



**Inês Sofia Mendes Amaral Marques**

**Conservação de frutas: Redução de  
doenças de pós-colheita em pera  
'Rocha'**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar na área de especialização  
Qualidade Alimentar

Orientador: Doutora Cláudia Sánchez Lara  
do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária  
Coorientador: Professor Doutor Fernando José Cebola Lidon  
da Faculdade de Ciências e Tecnologia



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA  
2012

Conservação de frutas: Redução de doenças de pós-colheita em pera 'Rocha' Copyright de Inês Sofia Mendes Amaral Marques, FCT/UNL e UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Doutora Claudia Sánchez pela sua disponibilidade e colaboração incansável na realização do trabalho assim como toda a ajuda na resolução dos problemas que foram surgindo ao longo do caminho;

Ao meu coorientador de estágio, Professor Doutor Fernando Lidon pela sua disponibilidade, apoio e orientação científica demonstrada no desenvolvimento do trabalho, bem como toda a aprendizagem que me proporcionou ao longo de todo o curso;

À Doutora Isabel Maia e à Doutora Manuela Pinto pelos ensinamentos das técnicas experimentais relativas à microscopia e aos ensaios *in vitro*, respetivamente, e pela ajuda prestada ao longo de todo o trabalho;

À Engenheira Cátia Rodrigues, ao Engenheiro Mário Santos e à Paula Ramos pelo apoio prestado no laboratório e por todos os momentos vividos ao longo destes meses de trabalho;

A todos os elementos do Departamento de Fisiologia Vegetal do INIAV pelas constantes palavras de incentivo, ajuda e pelos bons momentos proporcionados;

À minha família e amigos pelo constante apoio e incentivo demonstrado durante a elaboração deste trabalho.

A todos um muito Obrigado!

## Resumo

A utilização de agentes de biocontrolo constitui uma vantagem na redução de doenças de pós-colheita em frutos e legumes, evitando ou reduzindo o uso dos tradicionais fungicidas. Assim, no presente trabalho, foi estudada a aplicação de um microrganismo antagonista, *Aureobasidium pullulans*, juntamente com um composto natural com propriedades antifúngicas, o quitosano, para prolongar o tempo de conservação da pera 'Rocha' e reduzir a incidência da podridão azul causada por *Penicillium expansum*.

Recorreu-se a ensaios *in vitro* para estudar o efeito inibitório da solução ácida de quitosano sobre o patógeno, bem como possíveis efeitos sobre o antagonista *A. pullulans*.

Foram testadas duas concentrações de ácido acético para a preparação das soluções de quitosano, uma a 5% e outra a 1%. Para a primeira concentração utilizaram-se doses crescentes de quitosano, 0 - 5g.L<sup>-1</sup>. Verificou-se que, mesmo a baixas concentrações, a solução de quitosano teve um efeito inibitório significativo no antagonista, uma vez que a colónia de *A. pullulans* foi inibida em todas as concentrações com exceção da concentração de 0,5 g.L<sup>-1</sup>. O *P. expansum* foi inibido a 100% quando a concentração de quitosano foi maior ou igual a 1,2 g.L<sup>-1</sup>.

Neste enquadramento, foram testadas oito concentrações de quitosano (de 0 a 2,5 g.L<sup>-1</sup>) em solução de ácido acético a 1%. Os resultados obtidos indicam que 1,2 g.L<sup>-1</sup> é a concentração mais adequada para o controlo do crescimento do fungo patogénico, quando combinado o efeito antagonico de *A. pullulans* e o antifúngico do quitosano.

Realizaram-se ainda ensaios *in vivo*, para estudar o efeito do antagonista *A. pullulans* e de diferentes concentrações de quitosano (0,5; 1,2 e 2,5 g.L<sup>-1</sup>) em solução ácida a 1%, no controlo da podridão azul em pera 'Rocha'. Verificou-se que a inoculação com o antagonista levou a um aumento da percentagem de inibição do patógeno. Quando inoculado o patógeno e a solução de quitosano na mesma ferida, constatou-se que não houve qualquer controlo da podridão azul, em comparação aos frutos inoculados somente com *P. expansum*.

Efectuou-se ainda a observação citológica da polpa da pera na zona da ferida, para identificar os possíveis mecanismos de ação do antagonista no controlo da doença. Os resultados indicam que a presença do antagonista poderá induzir mecanismos no hospedeiro, produzindo a formação de compostos que possam reforçar as paredes celulares, dificultando assim a invasão dos tecidos por parte do patógeno.

**Palavras-chave:** Conservação; doenças pós-colheita; *Penicillium expansum*; biocontrolo; *Aureobasidium pullulans*; quitosano; pera 'Rocha'

## Abstract

The use of biocontrol agents is considered an advantage in reducing post-harvest diseases on fruits and vegetables. In this work, it was studied the use of an antagonistic microorganism, *Aureobasidium pullulans*, along with a natural antimicrobial compound, chitosan, for the control of blue mold caused by *Penicillium expansum*, prompting to extend the conservation time of 'Rocha' pear.

*In vitro* tests were performed with the aim of studying the inhibitory effect of acidic solutions of chitosan on the pathogen, as well as possible effects on the antagonist *A. pullulans*.

Two concentrations of acetic acid solution were tested, 5% and 1%. For the first concentration, increasing doses of chitosan were used, from 0 to 5g.L<sup>-1</sup>. It was found that, even at low concentrations, the chitosan solution had a significant inhibitory effect on the antagonist, since the colony growth of *A. pullulans* was inhibited at all concentrations, except the concentration of 0.5 gL<sup>-1</sup> of chitosan. *P. expansum* was completely inhibited when the chitosan concentration was greater than or equal to 1.2 gL<sup>-1</sup>.

From these results, eight chitosan concentrations (from 0 to 2.5 gL<sup>-1</sup>) in 1% acetic acid solution were tested. The results suggested that 1.2 gL<sup>-1</sup> chitosan is the optimum concentration for controlling the growth of *P. expansum*, combining the antagonistic effect of *A. pullulans* and the antifungal properties of chitosan.

*In vivo* assays were also performed, in which the efficiency of *A. pullulans* and different chitosan concentrations (0.5, 1.2 and 2.5 gL<sup>-1</sup> in an acid solution 1%) to control blue rot in "Rocha" pear was analyzed. It was found that, the inoculation with the yeast, increased the percentage of inhibition of the pathogen. On the other hand, when the pathogen and chitosan solutions were inoculated in the same wound, it was found that there was no control of the blue mold rot, as compared to fruit inoculated only with *P. expansum*.

To study the possible mechanisms involved in the action of the antagonist in the disease control, cytological observations of the pear pulp around the wounds were done. The results indicate that the presence of the antagonist may induce resistance mechanisms in the host, producing compounds that can strengthen the cell walls.

**Keyword:** Conservation; postharvest diseases; *Penicillium expansum*; biocontrol; *Aureobasidium pullulans*; chitosan; pear 'Rocha'

## Índice

Índice de figuras .....	VIII
Índice de tabelas .....	X
1. Introdução .....	1
1.1 Pera ‘Rocha’ .....	1
1.1.1 Importância para Portugal .....	2
1.1.2 Exportação de pera ‘Rocha’ .....	3
1.2 Doenças de pós-colheita.....	3
1.2.1 Doenças de pós-colheita em pomóideas.....	4
1.2.1.1 <i>Penicillium expansum</i> .....	5
1.3 Mecanismos de controlo.....	7
1.3.1 Biocontrolo.....	9
1.3.1.1 <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	12
1.3.2 Quitosano .....	14
1.3.2.1 Propriedades do quitosano .....	16
1.3.2.2 Utilização .....	17
1.4 Enquadramento e objetivos do trabalho .....	18
2. Materiais e métodos .....	19
2.1 Ensaio <i>in vitro</i> .....	19
2.1.1 Preparação do meio de cultura e solução de quitosano .....	19
2.1.1.1 Meio de cultura Agar de batata glucosada (PDA).....	19
2.1.1.2 Quitosano .....	19
2.1.2 Isolamento de microrganismos.....	19
2.1.3 Ensaio em meio sólido.....	20
2.1.3.1 Ensaio para a otimização das concentrações de quitosano em solução de ácido acético a 5% .....	20
2.1.3.2 Ensaio para a otimização das concentrações de quitosano em solução de ácido acético a 1% .....	21
2.2 Ensaio <i>in vivo</i> .....	21
2.2.1 Matéria-prima.....	21

2.2.2	Preparação dos inóculos a utilizar no ensaio.....	22
2.2.3	Ensaio de biocontrole.....	23
2.3	Observação citológica da polpa da pera 'Rocha': sem ferida e inoculada com <i>A. pullulans</i> ou <i>P. expansum</i> ou <i>A. pullulans</i> e <i>P. expansum</i> .....	25
2.3.1	Processamento do material vegetal para observação em microscopia ótica .....	25
2.3.1.1	Fixação .....	25
2.3.1.2	Desidratação.....	25
2.3.1.3	Inclusão .....	25
2.3.1.4	Seccionamento .....	26
2.3.1.5	Coloração .....	26
2.3.1.6	Observação microscópica.....	26
3.	Resultados e Discussão .....	27
3.1.	Ensaio <i>in vitro</i> .....	27
3.1.1	Ensaio em meio sólido.....	27
3.1.1.1	Ensaio para a otimização das concentrações de quitosano em solução de ácido acético a 5% .....	27
3.1.1.2	Ensaio para a otimização das concentrações de quitosano em solução de ácido acético a 1% .....	30
3.2.	Ensaio <i>in vivo</i> .....	34
3.2.1	Desenvolvimento microbiano .....	34
3.2.2	Porcentagem de incidência .....	38
3.2.3	Eficácia do tratamento.....	39
3.2.3.1	Redução do diâmetro das feridas.....	39
3.2.3.2	Redução do número de feridas infetadas.....	40
3.3.	Observação citológica da polpa da pera 'Rocha': em ferida e inoculada com <i>A. pullulans</i> ou <i>P. expansum</i> ou <i>A. pullulans</i> e <i>P. expansum</i> .....	41
3.3.1	Observação microscópica.....	41
3.3.2	Análise das observações.....	47
4.	Considerações finais .....	48
5.	Bibliografia .....	50

## Índice de figuras

Figura 1.1: Pera 'Rocha' .....	1
Figura 1.2: Distribuição geográfica da produção de pera 'Rocha' .....	2
Figura 1.3: Colónia de <i>Penicillium expansum</i> cultivada em PDA .....	6
Figura 1.4: Observação microscópica do fungo <i>P. expansum</i> .....	6
Figura 1.5: Aspeto de pera infetada com <i>P. expansum</i> .....	7
Figura 1.6: Principais estratégias com efeito direto e indireto nos patogéneos de pós-colheita ...	8
Figura 1.7: Principais estratégias com efeito nos frutos para o controlo das podridões de pós-colheita .....	9
Figura 1.8: Colónia de <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	13
Figura 1.9: Observação microscópica de <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	14
Figura 1.10: Fluxograma simplificado relativo à produção do quitosano .....	15
Figura 1.11: Estrutura química da quitina (A) e do quitosano (B) .....	16
Figura 2.1: Câmara de Neubauer .....	22
Figura 2.2: Metodologia utilizada para a inoculação das feridas .....	24
Figura 3.1: Percentagem de inibição do <i>P. expansum</i> ( <i>Pe</i> ) e do <i>A. pullulans</i> ( <i>Ap</i> ) produzida por diferentes concentrações de quitosano em solução ácida a 5%, após 6 dias de incubação. ....	29
Figura 3.2: Percentagem de inibição do <i>P. expansum</i> ( <i>Pe</i> ) e do <i>A. pullulans</i> ( <i>Ap</i> ) produzida por diferentes concentrações de quitosano em solução ácida a 1%, após 6 dias de incubação. ....	32
Figura 3.3: Crescimento da colónia de <i>P. expansum</i> em solução ácida a 1% de quitosano na concentração de: 0 g.L <sup>-1</sup> , 0,5 g.L <sup>-1</sup> , 1,2 g.L <sup>-1</sup> e 2,5 g.L <sup>-1</sup> após 6 dias de incubação. ....	33
Figura 3.4: Crescimento da colónia de <i>A. pullulans</i> em solução ácida a 1% de quitosano na concentração de: 0 g.L <sup>-1</sup> , 0,5 g.L <sup>-1</sup> , 1,2 g.L <sup>-1</sup> e 2,5 g.L <sup>-1</sup> após 6 dias de incubação .....	33
Figura 3.5: Diâmetro da lesão nas diferentes modalidades ao fim de 7 dias .....	35
Figura 3.6: Lesões da pera nas diferentes modalidades, após 4 dias de inoculação .....	37
Figura 3.7: Lesões da pera nas diferentes modalidades, após 6 dias de inoculação .....	37
Figura 3.8: Percentagem de incidência nas diferentes modalidades ao fim de 7 dias. ....	38
Figura 3.9: Eficácia do tratamento (%) nas diferentes modalidades ao fim de 7 dias .....	39
Figura 3.10: Redução de feridas (%) nas diferentes modalidades ao fim de 7 dias .....	40
Figura 3.11: Polpa de pera 'Rocha'. Corte realizado à mão livre. ....	41



- Figura 3.12: Secções da polpa de pera – fruta sem ferida (controlo). A) Aspeto geral. B) e C) Pormenor do parênquima em zonas sem e com idioblastos (células pétreas). ..... 42
- Figura 3.13: Secções da polpa das paredes da ferida da pera – fruta tratada com água (controlo da infeção). A) Aspeto geral da polpa do fruto. B) e C) Pormenores de zonas do parênquima.. 43
- Figura 3.14: Secções da polpa das paredes da ferida de pera inoculada com *Penicillium expansum*. A) Aspeto geral da dispersão do inóculo inter e intracelularmente na zona de lesão. B) e C) Pormenores de zonas de polpa..... 44
- Figura 3.15: Secções da polpa das paredes da ferida de pera inoculada com *Aureobasidium pullulans*. f – fungo. A) Aspeto geral da dispersão do inóculo inter e intracelularmente na zona de lesão. B) e C) Pormenores de zonas da polpa..... 45
- Figura 3.16: Secções da polpa de pera inoculada com *A. pullulans* e *P. expansum*. A) e B) Aspetos gerais da dispersão dos dois fungos inoculados em conjunto, inter e intracelularmente na zona de lesão. C) e D) Pormenores de zonas de polpa ..... 46

## Índice de tabelas

Tabela 1.1: Comparação e diferenças quanto ao modo de ação entre os fungicidas químicos e o biocontrole .....	11
Tabela 3.1: Valores médios de crescimento da colónia ( $\emptyset$ mm) de <i>P. expansum</i> nas diferentes concentrações de quitosano em solução ácida a 5%. .....	27
Tabela 3.2: Valores médios de crescimento da colónia ( $\emptyset$ mm) de <i>Aureobasidium pullulans</i> nas diferentes concentrações de solução ácida a 5% de quitosano.....	28
Tabela 3.3: Percentagem de inibição de <i>P. expansum</i> e <i>A. pullulans</i> nas diferentes concentrações de quitosano em solução ácida a 5% ao longo de 6 dias.....	29
Tabela 3.4: Valores médios de crescimento da colónia ( $\emptyset$ mm) de <i>P. expansum</i> nas diferentes concentrações de quitosano em solução ácida a 1%. .....	30
Tabela 3.5: Valores médios de crescimento da colónia ( $\emptyset$ mm) de <i>A. pullulans</i> nas diferentes concentrações de quitosano em solução ácida a 1%. .....	31
Tabela 3.6: Percentagem de inibição do <i>P. expansum</i> e do <i>A. pullulans</i> nas diferentes concentrações de quitosano em solução ácida a 1% ao longo de 6 dias. ....	32
Tabela 3.7: Diâmetros médios ( $\emptyset$ mm) da lesão nas diferentes modalidades.....	34

## 1. Introdução

### 1.1 Pera 'Rocha'

A nível taxonómico, a pereira 'Rocha' pertence ao reino *Plantae*, filo *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, ordem *Rosales*, família *Rosaceae*, género *Pyrus* e variedade 'Rocha' (Naturdata, 2011).

A "Pera Rocha do Oeste" é um produto com Denominação de Origem Protegida (DOP), englobando uma área geográfica cuja produção apresenta características únicas de qualidade (Soares *et al.*, 2003).

É um cultivar derivado do *Pyrus communis L.* de origem portuguesa que, para além das características intrínsecas do produto, apresenta como vantagem, face a outras variedades, o facto de ter uma excelente capacidade de conservação e resistência ao transporte e manuseamento, que se traduz na possibilidade de ter uma época de comercialização bastante prolongada (GPP, 2007). Por outro lado, a pera 'Rocha' é uma variedade atrativa, apresentando uma cor, textura e sabor apetecíveis. Graças às suas propriedades, são baixas as perdas de sabor durante o período de conservação (ANP, 2012).

A cor da epiderme (**figura 1.1**) pode variar entre o amarelo e o verde-claro, com carepa típica ao redor do pedúnculo, menos acentuada na zona apical e com leves pontuações dispersas na superfície do fruto (PTQC, 2008).

A polpa do fruto caracteriza-se pela cor branca e macia-crocante, quando se trata de uma maturação comercial, ou granulosa, doce e muito sumarenta, de perfume ligeiramente acentuado, no estado da maturação fisiológica (Soares *et al.*, 2001; PTQC, 2008).



Figura 1.1: Pera 'Rocha' (original do autor).

A forma do fruto é variável, uma vez que o fruto se desenvolve sem recorrer à fecundação. No entanto são predominantes as formas redonda ovada, redonda piriforme e piriforme ovada, apresentando um calibre que pode variar entre 55 a 75 mm (Soares *et al.*, 2001; PTQC, 2008).

Admitindo algumas fragilidades da epiderme do fruto, se forem cumpridas algumas técnicas elementares, durante a colheita, no período de conservação e após a saída do frio, pode-se dizer que a pera 'Rocha' tem bom poder de conservação e ótima aptidão para o transporte a longa distância (Avelar, 2001; Soares *et al.*, 2001), daí o interesse em se desenvolver o intercâmbio com os países do hemisfério sul.

### 1.1.1 Importância para Portugal

A produção de pera ‘Rocha’ ocupa um lugar cimeiro entre as restantes variedades de pera cultivadas no nosso país. Atualmente pode-se falar do predomínio do cultivar ‘Rocha’ com 97% da área de pereira em Portugal. Esta área plantada tem a capacidade de produzir cerca de 120 a 180 mil toneladas de pera ‘Rocha’ por ano (ANP, 2012). De referir ainda que cerca de 93% do volume de produção dos frutos é coberto pela “Pera Rocha do Oeste” DOP (INE, 2012). É de salientar que mais de 99% da pera ‘Rocha’ mundial é produzida em Portugal (ANP, 2012).

É nos concelhos do Oeste que se concentra a produção de pera ‘Rocha’, destacando-se o Cadaval com uma área de cultivo de 2.073 hectares e um expressivo crescimento na última década, tendo ultrapassado o concelho do Bombarral cuja área plantada de 1.934 hectares. Embora em menores quantidades, produz-se pera ‘Rocha’ no Alentejo (Ferreira do Alentejo e Elvas), Ribatejo (Ferreira do Zêzere), Beira Interior (Manteigas, Covilhã e Fundão) e Trás-os-Montes (Carraceda de Ansiães) (**figura 1.2**) (ANP, 2012).

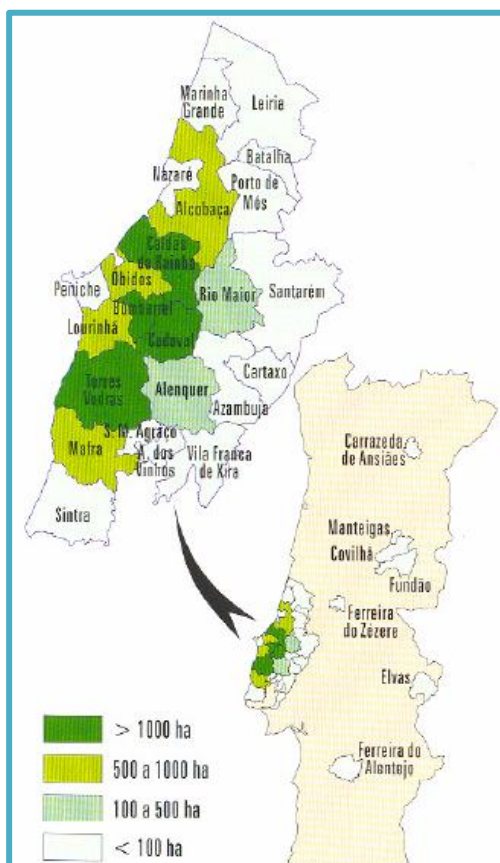


Figura 1.2: Distribuição geográfica da produção de pera ‘Rocha’ (ANP, 2012).

O mercado nacional consome cerca de 70% da produção de pera ‘Rocha’, o que equivale a cerca de 15kg/habitante/ano. Caracteriza-se por ser um mercado cada vez mais informado sobre as características do produto e as formas de produção. No entanto, torna-se importante

incrementar ações de promoção e *marketing* junto dos consumidores e retalhistas nacionais, de forma a valorizar o produto, bem como no mercado internacional (ANP, 2012).

### **1.1.2 Exportação de pera 'Rocha'**

A exportação de pera 'Rocha' foi iniciada no século XIX. Nos tempos recentes, teve expressão significativa nas três últimas décadas, e tomou maiores contornos após a campanha de 1991/92, aproveitando a oportunidade criada com a quebra de produção europeia de pera que se cifrou em 2012 na ordem dos 30% (ANP, 2012).

Em 2010 Portugal produziu 171 mil toneladas de pera 'Rocha', das quais exportou 80 mil toneladas, sobretudo para o Reino Unido (27% de exportações), França (25%) e Brasil (24%) (Cipriano, 2011). O quarto país de destino já fica a uma diferença considerável dos três primeiros, é a Rússia, com 5,4% das exportações, seguindo-se a Irlanda com 5,1% (Cipriano, 2011).

Verifica-se que esta variedade se impõe no mercado externo, sendo um produto que permite manter, com vantagem, o saldo positivo de Portugal na balança comercial e poderá manifestar-se como uma cultura competitiva nos mercados da comunidade (Henriques, 2009).

## **1.2 Doenças de pós-colheita**

As doenças de pós-colheita afetam diversas culturas e os prejuízos podem ser avultados, aumentando os custos e, eventualmente, reduzindo as mais-valias na cadeia de conservação, armazenamento e distribuição (Fialho e Silva, 2010).

Numa perspetiva de produção integrada, o desenvolvimento de doenças está dependente, não só da suscetibilidade do hospedeiro, mas também de fatores ambientais e de técnicas culturais que conduzem a uma maior ou menor eficácia dos mecanismos de invasão e desenvolvimento de patogéneos (Oliveira, 2007).

O ataque de microrganismos fitopatogénicos tais como fungos, bactérias e, em menor extensão, vírus, é, talvez, uma das causas mais sérias de perdas pós-colheita (Choudhury, 2007).

As bactérias causam geralmente mais problemas em produtos hortícolas do que em frutos, sendo o pH apontado como um dos principais motivos. O pH dos produtos hortícolas varia entre 4,5 e 7,0, enquanto muitos frutos têm pH <4.5, retardando o crescimento bacteriano (Almeida, 2004).

Ao contrário da maioria dos fungos, as bactérias não conseguem penetrar pela superfície intacta dos tecidos vegetais, recorrendo, por isso, às aberturas naturais (hidátodos, estomas, lenticelas) ou a ferimentos (Almeida, 2004).

Bactérias como *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas viridiflava* e *Pseudomonas cichirii* foram identificadas como as principais bactérias causadoras de podridões pós-colheita (Almeida, 2004).

A podridão devida a fungos pode ocorrer durante o ciclo vegetativo, colheita, transporte, armazenamento, manuseamento e venda ou até depois da compra pelo consumidor. A ocorrência de podridões pode ter a sua causa antes ou depois da colheita. Dentro dos fatores de pré-colheita, as condições atmosféricas durante o ciclo vegetativo da cultura e em especial as condições meteorológicas imediatamente antes ou durante a colheita são as que mais contribuem para o aparecimento de podridões (Fialho e Silva, 2010).

A podridão pós-colheita de fruta fresca, devido a infeções fúngicas, causa perdas económicas significativas à indústria. As doenças de pós-colheita mais importantes são causadas por fungos, nomeadamente o *Penicillium spp.*, *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* e *Rhizopus stolonifer* (Francés *et al.*, 2005).

### **1.2.1 Doenças de pós-colheita em pomóideas**

Os fungos são os principais responsáveis pelas doenças de pós-colheita em pomóideas, reduzindo drasticamente o período de armazenamento e comercialização.

Os sintomas desenvolvem-se durante o armazenamento, no entanto, a infeção dos frutos por parte dos patogéneos pode ocorrer antes da colheita, durante a colheita, durante o manuseamento e acondicionamento e no período de armazenagem (Xiao, 2005; Borge *et al.*, 2004).

Os tratamentos de pós-colheita destas doenças incluem, habitualmente, meios de proteção químicos como a aplicação de antioxidantes e de fungicidas, que apresentam uma reduzida degradação nas condições de conservação dos frutos (Oliveira, 2007).

No entanto, as perdas causadas pelas podridões podem alcançar 30% da produção total (Botelho *et al.*, 2010). Assim, para os frutos destinados a um armazenamento de longo prazo, é importante controlar a deterioração resultante deste tipo de infeção, porque um fruto pode potencialmente destruir uma quantidade considerável de fruta (Xiao, 2005).

As doenças de pós-colheita de pomóideas, essencialmente por parte dos fungos, podem ser divididas em duas categorias: aquelas que se originam a partir da infeção fúngica latente da fruta no pomar, causadas por *Sphaeropsis pyriputrescens*, *Potrebniomyces pyri*, *Neofabraea spp.* e aquelas que se originam a partir da infeção de feridas, na colheita, durante o manuseamento pós-colheita e/ou no processo de embalagem. Normalmente, estas doenças são causadas por *Mucor piriformis*, *Botrytis cinerea* e *Penicillium spp.*, principalmente por *P. expansum* (Xiao, 2005; Nunes, *et al.*, 2002).

No entanto, *P. expansum* e *B. cinérea*, responsáveis pelas podridões azul e cinzenta, respetivamente, são os fungos que originam, a nível mundial, as doenças mais significativas em pomóideas (Nunes, *et al.*, 2002).

O fruto deteriorado por *B. cinerea* apresenta tons que variam entre o castanho claro e escuro, sendo que a cor é semelhante em toda a área deteriorada. Esta doença é designada por bolor cinzento uma vez que em condições de humidade relativa elevada, os esporos aparecem na superfície deteriorada com tons entre o branco e o cinzento. Geralmente não tem odor, no entanto em estados de deterioração elevados pode aparecer “cozido”. A superfície deteriorada é esponjosa e o tecido afetado não é separável do tecido saudável, diferenciando-se por isso do *Penicillium* spp (Xiao, 2005).

No caso particular da pera 'Rocha', a podridão azul, provocada pelo *P. expansum*, merece especial atenção devido à elevada frequência e grau de incidência (Borges *et al.*, 2004).

#### **1.2.1.1 *Penicillium expansum***

A classificação do *Penicillium expansum* enquadra-se na classe *Eurotiomycetes*, ordem *Eurotiales*, família *Trichocomaceae*, género *Penicillium* e espécie *P. expansum*.

O fungo *Penicillium expansum* Link não só induz podridão azul, que encurta o período de vida útil dos frutos colhidos, mas também produz a patulina, um metabolito secundário que é tóxico para seres humanos e animais (Yu *et al.*, 2007). A Organização Mundial da Saúde estabelece como limite máximo de patulina o valor de 50µg/L, contudo, no sentido de se proteger a saúde pública, está a ponderar alterar este valor para 25µg/L (Sousa e Sousa, 2005).

Como referido anteriormente, o fungo é um patógeno oportunista, isto é, penetra nos tecidos através de feridas, no pedúnculo e nas lentículas. Pode igualmente propagar-se de frutos infetados em contacto com frutos saudáveis, através da epiderme não ferida (Sousa e Sousa, 2005). No pomar, a doença assume menor importância pois raramente ocorre (Madeira, 2005).

Note-se ainda que é no estado vegetativo ou assexuado que, geralmente, o *Penicillium* ataca os frutos (Tomaz, 2001).

Este fungo possui um crescimento micelial denso, com colónias azul-esverdeadas ou verde-escuras, quando cultivadas em Agar de batata glucosada (PDA) (**figura 1.3**) (Madeira, 2005).



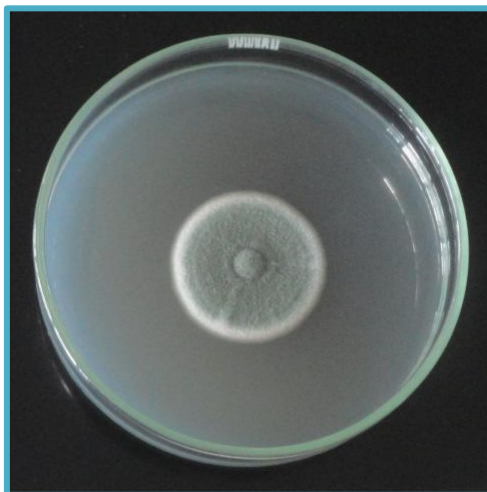


Figura 1.3: Colónia de *Penicillium expansum* cultivada em PDA (original do autor).

*P. expansum* produz conidióforos que se ramificam na extremidade. Cada uma das ramificações volta a ramificar-se e na extremidade formam-se 3 a 4 fiadas de conídios, que apresentam um aspeto de um leque ou de uma vassoura, quando observados ao microscópio (**figura 1.4**) (Sousa e Sousa, 2005). Estes conídios são bastante pulverulentos e facilmente arrastáveis pelo vento e pela chuva, o que facilita a sua dispersão.

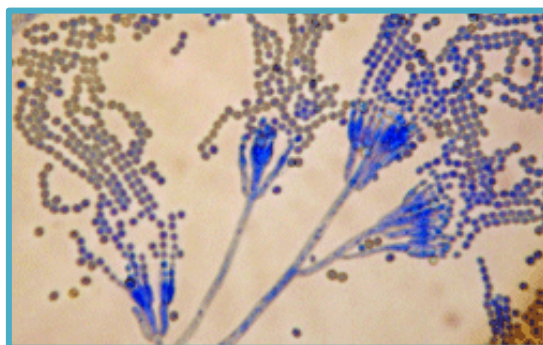


Figura 1.4: Observação microscópica do fungo *P. expansum* (MBL, 2005).

Relativamente aos nutrientes necessários para o seu crescimento e reprodução, não é um fungo muito exigente, pois requer apenas oxigénio e uma fonte de carbono, que obtém do fruto (Pitt, 1979).

Pode desenvolver-se a temperaturas elevadas, entre 18-25°C, possuindo uma temperatura mínima de crescimento e desenvolvimento de -1°C. Para que ocorra a germinação dos conídios é ainda necessária uma humidade relativa de cerca de 80% (Kader, 2002).

A podridão provocada por *P. expansum* também é designada por podridão azul devido à coloração que os frutos adquirem à superfície do local de infeção (Sousa e Sousa, 2005).

A podridão desenvolve-se de forma centrifuga e evolui rapidamente (Madeira, 2005).

Em regra, o fungo desenvolve podridões húmidas a partir de ferimento na epiderme. A infeção instalada à superfície do fruto adquire forma circular, inicialmente de cor esbranquiçada,



evoluindo para um bolor de cor verde azulado. No início da infecção as manchas são superficiais, mas rapidamente desenvolvem-se em profundidade (Agrios, 1997).

À medida que a infecção avança a polpa e a epiderme, junto das feridas, torna-se translúcida, difusa, de cor ligeiramente acastanhada e de contorno circular regular. Posteriormente, a polpa perde consistência e liquefaz-se enquanto que a epiderme se enrugando formando halos circulares concêntricos, tomando o fruto um aspeto de podridão mole ou húmida (**figura 1.5**) (Sousa e Sousa, 2005).



Figura 1.5: Aspeto de pera infetada com *P. expansum* (cortesia de INIAV).

A epiderme destaca-se facilmente da polpa liquefeita, à mais ligeira pressão, e rompe-se libertando um líquido com sabor e odor característico.

A polpa contaminada pode também adquirir a coloração azulada ou com laivos azuis devido ao desenvolvimento micelial e à produção de esporos (Sousa e Sousa, 2005).

### **1.3 Mecanismos de controlo**

A proteção dos frutos contra os fungos deve iniciar-se no pomar através de adequadas técnicas culturais e, posteriormente, deve continuar-se no local de armazenamento e/ou conservação.

Para reduzir a incidência de doenças de pós-colheita, pode-se atuar ao nível da luta cultural, química ou biológica (Madeira, 2005).

A nível cultural, pode-se implementar um conjunto de medidas profiláticas que não poderão eliminar totalmente a doença, mas reduzir de forma significativa a sua incidência. O controlo do vigor vegetativo, nomeadamente com aplicações regradas de azoto, é um exemplo deste controlo pré-colheita. O azoto em excesso torna as paredes celulares dos frutos mais finas, facilitando o desenvolvimento de doenças, nomeadamente a entrada de fungos.

Assim, os tratamentos fitossanitários efetuados no pomar, em pré-colheita, destinam-se a proteger os frutos das potenciais infeções (Fialho e Silva, 2010; Madeira, 2005).

Na atualidade, a aplicação de fungicidas sintéticos, permanece como a principal medida para reduzir a incidência de doenças de pós-colheita em frutos (Berger *et al.*, 2011; Droby *et al.*, 2009). No entanto, apesar de terem uma rápida eficiência, os pesticidas de síntese têm um efeito negativo sobre o solo, a vegetação, as águas, os animais e o homem, podendo provocar a seleção de mutantes resistentes, resultantes da forte pressão seletiva. Além disso, o tempo de degradação no ambiente pode ser na ordem de décadas, o que provoca uma concentração elevada dessas substâncias na cadeia alimentar, levando a uma necessidade urgente de desenvolver alternativas mais ecológicas (Lidon *et al.*, 2012; Pacheco *et al.*, 2008; Franceschini *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, diversas abordagens biológicas, têm visado o controlo, proteção, supressão ou erradicação das patogenias em frutos, podendo ser divididas em estratégias com efeitos no patógeno ou no hospedeiro (Oliveira, 2007).

A característica inerente ao hospedeiro é de grande valia nos estudos de controlo biológico, uma vez que a resistência da epiderme e textura da polpa constituem importantes parâmetros na invasividade do patógeno (Lima *et al.*, 1999).

Nas estratégias com efeitos no patógeno, salientam-se três tipos: a aplicação de produtos sanitários, de microrganismos antagonistas e de substâncias naturais com ação antimicrobiana (**figura 1.6**) (Botelho *et al.*, 2010; Oliveira, 2007; Yu *et al.*, 2007).



Figura 1.6: Principais estratégias com efeito direto e indireto nos patógenos de pós-colheita (Adaptado de: Oliveira, 2007).

O controlo biológico é uma das metodologias mais promissoras para o combate de pragas patogêneas, e representa uma alternativa vantajosa em relação ao controlo com produtos de síntese, especialmente quanto ao impacto ambiental, à especificidade e ao desenvolvimento de resistências (Franceschini *et al.*, 2001).

Por outro lado, a utilização de substâncias naturais com potencialidade fungitóxica, as quais devem ter baixa toxicidade em mamíferos, menos efeitos deletérios sobre o ambiente, e ampla aceitação pública, também constitui uma alternativa viável, constituindo um dos grandes desafios da agricultura sustentável (Carvalho, 2009; Berger, *et al.*, 2011). Além dos benefícios proporcionados à saúde, diversos estudos têm demonstrado o efeito inibidor de produtos naturais sobre o desenvolvimento de microrganismos patogénicos (Carvalho, 2009). Neste contexto, o quitosano tem sido um dos principais produtos de origem natural testados, com vista a minimizar as doenças de pós-colheita em frutas. Alternativamente, têm sido estudados tratamentos, ou substâncias, que induzem a produção de compostos antifúngicos nas plantas, ou que aumentam a resistência natural dos frutos às infeções (**figura 1.7**) (Oliveira, 2007).

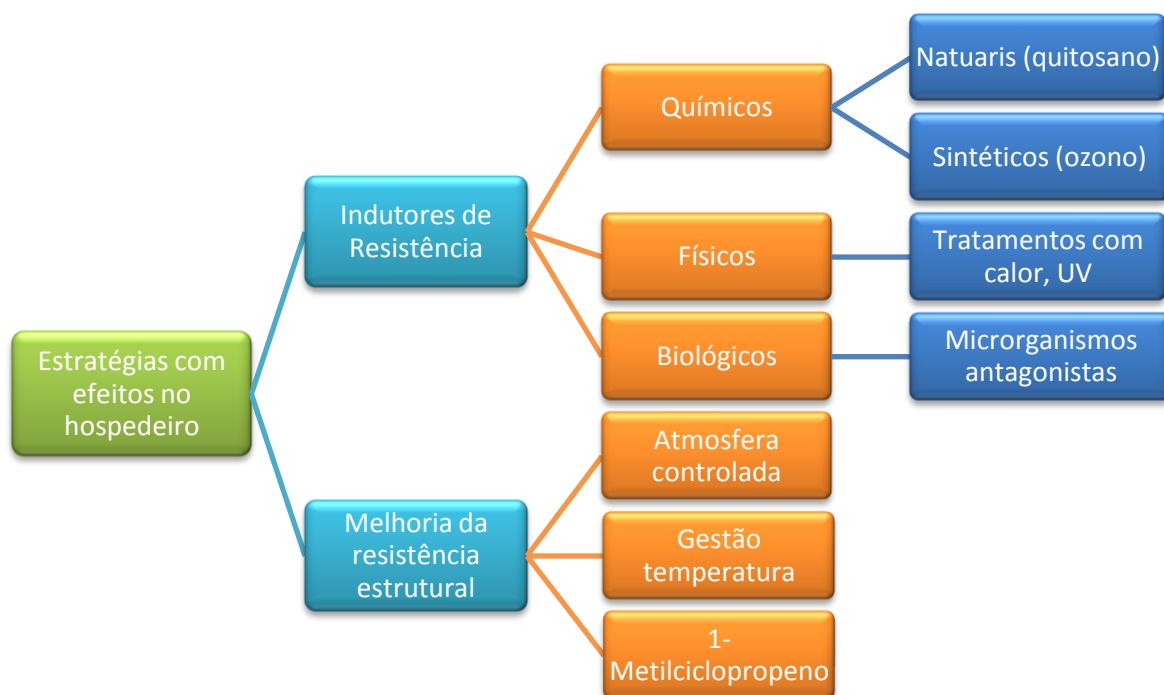


Figura 1.7: Principais estratégias com efeito nos frutos para o controlo das podridões de pós-colheita (Adaptado de: Oliveira, 2007).

### 1.3.1 Biocontrolo

Nos últimos anos têm-se verificado importantes progressos no controlo biológico como método alternativo aos fungicidas de síntese no controlo de doenças de pós-colheita de frutas (Oliveira, 2007; Coelho *et al.*, 2003). No entanto, os produtos biológicos ainda representam uma fração

mínima dos fungicidas comercializados no mercado mundial. No final da década de 90, o valor global das vendas de biofungicidas representou menos de 0,2% do mercado mundial de fungicidas (Ojiambo e Scherm, 2006). Contudo, devido às exigências da sociedade referentes à segurança alimentar e à necessidade de preservação do meio ambiente, as estratégias de controle biológico de pragas e doenças agrícolas ganharam maior destaque (Mello, 2012). Por outro lado, as legislações de vários países Europeus e Asiáticos, cada vez mais rigorosas no que respeita aos resíduos mínimos tolerados e à homologação de novos produtos, incrementaram consideravelmente as dificuldades para exportar frutas para esses países, pelo que o controle biológico representa uma alternativa de grande interesse económico. Apesar de serem mais específicos, os produtos biológicos são mais sensíveis quando comparados aos produtos de síntese, uma vez que a eficiência dos bioprodutos para sobreviver, colonizar e se multiplicar pode ser afetada diretamente pelos fatores bióticos locais (organismos vivos presentes) e abióticos (humidade, pH e temperatura) (Fischer, *et al.*, 2010).

Segundo a Environment Protection Agency (EPA), o biocontrole, também designado por controle biológico, pode ser definido, em sentido lato, como o uso de organismos no controle de pragas (EPA, 2000).

Por outro lado, Yu e col. (2007) referem que o controle biológico explora as atividades de um microrganismo para controlar o desenvolvimento de um segundo microrganismo (Yu *et al.*, 2007).

Assim, pode afirmar-se que o controle biológico tem por base as relações funcionais entre hospedeiro, patógeno e antagonista, uma vez que se procura utilizar microrganismos antagonistas que inviabilizem ou que reduzam o crescimento dos agentes patogénicos dos frutos, contribuindo assim para a redução das doenças pós-colheita até níveis economicamente viáveis (Barreiro, 2008).

No momento de escolher um antagonista, deve-se ter em conta a biossegurança, o crescimento e a habilidade de sobreviver sob condições desfavoráveis, a facilidade de utilização, a eficiência na utilização de nutrientes e o antagonismo contra diferentes hospedeiros (Droby *et al.*, 2009; Benítez, *et al.*, 2004). Além disso, o uso bem-sucedido do controle biológico requer um grande entendimento da biologia da doença e dos seus inimigos (Brumatti e Souza, 2012).

Um dos problemas decorrentes do uso do biocontrole deve-se à inconsistência dos resultados (de ano para ano), ao preço do produto, que poderá ser excessivo nalguns casos, às formulações e à passagem à escala comercial, uma vez que se trata de organismos vivos (Oliveira, 2007).

Contudo, essas limitações poderão ser ultrapassadas através da utilização da mistura de microrganismos, da manipulação das formulações e do ambiente de armazenagem, e da integração com outros tratamentos que ajudem a erradicar os esporos dos fungos na altura da aplicação, podendo ter efeitos aditivos ou sinérgicos (Oliveira, 2007).

Este método, ecologicamente viável e seguro, tem efeito fungistático e pode promover a proteção da cultura por um longo período de tempo (Berger *et al.*, 2011).

Ao contrário dos produtos químicos, o biocontrole, quanto à segurança alimentar, torna-se um fator importante na medida em que estes microrganismos não se acumulam nos alimentos. Os microrganismos biocontroladores não alteram, de modo significativo, o comportamento do patogéneo, sendo por isso um método persistente. Além disso têm um efeito reduzido no balanço ecológico, uma vez que não eliminam os inimigos naturais das espécies patogénicas, ao contrário de alguns fungicidas que favorecem o aparecimento de novas doenças.

Note-se ainda que os agentes de biocontrole podem ser compatíveis com outros métodos de controlo, incluindo produtos químicos de síntese, podendo serem aplicados em conjunto (Manso *et al.*, 2005; Vinãs, 1997).

Na **tabela 1.1** pode analisar-se a comparação e as diferenças quanto ao modo de ação entre os fungicidas químicos e o biocontrole.

Tabela 1.1: Comparação e diferenças quanto ao modo de ação entre os fungicidas químicos e o biocontrole (Oliveira, 2007).

<b>Fungicidas</b>	<b>Biocontrole</b>
Um único ingrediente ativo sintético	Mistura de ingredientes ativos e inativos, ingrediente ativo desconhecido
Bem caracterizados quimicamente e toxicologicamente	Quimicamente e toxicologicamente mal caracterizados, mas naturais
Eficácia alta	Eficácia variável, depende do meio
Resíduos, problemas de segurança	Produção biológica
Limitações à exportação	Não tem restrições à exportação
Controlam a podridão	Não erradicam a doença
Erradicam a doença causada por infeções existentes	Não têm atividade sobre infeções existentes
Protegem durante a conservação	Protegem contra infeções futuras
	Eficácia variável e nunca completa

O antagonismo é um processo complexo que pode ocorrer por diferentes mecanismos de ação, ou por uma combinação destes: amensalismo ou antibiose, competição por nutrientes, espaço e sítios de infeção, parasitismo, predação, hipovirulência e indução de mecanismos de defesa do hospedeiro (Bettiol e Ghini, 2009).

A competição pode ser definida como o comportamento de dois ou mais microrganismos perante um mesmo recurso necessário a ambos, levando à sua escassez. Os fatores

condicionantes mais comuns na competição são os nutrientes, o oxigénio e o espaço (Mendéz e Mondino, 1999).

A *Botrytis cinerea*, o *Penicillium expansum*, o *Penicillium italicum* e o *Penicillium digitatum* são fungos característicos do período de pós-colheita, cujos esporos requerem a presença de nutrientes no meio externo para poder germinar antes de penetrar no substrato. Estes nutrientes são disponibilizados através das lesões das frutas, sendo aqui que a competição pode atuar de forma a inibir o desenvolvimento destes fungos (Plaza, 2004; Mendéz e Mondino, 1999).

Para uma implementação bem-sucedida deve-se ter em conta os níveis de infeção que ocorrem no campo e o desenvolvimento de doenças pós-colheita, juntamente com as informações sobre a ecologia microbiana (Droby *et al.*, 2009).

Desta forma, a eficiência do biocontrolo está associada às propriedades antagonistas e aos mecanismos de ação que o agente de biocontrolo possa apresentar (Pereira, 2011).

A eficiência do antagonista revela um decréscimo proporcional ao aumento do tempo desde que originou a infeção e em que o antagonista foi aplicado (Cañamás *et al.*, 2007).

O antagonista deve ser estável, eficaz em baixa concentração e contra uma vasta gama de patogéneos, ter a capacidade de sobreviver às condições ambientais adversas e não ser prejudicial para a saúde humana (Droby *et al.*, 2009).

As leveduras reúnem várias destas características, pelo que o seu uso para o controlo biológico se tornou uma tecnologia promissora (Lidon, *et al.*, 2012). Pensa-se que as leveduras atuem principalmente por competição, pelo espaço ou utilização de determinados nutrientes podendo inibir o crescimento do agente fitopatogénico sem o eliminar, dominando e colonizando as feridas dos frutos (Oliveira e Mota, 2011; Spadaro *et al.*, 2002; Piano *et al.*, 1997).

As leveduras, como antagonistas, não produzem micotoxinas ou esporos alergénicos (Yu *et al.*, 2007). Apresentam uma boa taxa de utilização de nutrientes, o que lhes permite proliferar rapidamente. Além disso, produzem polissacáridos extracelulares que aumentam a sua sobrevivência, restringindo o espaço para o desenvolvimento do agente fitopatogénico. Normalmente são tolerantes aos fungicidas e frequentemente utilizados na pós-colheita (Spadaro e Guillino, 2004; Mendéz e Mondino, 1999). Deste modo, muitas espécies de leveduras têm sido referidas como bons antagonistas contra as doenças de pós-colheita, incluindo o fungo leveduriforme *Aureobasidium pullulans* (Vero *et al.*, 2009; Pais *et al.*, 2008).

#### **1.3.1.1 *Aureobasidium pullulans***

O fungo leveduriforme *Aureobasidium pullulans* pertence à classe *Dothideomycetes*, ordem *Dothideales*, família *Dothioraceae*, género *Aureobasidium* e espécie *A. pullulans*. Foi caracterizado a nível taxonómico por Hoog e Yurlova (1994), com base na sua morfologia e necessidades nutricionais (Hoog e Yurlova, 1994).

*A. pullulans* é um fungo amplamente distribuído na natureza. Encontra-se, geralmente, nas partes aéreas das plantas, uma vez que é um fungo dominante nas folhas. Dada a capacidade adaptativa de *A. pullulans* à baixa atividade de água, pode ser encontrado em rações para animais, rochas, madeira e gelo. Também cresce nas camadas superficiais de muitos tipos de solo, aumentando a sua fertilidade em azoto, e pode ser encontrado em ambientes de *stress* osmótico, nomeadamente em águas salinas (Zalar, *et al.*, 2008).

Uma vez que a espécie *A. pullulans* apresenta uma considerável variabilidade nas suas propriedades morfológicas e fisiológicas, ao longo das últimas décadas foram descritas, três variedades: *A. pullulans* var. *pullulans*, *A. pullulans* var. *melanogenum* e *A. pullulans* var. *aubasidani* Yurlova (Zalar *et al.*, 2008).

As duas primeiras são distinguíveis através da coloração da cultura. Na variedade *pullulans* a colónia permanece rosa, castanha clara ou amarela durante pelo menos três semanas, tornando-se, com o envelhecimento, castanha ou preta e aveludada com uma franja acinzentada, devido à pigmentação das hifas ou do desenvolvimento dos conídios. Este processo ocorre, normalmente, após 14 dias de incubação. Já na variedade *melanogenum* as colónias adquirem de imediato uma cor preta-esverdeada devido à tonalidade das suas hifas (Ellis, 2012; Pontón, *et al.*, 2002). A variedade *aubasidani* Yurlova apenas é distinguida pela produção de glucano com ligações  $\alpha$ -1,4-D-,  $\beta$ -1,6-D-e beta-1,3-D-glucosídicas (Zalar *et al.*, 2008).

Quando cultivadas em PDA, as colónias de *Aureobasidium pullulans* variedade *pullulans*, após sete dias de incubação, atingem cerca de 30-40 mm de diâmetro, apresentando um aspeto liso e escorregadio devido à esporulação abundante (**figura 1.8**) (Zalar *et al.*, 2008).

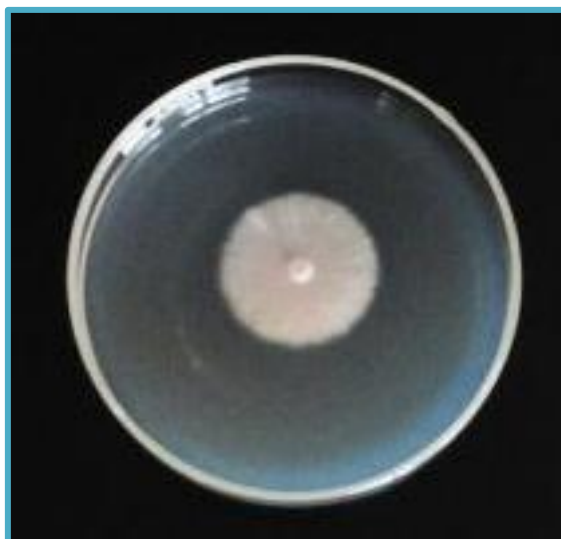


Figura 1.8: Colónia de *Aureobasidium pullulans* (original do autor).



Os conídios do *A. pullulans* podem multiplicar-se dando origem a conídios secundários. Estes formam aglomerados ou estão localizados ao longo das hifas, que são septadas, lisas e de paredes finas (**figura 1.9**) (Ellis, 2012; Zalar *et al.*, 2008).



Figura 1.9: Observação microscópica de *Aureobasidium pullulans* (Doctor fungus, 2007).

No que diz respeito à temperatura de crescimento, a maioria das estirpes cresce otimamente a 25°C, sendo sensíveis ao calor. No entanto, têm sido descritos alguns isolados que se conseguem desenvolver num intervalo amplo de temperatura: entre 2-35°C (Ellis, 2012).

Estudos anteriores verificaram que este fungo leveduriforme não apresenta qualquer tipo de patogenicidade para o ser humano, sendo por isso uma mais-valia para o biocontrolo de doenças pós-colheita (Ellis, 2012).

### 1.3.2 Quitosano

Como foi referido anteriormente, nos últimos anos o quitosano tem sido um dos produtos de origem natural estudado para o tratamento das patologias de pós-colheita em frutas. O quitosano é um polissacarídeo catiónico produzido através da desacetilação da quitina, um polissacarídeo amplamente distribuído na natureza.

A quitina, comercialmente extraída a partir da casca do camarão e do caranguejo, é um biopolímero formado por unidades monoméricas repetidas de  $\beta$  1,4-N-acetilglucosamina (**figura 1.11 A**) (Raafat *et al.*, 2008; Berger *et al.*, 2011).

Segundo Badawy e Rabea, a quitina foi descoberta em 1811, trinta anos depois da celulose, por Henri Braconnot, tendo sido o segundo polissacárido identificado pelo homem (Badawy e Rabea, 2011).

É um polissacárido abundante e largamente distribuído na natureza, uma vez que se encontra presente não só nas estruturas dos animais invertebrados, como também na parede celular de



fungos, nomeadamente os da classe *Zygomycete* da ordem Mucorales (Berger *et al.*, 2011) e em algumas espécies de algas (Pinto, 2005).

Devido ao seu difícil tratamento e à baixa solubilidade, resultantes da existência de fortes ligações de hidrogénio entre as cadeias poliméricas, a quitina tem uma aplicação ainda muito reduzida, embora seja uma fonte de matéria-prima com muitas potencialidades (Pinto, 2005).

Uma forma de contornar este problema consiste na desacetilação alcalina da quitina, através da utilização de NaOH, a temperaturas elevadas (cerca de 110°C), em várias fases e durante longos períodos de tempo, resultando o poli[ $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose], usualmente designado por quitosano (**figura 1.10**) (Moura *et al.*, 2006).



Figura 1.10: Fluxograma simplificado relativo à produção do quitosano (Adaptado de: Moura *et al.*, 2006).

Este biopolímero tem um potencial de aplicação versátil na indústria agroalimentar, tendo sido aprovado pela EPA como um biopesticida e pela FDA como um aditivo alimentar (Zhang *et al.*, 2011).

A quitina, assim como o quitosano (**figura 1.11 B**), tem sido relatada como uma alternativa promissora para controlar doenças de pós-colheita, especialmente em frutas e legumes, devido ao seu carácter natural e à sua atividade antimicrobiana (Zhang *et al.*, 2011). Por tal motivo, no presente trabalho, foi estudado o efeito do quitosano no controlo da podridão azul em pera 'Rocha'.

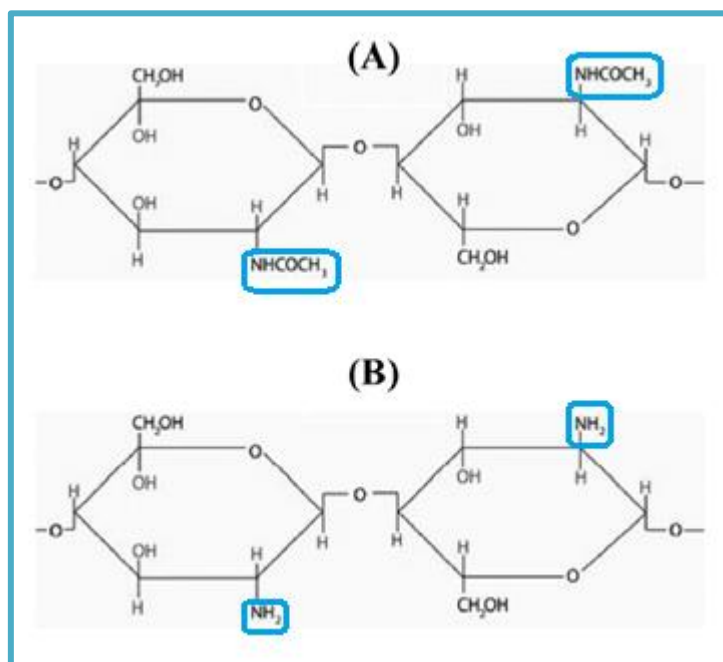


Figura 1.11: Estrutura química da quitina (A) e do quitosano (B) (Adaptado de: Bourtoom, 2008).

O quitosano obtém-se industrialmente por um processo de desacetilação alcalina da quitina (**figura 1.11**).

Segundo Moura e col., citado por Pinto, a desacetilação pode originar diversos tipos de quitosano, de acordo com o peso molecular do biopolímero e o grau de desacetilação. Este polissacarídeo, de fórmula molecular  $(\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5)_n$ , é de origem natural e tem sido alvo de intensa investigação nas últimas décadas (Pinto, 2005).

O quitosano é um aminopolissacarídeo linear, composto por unidades de glucosamina unidas a unidades de acetilglucosamina por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$  (**figura 1.11 B**) (Badawy e Rabea, 2011).

### 1.3.2.1 Propriedades do quitosano

É uma base fraca e é insolúvel em água e em solventes orgânicos, formando com facilidade um gel e/ou um filme (Berger *et al.*, 2011; Cordeiro, 2010). É solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos ou inorgânicos cujo pH seja inferior a 6 (Cordeiro, 2010). A sua solubilidade está diretamente relacionada com a quantidade de grupos amina que se encontram protonados (Pinto, 2005).

Este polissacarídeo tem sido alvo de diversos estudos devido às suas excelentes propriedades, nomeadamente: biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioatividade e capacidade adsorviva (Berger *et al.*, 2011; Cordeiro, 2010; Raafat *et al.*, 2008; Pinto, 2005).

O quitosano, para além de ser natural e não apresentar praticamente nenhuma toxicidade, é obtido a baixo custo. Além disso, possui características antioxidantes, antimicrobianas e

antifúngicas, sendo eficaz na inibição da germinação de esporos (Berger *et al.*, 2011; Cordeiro, 2010; Meng *et al.*, 2010 e Raafat *et al.*, 2008).

A atividade antimicrobiana é uma das propriedades mais importantes do quitosano, sendo eficaz contra uma vasta gama de fungos, leveduras e bactérias em produtos alimentares. Fatores como a composição do alimento, a acidez, as condições ambientais da elaboração da solução, a solubilidade, o grau de desacetilação, o peso molecular, a temperatura e humidade relativa e o tipo de microrganismo, podem influenciar a atividade antimicrobiana do quitosano (Badawy e Rabea, 2011; Pinho, 2011).

Quando utilizado no controlo das podridões de pós-colheita, o quitosano pode formar um filme semipermeável na superfície dos frutos, retardando a sua senescência e aumentando a sua resistência a infeções fúngicas (Reddy *et al.*, 2010). Além disso, regula a perda de humidade e a respiração do produto, atrasando o seu amadurecimento, mantendo o conteúdo fenólico final do fruto e melhorando a sua preservação pós-colheita (Berger *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, este polissacarídeo tem atraído muita atenção como agente antimicrobiano contra fungos, bactérias e vírus, e como eliciadores na indução de mecanismos de defesa nas plantas (Raafat *et al.*, 2008).

Quanto à toxicidade do quitosano, sabe-se que este polissacarídeo apresenta níveis muito reduzidos. A glicose tem uma dose letal que ronda as 8 a 12g por kg de massa corporal (em mamíferos), enquanto o quitosano numa concentração de 18g por kg de massa corporal não apresenta sinais de toxicidade e, muito menos, um efeito letal (Pinho, 2011). Contudo, como qualquer outra substância, quando utilizado de forma inadequada pode ser nocivo para o organismo, podendo-se registar uma desidratação gástrica (Pinho, 2011).

Estudos anteriores, verificaram que o quitosano tem um excelente potencial para ser misturado com outros agentes antimicrobianos, e aumentar o seu potencial bioativo (Cordeiro, 2010), também pode ser utilizado como agente antimicrobiano por si só ou misturado com outros polímeros naturais (Badawy e Rabea, 2011).

Deste modo, existe um crescente interesse em estudar e comprovar a eficiência deste polissacárido no controlo de doenças de pós-colheita de frutas, de forma a substituir os produtos químicos de síntese (Botelho *et al.*, 2010).

### **1.3.2.2 Utilização**

Nos últimos anos, o quitosano tem-se revelado um polissacarídeo de grande interesse nas diferentes aplicações industriais.

Devido às suas propriedades, tem sido utilizado na agricultura, em alimentos e bebidas, no fabrico de embalagens, no tratamento de águas e resíduos, na indústria farmacêutica e em cosméticos (Berger *et al.*, 2011; Raafat *et al.*, 2008; Rinoudo, 2006).

Na área alimentar, o quitosano é utilizado como espessante e estabilizante para molhos e como um inibidor da ação enzimática em sumos (Berger *et al.*, 2011; Rinoudo, 2006).

No que diz respeito à área ambiental, este polissacarídeo torna-se eficaz na remoção de iões metálicos e na redução de odores (Rinoudo, 2006).

Na agricultura, o quitosano tem sido aplicado como biofilme, como uma alternativa promissora para controlar doenças pós-colheita. Este polissacarídeo também estimula o sistema imune da planta, protege-a contra o ataque de patógenos e favorece o seu crescimento, aumentando a produção vegetal (Berger *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2010). A aplicação do quitosano pode aumentar a síntese de compostos antifúngicos na planta, induzindo a resistência natural das mesmas (Berger, *et al.*, 2011). De acordo com Benhamou (1996), a aplicação de uma solução de quitosano pode favorecer a resposta rápida ao ataque de patógenos pelo estímulo da produção de quitinase e glucanase. No entanto, existem autores que sugerem que a sua atuação passa por um efeito quelante, para impedir a disponibilidade de nutrientes essenciais ao crescimento dos microrganismos (Roller *et al.* 1999).

Assim, o quitosano pode utilizar-se por si só, como um agente antimicrobiano natural para o controlo de doenças de pós-colheita, ou como coadjuvante, combinado com outros agentes antimicrobianos, com o objetivo de aumentar o potencial bioativo dos mesmos.

#### **1.4 Enquadramento e objetivos do trabalho**

O presente trabalho realizou-se no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.), estando inserido no projeto FCT “SafeFruit - *Aureobasidium pullulans*, a biofungicida for the control of postharvest decay in pears: insights into its action mechanisms - Ref.: PTDC/AGR-ALI/118477/2010 “.

Na sequência de estudos efetuados anteriormente pelo grupo de Maturação e Pós-colheita do INIAV, foram isolados 32 microrganismos da superfície de frutos, folhas e ramos de pereira “Rocha” (Borges *et al.*, 2004). Neste contexto, no presente trabalho é proposta a utilização do antagonista microbiano, *Aureobasidium pullulans*, e de substâncias naturais com conhecido efeito fungistático ou fungicida, como é o caso do quitosano, para o controlo da podridão azul em pera ‘Rocha’. Com o intuito de avaliar a eficácia no controlo da doença e analisar os possíveis mecanismos de ação do antagonista e a resposta do hospedeiro, foi proposta a realização de ensaios *in vitro* e *in vivo* e de estudos citológicos com recurso a técnicas de microscopia ótica.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Ensaio *in vitro*

Com estes ensaios pretendeu-se estudar o efeito inibitório de uma solução ácida de quitosano sobre o *Penicillium expansum*, assim como os possíveis efeitos negativos sobre o *Aureobasidium pullulans*. Deste modo, testaram-se quatro modalidades:

- 1) Solução ácida a 5% com quitosano a diferentes concentrações + *P. expansum*
- 2) Solução ácida a 5% com quitosano a diferentes concentrações + *A. pullulans*
- 3) Solução ácida a 1% com quitosano a diferentes concentrações + *P. expansum*
- 4) Solução ácida a 1% com quitosano a diferentes concentrações + *A. pullulans*

#### 2.1.1 Preparação do meio de cultura e solução de quitosano

##### 2.1.1.1 Meio de cultura Agar de batata glucosada (PDA)

Para a preparação do meio de cultura, pesou-se, para um copo de precipitação, 39g de PDA (*Merck*) e adicionou-se 1L de água destilada. Posteriormente, a solução foi sujeita a esterilização em autoclave a 121°C durante 20 minutos. De salientar que abaixo dos 45°C  $\pm$  2, o PDA solidifica pelo que todo o manuseamento teve de ser o mais rápido possível. A 25°C, este meio de cultura apresenta um pH de 5,6  $\pm$  0,2.

##### 2.1.1.2 Quitosano

O quitosano utilizado foi de origem animal (exosqueleto de crustáceos), com cerca de 75-85% de desacetilação, de baixo peso molecular (LMW – *low molecular weight*) e comercializado pela marca Sigma-Aldrich.

Como referido anteriormente, o quitosano apenas é solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos cujo pH seja inferior a 6, deste modo fez-se uma solução mãe de quitosano em ácido acético. Em 200 mL de solução ácida (5% ou 1%) colocou-se 1g de quitosano, ficando com uma concentração final de 5g.L<sup>-1</sup>. As soluções de quitosano utilizados nos diferentes ensaios foram obtidas por diluição desta solução mãe.

#### 2.1.2 Isolamento de microrganismos

Os microrganismos utilizados foram isolados em estudos anteriores. O antagonista *Aureobasidium pullulans* foi isolado a partir de folhas e frutos de árvores de pera 'Rocha', colhidos em pomares situados na zona de Alcobaça. O patógeno *Penicillium expansum* foi isolado a partir de frutos infetados provenientes da mesma zona geográfica.

Na realização dos ensaios, utilizaram-se os microrganismos inoculados em meio de PDA e incubados durante 7 dias a 25°C.

### 2.1.3 Ensaio em meio sólido

#### 2.1.3.1 Ensaio para a otimização das concentrações de quitosano em solução de ácido acético a 5%

Para estudar a influência do quitosano na conservação de pera 'Rocha', foi necessário estudar a concentração ideal a utilizar, de maneira a inibir ao máximo o patogéneo e ao mínimo o antagonista, tendo-se recorrido a trabalhos anteriores efetuados por Meng e col. (2010) e por Bértolo (2011).

Deste modo, neste ensaio foram testadas as concentrações de 0 (controlo); 0,5; 0,7; 1; 1,2; 1,5; 1,8; 2 e 5 g. L<sup>-1</sup> de quitosano em solução de ácido acético a 5%.

Depois de se adicionar o quitosano à solução ácida foi necessário neutralizar a mesma com NaOH, de modo a que o pH ficasse ajustado para  $5,4 \pm 0,2$  (pH do meio de cultura).

Assim, para este ensaio, testaram-se nove tratamentos, para cada um dos microrganismos (*Penicillium expansum* e *Aureobasidium pullulans*), fazendo-se um replicado de 3 placas de Petri por concentração.

#### Preparação do inóculo

No caso do *P. expansum* foram preparados dois tipos de inóculo: um disco de 5mm de diâmetro com crescimento do fungo em meio PDA, obtido com o auxílio de um furador, e uma suspensão de esporos em água destilada esterilizada, obtida por raspagem do micélio do fungo. O tratamento com os discos de inóculo foi abandonado, por não se conseguir uma colónia isolada, mas sim várias colónias dispersas pelo meio de cultura, o que impedia a correta avaliação do crescimento do fungo.

Para o antagonista foram efetuados cortes no meio PDA inoculado com levedura, com o auxílio de um furador, de forma a obter-se um disco uniforme de 5mm de diâmetro.

#### Preparação do meio de cultura com quitosano

A partir de uma solução mãe de quitosano com uma concentração de 5 g.L<sup>-1</sup>, prepararam-se as diferentes concentrações, tendo-se adicionado ao meio de cultura PDA diferentes volumes dessa mesma solução, de modo a obter uma concentração final de: 0; 0,5; 0,7; 1; 1,2; 1,5; 1,8; 2 e 5 g.L<sup>-1</sup>.

#### Inoculação

No caso do *P. expansum* colocou-se 10 µL da suspensão de esporos no centro da placa de Petri e no caso do *A. pullulans*, o disco de inóculo foi colocado no centro da placa.

Em ambos os casos, as placas foram a incubar em estufa a 25°C, durante 6 dias.

### Leituras

O desenvolvimento microbiano foi monitorizado e efetuaram-se observações e medições do diâmetro da colónia, aos 2, 4 e 6 dias após a inoculação.

#### **2.1.3.2 Ensaio para a otimização das concentrações de quitosano em solução de ácido acético a 1%**

Neste ensaio foram testadas as concentrações de 0 (controlo); 0,5; 0,7; 1; 1,2; 1,6; 2 e 2,5 g.L<sup>-1</sup> de quitosano em solução de ácido acético a 1%. O procedimento foi igual ao ensaio anterior realizado com solução ácida a 5% (2.1.3.1).

### **2.2 Ensaio *in vivo***

De acordo com os resultados do ensaio *in vitro*, testou-se o efeito de *Aureobasidium pullulans* e de diferentes concentrações de quitosano em solução ácida a 1%, no controlo da podridão azul em pera 'Rocha'. Deste modo, analisaram-se onze modalidades (M):

- M0: Água
- M1: *Penicillium expansum*
- M2: *Aureobasidium pullulans*
- M3: *A. pullulans* + *P. expansum*
- M4: *P. expansum* + solução ácida (1%)
- M5: *P. expansum* + solução ácida (1%) de quitosano a 0,5 g.L<sup>-1</sup>
- M6: *P. expansum* + solução ácida (1%) de quitosano a 1,2 g.L<sup>-1</sup>
- M7: *P. expansum* + solução ácida (1%) de quitosano a 2,5 g.L<sup>-1</sup>
- M8: *A. pullulans* + *P. expansum* + solução ácida (1%)
- M9: *A. pullulans* + *P. expansum* + solução ácida (1%) de quitosano a 0,5 g.L<sup>-1</sup>
- M10: *A. pullulans* + *P. expansum* + solução ácida (1%) de quitosano a 1,2 g.L<sup>-1</sup>

#### **2.2.1 Matéria-prima**

A pera 'Rocha' (*Pyrus communis* L. cv. Rocha) foi a variedade escolhida para este ensaio. Os frutos foram colhidos num pomar da ex-Estação Nacional de Fruticultura Vieira Natividade (INRB), em Alcobaça, no estado de maturação comercial na campanha de 2011, tendo sido armazenados em câmaras de refrigeração entre -0,5 e 1°C, a uma humidade relativa de 90 a 95%, em atmosfera controlada até julho de 2012.

### 2.2.2 Preparação dos inóculos a utilizar no ensaio

Para a preparação do inóculo de *P. expansum* fez-se uma suspensão de esporos que se acertou, recorrendo ao hemacitómetro, para uma concentração final de  $4 \times 10^4$  ufc/mL, de acordo com estudos efetuados anteriormente pelo grupo de Maturação e Pós-colheita do INIA.

A câmara de *Neubauer*, também conhecida como hemacitómetro, consiste numa lâmina de microscopia com marcações em quadrantes de medidas conhecidas.

Observando-se ao microscópio, percebe-se que existem três tipos de quadrantes (**figura 2.1**) denominados A,B,C, que juntos formam um quadrado maior.

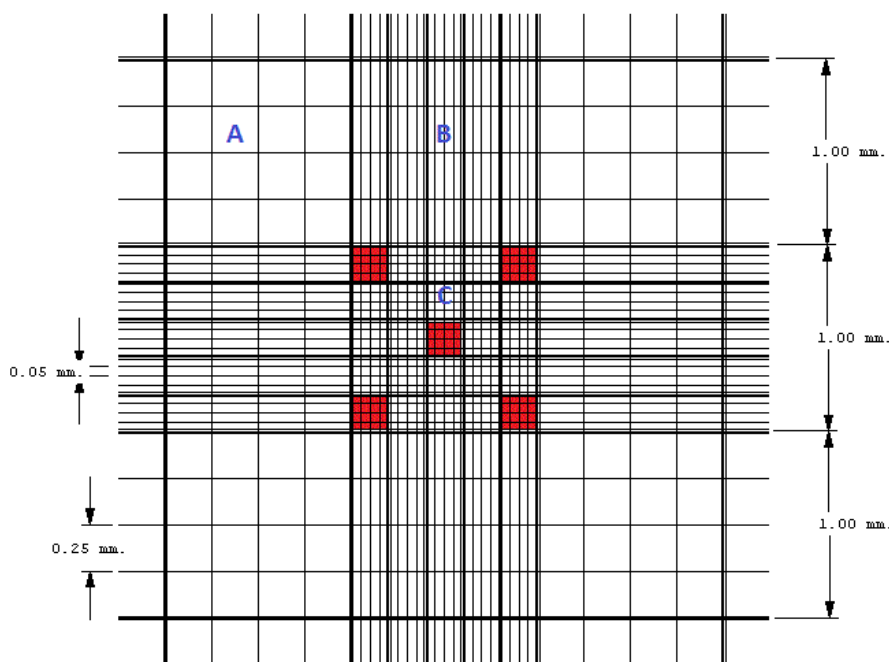


Figura 2.1: Câmara de Neubauer (Adaptado de: Bastidas, 2012).

Contou-se o número de esporos nos 5 sub-quadrantes de C, os quatro dos cantos e o sub-quadrante central (marcados a vermelho), sendo a concentração de células por mL dada por:

$$\text{Concentração de células x mL}^{-1} = \text{total de esporos nos 5 sub-quadrantes} \times 50\,000$$

Quando não é possível contar o número de esporos no quadrante C, conta-se o número de esporos nos 4 quadrantes A, sendo que o resultado final é o valor da contagem multiplicado por 2 500 e pelo fator de diluição.

Para o inóculo de *A. pullulans*, foi necessário preparar o meio caldo nutritivo glucosado com extrato de levedura (NYDB). Deste modo, para 1L de água destilada, pesou-se, 8g de caldo nutritivo (NB - *Merck*), 5g de extrato de levedura (Yeast extract - *Merck*) e 10g de D-glucose (*Merck*). Posteriormente, a solução foi esterilizada a 121°C durante 20 minutos.



O meio de cultura inoculado com um disco do antagonista foi a incubar, em banho-maria, a 25°C com agitação durante 48h. Seguiu-se uma centrifugação a 5 000 rpm durante 10 minutos. Com a centrifugação pretendeu-se separar o meio de cultura do antagonista. Por fim, efetuou-se uma filtração e acertou-se a concentração final para  $3 \times 10^8$  ufc/mL, recorrendo-se à câmara de *Neubauer*.

### **2.2.3 Ensaio de biocontrolo**

Para cada modalidade utilizaram-se 19 frutos, desinfetados com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, lavados com água e secos ao ar antes da sua utilização.

Posteriormente, em cada pera fez-se duas feridas (38 repetições), com 4 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade e a uma distância equidistante, cerca de 10 mm, da zona equatorial do fruto.

As concentrações das soluções de quitosano a utilizar neste ensaio foram seleccionadas a partir dos resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, sendo as mesmas 0,5, 1,2 e 2,5 g.L<sup>-1</sup>.

A metodologia utilizada para a inoculação das feridas foi a seguinte (**figura 2.2**):

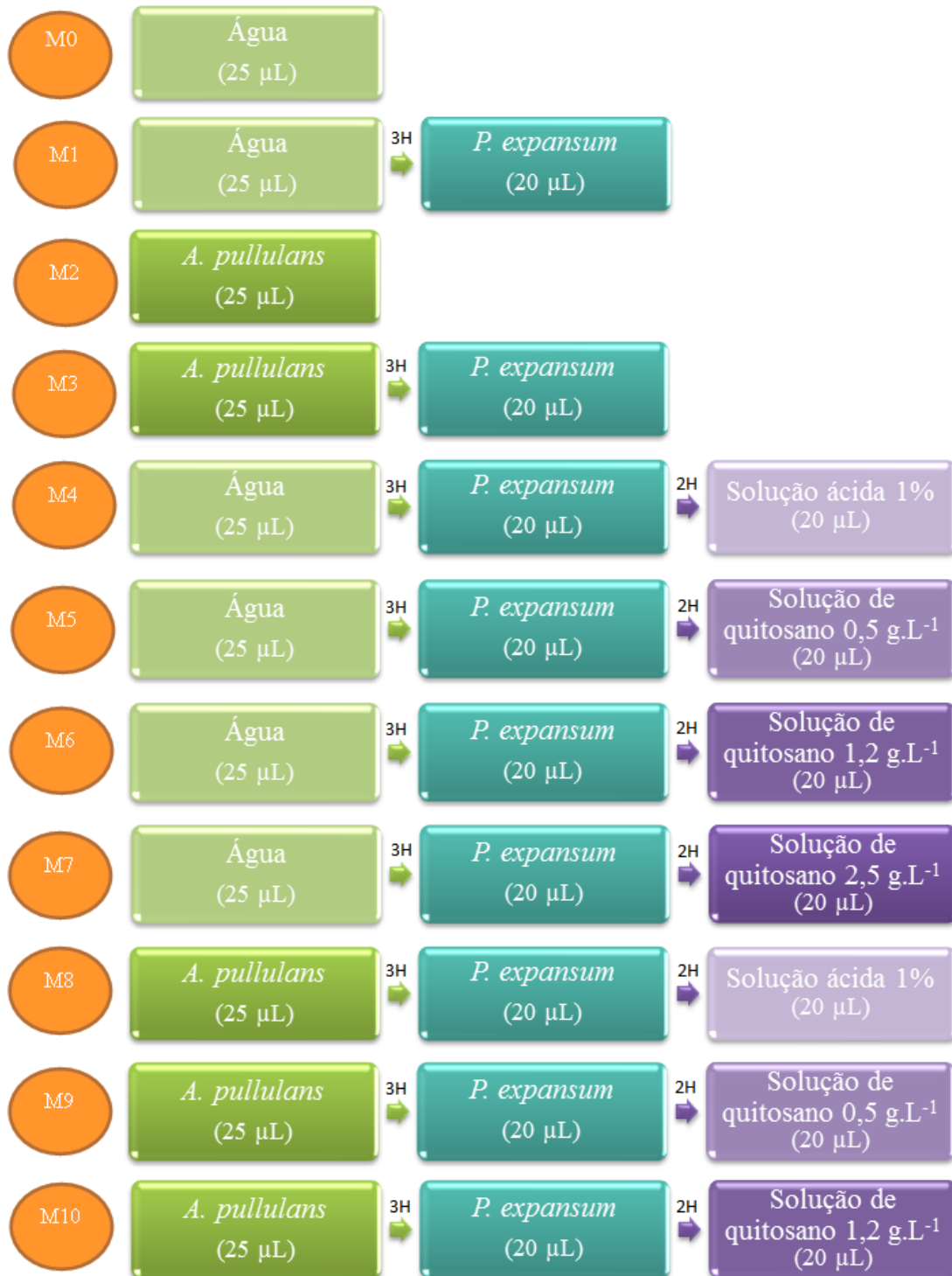


Figura 2.2: Metodologia utilizada para a inoculação das feridas.

O processo de inoculação foi realizado a temperatura ambiente. Posteriormente, os frutos foram a incubar numa câmara com temperatura próxima dos 24°C e humidade relativa controlada a 80-90%.

A capacidade de biocontrolo foi avaliada pelo número de feridas infetadas e pela redução do diâmetro da lesão ao longo de 7 dias, em relação à testemunha (M1), ambos expressos em percentagem.

Posteriormente, aplicou-se o teste ANOVA ( $P \leq 0,05$ ) para avaliação de diferenças nos resultados. Com base nos resultados obtidos, aplicou-se o teste de Tukey para comparação de médias.

Para o último dia, analisou-se também a percentagem de incidência e a eficácia do tratamento.

### **2.3 Observação citológica da polpa da pera 'Rocha': sem ferida e inoculada com *A. pullulans* ou *P. expansum* ou *A. pullulans* e *P. expansum***

#### **2.3.1 Processamento do material vegetal para observação em microscopia ótica**

De acordo com Salema e Santos (1992), a colheita do material foi realizada em condições que não permitissem a danificação da peça biológica e num curto espaço-tempo, para que não ocorressem alterações até ser fixada.

O material para análise foi retirado de uma zona que abrangeu a zona de ferida com ou sem inóculo (conforme a modalidade) e parte da polpa adjacente a esta (paredes da ferida).

Em cada modalidade foram retirados fragmentos de 2 pêras diferentes. As amostras foram recolhidas após 48h da inoculação (2º dia de incubação a 24°C).

##### **2.3.1.1 Fixação**

A fixação foi feita recorrendo a um fixador primário, glutaraldeído a 2,5% (v/v) em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, a 0°C. Seguiu-se uma pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1% (p/v) em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.2, durante duas horas à temperatura ambiente.

Embora o glutaraldeído seja um fixador aditivo, devido à sua composição, não confere contraste às estruturas. Por isso, fez-se atuar o tetróxido de ósmio, a fim de se melhorar a preservação e se obter a imagem das estruturas celulares (Salema e Santos, 1992).

De seguida fez-se uma lavagem rápida do material no mesmo tampão e procedeu-se à desidratação.

##### **2.3.1.2 Desidratação**

As amostras foram desidratadas em soluções de concentração crescente de etanol, de 10% a 100%, com permanência de cerca de 25 minutos em cada uma das soluções.

Esta etapa destinou-se a retirar a água livre em excesso existente nas células.

##### **2.3.1.3 Inclusão**

A inclusão dos tecidos foi efetuada em resina *Spurr*.

O material desidratado em etanol a 100% foi imerso sucessivamente em misturas de etanol puro e de resina nas seguintes proporções: 2:1 (v/v), 1:1 (v/v) e 1:2 (v/v) durante dois dias, posteriormente, foi deixado durante a noite, imerso em resina.

A polimerização da resina foi feita a 60°C em moldes específicos, durante 24 horas.

#### **2.3.1.4 Seccionamento**

Após a inclusão, os blocos foram desbastados em forma de tronco de pirâmide no micrótomo (*LKB bromma 11800* pyramitome) até se atingir o material, de modo a que as faces laterais do bloco formassem um ângulo de cerca de 40-30° com a base. Foram feitos cortes semifinos de 2-4 µm de espessura, de 3-5 blocos de cada modalidade.

Os cortes foram recolhidos com uma ansa e transferidos para uma lâmina de vidro, onde ficaram dentro de uma gota de água, cuja evaporação foi realizada em placa de aquecimento para histologia (*Sakura 1452*) a 70°C.

#### **2.3.1.5 Coloração**

Depois de estarem bem secos e distendidos sobre as lâminas de vidro, os cortes foram corados, com azul de toluidina 0.1%, secos na mesma placa elétrica e lavados em água. Por fim, fez-se a montagem definitiva dos cortes em meio de montagem *Entellan*.

As preparações ficaram prontas para serem observadas ao microscópio.

#### **2.3.1.6 Observação microscópica**

As observações microscópicas foram realizadas no microscópio ótico *Leica DM LB*, equipado com sistema de observação por contraste de fase. A amostragem foi constituída por 3-5 blocos de cada modalidade, tendo sido efetuados cerca de 120 cortes por bloco.

As observações foram registadas em fotografia digital, máquina fotográfica *Leica DFC 420C* e as imagens obtidas foram transferidas e tratadas pelo programa *Leica Application Suite v3.3.0*.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Ensaio *in vitro*

##### 3.1.1 Ensaio em meio sólido

Com o objetivo de estudar o efeito dos diferentes tratamentos com quitosano no crescimento dos microrganismos, recorreu-se à inoculação dos mesmos em meio sólido, com diferentes concentrações de quitosano, e à medição do diâmetro (mm) das colónias durante o período de incubação a 25°C.

Posteriormente, aplicou-se o teste ANOVA ( $P \leq 0,05$ ) para avaliação de diferenças nos resultados. Com base nos resultados obtidos, aplicou-se o teste de Tukey para comparação de médias.

##### 3.1.1.1 Ensaio para a otimização das concentrações de quitosano em solução de ácido acético a 5%

A atividade antimicrobiana da solução ácida de quitosano em diferentes concentrações, sobre o crescimento das colónias de *Penicillium expansum* e de *Aureobasidium pullulans*, pode ser analisada nas **tabelas 3.1 e 3.2**, respetivamente.

Tabela 3.1: Valores médios de crescimento da colónia ( $\emptyset$  mm) de *P. expansum* nas diferentes concentrações de quitosano em solução ácida a 5%. Letras diferentes traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes concentrações (a,b,c,d,e) e entre os dias de incubação (r,s,t).

<i>Penicillium expansum</i>			
[quitosano] g.L <sup>-1</sup>	2º dia	4º dia	6º dia
0	14,3 <sup>c, r</sup>	25,0 <sup>e, s</sup>	36,0 <sup>e, t</sup>
0,5	7,7 <sup>b, r</sup>	20,0 <sup>d, s</sup>	34,0 <sup>d, t</sup>
0,7	6,3 <sup>b, r</sup>	15,7 <sup>c, s</sup>	27,3 <sup>c, t</sup>
1	0,0 <sup>a, r</sup>	13,0 <sup>b, s</sup>	23,3 <sup>b, t</sup>
1,2	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>
1,5	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>
1,8	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>
2	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>
5	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>

Comparando com o crescimento do controlo (0 g.L<sup>-1</sup>), observou-se que todos os tratamentos aplicados tiveram um efeito inibitório no crescimento do fungo. Para as concentrações de 0,5 g.L<sup>-1</sup> e 0,7 g.L<sup>-1</sup>, verifica-se que no 2º dia o crescimento do fungo patogénico não apresenta

diferenças significativas. No entanto, a partir do 4º dia, as diferenças no crescimento das colónias começam a ser significativas.

Em geral, verificou-se que ao 6º dia, o tamanho das colónias diminuiu significativamente com o aumento da concentração da solução de quitosano, até à concentração de 1,2 g.L<sup>-1</sup>, não se registando qualquer desenvolvimento das colónias a partir desta concentração.

Tabela 3.2: Valores médios de crescimento da colónia (Ø mm) de *Aureobasidium pullulans* nas diferentes concentrações de solução ácida a 5% de quitosano. Letras diferentes traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes concentrações (a,b,c) e entre os dias de incubação (r,s,t).

<i>Aureobasidium pullulans</i>			
[quitosano] g.L <sup>-1</sup>	2º dia	4º dia	6º dia
0	10,7 <sup>c, r</sup>	17,3 <sup>c, s</sup>	33,7 <sup>c, t</sup>
0,5	2,0 <sup>b, r</sup>	5,0 <sup>b, s</sup>	12,0 <sup>b, t</sup>
0,7	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>
1	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>
1,2	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>
1,5	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>
1,8	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>
2	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>
5	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>	0,0 <sup>a, r</sup>

No controlo e na concentração de 0,5g.L<sup>-1</sup> verifica-se um aumento do crescimento da colónia, do 2º ao 6º dia, de 23 mm e de 10 mm, respetivamente. No entanto, comparando estas duas concentrações, ao fim de 6 dias, observa-se um decréscimo do diâmetro da levedura em 21,7 mm (~65%). Isto indica que a solução de quitosano, mesmo em baixas concentrações, já tem um efeito inibitório significativo no antagonista.

Efetivamente, durante as primeiras 48 horas verifica-se que não ocorreu crescimento micelial de *A. pullulans* a partir de 0,7 g.L<sup>-1</sup>, resultado que se manteve até ao fim do ensaio.

Posteriormente, analisou-se a percentagem de inibição para os dois microrganismos (**tabela 3.3** e **figura 3.1**), segundo a equação:

$$(100 \times (([0 \text{ quitosano}] - [x \text{ quitosano}]) / [0 \text{ quitosano}]))$$

[0 quitosano] = diâmetro da colónia (mm) com 0 g.L<sup>-1</sup> de quitosano

[x quitosano] = diâmetro da colónia (mm) com x g.L<sup>-1</sup> de quitosano

Tabela 3.3: Percentagem de inibição de *P. expansum* e *A. pullulans* nas diferentes concentrações de quitosano em solução ácida a 5% ao longo de 6 dias.

[quitosano] g.L <sup>-1</sup>	<i>Penicillium expansum</i>			<i>Aureobasidium pullulans</i>		
	2º dia	4º dia	6º dia	2º dia	4º dia	6º dia
<b>0,5</b>	47,0	20,0	5,6	81,0	71,2	64,4
<b>0,7</b>	56,0	37,0	24,1	100	100	100
<b>1</b>	100	48,0	35,2	100	100	100
<b>1,2</b>	100	100	100	100	100	100
<b>1,5</b>	100	100	100	100	100	100
<b>1,8</b>	100	100	100	100	100	100
<b>2</b>	100	100	100	100	100	100
<b>5</b>	100	100	100	100	100	100

Nas concentrações iniciais, à medida que se aumenta o tempo de incubação, verifica-se que a percentagem de inibição decresce, indicando uma certa capacidade de adaptação dos microrganismos às condições de crescimento impostas.

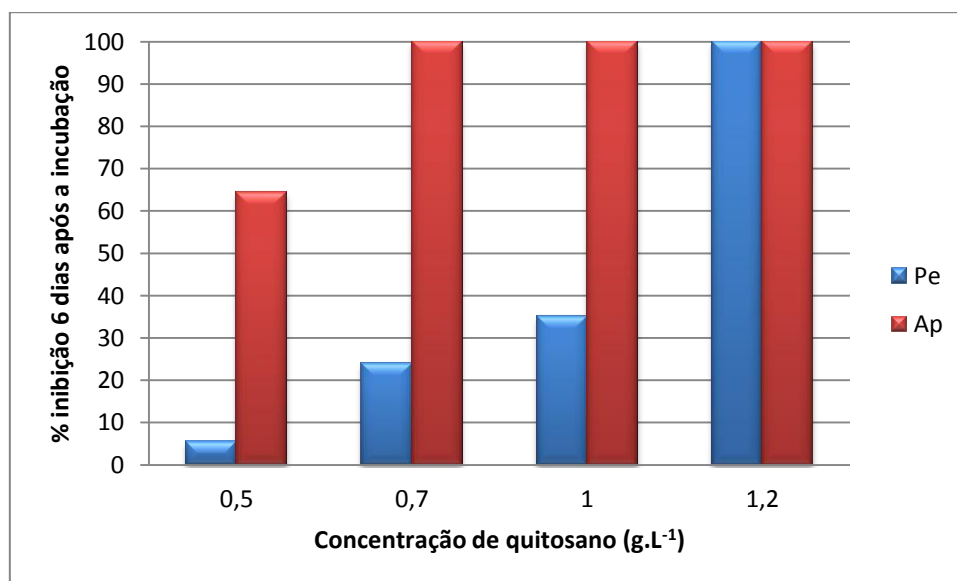


Figura 3.1: Percentagem de inibição do *P. expansum* (*Pe*) e do *A. pullulans* (*Ap*) produzida por diferentes concentrações de quitosano em solução ácida a 5%, após 6 dias de incubação.

Analisando a **figura 3.1**, verifica-se que o crescimento da colónia de *Aureobasidium pullulans* foi significativamente inibido pela solução de quitosano em todas as concentrações com exceção da concentração de 0,5 g.L<sup>-1</sup>, enquanto o crescimento de *Penicillium expansum* foi inibido a 100% somente quando a concentração de quitosano foi maior ou igual a 1,2 g.L<sup>-1</sup>. Em 2007, Yu

e col. apenas conseguiram uma inibição completa de *P. expansum* em concentrações iguais ou superiores a 3 g.L<sup>-1</sup> numa solução de ácido acético a 0,1%.

Assim, pode-se concluir que o crescimento micelial de *A. pullulans* é mais sensível à solução ácida de quitosano quando comparada com o *P. expansum*, uma vez que foi completamente inibido a partir da concentração de 0,7 g.L<sup>-1</sup>, enquanto o diâmetro da colónia do patogéneo foi de 27,3 mm para a concentração de 0,7 g.L<sup>-1</sup> e 23,3 mm para a concentração de 1 g.L<sup>-1</sup>.

Yu e col. (2007), verificaram ainda uma inibição do crescimento de *P. expansum* de 51,8% e de 91,8% nas concentrações de 1g.L<sup>-1</sup> e 2 g.L<sup>-1</sup>, respetivamente. No presente trabalho obtiveram-se resultados ligeiramente diferentes, 35,2% para a concentração de 1 g.L<sup>-1</sup> e 100% para a concentração de 2 g.L<sup>-1</sup>.

### 3.1.1.2 Ensaio para a otimização das concentrações de quitosano em solução de ácido acético a 1%

Nas tabelas 3.4 e 3.5 pode-se analisar, respetivamente, o crescimento das colónias de *Penicillium expansum* e de *Aureobasidium pullulans* em diferentes concentrações de quitosano.

Tabela 3.4: Valores médios de crescimento da colónia (Ø mm) de *P. expansum* nas diferentes concentrações de quitosano em solução ácida a 1%. Letras diferentes traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes concentrações (a,b,c,d,e,f,g,h) e entre os dias de incubação (r,s,t).

<i>Penicillium expansum</i>			
[quitosano] g.L <sup>-1</sup>	2º dia	4º dia	6º dia
0	9,0 <sup>h, r</sup>	13,3 <sup>g, s</sup>	14,0 <sup>g, s</sup>
0,5	5,5 <sup>b,c,d,e,f,g, r</sup>	6,7 <sup>d,e, r,s</sup>	9,0 <sup>b,c,d,e, t</sup>
0,7	5,0 <sup>b,c,d,e,f,g, r</sup>	7,7 <sup>d,e,f, s</sup>	9,3 <sup>b,c,d,e,f, s</sup>
1	4,0 <sup>a,b,c,d, r</sup>	7,3 <sup>d,e, s</sup>	9,0 <sup>b,c,d,e, s</sup>
1,2	4,7 <sup>a,b,c,d,e, r</sup>	6,7 <sup>c,d, s</sup>	8,0 <sup>a,b,c,d, s</sup>
1,6	3,3 <sup>a,b,c, r</sup>	4,7 <sup>a,b,c, r</sup>	7,5 <sup>a,b, s</sup>
2	2,8 <sup>a,b, r</sup>	4,0 <sup>a,b, r,s</sup>	7,9 <sup>a,b,c, t</sup>
2,5	2,1 <sup>a, r</sup>	3,0 <sup>a, r,s</sup>	6,4 <sup>a, t</sup>

Em conformidade com o observado por Liu e col. (2007), verificou-se que, em geral, quanto maior a concentração de quitosano, menor o crescimento micelial de *P. expansum*.

No 2º dia de incubação, para as concentrações de 0,5 g.L<sup>-1</sup> e 0,7 g. L<sup>-1</sup>, o crescimento do fungo não apresenta diferenças significativas. No entanto, o incremento da concentração para 1 g. L<sup>-1</sup>, provoca uma diminuição significativa do tamanho da colónia. Ao contrário do observado para a solução ácida a 5%, após 6 dias de incubação, na concentração de 1,2 g.L<sup>-1</sup> de quitosano,



consegue-se obter um crescimento da colónia de *P. expansum* de 8 mm, e nas concentrações superiores de quitosano a inibição nunca chega a ser total.

A partir do 4º dia de incubação, o crescimento do patogéneo não apresenta diferenças significativas entre as concentrações de 0,5 g.L<sup>-1</sup> e 1 g.L<sup>-1</sup>.

Tabela 3.5: Valores médios de crescimento da colónia (Ø mm) de *A. pullulans* nas diferentes concentrações de quitosano em solução ácida a 1%. Letras diferentes traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes concentrações (a,b,c,d,e,f,g,h) e entre os dias de incubação (r,s,t).

<i>Aureobasidium pullulans</i>			
[quitosano] g.L <sup>-1</sup>	2º dia	4º dia	6º dia
0	6,3 <sup>d,e,f, r</sup>	14,0 <sup>f,g,h, s</sup>	29,7 <sup>g, t</sup>
0,5	3,7 <sup>a,b,c, r</sup>	12,7 <sup>c,d,e,f,g, s</sup>	25,3 <sup>e,f, t</sup>
0,7	5,0 <sup>b,c,d, r</sup>	12,3 <sup>c,d,e,f, s</sup>	24,3 <sup>d,e, t</sup>
1	5,3 <sup>b,c,d,e, r</sup>	11,7 <sup>b,c,d,e, s</sup>	22,3 <sup>d, t</sup>
1,2	5,0 <sup>b,c,d, r</sup>	11,0 <sup>a,b,c,d, s</sup>	22,3 <sup>d, t</sup>
1,6	3,3 <sup>a,b, r</sup>	10,7 <sup>a,b,c, s</sup>	16,3 <sup>a,b,c, t</sup>
2	3,7 <sup>a,b,c, r</sup>	9,3 <sup>a, s</sup>	15,0 <sup>a,b, t</sup>
2,5	2,7 <sup>a, r</sup>	9,7 <sup>a,b, s</sup>	14,7 <sup>a, t</sup>

Na **tabela 3.5** pode observar-se que, em todas as concentrações testadas, a solução de quitosano tem um certo efeito inibidor no crescimento do fungo leveduriforme, quando comparado com o controlo sem quitosano. De maneira semelhante que para o patogéneo, quanto maior a concentração de quitosano, menor o crescimento da colónia do antagonista. Estes resultados concordam com os previamente descritos por Botelho e col. (2010). Contudo, constata-se que no 6º dia de incubação, para as diferentes concentrações de quitosano, o tamanho da colónia do antagonista só apresenta uma redução significativa a partir da concentração de 1,2 g.L<sup>-1</sup>.

Analisando a **tabela 3.6** verifica-se que o efeito inibitório sobre o antagonista e sobre o agente patogénico está diretamente correlacionado com a concentração de solução ácida de quitosano, como observado por Liu e col., 2007.

Tabela 3.6: Percentagem de inibição do *P. expansum* e do *A. pullulans* nas diferentes concentrações de quitosano em solução ácida a 1% ao longo de 6 dias.

[quitosano] g.L <sup>-1</sup>	<i>Penicillium expansum</i>			<i>Aureobasidium pullulans</i>		
	2º dia	4º dia	6º dia	2º dia	4º dia	6º dia
<b>0,5</b>	38,6	50,0	35,7	42,1	9,5	14,6
<b>0,7</b>	44,4	42,5	33,4	21,1	11,9	18,0
<b>1</b>	55,6	45,0	35,7	15,8	16,7	24,7
<b>1,2</b>	48,1	50,0	42,9	21,1	21,4	24,7
<b>1,6</b>	69,2	56,0	45,7	47,4	23,8	44,9
<b>2</b>	69,2	56,0	45,7	42,1	33,3	49,4
<b>2,5</b>	76,9	68,0	54,3	57,9	31,0	50,6

Com exceção das concentrações 0,5 g.L<sup>-1</sup> e 1,2 g.L<sup>-1</sup>, verifica-se que a percentagem de inibição do *P. expansum*, diminui ao longo do tempo de incubação, surgindo a ideia que a solução de quitosano é mais eficaz durante a fase de adaptação. Segundo Pacheco e col. (2008), este atraso da fase de latência deve-se à maior atividade fungistática do quitosano durante a germinação dos esporos, onde ocorre a interação do biopolímero com a parede celular dos conídios.

Constata-se que o *Aureobasidium pullulans* é menos afetado pela solução de quitosano no 4º dia. Assim, e dado os resultados obtidos, poder-se-á referir que no 4º dia se obtém resultados mais favoráveis para o controlo da podridão azul, porque o *P. expansum* é inibido por volta dos 50% enquanto o antagonista é inibido em cerca de 20%.

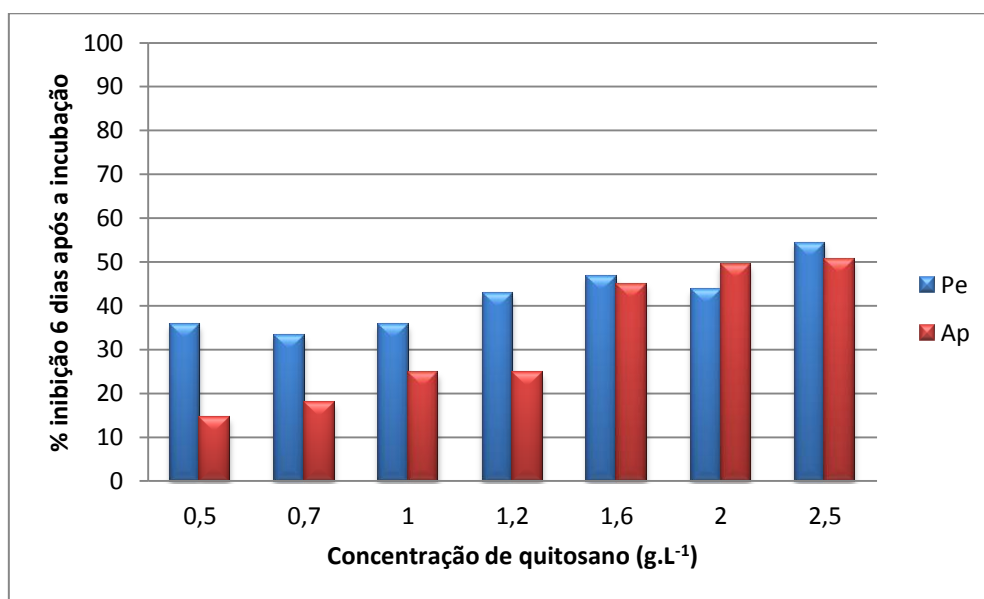


Figura 3.2: Percentagem de inibição do *P. expansum* (*Pe*) e do *A. pullulans* (*Ap*) produzida por diferentes concentrações de quitosano em solução ácida a 1%, após 6 dias de incubação.

Na **figura 3.2**, pode ver-se que na concentração máxima testada, ao fim de 6 dias, o antagonista *A. pullulans* é inibido em apenas 51%, comparativamente aos 100% da solução ácida a 5%. Para o *P. expansum*, apenas se conseguiu uma taxa de inibição de 54% na concentração de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de quitosano, resultado semelhante ao obtido por Pacheco e col. (2008), com uma percentagem de inibição de 53,6.

Apesar do efeito inibitório estar correlacionado com a concentração de solução de quitosano, ambos os microrganismos são afetados de maneira diferente, no entanto, observa-se que nas concentrações mais elevadas, os dois microrganismos são inibidos numa taxa muito semelhante, podendo não existir nenhum benefício derivado do efeito sinérgico do *Aureobasidium pullulans* e o quitosano quando aplicados em conjunto.

Estes resultados sugerem que as condições ideais para o controlo da podridão azul em pera 'Rocha', combinando o efeito antagónico de *A. pullulans* e antifúngico do quitosano, correspondem a 1,2 g.L<sup>-1</sup>, concentração de quitosano na qual o efeito inibidor é elevado no patogéneo e reduzido no antagonista.

Nas **figuras 3.3** e **3.4** pode-se observar o aspeto das colónias de *P. expansum* e de *A. pullulans*, respetivamente, em diferentes concentrações de solução de quitosano.

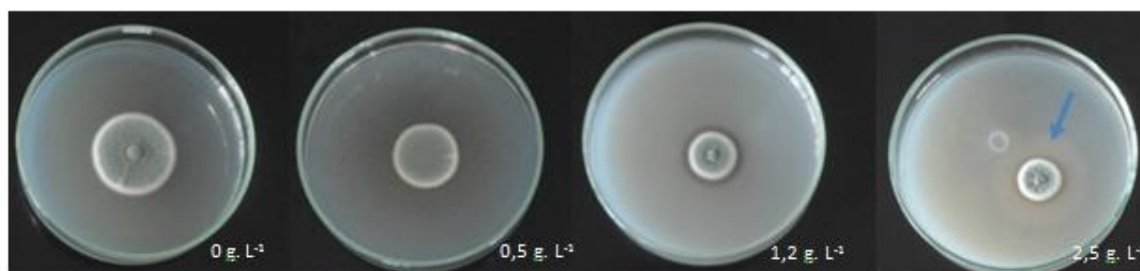


Figura 3.3: Crescimento da colónia de *P.expansum* em solução ácida a 1% de quitosano na concentração de: 0 g.L<sup>-1</sup>, 0,5 g.L<sup>-1</sup>, 1,2 g.L<sup>-1</sup> e 2,5 g.L<sup>-1</sup> após 6 dias de incubação.

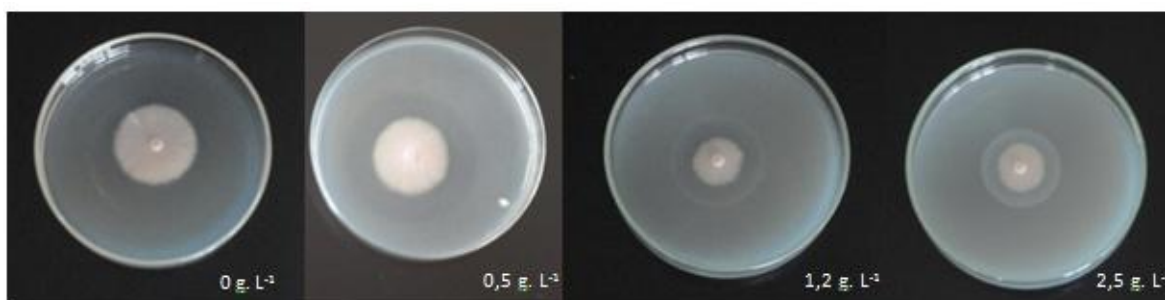


Figura 3.4: Crescimento da colónia de *A. pullulans* em solução ácida a 1% de quitosano na concentração de: 0 g.L<sup>-1</sup>, 0,5 g.L<sup>-1</sup>, 1,2 g.L<sup>-1</sup> e 2,5 g.L<sup>-1</sup> após 6 dias de incubação.

Observando a **figura 3.3** é evidente uma zona mais clara à volta da colónia de *P. expansum*, na concentração de 2,5 g.L<sup>-1</sup> e uma zona transparente na concentração de 1,2 g.L<sup>-1</sup>. Segundo Yu e

col.(2008), tal facto poderá ser uma indicação do mecanismo de adaptação por parte do microrganismo. Os mesmos autores verificaram o mesmo ao inocularem outras duas espécies, *Penicillium guilliermandii* e *Penicillium digitatum*.

No ensaio com o antagonista (**figura 3.4**) observou-se a formação de um halo que era mais evidente, isto é, mais esbranquiçado e com tons ligeiramente alaranjados, à medida que se aumentava a concentração da solução ácida de quitosano. Aspeto semelhante foi constatado por Vero e col. (2009) que visualizaram o aparecimento de um pigmento laranja sob e perto das colónias de *Aureobasidium pullulans* e o aparecimento de halos avermelhados-laranja à volta das colónias, nas concentrações mais elevadas de quitosano em meio enriquecido com ferro.

## 3.2. Ensaio *in vivo*

### 3.2.1 Desenvolvimento microbiano

Na **tabela 3.7** representa-se o crescimento microbiano, expressado como diâmetro médio da lesão, para as diferentes modalidades estudadas ao longo de 7 dias.

Tabela 3.7: Diâmetros médios ( $\emptyset$  mm) da lesão nas diferentes modalidades. Letras diferentes traduzem diferenças significativas para um grau de confiança de 95% entre diferentes modalidades (a,b,c,d,e,f,g,h,i) e entre os dias de incubação (r,s,t,u,v).

Modalidades	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia
<b>M0</b>	0,00 <sup>a, r</sup>	0,00 <sup>a, r</sup>	0,00 <sup>a, r</sup>	0,00 <sup>a, r</sup>	0,00 <sup>a, r</sup>
<b>M1</b>	4,97 <sup>b,c, r</sup>	13,33 <sup>e,f, s</sup>	20,09 <sup>f,g, t</sup>	27,55 <sup>f,g, u</sup>	33,92 <sup>f,g,h, v</sup>
<b>M2</b>	0,00 <sup>a, r</sup>	0,00 <sup>a, r</sup>	0,00 <sup>a, r</sup>	0,00 <sup>a, r</sup>	0,00 <sup>a, r</sup>
<b>M3</b>	0,00 <sup>a, r</sup>	0,46 <sup>a,b, r</sup>	4,12 <sup>b,c, s</sup>	5,29 <sup>b, s</sup>	9,96 <sup>b,c, t</sup>
<b>M4</b>	8,20 <sup>d,e, r</sup>	15,63 <sup>f,g,h, s</sup>	21,87 <sup>f,g,h,i, t</sup>	29,47 <sup>g,h,i, u</sup>	35,11 <sup>f,g,h,i, v</sup>
<b>M5</b>	6,88 <sup>c,d,e, r</sup>	14,30 <sup>e,f,g,h, s</sup>	20,46 <sup>f,g,h, t</sup>	27,80 <sup>f,g,h, u</sup>	33,34 <sup>f,g, v</sup>
<b>M6</b>	6,33 <sup>c,d, r</sup>	13,82 <sup>e,f,g, s</sup>	20,66 <sup>f,g,h,i, t</sup>	28,03 <sup>f,g,h,i, u</sup>	34,13 <sup>f,g,h,i, v</sup>
<b>M7</b>	2,67 <sup>a,b, r</sup>	12,33 <sup>e, s</sup>	19,13 <sup>f, t</sup>	26,51 <sup>f, u</sup>	32,68 <sup>f, v</sup>
<b>M8</b>	0,00 <sup>a, r</sup>	0,00 <sup>a, r</sup>	2,64 <sup>a,b, r</sup>	6,39 <sup>b,c, s</sup>	9,86 <sup>b, t</sup>
<b>M9</b>	0,00 <sup>a, r</sup>	1,11 <sup>a,b,c,d, r</sup>	5,05 <sup>b,c,d, s</sup>	9,93 <sup>d, t</sup>	15,01 <sup>d, u</sup>
<b>M10</b>	0,00 <sup>a, r</sup>	1,03 <sup>a,b,c, r</sup>	5,82 <sup>c,d,e, s</sup>	11,61 <sup>d,e, t</sup>	16,21 <sup>d,e, u</sup>

Ao longo dos 7 dias de incubação, verificou-se um aumento progressivo do diâmetro da lesão em todas as modalidades, com exceção da M0 e M2, que foram inoculadas apenas com água estéril (controlo) e com *A. pullulans*, respetivamente. Os frutos destas modalidades não mostraram nenhuma alteração visível. No último dia do ensaio, as feridas apresentavam um

aspecto limpo e totalmente cicatrizado, demonstrando que o antagonista não exerce nenhum efeito patogénico sobre o fruto, segundo descrito previamente (Borges, et al 2004).

Na **figura 3.5** representa-se o desenvolvimento microbiano no 7º dia após a inoculação, em todas as modalidades testadas.

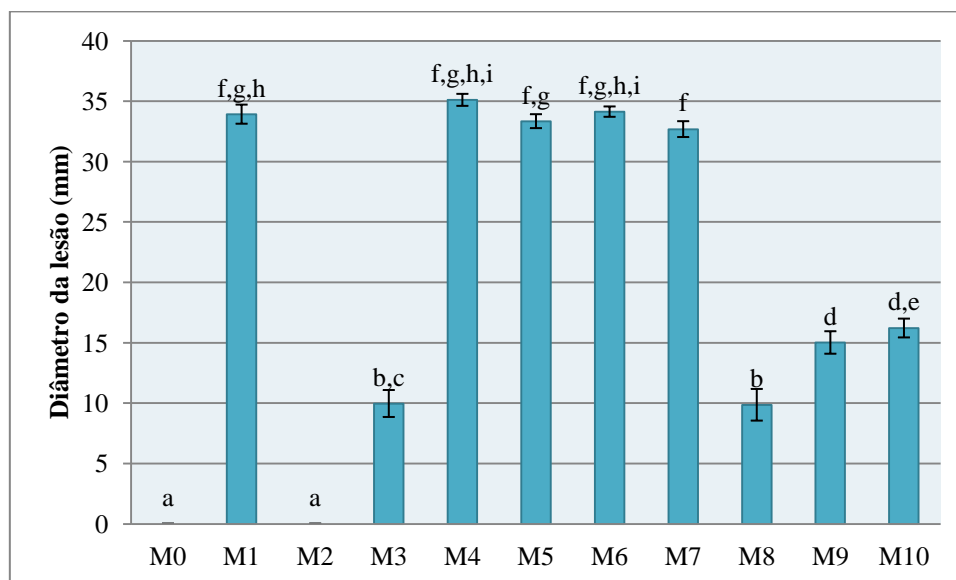


Figura 3.5: Diâmetro da lesão nas diferentes modalidades ao fim de 7 dias.

Verificou-se que não existem diferenças significativas entre as modalidades onde apenas foi inoculado *Penicillium expansum* (M1) e *P. expansum* com solução ácida (M4) ou com solução de quitosano em diferentes concentrações (M5, M6 e M7). Nestes casos, o diâmetro da lesão variou entre 32,7 e 35,1 mm.

Estes resultados indicam que o quitosano, nas concentrações testadas, não pode controlar efetivamente o crescimento *in vivo* do patogéneo. O mesmo foi verificado por Capdeville *e col.* (2002), que não observaram efeitos evidentes na redução do diâmetro da lesão como consequência dos tratamentos com quitosano para o controlo de *Penicillium expansum* em maçã.

Comparando M1 com M3, constatou-se que o *A. pullulans* teve efeito inibitório significativo face ao patogéneo. No entanto, entre as modalidades M8, M9 e M10 observou-se um certo efeito retardador do crescimento, que concorda com o efeito negativo da solução de quitosano sobre o antagonista observado *in vitro*. O efeito sinérgico do *A. pullulans* com a solução de quitosano (M8, M9 e M10), não revelou uma mais-valia quando comparado com o uso único do antagonista (M3), o que também foi verificado anteriormente por Vero *e col.* (2009).

Analisando o desenvolvimento microbiano, verificou-se que a inoculação da levedura (M3, M8, M9 e M10), levou a um aumento da percentagem de inibição do patogéneo, isto é, apresentou um menor crescimento face a M1. Segundo outros autores (Pacheco, *et al.*, 2008; Condeville, *et*

*al.*, 2002; Janisiewicz e Lise Korsten, 2002) este efeito deve-se à competição por os nutrientes juntamente com a interação da levedura com as hifas de *P. expansum*.

Neste estudo, bem como no de Borges e col. (2004), verificou-se que o antagonista inibiu o desenvolvimento de *P. expansum* em todas as concentrações testadas.

Nas **figuras 3.6** e **3.7** pode-se observar a evolução das lesões nas diferentes modalidades, respetivamente no 4º e 6º dia de incubação.



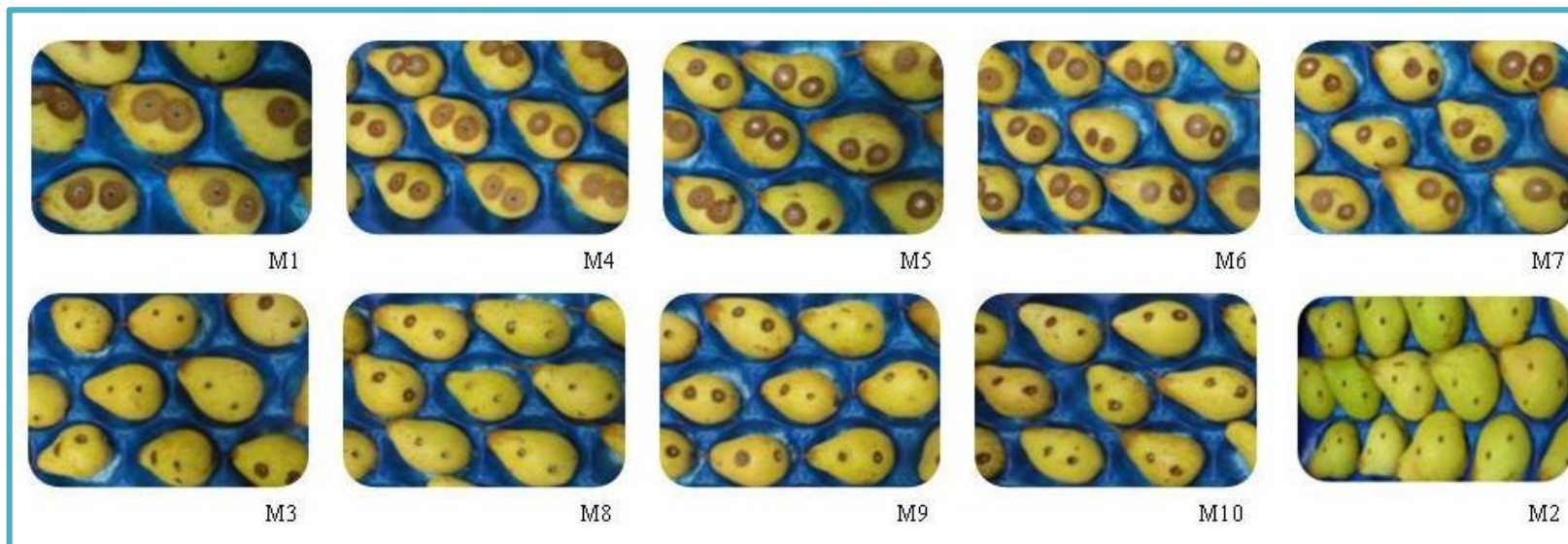


Figura 3.6: Lesões da pera nas diferentes modalidades, após 4 dias de inoculação.

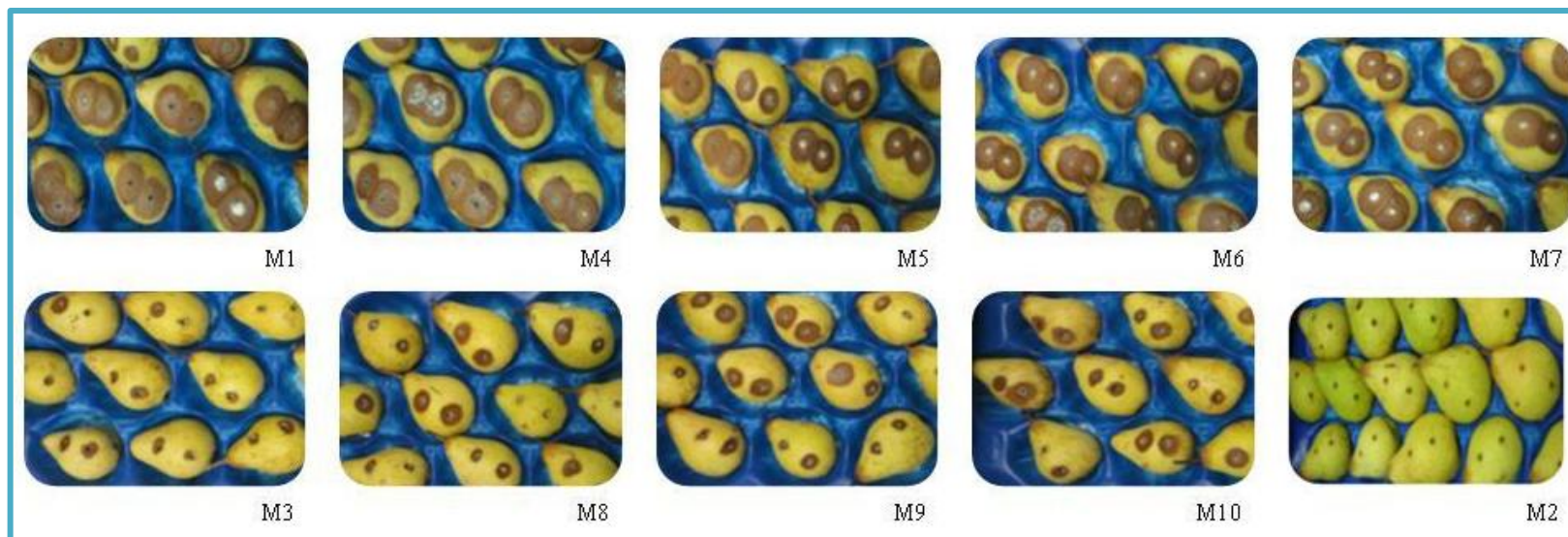


Figura 3.7: Lesões da pera nas diferentes modalidades, após 6 dias de inoculação.

### 3.2.2 Percentagem de incidência

Para efeitos de avaliação do grau de incidência da doença, comparam-se as diferentes modalidades inoculadas com *Penicillium expansum* quanto ao número de feridas infetadas.

Deste modo, determinou-se a percentagem de incidência para cada modalidade (**figura 3.8**), em que:

$$\% \text{ Incidência} = (\text{número de feridas infetadas} \times 100) / \text{número total de feridas}$$

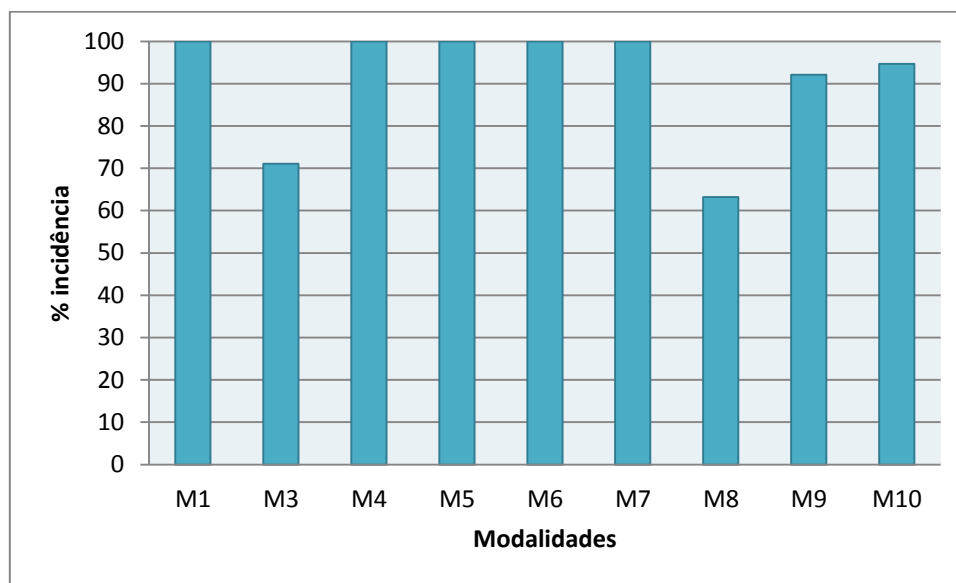


Figura 3.8: Percentagem de incidência nas diferentes modalidades ao fim de 7 dias.

Nas modalidades em que não foi inoculado *Aureobasidium pullulans* (M1, M4, M5, M6 e M7) verificou-se que as 38 feridas foram colonizadas pelo patógeno, apresentando uma taxa de incidência da doença de 100%. Deste modo, quando inoculado o patógeno e a solução de quitosano na mesma ferida, constatou-se que não houve qualquer controlo da podridão azul, em comparação aos frutos inoculados somente com *P. expansum* (M1).

No entanto, observou-se uma redução de cerca de 30% na incidência de podridão quando comparada a modalidade M3 com M1. Comparativamente ao estudo efetuado por Borges e col. (2004), este valor encontra-se ligeiramente inferior, uma vez que os autores conseguiram uma redução de incidência de, pelo menos, 50%.

Verificou-se que a combinação de *A. pullulans* com a solução de quitosano (M9 e M10) na mesma ferida, resultou numa redução de cerca de 10%. Quando comparado com M3, observa-se que não há uma mais-valia na adição da solução de quitosano.

Em 2009, Vero e col., obtiveram resultados diferentes tendo concluído que, quer o antagonista *Aureobasidium pullulans* quer a solução de quitosano, quando inoculados separadamente, reduzem significativamente a incidência de *Penicillium expansum*. Sugeriram também que a combinação dos dois agentes na mesma ferida não resultaria em qualquer controlo adicional.



Contraditoriamente, na modalidade M8, observou-se uma taxa de incidência da doença inferior a M3, o que parece indicar que, *in vivo*, a solução de ácido acético a 1% (M8) teve um maior efeito inibidor sobre o patógeno e um efeito negativo mínimo ou nulo sobre o antagonista, o que contribuiu para a redução do número de feridas infetadas.

No entanto, sendo o grau de incidência menor, e se se tiver em atenção que o diâmetro médio foi semelhante, tal implica que as feridas infetadas tiveram um diâmetro superior na modalidade M8.

Analisando M8, M9 e M10 verificou-se que quanto maior a concentração da solução de quitosano, maior foi a taxa de incidência, ou seja maior o número de feridas infetadas. Esta ação parece dever-se ao efeito negativo do quitosano sobre o *Aureobasidium pullulans* o qual, devido ao seu fraco desenvolvimento, teve maior dificuldade em controlar o *Penicillium expansum*.

### 3.2.3 Eficácia do tratamento

Como mencionado anteriormente, também se realizou a determinação da eficácia dos tratamentos, recorrendo-se à determinação da percentagem de redução do diâmetro e à redução do número de feridas infetadas.

#### 3.2.3.1 Redução do diâmetro das feridas

Na **figura 3.9** pode avaliar-se a eficácia do tratamento, através da redução do diâmetro das feridas, ao fim de 7 dias, em que:

$$\text{Redução do diâmetro (\%)} = 100 \times (\text{diâmetro M1} - \text{diâmetro Mx}) / \text{diâmetro M1}$$

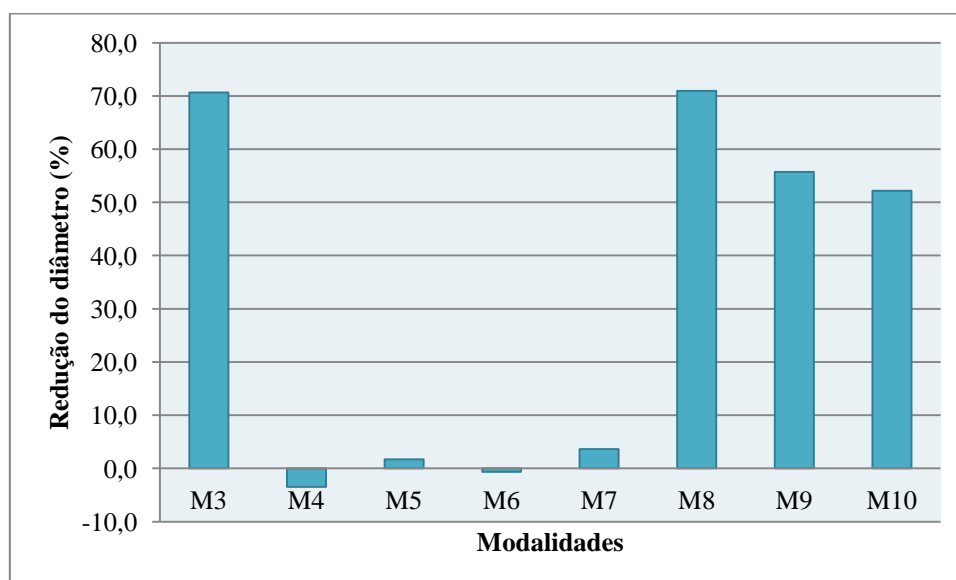


Figura 3.9: Eficácia do tratamento (%) nas diferentes modalidades ao fim de 7 dias.

Analisando o gráfico, verifica-se que na modalidade em que apenas foi inoculado *Aureobasidium pullulans* e *Penicillium expansum* (M3) e na modalidade em que foram

inoculados os dois microrganismos juntamente com a solução ácida a 1% (M8) se observou uma eficácia de cerca de 70% para ambas as modalidades. Seguiu-se M9 e M10, apresentando uma eficácia de 56 e 52%, respetivamente. Em 2009, Vero e col., também observaram uma eficácia de 70% na modalidade em que apenas inocularam os dois microrganismos.

Nas restantes modalidades (M4 e M7), não se observou qualquer eficácia do tratamento, podendo significar que a redução do tamanho das feridas não se deve à aplicação da solução de quitosano mas sim à aplicação do *Aureobasidium pullulans*. Observou-se que quando inoculados os dois microrganismos e a solução de quitosano (M8, M9 e M10), à medida que se aumentava a concentração da solução, a eficácia do tratamento era menor.

Resultados diferentes foram obtidos por Yu, e col (2007) para o controlo da podridão azul em maçãs, onde constataram que a aplicação de quitosano nas feridas, foi eficaz na inibição da podridão causada por *P. expansum*. Os mesmos autores verificaram que essa eficácia estava relacionada com a concentração da solução de quitosano e que em concentrações iguais ou inferiores a 1g. L<sup>-1</sup> o biopolímero não restringiu a ocorrência do fungo.

### 3.2.3.2 Redução do número de feridas infetadas

A **figura 3.10** mostra a eficiência dos tratamentos representada através da redução do número de feridas infetadas ao fim dos 7 dias de incubação, em que:

$$\text{Redução de feridas (\%)} = 100 \times (\text{n}^\circ \text{ de feridas infetadas M1} - \text{n}^\circ \text{ de feridas infetadas Mx}) / \text{n}^\circ \text{ de feridas infetadas M1}$$

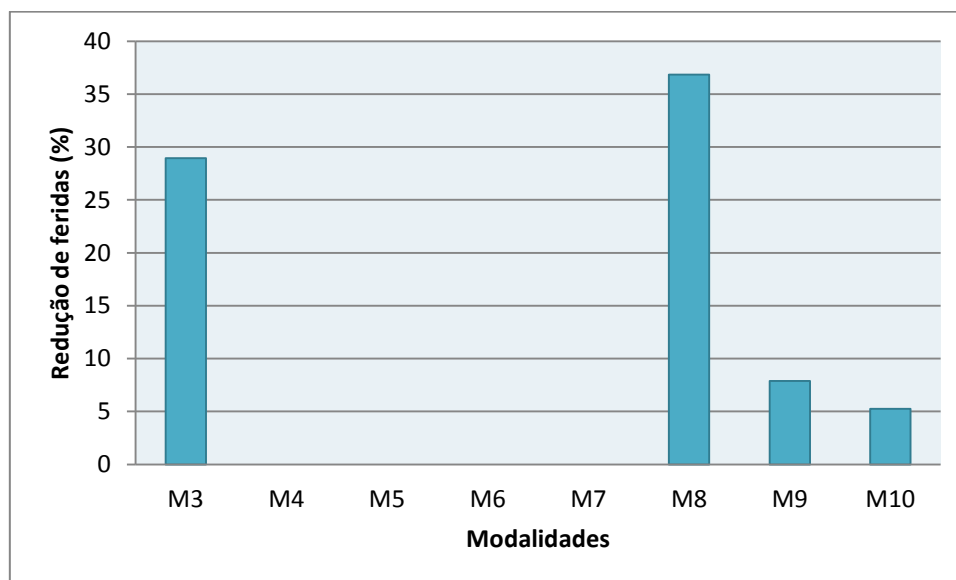


Figura 3.10: Redução de feridas (%) nas diferentes modalidades ao fim de 7 dias.

Observa-se que com o antagonista e com a solução de ácido acético (M8) há uma redução de 37% de feridas infetadas, seguindo-se a modalidade em que foi testada o *Aureobasidium pullulans* e o patogénico (M3) com 29%.

Quando adicionado o antagonista, verifica-se que quanto maior a concentração de quitosano, menor a percentagem de redução de feridas infetadas.

As frutas que foram inoculadas apenas com *Penicillium expansum* e com solução ácida ou solução de quitosano, não apresentaram qualquer redução do número de feridas infetadas quando comparado com a aplicação apenas do patogéneo.

### **3.3. Observação citológica da polpa da pera 'Rocha': em ferida e inoculada com *A. pullulans* ou *P. expansum* ou *A. pullulans* e *P. expansum***

Com o propósito de avançar com o estudo dos possíveis mecanismos de ação do antagonista no controlo da podridão azul em pera 'Rocha', realizaram-se estudos citológicos da polpa das paredes das feridas. Neste capítulo, apresentam-se os resultados mais representativos das observações efetuadas na polpa da pera 'Rocha' nas seguintes modalidades (ver secção 2.2):

- Pera sem ferida (apenas a polpa não sujeita a qualquer lesão)
- M0 (controlo com água)
- M1 (*P. expansum*)
- M2 (*A. pullulans*)
- M3 (*A. pullulans* + *P. expansum*)

#### **3.3.1 Observação microscópica**

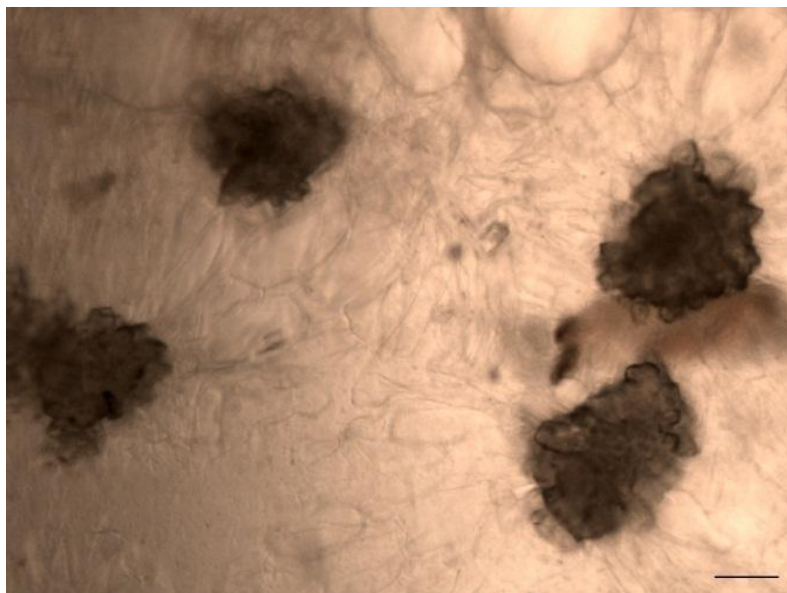


Figura 3.11: Polpa de pera 'Rocha'. Corte realizado à mão livre. Barra = 10µm.

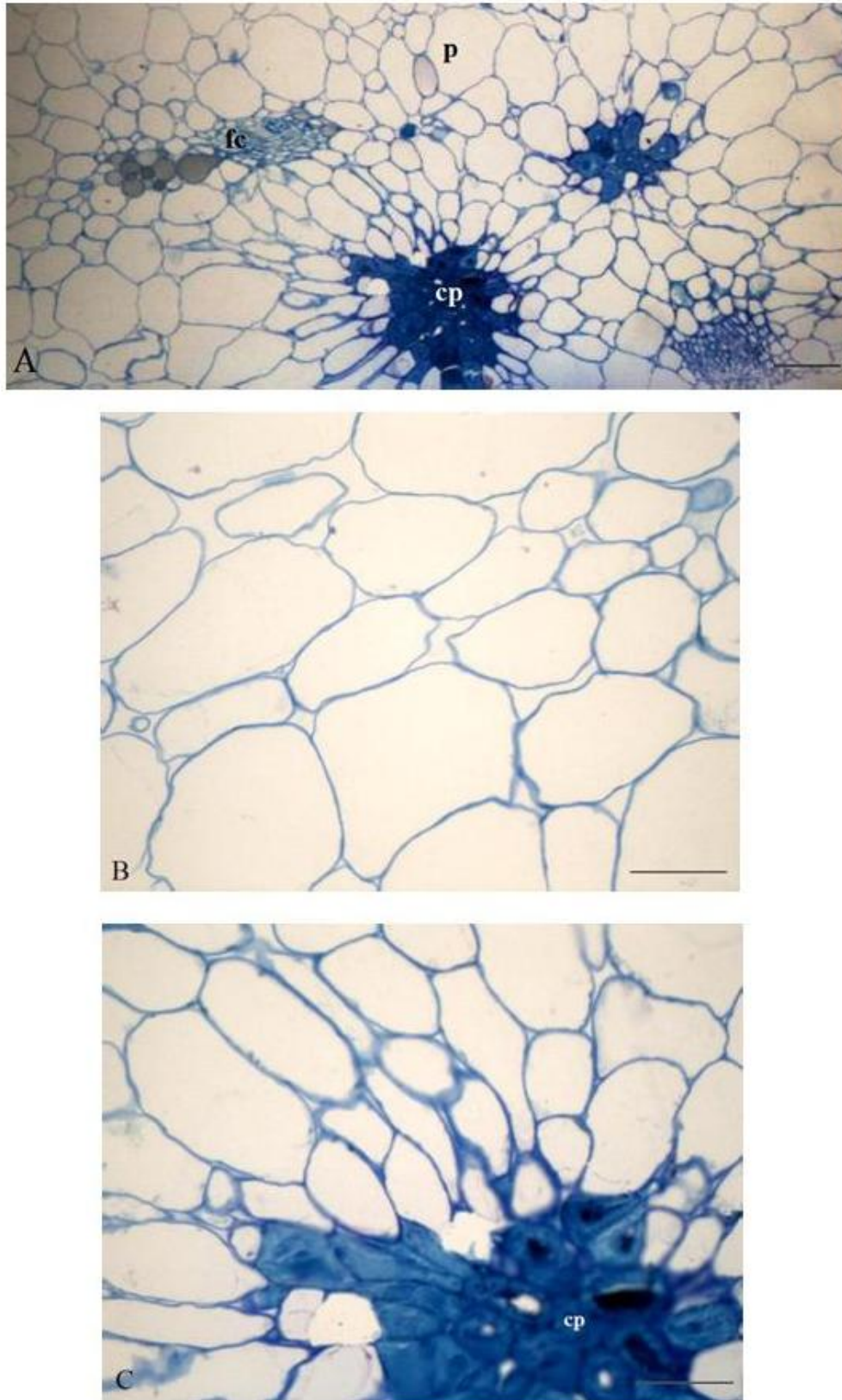


Figura 3.12: Secções da polpa de pera – fruta sem ferida (controlo). p – parênquima; cp – células pétreas; fc – feixe condutor. A) Aspeto geral. Polpa constituída por parênquima, sendo visíveis as características células pétreas. Barra = 10  $\mu$ m. B) e C) Pormenor do parênquima em zonas sem e com idioblastos (células pétreas). Barra = 5  $\mu$ m



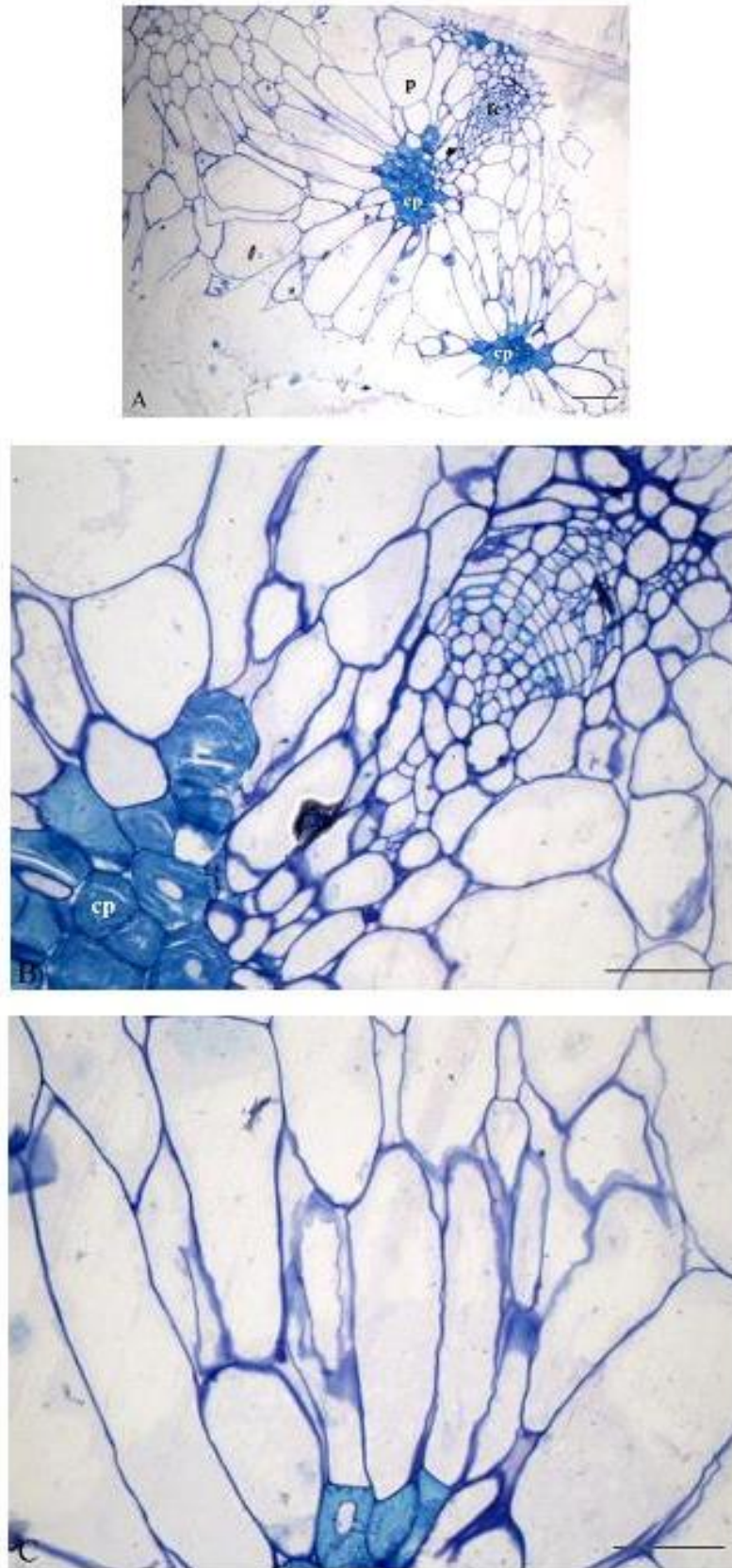


Figura 3.13: Secções da polpa das paredes da ferida da pera – fruta tratada com água (controlo da infeção). p - parênquima; cp – células pétreas; fc – feixes condutores. A) Aspeto geral da polpa do fruto. Barra = 10  $\mu$ m. B) e C) Pormenores de zonas do parênquima. Barra = 5  $\mu$ m.

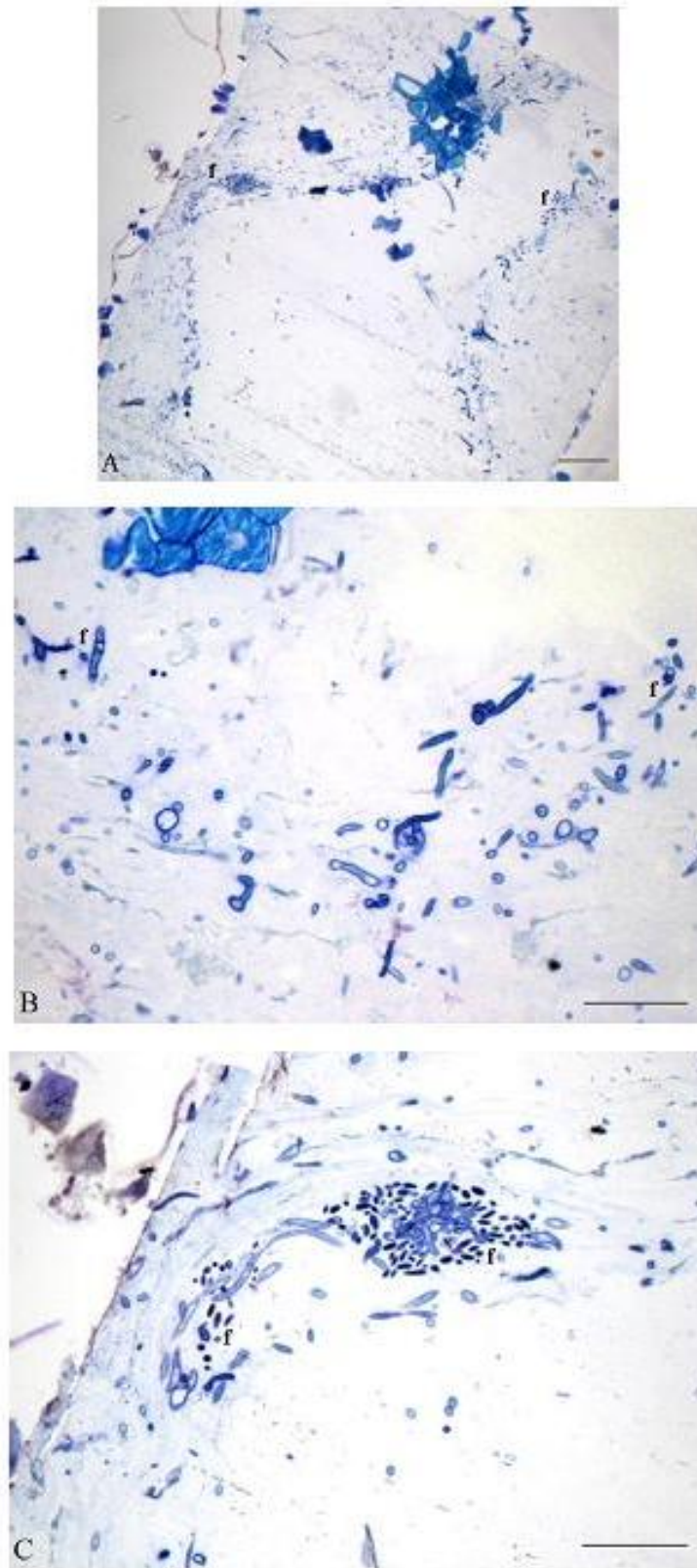


Figura 3.14: Secções da polpa das paredes da ferida de pera inoculada com *Penicillium expansum*. f – fungo. A) Aspeto geral da dispersão do inóculo inter e intracelularmente na zona de lesão. Barra = 10 µm. B) e C) Pormenores de zonas de polpa, onde é bem visível a destruição das células e formas fúngicas bem evidentes (hifas seccionadas transversal e longitudinalmente e estruturas reprodutoras). Barra = 5 µm.



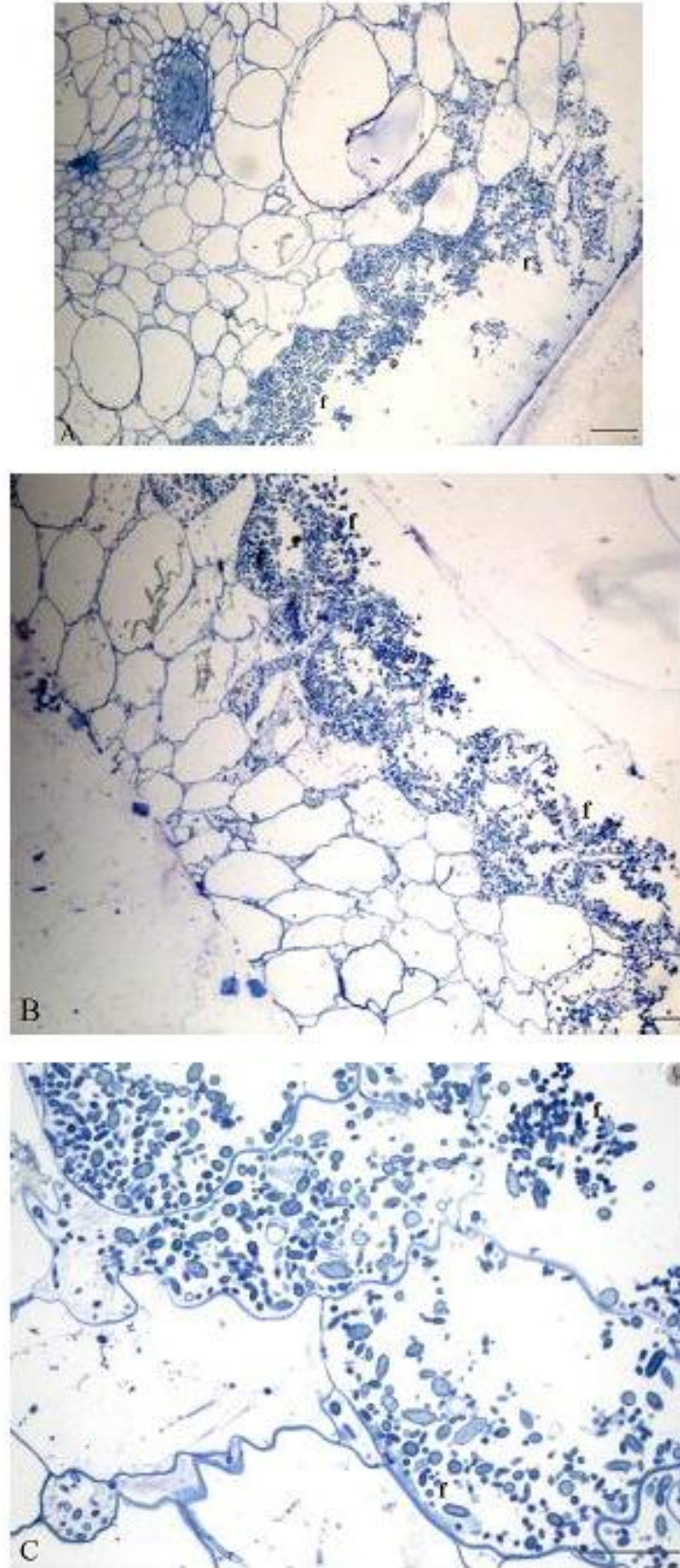


Figura 3.15: Secções da polpa das paredes da ferida de pera inoculada com *Aureobasidium pullulans*. f – fungo. A) Aspeto geral da dispersão do inóculo inter e intracelularmente na zona de lesão. Barra = 10  $\mu$ m. B) e C) Pormenores de zonas da polpa, com destruição parcial das células do parênquima, e formas fúngicas (hifas, formas leveduriforme e ascósporos). Barra = 5  $\mu$ m

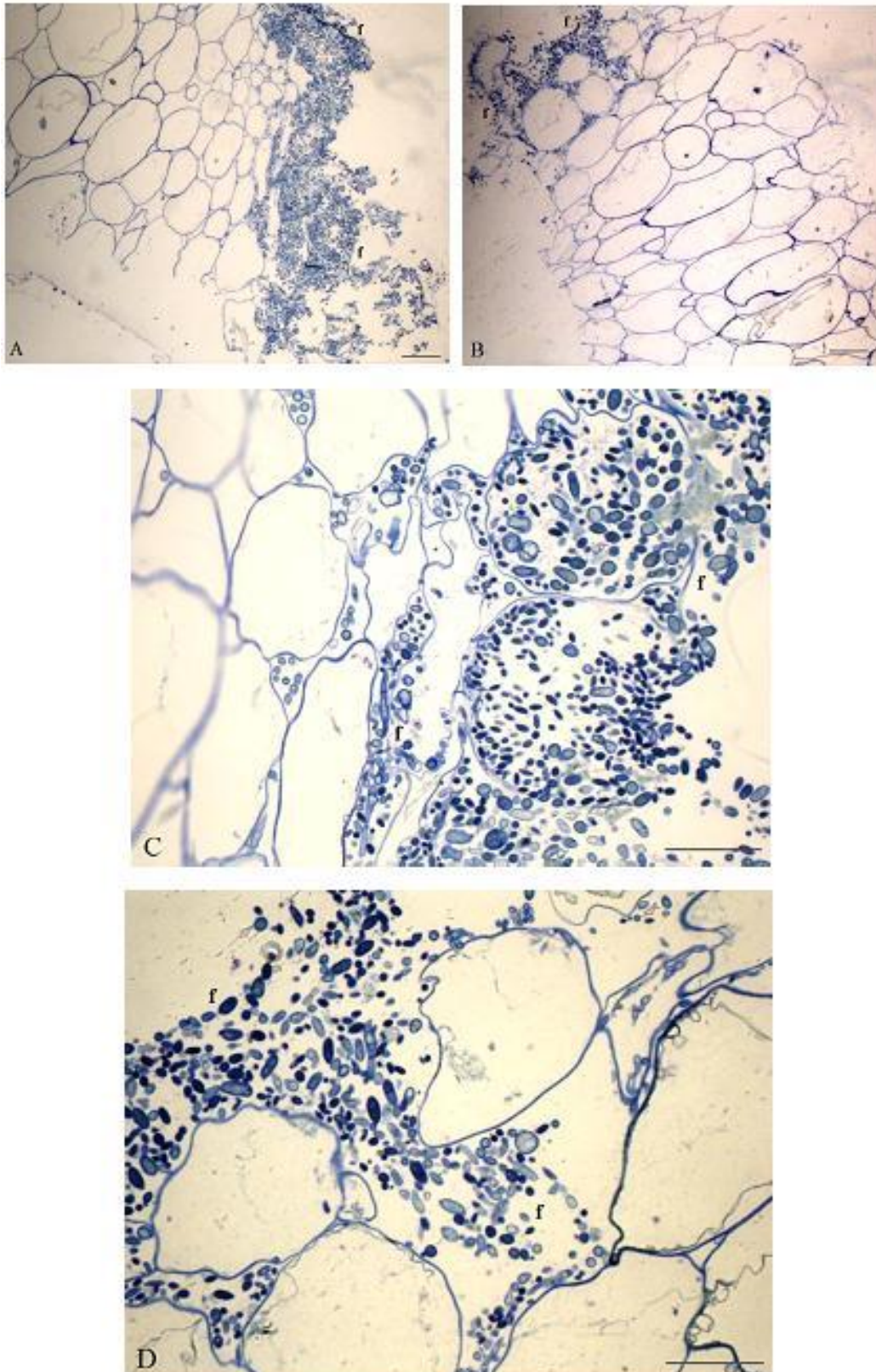


Figura 3.16: Secções da polpa de pera inoculada com *A. pullulans* e *P. expansum*. f-fungo. A) e B) Aspectos gerais da dispersão dos dois fungos inoculados em conjunto, inter e intracelularmente na zona de lesão. Barra = 10  $\mu$ m. C) e D) Pormenores de zonas de polpa onde várias estruturas fúngicas de *A. pullulans* e *P. expansum* são visíveis. Barra = 5  $\mu$ m.



### 3.3.2 Análise das observações

Neste capítulo do trabalho foram estudados os efeitos, a nível celular, da aplicação de *Aureobasidium pullulans* e/ou *Penicillium expansum* em pera 'Rocha'.

Foram realizadas observações ao microscópio ótico da estrutura da polpa da pera isenta de qualquer contaminação, espontânea ou induzida, em cortes feitos à mão livre (**figura 3.11**) e em micrótopo (**figura 3.12**). Verificou-se que o material a analisar é constituído por um parênquima muito hidratado formado por células mais ou menos esféricas e isodiamétricas, interrompida por agregados de braquiesclereídeos ou células pétreas (células com paredes secundárias muito espessadas com numerosas pontuações) que dão rigidez ao tecido e conferem uma estrutura muito típica à pera 'Rocha', que nas provas organoléticas é designada vulgarmente por "crocante". Uma das modalidades estudada foi a fruta tratada com água (**figura 3.13**). Comparativamente ao controlo, verificou-se que a estrutura celular junto às células pétreas sofreu alguma alteração, sendo visível um ligeiro aumento de dimensões das células do parênquima.

Na modalidade da fruta inoculada com *P. expansum*, verificou-se uma degradação das paredes celulares e a necrose total das células do parênquima, associada à presença de estruturas fúngicas (esporos, esporóforos e hifas). Os resultados apresentados demonstram que o *P. expansum* possui uma elevada capacidade para se expandir bastante para o interior da polpa, como se pode observar na **figura 3.14**.

Relativamente à fruta inoculada com o antagonista *A. pullulans* (**figura 3.15**), é perceptível a migração do inóculo da zona exterior para o interior da polpa, verificando-se assim, uma invasão do antagonista nos tecidos, desenvolvendo-se este nos espaços intercelulares e dentro das células, destruindo porções de paredes celulares. É nos espaços intercelulares que se conseguem visualizar as pseudo-hifas e esporos produzidos por este fungo leveduriforme, ficando as zonas de polpa de pera degradada, bastante restringidas.

Quando inoculados os dois microrganismos na mesma ferida, observam-se formas fúngicas tanto filamentosas como leveduriformes (**figura 3.16**). Neste caso, é notória a ação do *A. pullulans* concomitantemente com a de *P. expansum*, dado que se observou um retardamento do avanço do patógeno. Cabe destacar que nesta modalidade as células da pera se encontram muito menos degradadas, comparativamente ao material inoculado apenas com o patógeno.

Estes resultados preliminares concordam com resultados de estudos atualmente em curso, que sugerem, como modo de ação do antagonista, poderá induzir de mecanismos de resistência no hospedeiro. Assim, a presença do antagonista induziria mecanismos no hospedeiro produzindo compostos que poderão reforçar as paredes celulares, formando-se uma barreira física que bloqueia a proliferação do patógeno e impede a sua penetração nos tecidos do hospedeiro.

#### 4. Considerações finais

Neste trabalho estudou-se a aplicação de *Aureobasidium pullulans*, juntamente com quitosano, com o intuito de minimizar a incidência da podridão azul em pera 'Rocha', e assim prolongar o respetivo tempo de conservação.

Quando estudada a influência da concentração de quitosano em solução de ácido acético a 5% (ensaio *in vitro*) conclui-se que houve uma capacidade de adaptação do patogéneo às condições de crescimento impostas. O crescimento de *P. expansum* foi inibido a 100% somente quando a concentração de quitosano foi maior ou igual a  $1,2\text{g.L}^{-1}$ . Contrariamente, constatou-se que o crescimento da colónia do antagonista foi completamente inibido pela solução de quitosano em todas as concentrações testadas, com exceção de  $0,5\text{g.L}^{-1}$ .

Com a diminuição da concentração da solução ácida para 1%, observou-se que a solução de quitosano foi mais eficaz durante a fase de adaptação. Segundo os resultados obtidos, é no 4º dia que se obtêm as condições mais propícias para o controlo da podridão azul causada por *P. expansum* pois, na maioria das concentrações de quitosano testadas, houve um diferencial favorável de cerca de 30% entre a inibição do patogéneo e a inibição do antagonista. Apesar de se ter constatado que o efeito inibitório está correlacionado com a concentração da solução de quitosano, verificou-se ainda que não existiu nenhum benefício derivado do efeito sinérgico do *A. pullulans* e do quitosano quando aplicados em conjunto, uma vez que nas concentrações mais elevadas, os dois microrganismos são inibidos numa taxa muito semelhante.

Os resultados obtidos no ensaio *in vivo* indicam que o quitosano, nas concentrações testadas, não é capaz de controlar o patogéneo. As frutas que foram inoculadas apenas com *P. expansum* e com solução ácida ou solução de quitosano, não apresentaram qualquer redução do número de feridas infetadas quando comparado com a aplicação única do patogéneo.

Por outro lado, verificou-se a elevada eficácia do antagonista *A. pullulans* no controlo da podridão azul, já que foi capaz de inibir eficientemente o crescimento de *P. expansum*. No ensaio, constatou-se que a aplicação de *A. pullulans* juntamente com o quitosano não revelou ser uma mais-valia para o controlo da podridão azul. Quando adicionado o antagonista junto com o quitosano, verificou-se que quanto maior a concentração de quitosano, menor a percentagem de redução de feridas infetadas.

Na observação citológica da polpa da pera 'Rocha' foi notória a ação do *A. pullulans* sobre o *P. expansum*, tendo-se observado um retardamento do avanço do patogéneo.

Numa perspetiva futura, considera-se interessante investigar a solubilidade do quitosano em diferentes ácidos, ou em soluções mais diluídas de ácido acético, de maneira a reduzir a inibição do antagonista, uma vez que quando testadas as duas concentrações de solução ácida, houve o dobro de inibição de *A. pullulans* quando aplicada a solução de ácido acético a 5%.

Outra possível abordagem, será investigar a utilização de concentrações mais elevadas de quitosano, como único agente de biocontrolo.

De forma a comprovar os resultados citológicos, tornar-se-á importante a realização de novos ensaios, com observação de um maior número de cortes.

## 5. Bibliografia

- Agrios, G., 1997. Plant pathology. 4<sup>th</sup> Ed. Academic Press. California. USA, 635p.
- Almeida, D., 2004. Fisiologia Pós-colheita – doenças causadas por bactérias. Faculdade de Ciências. Universidade do Porto. Disponível em: <http://dalmeida.com/poscolheita/fisiologia/bacterias.htm>. Consulta efetuada em 20 de junho de 2012.
- ANP, Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha, 2012. Pera Rocha do Oeste. Disponível em: <http://www.perarocha.pt/>. Consulta efetuada em 5 de abril de 2012.
- Avelar, M. L., 2001. Principais aspectos associados à conservação frigorífica da pêra 'Rocha'. Agroforum, 15: 36-39.
- Badawy, M.; Rabea, E., 2011. A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications. In Crop Protection. International Journal of Carbohydrate Chemistry, 2011: 1-29.
- Barreiro, M., 2008. Biocontrolo das doenças de pós-colheita em pêra 'Rocha'. In Vida Rural, Lisboa, 1741: 32-34.
- Bastidas, O., 2012. Conteo Celular com Hematocitómetro – Uso Elemental del Hematocitómetro. Disponível em: <http://celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>. Consulta efetuada em 10 de maio de 2012.
- Benítez, T.; Rincón, A.; Limón, M.; Codón, A., 2004. Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. International Microbiology, 7: 249-260.
- Berger, L.; Stamford, T.; Stamford, N., 2011. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. Revista Iberoamericana de Polímeros, 12(4): 195:215.
- Bértolo, D., 2011. Aplicação de quitosano na redução do escurecimento enzimático em sumo de maçã não pasteurizado (estabilizado por hiperpressão). Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa, 82 pp.
- Borges, M.; Pedro, J.; Barreiro, M., 2004. Biological control of postharvest decay with epiphytic microorganisms of Rocha pear. In: Maturação e Pós-Colheita 2004 - Frutos e Hortícolas. Ed. M. Graça Barreiro/EAN-INIAP, Oeiras, Portugal: 513-517.
- Botelho, R.; Maia, A.; Rickli, E.; Leite, C.; Faria, C., 2010. Quitosana no controle de *Penicillium sp* na pós-colheita de maçãs. Revista Brasileira de Agroecologia, 5(2): 200-206.
- Bourtoom, T., 2008. Edible films and coatings: characteristics and properties – Review article. International Food Research Journal, 15(3): 237-248.
- Brumatti, C.; Souza, C., 2012. Controle Biológico. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Disciplina de Microbiologia. Universidade Federal de São Carlos, 15 pp.

Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/17571140/Controle-Biologico>. Consulta efetuada em 16 de junho de 2012.

- Cañamás, T.; Viñas, I.; Usall, J.; Torres, R.; Anguera, M.; Teixidó, N., 2007. Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest application of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 Part II. Effectiveness of different formulations. *Postharvest Biology and Technology*, 49: 96–106.
- Capdeville, G.; Wilson, C.; Beer, S; Aist, J., 2002. Alternative Disease Control Agents Induce Resistance to Blue Mold in Harvested 'Red Delicious' Apple Fruit. *Biological Control – Phytopathology*, 92(8): 900-908.
- Carvalho, V.; Cunha, R.; Chalfun, N.; Moura, P., 2009. Alternativas de controle pós-colheita da podridão-parda e da podridão-mole em frutos de pessegueiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31(1): 78-83.
- Choudhury, M., 2007. Doenças pós-colheita. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia22/AG01/arvore/AG01\\_42\\_24112005115222.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia22/AG01/arvore/AG01_42_24112005115222.html). Consulta efetuada em 21 de julho de 2012.
- Cipriano, C., 2011. No Oeste a produção e exportação de pêra-rocha não pára de crescer. *Jornal Público – Economia – Sectores tradicionais* de 15 de maio. p. 22.
- Coelho, R.; Hoffmann, F.; Hirooka, E., 2003. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 24(2): 337-358.
- Cordeiro, C., 2010. Desenvolvimento de filmes bioactivos a partir do quitosano. Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, 86 pp.
- Doctor fungus, 2007. *Aureobasidium spp.* In *The Fungi, Descriptions*. Disponível em: <http://www.doctorfungus.org/thefungi/Aureobasidium.php>. Consulta efetuada em 13 de maio de 2012.
- Droby, S.; Wisniewski, M.; Macarasin, D.; Wilson, C., 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm?. *Postharvest Biology and Technology*, 52: 137-145.
- Ellis, D., 2012. *Aureobasidium pullulans*. In *Mycology Online, Fungal Descriptions – Hyphomycetes (dematiaceous)*. School of Molecular & Biomedical Science – University of Adelaide, Australia. Disponível em: [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes\\_%28dematiaceous%29/Aureobasidium/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_%28dematiaceous%29/Aureobasidium/). Consulta efetuada em 13 de maio de 2012.

- EPA, United States Environmental Protection Agency, 2000. Glossary. Disponível em: <http://www.epa.gov/greatlakes/lakesuperior/lamp2000/LSglossary.pdf>. Consulta efetuada em 5 de junho de 2012.
- Fialho, D.; Silva, F., 2010. Doenças pós-colheita de pomóideas na região a Oeste da Serra de Candeeiros. Actas Portuguesas de Horticultura – 2º Simpósio Nacional de Fruticultura, 26: 202-203.
- Fischer, I.; Almeida, A.; Fileti, M.; Bertani, R.; Arruda, M.; Bueno, C., 2010. Avaliação de Passifloraceas, fungicidas e Trichoderma para o manejo da Podridão-do-colo do maracujazeiro, causada por *Nectria haematococca*. Revista Brasileira de Fruticultura, 32(3): 709-717.
- Francés, J.; Bonaterra, A.; Moreno, M.; Cabrefiga, J.; Badosa, E.; Montesinos, E., 2005. Pathogen aggressiveness and postharvest biocontrol efficiency in *Pantoea agglomerans*. Postharvest Biology and Technology, 39: 299-307.
- Franceschini, M.; Guimarães, P.; Camassola, M.; Frazzon, P.; Baratto, M.; Kogler, V.; Silva, V.; Dutra, V.; Nakazoto, L.; Castro, L.; Santi, L.; Vainstein, H.; Schrank, A., 2001. Biotecnologia aplicada ao controle biológico. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 23: 32-37.
- GPP, 2007. Pêra: Diagnóstico sectorial. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa, Portugal.
- Henriques, C., 2009. Desenvolvimento de Polpa de Pêra Rocha – Estabilização química e estudo na componente bioactiva. Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar, Ramo de Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, 90 pp.
- Hoog, G.; Yurlova, N., 1994. Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. Antonie van Leeuwenhoek, 65: 41–54.
- INE, Instituto Nacional de Estatística, I. P., 2012. Estatísticas Agrícolas 2011. Disponível em <http://www.ine.pt>. Consulta efetuada em 10 de agosto de 2012.
- Janisiewicz, W.; Korsten, L., 2002. Biological control of postharvest diseases of fruit. Annual Review of Phytopathology, 40: 411-441.
- Kader, A., 2002. Postharvest Technology of Horticultural Crops. 3<sup>th</sup> Ed. University of California, Agriculture and Natural Resources, 535pp.
- Lidon, F.; Ramalho, J.; Pais, I.; Ramos, A.; Santos, M.; Arrabaça, J.; Barreiro, M., 2012. Fungistatic action of *Aureobasidium pullulans* on *Penicillium expansum* in ‘‘Rocha’’ pear: implications for oxidative stress during fruit storage. International Journal of Pest Management, 58: 41-52.

- Lima, G.; Arru, S.; De Curtis, F.; Arras, G., 1999. Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 23: 223-229.
- Liu, J.; Tian, S.; Meng, X.; Xu, Y., 2007. Effects of chitosan on postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 44: 300-306.
- Madeira, C., 2005. Meios alternativos aos fungicidas convencionais para controlo de *Penicillium expansum* Linck em pêra rocha. Relatório do Trabalho de Fim de Curso da Licenciatura em Engenharia Agrária, Ramo da Produção de Hortofrutícolas. Escola Superior Agrária de Santarém – Instituto Politécnico de Santarém, 52 pp.
- Manso, T.; Salazar, M.; Nunes, C., 2005. Biofungicidas em pós-colheita de frutas. *Frutas, Legumes & Flores*, 82: 38-39.
- MBL, Mold & Bacteria Consulting Laboratories, 2005. Indoor Moulds: The *Penicillium* Species. Disponível em: <http://www.moldbacteriaconsulting.com/fungi/indoor-moulds-penicillium-species.html>. Consulta efetuada em 13 de maio de 2012.
- Mello, S., 2012. Rede Microbiana – PC3 – Microrganismos Agentes de Biocontrolo. Plataforma Nacional de Recursos Genéticos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/rede-microbiana/projetos-componentes/projeto-componente-3>. Consulta efetuada em 16 de junho de 2012.
- Mendéz, S.; Mondino, P., 1999. Control Biológico Postcosecha en Uruguay. *Horticultura Internacional*, 7: 29-36.
- Meng, X.; Yang, L.; Kennedy, J.; Tian, S., 2010. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. *Carbohydrate Polymers*, 81: 70-75.
- Moura C.; Muszinski P.; Schmidt C.; Almeida J.; Pinto L., 2006. Quitina e Quitosana Produzidas a partir de Resíduos de Camarão e Siri: Avaliação do Processo em Escala Piloto. *Vetor*, Rio Grande, 16(1/2): 37-45.
- Naturdata – Biodiversidade online, 2011. *Pyrus-communis*. Disponível em: <http://naturdata.com/Pyrus-communis-3544.htm>. Consulta efetuada em 20 de maio de 2012.
- Nunes, C.; Usall, J.; Teixidó, N.; Viñas, I., 2002. Improvement of *Candida sake* biocontrol activity against post-harvest decay by the addition of ammonium molybdate. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 927-935.
- Ojiambo, P.; Scherm, H., 2006. Biological and Application-Oriented Factors Influencing Plant Disease Suppression by Biological Control: A Meta-Analytical Review. *Phytopathology*, 96: 1168-1174.
- Oliveira, C., 2007. Tecnologia pós-colheita para melhoria da qualidade e segurança alimentar: pêra, maçã e kiwi. ISAPress, Lisboa, 52pp.

- Oliveira, C.; Mota, M., 2011. Tecnologias recentes em pós-colheita de pomóideas: 1-MCP, controlo das podridões e espectroscopia de infravermelho próximo. In Engenharia dos biosistemas/ ed. Luís Santos Pereira, et al. – Lisboa: Colibri/CEER: 281-284.
- Pacheco, N.; Larralde-Corona, P.; Trombotto, J.; Shirai, A., 2008. Evaluation of chitosans and *Pichia guilliermondii* as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*. International Journal of Biological Macromolecules, 43: 20-26.
- Pais, I.; Ramos, P.; Barreiro, M.; Silva, M., 2008. Calcium and imazalil increased efficacy of *Aureobasidium pullulans* on blue mold of 'Rocha' pears. Effects on sugars. In Avances en maduración y post-recolección de frutas y hortalizas, 561-566.
- Pereira, F., 2011. Produção, purificação e caracterização da actividade proteolítica produzida por *Trichoderma harzianum*. Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia. Universidade Católica de Brasília, 79pp.
- Piano, S.; Neyrotti, V.; Migheli, Q.; Gullino, M., 1997. Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. Postharvest Biology and Technology, 11: 131-140.
- Pinho, M., 2011. Aplicação de biofilmes de quitosano e de atmosfera modificada na conservação de pêra Rocha de 4ª Gama. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa, 94 pp.
- Pinto, L., 2005. Síntese e estudo de derivados do quitosano com potencial interesse biológico e ambiental. Dissertação de Mestrado em Química. Faculdade de Ciências – Universidade do Porto, 137 pp.
- Pitt, J., 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. New York: Academic Press, 193 pp.
- Plaza, P.; Usall, J.; Teixido, N.; Vinas, I., 2004. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common postharvest citrus fungi. International Journal of Food Microbiology, 90(1): 75-82.
- Pontón, J.; Moragues, M.; Gené, J.; Guarro, J.; Quindós, G., 2002. *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud. In Hongos y actinomicetos alergénicos. Revista Iberoamericana de Micología, p24.
- PTQC, Produtos Tradicionais de Qualidade na Região Centro, 2008. Pêra rocha do oeste – DOP. Disponível em: [http://ptqc.drappc.min-agricultura.pt/documentos/pera\\_rocha\\_oeste.htm](http://ptqc.drappc.min-agricultura.pt/documentos/pera_rocha_oeste.htm). Consulta efetuada em 5 de abril de 2012.
- Raafat, D.; Bargen, K.; Hass, A.; Sahl, H., 2008. Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. Applied and Environmental Microbiology, 74: 3764-3773



- Reddy, M.; Belkacemi, K.; Corcuff, R.; Castaigne, F.; Arul, J., 2010. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinérea* and quality of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 20: 39-51.
- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science*, 31: 603-632.
- Roller S.; Covill N., 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology* 47: 67-77
- Salema, R.; Santos, I., 1992. Microscopia electrónica de transmissão – instrumentação e técnicas para material biológico. Instituto Nacional de Investigação Científica, 252 pp.
- Soares, J.; Silva, A.; Alexandre, J., 2001. O livro da pêra Rocha': contributo para uma produção integrada (1ª edição). Associação Nacional de Produtores de Pêra 'Rocha'. Cadaval, 184 pp.
- Soares, J.; Silva, A.; Marques, H., 2003. O livro da pêra 'Rocha': intensificação cultural e regulação da produção (2ª edição). Associação Nacional de Produtores de Pêra 'Rocha'. Cadaval, 191pp.
- Sousa, A.; Sousa, A., 2005. O bolor azul (*Penicillium spp.*) das pêras e maçãs. CRIPOSA. *Jornal de Informação Técnica – AVAPI*, 67: 10-12.
- Spadaro, D.; Guillino, M., 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*, 1: 185-194.
- Spadaro, D.; Vola, R.; Piano, S.; Gullino, M., 2002. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the Yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Techonology*, 24: 123-134.
- Tomaz, I., 2001. Doenças das plantas. Diagnóstico das micoses e taxonomia dos seus agentes. Publicações Europa-América. Colecção uroagro. Mem Martins, 246p.
- Vero, S.; Garmendia, G.; González, M.; Garat, M.; Wisniewski M., 2009. *Aureobasidium pullulans* as a biocontrol agent of postharvest pathogens of apples in Uruguay. *Biocontrol Science and Technology*, 19: 1033-1049.
- Viñas, I., 1997. Control Biológico de las principales enfermedades fúngicas post-cosecha. *Phytoma-España*, 90: 78-81.
- Xiao, C., 2005. Postharvest Diseases of Apples and Pears – A Guide to Diagnosis and Control. In Tree Fruit Research & Extension Center – Tree Fruit Postharvest Pathology. Washington State University. Disponível em <http://decay.tfrec.wsu.edu/index.php>. Consulta efetuada em 20 de junho de 2012.
- Yu, T.; Li, H.; Zheng, X., 2007. Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 261-266.

- Zalar, P.; Gostincar, C.; Hoog, G.; Uršic, V.; Sudhadham, M.; Gunde-Cimerman, N., 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*, 61: 21-38.
- Zhang, H.; Li, R.; Liu, W., 2011. Effects of Chitin and Its Derivative Chitosan on Postharvest Decay of Fruits: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 917-934