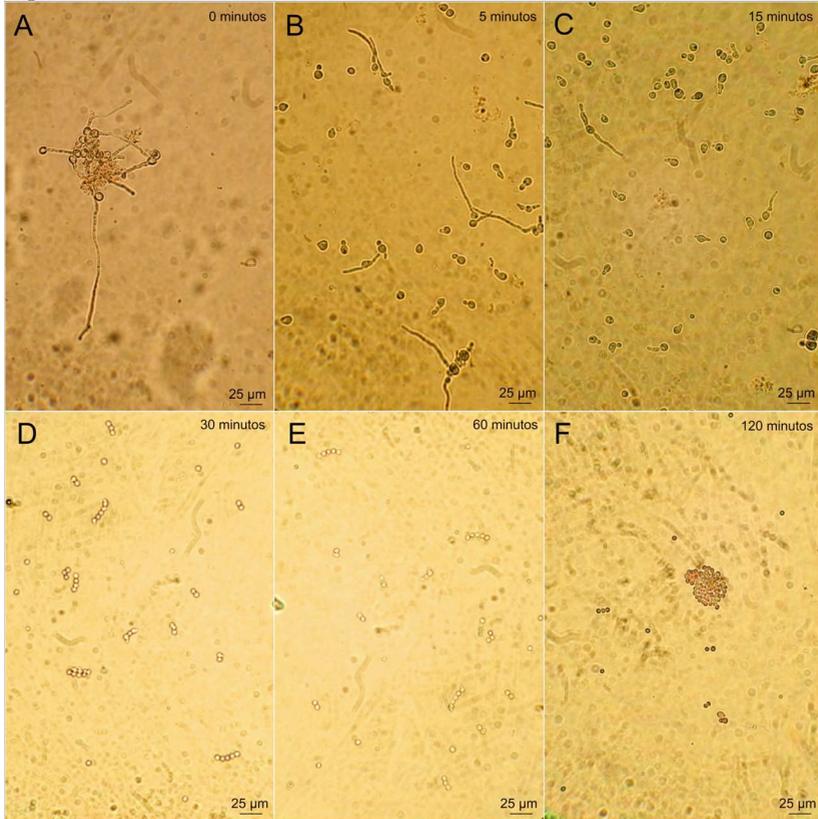


Figura 13. Efeito do AS (2,5 mM) sobre a integridade da membrana plasmática dos esporos de *P. expansum* observados em microscopia de fluorescência. Os esporos foram tratados por 0 min (A), 5 min (B), 15 min (C), 30 min (D), 60 min (E) ou 120 min (F) com AS e corados com iodeto de propídeo. Esporos em vermelho perderam a integridade da membrana. \*Campos representativos das diferentes repetições. \*\*Campos representativos de uma série de dois experimentos realizados nos mesmos moldes.

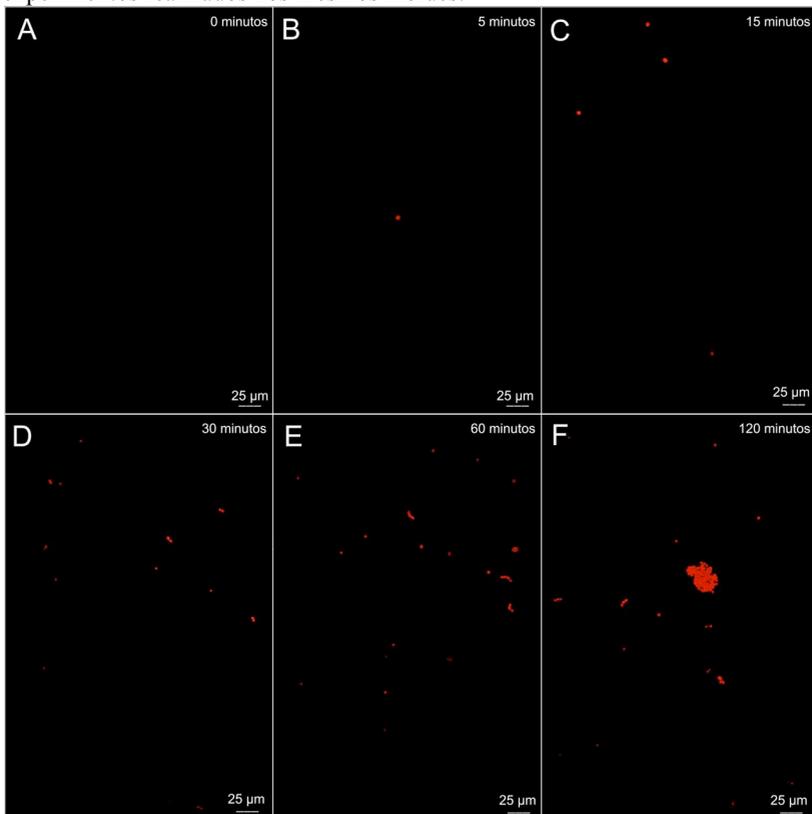
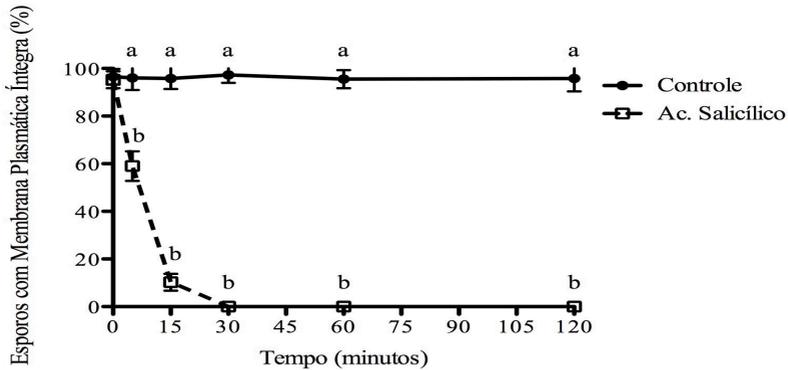
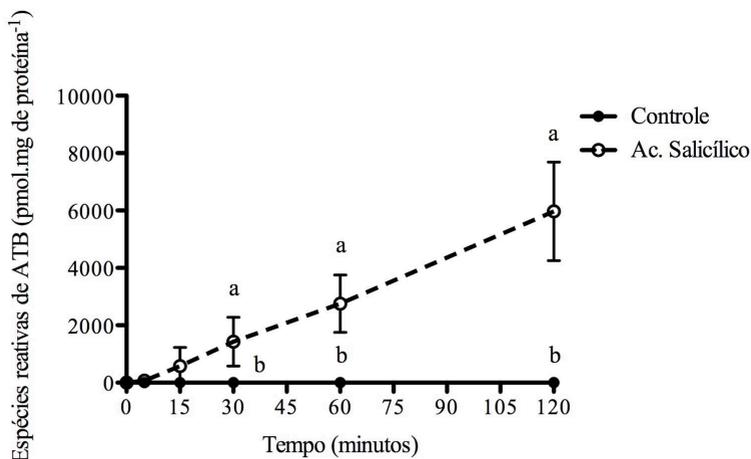


Figura 14. Efeito do AS a 2,5 mM na integridade da membrana plasmática dos esporos de *P. expansum* após diferentes tempos de contato. O controle se refere aos esporos germinados em suco de maçã a 4%. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância nos diferentes tempos.



Outra maneira utilizada para se verificar o efeito do AS sobre a integridade da membrana plasmática de *P. expansum* foi através da quantificação de espécies reativas de ATB (ácido tiobarbitúrico). Esporos processados do tratamento-controle apresentaram níveis de espécies reativas de ATB nulos, ao passo que, quando tratados com AS por 30 minutos, aproximadamente 2000 pmol de espécies reativas de ATB por mg de proteína foram quantificados, sendo crescentes estes valores com o aumento do tempo de contato dos esporos com a solução de AS, chegando a um máximo de 6000 pmol de espécies reativas de ATB por mg de proteína após 120 minutos de contato (FIGURA 15).

Figura 15. Espécies reativas de ATB ( $\text{pmol.mg de proteína}^{-1}$ ) a partir de esporos de *P. expansum* tratados com AS 2,5 mM por diferentes tempos, indicando estresse oxidativo das membranas celulares. O controle refere-se aos esporos tratados com água destilada estéril. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância nos diferentes tempos. \*Experimento representativo de uma série de dois realizados nos mesmos moldes.



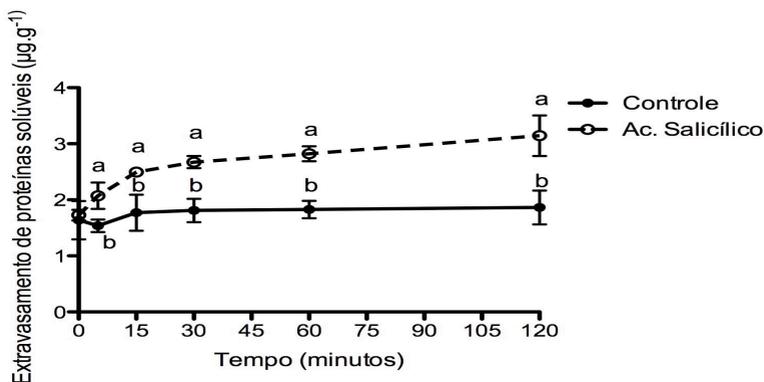
A membrana plasmática nas células desempenha um papel fundamental na manutenção e viabilidade celular, desde os esporos aos micélios formados pelos fungos, onde severos danos na bicamada lipídica podem resultar em um colapso celular, levando ao extravasamento dos compostos intracelulares (CHEN *et al.*, 2014).

O tratamento com AS, um ácido fenólico amplamente encontrado na natureza, demonstrou ser eficiente em comprometer a integridade funcional da membrana plasmática de *P. expansum* a uma baixa concentração, sendo crescente os danos ocorridos na membrana plasmática com um aumento no tempo de contato entre o fitopatógeno e o AS, não sendo observados efeitos destrutivos na parede celular do fungo.

Por sua vez, por possuírem um tamanho muito pequeno e, conseqüentemente, com baixo teor e potencial de extravasamento protéico, os esporos de *P. expansum* foram substituídos por micélios do fungo, e esses, utilizados para a quantificação do extravasamento de proteínas solúveis após o tratamento com AS.

Após a exposição por 15 minutos à solução de AS 2,5 mM, ocorreu um extravasamento de 2,4 µg de proteína solúvel por g de micélio úmido, sendo crescentes esses valores, a um máximo de, aproximadamente, 3,2 µg de proteína solúvel por g de micélio úmido 120 minutos após o contato dos micélios com o AS, ao passo que o extravasamento protéico não passou o valor de 1,8 µg de proteína solúvel por g de micélio úmido em tratamento-controle ao longo das duas horas de incubação (FIGURA 16).

Figura 16. Extravasamento de proteínas de micélios de *P. expansum* tratados com AS (2,5 mM) por diferentes tempos. O controle refere-se aos micélios tratados com água destilada estéril. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância nos diferentes tempos. \*Experimento representativo de uma série de três realizados nos mesmos moldes.



Resultados semelhantes foram encontrados por Liu *et al.* (2010) que, ao utilizarem silício como tratamento e observarem uma completa inibição da germinação dos esporos de *P. digitatum*, cruzaram os resultados encontrados com análises de microscopia de fluorescência, identificando os danos causados na membrana plasmática dos esporos, e com espectrofotometria, quantificando extravasamento de proteínas e açúcares solúveis ao meio.

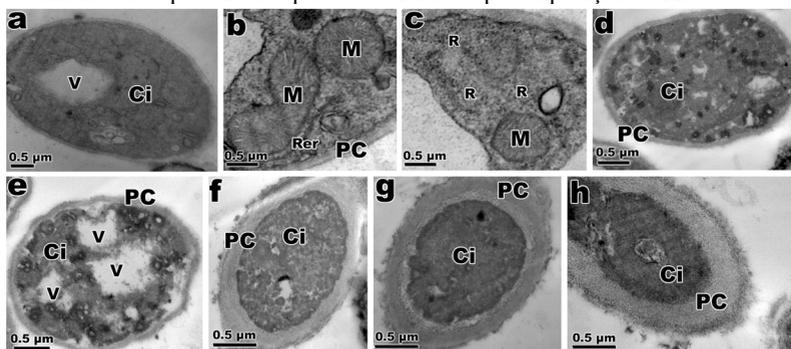
Em outro experimento, Zhang *et al.* (2011) relacionaram a inibição da germinação de esporos de *P. expansum* ao potencial do ácido β-aminobutírico (BABA) em causar danos na membrana plasmática dos esporos, onde ao se aumentar as doses de BABA, aumentou-se a porcentagem de esporos corados com iodeto de propídeo, bem como a

quantidade de açúcares e proteínas solúveis no meio, de modo similar à ação do AS.

A partir da análise em microscópio eletrônico de transmissão, verificou-se que os esporos de *P. expansum* suspensos em água destilada apresentam um interior celular organizado, onde é possível a identificação das organelas presentes no citoplasma celular, como mitocôndrias, retículos endoplasmáticos rugosos, ribossomos, além da presença de um vacúolo central e uma fina parede celular (FIGURA 17).

Em contrapartida, em esporos tratados com AS (2,5 mM) por 1 hora, observou-se uma alteração da morfologia intracelular, com grande formação de vacúolos, invaginações da membrana plasmática, desorganização das estruturas celulares presentes no citoplasma, além de um proeminente espessamento da parede celular dos esporos (FIGURA 17).

Figura 17. Microscopia eletrônica de transmissão dos esporos de *P. expansum* tratados com água (a – c) ou com AS 2,5 mM (d – h). (a) esporo de *P. expansum* organizado com a presença de um vacúolo central (V) e organelas no citoplasma (Ci). (b) detalhe da presença de mitocôndrias (M), de retículo endoplasmático rugoso (Rer) e fina parede celular (PC) em esporos de *P. expansum*. (c) detalhe do citoplasma com inúmeros ribossomos livres em esporo de *P. expansum*. (d) esporo de *P. expansum* com morfologia irregular após tratamento com AS 2.5 mM; (e) detalhe do esporo de *P. expansum* com a formação de grande quantidade de vacúolos; (f–h) detalhes da desorganização das estruturas celulares presentes no citoplasma dos esporos de *P. expansum* e do aumento da espessura das paredes celulares após exposição ao AS.



Estudos com quitosana demonstraram um modelo de ação onde, a partir da interação entre as cargas dos grupamentos amino presentes em sua molécula e a membrana plasmática de esporos de *P. expansum*,

resultou em uma alteração da permeabilidade seletiva da membrana plasmática (WANG *et al.*, 2014).

Tomados em conjunto, os resultados ultra-estruturais e morfológicos apresentados a partir das análises realizadas mostram que, provavelmente, o modo de atuação do AS esta relacionado à corrosão da membrana plasmática dos esporos de *P. expansum*. À luz dos trabalhos de Wang *et al.* (2014), a partir da penetração dos íons salicilato através da parede celular dos esporos de *P. expansum*, e sua interação com a membrana plasmática, formada por lipídios que, próximos à superfície, possuem íons  $H^+$  (devido à diferença de potencial causada pela cadeia transportadora de elétrons), ocorre uma reação semelhante ao processo catódico de corrosão. Essa interação entre os íons  $H^+$  da superfície e os íons do meio corrosivo (AS) rompe a bicamada lipídica ou mesmo danifica as proteínas associadas à membrana plasmática dos esporos, responsáveis pela permeabilidade seletiva.

Ao estudarem o comportamento da membrana plasmática de *Phanerochaete chrysosporium* em situações de estresse causadas por cádmio, Chen *et al.* (2014) observaram que a exposição das células às altas dosagens de cádmio levaram ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio intracelular e que essas, por sua vez, resultaram em danos à membrana plasmática pela diminuição da  $H^+$ -ATPase, pelo favorecimento da ligação entre o cádmio e proteínas de membrana, ou pela diminuição da eficiência de reposição do  $Ca^{2+}$  em sítios essenciais da membrana plasmática.

À luz do exposto, outro mecanismo de ação parece estar relacionado às interações entre a molécula de AS e a membrana plasmática dos esporos de *P. expansum*, permitindo trocas químicas entre a estrutura molecular dos íons salicilato e os ácidos graxos constituintes da membrana plasmática, impactando diretamente no modelo lipídico da membrana celular, diminuindo a fluidez da membrana a partir da modificação da fração lipídica ou mesmo pela ligação entre o AS e o  $Ca^{2+}$ , essencial em diversos sítios da membrana plasmática, levando à inviabilidade dos esporos do fitopatógeno.

Portanto, o AS apresentou forte efeito antifúngico contra o fitopatógeno *P. expansum*, mesmo em baixas concentrações, observando-se forte ligação entre sua estrutura química e sua ação na membrana plasmática do fungo. A ação do AS, quando não alterada pela alcalinização do pH do meio, levou ao extravasamento de proteínas solúveis, assim como à desorganização intracelular. No entanto, outros estudos de natureza bioquímica e molecular se fazem necessários para o

total entendimento do(s) complexo(s) mecanismo(s) de ação antimicrobiana do AS contra o fitopatógeno.



## CAPÍTULO 3 – POTENCIAL DO ÁCIDO SALICÍLICO NO CONTROLE DO BOLOR AZUL EM FRUTOS DE MAÇÃ FUJI DE DIFERENTES CATEGORIAS

### 3.1. INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos é, sem dúvidas, uma das áreas mais importantes para a economia mundial. No Brasil, o agronegócio representa o segmento mais importante da economia, sendo costumeiramente relacionado ao superávit da balança comercial. Na fruticultura, o país é a terceira maior potência mundial, perdendo apenas para China e Índia (CHITARRA & CHITARRA, 2005). No cenário mundial de produção de frutas, a maçã se destaca, sendo o terceiro fruto mais produzido no mundo, ficando atrás apenas da banana e melancia (FAO, 2011).

No Brasil, os frutos de maçã são muito apreciados, sendo produzidos 1,3 milhões de toneladas do fruto em 2012, elevando o país à posição de um dos principais produtores mundiais de maçã (IBGE, 2012). Deste total, cerca de 50% foram produzidos no estado de Santa Catarina, principalmente nos locais que se assemelham às regiões do centro de origem da cultura (CEPA, 2013).

Os frutos de maçã podem ser infectados por uma ampla diversidade de fitopatógenos (SPADARO *et al.*, 2002). Dentre eles, o fungo *Penicillium expansum* se destaca por ser um dos mais destrutivos, sendo capaz de causar grandes perdas às indústrias de frutas frescas (SANZANI *et al.*, 2010) como também às indústrias de processamento de frutos, uma vez que o fitopatógeno é o principal produtor da patulina, uma micotoxina de potencial mutagênico, capaz de causar sérios danos à saúde humana (da ROCHA *et al.*, 2014).

Por estes motivos, a utilização de fungicidas sintéticos continua sendo a principal forma para o controle do fitopatógeno ao redor do globo (ZHANG *et al.*, 2011), sendo utilizados largamente após a colheita, deixando efeitos residuais nos frutos, ou mesmo na água de lavagem das indústrias (POULSEN *et al.*, 2009; MAXIN *et al.*, 2012). Com a crescente preocupação social relacionada às questões ambientais, assim como à saúde humana (DROBY *et al.*, 2009) e o desenvolvimento de resistência dos fitopatógenos aos ingredientes ativos dos fungicidas utilizados (WEBER & PALM, 2010), novas estratégias para o controle do *P. expansum* se fazem necessárias.

Recentemente, compostos naturais com complexos bioativos começaram a ser estudados como alternativas ao uso de fungicidas

sintéticos (TERRY & JOYCE, 2004). Um desses compostos é o ácido salicílico (AS), um hormônio vegetal envolvido em diferentes aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal (TIAN *et al.*, 2007; ASGHARIA & AGHDAM, 2010), atuando como molécula sinalizadora na indução da biossíntese de compostos de defesa, tais como os polifenóis e proteínas relacionadas à patogênese (YAO & TIAN, 2005), além de apresentar comprovados efeitos antimicrobianos contra fungos causadores de podridões (PANAHIRAD *et al.*, 2012).

Diversos são os trabalhos relacionados à utilização do AS na proteção de frutas contra o ataque de fitopatógenos, como em tomates contra *Fusarium oxysporum* (MALDAL *et al.*, 2009), *Botrytis cinerea* em peras (ZHANG *et al.*, 2008) e *Penicillium expansum* em cerejas (XU & TIAN, 2008). Aplicado exogenamente, o AS ainda foi capaz de induzir respostas de defesa em cerejas (QUIN *et al.*, 2003) e uvas (DERCKEL *et al.*, 1998), aumentando a atividade de glucanases e quitinases. Em outros estudos, a aplicação do AS está correlacionada à manutenção das características físico-químicas dos frutos, tais como a melhoria do conteúdo de sólidos solúveis e acidez titulável em frutos de maçã (HAN & LI, 1997), menor perda de massa de frutos de morango armazenados (SHAFIEE *et al.*, 2010) e a manutenção da coloração da epiderme de frutos de pêssego (ABBASI *et al.*, 2010).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do AS para o controle do bolor azul em frutos de maçã, elucidando os mecanismos de ação relacionados à indução de resistência.

## 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1. Condições de cultivo e frutos de maçã

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, no período de março de 2012 a outubro de 2013.

Os frutos de maçã (*Malus domestica* cv. Fuji), das categorias 1, 2 e 3 (TABELA 1) foram adquiridos juntos à COOPERSERRA – Cooperativa do Estado de Santa Catarina, e mantidos por aproximadamente 2 meses em câmara fria a 4°C até sua utilização. Antes dos experimentos, os frutos passaram por um processo de desinfestação, sendo imersos em solução de hipoclorito (i.a 0,5%) por 2 minutos, lavados em água corrente e secos ao ar.

Tabela 1. Limites de tolerância e defeitos permitidos por categoria de frutos de maçã.

Limites de tolerância por categoria	Categorias		
	1	2	3
Mínimo da área da epiderme da fruta com coloração vermelha (%):	40	20	10
Resistência de polpa mín (lbs / pol <sup>2</sup> )	10	10	10
Resistência de polpa max (lbs / pol <sup>2</sup> )	22	22	22
Bitter pit - área atingida (mm <sup>2</sup> )	0	10	50
Lesão cicatrizada leve (mm <sup>2</sup> )	30	200	1000
Lesão cicatrizada grave (mm <sup>2</sup> )	10	30	500
Danos mecânicos (cm <sup>2</sup> )	1	2	5
Lesão aberta da área (mm <sup>2</sup> )	5	20	70
Queimaduras do sol (% da área)	10	20	>20

\*Modificada a partir da Instrução normativa 05. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/classificacao/files/2012/08/Instru%C3%A7%C3%A3o-Normativa-05-Ma%C3%A7%C3%A3-I.pdf>

### 3.2.2. Obtenção e manutenção do isolado de *Penicillium expansum*

O fitopatógeno *Penicillium expansum*, isolado de frutos de maçã infectados, foi cedido pela pesquisadora Dra. Rosa Maria Valdebenito Sanhueza, sendo armazenado na micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o código

MANE 138. O isolado foi crescido em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) e mantido a 25°C, sob luz fluorescente.

*P. expansum* foi repicado periodicamente e, quando utilizadas, as suspensões de esporos ( $1 \times 10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>) foram obtidas de culturas com duas semanas de idade.

### 3.2.3. Obtenção do ácido salicílico

O ácido salicílico (AS), fórmula química C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>, foi adquirido junto à empresa Sigma (Sigma-Aldrich, USA) em pó, sendo utilizado em diferentes concentrações nos diferentes experimentos realizados. Para sua dissolução, foi utilizada água destilada estéril (SHALMASHI & ELIASSI, 2008).

### 3.2.4. Efeito erradicante, protetor e curativo do AS em frutos de maçã cv. Fuji de diferentes categorias

Após a desinfestação e secagem dos frutos, estes foram distribuídos em bandejas plásticas com dimensões (mm) de 400 x 270 x 133. Com auxílio de uma agulha padronizada (5 mm x 2 mm), foram feitos dois ferimentos na região equatorial de cada fruto, sendo realizadas 4 repetições para cada tratamento, onde uma parcela experimental foi representada por uma bandeja contendo 4 frutos.

Para se testar o efeito erradicante do AS, frutos de maçã das categorias 1, 2 e 3 foram imersos por 2 minutos em suspensões de esporos de *P. expansum* ( $1 \times 10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>), preparadas em água destilada (controle) ou em solução de AS a 2,5 mM (pH 2,8). As suspensões haviam permanecido sob agitação durante 30 minutos antes da imersão das maçãs. Em seguida, os frutos foram dispostos nas bandejas plásticas e, a elas, adicionados 20 mL de água sobre papel toalha, simulando uma câmara úmida. As bandejas contendo os frutos tratados e inoculados foram incubadas a 25°C ou a 4°C ± 1°C, sob alta umidade relativa e mantidas em escuro por todo o período experimental.

O efeito de proteção foi avaliado a partir da imersão dos frutos de maçã das diferentes categorias em água destilada ou em solução de AS (2,5 mM e pH 2,8) por 2 minutos. Posteriormente, após a secagem, realizou-se a inoculação dos frutos através da imersão em suspensão de esporos ( $1 \times 10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>) de *P. expansum* por 2 minutos. As bandejas contendo os frutos tratados e inoculados foram incubadas a

25°C ou a  $4^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante todo o período experimental, sendo mantidas em escuro.

O efeito curativo foi feito alterando-se as aplicações, isto é, com os frutos primeiramente sendo inoculados e depois recebendo os tratamentos. A inoculação foi através da imersão em suspensão de esporos ( $1 \times 10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>) de *P. expansum* por 2 minutos e, após a secagem, os frutos foram imersos em água destilada ou solução de AS (2,5 mM e pH 2,8) por 2 minutos, fechando-se as bandejas e incubando-as a 25°C ou a  $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante todo o período experimental, sob condições de escuro.

Para avaliar a severidade da doença, mediu-se o diâmetro horizontal e vertical das lesões dos frutos, utilizando-se um paquímetro com precisão de milímetros. As medidas foram tomadas a cada 4 ou 10 dias, dependendo das condições de incubação, iniciando-se a avaliação quando os frutos apresentaram os primeiros sintomas da doença (aproximadamente no 4º dia após a inoculação sob temperatura de 25°C).

A partir do valor médio do diâmetro das lesões ao longo do tempo, em cada bandeja, calculou-se a velocidade do crescimento da lesão pela fórmula:  $VCL = (\Sigma (\theta_t - \theta_{t-1}) / t)$  observado, sendo os resultados expressos em cm / dia, onde  $\theta$  representa o diâmetro médio da lesão no tempo t.

A incidência da podridão foi calculada dividindo o número de furos apresentando sintomas característicos do bolor azul nos frutos de maçã pelo número total de furos feitos, no final do experimento, sendo os valores representados em %.

#### ***3.2.4.1. Caracterização físico-química dos frutos de maçã cv Fuji das diferentes categorias***

Antes e ao final do experimento, os frutos das diferentes categorias de maçã cv. Fuji foram amostrados conforme a normativa nº 5 do MAPA, retirando-se amostras de 10% dos frutos de maçã antes de receberem os tratamentos (0 dias), e após terem sido submetidos aos diferentes tratamentos e à incubação (aos 12 ou 40 dias, dependendo da temperatura de incubação), para avaliação da perda de massa, sólidos solúveis e acidez titulável.

A perda de massa dos frutos (PMF) foi quantificada conforme o proposto por Tefera *et al.* (2007), onde com o auxílio de uma balança

semi-analítica, a massa de cada um dos frutos foi medida aos 0 e 12 dias quando incubados a 25°C, e aos 0 e 40 dias, a 4°C.

A determinação dos sólidos solúveis (SS) foi realizada segundo o método de Dong *et al.* (2001), com modificações. Para tanto, as maçãs amostradas nos diferentes tempos foram trituradas em um processador de alimentos para obtenção do extrato líquido bruto. Deste extrato, amostras de 10 µL foram depositadas em refratômetro (Instrutherm – RT-30ATC), e determinados os teores de SS, sendo os resultados expressos em °Brix.

A acidez titulável (AT) foi determinada pelo método de Tefera *et al.* (2007), com modificações. Os níveis de AT se deram a partir da titulação do suco de maçã diluído em água destilada estéril (10%) com solução de hidróxido de sódio (0,1 N). O cálculo relativo de AT foi feito a partir do volume final gasto de NaOH necessário para alcalinizar o suco de maçã a um pH 8,2, sendo os resultados expressos em (%) de ácido málico presentes em suco de maçã.

### **3.2.5. Efeito erradicante do AS em frutos de maçã cv. Fuji de diferentes categorias**

Suspensões de esporos de *P. expansum* foram preparadas em água destilada, ou em solução de AS a 0,5 e 2,5 mM e pH de 2,8. Após 10 minutos de contato, frutos de maçã das diferentes categorias previamente feridos, foram imersos nessas suspensões por 2 minutos. Em seguida, os frutos foram dispostos nas bandejas plásticas e, incubados a 25°C ± 1°C, sob alta umidade relativa e mantidas em escuro por 12 dias. A avaliação da incidência e severidade do bolor azul, bem como da velocidade de crescimento da lesão, foram feitos conforme descrito anteriormente. O experimento foi repetido duas vezes para confirmação dos resultados.

Posteriormente, para se verificar a influência do pH na atuação do AS sobre o bolor azul, frutos de maçã foram imersos em suspensão de esporos preparadas em água destilada ou em solução de AS a 2,5 mM em pH 3 (padrão) ou pH 6 (ajustado), seguindo os moldes anteriores. As suspensões haviam permanecido sob constante agitação durante 10 minutos antes da imersão dos frutos. O tratamento com AS teve seu pH modificado pela adição de NaOH 2 N e o experimento foi realizado duas vezes.

Ainda para se verificar a influência do pH na incidência e severidade do bolor azul, aumentou-se o tempo de agitação das

suspensões de esporos de *P. expansum* para 30 minutos, antes da imersão dos frutos, mantendo-se os demais procedimentos. As suspensões de esporos foram preparadas em: água destilada estéril (controle positivo), água destilada estéril pH 3 (ajustado), AS 2,5 mM ou hipoclorito (i.a 0,5%). O experimento foi realizado duas vezes. Os padrões físico-químicos dos frutos foram avaliados conforme descrito no item 3.2.4.1.

### **3.2.6. Ensaios bioquímicos dos frutos de maçã cv. Fuji**

#### **3.2.6.1. Tratamentos**

Para se verificar a influência do AS em elicitar as respostas de defesa em maçãs, frutos das diferentes categorias foram imersos por 2 minutos em água destilada estéril, solução de AS (2,5 mM), suspensão de esporos de *P. expansum* em água destilada (contato por 30 minutos) ou suspensão de esporos de *P. expansum* em solução de AS a 2,5 mM (contato por 30 minutos) nos moldes erradicantes descrito anteriormente, sendo realizadas 4 repetições para cada tratamento, onde uma parcela experimental foi representada por uma bandeja contendo 6 frutos. Os padrões físico-químicos dos frutos também foram avaliados, conforme descrito no item 3.2.4.1 e o experimento realizado uma vez.

#### **3.2.6.2. Amostragem**

Cinco discos (6 mm de diâmetro x 4 mm de profundidade) da polpa dos frutos de maçã das diferentes categorias, foram retirados com epiderme (300 mg), para cada repetição, sendo realizadas cinco repetições por tratamento. Os tempos de amostragem foram de 0, 20, 40 e 80 horas após os tratamentos. As amostras foram armazenadas em tubos tipo eppendorf e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido. O material coletado foi mantido em ultra-freezer (-80°C) até o momento de sua utilização.

#### **3.2.6.3. Determinação das atividades enzimáticas**

As amostras de maçã (300 mg) foram maceradas em homogeneizador (Precellys 24®) a 6800 g por 16 segundos (2x), com adição ao tecido de 750 µL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0), contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM,

polivinilpirrolidona 1% (PVP) e fluoreto de *fenilmetanosulfonil* (PMSF) 1mM. A suspensão obtida foi centrifugada (20.000 g., 30 minutos, 4°C) e o sobrenadante (extrato protéico) recuperado para a determinação de peroxidases, polifenoloxidasas e glucanases.

Para a reação de peroxidases foram adicionados 50 µL do extrato protéico a 250 µL de tampão fosfato 50 mM (pH 6,0), contendo guaiacol 20,2 mM e peróxido de hidrogênio 90 mM. A atividade da enzima foi avaliada através de multileitora de microplacas (Spectramax Paradigm Molecular Devices), onde foram medidos a conversão do guaiacol em tetraguaiacol. A reação foi conduzida por 4 min a 40 °C, com os valores da DO mensurados a cada 30 segundos e gravados. Os resultados foram expressos em unidades de densidade óptica a 470 nm por mg de proteína por minuto ( $DO_{470\text{ nm}} \text{ mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) (Hammerschmidt, Nuckles, Kuc., 1982).

Já para a reação das polifenoloxidasas foram adicionados 20 µL do extrato protéico em 280 µL de tampão fosfato 60 mM (pH 6,0), contendo catecol 60 mM. A atividade de polifenoloxidasas foi avaliada através de multileitora de microplacas, onde foi mensurada a oxidação do catecol convertido em quinona. A reação foi conduzida por 1 min a 40 °C, os valores de DO mensurados e gravados a cada 6 segundos, e os resultados expressos em unidades de densidade óptica a 420 nm por mg de proteína por minuto ( $DO_{420\text{ nm}} \text{ mg proteína min}^{-1}$ ) (Duangmal & Apentem, 1999).

Para a determinação da atividade de glucanases utilizou-se a metodologia adaptada de Brisset *et al.* (2000), a partir do substrato carboximetilcurdlan-remazol azul brilhante (CM-curdlan-RBB). Para isto, em tubos tipo eppendorf de 2 mL foram adicionados 200 µL de CM-curdlan-RBB ( $4 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e 200 µL de tampão acetato de sódio (200 mM; pH 5,0), agitados em vortex por 5 segundos e posteriormente incubados a 40°C em banho maria, por 10 minutos. Finalizado este processo, 400 µL do extrato protéico obtido foi adicionado à solução e incubados novamente em banho maria por 40°C, por 2 horas. As amostras tiveram sua reação interrompida pela adição de 200 µL de HCl 2 N, sendo imediatamente colocadas em banho de gelo por 10 minutos. Ao final do tempo determinado, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante recolhido para a determinação dos valores de glucanase em multileitora de microplacas a 600 nm. Ao tubo correspondente ao branco, foram adicionados 200 µL de CM-curdlan-RBB, 200 µL de tampão acetato de sódio (200 mM; pH 5,0), 400 µL de tampão fosfato de sódio (50 mM; pH 7,0) e 200 µL de HCl 2

N. A atividade de glucanases foi expressa em unidade de densidade ótica a 600 nm por mg de proteína ( $DO_{600\text{ nm}} \text{ mg proteína}^{-1}$ ).

Foram feitas cinco leituras de uma mesma repetição para as amostras de peroxidases, polifenoloxidasas e glucanases, sendo o experimento realizado uma vez.

#### **3.2.6.4. Determinação de proteínas totais**

O método de Bradford (1976) foi empregado para a quantificação do conteúdo total de proteínas nas amostras coletadas, com a utilização do reagente “coomassie brilliant blue” (CBB), e as leituras de absorbância das soluções realizadas através de multileitora de microplacas a 595 nm. A reação foi feita adicionando-se 250  $\mu\text{L}$  do reagente a 25  $\mu\text{L}$  do extrato de uma amostra, incubando-os por 5 minutos a temperatura ambiente antes da leitura. Posteriormente, foi realizada a conversão dos valores de absorbância em concentração de proteína solúvel, e esta conversão feita pela comparação com as leituras de soluções padrões de albumina de soro bovino (ASB).

#### **3.2.6.5. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides totais**

As determinações dos teores de compostos fenólicos totais e flavonóides em frutos de maçã foram realizadas de acordo com as metodologias descritas por McCue *et al.* (2000) e Woisky & Salatino (1998), respectivamente, com modificações. Primeiramente, a 300 mg de tecido foram acrescentados 1 mL de metanol 80% acidificado (pH 2,0), seguindo de maceração em precellys. Ao macerado recolhido, foram adicionados em tubos do tipo Falcon 2 mL de metanol acidificado 80%, precedido de incubação por 1 hora, no escuro, em banho de gelo. Após a incubação, a mistura foi centrifugada por 5 minutos (6000 rpm, 4°C) e o sobrenadante recolhido.

A reação para determinação dos compostos fenólicos totais foi conduzida acrescentado-se 0,5 mL do extrato dos frutos em 0,5 mL de metanol 95%. Posteriormente, à estes foram adicionados 1 mL de etanol 95% (V/V), 1 mL de água destilada estéril, e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Passados 5 minutos da mistura, adicionou-se 0,5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (5% m/V). A reação foi conduzida no escuro, por 1 hora, sob temperatura ambiente. Após esse período, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 725 nm, e os valores interpolados em uma curva

padrão de ácido gálico ( $0-100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $R^2 = 0,99$ ;  $y = 0,0103x - 0,0268$ ). Os resultados foram apresentados em  $\mu\text{g}$  de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de matéria fresca ( $\mu\text{g EAG.g MF}^{-1}$ ).

Já a quantificação do teor de flavonóides foi realizada a partir de 0,5 mL do extrato em metanol acidificado, o qual foi adicionado em 2,5 mL de etanol 99% e 0,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio a 2% (m/V). A reação foi conduzida no escuro por 1 hora em temperatura ambiente. Os valores de absorbância a 420 nm foram lidos em multileitora de microplacas e os resultados interpolados em uma curva-padrão de quercetina ( $0-100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $R^2 = 0,99$ ;  $y = 0,0141x - 0,0104$ ) e representados em  $\mu\text{g}$  de equivalente de quercetina (EQC) por grama de matéria fresca ( $\mu\text{g EQC.g MF}^{-1}$ ).

Foram feitas cinco leituras de uma mesma repetição para as amostras de compostos fenólicos e flavonóides totais, sendo o experimento realizado uma vez.

**Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por HPLC.** A identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos metanólicos dos tecidos foram realizados conforme Schmidt *et al.* (2012), com modificações. Para tanto, 2 mL do extrato metanólico obtido no item anterior foram centrifugados para a obtenção do sobrenadante (6000 rpm, 4°C) e, novamente centrifugados para total remoção das partículas. Aliquotas (10  $\mu\text{L}$ ) de cada amostra foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC – 10A), equipado com coluna  $C_{18}$  (Shim-Pack; 250 mm x 4.6 mm  $\varnothing$  interno) e detector espectrofotométrico UV-visível operando em 280 nm. A eluição utilizou água: ácido acético:  $\eta$ -butanol (350:1:10 V/V/V) como fase móvel, com fluxo de 0.8  $\text{mL.min}^{-1}$ , e a identificação dos compostos de interesse realizada por co-cromatografia e comparação dos tempos de retenção dos compostos padrões (ácido gálico, ácido salicílico, epicatequina e ácido clorogênico – Sigma), sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada a partir da curva padrão externa de ácido gálico ( $0.5 - 300 \mu\text{L.mL}^{-1}$ ;  $R^2 = 0,99$ ;  $y = 35158x$ ) e levando em conta a área dos picos de interesse para efeito dos cálculos de concentração, onde os valores apresentados representam a média de 3 injeções por amostra. A concentração dos compostos fenólicos foi expressa em  $\mu\text{g}$  de EAG por g de massa seca e o experimento realizado uma vez.

### 3.2.7. Análise Estatística

Os experimentos foram conduzidos sob delineamento completamente casualizado, sendo as parcelas experimentais descritas anteriormente. Com auxílio do software Statistica 10.0, os dados foram submetidos ao teste de Levene ou Cochran para verificar a homogeneidade das variâncias (*factorial* e *one-way*) dos tratamentos. Em caso positivo, realizou-se a análise de variância e o respectivo F-teste (5%).

Na avaliação dos testes, quando o F-teste foi significativo, fez-se o teste de separação de médias de Tukey ao nível 5% de significância.

Quando necessário, aplicou-se a análise de regressão linear pelo software Sisvar 5.0, observando o modelo que melhor se ajustava aos resultados, com base nos valores do teste-t ao nível de significância de 5%.

Os gráficos foram construídos com o software Prism 5 for Mac OS X.

## 3.3. RESULTADOS

### 3.3.1. Efeito erradicante, protetor e curativo do AS contra o bolor azul em frutos de maçã cv. Fuji de diferentes categorias

Aplicado na forma erradicante, e permanecendo em contato com os esporos de *P. expansum* por 30 minutos antes da imersão dos frutos, o AS a 2,5 mM inibiu completamente a incidência do bolor azul, tanto aos 25°C (FIGURA 18) como aos 4°C de incubação dos frutos (FIGURA 19).

Apesar do AS ter apresentado efeito erradicante em ambas temperaturas, quando aplicado curativa ou preventivamente, o AS não diferiu do controle feito com água destilada estéril nas categorias 2 e 3 dos frutos de maçã, com 100% de incidência do fitopatógeno nos frutos desafiados, não diferindo se armazenados a 25°C ou a 4°C (FIGURAS 18 e 19). Por outro lado, associado à baixa temperatura, o AS aplicado de forma preventiva retardou o desenvolvimento do bolor azul nos frutos de maçã da categoria 1 no período de 20 dias após a inoculação, não diferindo do controle feito com água destilada estéril no restante do período de incubação (FIGURAS 18 e 19).

O efeito da baixa temperatura sobre o desenvolvimento do bolor azul nos frutos de maçã também foi observado, chegando-se a

velocidades de crescimento da lesão aos 40 dias (4°C) inferiores àquelas encontrados aos 12 dias (25°C) após a inoculação do fitopatógeno, apresentando um diâmetro de lesão semelhantes ao final do experimento (FIGURAS 18 e 19).

Figura 18. Efeito do ácido salicílico a 2,5 mM aplicado em diferentes formas nos frutos de maçã de diferentes categorias, sobre a incidência, severidade (diâmetro da lesão em cm) e velocidade de crescimento da lesão do bolor azul. Os frutos com inóculo foram incubados por 12 dias a 25°C. O controle se refere ao tratamento com água destilada realizado de forma preventiva. Letras maiúsculas nos gráficos indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (5%). Os valores de % acima das barras no gráfico “velocidade de crescimento da lesão” indicam a incidência do bolor azul ao final do experimento.

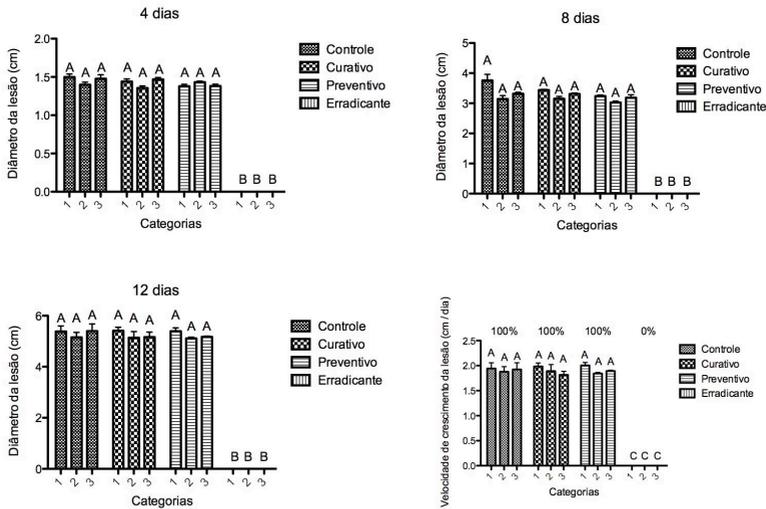
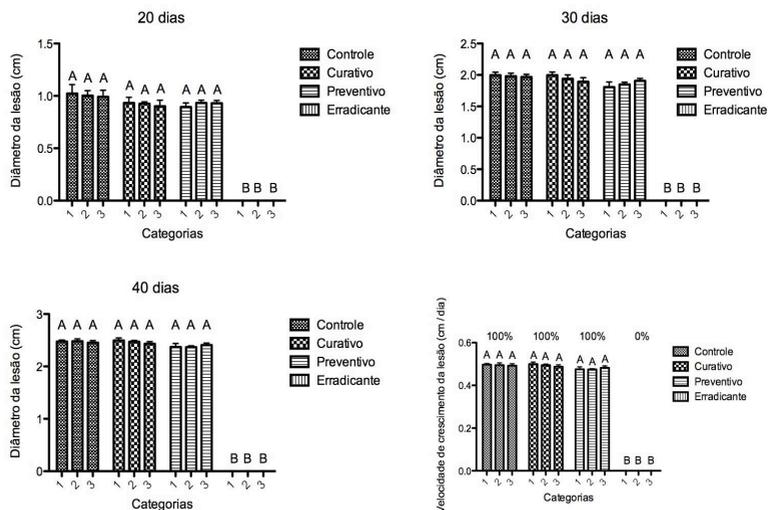


Figura 19. Efeito do ácido salicílico a 2,5 mM, aplicado em diferentes formas nos frutos de maçã das diferentes categorias, sobre a incidência, severidade (diâmetro da lesão) e velocidade de crescimento da lesão do bolor azul. Os frutos com inóculo foram incubados por 40 dias a 4°C. O controle refere-se ao tratamento com água destilada feito de forma preventiva. Letras maiúsculas nos gráficos indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (5%). Os valores de % acima das barras no gráfico “velocidade de crescimento da lesão” indicam a incidência do bolor azul ao final do experimento.



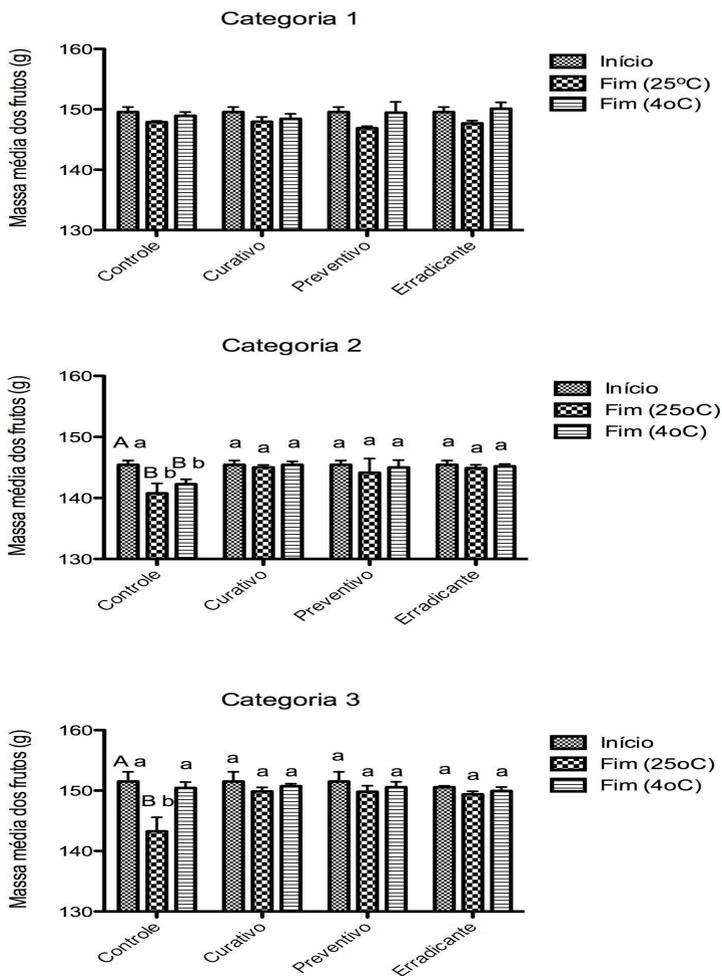
Além de possuir forte efeito antifúngico, diferenças fisiológicas também foram observadas entre os frutos de maçã das diferentes categorias tratados com AS nas diferentes formas de aplicação.

Nos frutos de maçã da categoria 1, não foram observados diferenças estatísticas entre os valores de massa dos frutos, tanto ao início quanto ao final do experimento, independente da forma de aplicação do AS ou das temperaturas em que foram incubados (FIGURA 20).

Em contrapartida, frutos da categoria 2 quando tratados com água destilada (tratamento-controle), apresentaram diferenças de aproximadamente 5 g (perda de, aproximadamente, 12% da massa) entre a massa inicial e a massa final, tanto aos 25°C (12 dias) como aos 4°C (40 dias) de incubação. Quando tratados com AS, independente da forma de aplicação, do período e da temperatura de incubação, os frutos da categoria 2 mantiveram constantes as suas massas, não apresentando diferentes estatísticas entre o início e o fim do experimento (FIGURA 20).

Por sua vez, frutos de maçã da categoria 3 apresentaram diferentes respostas às temperaturas e aos tratamentos com AS. Nesse caso, a aplicação de AS na forma preventiva, curativa e erradicante foi capaz de manter a massa dos frutos ao longo do período experimental, tanto aos 25°C como aos 4°C. Por outro lado, no tratamento-controle, os frutos de maçã apenas mantiveram sua massa ao final do experimento quando incubados a 4°C por 40 dias, sendo observado uma perda de massa de aproximadamente 13% quando incubados a 25°C por 12 dias (FIGURA 20).

Figura 20. Massa média dos frutos (g) de maçã de diferentes categorias, submetidos aos tratamentos com água destilada (controle) ou solução de AS (2,5 mM) e expostos ao fitopatógeno *P. expansum*, no início e ao final do período de incubação (12 dias a 25°C e 40 dias a 4°C). Letras maiúsculas indicam diferença estatística dentro do tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%.

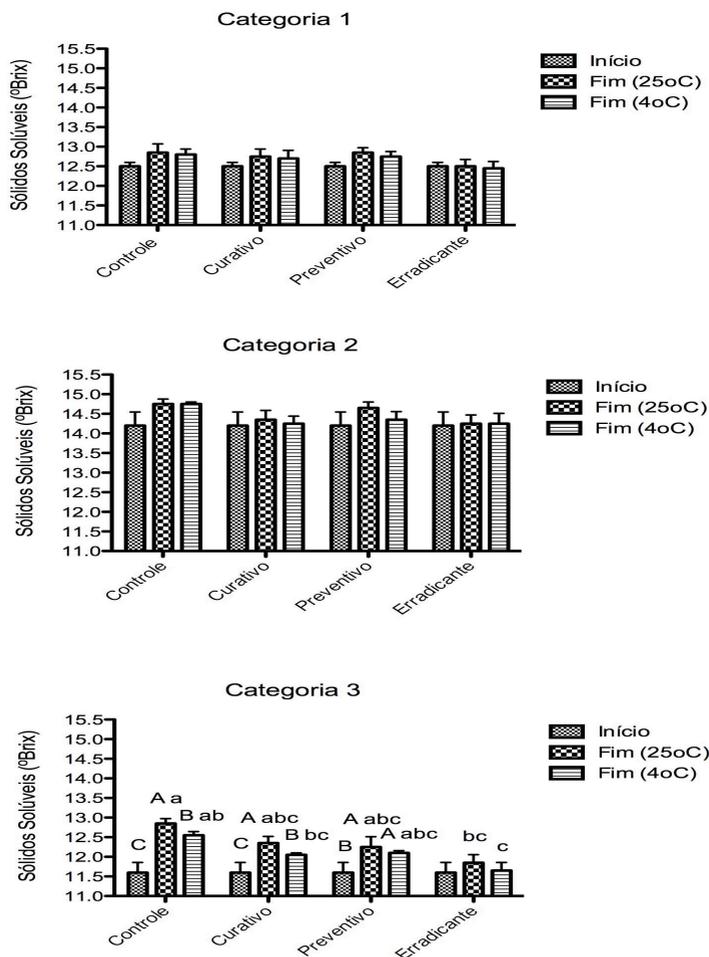


Outras características fisiológicas também sofreram alterações a partir da aplicação do AS. Os teores de sólidos solúveis, por exemplo, não diferiram estatisticamente nos frutos de maçã das categorias 1 e 2 quando submetidos às diferentes formas de aplicação do AS e às diferentes temperaturas (FIGURA 21).

Apenas frutos da categoria 3 apresentaram diferenças estatísticas significativas quando submetidos aos diferentes tratamentos. Nesses, o tratamento com AS na forma preventiva e curativa, aumentou os valores de SS, do início para o final do experimento, em aproximadamente 7% e 12% para as temperaturas de 4°C e 25°C, respectivamente (FIGURA 21).

Aplicado na forma erradicante, não foram observadas diferenças estatísticas entre o início e o fim do experimento. Por outro lado, frutos submetidos ao tratamento controle tiveram um aumento dos teores de SS maior do que os observados nos tratamentos com AS, do início para o final do experimento, apresentando valores de 10% e 15% superiores para as temperaturas de 4°C e 25°C, respectivamente (FIGURA 21).

Figura 21. Teores de sólidos solúveis ( $^{\circ}$ Brix) de frutos de maçã de diferentes categorias, submetidos aos tratamentos com água destilada (controle) ou solução de AS (2,5 mM) e expostos ao fitopatógeno *P. expansum*, no início e ao final do período de incubação (12 dias a 25°C e 40 dias a 4°C). Letras maiúsculas indicam diferença estatística dentro do tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%.



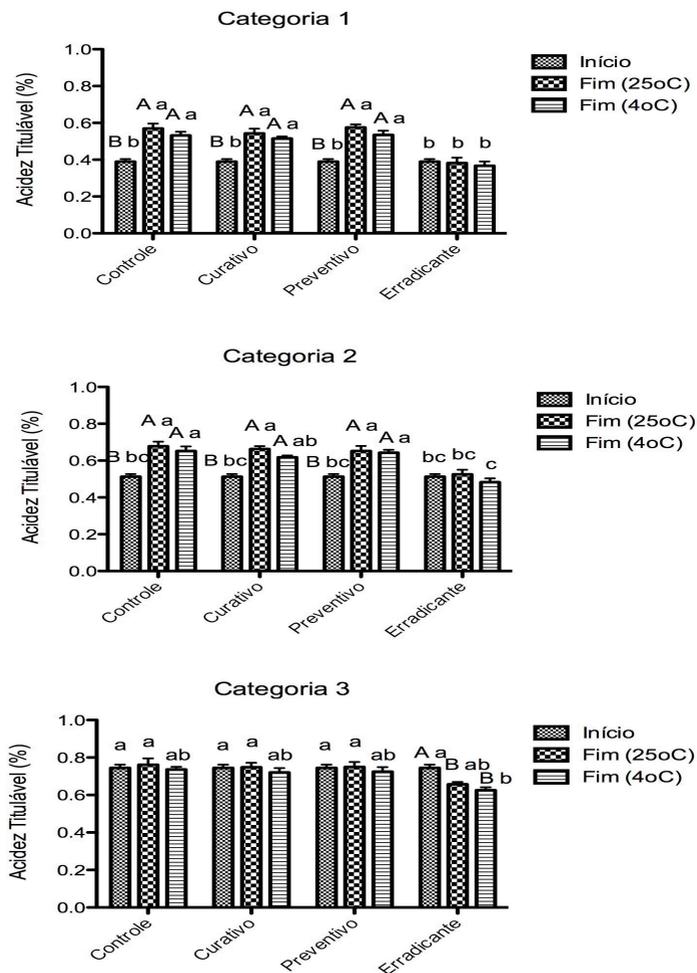
Os índices de acidez titulável, por sua vez, não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando os frutos de maçã das categorias 1 e 2 foram tratados com AS na forma erradicante, mantendo-

se semelhantes ao início do experimento, tanto aos 25°C (12 dias) como aos 4°C (40 dias) de incubação (FIGURA 22).

Os frutos das categorias 1 e 2, imersos em AS na forma preventiva e curativa, assim como aqueles do tratamento controle, apresentaram aumento na AT de, aproximadamente, 33% em frutos da categoria 1 e de 29% em frutos da categoria 2 (FIGURA 22).

Em frutos da categoria 3 tratados com AS de forma erradicante, os valores de acidez encontrados foram menores do que nos tratados com água, assim como dos valores encontrados ao início do experimento, onde a AT foi de 8% no início e de 6% ao final do experimento a 25°C e a 4°C (FIGURA 22). Quando aplicado na forma curativa e preventiva, os resultados finais observados com AS em frutos de maçã da categoria 3, foram próximos àqueles encontrados ao início do experimento, sendo também semelhantes aos encontrados no tratamento controle (FIGURA 22).

Figura 22. Acidez titulável (%) de frutos de maçã de diferentes categorias, submetidos aos tratamentos com água destilada (controle) ou solução de AS (2,5 mM) e expostos ao fitopatógeno *P. expansum*, no início e ao final do período de incubação (12 dias a 25°C e 40 dias a 4°C). Letras maiúsculas indicam diferença estatística dentro do tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%.



### **3.3.2. Efeito erradicante do AS contra o bolor azul em frutos de maçã cv. Fuji de diferentes categorias**

Para que o AS apresente potencial erradicante, algumas questões devem ser observadas, tais como a concentração final do AS em solução, o tempo de contato dos esporos com a solução e sua estrutura química.

Em um novo experimento, o potencial erradicante do AS (pH 2.8 – padrão) contra o bolor azul, após 10 minutos de contato com esporos de *P. expansum*, foi observado a partir da concentração de 0,5 mM, com redução de 47% e 44% na incidência da podridão nas categorias 2 e 3, respectivamente. Ocorreu também uma diminuição na severidade do bolor azul de aproximadamente 25% em frutos da categoria 3, quando esses foram tratados com AS a 2,5 mM (TABELA 2).

Apesar de diminuir a incidência do bolor azul nas categorias 2 e 3, o AS não foi capaz de promover uma redução significativa na incidência, severidade e na velocidade de crescimento da lesão da doença em frutos de maçã da categoria 1, não diferindo estatisticamente do controle (TABELA 2).

Tabela 2. Efeito de concentrações do ácido salicílico (0, 0,5 mM e 2,5 mM) sobre a incidência, severidade e velocidade de crescimento da lesão do bolor azul de *P. expansum* em frutos de maçã de diferentes categorias. As suspensões de esporos permaneceram 10 minutos em contato com os tratamentos antes da imersão dos frutos.

Tratamentos	Categorias		
	1	2	3
<b>Incidência (%)</b>			
Água	100 Aa	90,6 ± 12 Aa	96,9 ± 6,3 Aa
AS 0,5 mM	100 Aa	53,1 ± 6,3 Bb	56,3 ± 16 Bb
AS 2,5 mM	96,9 ± 6,3 Aa	53,1 ± 15 Bb	31,3 ± 16 Bb
<b>Severidade (diâmetro da lesão em cm aos 12 dias)</b>			
Água	3,7 ± 0,2 Aa	3,4 ± 0,4 Aa	3,5 ± 0,3 Aa
AS 0,5 mM	3,7 ± 0,1 Aa	3,2 ± 0,3 Ab	3,3 ± 0,2 Ab
AS 2,5 mM	3,5 ± 0,1 Aa	3 ± 0,1 Bb	2,7 ± 0,7 Bb
<b>Velocidade de crescimento da lesão (cm / dia)</b>			
Água	1,3 ± 0,1 Aa	1,3 ± 0,2 Aa	1,2 ± 0,1 Aa
AS 0,5 mM	1,3 ± 0,1 Aa	1,3 ± 0,1 Aa	1,4 ± 0,1 Aa
AS 2,5 mM	1,3 ± 0,4 Aa	1,3 ± 0,1 Aa	1,2 ± 0,3 Aa

\* Letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%.

Quando o pH da solução do ácido salicílico a 2,5 mM foi ajustado para 6, seu poder erradicante foi completamente perdido. Independente da categoria, frutos tratados com essa solução, apresentaram uma incidência da podridão próxima a 100%, não diferindo estatisticamente da testemunha (TABELA 3).

Uma vez em pH 3, próximo ao seu pH padrão, a solução de ácido salicílico demonstrou novamente um efeito erradicante sobre os esporos de *P. expansum*, inibindo completamente a incidência do bolor azul nos frutos de maçã das categorias 2 e 3, e em 50% na categoria 1, após 10 minutos de contato entre os esporos e os tratamentos (TABELA 3).

Tabela 3. Efeito do pH (3 e 6) sobre o modo de atuação erradicante do ácido salicílico (2,5 mM) para o controle do bolor azul em frutos de maçã de diferentes categorias. As suspensões de esporos permaneceram 10 min em contato com os tratamentos antes da imersão dos frutos.

Tratamentos	Categorias		
	1	2	3
<b>Incidência (%)</b>			
Água	100 Aa	96,9 ± 6,3 Aa	90,6 ± 18,8 Aa
AS pH 3	50 ± 7,2 Ba	0 Bb	0 Bb
AS pH 6	96,9 ± 6,3 Aa	96,9 ± 6,3 Aa	93,8 ± 7,2 Aa
<b>Severidade (diâmetro da lesão em cm aos 12 dias)</b>			
Água	4,2 ± 0,3 Aa	4,4 ± 0,5 Aa	3,2 ± 1,1 Aa
AS pH 3	1,9 ± 1,7 Ba	0 Bb	0 Bb
AS pH 6	4,4 ± 0,5 Aa	4,2 ± 0,3 Aa	4,1 ± 0,4 Aa
<b>Velocidade de crescimento da lesão (cm / dia)</b>			
Água	1,9 ± 0,1 Aa	2 ± 0,2 Aa	1,6 ± 0,5 Ab
AS pH 3	0,9 ± 0,8 Ba	0 Bb	0 Bb
AS pH 6	1,8 ± 0,2 Aa	1,9 ± 0,1 Aa	1,9 ± 0,2 Aa

\* Letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%.

Elevando-se o tempo de contato entre os esporos do fungo *P. expansum* e o AS para 30 minutos, houve inibição de 100% da incidência do bolor azul em frutos da categoria 2 e próximo de 90% nas categorias 1 e 3, além da redução da severidade da doença em mais de 95% nas três categorias de frutos. De modo semelhante, quando aplicado de modo erradicante, o hipoclorito a 0,5% de cloro ativo, inibiu completamente o desenvolvimento da doença e a sua incidência nas três categorias de frutos (TABELA 4).

O tratamento erradicante com água destilada a pH 3, próximo ao pH padrão do AS, por outro lado, não foi capaz de inibir a incidência ou de diminuir a severidade e a velocidade de crescimento da lesão do bolor azul, mostrando que o pH por si não é o fator que promove a redução do bolor (TABELA 4).

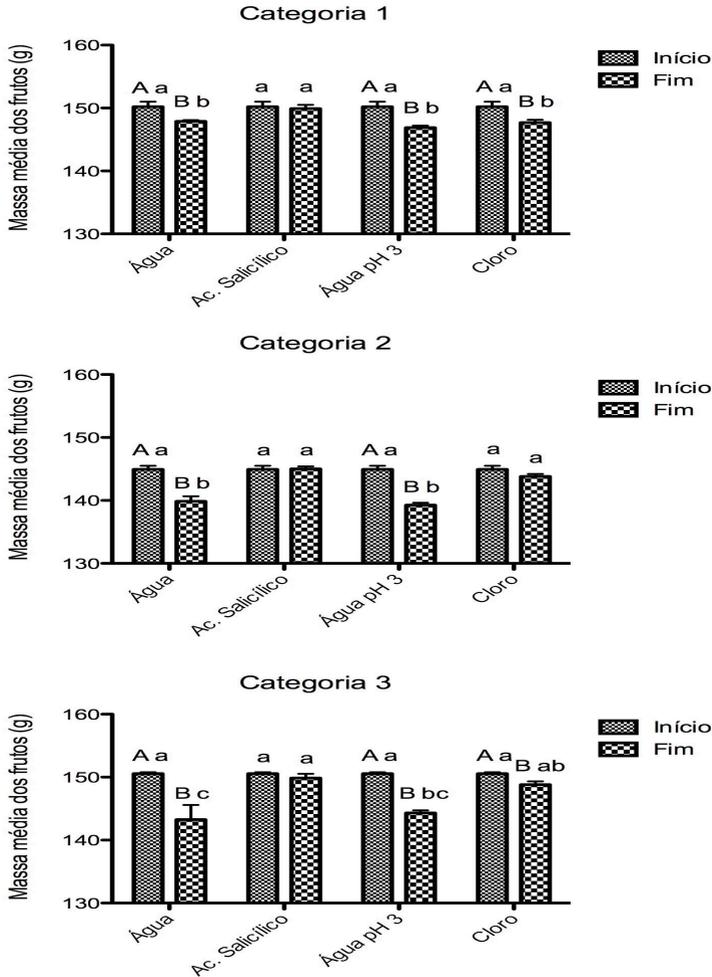
Tabela 4. Efeito do AS a 2,5 mM, da água acidificada a pH 3 e do hipoclorito (0,5% cloro ativo) para o controle do bolor azul em frutos de maçã de diferentes categorias. As suspensões de esporos permaneceram 30 minutos em contato com os tratamentos antes da imersão dos frutos.

Tratamentos	Categorias		
	1	2	3
<b>Incidência (%)</b>			
Água	100 Aa	100 Aa	100 Aa
AS	3,1 + 6,3 Ba	0 Ba	3,1 + 6,3 Ba
Água pH 3	100 Aa	96,9 + 6,3 Aa	96,9 + 6,3 Aa
Hipoclorito	0 Ba	0 Ba	0 Ba
<b>Severidade (diâmetro da lesão em cm aos 12 dias)</b>			
Água	4,8 + 0,1 Aa	5,1 + 0,5 Aa	4,7 + 0,2 Aa
AS	0,03 + 0,02 Ba	0 Ba	0,05 + 0,04 Ba
Água pH 3	5,0 + 0,5 Aa	5 + 2,2 Aa	4,6 + 0,2 Aa
Hipoclorito	0 Ba	0 Ba	0 Ba
<b>Velocidade de crescimento da lesão (cm / dia)</b>			
Água	1,7 ± 0,1 Aa	1,8 ± 0,3 Aa	1,6 ± 0,1 Aa
AS	0 Ba	0 Ba	0 Ba
Água pH 3	1,8 ± 0,2 Aa	1,8 ± 0,8 Aa	1,6 ± 0,1 Aa
Hipoclorito	0 Ba	0 Ba	0 Ba

\* Letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%.

Nesse último experimento, nas três categorias, o AS foi capaz de manter a massa dos frutos de maçã ao longo do período experimental, após 12 dias de incubação a 25°C de temperatura (FIGURA 23). Os frutos tratados com hipoclorito apresentaram perdas de 5 g (aproximadamente 7%), entre o início e o fim do experimento, ao passo que nos tratamentos-controlado (água destilada com pH normal ou acidificada), as maçãs chegaram a ter uma perda de massa entre o início e o fim do experimento de até 9% (FIGURA 23).

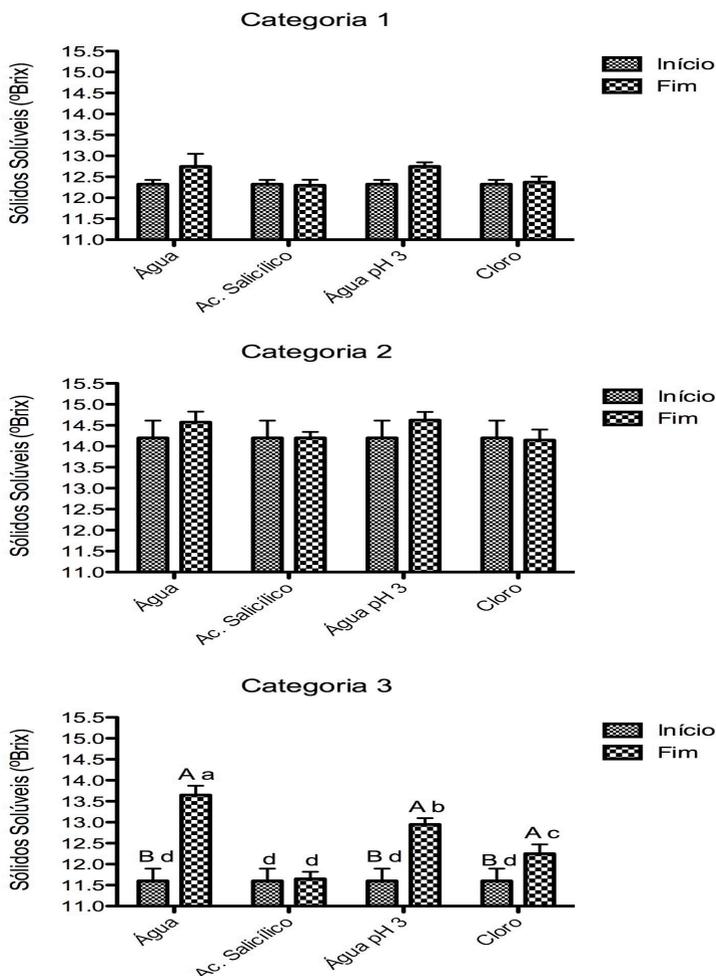
Figura 23. Massa média dos frutos (g) de maçã de diferentes categorias, no início e ao final do período de incubação (12 dias a 25°C). Os frutos foram submetidos aos tratamentos com água destilada em pH normal e pH 3 (controles), solução de AS (2,5 mM) e hipoclorito (0,5% cloro) e expostos ao fitopatógeno *P. expansum*. Letras maiúsculas indicam diferença estatística dentro do tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%.



Utilizando-se água destilada estéril em diferentes pH, AS e hipoclorito, os valores de sólidos solúveis novamente não apresentaram diferença estatística entre o início e o final do experimento nas categorias 1 e 2 (FIGURA 24).

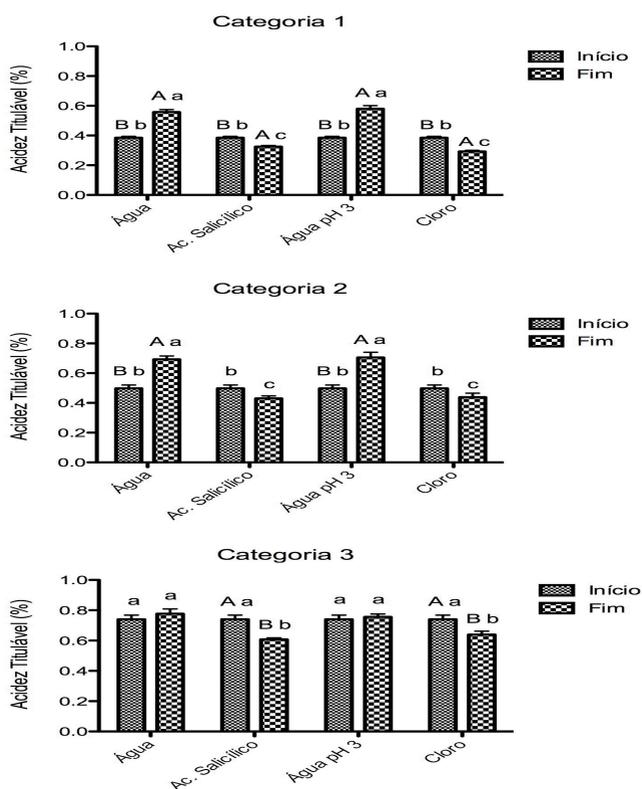
Por outro lado, na categoria 3, quando tratados com AS, os frutos de maçã apresentaram teores de sólidos solúveis equivalentes aos encontrados no início do experimento. Por sua vez, o hipoclorito aumentou o teor de sólidos solúveis em, aproximadamente 7% dos valores encontrados inicialmente, ao passo que frutos tratados com água destilada ou água destilada acidificada (pH 3) apresentaram aumentos de 17% e 13%, respectivamente, ao longo do experimento (FIGURA 24).

Figura 24. Sólidos solúveis ( $^{\circ}$ Brix) de frutos de maçã de diferentes categorias, no início e ao final do período de incubação (12 dias a  $25^{\circ}$ C). Os frutos foram submetidos aos tratamentos com água destilada em pH normal e pH 3 (controles), solução de AS (2,5 mM) e hipoclorito (0,5% cloro) e expostos ao fitopatógeno *P. expansum*. Letras maiúsculas indicam diferença estatística dentro do tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%.



Em frutos de maçã das 3 categorias submetidos aos tratamentos com AS e hipoclorito, os níveis de acidez titulável foram semelhantes àqueles encontrados no início do experimento. No entanto, quando submetidos aos tratamentos-controle (água destilada com pH normal ou acidificada) e comparados aos níveis iniciais de AT, os frutos das categorias 1 e 2 tiveram um aumento de, aproximadamente, 50% e 75% ao final do experimento (FIGURA 25).

Figura 25. Acidez titulável (%) de frutos de maçã de diferentes categorias, no início e ao final do período de incubação (12 dias a 25°C). Os frutos foram submetidos aos tratamentos com água destilada em pH normal e pH 3 (controles), solução de AS (2,5 mM) e hipoclorito (0,5% cloro) e expostos ao fitopatógeno *P. expansum*. Letras maiúsculas indicam diferença estatística dentro do tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%.



### 3.3.3. Efeito do AS nos mecanismos de defesa

Ao se aplicar o AS a 2,5 mM de forma erradicante, com um tempo de contato de 30 minutos, observou-se a confirmação dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, com uma inibição de aproximadamente 95% da incidência do fitopatógeno e uma diminuição da severidade e da velocidade de crescimento da lesão a valores próximos de 0, valores esses semelhantes ao tratamento feito apenas com água destilada estéril ou com solução de AS, sem a presença de esporos (TABELA 5).

Tabela 5. Efeito da água destilada estéril, do AS (2,5 mM), da suspensão de esporos de *P. expansum* e da mistura de AS com suspensão de esporos sob o bolor azul em frutos de maçã de diferentes categorias. As suspensões de esporos permaneceram 30 minutos em contato com o tratamento ante da imersão dos frutos.

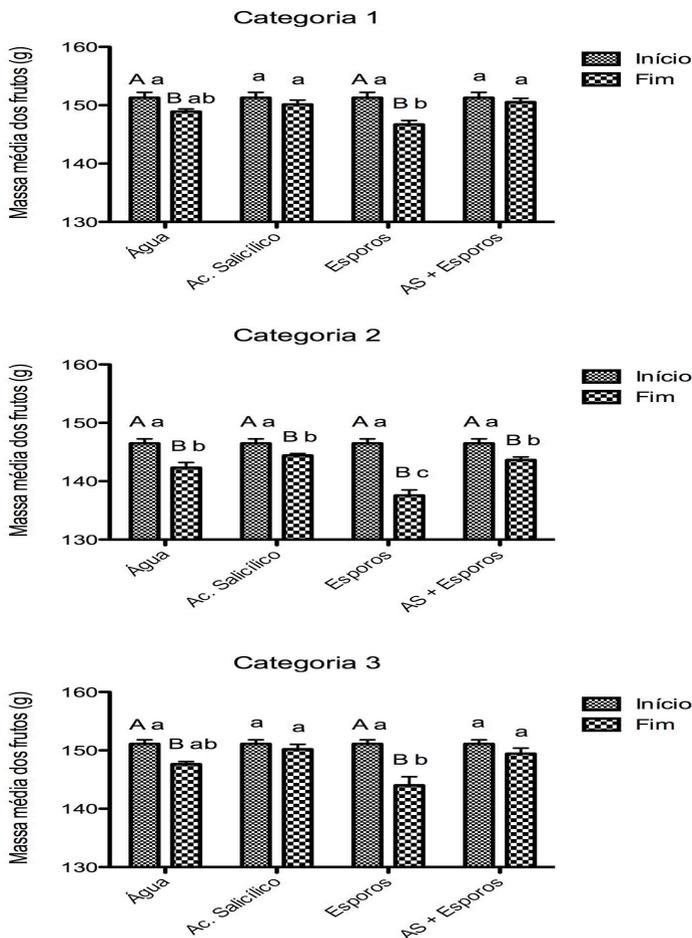
Tratamentos	Categorias		
	1	2	3
<b>Incidência (%)</b>			
Água	3,1 ± 3,6 Aa	7,8 ± 7,8 Aa	3,1 ± 3,6 Aa
AS	7,8 ± 7,8 Aa	4,7 ± 3,1 Aa	7,8 ± 3,1 Aa
Esporos	100 Ba	100 Ba	100 Ba
AS + Esporos	7,8 ± 7,8 Aa	1,6 ± 3,1 Aa	4,7 ± 1,8 Aa
<b>Severidade (diâmetro da lesão em cm aos 12 dias)</b>			
Água	0,1 ± 0,1 Aa	0,2 ± 0,2 Aa	0,1 ± 0,1 Aa
AS	0,1 ± 0,1 Aa	0,1 ± 0,1 Aa	0,1 ± 0,1 Aa
Esporos	3,8 ± 0,1 Ba	3,8 ± 0,1 Ba	3,6 ± 0,3 Ba
AS + Esporos	0,2 ± 0,2 Aa	0,3 ± 0,3 Aa	0,1 ± 0,1 Aa
<b>Velocidade de crescimento da lesão (cm / dia)</b>			
Água	0,4 ± 0,5 Aa	0,1 ± 0,1 Aa	0,1 ± 0,1 Aa
AS	0,1 ± 0,1 Aa	0,1 ± 0,1 Aa	0,1 ± 0,1 Aa
Esporos	1,5 ± 0,1 Ba	1,5 ± 0,1 Ba	1,4 ± 0,1 Ba
AS + Esporos	0,1 ± 0,1 Aa	0,1 ± 0,1 Aa	0,1 ± 0,1 Aa

\* Letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%.

Os resultados fisiológicos observados anteriormente também foram confirmados nesse experimento, a partir dos frutos de maçã das diferentes categorias tratados apenas com AS, ou em mistura de AS com suspensão de esporos de *P. expansum*, que apresentaram menor perda de massa ao final do experimento do que aqueles que receberam tratamento com água e principalmente daqueles inoculados com esporos do fitopatógeno (FIGURA 26).

Estatisticamente, os tratamentos com AS diferiram do início ao final do experimento apenas em frutos da categoria 2, apresentando uma variação na perda de massa de aproximadamente 6%, ao passo que frutos inoculados apenas com suspensão de esporos, apresentaram grandes perdas de massa ao longo do experimento, observando-se reduções de aproximadamente 8% em frutos da categoria 1, 12% em frutos da categoria 2 e 7% g em frutos da categoria 3 (FIGURA 26).

Figura 26. Massa média dos frutos (g) de maçã de diferentes categorias, no início e ao final do período de incubação (12 dias a 25°C). Os frutos foram submetidos aos tratamentos com água destilada, solução de AS (2,5 mM), suspensão de esporos de *P. expansum* e mistura de AS (2,5 mM) com suspensão de esporos (30 minutos de contato). Letras maiúsculas indicam diferença estatística dentro do tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%.

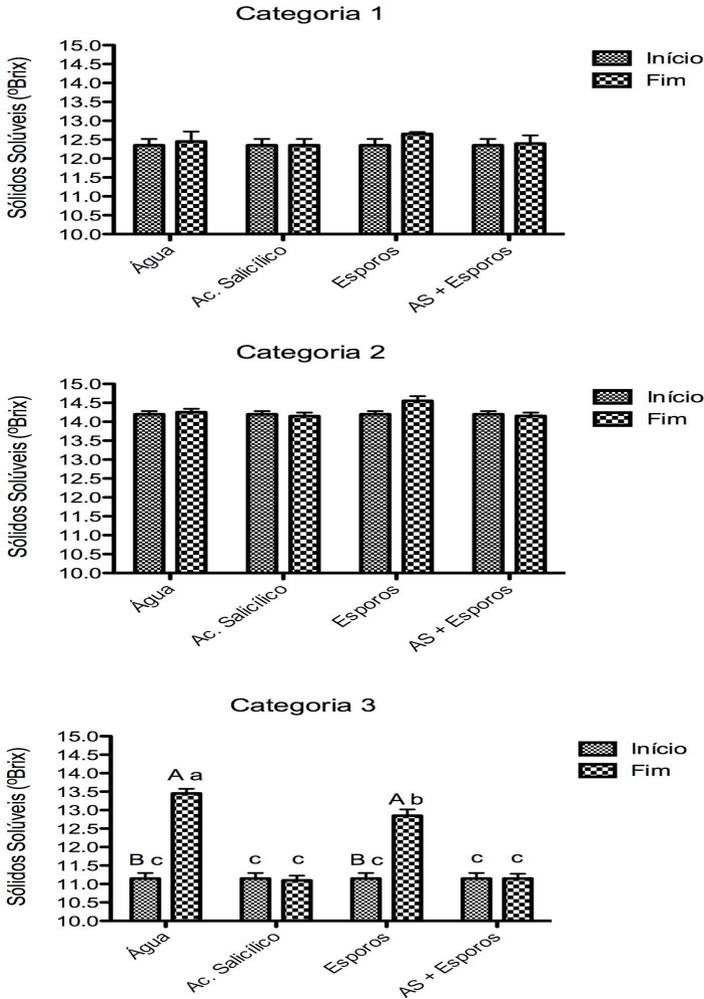


Nesse experimento, os teores de sólidos solúveis novamente não apresentaram diferenças estatísticas significativas nos frutos das

categorias 1 e 2 entre o início e fim do experimento, assim como entre os tratamentos. De forma semelhante, frutos da categoria 3 tratados com AS ou com mistura de AS com solução de esporos mantiveram os níveis de sólidos solúveis do início ao final do experimento (FIGURA 27), confirmando os resultados obtidos anteriormente.

Os frutos da categoria 3 inoculados com suspensão de esporos de *P. expansum*, por sua vez, tiveram um aumento superior a 18% nos teores de sólidos solúveis, passando de 11,0 °Brix para aproximadamente 13,0 °Brix, sendo este valor maior (24%) em frutos tratados apenas com água destilada, sem o contato com os esporos (FIGURA 27).

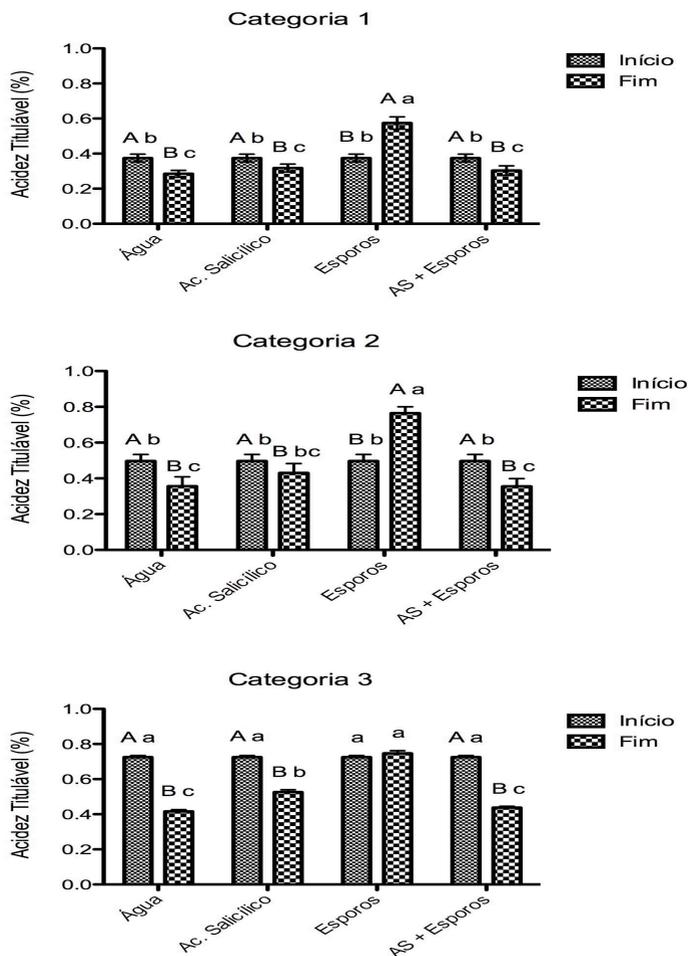
Figura 27. Sólidos solúveis ( $^{\circ}$ Brix) de maçã de diferentes categorias, no início e ao final do período de incubação (12 dias a  $25^{\circ}\text{C}$ ). Os frutos foram submetidos aos tratamentos com água destilada, solução de AS (2,5 mM), suspensão de esporos de *P. expansum* e mistura de AS (2,5 mM) com suspensão de esporos (30 minutos de contato). Letras maiúsculas indicam diferença estatística dentro do tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%.



Frutos das diferentes categorias tratados com AS, em mistura de AS com suspensão de esporos ou apenas com água destilada estéril, apresentaram diferenças significativas nos índices de AT, com uma redução nos valores 12 dias após o início do experimento, de aproximadamente 25% em frutos da categoria 1, de 40% em frutos da categoria 2 e de 43% em frutos da categoria 3 (FIGURA 28).

Por outro lado, frutos de maçã das categorias 1 e 2 ao serem inoculados com suspensão de esporos de *P. expansum*, tiveram um aumento dos valores de AT próximos a 50% ao final do experimento (FIGURA 28).

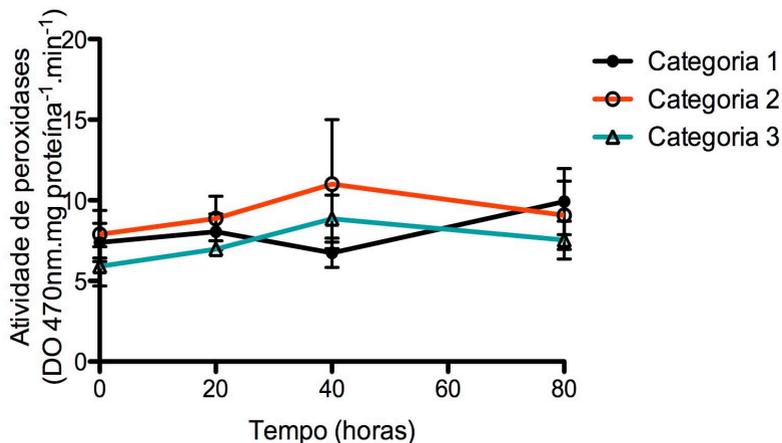
Figura 28. Acidez titulável (%) de maçã de diferentes categorias, no início e ao final do período de incubação (12 dias a 25°C). Os frutos foram submetidos aos tratamentos com água destilada, solução de AS (2,5 mM), suspensão de esporos de *P. expansum* e mistura de AS (2,5 mM) com suspensão de esporos (30 minutos de contato). Letras maiúsculas indicam diferença estatística dentro do tratamento e letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5%.



Outros processos fisiológicos também são afetados pelo AS, especialmente aqueles relacionados à defesa das plantas contra fitopatógenos. No presente estudo, as atividades de peroxidases

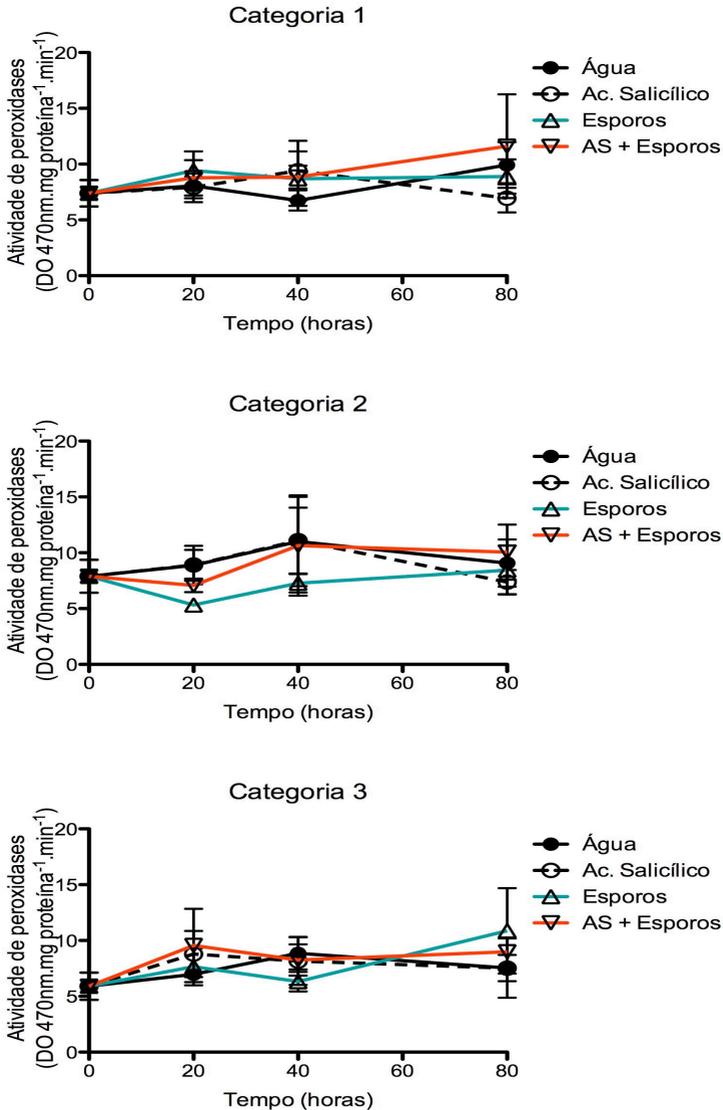
apresentaram valores similares entre as diferentes categorias dos frutos de maçã analisados, não apresentando diferenças estatísticas significativas (FIGURA 29).

Figura 29. Atividade de peroxidases em frutos de diferentes categorias de maçã cv. Fuji tratados com água destilada estéril. Barras de erros indicam o desvio padrão. Não houve diferenças significativa a 5% pelo teste F.



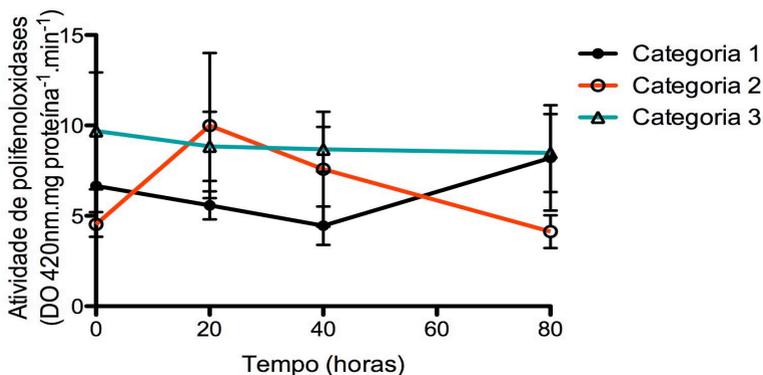
Também não foram observadas alterações significativas na atividade de peroxidases nos frutos das diferentes categorias de maçã, independente dos tratamentos utilizados (imersão em água destilada ou em solução de AS, contendo ou não esporos), mantendo-se relativamente constantes 80 horas após a aplicação dos tratamentos (FIGURA 30).

Figura 30. Atividade de peroxidases em frutos de maçã cv Fuji das categorias 1, 2 e 3 tratados com água destilada, AS (2,5 mM), suspensão de esporos em água destilada e suspensão de esporos em AS a 2,5 mM (AS+esporos). Barras de erros indicam o desvio padrão. Não houve diferenças significativas a 5% pelo teste F.



As atividades de polifenoloxidasas no presente estudo não apresentaram alterações significativas nos frutos de maçã das diferentes categorias, mantendo-se mais constante nos frutos da categoria 3 (FIGURA 31).

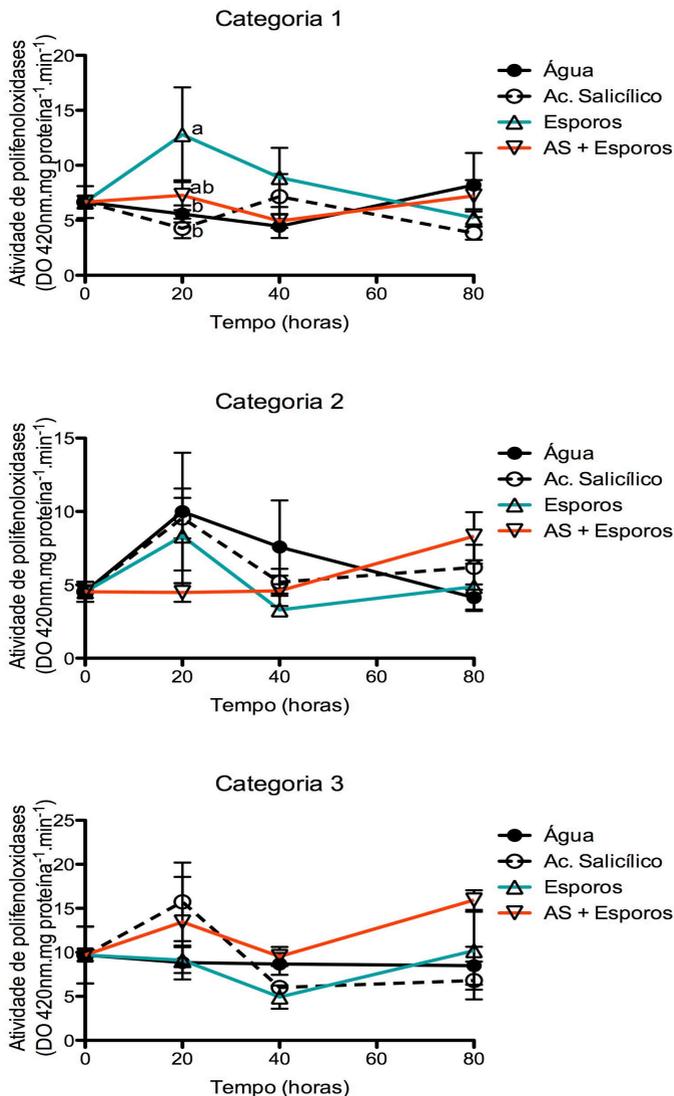
Figura 31. Atividade de polifenoloxidasas em frutos de diferentes categorias de maçã cv. Fuji tratados com água destilada estéril. Barras de erros indicam o desvio padrão. Não houve diferenças significativa a 5% pelo teste F.



Frutos de maçã da categoria 1, inoculados com suspensão de esporos de *P. expansum*, apresentaram atividade de polifenoloxidase duas vezes maior que os frutos tratados apenas com água destilada estéril ou com AS, 20 horas após o tratamento, não diferindo do tratamento AS + esporos, no tempo indicado. Nos demais tempos não foram observadas alterações significativas na atividade enzimática nos frutos de maçã (FIGURA 32).

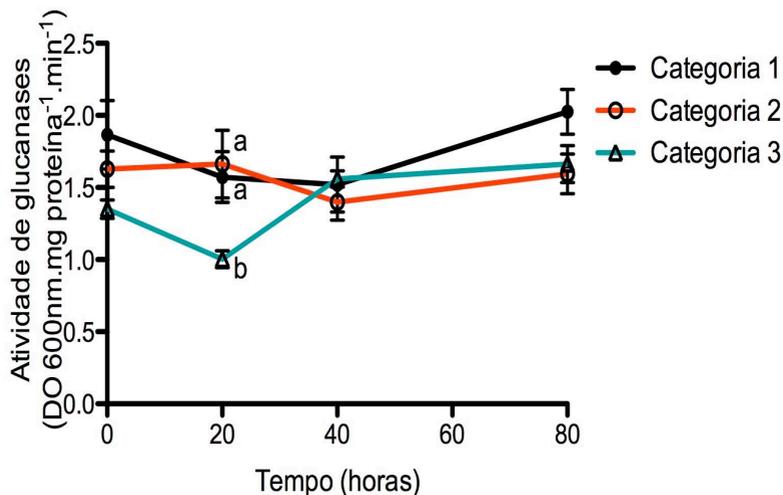
Em frutos de maçã das categorias 2 e 3 não foram observadas alterações significativas na atividade enzimática ou mesmo linearidade na atividade enzimática (FIGURA 32).

Figura 32. Atividade de polifenoloxidasas em frutos de maçã cv Fuji das categorias 1, 2 e 3 tratados com água destilada, AS (2,5 mM), suspensão de esporos e AS (2,5 mM) de forma erradicante. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância no tempo indicado.



Quanto à atividade de glucanases, não houve diferenças entre os frutos das categorias 1 e 2, porém constatou-se uma redução significativa na atividade enzimática em frutos da categoria 3 às 20 h após a incubação a 25°C (FIGURA 33).

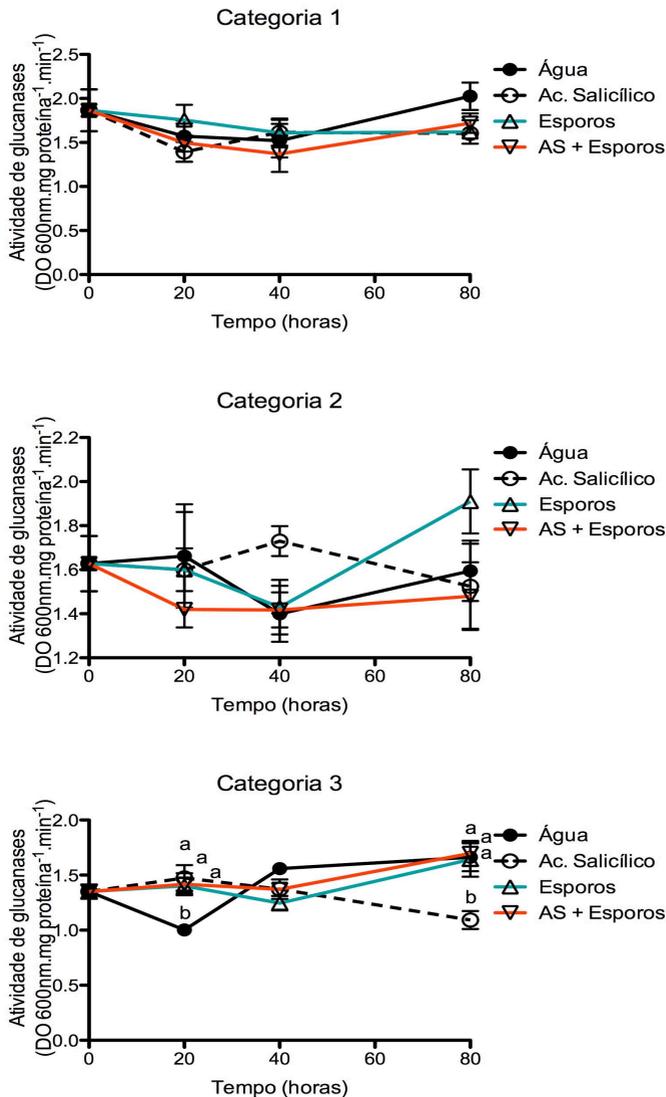
Figura 33. Atividade de glucanases em frutos de diferentes categorias de maçã cv. Fuji tratados com água destilada estéril. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância no tempo indicado.



Nos frutos de maçã da categoria 1, observou-se uma atividade enzimática linear ao longo dos tempos amostrais, sem, no entanto, apresentarem diferenças significativas entre os tratamentos. Por outro lado, frutos da categoria 2 apresentaram atividades enzimáticas não lineares ao longo do tempo, sem, no entanto, apresentarem diferenças estatísticas significativas (FIGURA 34).

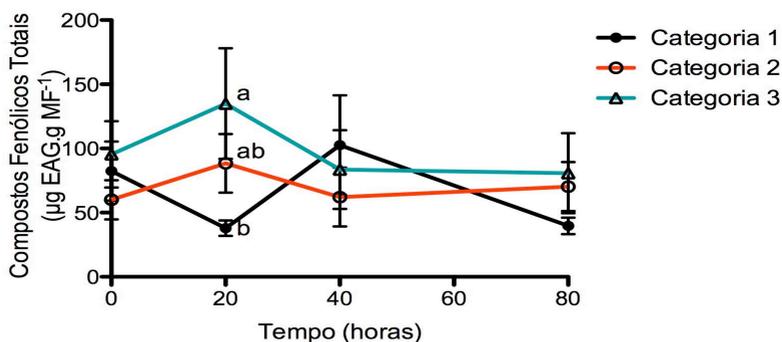
Já nos da categoria 3, observaram-se alterações significativas na atividade de glucanases 20 e 80 horas após a realização dos tratamentos. Às 20 horas, os valores da atividade enzimática nos frutos imersos em AS, contendo ou não esporos, e nos frutos apenas inoculados apresentaram-se aproximadamente 1 vez e  $\frac{1}{2}$  superiores aos da testemunha, ao passo que às 80 horas após os tratamentos, frutos imersos apenas em AS apresentaram valores da atividade de glucanases aproximadamente 1 vez e  $\frac{1}{2}$  inferiores do que os demais tratamentos (FIGURA 34).

Figura 34. Atividade de glucanases em frutos de maçã cv Fuji das categorias 1, 2 e 3 tratados com água destilada, AS (2,5 mM), suspensão de esporos e AS (2,5 mM) de forma erradicante. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância nos diferentes tempos.



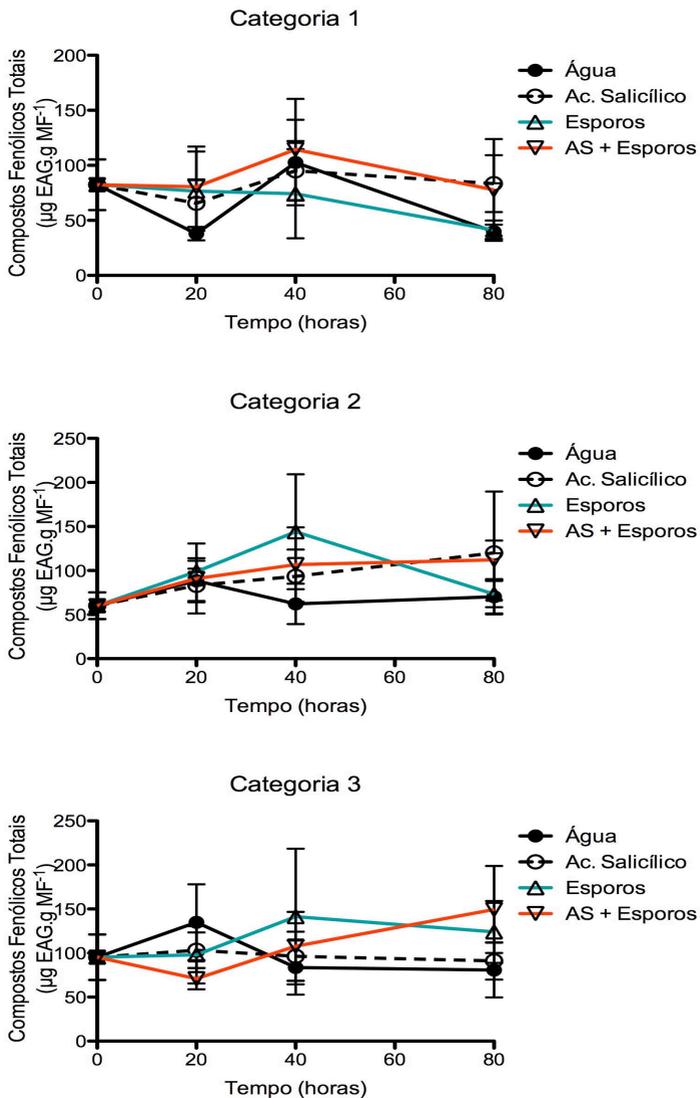
Às 20 horas após o início do experimento, os maiores teores de compostos fenólicos totais foram observados nos frutos de maçã das categorias 2 e 3, apresentando o dobro do valor dos frutos da categoria 1, onde foram observados os menores teores de compostos fenólicos totais para o tempo indicado, não havendo diferenças nos demais tempos de análise (FIGURA 35).

Figura 35. Conteúdo de compostos fenólicos totais em frutos de diferentes categorias de maçã cv. Fuji tratados com água destilada estéril. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância no tempo indicado.



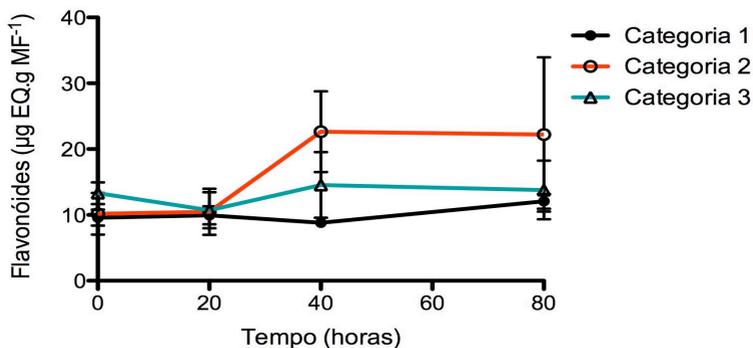
Imersos em água destilada estéril, suspensão de esporos ou AS, os frutos das diferentes categorias não diferiram em relação aos teores de compostos fenólicos totais as 0, 20, 40 e 80 horas após a imersão. Quando aplicado de forma erradicante, o AS apresentou valores lineares do conteúdo de compostos fenólicos totais, sem diferir, no entanto, estatisticamente dos demais tratamentos (FIGURA 36).

Figura 36. Conteúdo de compostos fenólicos totais em frutos de maçã cv Fuji das categorias 1, 2 e 3 tratados com água destilada, AS (2,5 mM), suspensão de esporos e AS (2,5 mM) de forma erradicante. Barras de erros indicam o desvio padrão. Não houve diferenças significativas a 5% pelo teste F.



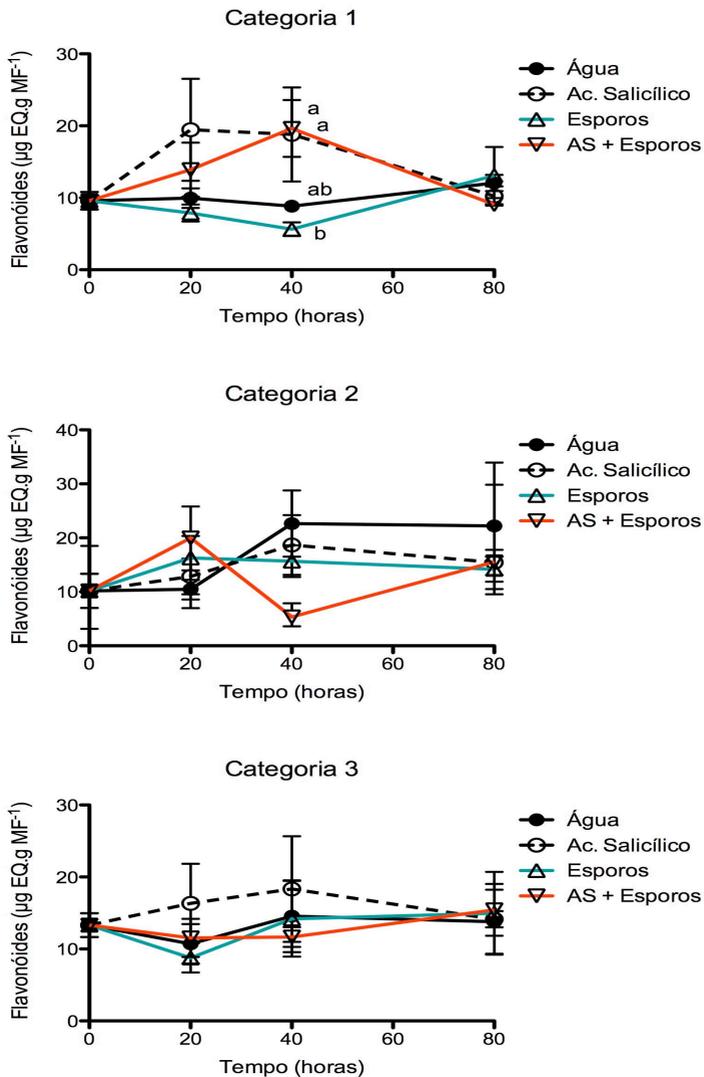
Quanto aos teores de flavonóides, no presente estudo não foram observadas diferenças significativas entre os frutos de maçã das diferentes categorias (FIGURA 37).

Figura 37. Conteúdo de flavonóides em frutos de diferentes categorias de maçã cv. Fuji tratados com água destilada estéril. Barras de erros indicam o desvio padrão. Não houve diferenças significativa a 5% pelo teste F.



Quando tratados com água destilada estéril ou solução de AS contendo ou não esporos, os frutos de maçã das categorias 2 e 3 não apresentaram alterações significativas nos teores de flavonóides. Por outro lado, frutos da categoria 1 imersos apenas em solução de AS ou AS contendo esporos, apresentaram concentrações maiores de flavonóides 40 horas após o tratamento quando comparados aos frutos imersos em água destilada estéril ou em suspensão de esporos, não diferindo nos demais tempos (FIGURA 38).

Figura 38. Conteúdo de flavonóides em frutos de maçã cv Fuji das categorias 1, 2 e 3 tratados com água destilada, AS (2,5 mM), suspensão de esporos e AS (2,5 mM) de forma erradicante. Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias com letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância no tempo indicado.



Os compostos fenólicos identificados no presente estudo nos frutos de maçã, por meio de HPLC, foram o AS, o ácido clorogênico e a epicatequina. Nos frutos da categoria 1, não foram observadas diferenças significativas no conteúdo do ácido clorogênico e da epicatequina. Por outro lado, frutos dessa categoria inoculados apenas com esporos ou tratados com AS de forma erradicante nos tempos 0 e 80 horas após o tratamento apresentaram diferenças no conteúdo de AS, onde os valores encontrados nos tratamentos no tempo 0 horas foram aproximadamente 25% menores do que aqueles encontrados 80 horas após os tratamentos (TABELA 6).

Tabela 6. Composição e concentração ( $\mu\text{g}$ ) de compostos fenólicos presentes em frutos de maçã cv. Fuji categoria 1 imersos em suspensão de esporos de *P. expansum* preparada em água destilada ou em solução de AS a 2,5 mM, no início (0 h) e ao final do experimento (80 h).

Pico	Composto	Tempo	Esporos	Esporos	Esporos	Esporos
		de retenção (min)	em água a 0 h	em água a 80 h	em AS a 0h	em AS a 80h
1	Ácido Salicílico	4,1	$1,7 \pm 0,5\text{ab}$	$2,2 \pm 0,4\text{ab}$	$1,6 \pm 0,1\text{b}$	$2,4 \pm 0,6\text{a}$
2	Epicatequina	4,6 - 4,7	$0,7 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,3$
3	Ácido Clorogênico	10,9 - 11	$3,5 \pm 1,1$	$3,5 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,8$
	Fenólicos Totais*	-----	$5,7 \pm 1,9$	$6,4 \pm 0,6$	$5,2 \pm 0,5$	$6,1 \pm 1,7$

\* Letras diferem os tratamentos nas linhas pelo teste de Tukey a 5%.

Nos frutos da categoria 2 não foram observadas diferenças significativa no conteúdo de AS e epicatequina. O composto fenólico ácido clorogênico, no entanto, apresentou concentrações inferiores nos frutos tratados com AS no início do experimento (TABELA 7).

Tabela 7. Composição e concentração ( $\mu\text{g}$ ) de compostos fenólicos presentes em frutos de maçã cv. Fuji categoria 2 imersos em suspensão de esporos de *P. expansum* preparada em água destilada ou em solução de AS a 2,5 mM, no início (0 h) e ao final do experimento (80 h).

Pico	Composto	Tempo				
		de retenção (min)	Esporos em água a 0 h	Esporos em água a 80 h	Esporos em AS a 0h	Esporos em AS a 80h
1	Ácido Salicílico	4,1	$2,7 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,4$
2	Epicatequina	4,6 – 4,7	$0,7 \pm 0,4$	$0,7 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,7$	$1,1 \pm 0,2$
3	Ácido Clorogênico	10,9 - 11	$5,0 \pm 0,3\text{ab}$	$4,7 \pm 0,5\text{ab}$	$3, \pm 0,4\text{b}$	$5,1 \pm 0,3\text{a}$
	Fenólicos Totais*	-----	$8,5 \pm 1 \text{ ab}$	$7,3 \pm 1,2\text{ab}$	$6,4 \pm 1,3\text{b}$	$8,3 \pm 0,9\text{a}$

\* Letras diferem os tratamentos nas linhas pelo teste de Tukey a 5%.

Na categoria 3, os frutos de maçã apresentaram diferenças significativas nas concentrações de AS e ácido clorogênico entre os tempos 0 e 80 horas, não diferindo, no entanto, se tratados com AS + esporos ou água + esporos. Por outro lado, as concentrações de epicatequina não apresentaram variações significativas entre os tempos e tratamentos (TABELA 8).

Tabela 8. Composição e concentração ( $\mu\text{g}$ ) de compostos fenólicos presentes em frutos de maçã cv. Fuji categoria 3 imersos em suspensão de esporos de *P. expansum* preparada em água destilada ou em solução de AS a 2,5 mM, no início (0 h) e ao final do experimento (80 h).

Pico	Composto	Tempo				
		de retenção (min)	Esporos em água a 0 h	Esporos em água a 80 h	Esporos em AS a 0h	Esporos em AS a 80h
1	Ácido Salicílico	4,1	$1,7 \pm 0,2\text{b}$	$1,8 \pm 0,1\text{b}$	$2,4 \pm 0,3\text{a}$	$2,3 \pm 0,2\text{a}$
2	Epicatequina	4,6 – 4,7	$0,7 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
3	Ácido Clorogênico	10,9 - 11	$3,5 \pm 0,6\text{c}$	$4,9 \pm 0,1\text{b}$	$6,9 \pm 0,7\text{a}$	$7,7 \pm 1,2\text{a}$
	Fenólicos Totais*	-----	$6 \pm 0,8 \text{ c}$	$7,5 \pm 0,3\text{b}$	$10,1 \pm 1,1\text{a}$	$10,9 \pm 1,5\text{a}$

\* Letras diferem os tratamentos nas linhas pelo teste de Tukey a 5%.

### 3.4. DISCUSSÃO

Os frutos de maçã são largamente consumidos ao redor do mundo devido ao forte apelo popular de que estes são alimentos saudáveis,

sendo grandes fontes de antioxidantes, fenóis, além de sais minerais e água (BOYER & LIU, 2004).

Doenças fúngicas são as principais causas das perdas de frutos de maçã em pós-colheita, restringindo o potencial de armazenamento em câmaras frias e de atmosfera controlada para poucos meses, trazendo a necessidade da utilização de compostos antimicrobianos eficientes, tais como os fungicidas (AHMADI-AFZADI *et al.*, 2013). Dentre as doenças, o bolor azul de *P. expansum* se destaca, causando perdas acima de 90% em condições adequadas de temperatura e umidade, além de produzir a micotoxina patulina, notadamente conhecida pelo seu potencial carcinogênico (BARREIRA *et al.*, 2010).

Com a crescente demanda social por alimentos sem resíduos químicos, somado ao impacto ambiental causado pelos fungicidas, o desenvolvimento de resistência do fitopatógeno aos ingredientes ativos utilizados e a consequente proibição do seu uso em diversos países, trazem a necessidade de métodos alternativos de controle (JANISIEWICZ & KORSTEN, 2002).

Buscando-se substâncias de menor impacto para o uso agrícola, avaliou-se em um primeiro momento as diferentes formas de aplicação do ácido salicílico (AS), um composto fenólico cujo potencial antifúngico é amplamente conhecido, para o controle do bolor azul.

No presente estudo, observou-se que, quando aplicado na forma erradicante, o AS a 2,5 mM foi capaz de inibir em 100% a incidência, a severidade do bolor azul e a velocidade de crescimento da lesão em frutos de maçã das diferentes categorias, diminuindo sua eficiência em 50% quando aplicado a uma concentração de 0,5 mM. Verificou-se que, para exercer tal efeito, o AS necessita de um tempo de contato mínimo com os esporos do fitopatógeno. Isso significa que, caso o AS seja incorporado à solução e não permaneça em contato direto com os esporos, o seu efeito pode ser reduzido pela metade.

Os efeitos antimicrobianos do AS contra diferentes fitopatógenos também foram observados em diversos estudos. Zang *et al.* (2011), por exemplo, ao utilizarem o AS na concentração de 0,5 mM contra o fungo *P. expansum* em pêssegos, observou a redução da incidência e da severidade em 20% e 30%, respectivamente. Em experimento com tomates desafiados com o fitopatógeno *B. cinerea*, o AS reduziu em 15% a incidência e em 10% a severidade da doença (WANG *et al.*, 2011). Além disso, em cerejeiras, a aplicação de AS a 2 mM foi capaz de reduzir o desenvolvimento e a incidência de *Monilinia fructicola* em até 30% (YAO & TIAN, 2005).

Somados a esses, o tratamento com AS tem demonstrado outros efeitos benéficos, aumentando a eficiência do controle biológico de leveduras como *Cryptococcus laurentii* em peras (YU *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2009) e maçãs (YU & ZHENG, 2006).

Apesar da eficiência do AS em controlar o bolor azul, observou-se que o mesmo, quando aplicado de forma preventiva ou curativa não foi capaz de reproduzir o mesmo efeito, demonstrando que a forma de aplicação é essencial para promoção da diminuição do bolor azul em frutos de maçã. Preventivamente, possivelmente, pela incapacidade do AS induzir respostas de defesa nos frutos, no presente estudo, não foram observados níveis de controle do bolor azul. Por ser um fitopatógeno muito agressivo e inespecífico, uma vez que tenha infectado e se estabelecido no fruto, dificilmente um agente de controle químico controlaria a doença. Assim, o AS aplicado de modo curativo possivelmente inibiria o desenvolvimento apenas em doses muito altas e sendo colocado diretamente no local da lesão, penetrando de forma adequada nos ferimentos e alcançando os tecidos colonizados.

Para que o AS apresente um adequado efeito antimicrobiano, atuando de forma erradicante, outros aspectos também devem ser levados em consideração, como o pH da solução e a forma disponível em solução do AS. Isso foi evidenciado no presente estudo onde, independente da categoria dos frutos, o ácido salicílico (2,5 mM), quando aplicado em pH 3, próximo ao seu pH padrão em solução, demonstrou forte poder erradicante, inibindo em 100% a incidência do bolor azul quando em contato com os esporos por 30 minutos. Quando o pH do AS foi alcalinizado a 6, seu efeito antifúngico foi perdido, observando valores de incidência, severidade e de velocidade de crescimento da lesão próximos aos observados em frutos tratados com água.

Uma vez alcalinizado o pH da solução de AS, possivelmente o composto pode estar perdendo suas características fenólicas a partir da interação entre os grupamentos hidroxilas e os prótons do anel aromático, levando a uma diminuição do seu potencial antifúngico além do seu potencial antioxidante.

De forma semelhante, outros compostos químicos são influenciados pelos parâmetros acima, tais como o imazalil cujo efeito antimicrobiano é diretamente afetado pelo pH final da solução, onde valores de pH próximos a 7 inibem completamente o desenvolvimento de *Penicillium italicum* e *P. digitatum*, ao passo que pH próximos a 5,

não apresentam efeitos antimicrobianos contra os fitopatógenos (DANIELS *et al.*, 1985; GUAN *et al.*, 1989).

Além do efeito direto do AS sobre o fitopatógeno, observou-se também o efeito da baixa temperatura na evolução da doença. Valores da severidade do bolor azul aos 40 dias, em frutos inoculados e incubados a 4°C, assemelharam-se àqueles encontrados em frutos inoculados e incubados por 12 dias a 25°C, demonstrando uma menor velocidade de crescimento da lesão. Os efeitos das baixas temperaturas sobre o fitopatógeno são bem conhecidos e difundidos, sendo constantemente utilizadas nos locais de armazenamento dos frutos visando não apenas garantir a diminuição do desenvolvimento do bolor azul, mas também auxiliando na preservação dos frutos, mantendo as características físico-químicas por mais tempo. No entanto, se por um lado o desenvolvimento do fitopatógeno diminui nas baixas temperaturas, por outro lado, essa diminuição favorece o acúmulo de patulina nos frutos infectados, sem a erradicação do fitopatógeno (BAERT *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2011).

Por isso, acredita-se que uma associação entre as baixas temperaturas e o AS aplicado de forma erradicante seria capaz de impedir o desenvolvimento do bolor azul e manter as características físico-químicas dos frutos de maçã por um maior período de tempo.

Além de possuir forte efeito antifúngico, diferenças fisiológicas também foram observadas entre os frutos de maçã das diferentes categorias tratados com AS nas diferentes formas de aplicação. Observou-se que, quando aplicado exogenamente, o AS foi capaz de manter a massa dos frutos das 3 diferentes categorias próximos àqueles encontrados no início dos experimentos. Por outro lado, os tratamentos com água destilada, com ou sem acidificação e o tratamento com cloro, não foram eficientes em manter a massa dos frutos, apresentando uma variação negativa de aproximadamente 10% nos frutos das categorias 1, 2 e 3.

Kazemi *et al.* (2011), ao aplicarem AS exogenamente em frutos de maçã cv. Jonagold também não observaram variações relevantes na massa dos frutos ao final do período de armazenamento (60 dias). Quando aplicado em aspargos, o AS foi capaz de manter a integridade celular do vegetal, levando a um maior período de armazenamento (WEI *et al.*, 2011).

Tal processo se deve às taxas de respiração dos frutos climatéricos, que notadamente aumentam durante o processo de amadurecimento dos frutos (MO *et al.*, 2008). Possivelmente, a

manutenção da massa decorreu do fato de que o AS é uma molécula capaz de diminuir a respiração dos frutos a partir da inibição da biossíntese de etileno ou mesmo da sua ação. Além disso, o AS é também, aparentemente, capaz de diminuir a respiração e, conseqüentemente, diminuindo a perda de massa nos frutos a partir da inibição, nas mitocôndrias, do transporte de elétrons ocasionado pelo substrato das desidrogenases em ubiquinonas (NORMAN *et al.*, 2004). Somado a isto, quando aplicado de forma erradicante, o AS não permite que o fitopatógeno utilize os nutrientes presentes nos frutos de maçã para colonizar e se desenvolver (ZHENG & ZHANG, 2004).

Os teores de sólidos solúveis (SS), por outro lado, são considerados importantes indicadores do processo de amadurecimento dos frutos, onde um aumento dos seus valores corresponde à conversão do amido em açúcares solúveis (KAZEMI *et al.*, 2011). Quando tratados com AS (2,5 mM), os frutos de maçã das 3 diferentes categorias não apresentaram diferenças estatísticas entre o início e o fim do experimento, mantendo seus valores constantes, incubados a 25°C ou 4°C. Apenas em frutos de maçã da categoria 3 os valores de SS apresentaram diferenças estatísticas para com os demais tratamentos. Tratados com água (pH ajustado ou não para 3) e cloro, os frutos apresentaram um aumento de 13%, 17% e 7% nos teores de SS, respectivamente. Esse aumento foi ainda maior em frutos apenas inoculados com suspensão de esporos de *P. expansum*, apresentando uma variação de até 24%.

O aumento de SS nos frutos de maçã da categoria 3 pode estar relacionado à sua fisiologia. Antes do início do experimento, esses frutos encontravam-se armazenados em baixas temperaturas, em um estágio de amadurecimento inicial (verdes), ao passo que com o decorrer do tempo de armazenamento do experimento, a uma temperatura de incubação de 25°C, ocorreu um aceleração do processo de maturação. Dessa maneira, ao serem tratados com AS, os frutos tiveram, possivelmente, suas taxas metabólicas diminuídas, de modo a se converter, em menor quantidade, o amido em sólidos solúveis, prevenindo ainda o desenvolvimento e colonização do fitopatógeno. Por outro lado, frutos do tratamento-controle mantiveram as suas funções metabólicas aceleradas, além de que, quando colonizados pelo bolor azul, tornaram-se alvos das enzimas degenerativas de tecidos secretadas pelo fitopatógeno, como as  $\alpha$ -amilases (BALKAN & ERTAN, 2005).

Outros pesquisadores observaram essa forma de ação do AS. Em pêssegos, o tratamento exógeno com AS foi capaz de manter os teores de SS encontrados no início de experimento (ZANG *et al.*, 2011). Resultados

também encontrados por MO *et al.* (2008) para frutos de maçã, onde observaram que pequenas doses do AS não apenas diminuem os teores de SS como também diminuem os teores de açúcares solúveis.

Por sua vez, a acidez titulável (AT) está diretamente relacionada com a concentração de ácidos orgânicos presentes nos frutos, sendo um importante parâmetro na determinação da qualidade dos mesmos. O tratamento com AS na forma erradicante manteve os valores de AT próximos àqueles encontrados no início dos experimentos nos frutos das 3 diferentes categorias, o que também se observou no tratamento dos frutos com cloro a 0,5%. Dessa forma, frutos tratados de forma erradicante com AS, além de terem diminuídas suas taxas metabólicas, não sofreram a ação dos ácidos orgânicos glucônico e cítrico, secretados por *P.expansum* durante o processo de colonização dos tecidos, mantendo os valores de AT abaixo daqueles observados em frutos de maçã colonizados pelo bolor azul (PRUSKY & LICHTER, 2008).

À luz do exposto, frutos tratados com AS na forma preventiva ou curativa e com água (pH acidificado ou não), por exibirem alta intensidade do bolor azul nas diferentes categorias, apresentaram valores de AT aproximadamente 25%, 40% e 43% maiores em frutos das categorias 1, 2 e 3, respectivamente, quando comparados àqueles observados para o AS aplicado de forma erradicante. Os resultados encontrados corroboram os de MO *et al.* (2008), onde a aplicação exógena de AS foi relacionada com a diminuição da AT dos frutos de maçã, indicando a preservação dos frutos por um período de tempo maior daqueles tratados com água destilada. Esse resultado também foi encontrado em tomates, onde o tratamento com AS promoveu a manutenção dos índices de AT dos frutos (WANG *et al.*, 2011).

Além dos seu potencial antifúngico, e de manter importantes características nos frutos como massa, AT, SS, firmeza de polpa, entre outras, o AS costumeiramente é relacionado à regulação dos mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos, por meio da indução de resistência (WEI *et al.*, 2011). Isso foi evidenciado a mais de 20 anos: aplicado exogenamente em folhas de fumo, o AS mimetizou os efeitos da inoculação do vírus do mosaico do tabaco, desencadeando reação de hipersensibilidade e aumento nas concentrações de proteínas relacionadas à patogênese nas folhas de fumo, mecanismos comumente associados à resistência das plantas contra os fitopatógenos (PIERPOINT, 1997).

As peroxidases (POX) são glicoproteínas associadas à membrana presentes em diversos tecidos, tanto de animais, plantas e microrganismos, sendo responsáveis por catalisar a oxi-redução entre o

peróxido de hidrogênio e compostos redutores (HIRAGA *et al.*, 2001), estando também envolvidas em diversos processos de deterioração dos materiais vegetais durante o armazenamento, sendo relacionadas aos processo de oxidação, ligações de polissacarídeos, cicatrizações de ferimentos, estresse fisiológico, oxidação de fenóis, entre outras (FREITAS *et al.*, 2008).

Os processos de oxidação estão relacionadas à taxa de respiração dos frutos e conseqüentemente aos níveis de  $O_2^-$  e de etileno, que podem atuar como substratos da peroxidase, onde, a partir da conversão do  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  pela enzima superóxido dismutase, o produto resultante é removido pela ação das POX (MO *et al.*, 2008). Neste trabalho, a constância da atividade enzimática das POX observadas ao longo do período experimental, para as 3 diferentes categorias dos frutos de maçã, pode estar relacionadas aos níveis muito próximas desses substratos no decorrer do experimento.

Além disso, uma vez que a última amostragem foi realizada 80 horas após o tratamento, o AS pode não ter elicidado, a tempo, essa enzima. YU & ZHENG (2006) ao tratarem frutos de maçã com AS a 10 mM, observaram uma atividade de POX constante até 72 horas após a aplicação dos tratamentos, com um aumento significativo apenas após 96 horas. MO *et al.* (2008) também observaram que, mesmo em baixas concentrações, o AS foi capaz de aumentar a atividade de POX apenas após 96 horas do tratamento. Em frutos de cereja, por outro lado, o tratamento com AS não foi capaz de induzir o aumento da atividade enzimática de POX, mesmo após 96 horas do tratamento (YAO & TIAN, 2005).

As polifenoloxidasas (PPO), por outro lado, agrupam um conjunto de enzimas responsáveis pela degradação oxidativa dos compostos fenólicos próximo ao local da descompartmentalização celular, sendo amplamente distribuídas em todas as espécies vegetais e encontradas também em bactérias, fungos e algas (CAMPOS *et al.*, 2004).

A atividade de PPO, no presente estudo, não apresentou diferença estatística entre as diferentes categorias de frutos de maçã. Por outro lado, em frutos de maçã da categoria 1 inoculados apenas com suspensão de esporos, após 20 horas, a atividade de PPO foi aumentada, possivelmente devido ao início do processo de infecção do fitopatógeno nos frutos, liberando as PPO ao meio. Zang *et al.* (2011) ao aplicarem AS em pêssegos, não observaram diferenças na atividade de PPO as 0, 24, 48, 96 e 144 horas após o tratamento.

As PPO encontram-se em sua maioria no estado inativo, sendo alojadas no interior celular e compartimentalizadas nos tilacóides dos cloroplastos, estando separadas dos compostos fenólicos que, por sua vez, estão compartimentalizados nos vacúolos ou extracelularmente em pequenas quantidades. À medida em que ocorrem rupturas celulares, decorrentes de ferimentos, ações de fitopatógenos ou mesmo senescência, as PPO são liberadas ao meio e iniciam o processo de oxidação dos compostos fenólicos em quinonas, possibilitando a formação de produtos mais tóxicos aos microrganismos do que o fenol original (LIU *et al.*, 2005; ALVARENGA *et al.*, 2011).

Estas observações corroboram com os resultados encontrados, em que os frutos de maçã da categoria 3 (em estágio menos avançado de amadurecimento), apresentaram os maiores valores equivalentes de atividades de PPO, ao passo que, frutos de maçã das categorias 1 e 2, possivelmente por estarem em estágio mais avançado de amadurecimento e, conseqüentemente, terem liberado ao meio a enzima, os valores equivalentes de atividades de PPO foram menores.

As glucanases (GLU), por sua vez, estão amplamente distribuídas entre as plantas superiores, sendo capazes de hidrolisar os polímeros de glucanas  $\beta$ -1,3, que, com a quitina, são os principais componentes de resistência da parede celular de fungos. Assim, conjuntamente, as quitinases e as  $\beta$ -1,3 glucanases representam hidrolases antifúngicas, atuando de forma sinérgica para a inibição do crescimento fúngico, liberando fragmentos glicosídicos do fitopatógeno e da parede celular para o meio, os quais podem se constituir em elicitores de defesas do hospedeiro (MARKOVICH & KONONOVA, 2003; BAUERMEISTER *et al.*, 2010).

As quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases atuam simultaneamente, onde uma pequena quantidade de  $\beta$ -1,3 glucanase é sintetizada e liberada para a lamela média celular e, a partir da penetração celular, os vacúolos são rompidos e grandes quantidades destas enzimas são liberadas, reprimindo a ação do fitopatógeno (MAUCH & STAEHELIN, 1989).

No presente estudo, frutos das categorias 1 e 2 submetidos aos diferentes tratamentos não apresentaram diferenças significativas ao longo do tempo amostral, ao passo que em frutos da categoria 3, observaram-se alterações significativas na atividade de glucanases 20 e 80 horas após a realização dos tratamentos, onde os valores da atividade enzimática nos frutos imersos em AS, contendo ou não esporos, e nos frutos apenas inoculados apresentaram-se aproximadamente 50% superiores aos da testemunha, ao passo que às 80 horas após os

tratamentos, frutos imersos apenas em AS apresentaram valores da atividade enzimática aproximadamente 50% inferiores aos demais tratamentos.

De modo semelhante ao observado no presente estudo para frutos de maçã de diferentes categorias, quando aplicado exogenamente em pós-colheita em frutos de cereja, o AS não foi capaz de aumentar a atividade de glucanases até 21 dias após o tratamento, independente da temperatura de armazenamento (YAO & TIAN, 2005).

Em outros patossistemas, utilizando-se o AS, pode-se observar um aumento na atividade de GLU. Cao *et al.* (2013), demonstraram que a aplicação exógena do AS em jujubas (*Ziziphus zizyphus*) aumenta a atividade de glucanases até 15 dias após o tratamento, auxiliando na proteção dos frutos contra *Alternaria alternata*. Isso também foi observado por Liu *et al.* (2012) ao realizarem o tratamento térmico de pêssegos por 10 minutos, o que resultou na diminuição de incidência e severidade da podridão parda (*Monilinia fructicola*).

Já os compostos fenólicos (CF) sintetizados pelas plantas apresentam efeitos protetores contra a exposição aos altos níveis de radiação solar, além de exercer ação protetora, antioxidante e antimicrobiana (antibiose) contra fungos e bactérias, e de serem importantes na estrutura celular, pigmentação e sinalização das respostas de defesa dos vegetais (SHETTY *et al.*, 2008). Os compostos fenólicos são rapidamente produzidos na defesa vegetal, acumulando-se logo após a infecção nos sítios de infecção. No entanto, estes compostos podem sofrer uma oxidação das PPO e POX, sendo transformados em substâncias com maior poder antimicrobiano (CAMPOS *et al.*, 2004).

Um estudo feito por Carbone *et al.* (2011) constatou que os frutos de maçã da cultivar Fuji são um dos que maior apresentam conteúdos de compostos fenólicos totais, chegando a um total aproximado de 140 µg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de matéria fresca, corroborando com os resultados apresentados para as três diferentes categorias.

No presente estudo, frutos de maçã da categoria 3 apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos totais, às 20 horas após o início do experimento, ao passo que frutos da categoria 1 apresentaram os menores valores no tempo indicado. Por outro lado, passado o período experimental, os teores encontrados nas categorias 1, 2 e 3 apresentaram-se semelhantes.

Isso pode estar relacionado ao fato de que, em frutos de maçã da categoria 3, as PPO permanecem alojadas em sua maioria no estado

inativo, sendo compartimentalizadas nos tilacóides dos cloroplastos e separadas dos compostos fenólicos que, por sua vez, estão compartimentalizados nos vacúolos ou extracelularmente em pequenas quantidades LIU *et al.*, 2005; ALVARENGA *et al.*, 2011).

Por sua vez, o AS quando aplicado exogenamente, contribuiu para diminuir os teores de compostos fenólicos totais (em EAG) ao final do período de armazenamento (288 horas) de aspargos (WEI *et al.*, 2011). Isso também foi observado por Yang *et al.* (2011) em frutos de pêssego onde, a partir da aplicação exógena de AS, ao final do tempo de armazenamento (144 horas), houve a diminuição nos teores de compostos fenólicos totais (em EAG).

O mesmo não foi observado no presente estudo, onde a partir da aplicação exógena do AS, os teores de compostos fenólicos totais foram mantidos praticamente constantes até 80 horas após a aplicação. Essas observações podem estar relacionadas, como já visto, com o fato de que, à medida em que há senescência dos frutos, as PPO são liberadas e iniciam o processo de oxidação dos compostos fenólicos em compostos mais tóxicos aos microrganismos, como as quinonas.

As concentrações de AS encontrados nos frutos de maçã das diferentes categorias da cv Fuji poderiam ser correlacionadas à aplicação exógena do mesmo. No entanto, à exceção dos frutos de maçã da categoria 3, que apresentaram as maiores concentrações nos diferentes tempos, frutos da categoria 2 não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, ao passo que em frutos da categoria 1, quando observadas, as concentrações superiores foram relativas aos frutos inoculados com esporos do fitopatógeno.

Venema *et al.* (1996) observaram por HPLC que a concentração interna de AS em frutos de maçã, além de variarem entre as diferentes espécies vegetais e cultivares, são próximas a 2 µg por grama de massa fresca, corroborando com os resultados encontrados. Além disso, mesmo que houvesse traços de AS exógeno presentes nos frutos, os mesmos causariam efeitos benéficos à saúde humana, tais como a redução dos riscos de câncer, de doenças inflamatórias, entre outras (PATERSON & LAWRENCE, 2001; SCOTTER *et al.*, 2007).

Estudos realizados por Carbone *et al.* (2011), com frutos de maçã cv. Fuji demonstraram que o ácido clorogênico e a epicatequina são os compostos fenólicos mais abundantes nos frutos, além de exercerem benefícios diretos ao organismo quando ingeridos, resultando na diminuição do colesterol e de prevenirem contra o aparecimento de tumores e câncer (BOYER & LIU, 2004). Esses resultados foram

corroborados por Abbas *et al.* (2014) que, ao analisarem frutos de maçã, encontraram concentrações de ácido clorogênico de 3,27 µg em EAG por g de massa fresca e de 5,76 µg de epicatequina em EAG por g de massa fresca. Tomados conjuntamente, tais resultados corroboram com os resultados encontrados no presente estudo.

Os flavonóides, por sua vez, representam o grupo mais comum e de maior abrangência de compostos fenólicos presentes em frutos, sendo formados basicamente por dois anéis aromáticos ligados por 3 carbonos (PALIYATH *et al.*, 2008). Esses compostos têm demonstrado a capacidade de controlar doenças em diversas plantas, tanto por atividade antimicrobiana direta, como inibindo a síntese de celulases e pectinases em fitopatógenos (SKADHAUGE *et al.*, 1997).

Segundo Schwan-Estrada *et al.* (2008), o teor de flavonóides totais está fortemente relacionado às atividades de enzimas de oxidação de substratos orgânicos, uma vez que essas atuam na polimerização dos fenilpropanóides, responsáveis pela síntese dos compostos dessa natureza. Dessa forma, como sugerem os resultados do presente estudo, uma vez que não foram observados aumentos na atividade das enzimas POX e PPO nos frutos de maçã das diferentes categorias, mesmo quando submetidos ao AS ou a suspensão de esporos, os teores de flavonóides permaneceram constantes ao longo do período experimental.

Com esses resultados, pode-se afirmar que o AS não foi capaz de induzir resistência nos frutos de maçã cv. Fuji das categorias 1, 2 e 3 contra o bolor azul, já que não foram observadas elevações significativas nas atividades de enzimas envolvidas na defesa dos frutos, ou nos teores de compostos fenólicos e flavonóides. Por outro lado, foi observado e comprovado que o principal efeito do AS contra o fitopatógeno está relacionado ao potencial antifúngico da sua molécula, em pequenas doses e pH padrão.

Nesta pesquisa, observou-se que os frutos tratados com AS apresentaram suas características físico-químicas praticamente inalteradas após o período experimental sob temperaturas desfavoráveis à preservação, proporcionando possivelmente um aumento no tempo de prateleira e armazenamento dos frutos de maçã das 3 categorias, a partir da total ou parcial inativação da biossíntese de etileno dos frutos, uma das vantagens frente ao tratamento convencional.

Diante do exposto e considerando-se os resultados obtidos conjuntamente às informações levantadas em literatura, acredita-se que o AS pode representar uma forma alternativa de controle do bolor azul

em frutos de maçã das diferentes categorias, por apresentar um forte poder erradicante à uma baixa concentração, viabilizando sua utilização comercial na água de lavagem dos frutos em substituição à forma convencional feita atualmente com cloro ativo ou fungicidas, causando menores impactos ao meio ambiente e ao ser humano frente à relativa baixa concentração residual observada. Além disso, por inativar total ou parcialmente a biossíntese de etileno nos frutos, o AS não só garantiria a qualidade fitossanitária dos frutos de maçã como preservaria algumas das importantes características físico-químicas, aumentando o tempo de conservação dos frutos às temperaturas de armazenamento ou comercialização.



#### 4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados deste estudo é possível concluir que:

- i. O ácido salicílico (AS) apresenta alta atividade antimicrobiana sobre o bolor azul causado por *Penicillium expansum*, a qual depende do pH e da concentração da solução e está relacionada aos danos causados na membrana plasmática do fitopatógeno;
- ii. O controle do bolor azul após a imersão dos frutos de maçã ocorre pela ação direta do AS sobre o fungo (efeito erradicante), após um tempo de contato mínimo de 30 minutos com os esporos;
- iii. O AS aplicado exógenamente não foi capaz de ativar os mecanismos de defesa nos frutos de maçã cv. Fuji de diferentes categorias;
- iv. Além da ação antifúngica, a manutenção das características físico-químicas de massa, sólidos solúveis e acidez titulável dos frutos de maçã, conferidas pela aplicação do AS, contribuem para o aumento do tempo de prateleira dos frutos.



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, S. R.; SABIR, S. M.; AHMAD, S. D.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L. Phenolic profile, antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Food Chemistry**, v. (147), p. 10 – 16, 2014.
- ABASSI, N. A.; HAFEEZ, S.; TAREEN, M. J. Salicylic acid prolongs shelf life and improves quality of ‘Maria Delicia’ peach fruit. **Acta Horticulturae**, v. (880), p. 191 – 197, 2010.
- AMIRI, A.; CHOLODOWSKI, D.; BOMPEIX, G. Adhesion and germination of waterborne and airborne conidia of *Penicillium expansum* to apple and inert surfaces. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. (67), p. 40 – 48, 2005.
- AHMADI-AFZADI, M.; TAHIR, I.; NYBOM, H. Impact of harvesting time and fruit firmness on the tolerance to fungal storage diseases in an apple germplasm collection. **Postharvest Biology and Technology**, v. (82), p. 51 – 58, 2013.
- ALAVIFARD, F.; ETEBARIAN, H. R.; SAHEBANI, N.; AMINIAN, H. Induction of resistance in apple fruit inoculated with antagonistic *Candida membranifaciens* isolates and *Botrytis mali*. **Journal of Crop Protection**, v. (1), p. 249 – 259, 2012.
- ALI, S.; MASUD, T.; ABBASI, K. S.; MAHMOOD, T.; ALI, A. Effect of different concentrations of salicylic acid on keeping quality of *Apricot cv. Habi* at ambient storage. **Journal of Biological and Food Science Research**, v. (2), p. 69 – 78, 2013.
- ALMEIDA, A. A. P. **Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café: avaliação *in vitro* e em modelo alimentar**. 2007. 137 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil.
- ALVARENGA, T. C.; NETO, H. F. S.; OGASSAVARA, F. O.; ARANTES, F. C.; MARQUES, M. O.; FRIGIERI, M. C. Polifenoloxidase: uma enzima intrigante. **Ciência e Tecnologia**, v. (3), p. 83 – 93, 2011.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos**. 2.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 416 p.

ASGHARI, M.; AGHDAM, M. S. Impact of salicylic acid on post-harvest physiology of horticultural crops. **Food Science & Technology**, v. (21), p. 502 – 509, 2010.

BAERT, K.; DEVLIEGHERE, F.; FLYPS, H.; OOSTERLINCK, M.; AHMED, M. M.; RAJKOVIC, A.; VERLINDEN, B.; NICOLAI, B.; DEBEVERE, J.; DE MEULENAER, B. Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. (119), p. 170 – 181, 2007.

BALKAN, B.; ERTAN, F. Production and properties of  $\alpha$ -amylase from *Penicillium chrysogenum* and its application in starch hydrolysis. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. (35), p. 169 – 178, 2005.

BARAD, S.; HOROWITZ, S. B.; KOBILER, I.; SHERMAN, A.; PRUSKY, D. Accumulation of the mycotoxin patulin in the presence of gluconic acid contributes to pathogenicity of *Penicillium expansum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. (27), p. 66 – 77, 2014.

BARREIRA, M. J.; ALVITO, P. C.; ALMEIDA, C. M. M. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. **Food Chemistry**, v. (121), p. 653 – 658, 2010.

BAUERMEISTER, A.; REZENDE, M. I.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.  $\beta$ -1,3 Glucanases fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. (31), p. 75 – 86, 2010.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. (12), p. 123 – 130, 1999.

BLEICHER, J. História da Macieira. In: EPAGRI. **A Cultura da Macieira**. Florianópolis, 2002.

BONALDO, S.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005.

BOYER, J.; LIU, R. H. Apple phytochemicals and their health benefits. **Nutrition Journal**, v. (3), p. 1 – 15, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. (72), p. 248 – 254, 1976.

CALVO, J.; CALVENTE, V.; ORELLANO, M. E.; BENUZZI, D.; TOSETTI, M. I. S. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rhizobium aquatilis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. (113), p. 251 – 257, 2007.

CAMILO, A. P.; DENARDI, F. Cultivares: descrição e comportamento no sul do Brasil. In: EPAGRI. **A Cultura da Macieira**. Florianópolis, 2002.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente. 279 p. 2003.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidases e polifenoloxidasas na resistência do feijão a antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. (39), p. 637 – 643, 2004.

CAMPOS, A. D.; HAMPE, M. M. V.; FERREIRA, A. G.; ANTUNES, I. F.; CASTRO, L. A. S. Indução de resistência sistêmica à antracnose em feijoeiro-comum pela raça delta avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. (44), p. 15 – 21, 2009.

CAO, J.; YAN, J.; ZHAO, Y.; JIANG, W. Effects of postharvest salicylic acid dipping on *Alternaria* rot and disease resistance of jujube

fruit during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. (93), p. 3252 – 3258, 2013.

CARBONE, K.; GIANNINI, B.; PICCHI, V.; LO SCALZO, R.; CECCHINI, F. Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. **Food Chemistry**, v. (127), p. 493 – 500, 2011.

CASTRO, O. L.; BACH, E. E. Increased production of  $\beta$ -1,3 glucanase and protein in *Bipolaris sorokiniana* pathosystem treated using commercial xanthan gum. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. (42), p. 165 – 169, 2004.

CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ. 263 p. 2005.

CEPA – INSTITUTO DE PLANEJAMENTO E ECONOMIA AGRÍCOLA DE SANTA CATARINA. **Situação da safra de maçã 2013**. Disponível em: <<http://cepa.epagri.sc.gov.br/>>. Acesso em: 21 de Dezembro de 2013.

CERIONI, L.; VOLENTINI, S. I.; PRADO, F. E.; RAPISARDA, V. A.; RODRIGUEZ-MONTELONGO, L. Cellular damage induced by a sequential oxidative treatment on *Penicillium digitatum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. (109), 1441 – 1449, 2010.

CHEN, A.; ZENG, G.; CHEN, G.; LIU, L.; SHANG, C.; HU, X.; LU, L.; CHEN, M.; ZHOU, Y.; ZHANG, Q. Plasma membrane behavior, oxidative damage, and defense mechanism in *Phanerochaete chrysosporium* under cadmium stress. **Process Biochemistry**, 2014 (*in press*).

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de Frutas e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio**. Lavras: UFLA. 783 p. 2005.

CID, A.; MORALES, J.; MEJUTO, J. C.; BRIZ-CID, N.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GANDARA, J. Thermodynamics of sodium dodecyl sulphate-salicylic acid based micellar systems and their

potential use in fruits postharvest. **Food Chemistry**, v. (151), p. 358 – 363, 2014.

CIDASC – COMPANIA INTEGRADA DE DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO DE SANTA CATARINA. **Instrução normativa 05**. Disponível em: <  
<http://www.cidasc.sc.gov.br/classificacao/files/2012/08/Instru%C3%A7%C3%A3o-Normativa-05-Ma%C3%A7%C3%A3-I.pdf>>. Acesso em: 01 de Fevereiro de 2014.

CIPOLLINI, D. F.; PURRINGTON, C. B.; BERGELSON, J. Cost of induced responses in plants. **Basic and Applied Ecology**, v. (4), p. 79 – 85, 2003.

CLUZET, S.; TORREGROSA, C.; JACQUET, C.; LAFITTE, C.; FOURNIER, J.; MERCIER, Z. Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. **Plant Cell and Environment**, v. (27), p. 917 – 928, 2004.

COLPAS, F. T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; FERRARESE, M. L.; SCAPIM, C. A.; BONALDO, S. M. Induction of plant defense responses by *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) leaf extracts. **Summa Phytopathologica**, v. (35), p. 191 – 195, 2009.

CONSTABEL, C. P.; BERGEY, D. R.; RYAN, C. A. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. (92), p. 407 – 411, 1995.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. (26), p. 343 – 356, 2005.

DANIELS, J. A.; KRISHNAMURTHI, R.; RIZVI, S. H. A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. **Journal of Food Protection**, v. (48), p. 532 – 537, 1985.

DERCKEL, J. P.; AUDRAN, J. C.; HAYE, B.; LAMBERT, B.; LEGENDRE, L. Characterization, induction by wounding and salicylic

acid, and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and glucanase of ripening. **Physiologia Plantarum**, v. (104), p. 56 – 64, 1998.

DONG, L.; ZHOU, H. W.; SONEGO, L.; LERS, A.; LURIE, S. Ripening of Red Rosa plums: effect of ethylene and 1-methycyclopropene. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. (28), p. 1039 – 1045, 2001.

DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; MACARISIN, D.; WILSON, C. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and Technology**, v. (52), p. 137 – 145, 2009.

DUANGMAN, K; APENTEN, R. K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, v. (64), p. 351 – 359, 1999.

EL-MOHAMEDY, R. S. R.; ABDEL-KADER, M. M.; ABD-EL-KAREEM, F.; EL-MOUGY, N. S. Essential oils, inorganic acids and potassium salts as control measures against the growth of tomato root rot pathogens *in vitro*. **Journal of Agricultural Technology**, v. (9), p. 1507 – 1520, 2013.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Maçã – Quantidade Produzida: Total e dos principais países (traduzido) 2011**. Disponível em: <[www.fao.org](http://www.fao.org)> Acesso em: 17 de Dezembro de 2013.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. (18), p. 23 – 36, 2006.

FILONOW, A. B. Wound type in apple fruits affects wound resistance to decay-causing fungi. **Journal of Plant Pathology**, v. (87), p. 233 – 238, 2005.

FRAVEL, D. R. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. (26), p. 75 – 91, 1988.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-born terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. (49), p. 1 – 174, 2004.

FREITAS, A. A.; FRANCELIN, M. F.; HIRATA, G. F.; CLEMENTE, E.; SCHMIDT, F. L. Atividades das enzimas peroxidases (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geléias. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. (28), p. 172 – 177, 2008.

GARCIA, D.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARIN, S. Intraspecific variability of growth and patulin production of 79 *Penicillium expansum* isolates at two temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. (151), p. 195 – 200, 2011.

GUAN, J.; KERKENAR, A.; WAARD, M. A. Effects of imazalil on sterol composition of sensitive and DMI-resistance isolates of *Penicillium italicum*. **Journal of Plant Pathology**, v. (95), p. 73 – 86, 1989.

HADAS, Y.; GOLDBERG, I.; PINES, O.; PRUSKY, D. Involvement of gluconic acid and glucose oxidase in the pathogenicity of *Penicillium expansum* in apples. **Phytopathology**, v. (97), p. 384 – 390, 2007.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E. M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. (20), p. 73 – 82, 1982.

HAN, T.; LI, L. P. Physiological effect of salicylic acid on storage of apple in short period. **Plant Physiology Communications**, v. (33), p. 347 – 348, 1997.

HAYAT, Q.; HAYAT, S.; IRFAN, M.; AHMAD, A. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. **Environmental and Experimental Botany**, v. (68), p. 14 – 25, 2010.

HEIL, M.; BOSTOCK, R. M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defenses. **Annals of Botany**, v. (89), p. 503 – 512, 2002.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v. (42), p. 462 – 468, 2001.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Banco de dados agregados: situação da cadeia produtiva de maçã no Brasil**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em: 16 de Dezembro de 2013.

IQBAL, Z. **Innovative approaches to control postharvest diseases in fruits**. 2010. 64 p. Post Doctoral Research Report. Department of Environment and Agriculture. Curtin University of Technology, WA, Australia.

JANISIEWICZ, W. J. Ecological diversity, niche overlap, and co-existence of antagonist used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apples. **Phytopathology**, v. (86), p. 473 – 479, 1996.

JANISIEWICZ, W. J. Blue mold – fruit disease focus. **Tree fruit research and education center**. Davis College of Agriculture, Natural Resources and Design. 1999. Disponível em: <[http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/disease\\_month/bluemold0199.html](http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/disease_month/bluemold0199.html)>. Acesso em: 11 de Dezembro de 2013.

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

KADER, A. A. **Postharvest Technology of Horticultural Crops**. California: PUBL, 1992. 296 p.

KARABULUT, O. A.; COHEN, L.; WIESS, B.; DAUS, A.; LURIE, S.; DROBY, S. Control of brown rot and blue mold of peach and nectarine

by short hot water brushing and yeast antagonists. **Postharvest Biology and Technology**, v. (24), p. 103 – 111, 2002.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: CERES, 1997. 706 P.

KOZLOVSKII, A. G.; ZHELIFONOVA, V. P.; ANTIPOVA, T. V. Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. (49), p. 5 – 16, 2013.

KAZEMI, M.; ARAN, M.; ZAMANI, S. Effect of salicylic acid treatments on quality characteristics of apple fruits during storage. **American Journal of Plant Physiology**, v. (6), p. 113 – 119, 2011.

LI, B.; LAI, T.; QIN, G.; TIAN, S. Ambient pH stress inhibits spore germination of *Penicillium expansum* by impairing protein synthesis and folding: A proteomic-based study. **Journal of Proteome Research**, v. (9), p. 298 – 307, 2010.

LIU, H.; JIANG, W.; BI, Y.; LUO, Y. Postharvest BHT treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, v. (35), p. 263 – 269, 2005.

LIU, J.; TIAN, S. P.; MENG, X. H.; XU, Y. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. (44), p. 300 – 306, 2007.

LIU, J.; ZONG, Y.; QIN, G.; LI, B.; TIAN, S. Plasma membrane damage contributes to antifungal activity of silicon against *Penicillium digitatum*. **Current Microbiology**, v. (61), p. 274 – 279, 2010.

LIU, J.; SUI, Y.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; TIAN, S.; NORELLI, J.; HERSHKOVITZ, V. Effect of heat treatment on inhibition of *Monilinia fructicola* and induction of disease resistance in peach fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. (65), p. 61 – 68, 2012.

LUCHI, V. L. Botânica e fisiologia. In: EPAGRI. **A Cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002.

MANDAL, S.; MALLICK, N.; MITRA, A. Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. (47), p. 642 – 649, 2009.

MANSO, S.; CACHO-NERIN, F.; BECERRIL, R.; NERIN, C. Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. **Food Control**, v. (30), p. 370 – 378, 2013.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Agrofit**. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 15 de Dezembro de 2013.

MARTINS, C. R.; FARIA, J. C.; HOFFMAN, A.; ROMBALDI, C. V.; SCHENATO, P. G.; Fisiopatias e fitopatias em pós-colheita de maçãs produzidas em diferentes sistemas de produção nas safras de 2002 e 2003. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. (2), p. 1438 – 1441, 2007.

MARKOVICH, N. A.; KONONOVA, G. L. Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal disease: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. (39), p. 341 – 351, 2003.

MAUCH, F.; STAEHELIN, L. A. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and  $\beta$ -1,3 glucanase in bean leaves. **Plant Cell**, v. (1), p. 447 – 457, 1989.

MAXIN, P.; WEBER, R. W. S.; PEDERSEN, H. L.; WILLIAMS, M. Control of a wide range of storage rots in naturally infected apples by hot-water dipping and rinsing. **Postharvest Biology and Technology**, v. (70), p. 25 – 31, 2012.

MAYER, G. Antibiotics: protein synthesis, nucleic acids synthesis and metabolism. In: **Bacteriology**. South Carolina: Board of Trustees, 2011.

METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: Current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, v. (107), p. 13 – 18, 2001.

MEYER, S. T. O uso do cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v. (10), p. 99 – 110, 1994.

MO, Y.; GONG, D.; LIANG, G.; HAN, R.; XIE, J.; LI, W. Enhanced preservation effects of sugar apple fruits by salicylic acid treatment during post-harvest storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. (88), p. 2693 – 2699, 2008.

MONDINO, P.; DI MASI, S.; FALCONI, C.; MONTEALEGRE, J.; HENRIQUE, J. L.; NUNES, C.; SALAZAR, M.; STADNIK, M. J.; VERO, S.; USALL, J. **Manual de identificação de doenças da maçã em pós-colheita**. Montevideo: CYTED, 2009. 67p.

MORAES, W. B. C. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. (27), p. 175 – 190, 1992.

MORALES, H.; MARIN, S.; OBEA, L.; PATINO, B.; DOMENECH, M.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Ecophysiological characterization of *Penicillium expansum* population in Lleida (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. (122), p. 243 – 252, 2010.

NORMAN, C.; HOWELL, K. A.; MILLAR, A. H.; WHELAN, J. M.; DAY, D. A. Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. **Plant Physiology**, v. (134), p. 492 – 501, 2004.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Patterns and determinants of fruit and vegetable consumption in sub-Saharan Africa: a multicontry comparison, 2005**. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 10 de Dezembro de 2013.

PALMER, C. L.; HORST, R. K.; LANGHANS, R. W. Use of bicarbonates to inhibit *in vitro* colony growth of *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v. (81), p. 1432 – 1438, 1997.

PALIYATH, G.; MURR, D. P.; HANDA, A. K.; LURIE, S. **Postharvest biology and technology of fruits, vegetables and flowers.** IOWA, 2008. 497 p.

PANAHIRAD, S.; NAHANDI, F. Z.; SAFARALIZADEH, R.; ALIZADEH-SALTEH, S. Postharvest control of *Rhizopus stolonifer* in peach (*Prunus persica* L. Batsch) fruits using salicylic acid. **Journal of Food Safety**, v. (32), p. 502 – 507, 2012.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de resistência. In: **Manual de fitopatologia. Princípios e conceitos**, 1995.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Host-parasite interaction; Nonspecific Host Interaction. **Microbiology concepts and applications**, NEW YORK: Mc-Graw-Hill, 1999. 479 p.

PETRI, J. L.; PALLADINI, L. A. POLA, A. C. Dormência e indução de brotação da macieira. In: EPAGRI. **A cultura da macieira.** Florianópolis: EPAGRI, 2002.

PETRI, J. L.; LEITE, G. B.; CESA, J. D. Padronização e classificação da maçã. In: EPAGRI. **A cultura da macieira.** Florianópolis: EPAGRI, 2002.

PIERPOINT, W. S. The natural history of salicylic acid: Plant production and mammalian medicine. **Interdisciplinary Science Reviews**, v. (22), p. 45 – 52, 1997.

POULSEN, M. E.; NAEF, A.; GASSER, S.; CHRISTEN, D.; RASMUSSEN, P. H. Influences of different disease control pesticide strategies on multiple pesticide residue levels in apple. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. (84), p. 58 – 61, 2009.

POPOVA, L.; PANCHEVA, T.; UZUNOVA, A. Salicylic acid: Properties, biosynthesis and physiological role. **Journal of Plant Physiology**, v. (23), p. 85 – 93, 1997.

PRUSKY, D.; YAKOBY, N. Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH?. **Molecular Plant Pathology**, v. (6), p. 509 – 516, 2003.

PRUSKY, D.; McEVOY, J. L.; SAFTNER, R.; CONWAY, W. S.; JONES, R. Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium spp.* on apple and citrus fruits. **Phytopathology**, v. (94), p. 44 – 51, 2004.

PRUSKY, D.; KOBILER, I.; AKERMAN, M.; MIYARA, I. Effect of acidic solutions and acidic prochloraz on the control of postharvest decay caused by *Alternaria alternata* in mango and persimmon fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. (42), p. 134 – 141, 2006.

QUAGLIA, M.; EDERLI, L.; PASQUALINI, S.; ZAZZERINI, A. Biological control agents and chemical inducers of resistance for postharvest control of *Penicillium expansum* Link. on apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. (59), p. 307 – 315, 2011.

QIN, G. Z.; TIAN, S. P.; XU, Y.; WAN, Y. K. Enhancement of biocontrol efficacy of antagonistic yeasts by salicylic acid in sweet cherry fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. (62), p. 147 – 154, 2003.

RESENDE, M. L. V. & MACHADO, J. C. **Manejo de Doenças em Pós-Colheita de Produtos Vegetais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 182p.

da ROCHA, M. E. B.; FREIRE, F. C. O.; MAIAC, F. E. F.; GUEDES, M. I. F.; RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. (36), p. 159 – 165, 2014.

RUIZ-GARCIA, Y.; GOMEZ-PLAZA, E. Elicitors: A tool for improving fruit phenolic content. **Agriculture**, v. (3), p. 33 – 52, 2013.

SANHUEZA, R. M. V.; CATTANIO, M. E. Controle biológico de *Penicillium expansum* em pós-colheita de maçãs ‘Fuji’. **Summa Phytopathologica**, v. (29), p. 306 – 313, 2003.

SANT’ANNA, A. S.; ROSENTHAL, A.; MASSAGUER, P. R. The fate of patulin in apple juice processing: A review. **Food Research International**, v. (41), p. 411 – 453, 2008.

SANZANI, S. M.; GIROLAMO, A.; SCHENA, L.; SOLFRIZZO, M.; IPPOLITO, A.; VISCONTI, A. Control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on apples by quercetin and umbelliferone. **European Food Research and Technology**, v. (228), p. 381 – 389, 2009.

SANZANI, S. M.; SCHENA, L.; GIROLAMO, A.; IPPOLITO, A.; GONZALEZ-CANDELA, L. Characterization of genes associated with induced resistance against *Penicillium expansum* in apple fruit treated with quercetin. **Postharvest Biology and Technology**, v. (56), p. 1 – 11, 2010.

SCHMIDT, E. C.; ROVER, T.; SCARIOT, L.; BOUZON, Z. L. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycys alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. **Micron**, v. (40), p. 860 – 869, 2009

SCHMIDT, E. C.; PEREIRA, B.; SANTOS, R. W.; GOUVEIA, C.; COSTA, G. B.; FARIA, G. S. M.; SCHERNER, F.; HORTA, P. A.; MARTINS, R. P.; LATINI, A.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. L. Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after *in vitro* exposure to UV-B. **Aquatic Botany**, v. (100), p. 8 – 17, 2012.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: **Interação planta patógeno: Fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008.

SCOTTER, M. J.; ROBERTS, D. P. T.; WILSON, L. A.; HOWARD, F. A. C.; DAVIS, J.; MANSELL, N. Free salicylic acid and acetyl salicylic acid content of foods using gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. (105), p. 273 – 279, 2007.

SHABANA, Y. M.; ABDEL-FATTAH, G. M.; ISMAIL, A. E.; RASHAD, Y. M. Control of brown spot pathogen of rice (*Bipolaris oryzae*) using some phenolic antioxidants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. (39), p. 438 – 444, 2008.

SHAFIEE, M.; TAGHAVI, T. S.; BABALAR, M. Addition of salicylic acid to nutrient solution combined with postharvest treatments (hot

water, salicylic acid, and calcium dipping) improved postharvest fruit quality of strawberry. **Scientia Horticulturae**, v. (124), p. 40 – 45, 2010.

SHALMASHI, A.; ELIASSI, A. Solubility of salicylic acid in water, ethanol, carbon tetrachloride, ethyl acetate, and xylene. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. (53), p. 199 – 200, 2008.

SHETTY, N. P.; LYNGS, H. J. J.; JENSEN, J. D.; COLLINGE, D. B.; SHETTY, S. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v. (121), p. 267 – 280, 2008.

SILVA, M. V.; ROSA, C. I. L. F.; VILAS-BOAS, E. V. B. Conceitos e métodos de controle do escurecimento enzimático no processamento mínimo de frutas e hortaliças. **Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. (27), p. 83 – 96, 2009.

SKADHAUGE, B.; THOMSEN, K.; VON WETTSTEIN, D. The role of barley testa layer and its flavonoids content in resistance to *Fusarium* infections. **Hereditas**, v. (126), p. 147 – 160, 1997.

SMILANICK, J. L.; MANSOUR, M. F.; MARGOSAN, D. A.; GABLER, F. M. Influence of pH and NaHCO<sub>3</sub> on effectiveness of imazalil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control postharvest green mold on citrus fruit. **Plant Disease**, v. (89), p. 640 – 648, 2005.

SMITH, C. J. Accumulation of phytoalexins: Defense mechanisms and stimulus response system. **New Phytologist**, v. (132), p. 1 – 45, 1996.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica**, v. (1), p. 9, 2007.

SPADARO, D.; VOLA, R.; PIANO, S.; GULLINO, M. L. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. (24), p. 123 – 134, 2002.

STADNIK, M. J. **Manejo integrado de doenças da macieira**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2009. 229 P.

STANGARLIN, J. R.; CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, F. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 719 p.

TAREEN, M. J.; ABBASI, N. A.; HAFIZ, I. A. Postharvest application of salicylic acid enhanced antioxidant enzyme activity and maintained quality of peach cv. 'Flordaking' fruit during storage. **Scientia Horticulturae**, v. (142), p. 221 – 228, 2012.

TIAN, S.; QIN, G.; LI, B.; WANG, Q.; MENG, X. Effects of salicylic acid on disease resistance and postharvest decay control of fruits. **Stewart Postharvest Review**, v. (6), p. 1 – 7, 2007.

TEFERA, A.; SEYOUM, T.; WOLDETSADIK, K. Effect of disinfection, packaging, and storage environment on the shelf life of mango. **Biosystems Engineering**, v. (96), p. 201 – 212, 2007.

TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: A brief review. **Postharvest Biology and Technology**, v. (32), p. 1 – 13, 2004.

VALERO, D.; DIAZ-MULA, H. M.; ZAPATA, P. J.; CASTILLO, S.; GUILLEN, F.; MARTINEZ-ROMERO, D.; SERRANO, M. Postharvest treatments with salicylic acid, acetylsalicylic acid or oxalic acid delayed ripening and enhanced bioactive compounds and antioxidant capacity in sweet cherry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. (59), p. 5483 – 5489, 2011.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. (55), p. 85 – 97, 1999.

VIEIRA, D. R.; VALLE, R. R. Indução de resistência sistêmica para o controle da vassoura-de-bruxa *Crinipellis pernicioso* em cacauzeiros (*Theobroma cacao*) dos clones ICS 1 e CCN 51. **15<sup>a</sup> Conferência Internacional de Pesquisas em Cacao**. Costa Rica, 2006.

VENEMA, D. P.; HOLLMAN, P. C. H.; JANSSEN, K. P. L. T. M.; KATAN, M. B. Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in foods, using HPLC with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. (44), p. 1762 – 1767, 1996.

WANG, Y. Y.; LI, B. Q.; QIN, G. Z.; TIAN, S. P. Defense response of tomato fruit at different maturity stages to salicylic acid and ethephon. **Scientia Horticulturae**, v. (129), p. 183 – 188, 2011.

WANG, L.; WU, H.; QIN, G.; MENG, X. Chitosan disrupts *Penicillium expansum* and control postharvest blue mold of jujube fruit. **Food Control**, v. (41), p. 56 – 62, 2014.

WEBER, R. W. S.; PALM, G. Resistance of storage rot fungi *Neofabraea perennans*, *N. alba*, *Glomerella acutata* and *Neonectria galligena* against thiophanate-methyl in Northern German apple production. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. (117), p. 185 – 191, 2010.

WEI, Y.; LIU, Z.; SU, Y.; LIU, D.; YE, X. Effect of salicylic acid treatment on postharvest quality, antioxidant activities, and free polyamines of asparagus. **Journal of Food Science**, v. (76), p. 126 – 132, 2011.

WELKE, J. E.; HOELTZI, M.; DOTTORI, H. A.; NOLLI, I. B. Ocorrência, aspectos toxicológicos, métodos analíticos e controle da patulina em alimentos. **Ciência Rural**, v. (39), p. 300 – 308, 2009.

WHITE, E. G. **Patriarcas e Profetas**. 784 p.

XU, X.; TIAN, S. Salicylic acid alleviated pathogen-induced oxidative stress in harvested sweet cherry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. (49), p. 379 – 385, 2008.

YANG, Z.; CAO, S.; CAI, Y.; ZHANG, Y. Combination of salicylic acid and ultrasound to control postharvest blue mold caused by *Penicillium expansum* in peach fruit. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. (12), p. 310 – 314, 2011.

YAO, H.; TIAN, S. Effects of pre and postharvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. (35), p. 253 – 262, 2005.

YU, T.; ZHENG, X. D. Salicylic acid enhances biocontrol efficacy of the antagonist *Cryptococcus laurentii* in apple fruit. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. (25), p. 166 – 174, 2006.

YU, T.; ZHENG, X. D. An integrated strategy to control postharvest blue and grey mold rots of apple fruit by combining biocontrol yeast and gibberellic acid. **International Journal of Food Science and Technology**, v. (42), p. 977 – 984, 2007.

ZHANG, H. Y.; WANG, L.; DONG, Y.; JIANG, S.; ZHANG, H. H.; ZHENG, X. D. Control of postharvest pear diseases using *Rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality parameters. **International Journal of Food Microbiology**, v. (126), p. 167 – 171, 2008.

ZHANG, H.; MA, L.; WANG, L.; JIANG, S.; DONG, Y.; ZHENG, X. Biocontrol of gray mold decay in peach fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid and their effects on postharvest quality parameters. **Biological Control**, v. (47), p. 60 – 65, 2008.

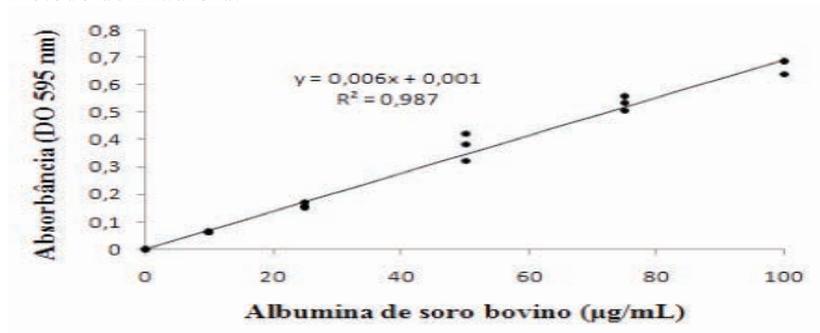
ZHANG, C.; WANG, J.; ZHANG, J.; HOU, C.; WANG, G. Effects of  $\beta$ -aminobutyric acid on control of postharvest blue mold of apple fruit and its possible mechanisms of action. **Postharvest Biology and Technology**, v. (61), p. 145 – 151, 2011.

ZHENG, Y.; ZHANG, Q. Effects of polyamines and salicylic acid postharvest storage of *Ponkan mandarin*. **Acta Horticulturae**, v. (632), p. 317 – 320, 2004.

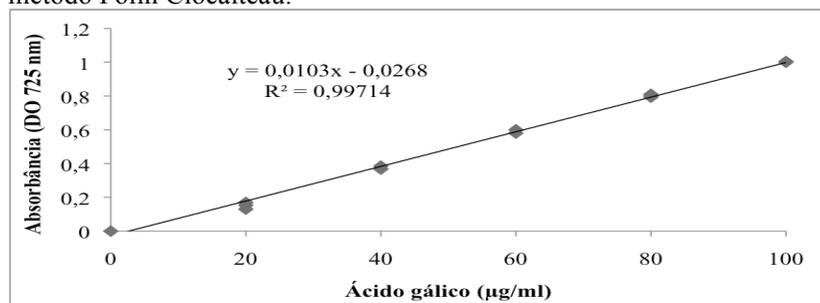
ZHOU, Y.; WANG, G.; LI, Y.; LIU, Y.; SONG, Y.; ZHENG, W.; ZHANG, N.; HU, X.; YAN, S.; JIA, J. *In vitro* interactions between aspirin and amphotericin B against planktonic cell and biofilm cell of *C. albicans* and *C. parapsilosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. (56), p. 3250 – 60, 2012.

## ANEXO

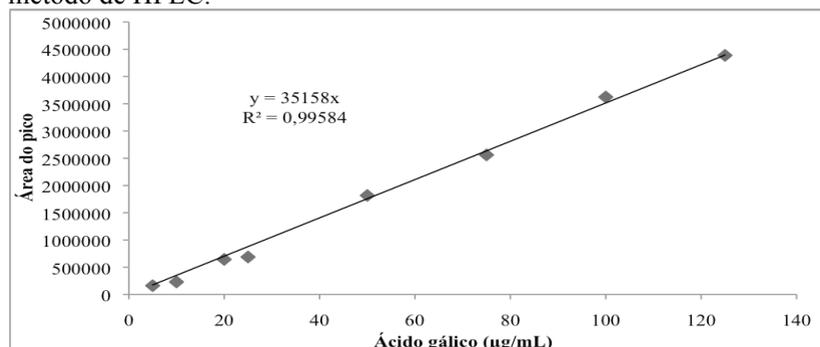
**Anexo 1** – Curva padrão para dosagem de proteínas totais através do método de Bradford.



**Anexo 2** – Curva padrão para dosagem de compostos fenólicos pelo método Folin Ciocalteu.



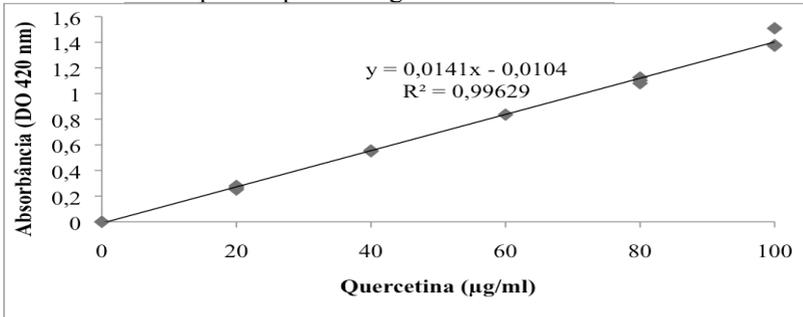
**Anexo 3** – Curva padrão para dosagem de compostos fenólicos pelo método de HPLC.



????

?

### Anexo 4 – Curva padrão para dosagem de flavonóides.



### Anexo 5 – Análise de variância da porcentagem de germinação de esporos de *P. expansum* em água destilada e em diferentes concentrações de suco de maçã.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tempo	3	24312,301190	8104,100397	1190,346	0,0000
Tempo * Tempo	6	183742,321429	30623,721905	42580,306	0,0000
erro	30	39303,107363	1310,104458	625,986	0,0000
Total corrigido	39	235886,279782			
CV (%) =		7,22			

### Anexo 6 – Análise de variância da porcentagem de germinação e comprimento do tubo germinativo de esporos de *P. expansum* submetidos a diferentes concentrações de AS.

#### Germinação

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	3	23586,187500	7862,062500	1479,918	0,0000
erro	12	63,750000	5,312500		
Total corrigido	15	23649,937500			
CV (%) =		8,72			

#### Comprimento do tubo germinativo

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	3	38024,500000	12674,833333	770,116	0,0000
erro	12	197,500000	16,458333		
Total corrigido	15	38222,000000			
CV (%) =		11,43			

2

**Anexo 7** – Análise de variância da porcentagem de germinação e comprimento do tubo germinativo de esporos de *P. expansum* submetidos a diferentes tempos de contato com o AS (2,5 mM).

**Germinação**

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	2	80013.194444	40006.597222	25267.325	0.0000
Tempo	5	40631.111111	8126.222222	5132.351	0.0000
Tratamento*Tempo	10	25474.638889	2547.463889	1608.925	0.0000
erro	54	89.500000	1.583333		
<b>Total corrigido</b>	<b>71</b>	<b>146204.444444</b>			
CV (%) =	2.43				

**Comprimento do tubo germinativo**

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	2	206748.777778	103374.388889	757.282	0.0000
Tempo	5	297487.236111	59497.447222	435.856	0.0000
Tratamento*Tempo	10	178304.138889	17830.413889	130.619	0.0000
erro	54	7371.385000	136.507130		
<b>Total corrigido</b>	<b>71</b>	<b>689811.537778</b>			
CV (%) =	7.87				

**Anexo 8** – Análise de variância da porcentagem de germinação e comprimento do tubo germinativo de esporos de *P. expansum* submetidos ao AS (2,5 mM) em diferentes pH.

**Germinação**

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	1	21945.312500	21945.312500	2309.020	0.0000
pH	9	81452.262500	9050.251389	952.240	0.0000
Tratamento*pH	9	20281.062500	2244.562500	236.166	0.0000
erro	60	570.250000	9.504167		
<b>Total corrigido</b>	<b>79</b>	<b>124168.887500</b>			
CV (%) =	4.97				

????

?

### Comprimento do tubo germinativo

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	1	20995.200000	20995.200000	620.586	0.0000
pH	9	101616.887500	11290.765278	333.738	0.0000
Tratamento*pH	9	19621.487500	2180.165278	64.442	0.0000
erro	60	2029.875000	33.831250		
Total corrigido	79	144263.450000			
CV (%) =	9.39				

**Anexo 8** – Análise de variância do efeito do AS (2,5 mM) na integridade da membrana plasmática dos esporos de *P. expansum* após diferentes tempos de contato.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	1	56650.020833	56650.020833	9912.033	0.0000
Tempo	5	16399.354167	3279.870833	573.878	0.0000
Tratamento*Tempo	5	16203.354167	3240.670833	567.019	0.0000
erro	36	205.750000	5.715278		
Total corrigido	47	89458.479167			
CV (%) =	9.87				

**Anexo 9** – Análise de variância das espécies reativas de ATB a partir de esporos de *P. expansum* tratados com AS (2,5 mM) por diferentes tempos indicando stress oxidativo nas membranas.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	1	38826990.081075	38826990.081075	944.825	0.0000
Tempo	5	52286050.184267	10457210.036853	227.535	0.0000
Tratamento*Tempo	5	52286516.740400	10457303.348080	227.537	0.0000
erro	36	1654510.699850	45958.630551		
Total corrigido	47	145054067.705592			
CV (%) =	23.68				

2

**Anexo 10** – Análise de variância do extravasamento de proteínas de micélios de *P. expansum* tratados com AS (2,5 mM) por diferentes tempos.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	1	6.705823	6.705823	329,678	0.0000
Tempo	5	3.961944	0.792389	38,956	0.0000
Tratamento*Tempo	5	1.674240	0.334848	16,462	0.0000
erro	36	0.732259	0.020341		
Total corrigido	47	13.074265			
CV (%) =	6,74				

**Anexo 11** – Análise de variância da atividade de peroxidases em frutos de diferentes categorias de maçã Fuji tratados com água destilada estéril.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	2	29.270017	14.635008	1.177	0.3197
Tempo	3	26.528075	8.842692	0.711	0.5516
Tratamento*Tempo	6	34.692050	5.782008	0.465	0.8294
erro	36	447.535950	12.431529		
Total corrigido	47	538.025192			
CV (%) =	11,24				

**Anexo 12** – Análise de variância da atividade de peroxidases em frutos de diferentes categorias de maçã Fuji tratados com água destilada estéril, AS, suspensão de esporos em água destilada ou suspensão de esporos em AS.

**Categoria 1**

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	15.652250	5.217417	0.355	0.7857
Tempo	3	39.710050	13.236683	0.696	0.5567
Tratamento*Tempo	9	52.254050	5.806006	0.395	0.9315
erro	48	705.511650	14.698159		
Total corrigido	63	806.128000			
CV (%) =	13,91				

????

?

## Categoria 2

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	38.116162	12.705381	0.866	0.5770
Tempo	3	57.401192	19.133731	1.003	0.3996
Tratamento*Tempo	9	52.571964	5.841285	0.306	0.9692
erro	48	915.645025	19.075938		
Total corrigido	63	1063.733923			
CV (%) =		13.65			

## Categoria 3

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	6.162755	2.054252	0.145	0.9324
Tempo	3	73.987180	24.662393	1.744	0.1706
Tratamento*Tempo	9	54.355789	6.039532	0.427	0.9140
erro	48	678.949275	14.144777		
Total corrigido	63	813.454998			
CV (%) =		15.87			

**Anexo 13** – Análise de variância da atividade de polifenoloxidas em frutos de diferentes categorias de maçã Fuji tratados com água destilada estéril.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	2	69.426212	34.712106	1.796	0.1809
Tempo	3	13.091340	4.363780	0.226	0.8781
Tratamento*Tempo	6	112.510754	18.751792	0.969	0.6400
erro	36	696.655125	19.351531		
Total corrigido	47	891.681431			
CV (%) =		13.79			

**Anexo 14** – Análise de variância da atividade de peroxidases em frutos de diferentes categorias de maçã Fuji tratados com água destilada estéril, AS, suspensão de esporos em água destilada ou suspensão de esporos em AS.

## Categoria 1

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	73.377067	24.459022	2.011	0.1249
Tempo	3	16.769042	5.589681	0.460	0.7118
Tratamento*Tempo	9	191.974077	21.330453	1.756	0.1025
erro	48	583.840525	12.163344		
Total corrigido	63	865.960711			
CV (%) =		11.38			

2

### Categoria 2

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	19.780550	6.593517	0,517	0,6728
Tempo	3	115.871762	38.623921	3,026	0,0384
Tratamento*Tempo	9	134.789937	14,976660	1,174	0,3331
erro	48	612.578750	12,762057		
Total corrigido	63	883.021000			
CV (%) =		11,91			

### Categoria 3

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	129.453842	43.151281	1,343	0,2715
Tempo	3	169.098230	56.366077	1,754	0,1685
Tratamento*Tempo	9	253.165252	28,129472	0,875	0,5532
erro	48	1542.229425	32,129780		
Total corrigido	63	2093.946748			
CV (%) =		9,94			

**Anexo 15** – Análise de variância da atividade de glucanases em frutos de diferentes categorias de maçã Fuji tratados com água destilada estéril.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	2	0.990554	0.495277	5,300	0,0096
Tempo	3	0.828623	0.276208	2,956	0,0453
Tratamento*Tempo	6	1.049046	0.174841	1,871	0,1128
erro	36	3.363875	0.093441		
Total corrigido	47	6.232098			
CV (%) =		9,47			

**Anexo 16** – Análise de variância da atividade de glucanases em frutos de diferentes categorias de maçã Fuji tratados com água destilada estéril, AS, suspensão de esporos em água destilada ou suspensão de esporos em AS.

### Categoria 1

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	0.213787	0.071262	0,540	0,6569
Tempo	3	1.223787	0.407929	3,094	0,0356
Tratamento*Tempo	9	0.683225	0.075914	0,576	0,8102
erro	48	6.329400	0.131863		
Total corrigido	63	8.450200			
CV (%) =		8,71			

????

?

### Categoria 2

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	0.308267	0.102756	1.230	0.3090
Tempo	3	0.113317	0.037772	0.452	0.7169
Tratamento*Tempo	9	0.558002	0.062000	0.742	0.6686
erro	48	6.009725	0.083536		
Total corrigido	63	6.989311			
CV (%) =	11,20				

### Categoria 3

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	0.152650	0.050883	1.630	0.1948
Tempo	3	0.378388	0.126129	4.040	0.0122
Tratamento*Tempo	9	1.612063	0.179118	5.738	0.0000
erro	48	1.498400	0.031217		
Total corrigido	63	3.641500			
CV (%) =	11,65				

**Anexo 17** – Análise de variância do teor de compostos fenólicos totais de frutos de diferentes categorias de maçã Fuji tratados com água destilada estéril.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	2	10250.579850	5125.289925	1.878	0.1675
Tempo	3	3773.312773	1257.770924	0.461	0.7113
Tratamento*Tempo	6	18073.605683	3012.267614	1.104	0.3792
erro	36	98249.260425	2728.896137		
Total corrigido	47	130337.759231			
CV (%) =	15,81				

**Anexo 18** – Análise de variância do teor de compostos fenólicos totais de frutos de diferentes categorias de maçã Fuji tratados com água destilada estéril, AS, suspensão de esporos em água destilada ou suspensão de esporos em AS.

### Categoria 1

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	5706.602750	1902.200917	0.537	0.6592
Tempo	3	13126.946162	4375.68721	1.235	0.3073
Tratamento*Tempo	9	8655.069162	961.674260	0.271	0.9794
erro	48	170066.541900	3543.052956		
Total corrigido	63	197555.158975			
CV (%) =	14,15				

2

### Categoria 2

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	5854,434337	1951,478112	0,458	0,7129
Tempo	3	15975,763462	5325,254487	1,230	0,3022
Tratamento*Tempo	9	16445,785575	1827,309508	0,429	0,9130
erro	48	204558,094200	4261,626962		
Total corrigido	63	242834,077575			
CV (%) =		13,46			

### Categoria 3

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	3247,439492	1082,479831	0,213	0,8874
Tempo	3	2300,760605	766,920202	0,151	0,9290
Tratamento*Tempo	9	24278,150164	2697,572240	0,530	0,8657
erro	48	244480,189775	5093,337287		
Total corrigido	63	274386,540036			
CV (%) =		14,65			

**Anexo 19** – Análise de variância do teor de flavonóides de frutos de diferentes categorias de maçã Fuji tratados com água destilada estéril.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	2	315,012388	157,506194	1,837	0,1739
Tempo	3	302,826356	100,942119	1,177	0,3320
Tratamento*Tempo	6	340,147612	56,691235	0,661	0,6812
erro	36	3086,877475	85,746597		
Total corrigido	47	4044,863631			
CV (%) =		17,68			

**Anexo 20** – Análise de variância do teor de flavonóides de frutos de diferentes categorias de maçã Fuji tratados com água destilada estéril, AS, suspensão de esporos em água destilada ou suspensão de esporos em AS.

### Categoria 1

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	309,630519	103,210173	2,707	0,0555
Tempo	3	132,870506	44,290169	1,162	0,3341
Tratamento*Tempo	9	636,776519	70,752947	1,856	0,0822
erro	48	1829,852450	38,121926		
Total corrigido	63	2909,129994			
CV (%) =		12,84			

????

?

## Categoria 2

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	107.392430	35.797477	0.416	0.7423
Tempo	3	407.448630	135.816210	1.578	0.2069
Tratamento*Tempo	9	914.940264	101.660029	1.181	0.3284
erro	48	4131.236925	86.067434		
Total corrigido	63	5561.018108			
CV (%) =	14.50				

## Categoria 3

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	79.493388	26.497796	0.450	0.7182
Tempo	3	85.333787	28.444596	0.483	0.6953
Tratamento*Tempo	9	141.844975	15.760553	0.268	0.9803
erro	48	2824.116550	58.835761		
Total corrigido	63	3130.788700			
CV (%) =	14.37				