UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

ILANA MACIEL PAULO MAMÉDIO

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CEPAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS E EXTRATOS DE CASCA E COROA DE ABACAXI SOBRE *Fusarium guttiforme* NIRENBERG & O'DONNELL

Feira de Santana – BA
2017

ILANA MACIEL PAULO MAMÉDIO

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CEPAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS E EXTRATOS DE ABACAXI (*Ananas comosus* (L.) Merril) SOBRE *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Neves Brandão
Coorientadora: Profa. Dra. Elinalva Maciel Paulo

Feira de Santana - BA
2017

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

Mamédio, Ilana Maciel Paulo

M231 Atividade antifúngica de cepas de bactérias láticas e extratos de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merril) sobre *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O' Donnell / Ilana Maciel Paulo Mamédio. – Feira de Santana, 2017.

99 f.: il.

Orientador: Hugo Neves Brandão.

Coorientadora: Elinalva Maciel Paulo

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2017.

1. Fitopatologia. 2. Micotoxinas. 3. Biocontrole. I. Brandão, Hugo Neves, orient. II Paulo, Elinalva Maciel, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV.Título.

CDU: 616:504.73

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Cristina Fermino Soares
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia)

Prof. Dr. Hélio Mitoshi Kamida
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)

Prof. Dr. Hugo Neves Brandão
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)
Orientador e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA

2017

DEDICO:

À minha família pelo apoio e pelo exemplo.

A todas as mulheres que lutam diariamente contra o câncer de mama.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”
(Marie Curie)

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós- Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana pela oportunidade de realização do curso;

Ao meu orientador Hugo Neves Brandão pela compreensão e disponibilidade durante a realização do trabalho;

À minha coorientadora Elinalva Maciel Paulo pelo acompanhamento, aconselhamento, compreensão e disponibilidade da estrutura e material do LAMASP, sem o qual o trabalho não poderia ter sido realizado;

A todos os técnicos e estagiários do LAMASP pela colaboração e apoio;

Aos colegas do LabIV e LAEX por todo o acompanhamento e ajuda nas análises químicas, em especial à Carine Raissa e Danielle Figuerêdo, por sempre estarem à disposição;

Aos colegas do curso por todos os momentos de alegria e cooperação ao longo do curso e das aulas, em especial à colega Mileide Coutinho, pela parceria que nos acompanha desde a graduação;

A todos os médicos e funcionários do Instituto Baiano do Câncer (IBC), sem os quais não poderia ter concluído este trabalho;

À minha família pelo total apoio e dedicação nessa jornada, em especial aos meus pais Florisvaldo da Silva Mamédio e Ivana Maciel Paulo Mamédio e ao meu irmão Felipe Maciel Paulo Mamédio, vocês sempre foram os meus maiores incentivadores e os verdadeiros pilares desta conquista;

Às minhas tias Elenice e Elinalva pelo apoio e aconselhamento;

Ao meu namorado Eduardo, pela paciência e força para que esse momento se concretizasse;

À FAPESB pela concessão da bolsa durante o período do curso.

RESUMO

O abacaxi é uma fruta tropical de grande valor comercial, sendo o Brasil o segundo maior produtor no mundo. A variedade mais produzida no país é a Pérola, seguida pela Smooth Cayenne, ambas possuem alto grau de suscetibilidade à fusariose ou gomose do abacaxi, causada pelo fungo *Fusarium guttiforme*. Esta doença, uma vez instalada, pode reduzir em até 80% a produção dos cultivares. As bactérias láticas (BAL), devido as suas características metabólicas possuem potencial de inibir o crescimento bacteriano e fúngico, bem como neutralizar toxinas produzidas por algunsmicro-organismos. Este trabalho teve como objetivodeterminar através de testes "*in vitro*" o efeito inibitório de bactérias lácticas sobre o agente etiológico da fusariose do abacaxi.Foram realizados ensaios qualitativo e quantitativode inibição microbiana, confrontando cepas de bactérias láticas e extrato bruto do abacaxifrente aisolados de *F.*guttiforme. Determinarse há micotoxina nos extratos fúngicos destes isolados. Constatou-se efeito inibitório do *Lactobacillus plantarum* Abx3 e *Lactobacillus paracasei*subsp.*paracasei* Abx5.2 sobre os isolados de *F. guttiforme.* O mesmo não aconteceu com o extrato bruto de abacaxi, e não foi detectada a produção de micotoxina nos extratos dos isolados fúngicos. Os resultados preliminares deste trabalho apontamque as bactérias láticas apresentam potencial de serem utilizadas em formulações de produto de biocontrolede *F. guttiforme*.

Palavras-chave: Bromeliácea, fitopatologia, micotoxinas, biocontrole.

“ANTIFUNGAL ACTIVITY OF LACTIC BACTERIA AND PINEAPPLE VEGETABLE EXTRACTS (*Ananas comosus* (L.) Merril) IN *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell”

ABSTRACT

Pineapple is a tropical fruit of great commercial value, Brazil is the second largest producer of pineapple in the world. The most produced variety in the country is the “Perola”, followed by Smooth Cayenne and, both have a high degree of susceptibility to fusariosis or pineapple gum disease, caused by the fungus *Fusarium guttiforme.*Once installed, this disease can reduce pineapple yield by up to 80%. Lactic bacteria (BAL) have their metabolic characteristics and the potential to inhibit bacterial and fungal growth, as well as to neutralize toxins produced by *F. guttiforme*.This work aimed to determine by in vitro tests the inhibitory effect of lactic acid bacteria on the etiologic agent of fusariosis. Qualitative and quantitative microbial inhibition tests were performed, comparing strains of lactic acid bacteria and crude pineapple extract against *F. guttiforme* isolates. Determination of mycotoxins in the fungal extracts of these isolates. The inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* Abx3 and *Lactobacillus paracasei* subsp.*paracasei* Abx5.2 was observed for isolateson *F. guttiform*e, the same did not occur with crude pineapple extract, and mycotoxin production was not detected in extracts of fungal isolates. The preliminary results of this work point out that lactic bacteria present potential to be used as a biocontrol product on *F. guttiforme*.

Keywords: bromeliad, plant pathology, mycotoxins, biocontrol.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Gradiente de eluição da análise por CLAE-DAD	46
Tabela 2	Identificação dos isolados de bactérias láticas por meio do KIT API 50 CHL (Biomerieux®)	52
Tabela 3	Provas de caracterização das cepas *L. plantarum* (isolado Abx3) e L. *paracasei* subsp. *paracasei* (isolado Abx5.2).	55
Tabela 4	Medida dos halos de inibição em mm das culturas láticas frente à *F. guttiforme* semeada em meio BDA.	57
Tabela 5	Inibição do crescimento de *F. guttiforme* por bactérias láticas do abacaxi, avaliada por meio do teste de difusão em disco. Valores em mm.	58
Tabela 6	Halos de inibição em mm das culturas láticas frente à *F. guttiforme* semeadas em meio MRS. Valores em mm.	59
Tabela 7	Avaliação da atividade antagônica de bactérias láticas isoladas do abacaxi, através da técnica da cultura mista, medida em UFC (Unidades Formadoras de Colônias).	60
Tabela 8	Valores de pH dos tratamentos utilizados na cultura mista para o teste de antagonismo entre cepas de bactérias láticas frente aos isolados de *F. guttiforme.*	61
Tabela 9	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), em $mg.mL^{-1}$, das culturas láticas Abx3 (*L. plantarum)* e Abx5.2 (*L. paracasei* subsp. *paracasei*) em meio líquido BD, sobre isolados de *F. guttiforme*.	64
Tabela 10	Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), em $mg.mL^{-1}$, dos sobrenadantes das culturas láticas Abx3 (*L. plantarum)* e Abx5.2 (*L. paracasei* subsp. *paracasei*) sobre isolados de *F. guttiforme*.	65
Tabela 11	Rendimento do extrato metanólico de casca e coroa de *A. comosus* por três métodos diferentes.	67

Tabela 12 Valores correspondentes ao peso e rendimentos dos extratos brutos obtidos a partir de isolados de *Fusarium.* 68

Tabela 13 Classificação dos compostos obtidos a partir da CLAE-DAD UV dos extratos dos isolados de *Fusarium* de acordo com características espectrométricas. 70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	**A** e **B** Sintomas da fusariose do abacaxi em frutos (vermelhidão e apodrecimento do tecido interno do fruto). **C** (Exsudação de goma na parte externa do fruto). Fonte: (TROCOLI, 2010).	21
Figura 2	Estruturas microscópicas de *Fusarium guttiforme.* **A – B**: Macroconídios; **C – D**: Microconídios; **E – F**: Microconídios in situ em meio CLA. (Agar e Folha de Cravo). **A – D**, barra de escala = 25 µm; **E – F**, barra de escala = 50 µm.Fonte: LESLIE; SUMMERELL (2006).	23
Figura 3	Fruto de abacaxi apresentando apodrecimento da polpa e produção de goma.	36
Figura 4	Inoculação dos isolados de *Fusarium sp.*proveniente de mudas de abacaxi com sintomas da fusariose de acordo com postulados de Koch.	37
Figura 5	Esquema da placa de 96 poços para a determinação da CIM.	41
Figura 6	Características das culturas dos isolados de *Fusarium guttiforme* obtidos a partir de abacaxi com sintomas da fusariose. Colônias crescidas por 7 dias a ± 22ºC.	48
Figura 7	Verso das culturas de *Fusarium guttiforme.* Colônias crescidas por 7 dias a ± 22ºC.	48
Figura 8	Estruturas microscópicas observadas nas colônias de *Fusarium guttiforme.* (A) Macroconídios fusiformes; (B) Microconídios ovoides, (C) Microconídios*in situ*.	49
Figura 9	Sintomas da fusariose em abacaxis após a reinoculação dos isolados obtidos. **A)** Ferimento com crescimento micelial, **B) e C)** apodrecimento do tecido interno do fruto e **D)** presença de goma.	50
Figura 10	Halos de inibição na avaliação da difusão em disco. **A)** Sem inibição; **B)** Inibição muito fraca; **C)** Inibição moderada.	55
Figura 11	Filtração do extrato metanólico bruto de *Ananas comosus* variedade Pérola.	67
Figura 12	Teste de inibição em disco pelo extrato de casca e coroa de abacaxi frente a isolados de *Fusarium.* **A-**Tratamento com extrato da casca; **B-** Tratamento com extrato da coroa; **C-** Tratamento com fungicida.	67
Figura 13	Extratos obtidos através dos isolados de *Fusarium*. Da esquerda para direita, extratos de F1, F2, F3, F4, F5 e F6, respectivamente.	68
Figura 14	Cromatogramas dos extratos dos isolados de Fusarium cultivados em meio BD.	69
Figura 15	Perfil químicodo metabólito XXXI. A- Cromatograma do extrato do isolado F2; B- Espectro UV-VIS do composto XXXI; C- Estrutura química das antraquinonas.	75
Figura 16	Comparação entre os espectros de absorção UV dos compostos XIII, XIV e XV do extrato F3 com o acetaldeído descrito na literatura.	76
Figura 17	Comparação entre os espectros UV-VIS dos compostos que se assemelham com alanina e a alanina descrita no site NIST.	77
Figura 18	Espectros UV-VIS do composto I obtidos nos extratos dos isolados F3 e F4 comparados com espectro obtido por Merlin et al. (2013).	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL	Bactérias ácido láticas.
BDA	Meio de cultura: batata, dextrose, ágar.
CLA	Meio de cultura: folhas de cravo, ágar.
DON	Desoxinivalenol.
MRS	De Man Rogosa; Sharp(1960).
NIV	Nivalenol.
NLST	National Institute of Standards and Technology.
ZEA	Zearalenona.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO 14

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15

2.1- Bromeliaceae 15

2.1.1 O abacaxi 15

2.1.2 Mercado nacional de abacaxi 16

2.2- Principais problemas na produção de frutas no Brasil 17

2.2.1 *Fusarium* sp. 18

2.2.2 Fusariose do abacaxizeiro 19

2.2.3 Agente etiológico 21

2.2.4 Identificação de *F. guttiforme* 23

2.3- *Fingerprint* 24

2.3.1 Metabólitos secundários de micro-organismos 24

2.3.2 Perfil metabólico *Fusarium sp.* 24

2.4- Métodos de controle da fusariose 26

2.5- Controle biológico 26

2.6- Bactérias ácido láticas 27

2.6.1*Lactobacillus* 29

2.6.2 Bactérias láticas como agentes antimicrobianos 30

2.6.3 Metabólitos de bactérias láticas 31

2.7- Extratos fitoquímicos 33

2.7.1 Uso, aplicação e composição do extrato de abacaxi 33

2.7.2 Fitocompostos como agentes antimicrobianos 34

3. OBJETIVOS 35

3.1- Objetivo Geral 35

3.2- Objetivos específicos 35

4. MATERIAL E MÉTODOS 36

4.1- Micro-organismos 36

4.2- Isolamento do agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro 36

4.3- Identificação dos fungos isolados 38

4.4- Identificação fenotípica e caracterização dos isolados de bactérias láticas 38

4.5- Ativação, checagem e manutenção das cepas de bactérias láticas 38

4.5.1 Manutenção dos isolados 39

4.6- Avaliação da atividade antifúngica das bactérias láticas 39

4.6.1 Difusão em disco proposto por Corsetti et al. (1998). 39

4.6.2 Método da cultura mista proposto por Silva (2015). 40

4.6.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) 41

4.6.4 Concentração Fungicida Mínima (CFM) 42

4.7- Identificação e caracterização fenotípica dos isolados de BAL 43
4.7.1 Produção de gás 43
4.7.2 Lactofermentação 43
4.7.3 Tolerância ao Cloreto de Sódio (NaCl) 43
4.7.4 Redução do nitrato 43
4.7.5 Produção de amônia 44
4.7.6 Produção de diacetil - Voges-Proskauer (VP) 44
4.8- Preparo de extrato bruto metanólico de casca e coroa de abacaxi variedade Pérola 44
4.9- Avaliação da atividade antifúngica do extrato aquoso de *A. comosus* 45
4.10- Produção do extrato bruto de *F. guttiforme* 45
4.10.1 Preparo do pré-inóculo e inoculação do fungo 45
4.10.2 Preparo do extrato fúngico 45
4.11- Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE UV-VIS) 46
4.12- Análises estatísticas 47

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 47
5.1- Isolamento e identificação do fitopatógeno 47
5.2- Identificação e caracterização fenotípica dos isolados 51
5.2.1 Coloração de Gram e teste de catalase 51
5.2.2 Identificação dos isolados de BAL pelo kit API 50 CHL 51
5.3- Caracterização dos isolados 53
5.4- Avaliação da atividade antifúngica das bactérias láticas 55
5.5- Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) 62
5.6- Extrato bruto metanólico e avaliação da atividade antifúngica do extrato bruto de abacaxi 65
5.7- Preparo dos extratos do fungo 68
5.8- *Fingerprint* do perfil metabólico dos extratos de *Fusarium* 68

6. CONCLUSÃO 78

7. REFERÊNCIAS 79

8. ANEXOS 91
8.1- Anexo 1 92
8.2- Anexo 2 96
8.3- Anexo 3 99

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merril) do mundo. Apesar da excelente colocação na produção do fruto no *ranking* mundial, a exportação da fruta não é expressiva. Esse fato se dá principalmente a fatores técnicos e fitossanitários. Dentre as doenças que acometem o abacaxizeiro, destaca-se a fusariose ou gomose do abacaxizeiro, causada pelo fungo *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell(VENTURA; ZAMBOLIM, 2002). Uma vez acometendo uma plantação, a fusariose pode causar danos de até 80% na produção do fruto. Um dos principais métodos de controle da doença no Brasil é o uso de defensivos agrícolas.

Em 2010, a venda de agroquímicos no Brasil foi de US$ 7,304 bilhões, passando para US$ 8,487 bilhões em 2011 e atingindo a cifra de US$ 9,710 bilhões em 2012 (SINDAG, 2013). O impacto ambiental causado pelo uso excessivo desses agroquímicos preocupa cada vez mais a sociedade. Desta forma é necessárioo desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de produtos químicos, que podem causar danos à saúde humana e ao ambiente.

O controle biológico é uma opção viável e que promete bons resultados, tendo sidoefetivo quanto ao aumento da proteção e produtividade de diversas culturas (BETTIOL; MORANDI, 2009).Baker e Cook (1974)define o controle biológico como a redução da densidade de inoculo ou de suas atividades determinantes, podendo ser realizado através de um ou mais organismos.

As bactérias produtoras de ácido lático, bactérias láticas (BAL), são indicadas como bons agentes antagônicos a patógenos.Estas bactérias podem produzir vários metabólitos secundários que possuem ação antifúngica e inibitória, como ácidos acético, lático, peróxido de hidrogênio, entre outros (FRANCO, 2010). Além da produção de metabólitos, as BAL também podem ter ação contra fungos fitopatogênicos por meioda competição por nutrientes. Além do potencial como agentes de controle biológico, estudos indicam que essas bactérias também apresentam a capacidade de destoxificação de micotoxinas (FRANCO, 2010).

Dado ao potencial biotecnológico das bactérias láticas, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar "*in vitro*" a capacidade de bactérias láticas em inibir o agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bromeliaceae

A primeira descrição da família Bromeliaceae foi no final do século XVII, e é atribuída ao padre francês Charles Plumier, que batizou como bromélias essas plantas de aspecto diferente. A reunião formal sobre estas plantas só ocorreu em 1789, sendo então chamadas de Bromelle. Atualmente essa família é considerada como a segunda maior entre as monocotiledôneas epífitas, ficando atrás apenas da família Orchidaceae (BENZING, 1980 IN: MANETTI et al., 2009).

As Bromeliaceas são importantes devido à sua diversidade ecológica, e alto potencial adaptativo frente a diferentes habitats, o que permite às espécies serem encontradas em ambientes de clima quente e seco, como os desertos, e até mesmo em florestas úmidas e regiões montanhosas frias (BENZING, 2000). Algumas das plantas desta família são utilizadas pela medicina popular e tradicional para tratarvárias doenças, como: bronquites, aftas, tosses e inflamações em geral (MANETTI, 2009). Além disso, algumas espécies são úteis para a extração de fibras, destinadas a fabricação de redes, cordas, barbantes e até mesmo linha de pesca, como fonte de alimento na ração animal e na alimentação humana (VASCONCELOS et al., 2013).

A família Bromeliaceae abrange cerca de 57 gêneros, com aproximadamente 3.000 espécies. (VASCONCELOS et al., 2013). No Brasil, ocorrem cerca de 40 gêneros de Bromeliaceae, sendo encontrados 40% do total de espécies dessa família. O abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merril é a espécie mais conhecida, sendo considerada uma das frutas tropicais mais populares do mundo (BENNETT, 2000).

2.1.1O abacaxi

O abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merril) é uma monocotiledônea da família Bromeliaceae, subfamília Bromeloideae, que apesar de ser proveniente das Américas,se adaptou bem nas regiões tropicais (CRESTANI et al.,2010).REINHARDT et al. (2000) definem o abacaxizeiro como sendouma planta herbácea perene, que apresenta um caule grosso com folhas crescendo ao seu redor. O sistema radicular dessa planta é fasciculado, fibroso e superficial. O gênero *Ananas* se diferencia dos outros componentes da família Bromeliaceae por apresentarem frutos tipo sincarpo,

enquanto nos outros gêneros os frutos permanecem livres (REINHARDT et al., 2000).

O abacaxizeiro é uma planta de clima tropical.A faixa de temperatura para o melhor desenvolvimento das raízes e folhas do abacaxizeiro situa-se entre 22 a 32°C, a pluviosidade em torno de 1.200 a 1.500mm anuais, e a insolação anual ótima para a planta vai de 2.500 a 3.000 horas, o que corresponde a uma média de 7,5 horas de luz solar por dia (NASCENTE et al., 2005; CUNHA,1999).Por ser uma cultura tropical, esta planta pode resistir a temperaturas pouco acima de 40 °C, característica encontrada em muitas das regiões produtoras no Brasil (CUNHA, 1999).

O fruto possui concentração elevadade açúcar, além de uma diversidade de sais minerais e vitaminas A, B1, B2 e C. Cem gramas de polpa fresca de abacaxi possuem aproximadamente 50 quilocalorias, 89% de água, 0,3% de proteína, 0,5% de lipídios, 5,8% de glicídios, 3,2% de celulose e 0,3% de sais (SOARES et al.,2004).

A. comosus produz uma enzima proteolítica muito usada na composição de medicamentos por possuir propriedades medicinais que auxiliam na digestão, a bromelina. O conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos exemplares da família Bromeliaceae EC 3.4.22.4, possui ação diurética e depurativa, além de ação anti-inflamatória. Possui indicação no tratamento de hematomas, contusões e também como solvente de mucosidades no sistema respiratório (MANETTI, 2009).

2.1.2Mercado nacional de abacaxi

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de abacaxi, perdendo apenas para a Tailândia. No ano de 2015 a produção de abacaxi foi de aproximadamente 1.801.415 toneladas (IBGE, 2015). No Brasil, a principal cultivar plantada é a *Pérola* e em seguida a *Smooth cayenne*. Ambas são suscetíveis à fusariose (Cunha et al., 1999).O nordeste é a região com a segunda maior produção, com 32,2%. A Bahia ocupa o quarto lugar no ranking da produção nacional de abacaxi, com 129.600 mil frutos por ano, presentes em 7.700 mil hectares de área plantada, distribuída em 110 municípios em várias regiões do Estado (IBGE, 2017).Os municípios de Umburanas (72.000 mil frutos por ano) e Itaberaba (18.876 mil frutos por ano), ambos localizados na Chapada Diamantina, são os maiores produtores do fruto no estado (IBGE,2015).

Apesar de o Brasil ter um clima adequado, a produtividade da abacaxicultura brasileira é baixa. Isso pode serdevido a fatores ambientais, fitossanitários, assim como à fatores técnicos, como práticas inadequadas de cultivo (CUNHA et al.,1999). Entre os anos de 2001 a 2015, houve uma redução de 11,39% no valor obtido com as exportações de abacaxi para o mundo , em contrapartida, o preço médio do fruto para exportação aumentou cerca de 10,54% (EMBRAPA, 2016). Indicando que mesmo com o aumento no valor de mercado do fruto, o Brasil está reduzindo o ganho com o fruto.

A cultura do abacaxi é alvo de infecção por diversos tipos de patógenos, o que causa quedas na produtividade e na qualidade dos frutos a serem comercializados. A fusariose,também conhecida como resinose ou gomose,está dentre os principais problemas encontrados na cultura do abacaxizeiro, é capaz de afetar todas as partes da planta (GARCIA, 2013). No Brasil, a fusariose do abacaxizeiro, é causada pelo fungo *Fusarium guttiforme* (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998). Este fitopatógeno é responsável por até 80 % de perdas na produção do fruto. Este valor pode variar a depender da região, condições ambientais e do período fenológico da planta no qual ocorreu à infecção (CUNHA et al.,1999).

2.2 Principais problemas na produção de frutas no Brasil

Apesar de possuir uma grande oferta de produtos agrícolas, o volume de exportações do Brasil ainda é pequeno. Lacerda et al. (2004) apontam as barreiras comerciais e fitossanitárias, além da falta de organização da produção e comercialização das frutas, como os principais fatores responsáveis pelo fraco desempenho do país no comércio internacional de frutas. O Brasil tem valores elevados de perda de frutas na pós-colheita.De acordo com a IBRAF (2009), esse valor corresponde a cerca de 40% da produção nacional, o que é equivalente a 10 milhões de toneladas por ano.

Segundo Oliveira et al. (2006), a principal causa da perda de produtos pós-colheita, são as infecções por micro-organismos. Esses micro-organismos geralmente são favorecidos por ferimentos e danos fisiológicos, pois estes deixam as frutas mais suscetíveis à colonização por patógenos.

Em 2013 o Brasil produziu cerca de 43,6 milhões de toneladas de frutas, o que corresponde a terceira maior produção de frutas do mundo. A produção brasilei-

ra de frutas frescas teve um aumento de produção de 30% no período de 14 anos. Boa parte da produção de frutas nacionais, cerca de 42%, é concentrada no estado de São Paulo. Conforme dados do IBGE, no país, 2,2 milhões de hectares são utilizados para a fruticultura, o que corresponde a 1,5% do total da área agricultável no Brasil (IBRAF, 2013).

As frutas que mais representam o volume total da produção brasileira são, por ordem de produção: a laranja, banana, abacaxi, melancia e mamão (IBGE, 2009).

2.2.1 *Fusarium* sp.

Barnett e Hunter (1972) descrevem espécies do gênero *Fusarium* como espécies que possuem colônias de aspecto cotonoso, apresentando, em grande parte dos casos, colorações rosa, púrpura ou amarelada no micélio ou no meio de cultura.Os conidióforos dessas espécies variam muito entre si, podendo apresentar formato simples e delgadas, ou até mesmo curta e espessa. As ramificações podem ser irregulares, únicas ou agrupadas, sendo que as últimas ocorrem dentro do esporodóquio. O conídio é hialino, sendo os macroconídios com várias células discretamente curvadas, ou até mesmo inclinadas e pontiagudas na porção terminal, apresentando formato típico de canoa.Os microconídios possuem uma célula de formato ovoide, podendo ser encontradas sozinhas, ou em cadeia.

Fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* possuem ampla distribuição geográfica, podendo ocorrer espécies cosmopolitas ou espécies restritas a determinados ambientes. Este gênero ocorre predominantemente nos trópicos e regiões subtropicais. Algumas espécies possuem uma íntima associação com o hospedeiro (Burgess & Summerell, 1992).

No Brasil as espécies de *Fusarium* possuem grande importância fitopatológica. Existem muitos registros de várias espécies responsáveis por uma série de doenças em plantas. Apesar de serem comumente associados como patógenos de plantas, muitos trabalhos relatam espécies do gênero *Fusarium* como fungos endofíticos, e também ocorrência de várias substâncias bioativas produzidas por espécies deste gênero. Lee et al. (1995) observaram a produção do diterpeno subglutinol A por *Fusarium subglutinans*, isolado da planta *Tripterygium wilfordii*. Esse diterpeno

apresenta atividade imunossupressora, e diferente da ciclosporina, um importante imunossupressor de origem fúngica, o subglutinol A não é tóxico.

Zhan et al. (2007), também chamam atenção para o potencial de fungos do gênero *Fusarium* como produtor de substâncias bioativas. Os autores isolaram as substâncias beauvericina e bikaverina a partir do fungo *Fusarium oxysporum.*Essas substâncias apresentaram citotoxicidade contra células tumorais humanas.

O gênero *Fusarium* sempre foi visível em relação ao número de espécies produtoras de metabólitos de importância para a ciência e a agricultura. Leslie e Summerell (2006) relataram o uso de metabólitos proveniente desse gênero para o tratamento de diversas doenças em plantas, humanos e animais domesticados, podendo inclusive, serem utilizados como matéria prima para a síntese de substâncias promotoras de crescimento de plantas e animais.

Segundo Leslie e Summerell (2006) metabólitos secundários e micotoxinas também podem ser utilizadas como caracteres secundários de identificação das espécies de *Fusarium*. Perfis químicos complexos de metabólitos secundários podem ser utilizados para associar cepas com determinados grupos quimiotaxonômicos de *Fusarium.*

2.2.2 Fusariose do abacaxizeiro

A fusariose do abacaxizeiro foi descrita pela primeira vez no Brasil em 1964, em São Paulo, em frutos da cultivarSmoothCayenne (KIMATI; TOKESHI, 1964). É a doença mais grave dessa cultura no Brasil. *Fusarium guttiforme* é o agente etiológico da fusariose, pertencente à família Tubercularia**ceae**.Esta espécie foi denominada anteriormente como *Fusarium moniliforme* Sheldon var.*subglutinans* e posteriormente descrita como *F. guttiforme* (NIRENBERG; O‘DONNELL, 1998).Também conhecida como resinose fúngica, a fusariose afeta todas as partes da planta, entretanto o maior potencial de destruição se dá nos frutos.

O Brasil e a Argentina foram os primeiros países do mundo a registrarem esta doença. O transporte de frutos contaminados, principalmente através da sua exportação, é o principal fator apontado como responsável pela disseminação da doença para outros continentes (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

Segundo Matoset al. (2012), fusarioses causadas por espécies patogênicas de *Fusarium* que habitam o solo (responsáveis por podridões radiculares, podridões na base do tronco e murchas vasculares) são mais difíceis de serem controladas. Entretanto, doenças de parte aérea causam mais prejuízos para os produtores, pois afetam o produto comercial, resultando na redução da renda para o produtor.

A fusariose constitui séria ameaça à abacaxicultura mundial tendo em vista que as cultivares de participação expressiva na produção mundial de abacaxi são suscetíveis a esta doença (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998). O fungo *F. guttiformeé* patogênico apenas ao abacaxi, apresentando elevado grau de especificidade com o hospedeiro.Este patógeno penetra em seus hospedeiros por meio de aberturas naturais ou ferimentos.Possui a capacidade de infectar mudas/frutos durante os períodos de inflorescência e crescimento, com perdas estimadas de 30 a 40% nos frutos e até 20% nas mudas (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

Diversos são os sintomas observados em plantas infectadas por este microorganismo, como podridão dos tecidos afetados acompanhada por exsudação de substâncias de característica gomosa (Figura 1: A e B- vermelhidão e apodrecimento do tecido do fruto, C- exsudação de goma), são os sintomas mais evidentes desta doença (MATOS; CABRAL, 2005).Outros sintomas da doença em plantas de abacaxizeiro incluem curvatura do caule, morte da região apical, encurtamento das folhas, alteração na filotaxia, redução no desenvolvimento, clorose e morte da planta. Nos frutos, os sintomas da fusariose caracterizam-se pela exsudação de resina através da cavidade floral, apodrecimento da polpa e presença de resina nos lóculos do ovário. Externamente, os frutilhos afetados evidenciam descoloração amarronzada e apresentam-se em nível inferior em comparação com os vizinhos sadios devido à exaustão dos tecidos internos (VENTURA, 2000).

A época de produção do fruto é determinante na incidência do patógeno. Desta forma em períodos favoráveis à doença, como de umidade elevada e temperatura variando entre 15ºC e 25ºC, há uma maior probabilidade de infecção das mudas pelo *F. guttiforme* (VENTURA In: ZAMBOLIM, 2002). Glenn (2007) também aponta a temperatura e umidade relativa como fatores contribuem para o desenvolvimento da fusariose. O autor também cita que a pluviosidade, a esporulação do fungo, os padrões dos ventos, danos causados por insetos e o manejo do homem também podem interferir na incidência da doença.

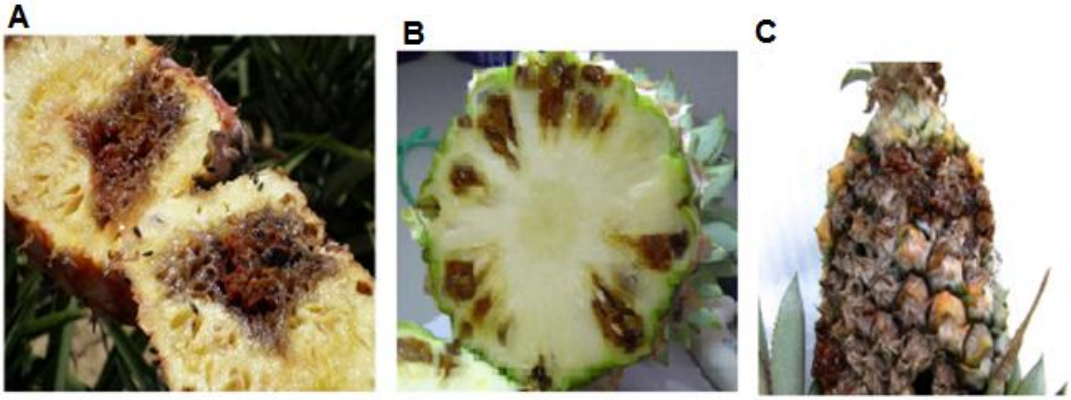

Figura 1: A e **B** Sintomas da fusariose do abacaxi em frutos (vermelhidão e apodrecimento do tecido interno do fruto). **C** (Exsudação de goma na parte externa do fruto). Fonte: (TROCOLI, 2010).

Estudos feitos na região de Coração de Maria, na Bahia, mostram que uma maior precipitação pluviométrica no período compreendido entre a indução floral e a colheita dos frutos, resulta no aumento da incidência da fusariose. Além disso, há uma relação entre a temperatura, à fenologia e a incidência da doença. Essa última possui maiores índices quando a planta se encontra na faixa de temperatura entre 15 e 22ºC, após o tratamento de indução floral (MATOS et al., 2000).

2.2.3 Agente etiológico

Nirenberg e O'Donnell (1998) em análise de sequências do DNA e de fragmentos dos genes que codificam a beta tubulina, fator de elongação 1-alfa e calmodulina, bem como a observação de marcadores morfológicos, mostraram que o agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro pertence a uma única espécie, a qual foi denominada *Fusarium guttiforme*.

Ploetz (2006) também aponta *Fusarium guttiforme* como o principal agente causador da fusariose em abacaxi. Entretanto, pesquisas mais recentes chamam atenção para a presença de *Fusarium ananatum* em lesões no abacaxi na África do Sul (JACOBS et al., 2010). Stepién et al. (2013) em análise filogenética de diferentes isolados de *F. ananatum* revelaram que esses isolados apresentaram relação muito próxima a isolados de *F. guttiforme.*

Em estudo realizado por Stepién et al. (2013), os autores encontraram 10 espécies de *Fusarium* isoladas a partir de frutos de abacaxi, sendo elas: *F. ananatum, F. concentricum, F. fujikuroi, F. guttiforme, F. incarnatum, F. oxysporum, F. polyphialidicum, F. proliferatum, F. temperatum* e *F. verticillioides.* Apesar de estarem presentes na microbiota do fruto, a maioria das espécies ocorreu em baixa frequência, e não foram relatadas como patogênicas de abacaxi.No Brasil, ainda não há relatos de outras espécies envolvidas na fusariose do abacaxizeiro além de *F. guttiforme.*

O conhecimento atual sobre o patossistema abacaxizeiro-*Fusarium* ainda não abrange os eventos que ocorreram após a deposição do patógeno na superfície do hospedeiro. Ainda não existem relatos de como ocorre a germinação, bem como a colonização dos tecidos da planta pelo patógeno. Essa falta de informações se da pela escassez de estudos epidemiológicos e histopatológicos da doença (TROCOLI, 2010). Também não existem relatos, sobre a fase sexuada do patógeno, na literatura. Não se conhece bem o comportamento biológico, e nem a diversidade genética da espécie (CRESPO, 2010).

F. guttiforme é pertencente ao Complexo *Gibberella fujikuroi* (GFC), esse complexo, inclui variadas espécies fitopatogênicas, sendo que muitas destas são produtoras de micotoxinas (PLOETZ, 2006).Atualmente, esse complexo é composto por nove espécies com o telomorfo descrito. Entretanto, para *F. guttiforme*, ainda não se conhece a fase teleomórfica (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Em condições laboratoriais, a colônia do patógeno apresenta crescimento micelial branco inicialmente, passando para róseo-alaranjado, entretanto algumas vezes observa-se coloração violeta. Esse fungo produz dois tipos de esporos, sendo eles os microconídios, que apresentam formato oval, e os macroconídios, que apresentam parede delgada e formato cilíndrico. Como características principais, *F. guttiforme*, produz polifiálides em falsas cabeças, assim como ausência de clamidósporos (LESLIE; SUMMERELL, 2006)(Figura 2).

De acordo com Ventura e Zambolim (2002), o fungo causador da fusariose do abacaxi possui especificidade no gênero *Ananas* sp. Boutigny (2011) também encontraram evidências de que os membros do complexo *Gibberella zeae* apresentam preferência de hospedeiro em certa medida.Os conídios do fungo podem persistir no solo por até 13 semanas ou em restos de plantas colonizadas por até um ano (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

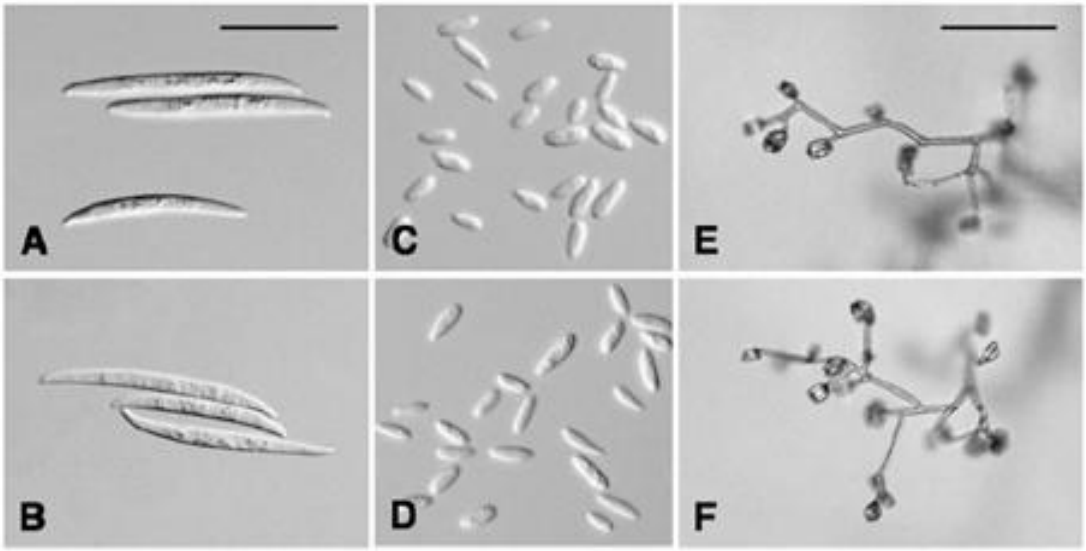

Figura 2: Estruturas microscópicas de *Fusarium guttiforme.* **A – B**: Macroconídios; **C – D**: Microconídios; **E – F**: Microconídios in situ em meio CLA. (Agar e Folha de Cravo). **A – D**, barra de escala = 25 µm; **E – F**, barra de escala = 50 µm.
Fonte: LESLIE; SUMMERELL (2006).

2.2.4 Identificação de *F. guttiforme*

As principais características utilizadas para identificar, morfologicamente, espécies fúngicas são: a morfologia macro e microscópica da colônia e das hifas e esporos, sua pigmentação, assim como sua taxa de crescimento. Além destas características, a especificidade de hospedeiros e o perfil químico dos metabólitos secundários são muito importantes (THARANE, 1990).

Segundo Michereff (2001), para se determinar o agente etiológico de uma doença de planta é preciso seguir os postulados de Koch, sendo estes divididos em quatro etapas. Inicialmente o micro-organismo precisa ser ocorrente em plantas com lesões da doença, posteriormente deve ser isolado e cultivado em meio de cultura. A terceira etapa consta na reinoculação do micro-organismo na em plantas sadias da mesma espécie em que foi isolado inicialmente, e reproduzir no vegetal os mesmos sintomas da doença estudada. Por fim, o patógeno é isolado mais uma vez das plantas onde foram inoculados anteriormente, sendo essencial que apresentem as mesmas características presentes no primeiro isolamento.

Por algum tempo as espécies de *Fusarium* eram classificadas por características morfológicas e especificidades do hospedeiro. A análise de sequências de DNA vêm revolucionando a forma em que as espécies são caracterizadas, permitindo uma descrição de espécie mais confiável e detalhada (KVAS et al., 2009).

2.3 *Fingerprint*

Também conhecido como técnica de “impressão digital”, o *fingerprint* corresponde a uma rápida análise de uma série de amostras, com objetivo de avaliar a diversidade metabólica. Apesar de avaliar o número de metabólitos presentes nas amostras, o *fingerprint* não tem por objetivo a identificação dos compostos, sendo possível apenas comparar e classificar, por meio de dados na literatura, os perfis metabólicos das amostras. Esse perfil é muito variável para cada amostra, podendo ser alterado de acordo com condições abióticas e bióticas.

O *fingerprint* pode ser utilizado para estudos de caracterização de mutações genéticas, para avaliar as respostas das plantas ou animais ao estresse abiótico, bem como no controle de qualidade e verificação de extratos de plantas (CABRAL, 2010).

2.3.1 Metabólitos secundários de micro-organismos

De acordo com Ratklao (2016) entre os anos de 1940 a 1974, 62% de todos os metabólitos obtidos era proveniente de actinobactérias, principalmente *Streptomyces*, seguido por 23% de metabólitos provenientes de fungos e 15% obtidos a partir de outras fontes bacterianas. Entre 1975 a 2000 esse perfil mudou, sendo observado um crescimento na produção/estudo de metabólitos secundários a partir dos fungos. Na década de 80 fungos e actinobactérias dividiram a mesma porcentagem de produção de metabólitos secundários, sendo cada um, responsável por 45% da produção. Do ano 2000 até 2010, os registros indicam que os fungos lideraram a participação como fonte de antibióticos, sendo responsáveis por 61% da fonte de compostos naturais, superando as actinobactérias, que passaram a ser fonte de apenas 28,5% dos compostos naturais.

2.3.2 Perfil metabólico *Fusarium sp.*

Santos (2004) identificou a presença de metabólitos tóxicos, antibacterianos, inseticidas, e outras substância com propriedades biológicas produzidas pelos fun-

gos endofíticos *Penicillium sp*. e*Fusarium moniliforme* isolados a partir de *Melia azedarach*. A diversidade estrutural dos metabólitos desses fungos é ampla, sendo encontrados policetídeos, terpenoides, esteroides, aminoácidos, entre outros.

A liberação de metabólitos secundários, incluindo micotoxinas, tais como fumonisinas e desoxinivalenol, pode realmente melhorar a aptidão de fungos e nicho de colonização, inibindo fungos concorrentes ou até mesmo comprometendo a saúde da planta hospedeira para facilitar crescimento do patógeno e a colonização dos tecidos da planta (GLENN, 2007).As micotoxinas produzidas por fungos são substâncias altamente tóxicas para os mamíferos, algumas são potentes carcinogênicos (Pinto et al.,2003). Segundo Bennett e Klich (2003) micotoxinas são produtos naturais derivados do metabolismo secundário de fungos filamentosos, atualmente há cerca de 400 micotoxinas classificadas.

Espécies de *Fusarium* podem produzir uma matriz química diversificada de micotoxinas, como diacetoxiscirpenol, desoxinivalenol, nivalenol, toxina T-2, a zearalenona, fumonisinas, fusarin C, beauvericina, moniliformina e fusaproliferin (GLENN, 2007).Hussein e Brasel (2001) apontam grãos e cereais como a principal fonte de micotoxinas, pois abrigam a maioria dos fungos saprofíticos durante o processo errôneo de estocagem desse material, ou ainda, devido aos fungos endofíticos, na fase de crescimento vegetativo.

Mais de 40 tricotecenos produzidos por espécies de *Fusarium* são conhecidos. Tricotecenos também são tóxicos para uma variedade de plantas. A produção de toxinas pode aumentar a virulência de algumas espécies de *Fusarium* em plantas hospedeiras (DESJARDINS, 2006).Desoxinivalenol, também conhecido como vomitoxina, é muitas vezes o tricoteceno mais comum em contaminação de grãos em todo o mundo (GLENN, 2007). Não há relatos da produção de DON por *F. guttiforme,* assim como outras micotoxinas.

Ter uma compreensão clara da identidade taxonômica e o potencial micotoxigênico das diversas espécies de *Fusarium* e sua fitopatologia associada é fundamental para o desenvolvimento e a implementação de estratégias de vigilância e gestão da contaminação por micotoxinas. (GLENN, 2007). Assim como essa informação também pode ampliar o conhecimento sobre o patossistema da fusariose do abacaxizeiro, bem como medidas de prevenção e controle da doença.

2.4 Métodos de controle da fusariose

Segundo Chalfound et al. (1984) há relação entre a broca-do-fruto (*Thecla basalides* Geyer) e a incidência da fusariose.Neste trabalho os autores observaram que a aplicação de inseticida para a redução da broca-do-fruto diminuir a incidência da fusariose. Nesse caso a infestação do abacaxizeiro pelo *Fusarium guttiforme*o-corre por ferimentos causados pelo inseto.

A fusariose do abacaxi no Brasil é controlada principalmente com o uso de fungicidas. Nogueira et al. (2014) avaliaram o efeito de diferentes concentrações em três fungicidas (Tebuconozol, Azoxistrobina e Tiofanato-metilo) no controle da fusariose. Neste trabalho os autores comprovaram que os fungicidas testados são efetivos no controle da doença, entretanto atuaram de forma negativa no peso, aparência e tamanho da coroa. Apesar de serem efetivos no controle da fusariose, os fungicidas prejudicam a aparência, e consequentemente a venda dos frutos, além de constituírem um risco à saúde humana e do meio ambiente.

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2015) os fatores que contribuem para o aumento da incidência da doença são: pouca oferta de genótipos resistentes, uniformização das plantações e o intenso trânsito de mudas contaminadas. Além disso, há pouca disponibilidade de produtos registrados no mercado para o controle da fusariose. Em 2014 estavam registrados apenas dois princípios ativos no Brasil para fusariose do abacaxi (MAPA, 2015).

2.5 Controle biológico

Controle biológico pode ser definido como "*a redução da densidadede inóculo ou das atividades determinantes da doença, através de um ou mais organismos*"(BAKER; COOK, 1974).

O uso de micro-organismos antagonistas é ummétodo de controle biológico. Podendo ser eficaz tanto no solo, quanto nos órgãos de propagação, ou ainda através da manipulação do ambiente (LARANJEIRA, 2001). Como exemplo de micro-organismos com ação antagônica a patógenos de plantas, encontram-se as bactérias láticas. Elas apresentam potencial de inibição do crescimento fúngico, e de destoxificação de micotoxinas. A atividade antimicrobiana das bactérias láticas pode estar associada à competição por nutrientes, à produção dos ácidos lático, orgânico e acético, além da produção de peróxido de hidrogênio, um importantíssimo agente

antimicrobiano (FRANCO, 2010), e à produção de diferentes tipos de enzimas como as pectinases produzidas pelos *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides* (MENEZESet al., 1988).

A inserção de agentes de biocontrole às práticas de manejo recomendadas pelo CNPMF (Embrapa Mandioca e Fruticultura Nacional) pode beneficiar o manejo integrado da doença. Entretanto, são escassas as pesquisas com controle biológico da fusariose do abacaxizeiro. Considerando a importância do desenvolvimento de métodos de controle da doença, levando em conta a redução do custo e menor impacto negativo ao meio ambiente, tornam-senecessários estudos que selecionem micro-organismos eficientes para o biocontrole da fusariose (TROCOLI, 2010).

Atualmente, diversas pesquisas veem sendo realizadas sobre o controle biológico de doenças fúngicas, visando a redução de uso de agroquímicos na agricultura nacional, e estudos sobre a redução ou inativação de micotoxinas. Dentre as micotoxina produzidas por fungos do gênero *Fusarium,* destacam- se os tricotecenos, que são derivados de um sistema cíclico, o tricotecano. Dentre os tricotecenos mais conhecidos destaca-se o desoxinivalenol (DON), um tricoteceno do tipo B. Há vários relatos na literatura que indica o DON, como o responsável por infecções alimentar e problemas no sistema imunológico, principalmente em suínos (FRANCO, 2010).

2.6 Bactérias ácido láticas

Bactériasácidoláticas ou simplesmente bactérias láticas, morfologicamente podem ser cocos ou bacilos Gram-positivos, catalase negativa, desprovidos de citocromo, aerotolerantes de metabolismo exclusivamente fermentativo. O principal produto final da fermentação de açúcares é o ácido lático (AXELSSON, 2004). Estas bactérias encontram-se em grandes quantidades na natureza e também no nosso aparelho digestório.

Com base na definição fisiológica, bactérias láticas estão compreendidas em um grupo com cerca de 20 gêneros. Do ponto de vista tecnológico, destacam-se os gêneros: *Lactococcus, Lactobacillus, Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Oenococcus, Tetragenococcus, Vagococcus e Weissella*. Conhecido desde 1940, o gênero *Lactobacillus*compreende cerca de 80 espécies conhecidas, e é o mais encontrado (AXELSSON, 2004).

A morfologia é um dos principais métodos utilizado para a classificação de bactérias láticas em seus diversos gêneros. Além disso, o modo como fermentam a glicose, o crescimento em diferentes temperaturas, a capacidade de crescer sob altas concentrações de sais, ácidos ou base, a configuração do ácido lático produzido, bem como marcadores quimiotaxonômicos como a composição de ácidos graxos e constituintes da parede celular, são técnicas utilizadas para a classificação dessas bactérias (FRANCO, 2010).

Bactéria láticas não conseguem sintetizar grupos porfirina, desta forma são desprovidas de catalase e citocromos.Não possuem uma cadeia transportadora de elétrons, fazendo com que elas dependam da fermentação para produzir energia (AXELSSON, 2004).

Bactérias consideradas GRAS (Generally Recognised As Safe) possuem um grande potencial na indústria alimentícia, podendo ser utilizadas na segurança, qualidade, melhoramento sensorial e qualidade nutricional. Além disso, essas bactérias apresentam um grande potencial antimicrobiano frente a diversos micro-organismos. Essas funções ocorrem principalmente devido à: baixos valores de pH do alimento, competição e produção de metabólitos com potencial inibidor (AUD, 2014).

Bactérias láticas são classificadas como homo ou heterofermentativas de acordo com a fermentação da glicose em condições ilimitadas de crescimento. Bactérias homofermentativas utilizam a via glicolítica (Embden-Meyerhof-Parnas) para fermentar glicose. Entre elas estão *Lactococcus, Streptococcus, Pedicoccus* e algumas espécies homofermentativas de *Lactobacillus*. Já as bactérias láticas heterofermentativas utilizam a via do 6-fosfogliconato/fosfoquetolase (6-PG/PK) paradescarboxilar os carboidratos,tendo como produtos finais: ácido lático, dióxido de carbono e etanol. Entre as bactérias heterofermentativa estão: *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus fermentum* (AXELSSON, 2004).

Em citação realizada por Sharpe (1962), Orla Jensen(1919) fez uma classificação nova desse gênero, dividindo-o em três grupos, sendo eles classificados como: *Termobacterium*, com crescimento a apenas 45ºC, não sendo registrado crescimento a 15ºC, tem como principais representantes *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus delbruckii*; *Streptobacterium*, com crescimento que pode ou não ocorrer a 45ºC, não havendo crescimento a 15ºC, tem por representantes *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum*; por fim, o grupo dos *Betabacterium*, com crescimento a

15ºC, não havendo crescimento a 45ºC, *Lactobacillus fermentatum* e *Lactobacillus brevis* são representantes deste grupo (PAULO, 1991).

A primeira descrição de “bactérias láticas verdadeiras” foi em 1919, sendo definidas como um grupo grande de bactérias com formato de cocos e bastonetes, sem motilidade, sem esporos, que fermentam açúcar, resultando, principalmente, em ácido lático (YOKOYA, 1997) apud (Costa, 2006).

As relações filogenéticas das bactérias láticas eram avaliadas através da análise dos caracteres fenotípicos. Entretanto, atualmente, existem diversas formas de definir essas relações, como pela análise das macromoléculas (ácidos nucléicos). A hibridização DNA-DNA pode ser utilizada para determinar as relações entre espécies e subespécies. Para determinar a relação filogenética entre gêneros e espécies é possível comparar o RNA ribossômico (COSTA, 2006).

Segundo Yokoya et al. (1997) apud(Costa, 2006), a descoberta da capacidade das BAL em acidificarem produtos agrícolas foi o marco no interesse em se estudar a fisiologia dessas bactérias. O conhecimento a respeito do metabolismo, fisiologia, processamento de nutrientes, bem como os valores ótimos de temperatura e pH para crescimento, permitiram um maior controle do processo de acidificação da matéria prima. Estas bactérias podem ser utilizadas tanto na fabricação de produtos fermentados, quanto na inibição da atividade metabólica e conservação de produtos alimentícios.

2.6.1*Lactobacillus*

Lactobacillus possuem a morfologia de bacilos, ocasionalmente são cocobacilos. A caracterização fenotípica dos *Lactobacillus* os define como: microaerófilos, estritamente fermentativos, geralmente catalase negativa, mas podem apresentar algumas linhagens de pseudocatalase. Geralmente não são pigmentados, raramente produzem pigmentos, podendo variar a coloração de laranja-ferrugem, vermelho-tijolo, ou amarelados. Geralmente são benignos. Podem ser encontrados em humanos na vagina e no trato gastrointestinal, nos vegetais podem ser encontrados em plantas em decomposição (BOTELHO, 2005).

De acordo com a forma como degradam os carboidratos, o gênero *Lactobacillus* é dividido em três grupos. Nesses grupos a seletividade em degradar apenas hexoses é semelhante para todos os componentes, porém a metabolização dos esqueletos carbônicossão diferentes. O primeiro grupo, composto pelos homofermen-

tativos obrigatórios, há conversão quase que exclusiva das hexoses em ácido lático através da via Embdem Meyerhof. O segundo grupo, dos heterofermentativos obrigatórios a via utilizada é a 6-fosfogluconato/fosfocetolase para fermentar as hexoses, essas hexoses são convertidas em ácido lático, etanol e/ou ácido acético, gás carbônico e ATP em condições anaeróbicas. Por fim, o ultimo grupo, composto pelos *Lactobacillus* heterofermentativos, algumas espécies possuem a capacidade de converter as hexoses em ácido lático, ácido acético e/ou etanol, quando em condições limitadas de glicose (KANDLER; WEISS, 1986) apud(SNEATH et al., 1986).

De acordo com Paulo (2010), vários membros do gênero *Lactobacillus* já estão completamente sequenciados e encontram-se armazenados no Gen-Bank(National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Md.), facilitando a identificação de isolados deste gênero.

2.6.2 Bactérias láticas como agentes antimicrobianos

As bactérias láticas apresentam a capacidade de inibir vários organismos e neutralizar micotoxinas, entre elas o desoxinivalenol, produzido por fungos do gênero *Fusarium* (BIANCHINI; BULLERMAN, 2010). Extratos vegetaisvem sido bastante aplicados para o controle agroecológico de fitomoléstias, até mesmo no controleda fusariose do abacaxi (CARVALHO et al.,2006).

As bactérias láticas produzem uma série de substâncias com potencial antimicrobiano, a exemplo de: ácido acético, peróxido de hidrogênio, diacetil, reuterina e bacteriocinas (SCHILLINGER et al., 1996).

Por serem bactérias Gram positivas, as BAL possuem uma camada de peptídeoglicado compondo grande parte de sua parede celular, e em menor parte estão presentes ácidos teicóicos e lipoteicóicos, camada proteica S e polissacarídeos neutros. Esses componentes permitem à parede celular várias funções, como adesão e captura de macromoléculas. Segundo Franco (2010), estudos sugerem que os peptídeoglicanos e polissacarídeos atuam da mesma maneira e proporção na captura de micotoxinas.

As bactérias láticas não produzem catalase devido à falta do grupamento heme. Isso faz com que não consigam remover o peróxido de hidrogênio e outras enzimas como as flavoproteínas e peroxidases não são muito eficientes na remoção do peróxido de hidrogênio no meio (CONDON, 1987). O efeito antimicrobiano do peróxido de hidrogênio é atribuído ao efeito antioxidante deste sobre a membrada lipídi-

ca, pela sua ação na destruição de estruturas básicas de proteínas das células, além de seu potencial em neutralizar o oxigênio singleto, o que acarreta na anaerobiose do ambiente, fato que não é favorável para uma série de micro-organismos (DAVIDSON et al., 1995).

A atividade antifúngica das BAL não está associada apenas à produção de ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, mas também à combinação de vários fatores que estão inter-relacionados, e que podem agir em sinergia (MAGNUSSOM et al., 2003).

2.6.3 Metabólitos de bactérias láticas

Bactérias láticas têm a capacidade de inibir diversos micro-organismos patogênicos devido à ação de vários produtos finais da fermentação, como os ácidos lático e acético, peróxidos de hidrogênio, diacetil, bacteriocinas e produtos secundários gerados pela ação da lactoperoxidase sobre o peróxido de hidrogênio e tiocianato (SHIRAI et al., 1996) apud (RAMÍREZ et al., 2011).Segundo Strom (2005), o ácido lático e a reuterina são antimicrobianos produzidos por bactérias láticas e possuem a capacidade de inibir bactérias, bolores e leveduras.O ácido lático é formado a partir da redução enzimática do piruvato, no final do processo metabólico das BAL. Cada espécie de bactérias láticas produz misturas entre os estereoisômeros D(-)-lactato e L(+)-lactato em proporções diferentes. Isso é resultado da presença das desidrogenases de lactato estereoispecíficas, em alguns casos ocorrem racemases, que são enzimas que tem a capacidade de converter a forma L(+) em D(-) (COSTA, 2006).

A reuterina foi descrita pela primeira vez ocorrendo em *Lactobacillus reuteri*. É uma substância que apresenta capacidade de resistir às enzimas proteolíticas e lipolíticas, e possuem amplo espectro de ação. Essas características fazem com que esse composto de baixa massa molecular produzido pelas bactérias láticas, seja um dos inibidores mais estudados (AXELSSON et al., 1993). Segundo Sung et al. (2003), a atividade antimicrobiana da reuterina pode atingir bactérias Gram positivas e negativas, fungos, vírus e até mesmo protozoários. Além disso, não há registro de que esse composto tenha efeito negativo nas células humanas, apesar da sua capacidade de atravessar tecidos biológicos (FRANCO, 2010).

Outros compostos de baixa massa molecular produzido por BAL com efeito antimicrobiano são os ácidos graxos. Segundo Franco (2010) em Sjogren et al. (2003), foram encontrados três ácidos graxos hidroxilados provenientes da fermen-

tação por *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14, que apresentavam grande atividade antifúngica.

Quando há presença de oxigênio, as BAL podem produzir peróxido de hidrogênio, que por sua vez resulta em radicais hidróxi, causando peroxidação nos lipídeos da membrana e suscetibilidade das células microbiana de muitos micro-organismos (OUWEHAND, 1998).A literatura ainda aponta a produção de ácido fenilático e do ácido 4hidroxi-fenilático pela bactéria lática *Lactobacillus plantarum*, e essas substâncias possuem atividade antifúngica frente a um grande número de espécies de fungos filamentosos (FRANCO, 2010).

Atualmente já estão disponíveis no mercado uma série de produtos biológicos que usam metabólitos, bem como as próprias bactérias láticas no controle de doenças que afetam vegetais. Compost Aid® é um produto elaborado a base de enzimas e bactérias (*Lactobacillus plantarum, Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecium*). Esses componentes aceleram o processo de compostagem, de forma natural, convertendo materiais orgânicos em um composto com baixa relação carbono/nitrogênio, auxiliando na diminuição da severidade de doenças, causadas por patógenos que competem com micro-organismos habitantes do solo (BELLOTTE, 2006).Trocoli (2010) também cita o produto Biopower® (*Bacillus amyloliquefaciens*), fornecido pela empresa MK Química do Brasil Ltda, utilizado no controle de *Fusarium graminearum,Drechslera tritici-repentis* e *Bipolaris sorokiniana* no trigo.

A utilização de metabólitos e/ou isolados de bactérias láticas vem ganhando espaço no mercado e nos centros de pesquisa. Atualmente estão sendo avaliadas quanto ao seu potencial não só antimicrobiano, mas também como aditivo e potencializador de produtos alimentícios. Na literatura estão sendo relatadas várias pesquisas referentes à adição de bactérias láticas à extratos fitoquímicos para lhes conferir potencial probiótico. O extrato de soja foi o mais utilizado para esse fim (Barbosa, 2007; Nicoletti, 2014).

Curriel et al. (2015) avaliaram o potencial de utilização da fermentação com bactérias láticas no aumentodo efeito antioxidante de *Myrtus communis* berries (L.). Segundo os autores, a fermentação das plantas por meio das BAL promoveu o aumento das concentrações de fenóis totais, flavonoides e antocianinas, que foram de 5 a 10 vezes maiores do que as encontradas para o controle não fermentado.

2.7 Extratos fitoquímicos

A extração é a primeira etapa para que possa ocorrer uma análise fitoquímica qualitativa ou quantitativa de uma planta, pois a extração separa os compostos da matriz celular para serem posteriormente analisadas (JACQUES, 2005). É preciso avaliar o método de extração, levando em conta aspectos como a polaridade do solvente, a seletividade para os componentes de interesse, a recuperação do analito, o volume do solvente orgânico necessário, a toxicidade do solvente, o tempo de extração e número de passos requeridos após a extração (COTTA et al., 2009). Ainda é preciso levar em conta o custo, a facilidade na execução, o uso de solventes, assim como a homegeinização do método utilizado.

Várias técnicas de extração têm sido desenvolvidas, com o objetivo de reduzir o tempo de extração e a quantidade de solvente utilizada como, por exemplo, por ultrassom. Comparada à extração por Soxhlet, a extração por ultrassom ocorre em tempo reduzido e oferece boa recuperação dos analitos, por meio de umatécnica simples e de fácil operação. Para realizar esse tipo de extração é preciso se ater a várias questões como: o tipo de solvente ou composição do solvente, tempo de extração, bem como a carga da amostra e teor de água.Além disso, para melhorar a recuperação, usa-se um solvente polar, como acetona ou metanol, minimizando-se, assim, a necessidade da secagem das amostras antes da extração (COTTA et al., 2009).

Atualmente a indústria farmacêutica tem utilizado vários produtos naturais provenientes de plantas, para sintetizar e desenvolver novos medicamentos. (GLOBO-NETO et al, 2007). Calcula-se que atualmente cerca de 30% dos produtos comercializados nas farmácias é proveniente de compostos extraídos (ou até mesmo de estruturas químicas sintéticas) de vegetais (CABRAL, 2010).

2.7.1Uso, aplicação e composição do extrato de abacaxi

O extrato de *A. comosus* já foi estudado sob diversos aspectos, principalmente na área farmacêutica, sendo sua atividade terapêutica indicada para diversas funções. Erukainure et al. (2011), identificaram efeito protetor do extrato da casca de abacaxi contra estresse oxidativo causado pelo álcool nos tecidos cerebrais de ratos albinos. Domingues; Gilioti et al. (2013), atestaram o efeito de extratos e compostos de ananás contra o carrapato bovino *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. Ketnawa

et al. (2012) identificaram que entre extratos de diferentes partes de duas espécies de abacaxis locais da Tailândia (Nang Lae e Phu Lae), o extrato da coroa apresentou maior atividade proteolítica e teores de proteínas totais.Xie et al. (2014), observaram o efeito regulador de fenóis e ácido p-cumárico, extraído de folhas de abacaxi, no metabolismo da gordura hepática de ratos.

Sendo uma das bromeliáceas mais estudadas, devido ao seu valor comercial no mercado agrícola e farmacológico, existe uma série de compostos identificados nos extratos de várias partes do abacaxizeiro, sendo estes pertencentes principalmente às classes dos triterpenos e flavonoides. Esteróis, diterpenos, ácidos cinâmicos, gliceróis substituídos, lignanas ecompostos nitrogenados também foram identificados em pequeno número nesta família. Foram reportadas 20 antocianinas em 83 espécies de Bromeliaceae distribuídas pelas três subfamílias (MANETTI et. al., 2009).Estudo feito por Paixão (2016) em diferentes acessos e híbridos da família *Bromeliaceae,* constatou a presença de diversos metabólitos secundários, tais como: saponinas, taninos, triterpenos, esteroides, alcaloides, antraquinonas, cumarinas, quercetina.

Os terpenos são derivados da rota do ácido mevalônico e metileritritol fosfato(MEP), e sãoformados por unidades isoprênicas, compostas de cinco carbonos. Terpenos são importantes para o desenvolvimento do vegetal. Carotenoides são terpenos que agem como pigmentos na fotossíntese, protegendo o vegetal contra fotoxidação, também tem função de ajudar na resistência contra insetos e microorganismos, devido à suas ações inseticida e antimicrobiana, sendo os monoterpenos piretroides grandes representantes de terpenos com atividade antagonista (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Já os flavonoides possuem uma série de funções que podem ajudar os vegetais na proteção contra patógenos e na resistência frente a mudanças ambientais, tais como: proteção contra raios ultravioleta e luz visível, insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais polinizadores; atividade antioxidante; controle da ação de hormônios; agentes alelopáticos; inibidores de enzimas; entre outros (TAIZ; ZEIGER 2013).

2.7.2 Fitocompostos como agentes antimicrobianos

Muitos compostos que apresentam atividade bactericida, fungicida e/ou inibidora de toxinas, são extraídos de plantas. Além dessas funções, esses fitocompos-

tos podem ser utilizados como analgésicos, sedativos, antidepressivos, entre outros (SILVA et al., 2003).

Para a maior difusão de produtos naturais, ainda existem poucos estudos que se aprofundem nos possíveis riscos desses produtos à saúde humana, animal e para o meio ambiente (VILELA, 2007).

Vilela (2007) estudou o efeito do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre o crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, confirmando a eficiência do óleo essencial como antifúngico. Pedrosa (2012) em estudo com plantas medicinais, destaca o potencial destas como antimicrobianos naturais frente à *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis.*

Apesar de já haverem trabalhos na área de controle biológico com o uso de fitocompostos, e de já existem vários relatos na literatura do efeito inibidor desses compostos contra fitopatógenos, ainda são poucos os trabalhos de otimização e purificação desses compostos. Entretanto, antes do preparo e purificação do composto, é preciso avaliar o efeito antimicrobiano em diversos estudos *in vitro*, e posteriormente, em casa de vegetação e em campo, para determinar a ação do fitocomposto sobre determinadas fitomoléstias.

3 **OBJETIVOS**

3.1 Geral:

Avaliar a atividade antifúngica de duas cepas de bactérias láticas e do extrato metanólico de casca e coroa do abacaxi**,** proveniente da região semiárida da Bahia.

3.2 Específicos:

- Isolar *Fusarium* guttiformede frutos deabacaxi infectado;
- Testar cepas de bactérias láticas quanto ao potencial antagônico à*F.guttiforme*;
- Avaliar o potencial inibitório do extrato bruto de casca e coroa deabacaxi frente a isolados de *F. guttiforme;*
- Determinar se ocorreprodução de micotoxinas porisolados de *F. guttiforme* obtidos a partir de frutos de abacaxi contaminados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Isolados de bactérias láticas pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Saúde Pública - LAMASP/UEFS, isoladas de casca de abacaxi da região semiárida da Bahia.

Linhagens fúngicas de *Fusarium guttiforme* isoladas de amostras de abacaxi, provenientes de feira livre, Feira de Santana, BA, BR.

4.2 Isolamento do agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro

Abacaxis com sintomas da fusariose (Figura 3) foram coletados em feiras livres da cidade de Feira de Santana, Bahia, e levados ao Laboratório de Microbiologia Aplicada a Saúde Pública (LAMASP) da Universidade Estadual de Feira de Santana para processamento e isolamento do fungo.

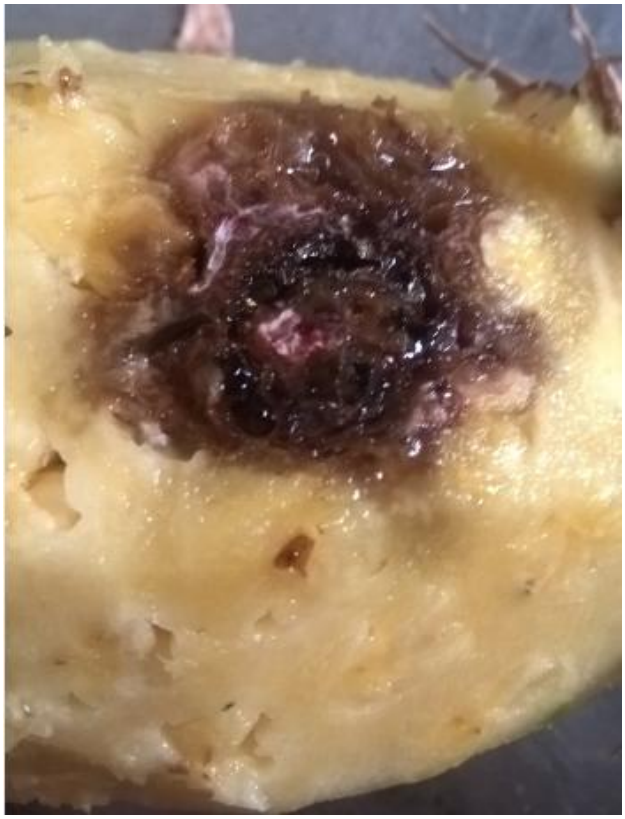

Figura 3: Fruto de abacaxi apresentando apodrecimento da polpa e produção de goma. Fonte: MAMÉDIO, I. M. P. (2017).

Fragmentos medindo cerca de 1,5 cm da casca, polpa, base e miolo da fruta foram desinfestados separadamente em solução de hipoclorito de sódio a 2% por dois minutos, seguido por imersão durante mais dois minutos em álcool etílico 70 %, sendo lavados logo após, em água destilada estéril (três lavagens). Posteriormente, esses fragmentos foram secos em papel de filtro esterilizado e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo BDA (Batata Dextrose Ágar), sendo incubados à temperatura de 25 ± 2 °C, e luz alternada (12/12h) durante sete dias. Para a obtenção da cultura pura do fungo, foram feitas três repicagem sucessivas das colônias que cresceram em volta dos fragmentos de abacaxi, em meio BDA. Os isolados foram preservados em refrigerador a 6,0 ± 2 °C (SOUZA, 2010).

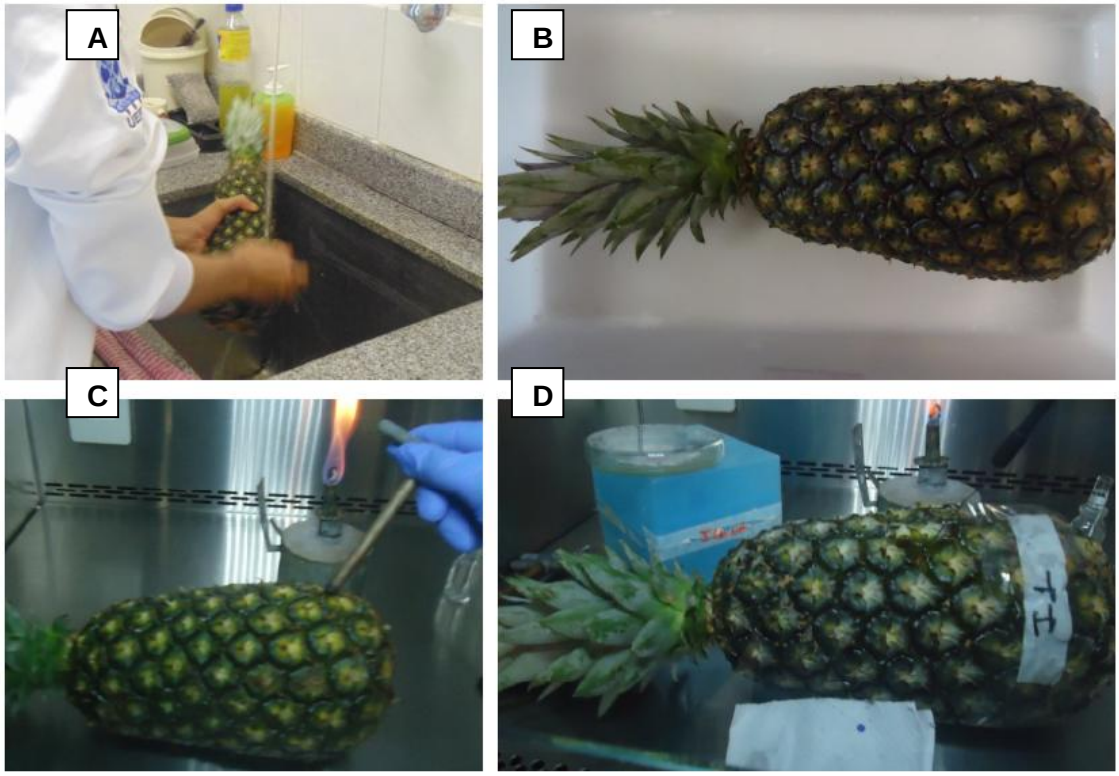

Figura 4: Inoculação dos isolados de Fusarium sp. proveniente de mudas de abacaxi com sintomas da fusariose de acordo com postulados de Koch. Fonte: AUTORA.

Seguindo os postulado de KOCH (KONEMAN et al, 2001), frutos sadios de abacaxi da mesma cultivar tiveram a superfície desinfestada por meio de imersão em solução de hipoclorito a 10% (Figura 4A-4B), e foram inoculados com os isolados provenientes de frutos sintomáticos. Os frutos foram perfurados com vazador de rolha (Figura 4C) e três discos de micélio da cultura dos isolados (Figura 4D), foram inseridos nos orifícios, os quais foram fechados com a parte retirada pelo vazador.

Na testemunha, foram inserido três discos do meio de cultura sem o fungo. Os frutos foram incubados a 25 ± 2,0 °C por dois dias. Após o aparecimento dos sintomas, foi feito o reisolamento a partir das lesões formadas, e foram observadas colônias idênticas às obtidas originalmente.

4.3 Identificação dos fungos isolados

A caracterização dos fungos foi realizada através de chave de identificação proposta por NIRENBERG; O'DONNEL (1998) (Anexo 1).A caracterização morfológica foi realizada a partir da técnica do microcultivo, modificada (ANVISA, 2004).

Um disco de micélio de cada isolado de *Fusarium*com sete dias de crescimento, foi inserido no centro de uma placa contendo meio de cultura BDA. Sobre o disco de micélio foi inserida uma lamínula estéril (seguindo esta técnica, as estruturas do fungo crescem sobre a lamínula).Os isolados foram multiplicados no meio de cultura a 25 ± 2ºC por 5 dias, com fotoperíodo de 12 horas.

As estruturas macro e microscópicas foram observados, sendo levado em contao tamanho, formato e a septação dos conídios produzidos no micélio aéreo e esporodóquio das colônias dos isolados.Estas observaçõesforam feitas com o uso de microscópio óptico, em lâminas com corante azul de lactofenol-azul algodão (20g de ácido lático, 20g de cristais de fenol, 20g de glicerina, 0,05g de azul de algodão, 20g de água destilada), e sem corante (água destilada). A identificação do fungo foi realizada de acordo com as descrições da literatura micológica e fitopatológica especializadas (NIRENBERG; O'DONNELL,1998; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

4.4 Identificação fenotípica e caracterização dos isolados de bactérias láticas.

Foram utilizados dois isolados(ABX3 e ABX5) de bactérias láticas provenientes do caldo fermentativo da casca do abacaxi, pertencentes ao Laboratório de Microbiologia Aplicada e Saúde Publica, para os testes de antagonismo contra as colônias do *Fusarium* isoladas.

4.5 Ativação, checagem e manutenção das cepas de bactérias láticas

Estes isolados estavam preservadas em criotubos contendo meio leite desnatado – LEL (10%; extrato de levedura – 0,5%; glicose – 1,0% , acrescido de 10% de glicerol) acondicionados em *ultrafreezer* -80°C (PAULO, 2010).

Para a sua reativação, as bactérias foram semeadas por esgotamento em estrias, em placas de Petri contendo ágar MRS(DE MAN ROGOSA; SHARP, 1960). As placas foram incubadas a 30 ± 2ºC por 48h. Após a incubação foi coletada uma colônia separada das outras, e esta foi semeada novamente no ágar MRS, repetindo este processo mais uma vez. Este procedimento permite a obtenção de uma colônia originada de uma única célula, garantindo a pureza da cultura.

Após a ativação, as culturas foram checadas quanto a sua pureza, através da realização de testes preliminares para identificação de bactérias láticas, utilizando o teste morfotintorial de coloração de Gram (KONEMAN, 2001) e o teste da catalase (kONEMAN, 2001).

4.5.1 Manutenção dos isolados

Para a utilização dos isolados, após a checagem da pureza das bactérias, estas foram semeadas em tubos com tampa de rosca contendo ágar MRS com baixa concentração de glicose (0,5%), sendo incubados por 30 ± 2ºC durante 24 horas, e após este período armazenados sob refrigeração na temperatura de 6,0 ± 2ºC. Neste tipo de preservação, as células permanecem viáveis em grande concentração por 6 meses, evitando a utilização de repiques sucessivos para a realização dos ensaios, o que pode comprometer o perfil genético do micro-organismo.

4.6 Avaliação da atividade antifúngica das bactérias láticas

Foram utilizados dois métodos para avaliar preliminarmente a atividade antimicrobiana das bactérias láticas sobre os isolados de *Fusarium*.

4.6.1 Difusão em disco proposto por Corsetti et al. (1998).

Em uma placa de Petri previamente esterilizada foram dispostos 15 mL de meio BDA, sendo inoculada, com auxílio de alça de Drigalsky, com suspensão de propágulos de *Fusarium guttiforme* a uma concentração de 10^4 conídios/mL^{-1}, a concentração foi obtida a partir da quantificação dos esporosem Câmera de Neubauer e microscópio de luz, com aumento de 100x, o ajuste da diluição foi feito com água destilada estéril (SÁ, 2009). A seguir, discos estéreis de papel de filtro nº1 (5mm de diâmetro) foram imersos em tubos contendo cultura de bactéria lática com 48h de incubação a 35ºC, e esperou-se 30 segundos para a cultura ser absorvida pelos discos de papel. Os discos contendo cultura lática foram inseridos no centro das placas

inoculadas com os isolados de *F. guttiforme*, que foram incubadas a 22 ± 2ºC durante cinco dias em B.O.D.Também foram realizados testes de controle negativo (ausência de efeito inibitório) e positivo (presença de efeito inibitório). No controle negativo, os discos de papel de filtro foram imersos em água destilada estéril, e no controle positivo emfungicida Derosal® (Carbendazim, Thiram) com água destilada estéril na proporção na concentração de 0,002 mL/g. Mediu-se o halo de inibição, com um paquímetro 48h após a incubação.

4.6.2 Método da cultura mista proposto por Silva (2015).

As bactérias láticas foram ativadas em tubos com 10 mL de caldo MRS com incubação a 35 ± 2ºC por 48h. Após a incubação, foi adicionada suspensão de esporos na concentração de 10^{-4}conídios/mLdos isolados de *Fusarium,* a diluição da suspenção ocorreu conforme descrito no item anterior. Os tubos foram mantidos no refrigerador a 6,0 ± 2ºC por 24h. Após esse período a mistura foi semeada em placas de Petri contendo 15 mL de meio de cultura BDA e incubada a 28 ± 2 °C por 48horas.

Para tratamentos controle, o controle negativo (ausência de efeito fungicida), foi com água destilada estéril, e o controle positivo (presença de efeito fungicida) foi com antifúngico Derosal® na concentração de 0,002mL/g.

A suspensão de propágulos a ser inoculada no ensaio biológico, foi preparada após o crescimento de *Fusarium guttiforme* em placas de Petri contendo meio BDA incubados a 22 ± 2ºC por sete dias. O inoculo de propágulos foi preparado adicionando-se aplaca de Petri com *Fusarium*, 20 mL de solução salina a 0,85% contendo um grama de Tween 80, foi realizada a raspagem das colônias com alça de Drigalsky, o conteúdo líquido resultante da raspagem foi transferido para tubos de vidro estéreis. A determinação da concentração de esporos foi realizada por contagem com auxílio de uma câmara de Neubauer e microscópio de luz, com um aumento óptico de 100 vezes, conforme descrito por Sá (2009), a concentração da suspensão foi ajustada para 10^{-4}conídios/mL.

A cultura bacteriana foi preparada utilizando culturas bacterianas láticas previamente armazenadas sob refrigeração e ativadas no caldo MRS a 35ºC por 48 horas.

Após a ativação, foram separadas duas alíquotas, uma para a determinação do pH em medidor de pH digital (Quimis®) e a outra para a determinação da turbidez em Espectrofotômetro VIS—UV (Quimis®).

4.6.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Este ensaio foi realizado com a cultura bacteriana (contendo células viáveis) e com o sobrenadante desta cultura (isento de células).

As culturas bacterianas foram obtidas conforme anteriormente descrito para metodologia de difusão em disco. Para a avaliação quanto à suspensão da cultura lática, a cultura foi centrifugada em centrífuga refrigerada a 4.000 rpm (rotação por minuto) por 20 minutos.

Os testes foram realizados segundo as normas do NCCLS (2003.a) com adaptações.

Na determinação da concentração inibitória mínima foram utilizadas placas de microtitulação estéreis, próprias para microdiluição. Estas placas são compostas de poliestireno, com 96 poços, e capacidade para 300µL por poço.

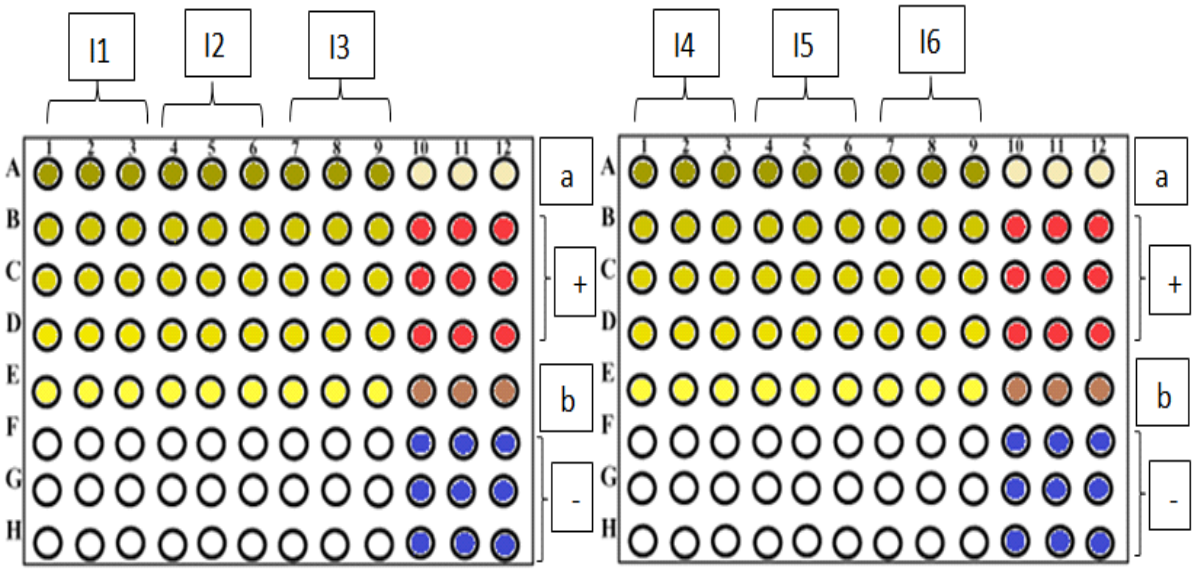

Figura5: Esquema da placa de 96 poços para a determinação da CIM.
A (cultura ou sobrenadante sem diluir, concentração de 0,446 mg.mL^{-1}) ,**B,C,D e E**(concentrações da cultura ou sobrenadante diluídos 0,360 mg.mL^{-1}; 0,266 mg.mL^{-1}; 0,180 mg.mL^{-1} e 0,086 mg.mL^{-1}, respectivamente).**F1, F2, F3,F4,F5** e **F6** corresponde aos 6 isolados de *F. guttiforme*.**a** = meio de cultura BD;**-**Controle negativo (Meio BD + *F. guttiforme* + Fungicida); **b** = amostras de bactéria lática;**+** Controle positivo (Meio BD + *F. guttiforme*). Fonte: AUTORA.

Os ensaios foram realizados conforme ilustrado na Figura 5, em que foram colocados 67 µL das cultura de BAL nos poços das linhas A, B, C, D e E da placa de microtitulação, nas concentrações de 0,446, 0,360, 0,266, 0,280 e 0,086 $mg.mL^{-1}$ respectivamente, contendo 67 µL de caldo BD (Batata, Dextrose).Os poços (A1 até A9) continham a cultura ou osobrenadantede bactéria lática, com as suas correspondentes concentrações. Em cada poço foram inoculados 16 µL da suspensão de esporos de*F. guttiforme*, totalizando um volume de 150 µL, portanto, cada poço continha 67 µL do BD + 67 µL amostras de BAL e 16 µL do fungo.

As placas foram incubadas a 22 ± 2ºC por 48 horas. Após esse período, foram adicionados 50µL de cloreto 2-3-5 trifenil tetrazólio na concentração final de 1,25 mg.poço em todos os poços, para análise quantitativa do crescimento fúngico nos poços. Todos os testes foram realizados em triplicata na placa de Elisa.

O antifúngico Derosal® na concentração de 0,002mL/g foi utilizado como controle positivo no que se refere à inibição do crescimento fúngico, onde a suspenção de *F. guttiforme* foi inserida em poços apensas com meio BD e fungicida. Foram realizados controles de viabilidade dos micro-organismos testados (com a adição de suspenção de esporos em meio BD), esterilidade do meio de cultura (com a adição de apenas meio de cultura BD no tratamento controle negativo), epureza da cultura ou sobrenadante de BAL (com adição de apenas cultura lática ou sobrenadante da cultura lática em poços da placa de Elisa).

4.6.4 Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após a determinação da CIM, foi realizado o teste concentração fungicida mínima (CFM), para a determinação quantitativa da concentração mínima inibitória, uma vez que a avaliação da CIM apenas avalia o efeito fungistático e não fungicida da cultura avaliada. Este teste consiste na semeadura das amostras contidas na placa de microtitulação com resultados positivos para inibição do fungo em placas de Petri contendo BDA. Foi considerada como CFM a menor concentração da cultura e do sobrenadante de BAL que não demonstrou crescimento celular sobre a superfície do BDA.

4.7 Identificação e caracterização fenotípica dos isolados de BAL.

Os isolados que foram identificados por meio do kit API 50 CHL (Biomérieux® S.A, Marcy L'Etoile, França), seguindo o protocolo do fabricante. A leitura foi realizada pelo programa apiweb^{TM}, para a identificação dos isolados em nível de espécie.

A caracterização destes isolados foi realizada através decincoprovas, seguindo por métodos indicados por Chaves et al.(1999).

4.7.1 Produção de gás

A análise da produção de gás foi feita a partir do cultivo dos isolados em tubos contendo caldo 5 mL de meio MRS com tubos de *Durham* invertidos e incubadas a 35ºC por 48 horas (COLLINS; HARTLEIN, 1982; CHAVES, 1999). Observa-se a presença ou ausência de gás nos tubos de *Durham.*

4.7.2 Lactofermentação

Esta prova foi realizada em diferentes temperaturas etempo de incubação. Cinquenta µl de culturas ativas foram inoculados em tubos contendo 5 mL do meio LDR 10% (Leite Desnatado Reconstituído) e incubadas sob as seguintes condições: 15 ± 2,0 °C por 15 dias, 35 ± 2,0 °C por 48 horas e 45 ± 2,0 °C por 24 horas. Observando-se a coagulação do meio.

4.7.3 Tolerância ao Cloreto de Sódio (NaCl)

Cinco mL de cada cultura foram incubados na temperatura de 35 ± 2,0 °C por 48 horas em caldo MRS com diferentes concentrações de NaCl (4%, 6% e 8%). O resultado foi baseado no crescimento bacteriano, por meio da avaliação visual da turbidez do meio.

4.7.4 Redução do nitrato

Para verificar se os isolados promoviam a redução do nitrato a nitrito, foram inoculadas culturas ativas no caldo Nitrato com caldo MRS na proporção de 1:1e incubadas a 35 ± 2 °C por 48 horas em condições de microaerofilia. Após esse período, foramadicionadas ao meio 0,025 mL de alfa-naftol e 0,025 mL de ácido sulfanílico. Com a mudança da coloração do meio, considera-se positivo para a redução do

nitrato a nitrito. Quando não ocorre alteração na coloração do meio, o resultado é considerado negativo.

4.7.5 Produção de amônia

Este teste foi realizado a partir da inoculação das bactérias em tubos contendo caldo MRS e caldo descarboxila de lisina (proporção 1:2), além de 0,5 ml de óleo mineral com o intuito de proporcionar ambiente anaeróbio para a reação. Observando-se a ocorrência da cor violeta durante 24 e 48 horas (a 35 ± 2 °C) o resultado é considerado positivo. Caso não ocorra alteração na coloração do meio o resultado é negativo.

4.7.6 Produção de diacetil - Voges-Proskauer (VP)

Foram inoculados 50 µl da cultura no caldo MRS em tubos contendo 3 ml do meio VM-VP (Kasvi®), sendoincubados à 35 ± 2 °C, durante 48 horas. Após esse período, foram adicionados aos tubos 800 µl de solução alfa-naftol 5% e 600 µl de KOH 40%, passado 60 minutos as amostras foram avaliadas quanto à alteração da cor.Uma vez surgindo à cor vermelha ou rósea no meio, o resultado é considerado positivo. A cor amarelado ou ligeiramente esverdeado, indica o resultado negativo (SILVA et al, 2010).

4.8 Preparo de extrato bruto metanólico de casca e coroa de abacaxi variedade Pérola

Amostras de casca e coroa de abacaxi foram secas em estufa de circulação, a 40 ± 2,0 °C por 20 dias e ao abrigo de luz e triturados em moinho tipo Willey. As extrações foram realizadas em recipientes de vidro, portrês técnicas: 1) a técnica de extração porultrassom, realizada durante 50 minutos, utilizado 100 mL de álcool metílico 98% como solvente; 2) refluxo, com placa aquecedora a 60 ± 2,0 ºC e o condensador, sendo que neste caso a amostra ficou por duas horas no aparelho, e logo após foi filtrada em papelfiltro; 3) a técnica de maceração, em que a amostra foi coberta com o solvente metanol, revirada com bastão de vidro e filtrada de três em três dias, sendo esse processo repetido por quatro vezes.

A remoção do solvente para a concentração dos extratos brutos ocorreu em evaporadores rotatórios (40-45°C, sob pressão reduzida).

O rendimento total dos extratos foi calculado de acordo com Rodrigues et al. (2011), utilizando-se a fórmula: Re = (Pext /Pfolhas) x 100. Onde: Re = Rendimento total do extrato (%); Pext = Peso do extrato seco (g); Pfolhas = Peso das folhas frescas ou secas (g).

4.9 Avaliação da atividade antifúngica do extrato bruto de *A. comosus*

Visando avaliar o extrato bruto do abacaxi (*Ananas comosus*)sobre *o F. guttiforme*, foram realizados os mesmos testes de atividade antimicrobiana, seguindo a mesma metodologia proposta para a avaliação da atividade antifúngica das bactérias láticas (item 4.6.1).

4.10 Produção do extrato bruto de *F. guttiforme*

O preparo do extrato dos isolados de *Fusarium* seguiu a metodologia proposta por Moreira (2009) com alterações descritas abaixo.

4.10.1 Preparo do pré-inóculo e inoculação do fungo

Cinco discos de micélio de 5mm provenientes de placas de Petri com culturas de *Fusarium*incubadas a 22± 2,0ºC por 7 dias em meio BDA, foram inoculados em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 1.000 mL, contendo 400 mL de meio de cultura BD (batata, dextrose). Os isolados foram incubados a 22± 2,0ºC, sob agitação, por 20 dias.

4.10.2 Preparo do extrato fúngico

Após 20 dias de incubação, os meios de cultura contendo os isolados foram filtrados a vácuo, com o auxílio do funil de *Buchner*efiltro de papel com gramatura de 0,45 µm,para a separaçãodo filtrado do micélio de cada isolado. Foi realizada a extração por separação dos filtrados obtidos com o solvente acetato de etila em balão volumétrico, sendo esse processo repetido por três vezes para assegurar a extração dos compostos da fração.

A extração dos compostos presentes no micélio ocorreu por meio da técnica de ultrassom. O micélio foi adicionado em frascos Erlenmeyer estéreis, cobertos com

acetato de etila e colocados no aparelho de ultrassom por 60 minutos. Em seguida realizou-se a filtração do micélio, conforme descrito acima.

Os extratos obtidos via extração do micélio e do filtrado foram combinados e concentrados por rotavapor a vácuo. O rendimento total dos extratos foi calculado de acordo com Rodrigues et al. (2011), com a mesma fórmula utilizada para calcular o rendimento do extrato do abacaxi.

4.11 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência(CLAE UV-VIS)

A análise cromatográfica foi realizada com base no método utilizado por Moreira (2009), com algumas adaptações, com a coluna LiChroCART Purospher StaR® RP18-e (250 mm x 4,6 mm i.d.) (5µm) (Merck®, Darmastad, Germany) combinado com pré-coluna apropriada da Merck®. As condições cromatográficas incluíram: volume de injeção de 20µL, faixa de comprimento de onda de 220-400 nm, com aquisição cromatográfica em 270 nm.

O gradiente de eluição utilizado para análise das amostras foi água (fase A) e acetonitrila (fase B) (Tabela 1). Para as análises em CLAE foram usados solventes de grau cromatográfico de pureza (Merck®) e água purificada em sistema Milli-Q®.

Tabela 1: Gradiente de eluição da análise por CLAE-DAD.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Fase A	Fase B
0:00	0,2	50	50
5:00	0,2	50	100
25:00	0,2	0	100
30:00	0,2	50	50
32:00	0,2	50	50
35:00	0,2	50	50

Fonte: AUTORA

Os extratos foram dissolvidos com a fase B (10 mg/mL) e filtrados em cartucho de extração de fase sólida C18 Cleanert® e filtro de membrana de éster de celulose 0,45 µm (Millipore®), sendo posteriormente submetidos à cromatógrafo Varian e detector de arranjo de diodo Varian ProStar.

4.12 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). A comparação das médias foirealizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software SAS 6.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e identificação do fitopatógeno

O isolamento do *Fusarium* ocorreu com sucesso utilizando o maio BDA, uma vez que, após o segundo repique não houve crescimento de colônias com características diferentes do fungo em estudo. Esse resultado já era esperado, pois segundo Leslie e Summerell (2006), trabalhar a partir de material vegetal fresco e recém infectadotende a reduzir o número de agentes patogénicos secundários e saprofíticos que são recuperados a partir de uma amostra.

Apesar de os sintomas da fusariose estarem mais presentes na casca e em alguns pontos da polpa dos abacaxis, foi possível o isolamento de colônias fúngicas em outras áreas da planta que aparentemente não estavam infectadas (miolo e polpa).Leslie; Summerell (2006) chamam atenção de que apesar de parte da planta usada para recuperar o fungo ser o tecidocom sintomas deve-se ter cautela quanto ao isolamento, pois em alguns casos os sintomas podem ser uma resposta da planta à infecção que ocorre em outro ponto da planta.

Os isolados do *Fusarium* apresentarammicélio branco e cotonoso, que adquiriram uma coloração rósea ouarroxeada a partir de 3 a 4 dias de incubação (Figuras 6 e 7).

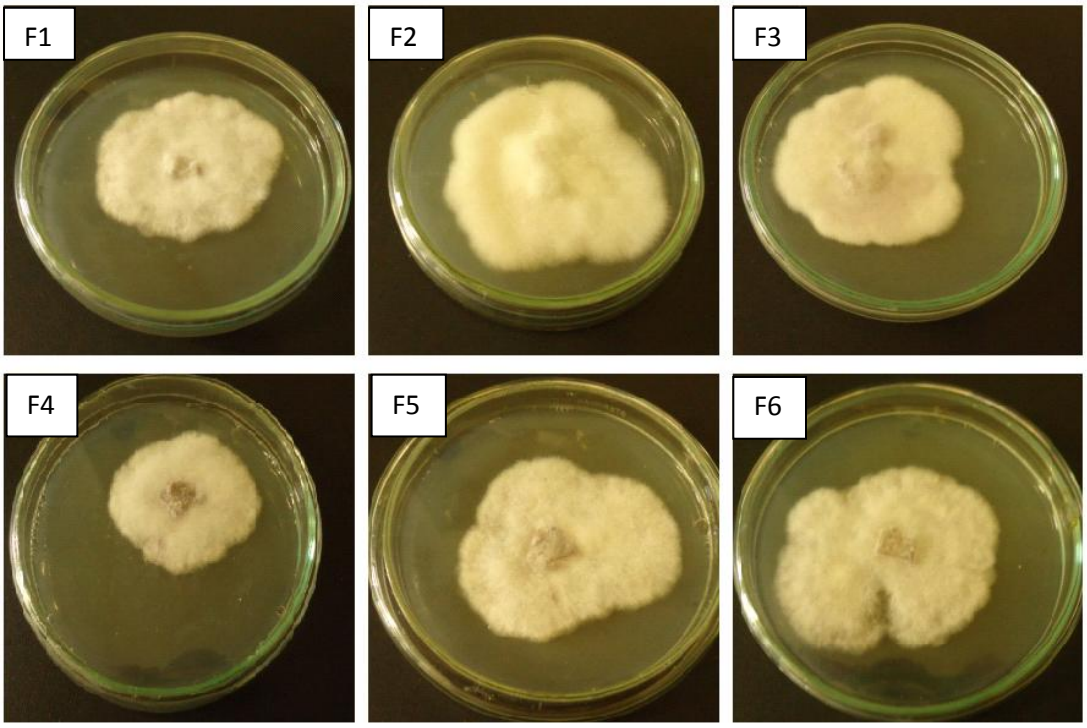

Figura 6: Características das culturas dos isolados de *Fusarium guttiforme* obtidos a partir de abacaxi com sintomas da fusariose. Colônias crescidas por 7 dias a± 22ºC. Fonte: AUTORA.

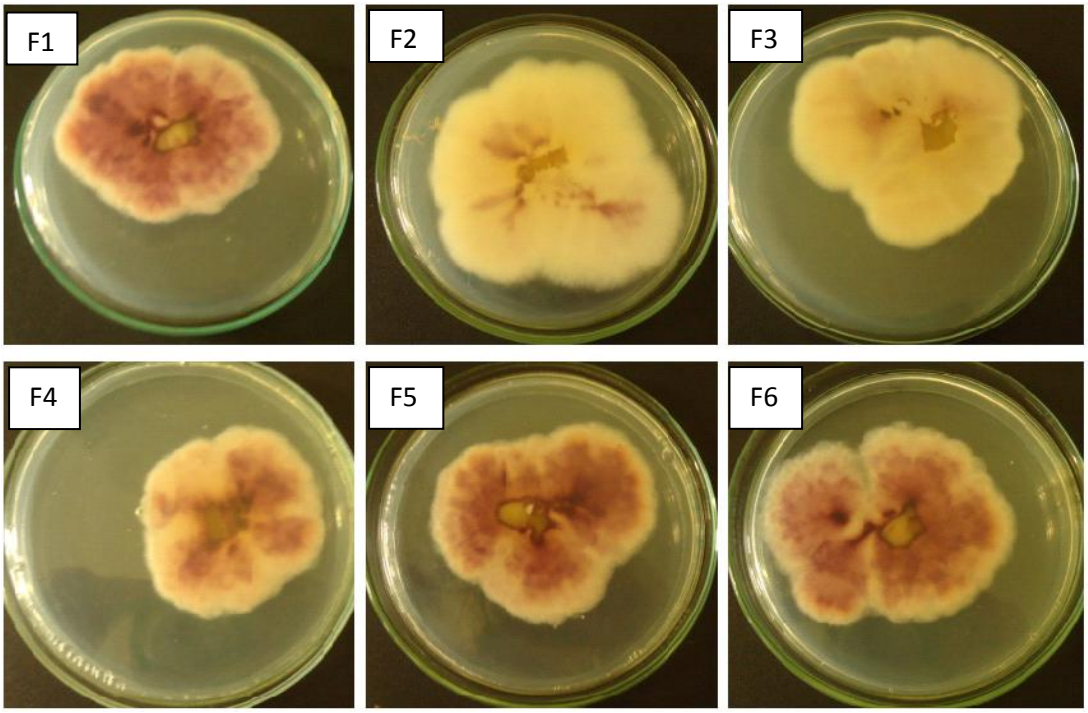

Figura 7: Verso das culturas de*Fusarium guttiforme.* Colônias crescidas por 7 dias a ± 22ºC. Fonte: AUTORA.

Levando em conta pequenas diferenças quanto à coloração, velocidade de crescimento e esporulação, foram selecionados seis isolados com características de *Fusarium*. Essa seleção foi feita com base no trabalho de Coutinho (2010), onde o autor indica que o melhor método para distinguir os isolados do fungo é com a semeadura em meio BDA, bem como a utilização de um sistema de luminosidade alternada ou contínua. No presente trabalho, foi utilizada um sistema de luz alternado.

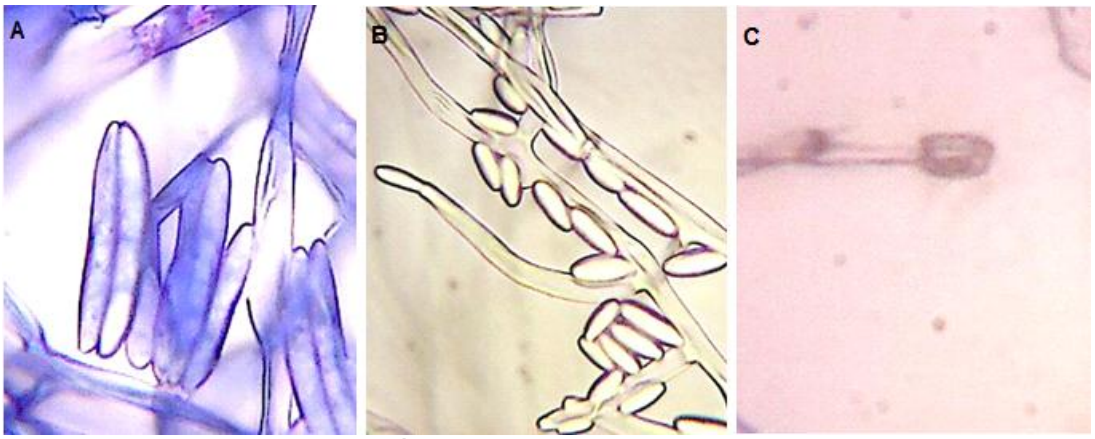

Figura 8: Estruturas microscópicas observadas nas colônias de *Fusarium guttiforme.* (A) Macroconídios fusiformes; (B) Microconídios ovoides, (C) Microconídios*in situ* Fonte: AUTORA.

Em relação às estruturas microscópicas, não foram observados clamidósporos. Foram observados dois tipos de esporos: microconídios, encontrados de forma abundante no micélio aéreo, com formato oval, e os macroconídios, com formato cilíndrico (Figura 8). As características encontradas esta de acordo com a literatura(Leslie; Summerell, 2006).

A descrição da espécie *Fusarium guttiforme* realizada por Nirenberg e O'Donnell em 1998 segue as seguintes características em meio BDA: crescimento da colônia ocorre em média de 5 milímetros por dia a 20ºC, com micélio aéreo albino de aspecto cotonoso, substrato adquire uma cor rósea/violeta. A ausência de escleródios, a esporulação no micélio aéreo é iniciada precocemente, com conídios em capítulos falsos agregados, ausência de esporodoquios, apresentam odor frutado em alguns isolados. A identificação morfológica desta espécie segue a chave descrita para espécies de *Fusarium* e espécies afins pertencentes ao complexo Gibberella fujikuroi (Nirenberg & O'Donnell, 1998)(Anexo 1).

Segundo Leslie e Summerell (2006) *Fusarium guttiforme*em meio BDA apresenta as seguintes características: micélio branco, que pode tornar-se cinza ou roxo com a idade. Ocorre pigmentação laranja e / ou violeta quando cultivada no ágar. Em relação aos macroconídios, a morfologia geralmente consiste em paredes finas, fino e reto a ligeiramente curvado (Figura 8A), os esporodóquios geralmente não são produzidos, mas quando presentes apresentam coloração laranja, a morfologia celular apical é afilada, enquanto que a basal apresenta um formato de “pé”. Geralmente essa espécie apresenta três septos. Já os microconídios possuem um formato ovoide, podendo se apresentar sem ou ocasionalmente com um septo, o micélio aéreo se apresenta com falsas cabeças, enquanto que as células conidiogênicas podem ser fiálides ou monofiálides, mas geralmente estão em polifiálides. Os microconídios estão abundantes no micélio aéreo. O clamidósporo é ausente nessas espécies.

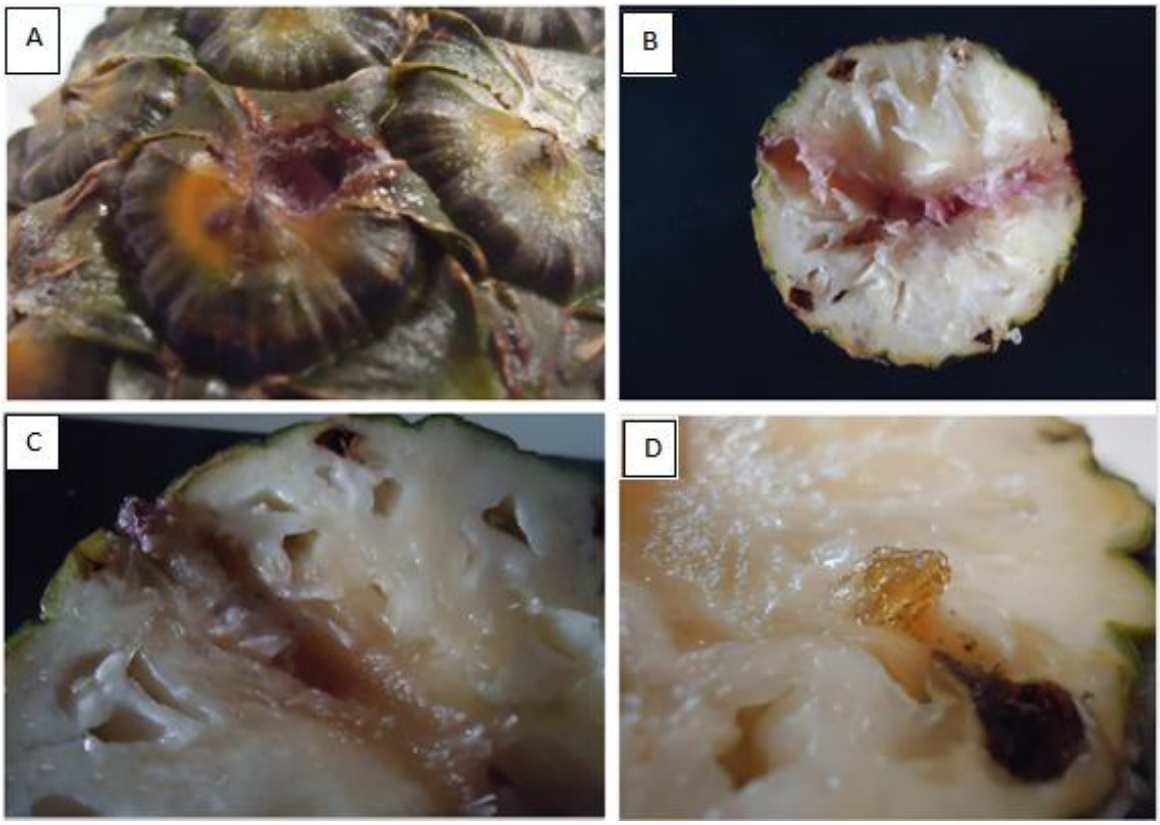

Figura 9: Sintomas da fusariose em abacaxis após a reinoculação dos isolados obtidos.**A)** Ferimento com crescimento micelial, **B) e C)** apodrecimento do tecido interno do fruto e **D)** presença de goma. Fonte: AUTORA.

A reinoculação dos isolados foi realizada com o objetivo de cumprir com os requisitos dos postulados de Koch, como descrito em Konemanet al. (2001). Na figu-

ra 9 é possível observar os sintomas da fusariose induzidos nos frutos sadios de abacaxi, após a inoculação dos isolados obtidos neste trabalho. Após a avaliação dos sintomas, os isolados foram reinoculados.

As colônias dos isolados reinoculados apresentaram aspecto cotonoso, coloração rósea/ alaranhada e roxa, com macroconídeos alongados em formato de canoa, e microconídeos com formato ovoide. Os resultados obtidos confirmam que os isolados obtidos inicialmente são responsáveis pelos sintomas da doença, além de pertencerem à espécie *Fusarium guttiforme.*

5.2 Identificação e caracterização fenotípica dos isolados de BAL

5.2.1 Coloração de Gram e teste de catalase

Os isolados ABX3 e ABX5.2 foram confirmados pelos testes preliminares como pertencentes ao grupo das bactérias lática, que apresenta na coloração de Gram como células arroxeadas (Gram positivas), não produtoras de catalase. Ambas se apresentaram com morfologia de bacilo. Mas as bactérias láticas também podem apresentar com morfologia de cocos e cocobacilos (PAULO, 2010).

Segundo Condon (1987) as bactérias láticas não produzem catalase devido à falta do grupamento heme. Paulo (2010) relata a ausência de atividade de catalase como sendo um dos testes mais úteis para a identificação desses organismos, uma vez que esses são os únicos organismos que não possuem esta enzima e crescem na presença do oxigênio.Algumas espécies de bactérias láticas podem usar porfirinas do ambiente e exibir atividade catalase,denominada como pseudo catalase (PAUL DE VOSet al., 2009).

5.2.2 Identificação dos isolados de BAL pelo kit API 50 CHL

Na tabela 2 consta os resultados da identificação dos isolados Abx3 e Abx5.2 realizado através das provas da fermentação de 49 carboidratos. Este método de identificação fenotípica é largamente utilizado para a identificação das bactérias láticas por possuir alta percentagem de similaridade com a identificação molecular através do DNA. Todas as bactérias utilizadas neste trabalho foram classificadas com índices de probabilidade de semelhança acima de 99%, o que aumenta a confiabilidade da identificação.

Leandro (2011) aponta que o sistema API 50 CHL (bioMérieux) possibilita a identificação dos lactobacilos através da reação com os substratos: glicerol, eritritol, D-arabinose, L-arabinose, D-ribose, D-xilose, L-xilose, D-adonitol, metil-βDmanitol, D-sorbitol, metil-αD-glucopiranosido, D-galactose, D-frutose, D-manose, L-sorbose, D-ramnose, ducitol, inositol, D-manitol, D-sorbitol, metil-αD-glucopiranosido, N-acetil-glucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, D-celobiose, D-maltose, D-lactose, D-melibiose, D-sacarose, D-trealose, inulina, D-melezitose, D-rafinose, amido, glicogênio, xilitol, gentiobiose, D-turanose, D-lixose, D-tagatose, D-fucose, D-arabitol, L-arabitol, gluconato de potássio, 2-cetogluconato de potássio e 5-cetogluconato de potássio.

Segundo Franco (2010), a base de dados do software APILAB® segue o princípio de codificação e condensação das informações binárias, o perfil numérico obtido indica o percentual de semelhança do micro-organismo em questão, com perfis já existentes na base de dados. Essa forma de identificação é considerada rápida e confiável.

Tabela 2: Identificação dos isolados de bactérias láticas por meio do KIT API 50 CHL (Biomerieux®)

Isolados de BAL	Classificação pelo API 50 CHL	Probabilidade de identificação (%)
Abx3	*Lactobacillus plantarum*	99,4
Abx5.2	*Lactobacillus paracasei* subsp.*paracasei*	99,7

Segundo descrição presente no manual Bergey's (PAUL DE VOS, et al., 2009),*Lactobacillus plantarum* possuem células sem motilidade, em formato de bastão, medindo em média (0,9-1,2 µm x 3-8 µm); ocorrem isoladas, em pares ou em cadeiras curtas; em algumas estirpes reduzem nitrato em condições de baixa glicose e pH igual ou superior à 6,0; algumas estirpes apresentam atividade de pseudocatalase, ou catalase positiva quando o grupamento heme está presente; heterofermentativos facultativo; niacina e pantotenato de cálcio são necessários como fator de crescimento.

Em*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Collins, Phillips and Zanoni (1989), as células possuem formato de bastão, sem motilidade, geralmente as di-

mensões estão entre 0,8-1,0 x 2,0-2,0 µm; podem ocorrer isoladas ou em correntes; produzem ácido lácticodo tipo L (+); amônia não é produzida a partir de arginina; não produzem ureia (HAMMES et al., 1991 apud Bergey's Manual, 1986).

5.3 Caracterização dos isolados

5.3.1 Lactofermentação

Analisando a tabela 3, no teste de lactofermentação, pode-se observar que tanto o *L. plantarum* (isoladoAbx3)*como o L. paracasei* subsp.*paracasei* (isolado Abx5.2) promoveram a fermentação da lactose presente no leite, porém em temperaturas diferentes. O teste de lactofermentação a 15, 35 e 45°C testa a capacidade das bactérias láticas metabolizarem a lactose em diferentes temperaturas. Normalmente todas as bactérias láticas crescem a 35°C, sendo, portanto consideradas como mesófilas. No entanto, podem crescer em temperaturas inferiores ou superiores a 35°C, podendo ser consideradas psicodúricas ou termoduricas, respectivamente.

5.3.2 Produção de CO_2a partir da glicose

Na prova da tolerância ao Cloreto de Sódio, as duas espécies de bactérias láticas desenvolveram-se no meio com concentração de 4% e 6%, mas não cresceram na concentração de 8% de NaCl, não sendo consideradas halofílicas (Tabela 3). De acordo com Poffo e Silva (2011), o gênero *Lactobacillus* é um dos mais halotolerantes entre as BAL, tendo sido relatado crescimento na presença de até 10% de NaCl. Os autores ainda relatam que as taxas de crescimento de certas bactérias tendem a aumentar com a elevação da concentração salina, o que não ocorreu entre o *L. plantarum* Abx3 e *L. paracasei* subsp.*paracasei*Abx5.2.

As bactérias láticas ao metabolizarem a glicose podem degrada-los produzindo somente ácido lático como produto principal da fermentação, sendo chamadas de homofermentativas, como mencionado por Massaguer (2005). As BAL ainda podem produzir além do ácido lático, ogás carbônico, neste caso são denominadas como heterofermentativas. As bactérias láticas heterofermentativas ainda podem produzir ácidos acéticos e em menores quantidades o propiônico. Esses ácidos se comportam de forma similar ao ácido lático, interagindo com a membrana celular com a finalidade de neutralizar o gradiente eletroquímico dos prótons, entretanto, algumas ve-

zes esse efeito dos ácidos acéticos e propiônico depende da redução do pH, que ocorre devido ao ácido lático (FRANCO, 2010).

5.3.3 Produção de Diacetil

Através do teste Voges-Proskauer(VP), somente a Abx3 produziu diacetil (Tabela 3). Esse tipo de bactéria é capaz de metabolizar o piruvato pela via butilenoglicol, resultando na produção de produtos finais neutros (pH> 6,0). A acetoína (acetil metil carbinol) é um desses produtos finais. No teste VP, a acetoína é oxidada na presença de oxigênio e hidróxido de potássio (KOH), formando diacetil, produzindo uma cor vermelha. A adição de naftol antes do KOH aumenta a sensibilidade do teste (ISENBERG, 1994).

5.3.4 Redução de nitrato a nitrito

Nesta prova não houve mudança na coloração do meio para as duas espécies em estudo, indicando resultado negativo quanto à degradação do nitrato,confirmando que se tratavam realmente de bactérias láticas (TERRA, 1998). No Manual Bergey`s de Sistemática Bacteriana (PAUL DE VOS , et al., 2009) consta que as bactérias láticas normalmente não reduzem o nitrato a nitrito, isto acontece quando o pH final da cultura fica acima de 6,0 e/ou é adicionado heme no meio de cultura.

5.3.5 Produção de amônia a partir do caldo descarboxila de lisina

O mesmo resultado se deu ao teste da produção de amônia a partir do caldo descarboxila de lisina. Para este teste todos os isolados obtiveram resposta negativa (Tabela 3), indicada pela não apresentação de coloração violeta.Logo, não foi identificada a produção de amônia pelas duas cepas. Mas, algumasespécies de *Lactobacillus* são hábeis em produzir amônia através da arginina, utilizando este substrato como única fonte de energia. (RIMAUX,2012).

Tabela 3: Provas de caracterização das cepas *L. plantarum*(isolado Abx3) e L. *paracasei* subsp.*paracasei*(isolado Abx5.2).

Bactérias láticas	**Lactofermentação**			**Halotolerância NaCl**			**Produção de Diacetil**	**Redução do Nitrato**	**Produção de amônia**
	15ºC	35ºC	45ºC	4%	6%	8%			
L. plantarum	+	+	-	+++	+	-	+	-	-
L. paracasei subsp. *paracasei*	-	+	+	+++	+	-	-	-	-

+ positivo; - negativo; * + *pouco crescimento; ++ bom crescimento; +++ ótimo crescimento.*

5.4 Avaliação da atividade antifúngica das bactérias láticas

5.4.1 Difusão em disco

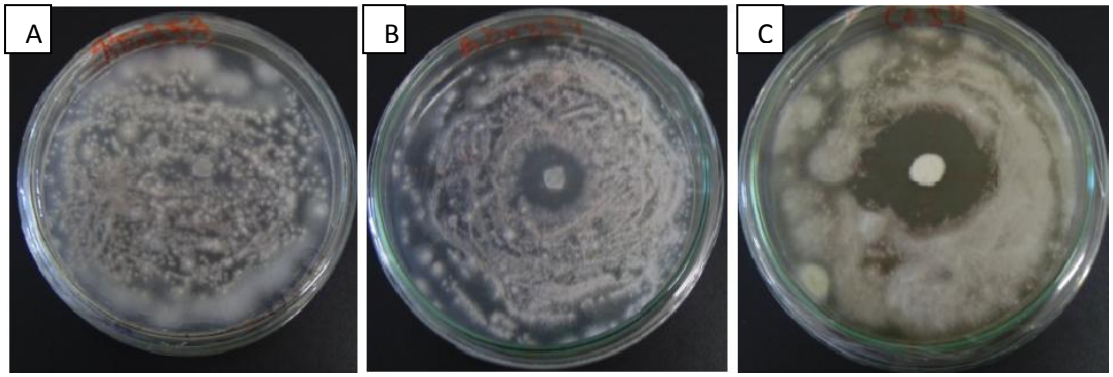

Figura 10: Halos de inibição na avaliação da difusão em disco. **A)** Sem inibição; **B)** Inibição muito fraca; **C)** Inibição moderada. Fonte: AUTORA.

A tabela 4 apresenta o resultados da inibição de *F. guttiforme*por meio do halo de inibição por *L. plantarum*Abx.3 e *L. paracasei* subsp*. paracasei*Abx5.2. Em trabalho realizado por Franco (2010) *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paracasei* provenientes de grãos Kefir, foram considerados bons agentescom atividade antifúngica, inclusive fungos do gênero *Fusarium*,com halo de inibição de 15,0 mm e 35,0 mm, respectivamente.

O potencial inibitório de bactérias láticas tem vários relatos na literatura, principalmente quando se trata da sua ação antagonista contra cepas patogênicas de outras bactérias. Duarte et al. (2013) avaliaram o potencial antagônico da cultura lática mista *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* sobre cepas patogênicas de *Eschecichia coli,* apresentando halos de inibição de 10mm e 12 mm de diâmetro, respectivamente.

Os estudos em relação à inibição de bactérias láticas sobre fungos fitopatogênicos ainda são escassos.Mas já se conhece tal interação com antagonismo ocorre.Nascimento et al. (2016) ao avaliar a capacidade de um produto biológico com*Lactobacillus plantarum*identificou a capacidade deste produto em inibir os fungos fitopatogênicos *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) e *Macrophomina phaseolina* (Tassi.). Os autores atribuíram este efeito à produção deplantaricina,um tipo de bacteriocina.

Rattanachaikunsopon e Phumkhachom (2000) definiram bacteriocinas como sendo polipeptídios antimicrobianos. Esses polipeptídios podem se apresentar na forma simples ou complexa.Lima (2003) relata que as bacteriocinas das bactérias ácido láticas são pequenas proteínas catiônicas, heterogêneas. Apresentam, em geral, de 30 a 60 resíduos de aminoácidos, podendo variar bastante quanto ao microorganismo produtor.Uma vez que apresentam um alto peso molecular, as bacteriocinas (uma das substâncias mais envolvidas na inibição microbiana pelos microorganismos produtores)podem não ser muito indicadas para testes de inibição em disco de difusão, pois o peso pode interferir na difusão da substância pelo meio, e consequentemente apresentar um baixo halo de inibição.

Giassi (2016) ao avaliar culturas de bactérias sobre *Phytophthora nicotianae*- em plantas de tangerina Sunki (*Citrus sunki* Hort. ex Tan) e limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck), observou que 82% dos isolados de actinobactérias e de *Bacillus spp*. promoveram a redução da quantidade de micélio do fungo, entretanto, nesse estudo não foi possível observar a inibição da formação dessas estruturas por meio das bactérias láticas testadas por outro lado, todos os isolados de BAL avaliados foram capazes de diminuir o número de esporângios, chegando até 100% de inibição.

Duffy et al. (2004) relataram a ação antagonista de *Pseudomonasaureofaciens* (Q2-87) sobre isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* provenientes de tomateiros infectados com a podridão da coroa e da raiz. Os autores ainda atribuíram esse efeito antagonista ao composto 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), es-

se antibiótico produzido por *P. aureofaciens*, é um membro da classe decompostos floroquinolina e pode atuar na ruptura da membrana do fungo.

Tabela 4: Medida dos halos de inibição em mm das culturas láticas frente à *F. guttiforme* semeada em meio BDA.

Isolados de F. guttiforme	*L. plantarum* Abx3	*L. paracasei*sp. *paracasei* Abx5.2	Derosal®*
F1	8,7 ± 0,2	8,2 ± 0,1	29,0 ± 0,8
F2	11,0 ± 0,1	14,0 ± 0,9	25,0 ± 0,2
F3	12,0 ± 0,6	12,0 ± 0,4	17,0 ± 0,1
F4	12,5 ± 1,5	8,8 ± 0,1	27,0 ± 1,5
F5	14,7 ± 0,6	12,0 ± 0,4	30,0 ± 0,2
F6	10,0 ± 0,5	9,7 ± 0,6	34,0 ± 0,2

*Fungicida

De acordo com a análise de variância, a formação do halo de inibição foi significativa ao nível de 1% de significância, sendo possível realizar o teste de média entre os tratamentos, aplicando o teste de *Tukey* (Tabela 5).

No presente trabalho a inibição por bactérias láticas do*F. guttiforme* não foi tão expressivo quando comparado ao controle, com o fungicida Derosal®. Os tratamentos com cultura de bactéria lática, assim como com fungicida apresentaram formação de halos de inibição variáveis, mostrando que a atividade inibitória de ambos não atua sobre todos os isolados de *F. guttiforme* com a mesma eficiência (Tabela 5).

Neste trabalho, o grau de inibição foi relacionado ao critério estabelecido por Rouse et al. (2008) in Franco (2010), seguindo a seguinte interpretação: (-) nenhuma inibição; (+) inibição muito fraca com halos de 1 a 15 mm; (++) inibição moderada com halos de 16 a 30 mm; (+++) inibição média com halos de 31 a 45 mm; (++++) inibição extensiva com halos maiores que 45mm. A partir da avaliação por escala de notas, observou-se que os isolados *Lactobacillus plantarum*Abx3 e *Lactobacillus paracasei sp. paracasei*Abx5.2 apresentaram inibição considerada muito fraca para todos os isolados do patógeno. O fungicida Derosal apresentou nível de inibição considerado moderado.

É possível inferir que as cepas de BAL testadas apresentam atividade inibitória sobre o *F. guttiforme*, entretanto os resultados foram inferiores ao tratamento controle com fungicida Derosal. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de o fungicida ser

um produto isolado e purificado, provavelmente de fácil difusão no meio.A cultura bacterianas por ser um produto constituído por vários substâncias intrínsecas ao meio e também pelos metabólicos produzidos durante ocrescimento bacteriano, podendo existir compostos com moléculas de peso molecular elevado e de difícil difusão no meio.

Tabela 5: Inibição do crescimento de F. guttiforme por bactérias láticas do abacaxi, avaliada por meio do teste de difusão em disco. Valorem em mm.

Isolados de F. guttiforme	***L. plantarum* Abx3**	***L. paracasei* subsp. *paracasei* Abx5.2**	**Derosal®***
F1	8,6±0,2^{d}	8,1±0,1^{d}	28,8±0,8^{abc}
F2	10,6±0,07^{bcd}	13,8±0,8^{abcd}	25,5±0,2^{abcd}
F3	12,0±0,6^{bcd}	11,8±0,3^{bcd}	16,8±0,05^{abcd}
F4	12,5±0,9^{bcd}	8,8±0,1^{cd}	27,3±1,4^{abcd}
F5	14,6±0,6^{abcd}	12,1±0,4^{bcd}	30,1±0,2^{ab}
F6	10,0±0,4^{cd}	9,6 ±0,5^{cd}	33,8±0,2^{a}

*Fungicida
As médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente entre si.

A análise de variância das médias do teste de difusão em disco realizado em placas com meio MRS (Tabela 6) não foi considerada significativa, pois os tratamentos com as culturas láticas de *L. plantarum*(isolado Abx3) e *L. paracasei* subsp. *paracasei*(isoladoAbx5.2) não diferem entre si e em relação ao tratamento controle ao nível de 5% de probabilidade.

Neste ensaio a inibição causada pelas bactérias foram superiores em relação ao experimento realizada em placas com meio BDA. O isolado *L. plantarum*Abx3 apresentou halos que variaram de 12 a 33 mm, o isolados *L paracasei*sp. *paracasei*Abx5.2 apresentou uma variação de 18 a 41 mm no diâmetro dos halos, e o tratamento controle com variação de 28 a 39 mm. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de o meio MRS ser um meio próprio para bactérias láticas. Com o crescimento de bactérias, a inibição provavelmente ocorreu não só por antibiose, mas também por competição pelos nutrientes do meio.

De acordo com a avaliação do índice de inibição com exceção da cultura de *L. plantarum*Abx3 avaliada frente ao isolado de *F. guttiforme* F1, que apresentou índice de inibição muito fraco, todos os outros apresentaram índices de inibição maio-

res. Sendo o tratamento com *L. plantarum* frente aos isolados F2, F5 e F6 e *L. paracasei* subsp*. paracasei* frente aos isolados F1, F2, F4 e F6 com índices de inibição moderada, e tratamentos com *L. plantarum* frente aos isolados F3 e F4, e *L. paracasei* subsp. *paracasei* frente aos isolados F3 e F5 apresentou inibição média. Ainda foi possível observar uma inibição maior do isolado do patógeno F3 quando submetido aos discos de filtro imersos nas culturas láticas, do que o tratamento controle, realizado com o fungicida Derosal.

Essa variação nos índices de inibição por meio de bactérias láticas também foi relatada por Hamed et al. (2011). Neste trabalho, os autores observaram efeitos de inibição de BAL provenientes de iogurte e do leite contra fungos fitopatogênicos. A inibição variou de baixo, para *F. oxysporum*, moderado para *Rhizoctonia solani* e *F. oxysporum*, e alta inibição frente a*Sclorotium rolfsii.*

Rodriguez et al. (1997) in Franco (2010), sugerem que o meio MRS pode ser utilizado como substrato na seleção de substâncias antimicrobianas, exceto peróxido de hidrogênio, pois segundo os autores, o peróxido de hidrogênio é rapidamente degradado no MRS, o que ocorre, provavelmente, devido à atividade da catalase do extrato de levedura presente neste meio.

Resultados semelhantes foram encontrados por Murthy et al. (2012).Estes ‘autores avaliaram o efeito antagônico de bactérias láticas isoladas do solo contra *Ralstonia solanacearum* em plantas de tomateiro. As bactérias isoladas foram identificadas como sendo *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei,* e obtiveram halos de inibição que variaram de 22 a 24 mm e de 23 a 25 mm respectivamente.

Tabela 6: Halos de inibição em mm das culturas láticas frente à *F. guttiforme* semeadas em meio MRS. Valores em mm.

Isolados de F. guttiforme	***L. plantarum*Abx3**	***L. paracasei*sp. *paracasei*Abx5.2**	**Derosal®***
F1	12,8±0,2	18,8±0,4	28,6±0,6
F2	17,5±0,4	25,5±0,9	24,2±0,6
F3	32,0±1,6	33,6±2,3	24,7±1,1
F4	33,0±2,7	22,0±1,1	35,0±0,4
F5	19,0±0,8	41,0±2,0	34,0±0,7
F6	20,3±1,3	24,8±0,9	38,2±0,4

*Fungicida

5.4.2 Método da cultura mista

O teste de cultura mista consiste na imersão da suspensão de esporos diretamente em uma solução de caldo MRS com bactéria lática. No tratamento controle a suspensão de esporos foi imersa em tubos contendo caldo MRS e o fungicida Derosal®.

O método da cultura mista proposto por Silva (2015) se mostrou eficiente quanto à avaliação da capacidade inibitória de bactérias láticas em relação à *F. guttiforme.* A formação de UFC's em placas que receberam a suspensão de *F. guttiforme* previamente tratadas com a cultura ou o sobrenadante das bactérias foi quase nula, sugerindo que ambos os isolados de BAL possuem atividade inibitória ao crescimento de *F. guttiforme.* O tratamento controle, sem adição da cultura ou sobrenadante das bactérias, mas com adição do fungicida Derosal® apresentou crescimento de UFC's em todas as placas, indicando que o fugo cresce no meio MRS (Tabela 7). No entanto, apesar do experimento ter indicado inibição moderada no teste de difusão em disco, o fungicida Derosal não atuou na inibição de *Fusarium* no teste de cultura mista.Derosal® 500 SC é um fungicida sistêmico, indicado no tratamento de doenças da parte aérea de plantas. Mostra-se muito eficiente no tratamento da fusariose em trigo, que tem por agente etiológico o fungo *Fusarium graminearum* (ADAPAR, 2015).

Tabela 7: Avaliação da atividade antagônica de bactérias láticas isoladas do abacaxi, através da técnica da cultura mista, medida em UFC (Unidades Formadoras de Colônias).

Isolados de *F. guttiforme*	***L. plantarum* Abx3**	***L. paracasei* subsp. *paracasei* Abx5.2**	**Derosal®***
F1	0,0	0,0	13,0±8,4
F2	0,0	0,0	3,5±3,5
F3	0,5±0,7	0,0	8,0±9,8
F4	0,0	0,0	7,0±1,4
F5	0,0	0,5±0,7	1,5±0,7
F6	0,0	0,0	4,5±4,9

* Fungicida

No teste de cultura mista utilizada no presente trabalho (Tabela 8), o pH dos tratamentos com bactérias láticas ficaram entre 3,6 a 4,04, já o tratamento controle com fungicida o pH ficou entre 5,6 e 6,4, que é próximo ao ponto ótimo de crescimento de fungos do gênero *Fusarium.*Neste teste a acidez pode ter sido o principal fator de inibição do caldo com BAL. No tratamento com fungicida houve crescimento fúngico, que pode ter sido atribuído ao pH, pelo qual permaneceu na faixa do crescimento ótimo do fungo.

Tabela 8: Valores de pH dos tratamentos utilizados na cultura mista para o teste de antagonismo entre cepas de bactérias láticas frente aos isolados de F. guttiforme.

Isolados de *F. guttiforme*	***L. plantarum* Abx3**	***L. paracasei* subsp. *paracasei* Abx5.2**	**Derosal®***
F1	3,63±0,3	3,70±0,02	6,24±0,5
F2	3,60±0,2	3,71±0,06	6,41±0,7
F3	3,80±0,5	3,60±0,2	6,34±0,6
F4	3,96±0,3	3,86±0,2	6,22±0,3
F5	3,64±0,3	3,48±0,2	5,67±0,6
F6	3,80±0,1	4,04±0,6	5,72±0,5

*Fungicida

A produção de metabólitos inibidores é apontada por AUD (2014) como um dos principais mecanismos de bactérias láticas quanto ao antagonismo microbiano. Além de metabólitos, um dos principais mecanismos de inibição de bactérias lática frente a outros micro-organismos é a acidificação do meio através da produção de ácidos orgânicos. Os fungos geralmente não resistem a ambientes muito ácidos, fato apontado por Adisa (1983), que estudou a influência de fatores ambientais no crescimento e na patogenicidade de agente etiológicos de podridões em abacaxi, sendo eles: *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau*, Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., *R. oryzae* Went & Prins. Geerl*, Curvularia verruculosa* Tandon & Bilgrami*, Aspergillus flavus* Y. Sasaki e *Penicillium claviforme* Bainier. Nesse trabalho foi observado que o ponto ótimo de pH no crescimento de grande parte dos fungos foi entre os valores de 6,5 e 8,0.

O pH das culturas láticasfoi ácido, variando de 3,6 a 3,9 para *L. plantarum*Abx3, e de 3,6 a 4,04 para *L. paracasei* subsp. *paracasei*Abx5.2. O tratamento controle, que possuía apenas caldo MRS, suspensão fúngica e fungicida, apresentou uma variação nos valores de pH entre 5,6 a 6,4.

O pH baixo das culturas láticas, se da em decorrência da produção de ácido lático e esse fato pode constituir um bom potencial inibitório frente ao patógeno. Franco (2010) indica a produção de ácidos (acético e lático) como um dos possíveis fatores que conferem às BAL potencial de inibidordo crescimento fúngico.

Mauch et al. (2010) citam a produção de ácidos orgânicos como uma das principais estratégias antimicrobianas das bactérias láticas. Ao testarem o potencial inibitório de várias estirpes de bactérias láticas frente à *Fusarium culmorum*, identificaram a BAL *Lactobacillus brevis* com maior atividade inibitória contra *Fusarium*sp. Neste trabalho os autores citam que na literatura atividade inibitória de *L. brevis*é atribuída à produção de ácidos orgânicos e compostos proteicos ativos. Neste caso, apenas a acidificação do meio não potencializa a inibição, mas é um dos requisitos para que esta ocorra.

Outro mecanismo das bactérias láticas em relação à ação antimicrobiana é a produção de bacteriocinas. Estas são proteínas, ou complexos proteicos com atividade antimicrobiana, principalmente contra espécies que possuem relação com o organismo que as produziu, ou seja, as bactérias lática (BRUNO; MONTVILLE, 1993).

5.5 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Em relação à concentração inibitóriamínima (CIM), não foram observadas diferenças entres os isolados de bactérias láticas e a cultura mista, com exceção do tratamento do isolado *L. plantarum*Abx3 quando avaliado frente aos isolados de *Fusarium* F2 e F3, onde não houve resposta positiva quanto ao crescimento do patógeno mesmo na menor concentração de cultura lática.

A inibição dos isolados de *Fusarium* por meio das bactérias láticas vista no presente trabalho é corroborada pela literatura. Hamed et al (2011), Mauch et al. (2010), Franco (2010) e Junior et al. (2002) obtiveram resultados positivos ao con-

frontarem bactérias láticas frente a *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* e *F. solani* (*F. solani*f. sp. *phaseoli* e *F. solani* f. sp. *glycines)* respectivamente.

O composto 3,6-bis(2-metilpropil)-2,5-piperazinediona, produzido por *L. plantarum* AF1, foi capaz de impedir o crescimento do fungo *Aspergillus flavus* em grãos de soja em trabalho realizado por Yang; Chang (2010). *L. casei*ssp. *paracasei* apresentou atividade inibidora frente a *F. proliferatum* M 5689 e *F. graminearum* R 4053 (HASSAN; BULLERMAN, 2008).

Segundo Franco (2010), apesar de haver uma série de registros na literatura indicando atividade antifúngica de diversas bactérias láticas frente a diversas espécies de fungos e leveduras, há muitas dúvidas a respeito dos fenômenos envolvidos por trás da atividade antifúngica das BAL. A mesma autora evidenciou em seu trabalho a ação inibidora de *L. plantarum* e outros isolados e culturas comerciais de bactérias láticas frente ao*Fusarium graminearum.*

Os isolados de *F. guttiforme* F2 e F3 se mostraram mais suscetíveis ao antagonismo por Abx3, pois não houve reação de crescimento mesmo no tratamento com maior diluição, que continha apenas 20% de formulação de BAL (Tabela 9). Não foram observadas diferenças entre os tratamentos com células viáveis de BAL e com o sobrenadante da cultura bacteriana. Tratamentos com o sobrenadante da cultura bacteriana apresentaram uma reação visual mais fraca com o reagente 2-3-5-trifenil tetrazólio.

Apesar do teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ter apontado resultados semelhantes para praticamente todos os tratamentos e isolados, o teste de concentração fungicida mínima (CFM) mostrou-se diferente, como pode ser observado na tabela 9. Houve grande variação de inibição em relação aos isolados de *F. guttiforme,* o que pode ser devido aos diferentes níveis de agressividade entre os isolados.

O CIM indica quantitativamente a concentração da cultura ou sobrenadante que inibe o patógeno. Entretanto, apesar de identificar a mínima concentração capaz de inibir o crescimento, este método não indica se o efeito é fungistática ou fungicida.

Tabela 9: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), em mg.mL^{-1}, das culturas láticas Abx3 (*L. plantarum)* e Abx5.2 (*L. paracasei* subsp.*paracasei*)em meio líquido BD, sobre isolados de *F. guttiforme*.

Isolados de *Fusarium*	***L. plantarum* Abx3**		***L. paracasei* subsp. *paracasei* Abx5.2**		**Cultura mista**	
	CIM	**CFM**	**CIM**	**CFM**	**CIM**	**CFM**
F1	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
F2	0	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
F3	0	0	0,18	0,18	0,18	0,18
F4	0,18	0,266	0,18	0,18	0,18	0,266
F5	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,266
F6	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18

Cultura mista= Formulado com 50% de cultura de *L. plantarum* Abx3 + 50% de cultura de*L. paracasei* subsp. *paracasei*Abx5.2

Os isolados fúngicos possuem diferentes níveis de suscetibilidade em relação à inibição por bactérias láticas (Tabela 10).Silva (2012), avaliou a diversidade genética entre isolados de *Aspergillus niger* provenientes da região sisaleira no semiárido da Bahia, nesse trabalho a autora conclui que grande parte da variação genética de *A. niger* ocorre entre os isolados dentro das populações, assim como existe variabilidade genética e de agressividade entre isolados de diferentes locais. Os diferentes isolados de *F. guttiforme* avaliados no presente trabalho podem apresentar diferentes caracteres genéticos e, por sua vez diferentes níveis de agressividade e patogenicidade.

Em trabalho realizado por Trocoli (2010)em condições *in vitro*, foram selecionadas 26 bactérias provenientes da rizosfera do abacaxi com potencial para reduzir em 100% a colonização de *F. guttiforme*. De todos os isolados de bactérias avaliados pelo autor, 63 reduziram a colonização do patógeno entre 80 a 100%, 39 promoveram redução entre 40 a 80% e 124 promoveram redução de colonização inferior a 40%.

A avaliação com a cultura mista de BAL (50% *L. plantarum*Abx3 + 50% *L. paracasei* subsp. *paracasei* Abx5.2) apresentou os menores índices de inibição quando comparado com a cultura individualmente, indicando ausência de sinergismo entre estas culturas para o efeito inibitório sobre o *F. guttiforme*. Nos tratamento controle,

em alguns poços, houve crescimento fúngicodos isolados F5 e F6,com a adição do fungicida Derosal® (anexo 2, figura4).

Tabela 10: Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), em mg.mL^{-1}, dos sobrenadantes das culturas láticas Abx3 (*L. plantarum)* e Abx5.2 (*L. paracasei* subsp.*paracasei*) sobre isolados de *F. guttiforme*.

Isolados de *Fusarium*	***L. plantarum* Abx3**		***L. paracasei* subsp. *paracasei* Abx5.2**		**Cultura mista**	
	CIM	**CFM**	**CIM**	**CFM**	**CIM**	**CFM**
F1	0,18	0,266	0,18*	0,266*	0,18*	0,36
F2	0,18	0,266	0,18*	0,266*	0,18*	0,266
F3	0,18	0,266*	0,18*	0,266*	0,18*	0,266
F4	0,18*	0,18	0,18*	0,266	0,18*	0,446
F5	0,18*	0,18	0,18*	0,18	0,18*	0,446
F6	0,18*	0,18	0,18*	0,266	0,18*	0,446

Cultura mista= Formulado com 50% de cultura de *L. plantarum* Abx3 + 50% de cultura de *L. paracasei* subsp. *paracasei* Abx5.2; (*) Reação fraca

5.6Extrato bruto metanólico e avaliação da atividade antifúngica do extrato bruto de abacaxi

O rendimento dos extratos por diferentes métodos de extração foi variável, sendo a extração por maceração a que apresentou o maior rendimento do extrato bruto (Tabela 11). Apesara de ter sido a técnica mais rentável em termo de produção de extrato, a maceração é uma técnica que exige mais tempo e solvente do que comparados com as outras técnicas.

O ultrassom utiliza a energia de ondas sonoras que são transmitidas em frequência superior a capacidade auditiva do ouvido humano. Estas ondas criam uma vibração única, causando uma variação na pressão do líquido, gerando cavitação. Entre as vantagens da extração por ultrassom é a alta reprodutibilidade da técnica, a possibilidade de ser utilizado por amostras de vários tamanhos, o rápido processamento da amostra, além do baixo custo (LUZ, 1998).

A extração por ultrassom permite o aumento da permeabilidade das paredes celulares, produção de cavitação e o aumento do estresse mecânico das células (VINATORU, 2001). Essa técnica ainda pode facilitar a dilatação e hidratação do material vegetal, resultando em um alargamento dos poros da parede celular. Esse pro-

cesso facilita a transferência de massa, podendo resultar na quebra da parede celular, o que pode acarretar no aumento da eficiência de extração, assim como na redução do tempo de extração (TOMA et al., 2001). Além dessas vantagens, a extração por ultrassom usa menos solvente se comparada aos métodos tradicionais, como a maceração, e ocasionalmente apresenta maior rendimento. Esse fato não foi observado no presente trabalho, uma vez que a extração por ultrassom foi a que apresentou menores rendimentos.

De acordo com Cotta et al. (2009), a extração por ultrassom foi escolhida em relação à extração por *Soxhlet*, pois apresentou alta eficiência, baixo custo operacional e fácil operação, além de minimizar o uso de solvente e não levar a perdas por evaporação. Esse fato foi confirmado por Jacques (2005).

A extração por refluxo é uma técnica tradicional de extração de fitocompostos. Consiste no aquecimento do solvente juntamente com o material que será submetido à extração de fitocompostos. O recipiente com solvente e matéria seca é colocado sobre uma placa aquecedora e acoplado a um condensador. O líquido obtido na condensação dos compostos extraído retorna para o frasco com material, permitindo o reaproveitamento do solvente. Após o tempo determinado para a extração, nesse trabalho 60 minutos, o extrato obtido é filtrado e concentrado em rotavapor.

Tabela 11: Rendimento do extrato metanólico de casca e coroa de *A. comosus* por três métodos diferentes.

	Rendimento Extrato Bruto %	
	Casca	**Coroa**
Ultrassom	5,56%	6,16%
Refluxo	8,76%	18,04%
Maceração	29,25%	18,21%

A maceração é uma técnica realizada sob temperatura ambiente e em recipiente fechado, durante longo período, geralmente dias, ocorre sob agitação ocasional e renovação de solvente extrator, que é sempre um solvente orgânico, escolhido de acordo com sua polaridade (FERRI, 1996). Após a realização da extração, a mistura é decantada, e o sobrenadante é retirado e filtrado, o produto final é o macerado (BRASIL, 2011). Segundo Simões (2004) as principais vantagens deste método são

a simplicidade de execução e o baixo custo. Entretanto a difícil remoção do solvente e o tempo longo de execução são fatos que devem ser levados em conta quando se trata desta técnica.

Figura 11: Filtração do extrato metanólico bruto de *Ananas comosus* variedade Pérola. Fonte:AUTORA.

Nos testes de difusão em disco realizados com o extrato bruto de casca e coroa de *A.comosus,* não foi possível identificar nenhuma inibição do extrato no crescimento micelial do fungo *F. guttiforme*(Figura 12).Também não foi possível avaliar diferença de crescimentos entre os diferentes isolados de *F. guttiforme.* Pode-se afirmar através do presente experimento, que o extrato bruto de *A. comosus* não apresenta atividade inibitória frente à *Fusarium guttiforme*.

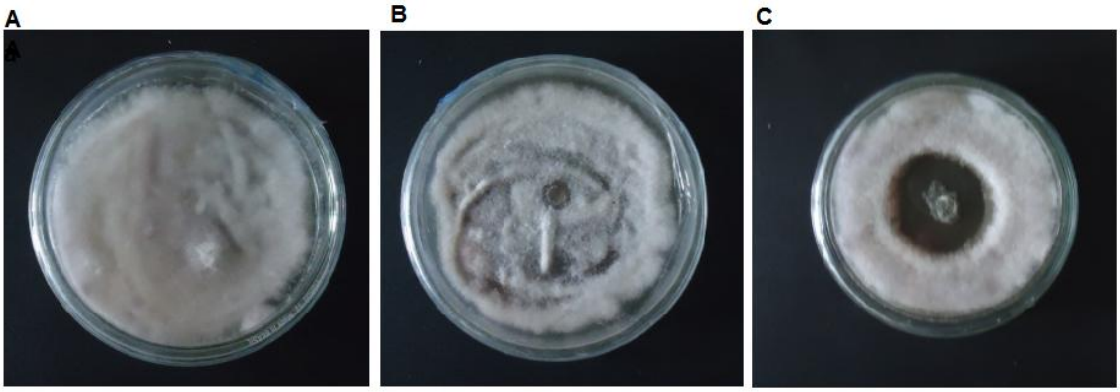

Figura 12: Teste de inibição em disco pelo extrato de casca e coroa de abacaxi frente a isolados de *Fusarium.* **A-**Tratamento com extrato da casca; **B-** Tratamento com extrato da coroa; **C-** Tratamento com fungicida. Fonte: AUTORA.

5.7Preparo dos extratos do fungo

Os rendimentos dos extratos de cada isolado podem ser vistos na tabela 12, os extratos são vistos na figura 13.

Tabela 12: Valores correspondentes ao peso e rendimentos dos extratos brutos obtidos a partir de isolados de *Fusarium.*

	Extrato obtido por isolado					
	F1	**F2**	**F3**	**F4**	**F5**	**F6**
Peso	0,1662g	0,1829g	0,3374g	0,1442g	0,1495g	0,1608g
Rendimento %	0,06%	0,06%	0,12%	0,05%	0,05%	0,05%

O rendimento dos extratos dos isolados de *Fusarium* foram inferiores ao rendimento obtido por Moreira (2009) com extratos do fungo *Penicillium brasilianum,* em que a autora obteve rendimento de aproximadamente 0,28% no extrato.

Figura 13: Extratos obtidos através dos isolados de *Fusarium*. Da esquerda para direita, extratos de F1, F2, F3, F4, F5 e F6, respectivamente. Fonte: AUTORA

5.8*Fingerprint* do perfil metabólico dos extratos de *Fusarium*

Segundo Mattos (1997), a triagem fitoquímica é um procedimento relevante quando se trata da seleção de vegetais de interesses farmacológicos, pois permite a

análise da composição química de um extrato de forma rápida e com um baixo custo.

O *fingerprint* do perfil metabólicos dos extratos dos isolados de *Fusarium*foi realizado com o intuito de observar a presença de micotoxinas, principais responsáveis pela contaminação de alimentos, com base em comparações com trabalhos publicados na literatura. Os cromatogramas obtidos nos seis extratos estãorepresentados na figura 14.

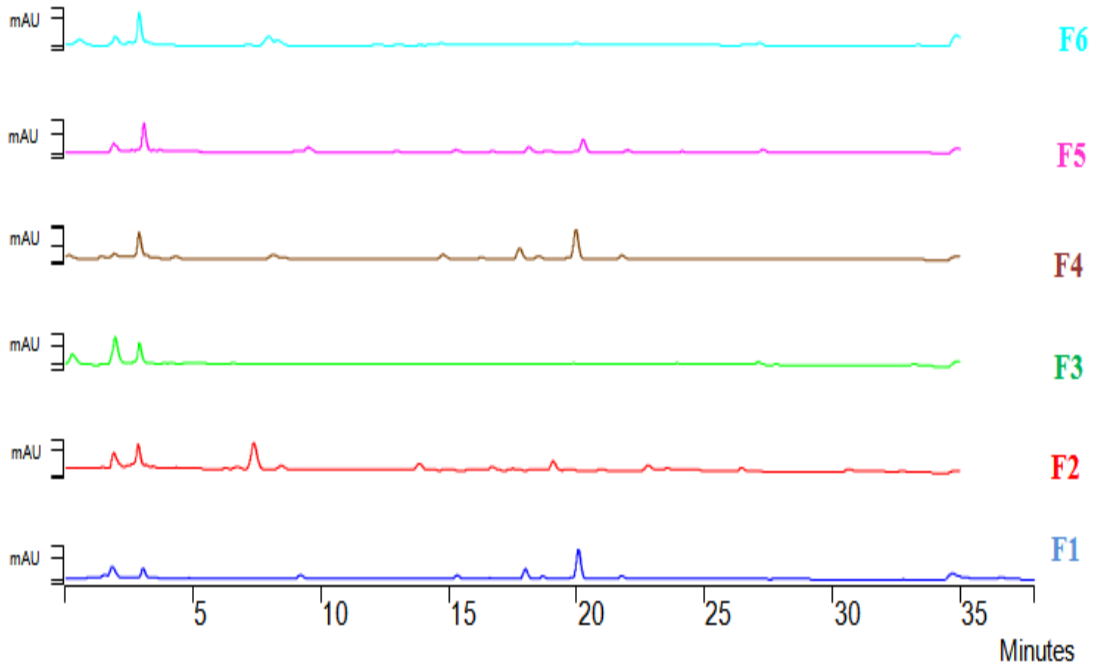

Figura 14: Cromatogramas dos extratos dos isolados de *Fusarium* cultivados em meio BD.

A análise com base nos cromatogramas, nos espectros de UV e no tempo de retenção apontam diferenças e semelhanças em relação à produção de metabólitos dos extratos. De acordo com os picos apresentados pelos cromatograma, os espectros de 62 compostos foram obtidos e comparados por suas semelhanças (espectros UV, valores das máximas bandas de absorção e tempo de retenção), sendo divididos em 43 classes, presentes na tabela 13.

Tabela 13: Classificação dos compostos obtidos a partir da CLAE-DAD UV dos extratos dos isolados de *Fusarium* de acordo com características espectrométricas.

Composto	Tempo de retenção (min)	Extrato	Bandas de máxima absorção		
			Banda 1	Banda 2	Banda 3
I	0,272	F3	236,63		
	0,153	F4	236,72		
II	0,552	F6	236,32	289,29	388,21
III	1,542	F1	210,13	388,22	
	1,427	F2	210,9	388,27	
IV	1,878	F5	259,63	388,17	
	1,948	F6	259,77	388,6	
V	1,833	F1	210,42	259,62	388,17
	1,898	F2	210,88	259,57	388,64
	1,948	F3	208,87	260,05	388,75
VI	1,932	F4	264,95	388,73	
VII	2,505	F6	222,48	275,1	388,55
VIII	2,635	F1	224,98	288,67	389,77
IX	3,032	F1	217,66	273,28	388,51
	2,840	F2	217,95	273,52	388,74
	3,063	F5	217,09	272,69	388,39

	2,870	F6	217,18	272,28	388,57
X	2,897	F6	219,35	272,19	
XI	2,882	F4	271,91	388,98	
XII	3,500	F1	218,2	275,62	388,52
	3,158	F2	217,37	278,99	388,73
	3,713	F5	218,37	280,49	388,77
XIII	3,865	F3	306,99		
XIV	4,135	F3	307,11		
XV	4,757	F3	308,75		
XVI	4,843	F1	267,05	333,33	
XVII	5,098	F3	306,83		
XVIII	6,562	F3	273,72	314,35	
XIX	6,725	F2	215,85	270,16	388,63
XX	7,142	F6	272,7	323,83	
XXI	7,367	F2	213,46	268,28	388,21
XXII	7,923	F6	269,54		
	8,133	F4	270,75		
XXIII	8,317	F6	263,67		
XXIV	8,447	F2	263,14	388,21	
	9,512	F5	262,38	388,19	
XXV	9,070	F5	268,2	388,25	
	9,197	F1	273,68	388,2	

XXVI	13,835	F2	261,75		
	14,685	F6	262,69		
XXVII	14,770	F4	265,8	359,06	
XXVIII	15,300	F1	259,72	387,71	
	15,303	F5	259,36	387,4	
XXIX	16,575	F1	232,46	282,02	385,39
XXX	16,683	F2	272,09		
XXXI	17,483	F2	242,85	273,17	306,11
XXXII	17,752	F4	220,02	271,78	310,07
XXXIII	17,983	F1	221,95	272,33	387,82
	18,117	F5	222,09	271,02	387,52
XXXIV	18,668	F1	231,73	274,57	386,99
XXXV	18,832	F5	232,06	269,23	386,92
XXXVI	19,065	F2	234,52	272,55	
XXXVII	19,773	F1	229,39	274,21	386,74
XXXVIII	19,942	F4	219,84	272,24	388,66
	20,237	F5	221,20	272,02	387,70
	20,055	F1	220,03	272,29	387,94
XXXIX	19,983	F6	233,62	270,94	308,29
XL	21,765	F1	226,90	273,46	388,25
	21,970	F5	227,59	270,37	386,69
XLI	23,912	F1	209,07	388,09	

XLII	27,132	F6	269,58
XLIII	27,603	F2	276,03

No perfil cromatográfico de cada um dos extratos, foi observada uma separação entre os picos, resultando em cromatogramas com boa resolução. Entretanto, a falta de trabalhos na literatura que demonstrem os espectros UV-VIS de todas as micotoxinas e metabólitos encontrados em *Fusarium*, dificultou a comparação dos perfis encontrados no presente trabalho. Frisvad e Thrane (1987) identificaram por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), as bandas de máxima absorção UV de 182 micotoxinas e outros metabólitos provenientes de fungos. Esses resultados foram comparados com os dados presentes na tabela 13.

Na literatura, vários autores indicam a produção das micotoxinas zearalenona (ZEA), desoxinivalenol (DON) e nivalenol por espécies de *Fusarium*(UENO et al., 1973) (MIROCHA et al., 1989) (YAMASHITA et al., 1995) (SANTOS, 2004)(GERALDO et al., 2006) (FRANCO, 2010)(NABOK et al., 2013)(LILLARD-ROBERTS et al., 2017).A enorme quantidade de estudos, sobretudo com essas micotoxinas em questão, são devido ao fato de serem responsáveis por grande parte da contaminação de alimentos.

De acordo com Frisvad e Thrane (1987), os valores de máxima absorção UV da ZEAsão 234,272 e312 nm, do DON é de 218 nm e do NIV de 218 nm.Utilizando esses dados como método comparativo, nenhuma dessas três micotoxinas foram encontradas nos extratos obtidos dos isolados de Fusarium no presente trabalho.

Além destas micotoxinas, a literatura ainda aponta a produção de moniliformina, toxina HT-2 (IAMANAKA et al., 2010) eácido fusárico (LI et al., 2012). Leslie e Summerell (2006) apontam vários trabalhos em que os autores encontraram fusarenona-x, beauverecina, fusarin c, toxina T-2 em várias espécies de *Fusarium.* Lillard-Roberts, em boletim técnico (disponível em www.micotoxinas.com.br) traz ainda, uma série de micotoxinas que podem ser produzidas por esse gênero, sendo elas: acetoxiscirpenediol, acetildeoxinivalenol,acetilneosolaniol, acetil T-2 toxina, auvenacina +1, beauverecina +2, butenolide, calonectrin, deacetilcalenoctrin, desoxinivalenol diacetato, desoxinivalenol monoacetato, diacetoxiscirpenol, eniantinas, fructige-

nin +1, fumosina B1, ácido fusárico, fusarin, toxina HT-2, ipomeanina, lateritin +1, licomarasmin +1, moniliformina, monoacetoxiscirpenol, neosolaniol, nivalenol, toxina NT-1, toxina NT-2, sambucinina +1, scipentriol, toxina T-1, toxina T-2, triacetoxiscirpendiol, yavanicina +1 e zearalenona.

Os espectros UV-VIS, bem como as bandas de máxima absorção de UV de todas as micotoxinas citadas anteriormente foram consultados no National Institute of Standards and Technology (NLST), acessado pelo endereço: webbook.nist.gov. Porém nenhum dos perfis de micotoxinas descritos no site corresponde aos perfis encontrados neste estudo. Uma vez que nem todas as micotoxinas citadas possuem registro, ou informações a respeito dos espectros UV no site, não foi possível identificaras micotoxinas nos extratos dos isolados de *Fusarium*.

Apesar das limitações do método de busca utilizado, constatou-se a ausência dos tricotecenos desoxinivalenol e nivalenol, bem como da micotoxina zearalenona em isolados de *Fusarium* obtidos em frutos de abacaxis, isolados no Hawaii (STÉPIEN, 2014).Esse autor evidenciou a presença de beauvericina em amostras de *F. guttiforme,* entretanto não foram evidenciadas a presença de fumosina.No mesmo trabalho, o autor relata a presença de nivalenol, produzido a partir de *F. graminearum*. O nivalenol, a beauvericina e perfis de fumosinas não foram encontrados entre as amostras de extrato dos isolados de *F. guttiforme*avaliados no presente trabalho.

Stepién et al. (2013), relata a presença de beauvericina (BEA), moniliformina (MON) e fumonisinas B1, B2 e B3 em suco e frações de pele de abacaxis provenientes da Costa Rica e do Equador, entretanto a produção dessas micotoxinas foram relacionadas à *F. ananatum* e *F. proliferatum.* A espécie *F. guttiforme* não foi considerada como produtora de micotoxinas prejudiciais à saúde pelo autor. Além disso, o papel de *F. ananatum*, *F. oxysporum*, *F. guttiforme* e *F. polyphialidicum* como produtores de micotoxinas foi considerado limitado.

Apesar de não terem sido detectadas micotoxinas nas amostras de extrato dos isolados de *F. guttiforme*, foram identificadas espectros no UV que se assemelham a alguns metabólitos que tem sido descritos na literatura como presentes em fungos do gênero *Fusarium.*

O composto XXXI, encontrado no extrato do isolado F2, e presente na tabela 13, com as bandas de máxima absorção correspondentes a 242.85, 273.17 e 306.11,figura 15, se assemelha a compostos derivados de antraquinonas, presente no site do NIST, com bandas UV-VIS correspondentes a aproximadamente 250, 270 e 320 nm.

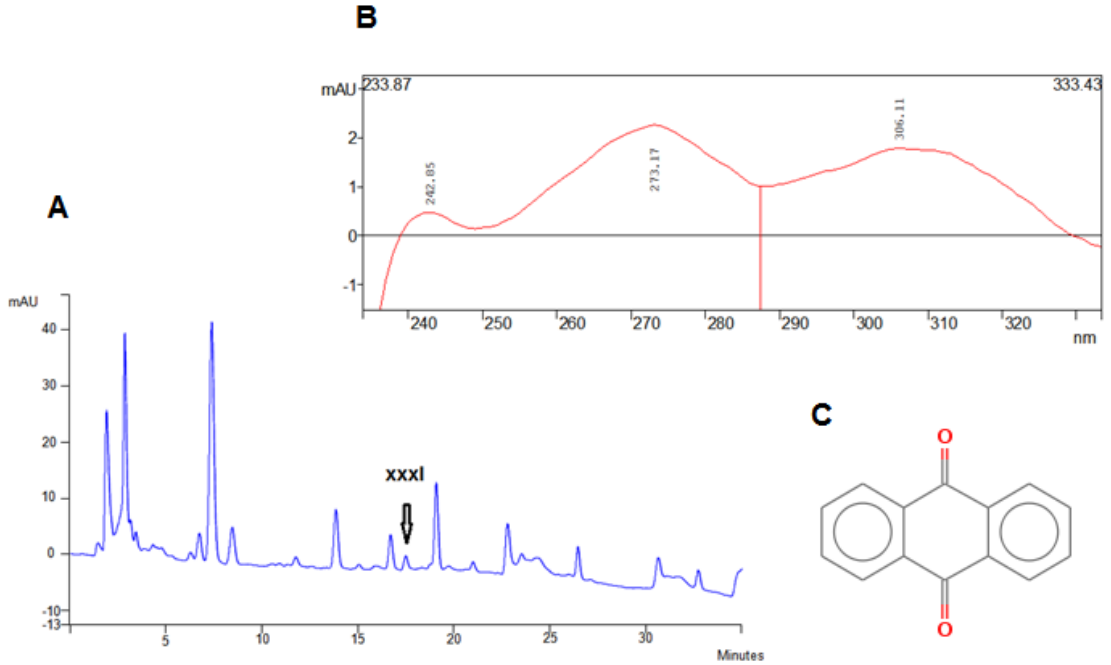

Figura 15: Perfil químico do metabólito XXXI. A- Cromatograma do extrato do isolado F2; B- Espectro UV-VIS do composto XXXI; C- Esqueleto básico das antraquinonas. Fonte: AUTORA.

A presença de antraquinonas como metabólito secundário de fungos presentes em plantas é citada por Pusztahelyi et al. (2015). Shaoet al. (2010) encontraram novas espécies de antraquinonas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* isolados de região de mangue. Nagia et al. (2007), relata a utilização de duas antraquinonas isoladas de *F. oxysporum* isolados de citros como corantes naturais de lã. Trisuwan et al. (2010), isolaram cinco novos metabólitos de *Fusarium* sp., sendo uma antraquinona e duas naftoquinonas.

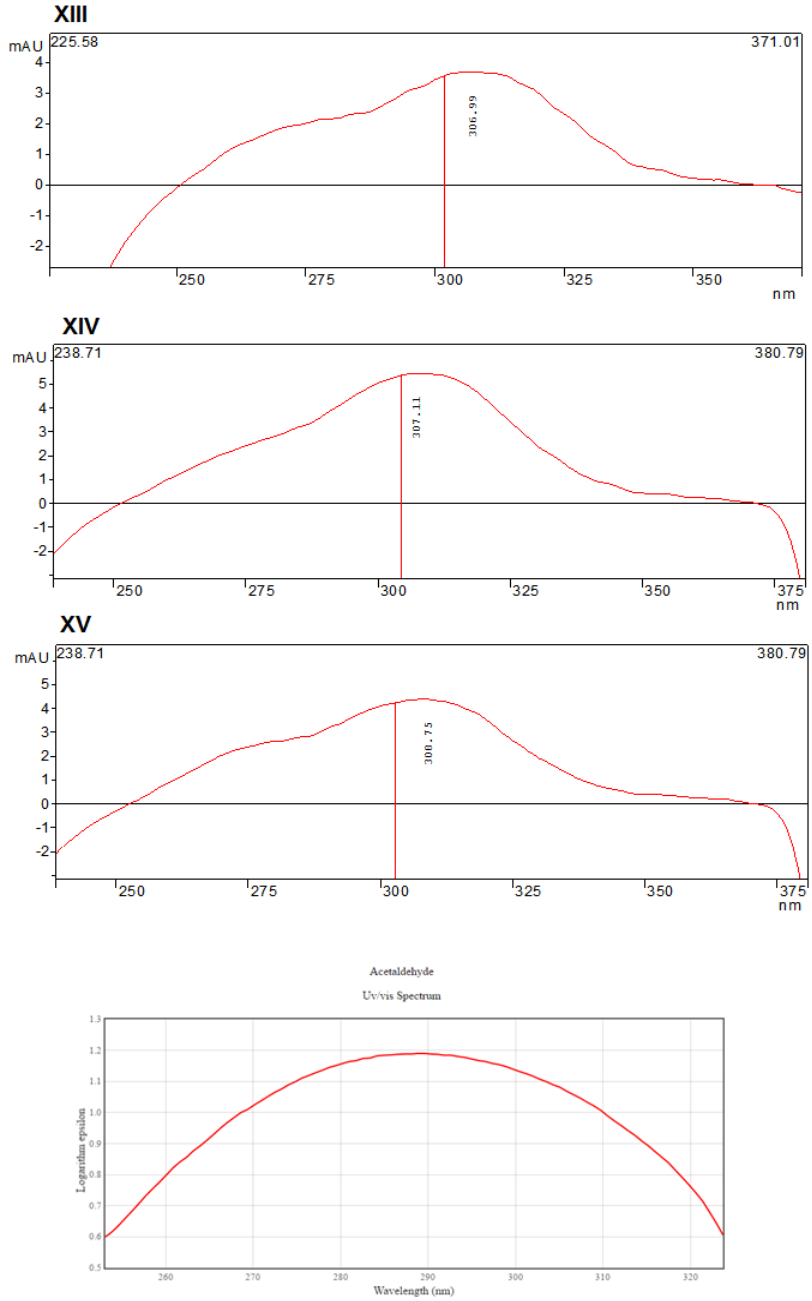

Figura 16: Comparação entre os espectros de absorção UV dos compostos XIII, XIV e XV do extrato F3 com o acetaldeído descrito na literatura. Fonte: AUTORA.

A produção de álcoois, como o acetaldeído, por espécies de *Fusarium* foi descrita em Bartelt et al. (1999). Os compostos XIII, XIV e XV, ambos encontrados no extrato do isolado F3, apresentam uma única banda de absorção no UV, correspondente a 306.99, 307.11 e 308.75, respectivamente. Esse perfil se assemelha ao perfil dos acetaldeídos, como mostra a figura 16, que compara os espectros obtidos com o espectro de acetaldeído obtido no site do NIST.

Os compostos XXII, XXIII e XXVI, obtidos nos extratos dos isolados F2, F4 e F6 apresentam características que se assemelham com o perfil de alanina descrito na literatura. Na figura 17 é possível observar a comparação entre os espectros UV dos compostos obtidos no extrato, e o perfil da alanina presente no site do NIST.

Carito e Pisano (1966) relataram a produção de alanina e ácido glutâmico por F. moniliforme, sendo que com a adição de glicose e ureia no meio, o fungo aumentou a produção de alanina. Branham e Plattner (1993) ainda avaliaram a adição de alanina no meio de cultura contendo *F. moniliforme*, o observaram que a adição de alanina aumenta a produção da micotoxina fumosina B1, sendo considerada um percussor da biossíntese de fumosinas.

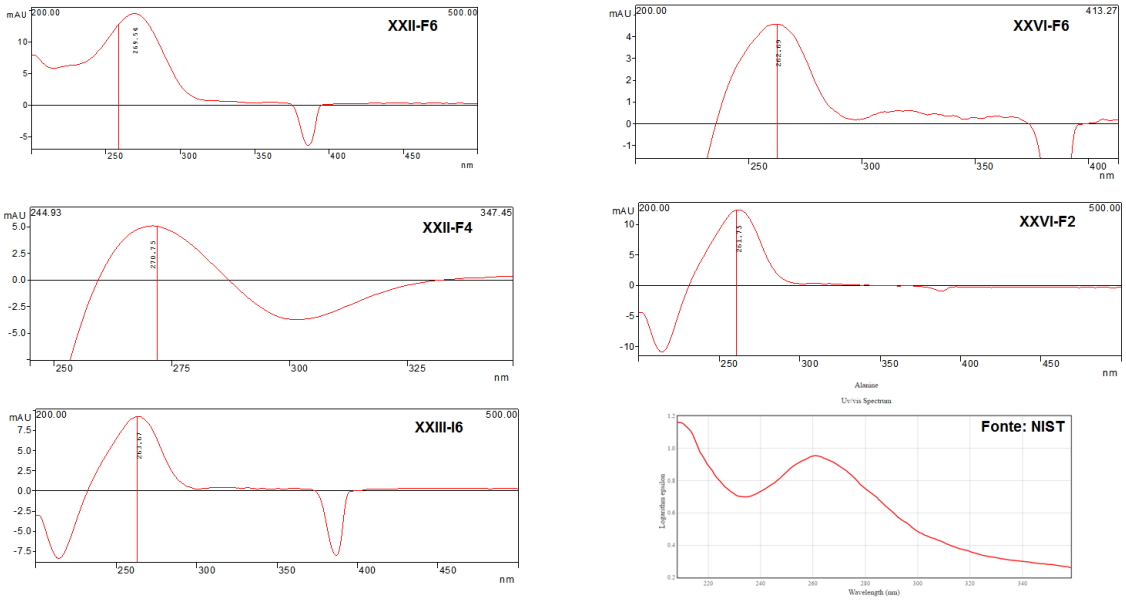

Figura 17: Comparação entre os espectros UV-VIS dos compostos que se assemelham com alanina e a alanina descrita no site NIST. Fonte: AUTORA.

O composto I, obtido a partir dos extratos F3 e F4, apresentam uma única banda de máxima absorção de UV, na faixa de 230 nm. Essa característica, bem como o espectro UV-VIS dos compostos, se assemelha com o composto javanicina. Esta foi descrita por Merlin et al. (2013) como presente em *F. solani* isolados de *T-ylophora indica.* Neste trabalho, o metabólito apresenta um grande potencial inibitó-

rio contra *Enterococcus faecalis,m*ostrando que os metabólitos obtidos a partir de fungos não só servem para caracterizar, mas também podem representar uma série de possibilidades para a indústria farmacêutica e alimentícia.

Na figura 18 é possível observar os espectros dos extratos e o espectro de javanicina obtido por Merlin et al. (2013).

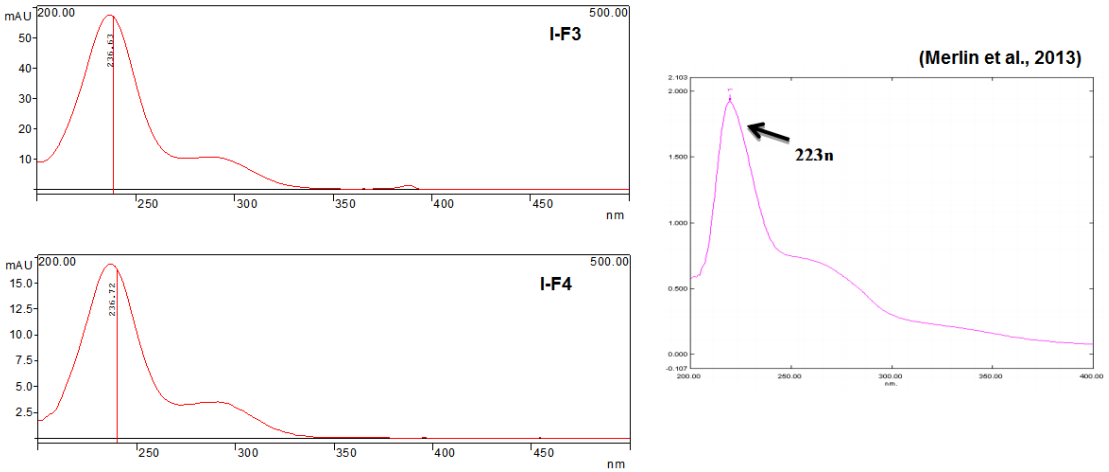

Figura 18: Espectros UV-VIS do composto I obtidos nos extratos dos isolados F3 e F4 comparados com espectro obtido por Merlin et al. (2013). Fonte: AUTORA.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível obter isolados de *Fusarium guttiforme,* de amostras de abacaxi (*Ananas comosus*) comsintomas de fusariose, e quando estes foram confrontados com cepas de *Lactobacillus plantarum* Abx3 *e Lactobacillus casei* subsp. paracasei, Abx5.2obteve-se efeito inibitório e fungicida das referidas cepas, tanto nas culturas com células viáveis quanto no sobrenadante destas culturas. Porém, estes efeitos foram reduzidos quando se testou a mistura das duas cepas, demonstrando a inexistência de ação sinérgica entre elas.

O extrato bruto de *Ananas comosus* não exerceu atividade antagônica sobre este *F. guttiforme*.

Não foi detectada a produção de micotoxinas nos isolados do *Fusarium guttiforme*.Apesar do consumo do abacaxi infectado com este patógeno não causar danos a humano, estes fungos comprometem a qualidade do fruto.

Os resultados preliminares deste trabalho apontam para o potencial das bactérias láticas serem utilizadas no controle de *F. guttiforme*.

Ensaios químicos nas culturas das bactérias láticas utilizadas no presente trabalho são necessários para identificar os metabólitos envolvidos no controle da fusariose, além da realização de testes de campo para comprovarem o efeito fungistático ou fungicida "*in vivo*".

7. REFERÊNCIAS

ADAPAR; Agência de defesa agropecuária, **Bula**. Disponível em: < http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Fungicidas/derosal_500_sc.pdf> Acesso em 06 de junho de 2015.

ADISA, V. A. The effects of some environmental factors on the growth and pathogenicity of six pineapple fruit rot pathogens. **Fitopatologia Brasileira,** Brasilia- DF, v. 8, n. 1, p. 37-46, fevereiro/ 1983.

AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., OUWEHAND, A. **Lacitic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 2004, p.1-63.

BACH, B. C. **Perdas fermentativas, microbiologia e composição químico-bromatológica de silagens de milho (*Zea mays*) ou capim-mombaça (*Panicum maximum*) tratadas com aditivos microbianos**. 2014. 97f. Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2015.

BAKER, K. F.; COOK, R. J. Biological control of plant pathogens.San Francisco: W. H. Freeman, 433 p., 1974.

BARBOSA, E. G. **Prevalência de bactéria probiótica Lactobacillus acidophilus – NCFM em extratos de soja fermentado e saborizado com sacarose e polpa de pêssego**. 2007. 58f. Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia agroindustrial) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas- RGS, 2007.

BARNETT, H. L.;HUNTER, B. B. Reviw:Ilustrated genera of imperfect fungi. **Burgess Publishing Company**, Minneapolis: BB, 1972.

BARTELT, R. J.; WICKLOW, D. T. Volatiles from *Fusarium verticillioides* (Sacc.)Nirenb.and their attractiveness to nitidulid beetles. **J. Agric. Food Chem**, v. 47, n. 6, p. 2447-2454, Junho/1999.

BELLOTTE, J. A. M. **Controle da mancha preta dos frutos cítricos mediante manejo cultura**. 2006, 63p. Dissertação (Mestrado – Produção Vegetal)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal-SP, 2006.

BENNETT, B.C.Ethnobotany of Bromeliaceae. In:BENZING, DAVID H.**Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation.**Cambridge-USA: Cambridge University Press, 2000, cap. 14, p. 587-607.

BENNET, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins.**Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v.16, n. 3, p. 497-516, 2003.
BENZING, D. H. **The Biology of Bromeliads**, Mad River Press: Eureka, California, 1980, 305p.

BETTIOL, W.; MORANDI, M, A, B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M, A, B.(Eds) **Biocontrole de Doenças de plantas: usos e perspectivas.**Embrapa, 2009.341p.

BIANCHINI, A.; BULLERMAN, L. B. Biological control of molds and mycotoxins in foods In: APPELL, M., et al. **MycotoxinPrevention and Control in Agriculture**, ACS Symposium Series-American Chemical Society: Washington, 2010. p. 1-16.

BOTELHO, L. **Isolamento e identificação de lactobacilos e bifidobact rias em alimetos probióticos disponíveis no mercado Brasileiro**. 2005. 244p. Tese(doutorado em tecnologia de alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2005.

BOUTIGNY, A-L.Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. **Fungal Genet Biol**, v.48, p.914-920, 2011.

BRANHAM, B. E.; PLATTNER, R. D. Alanine is a precursor in the biosynthesis of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, v. 124, n. 2, p. 99-104, 1993.

BRUNO, M.E.C. & MONTVILLE, T.J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. , Washington, v.59, p.3003-3010, 1993.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A. Mycogeography of *Fusarium* - survey of fusarium species in subtropical and semiarid grassland soils from Queensland.**Mycological Research**, Austrália, v. 96, p. 780-784, 1992.
CABRAL, E. C. **Utilização da técnica de *fingerprinting* por espectometria de massas para a análise de extratos de produtos naturais.** 2010. 144p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo (USP), 2010.

CARITO, S.; PISANO, M. A. Production of Alanine by Fusarium moniliforme.**Applied and Environmental Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 39-44, 1966.

CARVALHO, R.A. et al. **Controle agroecológico da fusariose do abacaxi com plantas antibióticas.** 2006. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/abacaxi/Index.htm>. Acesso em: 24/11/2014.

CHALFOUND, S. M; CUNHA, G. A. P da. Relação entre a incidência da broca-do-fruto e a fusariose do abacaxi. **Pesq. Agropec. Bras**., Brasilia, v. 19, n. 4, p. 423-426, 1984.

CHAVES, A. H.et al.Isolamento de *Lactobacillusacidophilus* a partir de fezes de bezerros. **R. Bras. Zootec***.* [online]. 1999, v.28, n. 5, p.1086-1092. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35981999000500026>.Acessoem: 02 de janeiro de 2017.

CLSI.**Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—6ª Edition. CLSI document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898 USA. 2003.

COLLINS, E.B., HARTLEIN, K. Influences of temperature on lactobacilli of nonfermented acidophilus milks.**J. Dairy Sci.,** v. 65, p. 883-886, 1982.

CORSETTI, A. et al. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: Identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. **Applied Microbiology and Biotechnology**,v.50, p. 253-256, 1998.

COSTA, V. M**. Perfil de metabólitos excretados por *Lactobacillus* isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D(-) e L(+) do ácido lático. 2006.** Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

COTTA, J. A. O.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D. Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. **Química Nova**, v.32, n.8, p.2026-2033, 2009.

COUTINHO, O. L**. Comportamento in vitro e patogenicidade de isolados de *Fusarium guttiforme*em abacaxizeiro, oriundos dos estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte.** 2010. 65 f. Tese(Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba, 2010.

CRESPO, N. C. **Diversidade genética de isolados do agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro no Brasil**. 2010. 36 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras- MG, 2010.

CRESTANI, M.et al. Das Américas para o Mundo origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. **Cienc. Rural [online]**, Santa Maria-RS,v. 40, n. 6, p. 1473-1483, Junho/2010.

CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S.; **O Abacaxizeiro. Cultivo, agroindústria e economia.** Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, BA). Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. p.17- 480.

CUNHA, G.A.P. da; CABRAL, J.R.S., SOUZA, L.F. da S. (Org.). **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia.** Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999, p. 53-66.

CUNHA, G. A. P. da; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. da S. (Org.). **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999, p. 269-305.

CURRIEL, J. A. et al. Lactic acid fermentation as a tool to enhance the antioxidant properties of *Myrtus communis* berries. **Microb Cell Fact**, v. 14, p. 14-67, May/ 2015.

DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for cultivation of lactobacilli. ***J. Appl. Bacteriol***., v. 23, p. 130-135, 1960.

DESJARDINS, A.E. **Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology.**St. Paul, Minnesota, USA: APS Press, 2006. 260p.

DUARTE, M. C. K. H. et al. Ação antagonista de bactérias láticas frente ao crescimento de estirpe patogênica.**Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v.9, n.16, 36p., 2013.

DUFFY, B.; KEEL, C.; DEFAGO, G. Potential role of pathogen signaling in multitrophic plant-microbe interactions involved in desease protection. **Appliedand Environmental Microbiology**, v.70, n.3, p.1836-1842, 2004.

EMBRAPA Mandioca e Fruticultura. **Desempenho das Exportações Brasileiras** – Abacaxi. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/abacaxi/b8_abacaxi.pdf > Acesso em: 15 de fevereiro de 2017.

FERRI, P. H.; In **Química de produtos naturais: métodos gerais –** Plantas Medicinais: Arte e Ciências; Stasi, L. C. di(Org.), Editora UNESP, SP: 1996, 129p.

FRANCO, T. S**. Bactérias láticas no biocontrole *Fusarium graminearum* e na detoxificação de desoxinivalenol,** 2010. 108p. Dissertação(Mestrado em Ciências de Alimentos)- Universidade Estadual de Londrina, 2010.

FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Standaridized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkyphenone retention indices and UV-VIS spectra (diode array detection). **Journal of Chromatography**, v. 404, n. 1, p. 195-214, Aug./1987.

GARCIA, W. M. **Comportamento *in vitro*, métodos de inoculação e fontes de resistência à *Fusarium guttiforme* em abacaxizeiro,** 2013. 58p. Dissertação (Mes-

trado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade do Estado de Mato Grosso, 2013.

GERALDO, M. R. F.; TESSMANN, D. J.; KEMMELMEIER, C. Production of mycotoxins by *Fusarium graminearum* isolated from small cereals (wheat, triticale and barley) affected with scab disease in southern Brazil. **Microbiol. [online].**2006, v. 37, n. 1, p. 58-63, Fevereiro/2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000100011>.

GIASSI, V. **Bactérias como agentes de controle de *Phytophthora nicotiane* e como promotores de crescimento de porta-enxertos de citros. 2015. 60p.** Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural)- Universidade Federal de São Carlos, Araras-SP, 2016.

GLENN, A. E**.**Mycotoxigenic Fusarium species in animal feed.**Animal Freed Science and Technology**, v. 137, p.213-140, October/ 2007.

GLOBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influencia no conteúdo de metabólitos secundários**. Química Nova**, v. 30, n.2, p. 374-381, Outubro/2007.

HAMED, H. A.; MOUSTAFA Y. A.; Y ABDEL - AZIZ, S. M.In vivo efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusariumoxysporum*for protection of tomato plant.**Life Science Journal**. v. 8, n. 4, p. 462 - 468. 2011.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. In: Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, 2010, v. 7, p. 138-161, 2010.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, 2016.** Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado> Acesso em: 23 de março de 2017.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Banco de dados agregados,** 2013. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2013/PAM2013 Online. Acesso em: 20 maio de 2016.

IBRAF - INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Produção agrícola municipal 2015.**2016. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/comparamun/compara.php?lang=&lista=uf&coduf=29&idtema=158&codv=V01> Acesso em: 22 de fevereiro de 2017.

ISENBERG, H. D. (ed.). 1994. Clinical microbiology procedures handbook. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C.

KIMATI, H; TOKESHI, H. Nota sobre a ocorrência de *Fusarium* sp. causando resinose fúngica em abacaxi.**Revista de Agricultura,** v. 39, n. 3, p. 131-133, 1964.

KANDLER, O.; WEISS, N. **Genus *Lactobacillus*** Beijerinck.In: SNEATH , P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,Baltimore: Williams & Wilkins, v. 2, 1986. p. 1209–1234.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**. Ed. MEDSI. 2001. 1600p.

KVAS, M. et al.Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex.**Fungal diversity**, Kunming, v. 34, p. 1-21, January/2009.

YAMASHITA, A. et al. Fusarium Mycotoxins (Fumonisins, Nivalenol and Zearalenone) and Aflotoxins in Corn from South east Asia. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,** v. 59, n. 9, p. 1804-1807, May/1995.

YOKOYA, F. MANFIO, G. P.; VARIANE, S. F**. Curso de Treinamento: Bactérias Lácticas na Fermentação Alcoólica**. IN: COSTA, V. M. Perfil de metabólitos excretados por *Lactobacillus* isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D(-) e L(+) do ácido lático. 2006. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

JACQUES, R. A. **Caracterização química da erva mate (*Ilexparaguariensis*): aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química.**2005. 158p. Tese (Doctored)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2005.

JACOBS, A. et al.*Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. **Fungal Biol**. v. 114, n. 7, p. 515-527, April/2010.

JUNIOR, C. B. B. et al. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos.**Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília-DF, v. 37, n. 8, p. 1189-1194, 2002.

LACERDA, M. A. D.; LACERDA, R. D.; ASSIS, P. C. O. A participação da fruticultura no agronegócio brasileiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 4, n. 1, 9p., 2004.

LEE, J. C. Subglutinol-a and subglutinol-b - immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*.***Journal of Organic Chemistry,*** v.60, p. 7076-7077, Nov/1995.

LEANDRO, T. de J. T. **Descrição de duas novas espécies do gênero *Nevskia* da classe *Gammaproteobacteria*.**2011. 96p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2011.

LESLIE, J. F.: SUMMERELL, B. A. **The fusarium laboratory manual**.2006. Malden: Blackwell,2006, 420p.

LI, J. et al.A luminescent bacterium assay of fusaric acid produced by Fusarium proliferatum from banana.**Anal Bioanal Chem,** v. 402, p. 1347-1354, 2012.

LILLARD-ROBERTS, S. Mycotoxin List.**Boletim científico**, n. 46, 2017. Disponível em: < http://www.micotoxinas.com.br/Boletim46.pdf > Acesso em 02 de janeiro de 2017.

LIMA, E. T. de. **Avaliação da atividade inibitória In vitro de bacteriocinas extraídas de *Lactobacillus* spp. isolados de aves (*Gallusgallus*, Linnaeus, 1758)**. Dis-

sertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, 87 p., 2003. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/99843>.

LUZ, L. P. **Estudo do Ultra-som como Técnica de Extração de Carvões e Caracterização dos Hidrocarbonetos Poliaromáticos**. 1998. 98 p. Dissertação (Mestrado em Química)-Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

MAGNUSSOM, J. et al. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bactéria.**FEMS Microbiology Letters**, v. 219, p.129-135, Feb/2003.

MANETTI, L.M. Metabólitos secundários da família bromeliaceae**. Química Nova**, São Paulo, v.32, n.7, 13p.,Fev/2009.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2014) – **Agrofit**. Disponível em < http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit >. Acesso 20 setembro 2015.

MASSAGUER, P.R. **Microbiologia de Processos Alimentares.** São Paulo: Varela, 2005.

MATOS, A. P. de.Effect of temperature and rainfall on the incidence of *Fusarium subglutinans* on pineapple fruits.**Acta Horticulturae**, n. 529, p. 265-272, 2000.

MATOS, A. P. DE; CABRAL, J. R. S. **Manejo integrado da fusariose do abacaxizeiro.** Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, 2005. 2p. (Embrapa-CNPMF, Abacaxi em Foco n. 32), 2005.

MATOS, A. P. de; CORDEIRO, Z. J. M.; HADDAD, F. **Fusariose em frutíferas.**In: XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura, Bento Gonçalves – RS, 2012.

MATTHEWS, A. et al.Lacticacidbacteria as a potentialsource of enzymes for use in vinification**.ApplEnviron Microbiol,** v. 70, n. 10, p. 5715-31, Oct/2004.

MATOS, F.J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997, 141p.

MAUCH, A.; BELLO, F. dal; COFFEY, A.; ARENDT, E. K. The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to in vitro inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley**. InternationalJournal of Food Microbiology**, v. 141, p. 116-121,Jun/ 2010.

MENEZES, T. J. B.; SARMENTO, S. B. S.; DAIAUTO, E. R. Influência de enzimas de maceração na produção de puba. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, Campinas , v. 18, n. 4, Oct./Dec. 1998.

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de Fitopatologia.**Recife, 133p, Fev/2001.

MIROCHA, C. J. et al. Production by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium sporotrichioides* Isolated from *Baccharis* spp. FromBrazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 254-255, 1989.

MOREIRA, B. T. **Bioprospecção do potencial farmacêutico de duas espécies de fungos do solo do cerrado mineiro.**2009. 125p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto-MG, 2009.

MOTA, L. M. et al. **Uso racional de antimicrobianos.** Medicina (Ribeirão Preto), 2010,v. 43, n. 2, p. 164-72, 2010. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/175/176> Acesso em: 08 de fevereiro de 2017.

MURTHY, K. N. et al. **Lactic acid bacteria (LAB) as plant growth promoting bacteria (PGPB) for the control of wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum***. Pest Management. In: Horticultural Ecosystems, v.18, p. 60-65, 2012.

NABOK, A. V. et al. Extraction of Mycotoxins from Aqueous Solutions Using Functionalized Polyelectrolyte-Coated Microparticles. **BioNanoSci**, v. 3, p.79-84, Jan/2013.

NAGIA, F. A.; EL-MOHAMEDY, R. S. R. Dyeing of wool with natural antraquinone dyes from Fusarium oxysporum.**Dyes and Pigments**, v. 75, n. 3, p. 550-555, Dec/2007.

NASCENTE, A.S. et al. **Cultivo do abacaxi em Rondônia.** Porto Velho, 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Abacaxi/CultivodoAbacaxiRO/autores.htm>. Online. Acesso em: 17 de out. 2014.

NASCIMENTO, S. R. C. et al. Sobrevivência de estrutura de resistência de *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotium rolfsii* em solos tratados biologicamente. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 10, n. 1, p. 50-56, 2016.

NICOLETTI, G.; KEMPKA, A. P.; KUHN, R. C. **Características físico-químicas e sensoriais de iogurte com diferentes proporções de extrato hidrossolúvel de soja e leite integral.**UniversidadeTecnológica Federal do Paraná – UTFPR, n.2, p. 1516-1530, 2014.

NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K.New *Fusarium* species and combinations within the *Giberella fujikuroi* species complex.**Mycologia**, v. 90, p. 434-458, Jun/1998.

NOGUEIRA, S. R. et al. Fungicidas no controle de fusariose do abacaxi no estado de Tocantins, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v.37, n. 4, p. 447-455, 2014.

OLIVEIRA, S. M. A. et al. **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**, Brasilia DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006.

OUWEHAND, A. C. **Antimicrobial componentes from lactic acid bactéria.**In: Salminen, S.; Von Wright, A. Lactic acid bactéria, Microbiology and functional aspects. 2ªed, Marcel Dekker Inc. New York-USA, 1998, p. 139-160.

PAULO, E. M. **Isolamento e caracterização de Lactobacillus acidophilus de fezes de suínos para uso como probiótico**. 1991. 73p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Viçosa (UFV), 1991.

PAULO, E. M. **Encapsulamento de *Lactobacillus acidophilus* por atomização em *spray drying*, utilizando exopolissacarídeos (EPS) produzidos por bactérias láticas.** 2010. 222p. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-Ba, 2010.

PEDROSA, F. P. da C. **Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas pertencentes à CPMA – Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA** . Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado- Ciências Biológicas)- UNICAMP, Botucatu, 2012.

PLOETZ,R.C. Fusarium-induced diseases of tropical, perennial crops. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 6, p. 648-652, June/2006.

POFFO, F.; SILVA, M. A. C. **Caracterização taxonômica e fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de pescado marinho.** 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v31n2/v31n2a04>. Acessoem: 12 de janeiro 2017.
PUSZTAHELYI, T.; HOLB, I.; PÓCSI, I. Secondary metabolites in fungus-plant interactions.**Fronties in Plant Science**, v. 6, n. 573, 23p.,Ago/2015.

RAMÍREZ, JJ. C. R.; ULLOA, P. R.; VELÁZQUEZ, G.; ULLOA, J. A.; ROMERO, F. A**. Bacterias lácticas: Importancia em alimentos y susefectos em lasalud.**Revista Fuente Año 2, n. 7, INSS 2007-0713, 2011.

RATKLAO, S. **Screening of Novel Secondary Metabolites from Endophytic Fungi by Chemical Library Analysis.**2016.120p. Tese (Doutorado)- Departmente of Biotechnology, University Osaka, 2016. Disponível em: <http://ir.library.osaka u.ac.jp/dspace/bitstream/11094/26207/1/26351_%E8%AB%96%E6%96%87.p> Acesso em 13 de março de 2017.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PLUMKHACHOM, P. A bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis*subsp. *lactis*isolated from thai fermented foods. **ScienceAsia**. v.26, p.195-200, 2000.

REINHARDT, D. H.; SOUZA, L. F. S.; CABRAL, J. R. S. **Abacaxi.Produção: aspectos técnicos**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura — Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000, 77 p.

RIMAUX, et al.**Expression of the Arginine Deiminase Pathway Genes in *Lactobacillusakei*ls Strain Dependent and Is Affected by the Environmental pH**, v.78, n. 14, Apr/2012.

RODRIGUES, T. S. et al. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthusbarbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatos* (boldo-miúdo). **Ver. Bras. Pl. Med**., Botucatu, v.13, especial, p.587-590, 2011.

SÁ, J. O. de. Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichordema* spp. 2009. 54p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas- Bahia, 2009.

SANTOS, R. M. G. dos. Metabolismo secundário dos fungos Penicillium sp. e*Fusarium moniliforme* isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae).2003. 432p. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 2004.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods.**Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 158-164, May/1996.

SHAO, C. et al. A new anthraquinone derivative from the marine endophytic fungus *Fusarium* sp. (No. b77).**Nat Prod Res,** v. 24, n. 1, p. 81-85, 2010.

SHARPE, E. M. Taxonomy of the lactobacilli. **Dairy Science Abstracts**, v. 24, n. 3, p. 109-119, 1962.

SHIRAI, K.; GUERRERO, I.; LARA, P. Bacterias lácticas em alimentos fermentados. **Ciência**, v. 47, p. 125-137, 1996.

SINDAG – **Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola.** Disponível em: <http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2278> Acesso em: 16 de out. de 2014.

SILVA, J. et al. Analgesic and anti-inflamatory effects of essential oils of Eucalyptus.**Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 89, p. 277-283, Dec/2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.**Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** 4. ed. São Paulo: Varela, 2010.

SILVA, J. R. Q. **Agente etiológico da podridão vermelha do sisal: densidade populacional, sobrevivência, caracterização genética e de agressividade**. 2012. 109p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias)- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-Ba, 2012.

SILVA, J. R. **Avaliação de métodos "in vitro" para detecção de bactérias lácticas com potencial de atividade antagônica frente à enteropatógenos.** 2015. 27p.(Monografia- Trabalho de conclusão de curso)- Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 2015.

SOARES, L. M. V. et al. Composição mineral de sucos concentrados de frutas brasileiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v.24, n.2, p.202-206, 2004.

SOUZA, A. E. D. de. **Atividade antifúngica de óleos vegetais no controle de podridão-por-fusarium em melão e fusariose em abacaxi.** 2010. 81p. Dissertação (Mestradoem Agronomia: Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró,2010.

STEPIÉN, L. The use of *Fusarium* secondary metabolite biosynthetic genes in chemotypic and phylogenetic studies. **Crit Rev Microbiol**, v. 40, n. 2, May/2014.

STEPIÉN, L.; KOCZYK, G.; WASKIEWICX, A. Diversity of Fusarium species and mycotoxins contaminating pineapple.**J Appl Genet**, v. 54, n. 3, p. 367-380, Aug/2013.

STROM, K. Fungal Inhibitory lactic acid bactéria – Characterization and application of *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393.Tese(Doutorado)- Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Uppsala, 2005.

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.;LESLIE, J. F.A utilitarian approach to *Fusarium* identification.**PlantDisease,** v.87, p. 117-128, 2003.

SUPERINTENDÊNCIA DE ESTUDOS ECONÔMICOS E SOCIAIS DA BAHIA. Consulta ao Banco de Dados. **Cultura por Município**. Disponível em: <http://sei/sei/frame_tabela.wsp?tmp.volta=sg1&tmp.tabela=t71> Acesso em: 02 nov. 2014.

TERRA, N. N. **Apontamentos de tecnologia de carnes.** 1ª edição, São Leopoldo: UNISINOS, 1998.

THARANE, U. Grouping Fusarium section Discolor isolates by statistical analysis of quantitative high performance liquid chromatographyc data on secondary metabolite production. **Journal Microbiological Methods**, St. Louis, US, v. 12, p. 23-39, 1990.

TOMA, M. et al. **UltrasonicsSonochemistry**, v. 8, p. 137-142, 2001.

TRISUWAN, K. et al. Anthraquinone, cyclopentanone, and naphthoquinone derivatives from the sea fanderived fungi Fusarium spp. PSU-F14 and PSU-F135.**J Nat Prod,** v. 73, n. 9, p. 1507-1511, 2010.

TROCOLI, R. O.,**Potencial de uso de bactérias associadas ao sistema de abacaxizeiro.** 2010. 83f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2010.

UENO, Y. et al. Biological and Chemical Detection of Trichothecene Mycotoxins of *Fusarium* Species.**Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 699-704, 1973.

VENTURA, J. A.; COSTA, H. **Manejo integrado das doenças de fruteiras tropicais: Abacaxi, Banana e Mamão**. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). Manejo integrado: fruteiras tropicais doenças e pragas. Viçosa, MG,: UF. p. 279-352. 2002.

VENTURA, J. A., Taxonomia de Fusarium e seus segregados. Parte II - chaves para identificação. **Revisão anual de Patologia de Plantas**, v.8, p.303-338, 2000.

VILELA, G. R. **Efeito do oleo essencial de Eucalyptus globulus sobre espécies produtoras de aflotoxinas.**2007. 64p. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, 2007.

VINATORU, M. **Ultrasonicssonochemistry**, v. 8, p. 303-313, 2001.

WIDESTRAND, J.; PETTERSSON, H. Effect of time, temperature and solvent on the stability of T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and nivalenol calibrants.**Food Additives and Contaminants,** v. 18, n. 11, p. 987-992, 2001.

XIE,W. et al. *Ananas comosus* L. Leaf Phenols and p-Coumaric Acid Regulate Liver Fat Metabolism by Upregulating CPT-1 Expression. Evidence-**Based Complementary and Alternative Medicine,** Article ID- 903258, 12p., 2014.

ZHAN, J. X. et al. Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: Beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. **Journal of Natural Products***,* v.70,p. 227-232, 2007.

ZORZAL, P. B. et al. **Análise Morfológica e Bioquímica Comparativa da Resistência à Fusariose em Abacaxizeiro.**In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2008. Disponível em:<http://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/item/139/1/ANALISE-MORFOLOGICA-E-BIOQUIMICA-COMPARATIVA-DA-RESISTENCIA-A-FUSARIOSE-EM-ABACAXIEIRO-CD-ANAISsmallpdf.com.pdf> Acesso em: 01 fev 2017.

8. Anexos

Anexo 1

Chave descrita para espécies de *Fusarium* e espécies afins pertencentes ao complexo Gibberella fujikuroi (Nirenberg & O'Donnell, 1998).

1. De 0 à 1 septo, conídiosoval sem células "pé" produzidas na superfície do agar, nunca no micélio aéreo.....***F. bacterioides***

1. De 0 à 5 septos, conídios sem células "pé"produzidas no micélio aére.....**2**

2. Clamidósporos produzido dentro de 14 no escuro.....**3**

2. Clamidósporos não produzidos dentro de 14 no escuro.....**9**

3. Clamidósporos principalmente laterais ou terminais suportados individualmente ou em pares, raramente em clusters; polifilíades ausentes.....**sectionElegans**[2]

3. Clamidósporos principalmente intercalar, normalmente suportados em cadeias ou agrupamentos; polifiálides às vezes presentes.....**4**

4. Conídios formando cadeias e falsas cabeças no micélio aéreo.....**5**

4. Conídios não formando cadeias no micélio aéreo.....**7**

5. Alguns conídiospiriformes produzidos.....**6**
5. Não produz conídios piriformes.....***F. nygamai***

6. Conídiosclavados e piriforme produzidos em cadeias lineares de comprimento (>30 conídios) sobremonofilíades.....***F. napiforme***

6. Conídios produzidosovóide e piriformes, por vezes em falsas cadeias curtas (<15 conídios) de mono e polifiálides.....***F. pseudoanthophilum***

7. Conidióforos muitas vezes ramificado, cada ramomuitas vezes terminando com polifiálides.....***F. pseudoanthophilum***

7. Conidióforos raramente ramificados, raramente formando polifilíades.....**8**
8. Conídiosesporodoquial principalmente com3 septos com uma célula apical e basal única; Não produzem conídios piriforme no micélio aéreo.....***F.udun***

8. Conídios esporodoquial principalmente de 3septos com uma célula apical aguda; Não produzem conídios piriforme no micélio aéreo.....1. ***F. acutatum***

8. Conídios esporodoquial principalmente de 5 septos, com uma célula apical ligeiramente adunco; ocasionalmente ocorre produção de conídios piriforme no micélio aéreo..... ***F. dlaminii***

9. Hifas estéreis enroladas formadas sobre o ágar.....**10**

9. Hifas estéril enroladas não formados.....**11**

10. Conídios agregados em falsas cabeças, nunca em cadeias.....***3. F. circinatum***

10. Conídios agregados em falsas cabeças e em cadeias curtas falsas (<15 conídios), quando cultivados sob luz negra contínua.....***8. F. pseudocircinatum***

11. Conídios aderente em cadeias e falsas cabeças.....**12**

11. Conídios aderindo somente nas falsas cabeças, cadeias ausente.....**24**

12. Conídios apenas suportados em monofiálides.....**13**

12. Conídios suportados em mono e polifiálides.....**14**

13. Conídios csuportadosem conidióforos que muitas vezes terminar verticalmente com 3 fiálides, cosmopolita em numerosas plantas hospedeiras, especialmente cereais.....***F. verticillioides (Sacc.) Niremberg***

13. Conídios suportados em conidióforos que geralmente terminam verticalmente com 4 fiálides; culturas tipicamente produzem placas violeta escuro viscosas no BDA dentro de 5 da; patogénico para *Sorgum* spp.....***F. thapsinum***

14. Conídios piriforme e clavados produzido em cadeias.....**15**

14. Conídios não piriformeproduzidos.....**16**

15. Polifiliádesfreqüentes; produzemesporodóquios.....***F. proliferatum***[3]

15. Polifiliádes rara, esporodóquios não produzido.....***F. nisikadoi***[1]

16. Conídios globosos produzidos isoladamente ou em aglomerados botryos.....***F. globosum***

16. Conídios não globosos produzidos.....**17**

17. Polifiálides raras:simpodialmente proliferando conidióforos comuns.....**18**

17. Normalmente polifiálides; abundante; conidióforos simpodialmente proliferam rara.....**19**

18. Conídios clavados principalmente 0 a 3 septos; conídios esporodoquial até 7 septos; na *Phyllostachys* e *Triticum*.....***F. nisikadoi***[4]

18. Conídios clavados principalmente 0 septos; raramente 1 septo; conídios esporodoquial tipicamente 3 a 5 septos; causando doença bakanae induzida por giberelina em *Oryza sativa*.....***F. fujikuroi Niremberg***

19. Conídios aderentes em curtas (<15 conídios) cadeias de comprimento médio (15-30 de conídios).....**20**

19. Conídios aderentes em longas cadeias (<30 conídios).....**23**

20. Cadeias de conídios produzidos sob qualquer condição de luz.....**21**

20. Cadeias de conídios produzidos quer no escuro ou sob luz negra.....**22**

21. Cadeias de conídios zigzaglike, de curta duração (<15 conídios) ou comprimento médio (15-30 conídios); causando endosepsis fruta em *Ficus carica*.....***12. F. lactis***

21. Conídios em cadeias lineares, de curto (<15 conídios) ou comprimento médio (15-30 conídios); patogénico para *Pennisetum typoides*.....***9. F. pseudonygamai***

22. Conídios de cadeias lineares e curtas(<15), formados abundantemente apenas no escuro, patogénico para *Sansecieria, Gasteria* e *Dracaena* spp.....**7.*F. phyllophilum***

22. Cadeias de conídios falsas e curtas (<15 conídios),formadas somente sob luz preta contínua.....***F. brevicatulatum***

23. Conídios esporodoquial quase em linha reta.....***F. proliferatum***[3]

23. Conídios esporodoquial fortemente recurvado, alguns em forma de anel.....***F. annulatum Bugnicourt***[3]

24. Conídiospiriforme produzidos.....**25**

24. Conidióforos principalmente prostrado, principalmente ramificada.....**28**

25. Conídios piriforme produzidos.....***F. anthphilum* (A. Braun) Wollenw**

25. Conídios piriformes não produzidos.....**26**

26. Conídios ovais para fusoides na maior parte 0 a 3 septadas; patogénico para *Zea mays*.....***F. subglutinans***

26. Conídiosovoides ou oval, principalmente sem septos.....**27**

27. Conídios sem septos principalmente ovoide; patogénico para *Ananas comosus*.....***6. F guttiforme***

27. Conídios sem septos principalmente ovais; patogénico para bulbos de flores-de*Nerine, Vallota* e *Haemanthus*.....***11.F. bulbicola***

28. Conidióforos ramificados em dois níveis; patogénico para *Ficus carica*.....***10.F. ramigenum***

28. Conidióforos ramificados em um nível.....**29**

29. Conídios esporodiquial presente, fortemente recurvado, alguns em forma de anel; patogênico para *Succisa pratensis*.....***F. succisae (Schrõter)Sacc.***

29. Conídios esporodoquial ausente, ou quando presente quase em linha reta.....**30**

30. Conídios piriformes produzidos; patogénico para *Saccarum officinarum*.....***F. sacchari (Bud.) W. Gams***

30. Conídios piriformes não produzidos.....**31**

31. Aberturas conidiógenas produzidas em ângulos retos, denticulado; patogénico para *Ipomoea*.....***5. F. denticulatum***

31. Não é como anteriormente.....**32**

32. Não forma esporodóquios em culturas de tipo selvagem; patogênico para *Saccharumofficinarum*, causando doençapokkah boeng.....***F. saccha***

33. Esporodóquios formado em culturas de tipo selvagem.....**33**

32. Conídios esporodóquios principalmente 3 a 5 septos; em *Musa sapientum*.....**4.*F. concentricu***

33. Conídios esporodóquios principalmente 3 a 5 septos; patogênico para *Begonia* spp.....***2. F. begoniae***

Anexo2

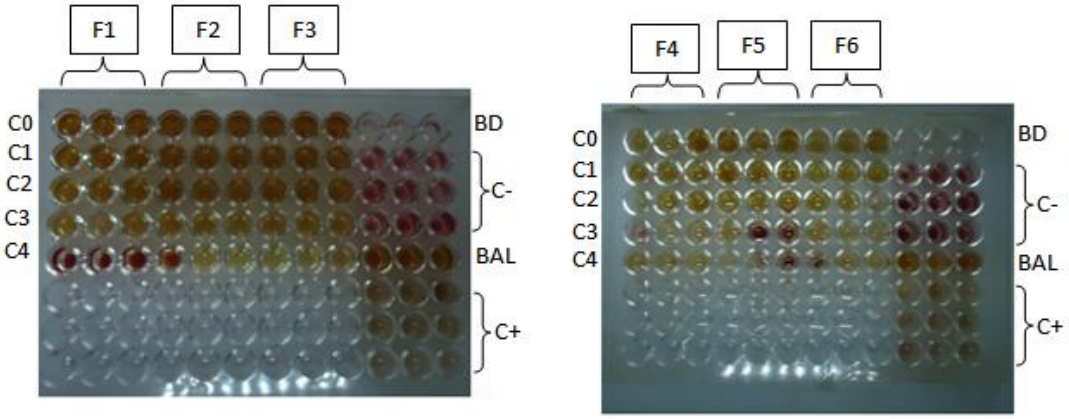

Figura 1: Resultados do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) da cultura ativa de *Lactobacillusplantarum* Abx3.Fonte: AUTORA.

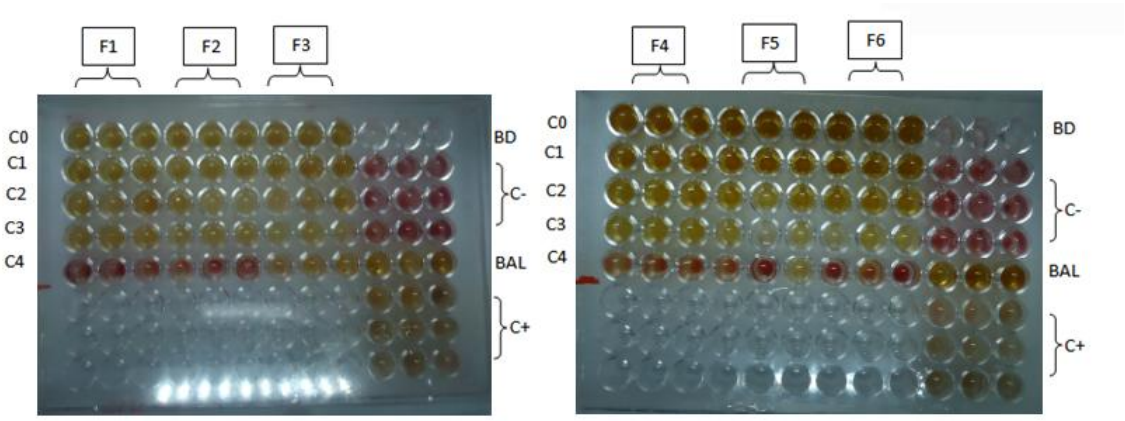

Figura 2: Resultados do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* Abx3.Fonte: AUTORA.

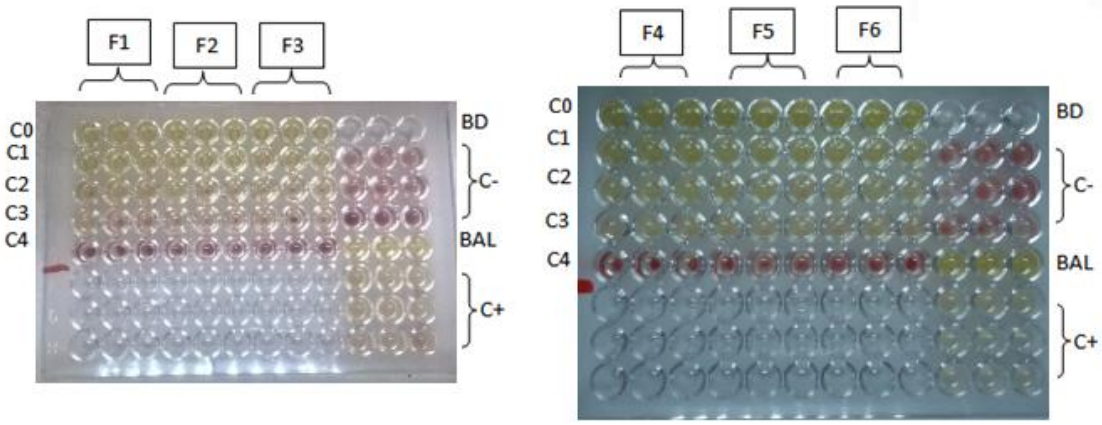

Figura 3: Resultados do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) da cultura ativa de *Lactobacillusparacasei* subsp.*paracasei*Abx5.2.Fonte: AUTORA.

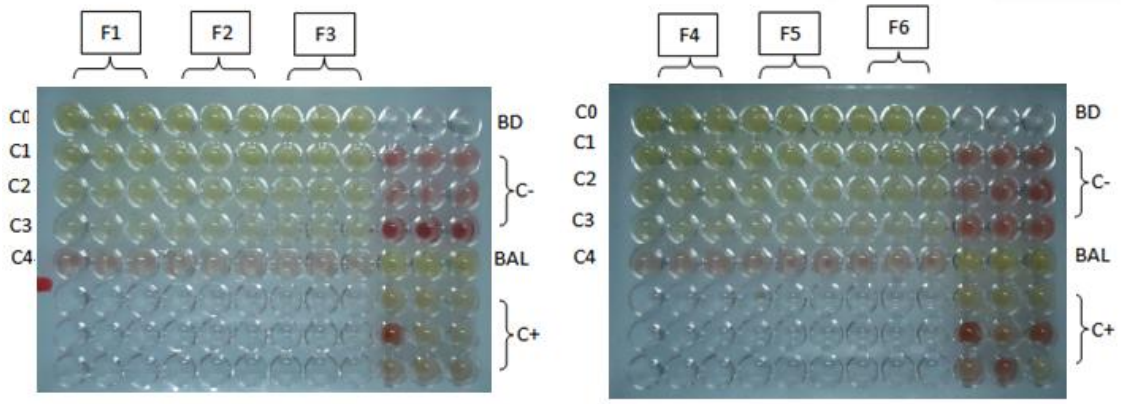

Figura 4: Resultados do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do sobrenadante de *Lactobacillus paracasei* subsp*. paracasei*Abx5.2.Fonte: AUTORA.

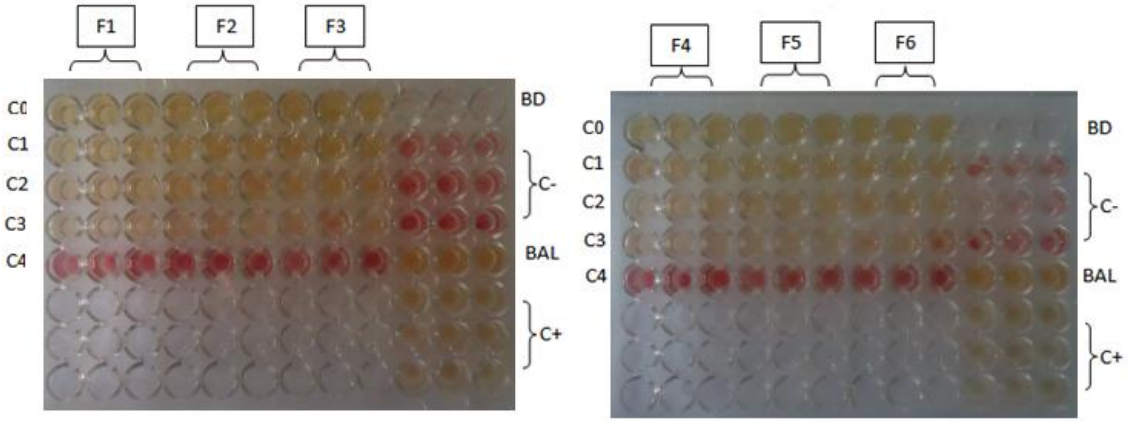

Figura 5: Resultados do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) da cultura ativa mista de *Lactobacillus plantarum* Abx3e *Lactobacillusparacasei* subsp.*paracasei*Abx5.2.Fonte: AUTORA

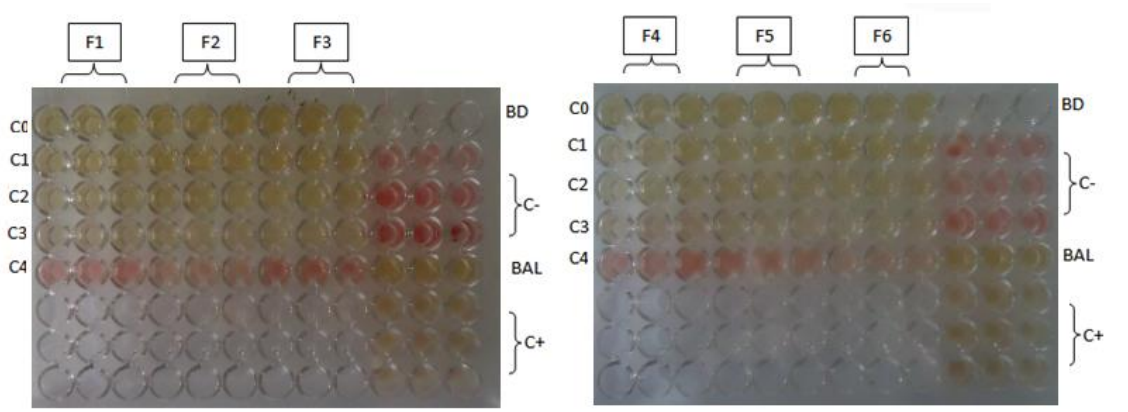

Figura 6: Resultados do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do sobrenadante da cultura mista de*Lactobacillus plantarum* Abx3 e*Lactobacillus paracasei* subsp*. paracasei*Abx5.2.Fonte: AUTORA.

Anexo 3

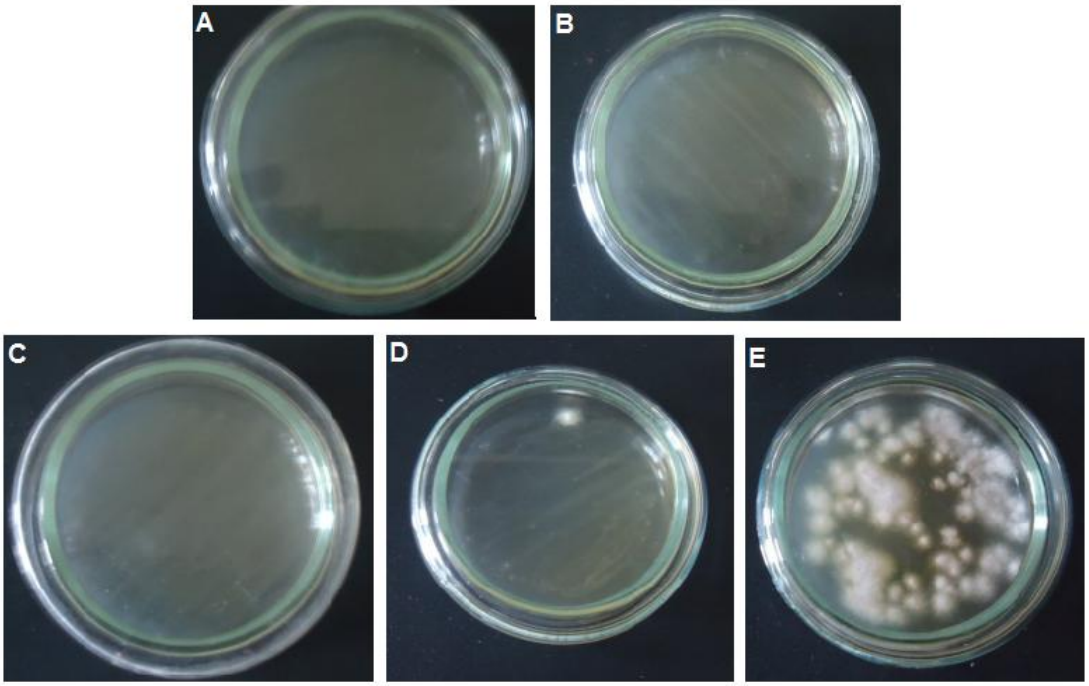

Figura1: Avaliação da concentração fungicida mínima (CFM) realizada em placa de Petri com meio BDA a partir da semeadura das diferentes concentrações de caldo e sobrenadante de BAL com inoculo de *F. guttiforme.* A- C0; B- C1; C- C2; D-C3 e E- C4. Fonte: AUTORA.