

## **Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar**

### **Biocontrol by yeasts: perspectives in application for fruits safety**

Alexandre Rodrigo Coelho<sup>1</sup>; Fernando Leite Hoffmann<sup>2</sup>; Elisa Yoko Hirooka<sup>3\*</sup>

---

#### **Resumo**

O sistema agroalimentar de frutas é uma área relevante, onde o Brasil vem concentrando esforços para garantir a competitividade de frutas. Perdas consideráveis na produção de frutas economicamente importantes decorrem da susceptibilidade à infecção fúngica no campo, assim como posterior ataque na armazenagem. Entre as alternativas ao tradicional tratamento químico de doenças pós-colheita de frutos, destaque especial enfoca-se sobre biocontrole, em função da baixa possibilidade de resíduos tóxicos. No contexto, abre-se perspectiva para as leveduras, com ampla inocuidade demonstrada nos processos fermentativos. Desconhece-se a aplicabilidade de fator “killer” presente em leveduras, mas a potencialidade de fatores inócuos à saúde dos consumidores aponta as leveduras como compostos bioativos promissores na aplicação em biofilmes biodegradáveis. A revisão discorre sobre interação benéfica de leveduras no controle de fungos deteriorantes/micotoxigênicos, visando contribuição adicional à segurança de frutas frescas no mundo globalizado, onde a economia brasileira mantém um avanço progressivo.

**Palavras-chave:** Leveduras, biocontrole, fator “killer”, frutas, biofilmes.

---

#### **Abstract**

The fruits agrifood system is a relevant area in Brazil. Considerable losses in the economically important fruits are elapsed by susceptibility to field fungal infection, followed by further storage fungi attack. Biocontrol has been considered as an alternative for traditional chemical treatment in pos-harvesting disease control, due the low possibility of undesirable residues. The perspective is targeted on yeasts, whose safety is already demonstrated by food fermentative processes. The applicability of yeast killer factor is unknown, but the potentially innocuous compounds seems to be a promising bioactive product for use in biodegradable biofilms. The possible application of beneficial interaction of yeasts in the control of deteriorative/mycotoxigenic fungi are revised, aiming additional contribution for fresh fruit safety in the globalized world, where the Brazilian economy is advancing strongly.

**Key words:** Yeasts, biocontrol, killer factor, fruits, biofilms.

---

<sup>1</sup> Doutorando do Curso de Ciência de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos da Universidade Estadual de Londrina. tel: (17) 2327048 ou (43) 3477109, Email: coelhoar@hotmail.com.

<sup>2</sup> Docente do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da UNESP-São José do Rio Preto-SP.

<sup>3</sup> Docente do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos da Universidade Estadual de Londrina. E-mail: hirooka@uol.com.br

\* Autor para correspondência.

## Introdução

O Brasil tem na agricultura uma das bases mais potentes de economia, garantindo o fornecimento contínuo de cereais, oleaginosas, hortaliças, frutas e derivados oriundos de processamento.

O sistema agroalimentar é uma das áreas onde o país vem investindo esforços para a melhoria de competitividade, onde as exportações brasileiras de frutas frescas geraram um volume de 580 mil toneladas, correspondente ao crescimento de 51,2% entre os anos 1998/2001. Manga, maçã, mamão “Papaya” e melão destacaram entre as frutas mais exportadas, indicando a apreciação crescente pelo consumo in natura de frutas tropicais/subtropicais. Apesar da exportação de frutas gerar um PIB de US\$11 bilhões, o país ainda está longe de seu verdadeiro potencial (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS, 2002), comparado ao milho, por exemplo, com demanda excepcional, cuja classificação anterior em oitavo importador apresentou avanço para o terceiro exportador em 2001 (IBGE, 2001). A fruticultura brasileira responde por apenas 1,5% do comércio mundial, evidenciando fraca inserção no mercado internacional e excluída dos vinte maiores exportadores de frutas frescas (FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION, 2002).

Entre outros fatores, as consideráveis perdas nas culturas de importância econômica resultam da susceptibilidade de frutas à infecção fúngica, desencadeada pelos fatores ambientais (temperatura, umidade) e danos mecânicos na colheita e estocagem. Na armazenagem de maçãs ocorrem perdas de 14%, causadas principalmente por *Penicillium expansum* (JANISIEWICZ et al., 1998), assim como as doenças pós-colheita responsáveis por prejuízos de 1 a 93% em mamão, com ênfase a *Colletotrichum gloeosporioides* (REZENDE; FANCELLI, 1997). Em manga, os agentes deteriorantes comumente relatados são *Lasiodiplodia theobromae* (MICHEREFF et al., 1997) e *Botryodiplodia theobromae* (MASCARENHAS et al., 1995). Em adição, a globalização do consumo de frutas e a

procura por produtos naturais saudáveis, requer segurança na qualidade, devendo-se direcionar atenção ao potencial toxigênico de fungos associados predominantemente no transporte e armazenagem. Ênfase especial deve ser dada ao risco de patulina e ocratoxina, além de outras micotoxinas oriundas de exposição a novos sistemas de manutenção de frutos frescos (JELINEK; PHOLAND; WOOD, 1989; PICCI, 1992; FALLIK et al., 1996).

No campo, a produtividade das frutas está relacionada à aplicação de fungicidas, o que pode incrementar o nível de contaminantes químicos indesejáveis no produto final, somando-se o efeito deletério já proporcionado pelas toxinas fúngicas naturais. Os métodos de controle biológico constituem alternativas viáveis em relação ao químico tradicional, principalmente por não deixarem resíduos tóxicos nas frutas tratadas (WILSON; WISNIEWSKI, 1994). Os produtos biológicos BIOSAVE II (*Pseudomonas syringae*) e ASPIRE (*Candida oleophila*) apresentaram resultados satisfatórios contra fungos deteriorantes e micotoxigênicos (SUGAR; SPOTTS, 1999; JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002). O ASPIRE encoraja a perspectiva para o controle empregando leveduras, onde dificilmente constariam espécimens micotoxigênicas.

Determinadas leveduras apresentam o fator “killer”, um peptídeo tóxico capaz de inibir o crescimento de outros microrganismos (PHILLISKIRK; YOUNG, 1975; YOUNG, 1982). Fungos filamentosos também podem ser susceptíveis às leveduras “killer”, constatando-se *Saccharomyces cerevisiae* (WALKER; MCLEOD; HODGSON, 1995) e *Sporobolomyces roseus* (JANISIEWICZ; PETERSON; BORS, 1994) entre as linhagens com maior potencial antagônico. Pesquisas visando incremento na produção de fator “killer”, aliado a caracterização molecular abrem perspectivas para o desenvolvimento deste novo elemento no controle biológico (SUZUKI; NIKKUNI, 1994; KASHIWAGI et al., 1997). Paralelamente à pesquisa básica, deve-se avançar também no desenvolvimento de processo aplicativo

capaz de incorporar os produtos biotecnológicos, onde os revestimentos biodegradáveis e/ou comestíveis vêm destacando com relevante participação.

O controle de doenças de fruto pós-colheita devido a fungos deteriorantes/toxigênicos, associado à investigação de compostos bioativos inócuos compatíveis com a aplicação prática, é assunto prioritário, para garantir a qualidade e segurança de produtos oriundos da fruticultura.

### **Importância da Produção e Comercialização de Maçã, Mamão e Manga no Brasil**

A produtividade da fruta brasileira supera os 34 milhões de toneladas, classificando o país entre os quatro maiores produtores mundiais juntamente com China Índia e EUA (FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION, 2002). A extensão territorial e a diversidade climática permitem o cultivo desde frutas de clima temperado (Região Sul e Sudeste) a tropical/subtropical (Sudeste, Norte e Nordeste), colocando o Brasil em posição privilegiada em relação às demais nações (SIMÃO, 1998). Do total produzido, 53% destina-se ao consumo nacional *in natura*, 46% para a indústria processadora e apenas 1,5% à exportação de frutas frescas, evidenciando fraca inserção no mercado internacional (SEBRAE, 2002; FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION, 2002).

As exportações brasileiras de frutas frescas geraram divisas de 214.590 milhões de dólares em 2001, correspondente ao volume de 580 mil toneladas, em relação a 169.867 milhões de dólares e 428 mil toneladas em 2000, i.e., crescimento de 35,5% em volume e 26,33% em valor. Outrossim, salienta-se a surpreendente evolução quando comparada a 297 mil toneladas em 1998, cuja cifra correspondeu ao incremento de 51,2% em volume nestes últimos três anos (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS, 2002).

A manga (*Mangifera indica*), a maçã (*Malus domestica*) e o mamão “Papaya” (*Carica papaya*) estiveram entre as seis frutas mais exportadas em 2001, sendo responsáveis por 15,91, 6,83 e 3,98%

em volume e 23,33, 9,35 e 8,85% em valor, respectivamente (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS, 2002). Do total das exportações de manga, 70% se destinaram aos Estados Unidos e 30% para a Comunidade Européia. A maior parte da safra da fruta é produzida no Vale do São Francisco, onde são colhidas cerca de 80 mil toneladas/ano. Em relação ao melão, 77,1% destinou-se para a Argentina, seguido de 15,62% para o Uruguai e 7,3% para Gana (BRASIL, 2002).

A maçã, uma fruta tradicionalmente importada pelo Brasil, está atingindo auto-suficiência na suplementação do mercado interno, inclusive já sendo citada entre os frutos exportados, devido a vantagem na diferença de periodicidade em relação ao Hemisfério Norte (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MAÇÃ, 2002). A fruta fresca, cuja exportação iniciou em 1997 para a Holanda, teve também o Reino Unido, Bélgica, Alemanha, Espanha e Itália como principais países importadores entre junho de 2001 e maio de 2002 (BRASIL, 2002). O seu consumo em forma natural ou processada é amplamente difundido, obtendo-se os mais variados produtos derivados, seja suco, polpa, purê, produtos fermentados, desidratados, conservas e doces (MACHUCA, 1988).

O fator determinante no plantio das macieiras numa região depende do período de baixa temperatura, necessário para o repouso vegetativo e conseqüente quebra de dormência (FUNDAÇÃO CARGILL, 1983). No Brasil, as áreas recomendadas para o plantio situam-se na Região Sul, com a representatividade de 90% da produção nacional, sendo o estado de Santa Catarina responsável por mais de 50% da produção total, seguido de Rio Grande do Sul com 44% (BRASIL, 2002). As cultivares predominantes de maçã são Gala e Fuji, com representatividade de 46 e 45%, respectivamente, em relação a produção total (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MAÇÃ, 2002).

O mamão, originário da América Central, é uma fruta climática tropical de excelência, sensível à queda de temperatura e à falta de umidade no solo

(SIMÃO, 1998). O Brasil atingiu incremento na produção de 125% com 1.450.000 ton. nos últimos 10 anos em relação a 643.716 ton. em 1991, constituindo-se no principal país produtor com 26% da cifra mundial em 2000 (FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION, 2002). Todavia, no cenário das exportações, ainda esta longe do potencial, onde o México deteve a primeira colocação com 60.000 ton., seguida do Brasil (22.000 ton.), destinando para os Estados Unidos (23%), Holanda (16%), Inglaterra (14%) e Portugal (12%) em 2000 (FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION, 2002). Os Estados de Bahia, Espírito Santo e Pará participam com maior plantio (IBGE, 1998).

A manga, fruto excelente para o consumo “in natura”, é também de grande valor industrial no preparo de marmeladas, compotas, geléia, aguardente, sucos e sorvetes. A mangueira se distribui em praticamente todas as regiões mundiais, assim como no território nacional, com maior produção

na Região Sudeste (São Paulo e Minas Gerais) (SIMÃO, 1998).

Além de manga, melão, mamão “Papaya”, banana e maçã, que lideram no mercado exterior, espera-se uma expansão para outras frutas no futuro próximo, considerando a vastidão do território brasileiro, com áreas propícias ao cultivo dos mais variados produtos exóticos ainda inexplorados (SIMÃO, 1998; INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS, 2002).

### Deterioração de frutas

Classificadas entre produtos altamente perecíveis, as frutas, na pós-colheita, devem estar livres de deterioração (KHURDIYA, 1995), responsável por perdas consideráveis, com ênfase a bolores (ECKERT; OGAWA, 1985; SITTON; PATTERSON, 1992; WILSON; WISNIEWSKI, 1994), conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Fungos envolvidos na deterioração de frutas

Gênero	Características da deterioração	Referências
<i>Alternaria</i> spp.	Mancha marrom a preta em maçã, cereja, pêssego, pêra, damasco, ameixa e figo.	Beuchat (1987). Fundação Cargill (1983).
<i>Aspergillus</i> spp.	Podridão negra em frutas cítricas.	Nelson (1979); Heerden et al. (2002).
<i>Botryodiplodia</i> spp.	Podridão negra e amolecimento em manga e banana.	Mascarenhas et al. (1995).
<i>Botrytis</i> spp.	Podridão em uvas de mesa. Podridão cinza em maçã, pêra, framboesa, morango, uva, figo, cereja, pêssego, nectarina, damasco, ameixa e frutas cítricas.	Nelson (1979). Beuchat (1987).
<i>Colletotrichum</i> spp.	Mancha marrom a preta (antracnose) em frutas cítricas, abacate, manga e mamão.	Rezende e Fancelli (1997).
<i>Diplodia</i> spp.	Podridão negra em frutas cítricas, abacate, manga e mamão.	Beuchat (1987); Fundação Cargill (1983).
<i>Fusarium</i> spp.	Podridão marrom em frutas cítricas e abacaxi; amolecimento em figos.	Beuchat (1987).
<i>Geotrichum</i> spp.	Rancidez em frutas cítricas.	Eckert e Eaks (1989).
<i>Penicillium</i> spp.	Podridão azul e verde em frutas cítricas; podridão marrom em abacaxi. Podridão azul em maçã, uva, pêra, banana e cereja.	Beuchat (1987); Eckert et al. (1994). Scott et al. (1972); Lindroth e Niskanen (1978); Taniwaki e Bleinroth e Martin (1989); Burda (1992).
<i>Rhizopus</i> spp.	Deterioração de uvas de mesa. Amolecimento em mamão, maçã, pêra, cereja, pêssego, damasco, nectarina, ameixa, uva, morango, abacate e figo.	Nelson (1979). Beuchat (1987).

As perdas na armazenagem de maçã atingem cifra de 14%, causadas por desordens fisiológicas (“bruising”) ou microbianas (JANISIEWICZ et al., 1998). Os bolores e leveduras constituem agentes de maior impacto em frutas armazenadas (BRACKEET, 1993), com perdas substanciais na indústria de processamento (SUGAR et al., 1994). Na categoria, *Penicillium* spp. representa o principal agente deteriorante (TAVARES, 1996), com destaque a *Penicillium expansum*, que além de colonizar o fruto e causar dano à polpa, produz a patulina, micotoxina teratogênica e cancerígena (PRIETA et al., 1994; SYDENHAM et al., 1997).

As doenças pós-colheita no mamão causaram perdas durante o armazenamento, transporte e comercialização, acarretando prejuízos de 10 a 40% (embarques terrestres) e 5 a 30% (embarques aéreos) (KRETZSCHMAR, 1988). A antracnose por *Colletotrichum gloeosporioides* constituiu na principal doença pós colheita em mamão, reduzindo o valor comercial devido a lesão circular deprimida, com margem marrom-clara e massa de esporos laranja ou rosada na porção central, com o coalescimento das lesões durante o progresso, apodrecendo o fruto (REZENDE; FANCELLI, 1997).

Em mangas, Srinivas et al. (1997) relataram perdas devido a desordens fisiológicas ou infecções fúngicas e bacterianas de 17,9 e 14,4% nas variedades “Totapuri” e “Alphonso” na Índia, estando entre os agentes comuns a *Lasiodiplodia theobromae* (MICHEREFF et al., 1997) e *Botryodiplodia theobromae* (MASCARENHAS et al., 1995). A deterioração pós-colheita típica por *B. theobromae* em manga caracteriza-se pela casca com coloração negra e aspecto molhado, resultante do amolecimento e liquefação da polpa à temperatura ambiente ( $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), seja em frutos verdes ou maduros mecanicamente danificados (MASCARENHAS et al., 1995).

### Micotoxinas em frutas

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos provenientes de vias biossintéticas comuns

em fungos, que proliferam em produtos agrícolas destinados a alimentação humana e animal (GOLDBLATT, 1977; BEUCHAT, 1987; HARISSON, 1989; ABARCA, 2001). Acarretando sérios danos à saúde humana e enquadrada entre toxinas naturais de difícil controle, aliada a termorresistência perante o processamento industrial, as micotoxinas têm sido assunto exaustivamente discutido pela “WHO/FAO Joint Expert Committee on Food Additives”-JECFA (WORLD HEALTH ORGANISATION, 1996). A produção de micotoxinas por fungos de campo tem freqüentemente envolvido fitopatógenos de interesse, seguida de adicional incremento devido a fungos de armazenagem, indicando característica cumulativa na cadeia produtiva (BEUCHAT, 1987). Para segurança alimentar, as micotoxinas constituem um dos pontos críticos decisivos no comércio internacional de produtos agrícolas (BRASIL, 2002).

Inúmeros fatores contribuem para a contaminação de produtos ao longo da cadeia alimentar, estando entre os principais a susceptibilidade dos tecidos vegetais ao ataque fúngico (GOLDBLATT, 1977), a rotação de culturas aliada à condição ambiental (temperatura/umidade) e danos físicos/mecânicos na colheita e estocagem (LACEY, 1986). *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. e *Alternaria* spp. são os principais representantes fúngicos responsáveis pela produção de micotoxinas numa ampla variedade de produtos agrícolas (BLUNDEN et al., 1991; HUSSEIN; BRASEL, 2001). Entre os grupos de micotoxina comumente relatados na contaminação de alimentos citam-se aflatoxina, ocratoxina, patulina, zearalenona, tricoteceno, fumonisina, ácido tenuazônico, ácido ciclopiazônico, citrinina e ácido penicílico (MCDONALD, 1973; PERRY et al., 1984; JELINEK; PHOLAND; WOOD, 1989; PICCI, 1992; SCOTT, 2001; ONO; HIROOKA, 2002).

O interesse pelo consumo de produtos naturais saudáveis vem estimulando cada vez mais a globalização de frutas, devendo-se consequentemente, direcionar atenção também ao

potencial micotoxigênico de fungos associados. Ênfase especial deve ser dada a ocratoxina A e patulina, devido a preferência de grupos taxonômicos pertencentes aos produtores da categoria no ataque a substratos constituídos de frutas frescas (JELINEK; PHOLAND; WOOD, 1989; PICCI, 1992; FALLIK et al., 1996). Por outro lado, salienta-se o perigo da contaminação por aflatoxinas em frutas secas como uva passa, damasco e ameixa seca produzidas nas regiões extremamente áridas do Oriente Médio, cuja ampla exportação para regiões de maior umidade, como o mercado europeu, permite adsorção de umidade durante o transporte, expondo ao perigo de proliferação microbiana anteriormente suprimida pela baixa atividade de água ( $A_w$ ) (FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION, 1990).

O desenvolvimento favorável de um determinado grupo fúngico e conseqüente produção de micotoxinas depende não somente do tipo de substrato, mas também de característica peculiar da espécie predominante. Neste contexto, a produção de patulina pode abranger uma faixa relativamente ampla de temperatura (0 a  $>30^\circ\text{C}$ ), porém restrito a  $A_w$  ( $>0,90$ ) (FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION, 1990). A produção de ocratoxina ocorre numa ampla faixa de temperatura (5 a  $>30^\circ\text{C}$ ) e  $A_w$  ( $>0,85$ ), atingindo desde cereais a frutas frescas (FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION, 1990). *Aspergillus ochraceus* é o principal representante toxigênico nas regiões tropicais, vindo a causar polêmicas na exportação dos frutos de café (VARGA et al., 1996), enquanto que *Penicillium verrucosum* predomina nos cereais cultivados nas regiões temperadas (MOSS, 1996a; TRUCKSESS et al., 1999; SWEENEY; WHITE; DOBSON, 2000).

A patulina é uma micotoxina com potencial carcinogênico, mutagênico (KRYGER, 2001) e teratogênico (BISSESSUR; PERMAUL; ODHAV, 2001) produzida por *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Byssochlamys* spp. (FRISVAD; FILTENBORG, 1988; STEIMAN; EIGLE; KRIVOBOK, 1989). O fato coloca em risco os produtos de origem vegetal com elevada  $A_w$ ,

submetidos ao transporte/armazenagem sob baixa temperatura, estando entre os principais substratos disponíveis, as frutas climatéricas como maçã, mamão, manga, banana, pêra, ameixa, entre outras.

Salienta-se a importância de *P. expansum*, devido a frequência de detecção na estocagem de maçãs, pêras, bananas e cerejas (TANIWAKI; BLEINROTH; MARTIN, 1989; BURDA, 1992), onde a maçã constitui o principal substrato para a produção de patulina pelas diferentes espécies fúngicas (STOTT; BULLERMAN, 1975; FRISVAD; FILTENBORG, 1988; SANDERSON; SPOTTS, 1995). Ênfase especial neste fruto decorre do volume comercializado e produtos desenvolvidos, consumidos sob forma de bebida ou como ingredientes incorporados nos mais diversos produtos alimentícios, com unanimidade na apreciação mundial (SANDERSON; SPOTTS, 1995).

Harwig et al. (1973) constataram alta ocorrência de *P. expansum* aliada à presença de patulina em 46% das maçãs naturalmente deterioradas, sob armazenagem sem refrigeração no Canadá, indicando aceleração na produção da toxina devido à conservação inadequada. O mesmo ocorreu com suco de maçã na Austrália, onde 65% das amostras apresentaram-se contaminadas por patulina (WATKINS; FAZERAS; PALMER, 1990). Brackett e Marth (1979) detectaram 10 a 350 mg/L de patulina em 58% das amostras de sucos de maçã. Lindroth e Niskanen (1978) relataram a ocorrência de patulina em 20% dos sucos de maçã industrializados e 40% nos sucos caseiros, constatando-se no último grupo quantidades maiores que 1000 mg/L, provavelmente devido a condições inadequadas de estocagem, aliada à matéria-prima de baixa qualidade.

Embora *P. expansum* prefira atividade de água em torno de 0,95 e temperatura ideal na faixa de 20 a  $25^\circ\text{C}$  para o crescimento e produção de toxina (NORTHOLT; VAN EGMOND; PAULSCH., 1978; ROLAND; BEUCHAT, 1984), o fungo produz patulina em refrigeração comumente empregada na armazenagem de frutas (BUCHANAN; SOMMER;

FORTLAGE, 1974; ROSS; HIROOKA, 1996). Wilson e Nuovo (1973) isolaram 60 cepas de *P. expansum* produtoras de patulina em maçãs com deterioração, mantidas sob armazenagem de 0°C. Northolt, Van Egmond e Paulsch (1978) confirmaram o fato, constatando-se crescimento e produção de patulina em maçãs armazenadas à 1°C. Analisando a produção de patulina em maçãs inoculadas com *P. expansum* NRRL 1172 e *P. variable*, a toxina pôde ser detectada após 30 (4°C) e 60 dias (0°C) de armazenagem (ROSS-URBANO et al., 1998).

As perspectivas na exportação estendem preocupação para a preservação/armazenagem de frutos desde tropicais e subtropicais a exóticos (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS, 2002). A exposição de contaminação a fungos adaptados às mais diversas condições climáticas brasileiras, especialmente ao caráter tóxico de espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, ainda está longe de estudo sobre micotoxinas em frutos. No contexto, salienta-se as investigações direcionadas para *A. ochraceus* nos frutos de café, devido ao questionamento sobre contaminação por ocratoxina no café brasileiro (VARGA et al., 1996; LEONI et al., 2001, ROSS-URBANO et al., 2001). Por outro lado, as aflatoxinas seriam micotoxinas de ocorrência remota em frutas frescas, estando os relatos concentrados em grãos e frutos secos (BEUCHAT, 1987).

A ocratoxina A é um composto nefrotóxico, teratogênico e imunotóxico produzido por *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (BUSBY JR.; WOGAN, 1981), com destaque especial a *A. ochraceus* e *P. verrucosum* (HESELTINE et al., 1972; FRISVAD; FILTENBORG, 1989). “United States Department of Health and Human Services” (1996) demonstrou carcinogenicidade de ocratoxina A em ratos, sendo possivelmente carcinogênico para humanos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993). A ocratoxina A despertou atenção por ser detectada em café nas concentrações entre 0,2 e 360 ng/g (STUDER-ROHR et al., 1995; NAKAJIMA et al., 1997; TRUCKSESS et al., 1999), sendo alvo de regulamentação pelos países importadores (FURLANI; VALENTE SOARES, 1999).

O alto teor de mono e oligossacarídeos em frutas frescas favorecem os osmotróficos, elegendo-se substrato preferido por leveduras, assim como família *Mucoraceae* e *Aspergillus* grupo *niger*, que compõem representantes indesejáveis da deterioração (BEUCHAT, 1987). Os relatos esporádicos indicando produção de ocratoxina A por *A. niger* (ABARCA et al., 1994), *A. carbonarius* (TÉREN et al., 1996) e *A. terreus* (VARGA et al., 1996) trouxeram preocupação adicional para a possível contaminação em frutas com elevado teor de açúcares.

Em particular interesse, salienta-se o risco referente a *A. niger*, classificada entre microrganismos essencialmente inócuos por “Food and Drug Administration” FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2002) e freqüentemente liberado para o emprego nos processos biotecnológicos. Embora não sejam linhagens utilizadas diretamente na indústria fermentativa, a análise de 27 cepas de *Aspergillus* grupo *niger* mantidas no Instituto de Fermentação de Osaka detectou positividade para a produção de ocratoxina A em 5 cepas (ONO et al., 1995). Um fator agravante seria a possibilidade de contaminação de produtos derivados de frutas industrializadas, com ênfase a bebidas alcoólicas, cujo processo depende de matérias primas com alto teor de mono a oligossacarídeos.

Nas doenças de plantas supõe-se envolvimento de algum metabólito fitotóxico produzido pelo agressor, sendo que 80% de fitopatologias decorrem de ataque fúngico (UBOLDI EIROA, 1989). Cuidados especiais devem ser tomados, quando se trata de exportação de frutos frescos, agora expostos ao longo período de transporte e armazenagem, cujo “stress” pode gerar condições propícias para deflagrar a proliferação de fungos micotoxigênicos, anteriormente suprimidos pela defesa natural de plantas (HARISSON, 1989). Desconhece-se o perigo desencadeado pelo evento, porém a prevenção precoce, empregando procedimentos de controle inócuos a saúde humana, seria uma decisão perspicaz

e coerente, ou seja, prevenir a proliferação/invasão de agentes deteriorantes/toxigênicos a nível de superfície externa do fruto, sem afetar a qualidade nutricional e características físicas e químicas internas.

### Controle biológico de agentes deteriorantes/toxigênicos em frutas

Em vista do atual interesse na ampliação da exportação de frutas brasileiras, o controle na armazenagem tornou-se essencial para garantir a qualidade (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS, 2002; BRASIL, 2002). No contexto, os consumidores cada vez mais conscientes vêm impondo exigência, perante a necessidade de produtos isentos de resíduos agrotóxicos (WISNIEWSKI; WILSON, 1992).

O controle de doenças pós-colheita de frutas ainda baseia-se no uso de fungicidas sintéticos (WISNIEWSKI; WILSON, 1992; CASTORIA et al., 2001). Os EUA lideram a atividade científico-prático, para atender a comunidade com o desenvolvimento de novos fungicidas sintéticos (SUGAR et al., 1994). Entretanto, a aplicação indiscriminada de fungicidas sintéticos vem sendo desencorajada por afetar a saúde humana e o ecossistema, aliado ao aumento da resistência antimicrobiana, com surgimento de cepas fúngicas resistentes (JANISIEWICZ; PETERSON; BORS, 1994; JANISIEWICZ, 1996; ARRAS et al., 1998; SUGAR; SPOTTS, 1999).

Os métodos físicos e biológicos constituem alternativas viáveis e desejáveis, que vêm ocupando o espaço dominado atualmente pelo produto químico tradicional, principalmente em função de não deixarem resíduos tóxicos nas frutas tratadas (WILSON; WISNIEWSKI, 1994). O controle biológico através de metabólitos bacterianos demonstrou perspectivas promissoras para restringir o uso de agrotóxicos químicos (SANHUEZA; KRETZCHMAR; BORSÓI, 1992). Florianowicz (2001) mostrou eficiente atividade antifúngica de *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*,

*Lactobacillus casei*, *L. delbrueckii* e *L. lactis* contra *P. expansum*. Nunes et al. (2001) relataram excelente controle exercido por *Pantoea agglomerans* (CPA-2) contra *B. cinerea* e *P. expansum* sob refrigeração, evidenciada pela redução de mais de 80% na deterioração de pêra ( $8,0 \times 10^7$  UFC/mL) causada por *P. expansum* e *Rhizopus stolonifer* ( $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  conídias/mL).

No Brasil, Tavares (1996) obteve uma redução de *P. expansum* em até 80%, utilizando *Bacillus subtilis* e *B. thuringiensis*, sendo o resultado obtido superior ao controle químico. As perspectivas também indicaram resultado satisfatório no controle simultâneo de diversos fitopatógenos, aplicando metabólitos de *Bacillus* spp. (MOTOMURA; HIROOKA, 1996; MOTOMURA; SUWA; HIROOKA, 1997).

Nos EUA, já existe produto biológico à base de *Pseudomonas syringae* (BIOSAVE II), registrado para aplicação no controle de *P. expansum* e *Botrytis cinerea* em maçãs armazenadas (JANISIEWICZ; KORSTEN, 2002), assim como BIOSAVE 110, também à base de *P. syringae*, registrado para pós-colheita de maçãs e pêras (SUGAR; SPOTTS, 1999). A biotecnologia israelense lançou o ASPIRE, um fungicida à base de *Candida oleophila* sob forma de grânulos dispersíveis em água para pós colheita de maçã, cuja ação baseia-se na colonização por hiperparasitismo (SUGAR; SPOTTS, 1999). Ambos os produtos controlaram o ataque de *P. expansum* em maçã, porém com resultados diferentes. Assim, em armazenagem por dois anos consecutivos, a aplicação de ASPIRE proporcionou redução de 65% no diâmetro da lesão e 27% na incidência no primeiro ano, não havendo controle significativo no segundo ano de aplicação. Não obstante, BIOSAVE 110 manteve a atividade durante os dois anos de experimento, obtendo-se redução adequada, seja no diâmetro da lesão (32 a 72%) ou incidência (21 a 40%) (SUGAR; SPOTTS, 1999).

Os dados vêm reforçando o biocontrole como método alternativo no controle de doenças em pós-



colheita de frutas, capaz de minimizar o impacto ambiental, devendo-se ainda reduzir o custo para valores equivalentes ao controle químico (TAVARES, 1996). Sob o ponto de vista de segurança alimentar, um aspecto relevante a ser considerado trata-se da patogenicidade bacteriana à saúde humana, i.e., determinados *Bacillus* spp. ou *Pseudomonas* spp. constituem agentes de toxinfecção alimentar, não se podendo descartar as conseqüências da aplicação direta em plantas destinadas ao consumo humano (JANIESIEWICZ, 1996).

Em vista da situação, abre-se perspectiva para o biocontrole empregando leveduras, devido à baixa possibilidade micotoxigênica deste grupo elegido para os processos fermentativos, não tendo sido relatado casos de micotoxicose (JANIESIEWICZ, 1996).

Arras et al (1998), utilizando cepas de *Pichia guilliermondii* e *Candida sake*, reduziram a infecção por *Penicillium italicum* de 86 para 98% em frutas cítricas. Usall et al. (2001) obtiveram resultados satisfatórios utilizando *C. sake* (cepa CPA-1) no biocontrole de doenças pós-colheita causadas por *P. expansum* em maçãs, reduzindo a incidência de frutas deterioradas em mais de 70%. O tratamento de maçãs (cultivar Golden Delicious) pós-colheita com *C. sake* sob estocagem a frio em duas estações (1994/5 e 1995/6) também resultou no controle efetivo de *P. expansum*, com redução de 80% no diâmetro da lesão e 50% na ocorrência das lesões (TEIXIDO; USALL; VINAS, 1999).

Guinebretiere et al. (2000) obtiveram sucesso no tratamento contra *B. cinerea* em morangos armazenados, aplicando  $10^3$  UFC/lesão de *Candida reukaufii* (cepas 5L3, 10CL4, 10L2) e *C. pulcherrima* (10L8) isoladas da própria fruta. *Rhodotorula glutinis* LS-11 e *Cryptococcus laurentii* LS-28 reduziram significativamente a podridão causada por *B. cinerea*, *P. expansum*, *R. stolonifer* e *A. niger* em maçã, pêra, morango, kiwi e uva, com amplo espectro de atividade nas diferentes combinações dos patógenos, porém com baixa colonização na casca da maçã intacta (LIMA et al.,

1998). Castoria et al. (1997) observaram atividade antagônica devido à competição por nutrientes em *C. laurentii* LS-28 e *Rhodotorula glutinis* LS-11. A interação direta com a hifa do patógeno ocorreu apenas com células de LS-11, não se podendo afirmar o mesmo com LS-28, que foi o antagonista mais ativo. Todavia, este último produziu níveis mais elevados de atividade  $\beta$ -1,3-glucanase extracelular “in vitro”, na presença de *P. expansum* e *B. cinerea*.

O fato despertou atenção sobre a produção extracelular de glucanases e chitinases capazes de despolimerizar a parede celular de fungos patogênicos (CHET, 1987; LORITO et al., 1993, 1994; CASTORIA et al., 1997; JIJAKLI; LEPOIVRE, 1998; WOO et al., 1999). Em particular, descreveu-se atividade antagônica de *Pichia guilliermondii* Wicker relacionada com  $\beta$ -1-3-glucanase contra *B. cinerea* em frutas (WISNIEWSKI et al., 1991) e *P. anomala* (Hansen) Kurtzman contra *B. cinerea* no controle de fermentos em maçãs (JIJAKLI; LEPROIVE, 1998). O antagonismo de *Aureobasidium pullulans* (LS-30) contra *B. cinerea*, *P. expansum*, *Rhizopus stolonifer* e *A. niger* parece envolver competição por nutrientes, porém a detecção de exochitinase [N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (Nagase)] e  $\beta$ -1-3-glucanase extracelular “in vitro” e em fermentos de maçãs sugeriram atividade adicional dessas enzimas no efeito antagônico (CASTORIA et al., 2001).

Arras, Demontis e Sussarellu (1996) mostraram resultados satisfatórios contra *Penicillium digitatum* utilizando *Metschnikowia pulcherrima* (cepas 1A e 5A) isolada de figo e *Rhodotorula glutinis* (21A) de tomate, aplicados em laranja e limão artificialmente lesados, com média de inibição de 97,5% (1A), 97,0% (5A) e 92,8% (21A), permanecendo viáveis entre -15 e 60°C e pH 3 a 8.

*Candida maritima* (cepa LM-5) isolada de manga, com alta eficiência “in vitro” na inibição da germinação de esporos de *Lasioidiplodia theobromae* ( $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$  conídias/mL) também mostrou potencial promissor no biocontrole de doenças de fruto pós-colheita (MICHEREFF et al., 1997).

Fan e Tian (2001) obtiveram atividade antagonista ótima aplicando  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL de *Candida albidus* isolada de pêra contra  $1,0 \times 10^5$  esporos/mL (*B. cinerea*) e  $5 \times 10^4$  esporos/mL (*P. expansum*) em maçãs armazenadas a 23 e 1°C, sugerindo biocontrole por competição de nutrientes. Por outro lado, *C. albidus* (R89-212) isolada de folhas de pessegueiro controlou eficientemente a podridão em pêras (ROBERTS, 1990).

Conseqüentemente, no controle biológico de pós-colheita deve-se considerar diversos aspectos, desde a intensidade dos mecanismos de defesa natural à dose de antagonistas/substâncias antimicrobianas naturais aplicadas (MARI; GUIZZARDI, 1998). A resistência natural de frutas e legumes a doenças pós-colheita depende intimamente do processo de ruptura e perda da sensibilidade do tecido (MARI; GUIZZARDI, 1998; LIMA et al., 1999).

A característica inerente do hospedeiro é de grande valia nos estudos de controle biológico, uma vez que a resistência da epiderme e textura da polpa constituem importantes parâmetros na invasividade do patógeno (LIMA et al., 1999). Aliado ao fato, os antagonistas podem atuar no biocontrole de doenças pós-colheita de frutas através de mecanismos constituídos de competição por espaço e nutrientes (WILSON; WISNIEWSKI, 1989; DROBY; CHALUTZ; WILSON, 1991; DROBY; CHALUTZ, 1994; WILSON et al., 1994; CASTORIA et al., 1997; JANISIEWICZ; TWORKOSKI; SHARER, 2000), antibiose e ativação de defesas (WILSON; WISNIEWSKI, 1989; DROBY; CHALUTZ; WILSON, 1991; DROBY; CHALUTZ, 1994; WILSON et al., 1994; CASTORIA et al., 1997).

Aliado ao fato, o uso de conservantes durante o processamento industrial de frutas, capazes de preservar a qualidade dos produtos derivados tornou-se uma necessidade para garantir a saúde dos consumidores (LEITÃO, 1990). A efetividade do metabissulfito é um fato comprovado, com vantagem na capacidade de degradar a patulina (ROSS, 1995).

Além da degradação de patulina por compostos sulfurados, os estudos promissores mencionam outras alternativas com eventual utilidade, citando-se a detoxificação biológica efetuada pela microbiota presente no próprio fruto (HARWIG et al., 1973; ROSS, 1995; WALKER; MCLEOD; HODGSON, 1995; KARLOVSKY, 1999).

A observação sobre possível efeito degradador de micotoxinas associado ao biocontrole empregando leveduras torna-se bastante interessante, devido ao caráter inócuo de utilidade fermentativa milenar, onde se desconhecem linhagens naturalmente micotoxigênicas. Karlovsky (1999) citou a detoxificação de aflatoxinas, alternariol, ácido micofenólico, patulina e toxina PR durante os processos fermentativos. Harwig et al. (1973) eliminaram a patulina, submetendo o suco de maçã a fermentação de duas semanas por *Saccharomyces* spp. As leveduras destinadas a fabricação de cidras, constituídas de *S. cerevisiae* industriais, removeram eficientemente a patulina (BURROUGHS, 1977). O antagonismo de leveduras isoladas de maçã, mamão, pêra, silagem de milho e fermento comercial perante *Penicillium* spp. produtores de patulina reforçam os indicativos promissores, devendo-se ampliar a variabilidade do nicho ecológico para o estudo de antagonistas com atividade detoxificadora (ROSS-URBANO; HIROOKA; 1999; LEVY; HIROOKA, 1999).

Em suma, o controle biológico na pós-colheita realçou o potencial de microrganismos antagonistas, porém contra determinados patógenos e em hospedeiros específicos, não se podendo generalizar a aplicação para todos os produtos agrícolas (MARI; GUIZZARDI, 1998). Não obstante, os estudos visando identificação de antagonistas portadores de amplo espectro de atividade são promissores (MARI; GUIZZARDI, 1998), devendo-se efetuar ensaios preliminares perante diversos patógenos, em combinação com diferentes tipos de frutas (LIMA et al., 1999).

## Leveduras “Killer”

Determinadas cepas de leveduras apresentam o fator “killer”, capaz de inibir o crescimento de outros microrganismos. O fator é um peptídeo tóxico liberado no meio de cultivo, sendo detectado nos gêneros *Saccharomyces* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Debaryomyces* spp., *Hansenula* spp., *Kluyveromyces* spp., *Pichia* spp., *Torulopsis* spp. (PHILLISKIRK; YOUNG, 1975; YOUNG, 1982), *Ustilago* spp. (KANDEL; KOLTIN, 1978), *Rhodotorula* spp., *Trichosporon* spp. (MORACE et al., 1984), *Hanseniaspora* spp. (RADLER; PFEIFFER; DENNART, 1985), *Williopsis* spp., *Zygowilliopsis* spp. (KAZANTSEVA; ZIMINA, 1989) e *Zygosaccharomyces* spp. (RADLER et al., 1993).

Embora a maioria das informações sobre o caráter “killer” se concentre em toxinas codificadas por plasmídios, a exemplo de K1, K2 e K28 de *S. cerevisiae* (WICKNER, 1991; DIGNARD et al., 1991; TIPPER; SCHMITT, 1991), KP6 de *Ustilago maydis* (TAO et al., 1990; PEERY et al., 1987) e toxina “killer” de *Kluyveromyces lactis* (GUNGE et al., 1981; STARK; BOYD, 1986), pouco se conhece sobre a estrutura molecular de toxinas codificadas por cromossomos (SUZUKI; NIKKUNI, 1994). A expressão do fenótipo “killer” em linhagens de *Saccharomyces* spp. depende da presença de dois plasmídios RNA de fita dupla (plasmídios L e M), enquanto que em *Kluyveromyces lactis* decorre de dois plasmídios DNA. Considerando que plasmídios dsRNA ou dsDNA ocorreram apenas em algumas linhagens de *Saccharomyces* spp., *Kluyveromyces* spp. e *Pichia* spp., assumiu-se que o caráter de outros gêneros estejam associados a genes cromossomais (YOUNG, 1987) e RNA viral veiculado por micovírus (KASHIWAGI et al., 1997).

Todas as toxinas “killer” detectadas consistiram de proteínas ácidas com ponto isoelétrico aproximado de pH 4,0, sendo a maioria com massa molecular entre 10-20 kDa, exceto toxina de *K. lactis*, constituída de três subunidades polipeptídicas (27,5,

30 e 99 kDa) (RADLER et al., 1993). As diferenças entre as toxinas “killer” baseiam-se nas informações armazenadas no ácido nucléico e em modificações pós-translacionais, oriundas de glicosilação (RADLER et al., 1993).

Embora o fenômeno “killer” em leveduras tenha sido descoberto em 1963 (BEVAN; MAKOWER, 1963), pouco se conhece ainda sobre o mecanismo de ação (DE LA PEÑA et al., 1981; SCHMITT et al., 1989; RADLER et al., 1993). As evidências indicaram atuação na membrana de células sensíveis, reduzindo o pH intracelular e causando conseqüente extravasamento de íons potássio e ATP, entre outros (DE LA PEÑA et al., 1981; MARTINAC et al., 1990). O transporte de aminoácidos e a bomba de prótons também foram inibidos (SKIPPER; BUSSEY, 1977), sendo que todos os efeitos citados constituíram no indicativo de aumento na permeabilidade do próton em células sensíveis (DE LA PEÑA et al., 1981).

Muitas toxinas de leveduras são glicoproteínas formadoras de prótons capazes de originar canais iônicos (MARTINAC et al., 1990), resultando em desestabilização do potencial eletroquímico da membrana e eventual morte celular. A toxina produzida por *K. lactis* interrompeu a fase G1 do ciclo celular (BUTLER et al., 1991), enquanto que a de *Williopsis saturnus* var. *mraikii* inibiu a síntese de  $\beta$ -1-3-glucano (YAMAMOTO et al., 1986) e de *S. cerevisiae* inibiu a síntese de DNA (SCHMITT et al., 1989).

A atividade “killer” em meios de cultura é expressa sob condições ácidas (pH 3-6), com maior atuação em pH 4-5 (WOODS; BEVAN, 1968; MIDDELBECK; HERMANS; STUMM, 1979) e entre 15-20°C, podendo ser inativa em temperaturas superiores (VUSTIN et al., 1989 apud GOLUBEV, 1998).

A aplicabilidade de leveduras “killer” e respectivas toxinas têm sido incorporadas em diversas pesquisas (WALKER; MCLEOD; HODGSON, 1995), inclusive no estudo da regulação de biossíntese polipeptídica em eucariotos (SOSSIN; FISHER;

SCHELLER, 1989). A técnica de DNA recombinante transferiu com sucesso, os plasmídeos “killer” pGKL1 e pGKL2 de *Kluyveromyces lactis* para *K. fragilis* e *Candida pseudotropicalis*, resultando em linhagens produtoras de quantidades maiores de toxina “killer”, supostamente constituída de glicopeptídeo (SUGISAKI et al., 1985). Na indústria fermentativa, leveduras com caráter “killer” combatem cepas de leveduras selvagens deteriorantes, indesejáveis durante o processamento de cerveja (YOUNG, 1981), vinho (HARA; IMURA; OTSUKA, 1980; BOONE et al., 1990) e pão (BORTOL et al., 1986).

A constatação da letalidade do fator “killer” em determinadas linhagens de leveduras perante fungos filamentosos ampliou ainda mais as perspectivas de aplicação, i.e., também sob o ponto de vista de biocontrole dos fitopatógenos e bolores deteriorantes de alimentos (JACOBS; VAN VUOREN, 1991).

Walker, Mcleod e Hodgson (1995) realizaram os trabalhos pioneiros, nos quais constatou-se a susceptibilidade de fungos filamentosos deteriorantes às leveduras “killer”. *S. cerevisiae* enquadrou-se entre os agentes com maior potencial antagônico, cuja exposição causou vacuolização da hifa e pigmentação do micélio, indicando lise celular (WALKER; MCLEOD; HODGSON, 1995). Salienta-se ainda a capacidade degradadora de patulina em determinadas leveduras, contemplando-a com fator bastante desejável além de antibiose (MOSS, 1996; LEVY et al., 2000).

Pesquisas mostrando indícios do aumento na produção de fator “killer” pela concentração salina (SUZUKI; NIKKUNI, 1994; KASHIWAGI et al., 1997), ou composição do meio (PANCHAL et al., 1985), aliada a recente caracterização molecular reforçam as perspectivas para o desenvolvimento de um novo elemento do controle biológico visando aplicação no campo. Panchal et al. (1985) obtiveram aumento na atividade “killer” (50 para 90%) de *K. lactis* contra a linhagem sensível *S. cerevisiae*, em ágar nutriente-peptona-extrato de levedura-glicose

contendo galactose, maltose ou glicerol como fontes de carbono, em pH 6,5. O aumento da concentração de NaCl (4-12%) induziu uma maior expressão na atividade “killer” em leveduras halotolerantes (KAGIYAMA et al., 1988; SUZUKI et al., 1989). Assim, 2 M de NaCl maximizou a atividade da toxina SMK (“salt-mediated-killer toxin”) produzida por *Pichia farinosa* KK1 contra determinadas linhagens de *S. cerevisiae* e *Zygosaccharomyce rouxii* (SUZUKI et al., 1989). Esta característica produzida em leveduras halotolerantes (KAGIYAMA et al., 1988) é desejável para o controle de leveduras selvagens durante a fermentação com sal, a exemplo da produção de shoyu (SUZUKI; NIKKUNI, 1994).

### Biofilmes

As tendências de mercado orientadas para o consumo de frutas e hortaliças minimamente processadas definem o processamento mínimo como manejo, desinfecção, embalagem e distribuição de produtos agrícolas sem alterar as características iniciais de produto fresco (GARCIA; MARTINO; ZARITZKY, 2000). Medidas são tomadas para facilitar a comercialização de frutas, no sentido de aumentar a vida de prateleira através de resfriamento (SANTOS, 1997) e desenvolvimento de atmosfera controlada, utilizando filmes plásticos biodegradáveis (HAN et al., 1985). Estes reduzem perda de água e velocidade de respiração, controlando a velocidade da migração de oxigênio e gás carbônico, cujo efeito de “atmosfera modificada” estende a validade e qualidade de alimentos (ZHUANG et al., 1996).

Outrossim, estas medidas normalmente resultam na alteração no microambiente circundante, sendo imprescindível as conseqüências perante qualidade e segurança alimentar, em consideração à diversidade microbiana presente em frutas. Cuidados especiais referem-se a frutos frescos expostos ao transporte e armazenagem, cujo “stress” pode gerar condições que favoreçam a proliferação de determinados grupos microbianos (HARISSON, 1989). Neste aspecto, a incorporação de compostos bioativos inócuos por

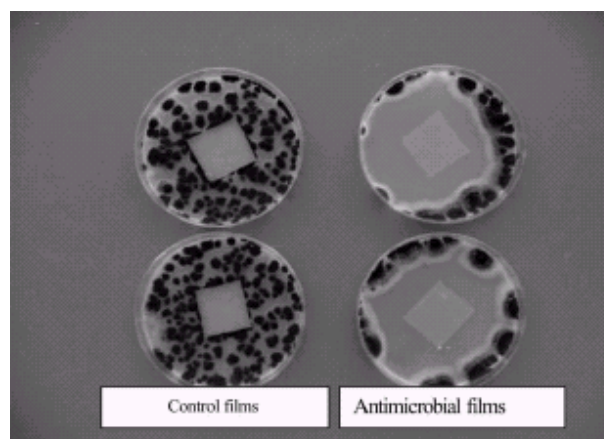
aspersão ou biofilmes aponta perspectivas promissoras para o uso de leveduras no biocontrole de fungos deteriorantes/micotoxigênicos.

A escolha do material utilizado na formulação dos filmes é de importância fundamental, já que as interações entre os componentes do material interferem nas propriedades de barreira, mecânicas e sensoriais dos revestimentos (BALDWIN, 1994). Uma variedade de polissacarídeos e derivados tem sido testada para o uso potencial em filmes comestíveis e/ou biodegradáveis, incluindo alginatos, pectinas, gomas, celulose e derivados, amidos e amidos modificados (KESTER; FENNEMA, 1986).

O celofane, um dos primeiros filmes plásticos biodegradáveis, consistiu de material flexível, transparente e com boas propriedades mecânicas, porém sensível à umidade (JENKINS; HARRINGTON, 1991). Entre as primeiras embalagens biodegradáveis comercializadas citam-se os materiais desenvolvidos combinando amido nativo (5-20%) com polímeros sintéticos, porém a decomposição restringia a fragmentação em moléculas menores de biodegradabilidade discutível no meio ambiente (GUILBERT; GONTARD, 1995). Nos últimos anos, o interesse concentra-se no desenvolvimento de materiais termoplásticos compostos essencialmente de amido, envolvendo apenas a adição de plastificantes compatíveis para melhorar as propriedades mecânicas (SOUZA; ANDRADE, 2000). A continuidade na pesquisa sobre caracterização das propriedades funcionais de biofilmes a base de amido é importante, por ser uma matéria-prima abundante na natureza com inúmeras possibilidades de modificação química, física ou genética capazes de conferir as mais variadas propriedades mecânicas aos revestimentos (GARCIA; MARTINO; ZARITZKY, 2000; SOUZA; ANDRADE, 2000; CHANG; CHEAH; SEOW, 2000).

Com o intuito de inovar a inibição de crescimento microbiano em alimentos minimamente processados, os estudos avançaram para o emprego de revestimentos adicionados de compostos com

propriedades antimicrobianas (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002). A Figura 1 mostra a efetividade “in vitro” (método de difusão em ágar) do filme antimicrobiano contra *Aspergillus niger*, simulando o que poderia ocorrer “in vivo” em alimentos.



**Figura 1.** Efeito do filme plástico antimicrobiano sobre *Aspergillus niger*. Fonte: Appendini e Hotchkiss (2002).

Os antimicrobianos GRAS (geralmente reconhecidos como seguros) e os naturais têm sido incorporados em papel e termoplásticos, conforme apresentado na Tabela 2 (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

Entre os produtos, os “silver substituted zeolites” são amplamente utilizados como aditivos em polímeros na embalagem alimentar, especialmente no Japão. Os íons de sódio presentes em “zeolites” são substituídos por íons prata e incorporados na proporção de 1-3% em polietileno, polipropileno e “nylon”, conferindo amplo espectro de ação contra bactérias e bolores (BRODY; KLINE; STRUPINSKY, 2001).

Outros compostos potencialmente incorporados em polímeros são: enzimas (lactoperoxidase e lactoferina), peptídeos (magainina, cecropina), fenóis naturais (hidroquinonas e catequinas) e ésteres de ácidos graxos (HOTCHKISS, 1997), incorporados a 0,1-5% (p/p) particularmente nos filmes (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

**Tabela 2.** Antimicrobianos incorporados em polímeros utilizados em embalagens para alimentos.

<b>Antimicrobianos</b>	<b>Polímero/carreador</b>	<b>Atuação</b>
<b>Ácidos orgânicos/anidridos:</b> Propiônico, benzóico, sórbico, acético, láctico e málico	Filmes comestíveis EVA*, LLDPE*	Bolores
<b>Gases inorgânicos:</b> Dióxido de enxôfre, dióxido de cloro	Várias poliolefinas	Bolores, bactérias e leveduras
<b>Metais:</b> prata	Várias poliolefinas	Bactérias
<b>Fungicidas:</b> benomil, imazalil	LDPE*	Bolores
<b>Bacteriocinas:</b> nisina, pediocina, lacticina	Filmes comestíveis, celulose, LDPE	Bactérias Gram-positivas
<b>Enzimas:</b> lisosima, glicose oxidase	Acetato celulose, poliestireno, filmes comestíveis	Bactérias Gram-positivas
<b>Quelantes:</b> EDTA	Filmes comestíveis	Bactérias Gram-negativas
Ácidos cinâmico, caféico e ñ-comáricos	"Nylon"/polietileno, celulose	Bolores, leveduras e bactérias
<b>Óleos essenciais:</b> Extrato de semente de uva	LDPE, celulose	Bolores, leveduras e bactérias
<b>Parabens:</b> Propilparaben, etilparaben	Celulose LDPE	Bolores
<b>Outros:</b> Hexametil-enetetramina	LDPE	Leveduras

\*EVA (acetato de vinil etileno); LLDPE (polietileno linear de baixa densidade); LDPE (polietileno de baixa densidade).  
Fonte: Appendini e Hotchkiss (2002).

Polímeros catiônicos constituídos de quitosana e poli-L-lisina promoveram adesão celular, causando o extravasamento de constituintes celulares (GOLDBERG; DOYLE; ROSENBERG, 1990). Embora o efeito antimicrobiano de quitosana seja atribuído à propriedade antifúngica, supõe-se que atue como barreira entre os nutrientes do alimento e os fungos deteriorantes de vegetais e frutos frescos (CUQ; GONTARD; GUILBERT, 1995). El Ghaouth et al. (1991) observaram modificação de atmosfera interna em adição a propriedades fungistáticas em revestimentos à base de quitosana, prolongando a vida útil de morango.

### Considerações Finais

As perspectivas abertas para a incorporação de compostos antagonistas inócuos à saúde humana apontam a utilização de leveduras antagonistas no controle de fungos deteriorantes/micotoxigênicos em frutas tropicais e subtropicais. A ampla inocuidade de leveduras demonstrada nos processos

fermentativos, aliada ao caráter “killer” são fatores atraentes que enfatizam a potencialidade da interação benéfica deste grupo microbiano no biocontrole. As alternativas surgem sob aplicação por aspersão ou biofilmes em revestimentos biodegradáveis e/ou comestíveis à base de polissacarídeos, na conservação de produtos minimamente processados, submetidos a armazenagem sob refrigeração. A substituição de fungicidas químicos tradicionais por substâncias antagonistas naturais constitui fator favorável na aceitação de produtos agrícolas no mercado externo, em termo de segurança alimentar e qualidade durante a armazenagem, permitindo alcançar melhores patamares na pauta das exportações.

### Agradecimentos

À CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.

## Referências

- ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M.R.; CABAÑES, F.J. Current importance of Ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.64, n.6, p.903-906, 2001.
- ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.60, p.2650-2652, 1994.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MAÇÃ. *Relatório Anual*, 2002. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br>>. Acesso em: 14 ago. 2002.
- APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, New York, v.3, p.113-126, 2002.
- ARRAS, G.; DEMONTIS, S.; SUSSARELLU, L. Characterization of yeasts (*Pichia guilliermondii* and *Rhodotorula glutinis*) antagonistic to *Penicillium digitatum*. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, Milano, v.46, n.2, p.285-298, 1996.
- ARRAS, G.; DE CICCO, V.; ARRU, S.; LIMA, G. Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, Kent, v.73, n.3, p.413-418, 1998.
- BALDWIN, E. A. Edible coatings for fruits and vegetables, past, present and future. In: KROCHTA, J.M.; BALDWIN, E. A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Lancaster: Technomic Publishing, 1994. p.25-64.
- BEUCHAT, L.R. (ed.). *Food and Beverage Mycology*, 2.ed. New York: Van Nostrand Reinbold, 1987.
- BEVAN, E. A.; MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. In: International Congress of Genetics, 11., 1963, Florença. *Proceedings...* Florença: [s.n.], 1963. v.1, p.202-203
- BISSESSUR, J.; PERMAUL, K.; ODHAV, B. Reduction of patulin during apple juice clarification. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.64, n.8, p.1216-1219, 2001.
- BLUNDEN, G.; ROCH, O.G.; ROGERS, D.J.; COKER, R.D.; BRADBURN, N.; JOHN, A.E. Micotoxins in food. *Medical Laboratory Sciences*, London, v.48, n.4, p.271-282, 1991.
- BOONE, C.; SDICU, A.M.; WAGNER, J.; DEGRE, R.; SANCHEZ, C.; BUSSEY, H. Integration of the yeast k1 killer toxin gene into the genome of marked wine yeasts and its effect on vinification. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, v.41, n.1, p.37-42, 1990.
- BORTOL, A.; NUDEL, C.; FRAILE, E.; DE TORRES, R.; GIULIETTI, A.; SPENCER, J.F.T.; SPENCER, D. Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v.24, n.5, p.414-416, 1986.
- BRACKEET, R.E. *Microbial quality*. Post harvest handling. A system approach, 1993.
- BRACKETT, R. E.; MARTH, E. H. Patulin in apple juice from roadside stands in Wisconsin. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.42, p.862-863, 1979.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil deve iniciar exportação de manga para o Japão em junho. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/pls/pubacs\\_cons/ap\\_detalhe\\_noticia\\_cons?p\\_id\\_publicacao=3536](http://extranet.agricultura.gov.br/pls/pubacs_cons/ap_detalhe_noticia_cons?p_id_publicacao=3536)> Acesso em: 9 jul. 2002.
- BRODY, A.L.; KLINE, L.; STRUPINSKY, G. *Active packaging for food applications*. Boca Raton : CRC Press, 2001
- BUCHANAN, J. R.; SOMMER, N.F.; FORTLAGE, R.J. Production of patulin by *Penicillium expansum*. *Applied Microbiology*, Washington, v.28, n.3, p.589-593, 1974.
- BURDA, K. A. Research Note: Incidence of patulin in apple, pear, and mixed fruit-products marketed in New South Wales. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.55, n.10, p.796-798, 1992.
- BURROUGHES, L. F. Stability of patulin to sulfur dioxide and to yeast fermentation. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, v.60, n.1, p.100-103, 1977.
- BUSBY JR., W.F.; WOGAN, G.N. Ochratoxins. In: SHANK, R.C. (Ed.). *Mycotoxins and N-itoso compounds: environmental risks*. Boca Raton: CRC Press, 1981. p.129-136.
- BUTLER, A. R.; O'DONNELL, R. W.; MARTIN, V. J.; GOODAY, G. W.; STARK, M. J. *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. *European Journal of Biochemistry/FEBS*, Berlin, v.199, n.2, p. 483-488, 1991.
- CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; DE CICCO, V. beta-1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v.12, n.3, p.293-300, 1997.
- CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; CAPUTO, L.; PACIFICO, S.; DE CICCO, V. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v.22, p.7-17, 2001.

- CHANG, Y.P.; CHEAH, P.B.; SEOW, C.C. Plasticizing - antiplasticizing effects of water on physical properties of tapioca starch films in the glassy state. *Journal of Food Science*, Chicago, v.65, n.3, p.445-451, 2000.
- CHET, I. Trichoderma-Application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: CHET, I. (Ed.). *Innovative approaches to plant disease control*. New York: John Wiley & Sons, 1987. p.137-160.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Edible films and coatings as active layers. In: ROONEY, M.L. (Ed). *Active food packaging*. London: Chapman & Hall, 1995. p.111-142.
- DE LA PEÑA, P.; BARROS, F.; GASCÓN, S.; LAZO, P.S.; RAMOS, S. Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v.256, n.20, p.10420-10425, 1981.
- DIGNARD, D.; WHITEWAY, M.; GERMAIN, D.; TESSIER, D.; THOMAS, D. Y. Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. *Molecular & General Genetics: MGG*, New York, v.227, n.1, p.127-136, 1991.
- DROBY, S.; CHALUTZ, E. Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. In: WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E. (Ed.). *Biological control of postharvest diseases-theory and practice*. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.63-75.
- DROBY, S.; CHALUTZ, E.; WILSON, C.L. Antagonistic microorganisms as biocontrol agents of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Postharvest News and Information*, Wallingford, v.2, p.169-173, 1991.
- ECKERT, J. W., EAKS, I. L. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. In: REUTHER, W.; CALAVAN, E.C.; CARMAN, G.E. (Ed.). *The citrus industry*. Berkeley: University of California Press, 1989. v. 4, p. 179-260.
- ECKERT, J.W.; OGAWA, J.M. The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 23, p. 421-454, 1985.
- ECKERT, J. W., SIEVERT, J. R., RATNAYAKE, M. Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packinghouses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*. *Plant Disease*, Saint Paul, v.78, p.971-974, 1994.
- EL GHAOUTH, A. E.; ARUL, J.; PONNAMPALAM, R.; BOULET, M. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Food Science*, Chicago, v.56, n.6, p.1618-1620, 1991.
- FALLIK, E.; GRINBERG, S.; GAMBOURG, M.; KLEIN, J.D.; LURIE, S. Pre-storage heat treatment reduces pathogenicity of *Penicillium expansum* in apple fruit. *Plant Pathology*, Oxford, v.45, n.1, p.92-97, 1996.
- FAN, Q.; TIAN, S. Postharvest biological control of grey mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v.21, p.341-350, 2001.
- FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION. Título. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 14 ago. 2002.
- FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION. FOOD AND NUTRITION PAPER. *Manuals of food quality control-traiting in mycotoxins analysis*. Local, 1990. v.10
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Título. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-micr.html>>. Acesso em: 14 ago. 2002.
- FLORIANOWICZ, T. Antifungal activity of some microorganisms against *Penicillium expansum*. *European Food Research Technology*, Berlin, v.212, n.3, p.282-286, 2001.
- FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. Specific mycotoxin producing *Penicillium* and *Aspergillus* mycoflora of different foods. *Mycotoxins and Phycotoxins*, n.1, p.163-166, 1988.
- FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. *Terverticillate Penicillia*: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia*, New York, v.81, p.837-861, 1989.
- FUNDAÇÃO CARGILL. *Relatório Anual*. São Paulo, 1983.
- FURLANI, R.P.Z.; VALENTE SOARES, L.M. Ocratoxina A em café. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v.1/2, n.2, p.1-6, 1999.
- GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N.E. Microstructural characterization of plasticized starch-based films. *Starch/Stärke*, Weinheim, v.52, n.4, p.118-124, 2000.
- GOLDBERG, S.; DOYLE, R.; ROSENBERG, M. Mechanism of enhancement of microbial cell hydrophobicity by cationic polymers. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.172, n.10, p.5650-5654, 1990.
- GOLDBLATT, L.A. Mycotoxins-Past, present and future. *Journal American Oil Chemists Society*, Chicago, v.54, p.302a-310a, 1977.
- GOLUBEV, W. I. Mycocins: killer toxins. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J.W. *the yeasts, a taxonomic study*. 4.ed. Amsterdam: Elsevier, 1998, cap.8.
- GUILBERT, S.; GONTARD, N. Technology and applications of edible protective films. In: BIOTECHNOLOGY AND FOOD RESEARCH, 6., 1995, Helsink. *Preceeding...* Helsink: [s.n.], 1995. p.49-60.
- GUINEBRETIERE, M. H.; NGUYEN-THE, C.; MORRISON, N.; REICH, M.; NICOT, P. Isolation and characterization of antagonists for the biocontrol of the postharvest wound pathogen *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.63, n.3, p.386-394, 2000.



- GUNGE, N.; TAMARU, A.; OZAWA, F.; SAKAGUCHI, K. Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.145, n.1, p.382-390, 1981.
- HAN, D. S.; HWANG, I.Y.; PARK, K H.; SHIN, H. K. Modified atmosphere storage of Fuji apples in polyethylene films. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, London, v.18, p.335-338, 1985.
- HARA, S.; IMURA, Y.; OTSUKA, K. Breeding of useful killer wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, v.31, p.28-33, 1980.
- HARISSON, M.A. Presence and stability of patulin in apple product: a review. *Journal of Food Safety*, Westport, v.9, p.147-153, 1989.
- HARWIG, J.; CHEN, Y.K.; KENNEDY, B.P.C.; SCOTT, P.M. Occurrence of patulin and patulin-producing strains of *Penicillium expansum* in natural rots of apple in Canada. *Journal/ Canadian Institute of Food Science and Technology*, Ottawa, v. 6, n.1, p. 22-25, 1973.
- HEERDEN, I. VAN; CRONJÉ, C.; SWART, S.H.; J.M. Microbial, chemical, and physical aspects of citrus waste composting. *Bioresource Technology*, Essex, v.81, p.71-76, 2002.
- HESELTIME, C.W.; VANDERGRAFT, E.E.; FENNEL, D. I.; SHOTWELL, O. L. Aspergilli as ochratoxin producers. *Mycologia*, New York, v.64, p.539-550, 1972.
- HOTCHKISS, J. Food packaging interactions influencing quality and safety. *Food Additives and Contaminants*, London, v.14, n.6/7, p.601-607, 1997.
- HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, Limerick, v.167, n.2, p.101-134, 2001.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. *Ochratoxin A*. In: \_\_\_\_\_. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Geneva, 1993. p.489-521.
- IBGE. *Anuário estatístico*, 1998. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br> >. Acesso em: 10 ago. 2002.
- IBGE. *Anuário estatístico*, 2001. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br> >. Acesso em: 10 ago. 2002.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. *Novos horizontes para a fruticultura brasileira*. Disponível em: < <http://www.ibraf.org.br> >. Acesso em: 10 jan. 2002.
- JACOBS, C.J. ; VAN VUOREN, H.J.J. Effects of different "killer" yeast on wine fermentations. *Journal of Amsterdam Society Brewing*, Amsterdam, v.42, n.4, p.295-299, 1991.
- JANISIEWICZ, W.J. Biological control of pathogens affecting temperate fruit crops. In: SINCOBIOL, 5., 1996, Foz do Iguaçu. *Anais...* 1996. Foz do Iguaçu, 1996. p.43-48.
- JANISIEWICZ, W. J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.40, p.411-441, 2002.
- JANISIEWICZ, W. J.; PETERSON, D. L.; BORS, R. Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. *Plant Disease*, Saint Paul, v.78, n.5, p.466-470, 1994.
- JANISIEWICZ, W. J.; TWOROSKI, T. J.; SHARER, C. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology*, Saint Paul, v.90, n.11, p.1196-1200, 2000.
- JANISIEWICZ, W.J.; CONWAY, W.; GLENN, M.; SAMS, C. Integrating biological control and calcium treatment for controlling postharvest decay of apples. *Hortscience*, Alexandria, v.33, n.1, p.105-109, 1998.
- JELINEK, C. F.; PHOLAND, A. E.; WOOD, E. E. Worldwide occurrence of mycotoxins on foods and feeds-an update. *Journal of AOAC*, Washington, v.72, n.2, p.223-230, 1989.
- JENKINS, W. A.; HARRINGTON, J. P. The chemistry and manufacture of polymers used in packaging. *Packaging foods with plastics*. Lancaster: Technomic publishing, 1991. p.35-36.
- JIJAKLI, M. H.; LEPOIVRE, P. Characterization of an exo-b-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology*, Saint Paul, v.88, p.335-343, 1998.
- KAGIYAMA, S.; AIBA, T.; KADOWAKI, K.; MOGI, K. New killer toxins of halophilic *Hansenula anomala*. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, v.52, n.1, p.1-7, 1988.
- KANDEL, J.; KOLTIN, Y. Killer phenomenon in *Ustilago maydis*: comparison of killer proteins. *Experimental Mycology*, New York, v.2, p.270-278, 1978.
- KARLOVSKY, P. Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Natural Toxins*, New York, v.7, n.1, p.1-23, 1999.
- KASHIWAGI, T.; KUNISHIMA, N.; SUZUKI, C.; TSUCHIYA, F.; NIKKUNI, S.; ARATA, Y.; MORIKAWA, K. The novel acidophilic structure of the killer toxin from halotolerant yeast demonstrates remarkable folding similarity with a fungal killer toxin. *Structure*, Philadelphia, v.5, n.1, p.81-94, 1997.
- KAZANTSEVA, D. I.; ZIMINA, M. S. Yeast killer strains with a broad spectrum of action: a search among collection strains and preliminary classification. *Mikrobiologija*, Moskva, v.58, n.2, p.291-297, 1989.

- KESTER, J. J.; FENNEMA, O. Edible films and coating: a review. *Food Technology*, Chicago, v. 40, n.12, p. 47-59, 1986.
- KHURDIYA, D. S. Non-thermal methods for preservation of fruits and vegetables: A critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology*, Mysori, v.32, n.6, p.441-452, 1995.
- KRETZSCHMAR, A. A. Controle biológico de patógenos que ocorrem em pós colheita. In: BETTIOL, W. (Ed.). *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPDA, 1988. Cap 5, p. 53-70.
- KRYGER, R.A. Volatility of patulin in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v.49, n.8, p.4141-4143, 2001.
- LACEY, J. Factors affecting mycotoxin production. In: STEYN, P. S.; VLEGGAR, R. *Micotoxins and Phycotoxins*. [S.l.]: Elsevier, 1986. p.64-75.
- LEITÃO, M. F. F. Conservadores em alimentos e fatores que afetam sua eficiência no controle de microrganismos. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.20, n.9, p.116-127, 1990.
- LEONI, L. A. B.; FURLANI, R. P. Z.; VALENTE SOARES, L. M.; OLIVEIRA, P. L. C. Ochratoxin A in brazilian green coffee. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.21, n.1, p.105-107, 2001.
- LEVY, R.M.; HIROOKA, E. Y. Detoxificação de patulina por leveduras antagonistas a *Penicillium* spp. *Unopar Científica-Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v.1, n.1, p.57-62, 1999.
- LEVY, R. M.; SILVA, R. S. F.; PAGNOCCA, F. C.; HIROOKA, E. Y. Ensaio fatorial da atividade inibitória de *Penicillium* por leveduras em frutos de maçã. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v.3, n.47, p.145-150, 2000.
- LIMA, G.; ARRU, S.; DE CURTIS, F.; ARRAS, G. Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Hampshire, v.23, n.3, p.223-229, 1999.
- LIMA, G.; DE CURTIS, F.; CASTORIA, R.; DE CICCO, V. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. *Biocontrol Science and Technology*, Oxford, v.8, n.2, p.257-267, 1998.
- LINDROTH, S.; NISKANEM, A. Comparison of potential patulin hazard in home-made and commercial apple products. *Journal of Food Science*, Chicago, v.43, p.446-448, 1978.
- LORITO, M.; HAYES, C.K.; DI PIETRO, A.; WOO, S.L.; HARMAN, G.E. Purification, characterization and synergistic activity of a glucan 1,3-b-glucosidase and an N-acetyl-b-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 4, p.398-405, 1994.
- LORITO, M.; HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; BROADWAY, R. M.; TRONSMO, A.; WOO, S. L.; DI PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, Saint Paul, v.83, p.302-307, 1993.
- MACHUCA, M.N. *Aspectos gerais da cultura de macieira no estado de Aomori-Japão*. Florianópolis: [s.n.], 1988. 90 p.
- MARI, M.; GUIZZARDI, M. The postharvest phase: Emerging technologies for the control of fungal diseases. *Phytoparasitica*, Bet Dagan, v.26, n.1, p.59-66, 1998.
- MARTINAC, B.; ZHU, H.; KUBALSKI, A.; ZHOU, X.; CULBERTSON, M.; BUSSEY, H.; KUNG, C. Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Cell Biology*, Madison, v.87, p.6228-6232, 1990.
- MASCARENHAS, P.; BEHERE, A.; SHARMA, A.; PADWALDESAI, S.R. Postharvest spoilage of mango (*Mangifera indica*) by *Botryodiplodia theobromae*. *Mycological Research*, Cambridge, v.100, n.1, p.27-30, 1995.
- MCDONALD, J. C. Toxicity, analysis, and production of aspergillic acid and its analogues. *Canadian Journal of Biochemistry*, Ottawa, v.51, n.9, p.1311-1315, 1973.
- MICHEREFF, S. J.; SILVA, J. B.; SILVEIRA, N. S. S.; PEDROSA, R. A.; MARIANO, R. L. R.; TAVARES, L. A.; TAVARES, S. C. C. H. Postharvest biocontrol of *Lasiodiplodia* rot of mango fruits by saprophytic yeasts. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, v.40, n.1, p.29-37, 1997.
- MIDDELBEEK, E. J.; HERMANS, J. M. H.; STUMM, C. Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri*, killer toxin. *Antonie van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v.45, n.3, p.437-450, 1979.
- MORACE, G.; ARCHIBUSSI, C.; SESTITO, M.; POLONELLI, L. Strain differentiation of pathogenic yeasts by the killer system. *Mycopathology*, Den Haag, v.84, p.81-85, 1984.
- MOSS, M. O. Mode of formation of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, London, v.13, suppl. 5/9, 1996a.
- MOSS, M.O. Mycotoxins. *Mycological Research*, Cambridge, v.100, n.5, p.513-523, 1996b.
- MOTOMURA, M.; HIROOKA, E. Y. Método rápido para o isolamento de microrganismos de solo com atividade antifúngica sobre *Fusarium moniliforme*. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, v.39, n.2, p.313-322, 1996.

- MOTOMURA, M.; SUWA, S.; HIROOKA, E.Y. Biological control: microbial *versus* chemical fungicide on the growth of rice infected with *Fusarium moniliforme*. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.28, n.1, p.11-16, 1997.
- NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, H.; UENO, Y. Survey of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food and Agricultural Immunology*, Norwich, v.9, p.77-83, 1997.
- NELSON, K.E. *Harvesting and handling California table grapes for market*. Oakland: DANR Publications, 1979.
- NORTHOLT, M. D.; VANEGMOND, H. P.; PAULSCH, W. E. Patulin production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.41, n.11, p.885-890, 1978.
- NUNES, C.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; VIÑAS, I. Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.70, n.1/2, p.53-61, 2001.
- ONO, E.Y.S.; HIROOKA, E.Y. *Hazards of Fusarium verticillioides, a mycotoxigenic fungus*. Local: editora, 2002.
- ONO, H.; KATAOKA, A.; KOAKUTSU, M.; TANAKA, K.; KAWASUGI, S.; WAKAZANA, M.; UENO, Y.; MANABE, M. Ochratoxin A producibility by strains of *Aspergillus niger* group sotred in IFO (Institute for Fermentation, Osaka) culture collection. *Mycotoxins*, n.41, p.47-51, 1995.
- PANCHAL, C.J.; MEACHER, C.; VAN OOSTROM, J.; STEWART, G.G. Phenotypic expression of *Kluyveromyces lactis* killer toxin against *Saccharomyces* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.50, n.2, p.257-260, 1985.
- PERRY, M.J.; MAKINS, J.F.; ADLARD, M.W.; HOLT, G. Aspergillic acids produced by mixed cultures of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, London, v.130, pt 2, p.319-323, 1984.
- PEERY, T.; SHABAT-BRAND, T.; STEINLAUF, R.; KOLTIN, Y.; BRUENN, J. Virus-encoded toxin of *Ustilago maydis*: two polypeptides are essential for activity. *Molecular and Cellular Biology*, Washington, v.7, n.1, p.470-477, 1987.
- PHILLISKIRK, G.; YOUNG, T. W. The occurrence of killer character in yeasts of various genera. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v.41, n.2, p.147-151, 1975.
- PICCI, G. Micotossine. Aspectii microbiologici e tossicologici. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, Milano, v.42, n.1, p.35-47, 1992.
- PRIETA, J.; MORENO, A.; DÍAZ, S.; SUAREZ, G.; DOMINGUEZ, L. Survey of patulin in apple juice and children's apple food by the diphasic dialysis membrane procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v.42, p.1701-1703, 1994.
- RADLER, F.; PFEIFFER, P.; DENNART, M. Killer toxins in new isolates of the yeast *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kluyveri*. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v.19, n.269-272, 1985.
- RADLER, F.; HERZBERGER, S.; SCHONIG, I.; SCHWARZ, P. Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailli*. *Journal of General Microbiology*, London, v.139, n.495-500, 1993.
- REZENDE, J. A. M.; FANCELLI, M.I. Doenças de mamoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, A.; BERGAMIN FILHO, A. B.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). *Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2, Cap.46, p.261-297.
- ROBERTS, R.G. Biological control of mucor rot of pear by *Cryptococcus laurentii*, *C. flavus* and *C. albidus*. *Phytopathology*, Saint Paul, v.80, p.1051, 1990.
- ROLAND, J. O.; BEUCHAT, L. R. Biomass and patulin production by *Byssoschamys nivea* in apple juice affected by sorbate, benzoate, SO<sub>2</sub> and temperature. *Journal of Food Science*, Chicago, v.49, p.402-406, 1984.
- ROSS, G. *Patulina: parâmetros que influem na produção, detoxicação e considerações sobre microbiota fúngica em maçã (Malus domestica Borkhausen)*. 1995. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- ROSS, G.; HIROOKA, E.Y. *Patulin: factors affecting production and risk of contamination through consume of apple (Malus domestica B.) cultivar Gala and Fuji*. Rome: IUPAC, 1996. 296p.
- ROSS-URBANO, G.; HIROOKA, E.Y. Aspectos Relevantes sobre Riscos da Produção de Patulina em Maçã. *Semina*, Londrina, v.20, n.1, p.79-86, 1999.
- ROSS-URBANO, G.; TANIWAKI, M.H.; LEITÃO, M.F.; VICENTINI, M.C. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw Brazilian coffee. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.64, n.8, p.1226-1230, 2001.
- ROSS-URBANO, G.; TANIWAKI, M.H.; SABINO, M.; VIZONI, T.; HIROOKA, E.Y. Produção de patulina em maçã (*Malus domestica* Borkhausen), cultivares Gala e Fuji inoculadas com *Penicillium* spp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.18, n.1, p.63-67, 1998.
- SANDERSON, P.G.; SPOTTS, R.A. Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 85, n. 1, p. 103-110, 1995.

- SANHUEZA, R. M.; KRETZCHMAR, A. A.; BORSÓI, M. Avaliação de organismos antagonísticos a *Penicillium expansum* em maçãs cv. Fuji em pós colheita. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.17, n.4, 1992.
- SANTOS, A.M. Cultivo de pequenas frutas, em regiões de clima temperado no Brasil, sob cobertura plástica. In: FORO INTERNACIONAL DE CULTIVO PROTEGIDO, 1997, Botucatu. *Anais...Botucatu (SP): Unesp*, 1997, p.168-174.
- SCHMITT, M.J.; BRENDEL, M.; SCHWARZ, R.; RADLER, F. Inhibition of DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by yeast killer toxin KT28. *Journal of General Microbiology*, London, v.135, p.1529-1535, 1989.
- SCOTT, P. M. Analysis of agricultural commodities and foods for Alternaria mycotoxins. *Journal of AOAC International*, Arlington, v.84, n.6, p.1809-1817, 2001.
- SCOTT, P. M.; MILES, W. F.; TOFT, P.; DUBE, J. G. Occurrence of patulin in apple juice. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, v.20, p.450-451, 1972.
- SEBRAE. Título. Disponível em: < <http://www.sebrae.com.br> >. Acesso em: 14 ago. 2002.
- SIMÃO, S. *Tratado de fruticultura*. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998.
- SITTON, J. W.; PATTERSON, M. E. Effect of high-carbon dioxide and low oxygen controlled atmospheres on postharvest decays of apples. *Plant Disease*, Saint Paul, v.76, p.992-995, 1992.
- SKIPPER, N.; BUSSEY, H. Mode of action of yeast toxins: energy requirement for *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.129, n.2, p.668-677, 1977.
- SOSSIN, W. S.; FISHER, J. M. SCHELLER, R. H. Cellular and molecular biology of neuropeptide processing and packaging. *Neuron*, Cambridge, v.2, p.1407-1417, 1989.
- SOUZA, R. C. R.; ANDRADE, C. T. Investigação dos processos de gelatinização e extrusão de amido de milho. *Polímeros*, São Carlos, v.10, n.1, p.24-30, 2000.
- SRINIVAS, R. N.; REDDY, T. V.; RAVI, P. C.; LALITH, A.; REDDY, B. V.C. Postharvest loss assessment of 'Totapuri' and 'Alphonso' mangoes. *Journal of Food Science and Technology*, Mysori, v.34, n.1, p.70-72, 1997.
- STARK, M. J. R.; BOYD, A. The killer toxin of *Kluyveromyces lactis*: characterization of the toxin subunits and identification of the genes which encode them. *The EMBO Journal*, Oxford, v.5, n.8, p.1995-2002, 1986.
- STEIMAN, R.; EIGLE, M.L.S.; KRIVOBOK, S. Production of patulin by Micromycetes. *Mycopathologia*, Den Haag, v.105, p.129-133, 1989.
- STOTT, W.T.; BULLERMAN, L.B. Influence of carbohydrate and nitrogen source on patulin production by *Penicillium patulum*. *Applied Microbiology*, Washington, v.30, n.5, p.850-854, 1975.
- STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food and Chemical Toxicology*, Elmsford, v.33, n.5, p.341-355, 1995.
- SUGAR, D.; SPOTTS, R. A. Control of postharvest decay in pear by four laboratory-grown yeasts and two registered biocontrol products. *Plant Disease*, Saint Paul, v.83, n.2, p.155-158, 1999.
- SUGAR, D.; ROBERTS, R. G.; HILTON, R. J.; RIGHETTI, T. L.; SANCHEZ, E. E. Integration of cultural methods with yeast treatment for control of postharvest fruit decay in pear. *Plant Disease*, Saint Paul, v.78, n.7, p.791-795, 1994.
- SUGISAKI, Y.; GUNGE, N.; SAKAGUCHI, K.; YAMASAKI, M.; TAMURA, G. Transfer of DNA killer plasmids from *Kluyveromyces lactis* to *Kluyveromyces fragilis* and *Candida pseudotropicalis*. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.164, p.1373-1375, 1985.
- SUZUKI, C.; NUKKUNI, S. The primary and subunit structure of a novel type killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v.269, n.4, p.3041-3046, 1994.
- SUZUKI, C.; YAMADA, K.; OKADA, N. NIKKUNI, S. Isolation and characterization of halotolerant killer yeasts from fermented foods. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, v.53, p.2593-2597, 1989.
- SWEENEY, M. J.; WHITE, S.; DOBSON, A. D.W. Mycotoxins in agriculture and food safety. *Irish Journal of Agriculture and Food Research*, Dublin, v.39, p.235-244, 2000.
- SYDENHAM, E. W.; VISMER, H. F.; MARASAS, W. F.; BROWN, N. L.; SCHLECHTER, M.; RHEEDER, J. P. The influence of deck storage and initial processing on patulin levels in apple juice. *Food Additives and Contaminants*, London, v.14, n. 5, p.429-434, 1997.
- TAO, J.; GINSBERG, I.; BANERJEE, N.; HELD, W.; KOLTIN, Y.; BRUENN, J.A. *Ustilago maydis* KP6 killer toxin: structure, expression in *Saccharomyces cerevisiae*, and relationship to other cellular toxins. *Molecular and Cellular Biology*, Washington, v.10, n.4, p.1373-1381, 1990.
- TANIWAKI, M. H.; BLEINROTH, E. W.; MARTIN, Z. J. Bolores produtores de patulina em maçã e suco industrializado. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.19, n.1, p.42-49, 1989.

- TAVARES, S.C.C. H. Controle biológico clássico de patógenos de frutas no Brasil - Situação atual. In: SINCOBIOL, 5., 1996, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu, 1996. p.57-68, 1996.
- TEIXIDO, N.; USALL, J.; VINAS, I. Efficacy of preharvest and postharvest *Candida sake* biocontrol treatments to prevent blue mould on apples during cold storage. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.50, n.3, p.203-210, 1999.
- TÉREN, J.; VARGA, J.; HAMARI, Z.; RINYU, E.; KEVEI, F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, Den Haag, v.134, p.171-176, 1996.
- TIPPER, D. J.; SCHMITT, M. J. Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. *Molecular Microbiology*, Salém, v.5, n.10, p.2331-2338, 1991.
- TRUCKSESS, M. W.; GILER, J.; YOUNG, K.; WHITE, K. D.; PAGE, S. W. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, v.82, n.1, p.85-89, 1999.
- UBOLDI EIROA, M.N. Microrganismos deteriorantes de sucos de frutas e medidas de controle. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.23, n.3-4, p.141-160, 1989.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. *National Toxicology Program technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A in F344/N rats*. New York: National Institutes of Health, 1996.
- USALL, J.; TEIXIDO, N.; TORRES, R.; DE ERIBE, X.O.; VINAS, I. Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v.21, n.2, p.147-156, 2001.
- VARGA, J.; KEVEI, F.; RINYU, E.; TÉREN, J.; KOZAKLEWICZ. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environment Microbiology*, Washington, v.60, p.4461-4464, 1996.
- WALKER, G.; MCLEOD, A.; HODGSON, V. Interactions between killer yeast and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology*, Amsterdam, v.127, p.213-222, 1995.
- WATKINS, K. L.; FAZERAS, G.; PALMER, M.V. Patulin in Australian apple juice. *Food Australia*, North Sydney, v.42, n.9, p.438-439, 1990.
- WORLD HEALTH ORGANISATION. Evaluation of certain food additives and contaminants. *Forty-fourth report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Geneva, 1996. (WHO Technical Report Series, n.859).
- WICKNER, R.B. The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. In: BROACH, J.R.; PRINGLE, J.R.; JONES, E.W. (Ed.). Título. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992. v.1
- WILSON, D. M.; NUOVO, G. J. Patulin production in apples decayed by *Penicillium expansum*. *Applied Microbiology*, Washington, v.26, p.124-125, 1973.
- WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M.E. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.27, p.425-441, 1989.
- \_\_\_\_\_. *Biological control of postharvest plant diseases of fruits and vegetables: theory and practice*. Boca Raton: CRC Press, 1994.
- WILSON, C. L.; EL GHAOUTH, A.; CHALUTZ, E.; DROBY, S.; STEVENS, C.; LU, J. Y.; KHAN, V.; ARUL, J. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plant Disease*, Saint Paul, v.78, p.837-844, 1994.
- WISNIEWSKI, M. E.; WILSON, C.L. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. *HortScience*, Alexandria, v.27, p.94-98, 1992.
- WISNIEWSKI, M. E.; BILES, C.; DROBY, S.; McLAUGHLIN, R.; WILSON, C.L.; CHALUTZ, E. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to Botrytis cinerea. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v.39, p.245-258, 1991.
- WOO, S. L.; DONZELLI, B.; SCALA, F.; MACH, R.; HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P.; DEL SORBO, G.; LORITO, M. Disruption of the ech42 (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* strain P1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, St. Paul, v.12, p.419-429, 1999.
- WOODS, D. R.; BEVAN, E.A. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, London, v.51, n.1, p.115-126, 1968.
- YAMAMOTO, T.; HIRATANI, T.; HIRATA, M.; IMAI, K.; YAMAGUCHI, H. Killer toxin from *Hansenula mrakii* selectivity inhibits cell wall synthesis in sensitive yeast. *FEBS Letters*, Amsterdam, v.197, n.1-2, p.50-54, 1986.

YOUNG, T. W. The genetic manipulation of killer character into brewing yeast. *Journal of Institute Brewing*, London, v.87, p.292-295, 1981.

\_\_\_\_\_. The properties of brewing performance of brewing yeasts possessing killer character. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Saint Paul, v.42, p.1-4, 1982.

\_\_\_\_\_. Killer yeasts. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J. S. *The Yeasts*. New York: Academic Press, 1987. p.131-164.

ZHUANG, R.; BEUCHAT, L.R.; CHINNAN, M.S.; SHEWFELT, R.L; HUANG, Y.W. Inactivation of *Salmonella* monteideo on tomatoes by applying cellulose based edible films. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.59, n.8, p.808-812, 1996.