



VYTÓRIA PISCITELLI CAVALCANTI

**BIOLOGICAL CONTROL OF *Sclerotinia sclerotiorum* BY YEAST AND *Bacillus* spp.
IN *Allium sativum* L. AND ITS EFFECT ON THE BIOACTIVE COMPOUNDS
CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY**

**LAVRAS - MG
2018**

VYTÓRIA PISCITELLI CAVALCANTI

**BIOLOGICAL CONTROL OF *Sclerotinia sclerotiorum* BY YEAST AND *Bacillus* spp. IN
Allium sativum L. AND ITS EFFECT ON THE BIOACTIVE COMPOUNDS CONTENT
AND ANTIOXIDANT ACTIVITY**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares para obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Joyce Dória Rodrigues
Orientadora

Prof. Dr. Smail Aazza
Coorientador

**LAVRAS - MG
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Cavalcanti, Vytória Piscitelli.

Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by yeast and *Bacillus* spp. in *Allium sativum* L. and its effect on the bioactive compounds content and antioxidant activity / Vytória Piscitelli Cavalcanti. - 2018.

107 p. : il.

Orientador(a): Joyce Dória Rodrigues.

Coorientador(a): Smail Aazza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Medicinal plants. 2. Biological control. 3. Bioactive compounds. I. Rodrigues, Joyce Dória. II. Aazza, Smail. III. Título.

VYTÓRIA PISCITELLI CAVALCANTI

BIOLOGICAL CONTROL OF *Sclerotinia sclerotiorum* BY YEAST AND *Bacillus* spp. IN *Allium sativum* L. AND ITS EFFECT ON THE BIOACTIVE COMPOUNDS CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum* POR LEVEDURAS E *Bacillus* spp. EM *Allium sativum* L. E SEU EFEITO NO TEOR DE COMPOSTOS BIOATIVOS E NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de fevereiro de 2018.

Dr. Smail Aazza

UFLA/Prof. visitante estrangeiro

Dr.^a Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada

UEM

Profa. Dra. Joyce Dória Rodrigues
Orientadora

AGRADECIMENTOS

À minha família e amigos, pelo apoio e conforto oferecidos nesta importante etapa de minha vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Joyce Dória Rodrigues, e ao meu coorientador, Prof. Dr. Smail Aazza, pelo apoio emocional, conhecimentos transmitidos e confiança depositada na realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade e estrutura fornecida para a realização dos experimentos, especialmente ao Departamento de Agricultura (DAG) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP).

Ao Setor de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, especialmente ao Laboratório de Fitoquímica e Controle de Qualidade, pelas condições oferecidas para realização de grande parte do trabalho.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto e à subcoordenadora, Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci, por me acolherem e permitirem a realização deste mestrado, que me proporcionou grandes aprendizados de vida.

A todos os professores que eu tive o prazer de conhecer durante a realização do mestrado, pelo apoio técnico e pelo saber transmitido, que despertam em mim cada vez maior interesse no trabalho com plantas medicinais e aplicação de práticas sustentáveis.

Ao setor de Microbiologia Agrícola do Departamento de Biologia (DBI) pelo fornecimento dos microorganismos para realização dos experimentos.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras, (<http://www.prp.ufla.br/labs/microscopiaeletronica/>) e a FINEP, FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo fornecimento dos equipamentos e suporte técnico para experimentos envolvendo microscopia eletrônica.

À CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado, à FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Neilton Antonio Fiusa Araújo pela ajuda na realização do trabalho e pelas experiências que me proporcionaram grande evolução pessoal e profissional.

À Luisa Bastos Domingos pelos conhecimentos fornecidos e pela disponibilidade e boa vontade em me ajudar, contribuindo para a conclusão desse trabalho.

Às turmas dos laboratórios, que me acompanharam e encorajaram na realização do mestrado, com quem compartilhei grandes aprendizados e boas risadas!

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum* POR LEVEDURAS E *Bacillus* spp. EM *Allium sativum* L. E SEU EFEITO NO TEOR DE COMPOSTOS BIOATIVOS E NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

RESUMO GERAL

O ataque de fitopatógenos pode influenciar a produção de metabólitos secundários, assim como o uso de agentes de biocontrole, uma vez que podem atuar através da indução de resistência, provocando aumentando na produção de metabólitos secundários relacionados à resposta de defesa, como tiosulfatos e compostos fenólicos no alho. Estes metabólitos atuam como antioxidantes e antifúngicos, protegendo o alho do fitopatógeno e do estresse oxidativo gerado durante a infecção. O aumento na produção destes metabólitos é desejável, assim como o uso de métodos extrativos eficientes para sua obtenção. Nesse contexto, objetivou-se (1) avaliar o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* por leveduras e *Bacillus* spp. *in vitro* e *in vivo* no alho; (2) otimizar o processo de extração de compostos fenólicos totais (TPC) e tiosulfatos (TS) e verificar a capacidade antioxidante total (TAC) usando design de misturas; (3) avaliar o efeito da interação planta x fitopatógeno e microorganismos antagonistas no teor de TPC e TS e na atividade antioxidante. Foi verificado o efeito de metabólitos antifúngicos voláteis e difusíveis sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* *in vitro* e avaliado o diâmetro da lesão em bulbilhos de alho tratados com suspensões de cada levedura e bactéria (10^8 células/ml), inoculados com o fitopatógeno e mantidos em câmara úmida por 15 dias. As extrações foram realizadas por sonicação utilizando alho seco e pulverizado. Para otimização extrativa foi utilizado o design estatístico de misturas simples-axial design (SAD) e o central composite design (CCD), para avaliar o efeito dos solventes água, etanol e acetona, bem como misturas destes solventes, em três tempos de extração (15, 30 e 45 min) no teor de TPC e TS e na TAC. À partir do método extrativo otimizado, foram feitos os extratos com os bulbilhos do experimento de controle biológico para verificar os efeitos das interações planta x microorganismos no teor de TPC e TS e na atividade antioxidante (TAC, atividade de eliminação de radicais livres DPPH, capacidade de absorver o radical oxigênio - ORAC, poder redutor e poder quelante). Foi observada maior inibição no crescimento de *S. sclerotiorum* pelos metabólitos voláteis produzidos por *Bacillus pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. macauenses* e *Candida labiduridarum*, variando entre 74,61-87,61%, e pelos metabólitos difusíveis produzidos por *B. amyloliquefaciens* (84%). A redução na área afetada pela doença foi mais expressiva nos bulbilhos de alho tratados com *B. pumilus* (86,74%) e *C. labiduridarum* (61,47%). Eletromicrografias mostraram colonização superficial dos bulbilhos por todos os microorganismos testados e a colonização das hifas do patógeno por *Pichia kudriavzevii*, *B. acidiceler* e *B. amyloliquefaciens*. Na otimização extrativa, 30 minutos foi tempo suficiente para extrair quantidades significativas de TPC e TS do alho por sonicação e o maior teor de TPC e TS e CAT foram obtidos utilizando água/acetona (80:20). A maior quantidade de TPC foi observada no alho tratado com *Saccharomyces cerevisiae* e de TS com *Bacillus amyloliquefaciens* e *Acidithiobacillus ferrooxidans*. O *Bacillus macauenses* mostrou o melhor poder de quelação e atividade antioxidante medida por DPPH e TAC, enquanto que *Bacillus pumilus* e *Bacillus acidiceler* apresentaram a melhor ORAC.

Palavras-chave: alho; fitopatógeno; agentes de biocontrole; compostos fenólicos; tiosulfatos; atividade antioxidante.

BIOLOGICAL CONTROL OF *Sclerotinia sclerotiorum* BY YEAST AND *Bacillus* spp. IN *Allium sativum* L. AND ITS EFFECT ON THE BIOACTIVE COMPOUNDS CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY

ABSTRACT

Phytopathogen attack may influence the production of secondary metabolites related to plant defense, as well as biocontrol agents application, since they can act through induction of resistance, promoting an increase in the production of secondary metabolites related to defense response, such as thiosulfinates and phenolic compounds in garlic. These act as antioxidants and antifungals, protecting the garlic from the phytopathogen and the oxidative stress generated during the infection. The increase of these metabolites is desirable, even as the use of efficient extractive methods to obtain them. In this context, the objective was (1) to evaluate the control of *Sclerotinia sclerotiorum* by yeasts and *Bacillus* spp. *in vitro* and *in vivo* in garlic; (2) to optimize the extraction process of total phenolic compounds (TPC) and thiosulfinates (TS) and verify the total antioxidant capacity (TAC) using mixture design; (3) to evaluate the effect of plant x phytopathogen and antagonistic microorganisms interaction on the content of TPC and TS and antioxidant activity. The effect of volatile and diffusible antifungal metabolites on mycelial growth of *S. sclerotiorum* was evaluated *in vitro* and the lesion diameter in garlic cloves treated with suspensions of each yeast and bacteria (10^8 cells/ml), inoculated with the phytopathogen and kept in a moist chamber for 15 days. Extractions were performed by sonication using dry and pulverized garlic. For extractive optimization it was used the statistical mixture design of simple-axial design (SAD) and the central composite desing (CCD), to evaluate the effect of solvents water, ethanol and acetone, as well as mixtures of these solvents, in three extraction times (15, 30 and 45 min) in TPC and TS content and TAC. From the optimized extraction the extracts were carried out with the garlic cloves of the biological control experiment to verify the effects of the plant x microorganisms interactions on the content of TPC and TS and on the antioxidant activity (TAC, free radical scavenging activity DPPH, ability to absorb oxygen radical - ORAC, reducing power and chelating power). A higher inhibition was observed in the growth of *S. sclerotiorum* by the volatile metabolites produced by *Bacillus pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. macauenses* and *Candida labiduridarum*, ranging from 74.61-87.61%, and by the diffusible metabolites produced by *B. amyloliquefaciens* (84%). The reduction in the area affected by the disease was more significant in garlic cloves treated with *B. pumilus* (86.74%) and *C. labiduridarum* (61.47%). Electromicrographs showed surface colonization of garlic cloves by all microorganisms tested and the colonization of the hyphae of the pathogen by *Pichia kudriavzevii*, *B. acidiceler* and *B. amyloliquefaciens*. In the optimization, the extraction for 30 min was sufficient to extract TPC from the garlic by sonication and the highest content of TPC and TS and CAT were obtained using water / acetone (80:20). The highest amount of TPC was observed in garlic treated with *Saccharomyces cerevisiae* and TS with *Bacillus amyloliquefaciens* and *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Bacillus macauenses* showed the best chelation power and antioxidant activity measured by DPPH and TAC, while *Bacillus pumilus* and *Bacillus acidiceler* presented the best ORAC.

Keywords: garlic; phytopathogen; biocontrol agents; phenolic compounds; thiosulfinates; antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1.1	Escleródio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> formando apotécio nas raízes de <i>Allium sativum</i>	15
Figura 1.2	Esquema da biossíntese dos tiosulfatos no alho.....	28
Figura 1.3	Esquema da biossíntese dos compostos fenólicos nas plantas.....	29
Figura 1.4	Controle de fitopatógenos e obtenção de metabólitos secundários de interesse através da indução de respostas de defesa na planta por agentes de biocontrole.....	31

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Figura 2.1	Esquema de montagem das placas para avaliação dos metabólitos antifúngicos voláteis.....	45
Figura 2.2	Esquema de montagem da placa para avaliação dos metabólitos antifúngicos difusíveis.....	46
Figura 2.3	Inibição do crescimento (%) da colônia de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> através da produção de metabólitos antifúngicos voláteis e difusíveis.....	48
Figura 2.4	Desenvolvimento da colônia de <i>S. sclerotiorum</i> em placa de Petri em conjunto com os microorganismos antagonistas.....	49
Figura 2.5	Ilustração do experimento de produção de metabólitos antifúngicos no controle biológico de <i>Sclerotinia sclerotiorum in vitro</i>	51
Figura 2.6	Percentual de redução na área afetada pela doença causada por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em bulbilhos de <i>Allium sativum</i> tratados com diferentes microorganismos antagonistas.....	51
Figura 2.7	Ilustração do experimento de avaliação dos microorganismos no controle biológico de <i>Sclerotinia sclerotiorum in vivo</i>	52
Figura 2.8	Eletromicrografias de varredura da interação de leveduras e <i>Bacillus</i> com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em bulbilhos de alho.....	53

ARTIGO 2

Figure 3.1	Simplex axial design (SAD).....	68
Figure 3.2	Response surfaces of effect of different times and solvents (A: water, B: ethanol, C: acetone) of extraction on total phenolic compounds.....	70
Figure 3.3	Response surfaces of effect of different times and solvents (A: water, B: ethanol, C: acetone) of extraction on thiosulfates.....	70
Figure 3.4	Cubic response surface for different extraction times (A1:15 min, A2: 30 min, A3: 45min) and contour plot (B1: 15 min, B2: 30 min, B3 45min) for total phenolic compounds (TPC) yields.....	73
Figure 3.5	Analysis of pareto chart of the standardized effects for TPC.....	76
Figure 3.6	Cubic response surface for diferents extraction times (A1: 15 min, A2: 30 min, A3: 45min) and contour plot (B1:15 min, B2: 30 min, B3: 45min) for thiosulfates yields.....	77
Figure 3.7	Standardized ($p < 0.05$) pareto chart representing the estimated effects of parameters and parameter interactions on thiosulfates recovery.....	79
Figure 3.8	Cubic response surface (A) and contour plot (B) for total antioxidants activity.....	81

Figure 3.9	Standardized ($p < 0.05$) pareto chart representing the estimated effects of parameters and parameter interactions on antioxidant activity.....	81
ARTIGO 3		
Figure 4.1	Lesion diameter (mm) of <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> in garlic cloves treated with different antagonistic microorganisms.....	93
Figure 4.2	Surface plot of lesion diameter (mm) against thiosulfinates ($\mu\text{mol/g}$ dry plant) and total phenolic compounds (TPC) (mg EAG/g dry plant).....	94
Figure 4.3	Thiosulfinates (TS) ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DGC) and total phenolic compounds (TPC) (mg EAG g^{-1} DGC) contents in garlic from different treatments.....	96
Figure 4.4	Percentage variation in antioxidant activities of different treatments in relation to the negative control.....	97
Figure 4.5	Dynamic curves from an ORAC assay for (A) Trolox antioxidant standards and (B) garlic extracts of different treatments.....	100
Figure 4.6	Reducing power of diferents treatment extracts.....	102
Figure 4.7	Reducing power of Ascorbic Acid (AA).....	102

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1.1	Alterações nos compostos bioativos e nutricionais das plantas por microorganismos.....	24
Tabela 1.1	Alterações nos compostos bioativos e nutricionais das plantas por microorganismos (continuação).....	25

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 2.1	Microorganismos utilizados, com seus devidos substrato e local de origem.....	44
Tabela 2.2	Diâmetro da lesão (mm) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em bulbilhos de alho tratados com diferentes microorganismos.....	51

ARTIGO 2

Table 3.1	Compositions of extraction mixtures, total phenolic compounds (TPC) and thiosulfates (TS) contents.....	71
Table 3.2	Analysis of variance (ANOVA) results for the mixture models.....	74
Table 3.2	Analysis of variance (ANOVA) results for the mixture models (continuation).....	75
Table 3.3	Compositions of extraction mixtures and total antioxidant activity (TAC)....	80

ARTIGO 3

Table 4.1	Microorganisms used, with their due substrate and site of origin.....	88
Table 4.2	Description of the treatments codes used in results.....	89
Table 4.3	Total antioxidant capacity – TAC (mg AAE g ⁻¹ DGC), Oxygen radical absorbance capacity – ORAC (mg TE g ⁻¹ DGC) and Reducing power (mg AAE g ⁻¹ DGC) from different treatments.....	98
Table 4.4	DPPH (IC ₅₀ , mg mL ⁻¹) and Chelating power (IC ₅₀ , mg mL ⁻¹) from different treatments.....	103

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	12
1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	A cultura do alho.....	13
2.2	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	15
2.3	Controle biológico de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	17
2.3.1	Leveduras.....	17
2.3.2	<i>Bacillus</i> spp.	19
2.4	Interações planta x patógeno e os agentes de controle biológico.....	21
2.5	Influência de microorganismos na composição fitoquímica.....	22
2.6	Fatores que alteram a composição fitoquímica do alho.....	25
2.7	Compostos bioativos do alho e sua atividade antioxidante.....	27
2.7.1	Tiosulfinafos.....	27
2.7.2	Compostos fenólicos.....	28
2.7.3	Atividade antioxidante.....	30
2.8	Perspectivas da aplicação de leveduras e <i>Bacillus</i> spp. no controle de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em <i>Allium sativum</i>	31
	REFERÊNCIAS.....	32
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	41
	ARTIGO 1 – CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> EM <i>Allium sativum</i> L. POR LEVEDURAS E <i>Bacillus</i> spp.	32
1	INTRODUÇÃO.....	43
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1	Obtenção e cultivo dos microorganismos antagonistas e do fitopatógeno.....	44
2.2	Produção de metabólitos antifúngicos voláteis.....	45
2.3	Produção de metabólitos antifúngicos difusíveis.....	46
2.4	Avaliação de leveduras e <i>Bacillus</i> spp. no controle de <i>S. sclerotiorum</i> em alho...	46
2.5	Microscopia eletrônica de varredura.....	47
2.6	Avaliação dos resultados.....	48
3	RESULTADOS.....	48
4	DISCUSSÃO.....	54
5	CONCLUSÃO.....	58
	AGRADECIMENTOS.....	58
	REFERÊNCIAS.....	58
	ARTIGO 2 – MIXTURE DESIGN OPTIMIZATION OF GARLIC EXTRACTION TO OBTAIN PHENOLIC COMPOUNDS, THIOSULFINATES AND TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY	63
1	INTRODUCTION.....	65
2	MATERIAL AND METHODS.....	66
2.1	Extraction procedure and sample preparation.....	66
2.2	Total phenolic compounds (TPC).....	66
2.3	Total antioxidant activity/Phosphomolybdenum assay (TAC).....	66
2.4	Determination of thiosulfinafos (TS).....	67
2.5	Evaluation of solvent effects by simplex-axial design (SAD).....	67
2.6	Statistical analysis.....	68

3	RESULTS AND DISCUSSION.....	69
3.1	Effect of time and solvent mixture composition in TPC and TS extraction.....	69
3.2	Mixture designs.....	72
3.2.1	Total phenolic compounds (TPC).....	72
3.2.2	Thiosulfinates (TS).....	76
3.2.3	Total antioxidant activity (TAC)	79
4	CONCLUSION.....	82
	REFERENCES.....	82
	ARTIGO 3 - BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY	
	OF <i>Allium sativum</i> L. WITH YEAST AND BACTERIA IN <i>Sclerotinia</i>	
	<i>sclerotiorum</i> CONTROL.....	85
1	INTRODUCTION.....	87
2	MATERIAL AND METHODS.....	88
2.1	Biocontrol of <i>S. sclerotiorum</i> by yeasts and bacteria in garlic.....	88
2.2	Extracts preparation.....	89
2.3	Determination of total phenolic compounds (TPC)	89
2.4	Determination of thiosulfinates (TS).....	90
2.5	Antioxidant activities.....	90
2.5.1	Total antioxidant activity (TAC)	90
2.5.2	Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)	91
2.5.3	Reducing power.....	91
2.5.4	DPPH free radical scavenging activity.....	92
2.5.5	Chelating power.....	92
2.6	Statistical analysis.....	93
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	93
3.1	Lesion diameter.....	93
3.2	Total phenolic compounds (TPC).....	95
3.3	Thiosulfinates (TS).....	95
3.4	Antioxidant activities.....	96
3.4.1	Total antioxidant activity (TAC).....	98
3.4.2	Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)	98
3.4.3	Reducing power.....	101
3.4.4	DPPH free radical scavenging activity.....	102
3.4.5	Ferrous ion chelating power.....	103
4	FINAL CONSIDERATIONS.....	104
	REFERENCES.....	105

1 INTRODUÇÃO

O alho (*Allium sativum* L.) é um importante representante da família Alliaceae, espécie já cultivada há muito tempo, sendo bastante requisitado por apresentar propriedades medicinais reconhecidas cientificamente. Trata-se de uma hortaliça abundante em amido e substâncias aromáticas de alto valor condimentar e medicinal, sendo também utilizada como fitoterápico devido às suas diversas propriedades farmacológicas (RESENDE; HABER; PINHEIRO, 2015; SOUZA, R. J.; MACÊDO, 2009).

As propriedades farmacológicas do alho estão relacionadas à produção de metabólitos secundários, como os compostos organossulfurados responsáveis pelo seu forte odor característico, que atuam na defesa contra insetos e fitopatógenos (KUSANO et al., 2016). Entre estes, pode-se destacar a alicina, que é um tiosulfinato responsável pela ação antibiótica, antiviral e antifúngica (BORLINGHAUS et al., 2014; CURTIS et al., 2004; SILVA et al., 2010). Apresenta também elevados teores de compostos fenólicos, destacando-se os flavonoides quercetina, apigenina e miricetina (LANZOTTI, 2006). Os compostos organossulfurados, como os tiosulfatos, e fenólicos estão diretamente relacionados à atividade antioxidante do alho (KIM; KUBOTA; KOBAYASHI, 1997; LANZOTTI, 2006; NUUTILA et al., 2003; WANG et al., 2015) sendo esta extremamente importante pela capacidade de reduzir ou prevenir a oxidação de outras moléculas em alimentos e sistemas biológicos, auxiliando na manutenção da qualidade dos alimentos, aumentando seu tempo de prateleira, e prevenindo o estresse oxidativo responsável pelos danos celulares, protegendo o organismo de diversas doenças, como câncer, doenças inflamatórias e cardiovasculares e arteriosclerose (BOROSKI et al., 2015).

Os metabólitos secundários desempenham importante função na interação entre as plantas e o ambiente, sendo, portanto, fortemente influenciados pelas variáveis ambientais, sejam estas abióticas, como a disponibilidade hídrica, temperatura e luminosidade, ou bióticas, como herbivoria e ataque de fitopatógenos (GOUVEA et al., 2016).

A cultura do alho apresenta diversos fitopatógenos, entre eles o *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo branco, um fungo necrotrófico generalista e cosmopolita, com mais de 500 hospedeiros, que ataca principalmente plantas herbáceas e leva a perdas substanciais na produção agrícola em todo o mundo a cada ano (BOLAND; HALL, 1994; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; JACCOUD FILHO et al., 2017). Neste contexto, surge a demanda por métodos para controlar os fitopatógenos, de preferência sem a necessidade do uso de agroquímicos, destacando-se o controle biológico e a indução de

resistência como eficientes medidas complementares, sendo a aplicação de microorganismos antagonistas uma ótima estratégia.

Assim como o ataque de fitopatógenos influencia na produção de metabólitos secundários nas plantas, o uso de leveduras e bactérias para a indução de resistência também compartilha este princípio, pois o alho pode aumentar a produção de metabólitos, como compostos fenólicos e tiosulfatos, que irão protegê-lo do ataque dos patógenos, aumentando sua resistência. Portanto, na hipótese do uso de leveduras e bactérias do gênero *Bacillus* para o controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* no alho (*Allium sativum* L.) é desejável saber se ocorrem alterações no teor de metabólitos secundários da planta e se estas alterações são de interesse biológico e econômico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do alho

O alho (*Allium sativum* L.) é uma espécie de hortaliça originária da Ásia, pertencente à família Alliaceae (RESENDE; HABER; PINHEIRO, 2015; SOUZA, R. J.; MACÊDO, 2009). O Brasil é um grande importador de alho “*in natura*”, chegando essa importação a cerca de 17 mil toneladas em 2016, correspondente a 26,9 milhões de dólares, enquanto a sua produção, no mesmo ano, foi de aproximadamente 130.407 toneladas em uma área de 11.334 ha, com produtividade de 11,5 t/ha, exportando entre janeiro e agosto de 2016 cerca de 274 kg com valor de 829,00 dólares (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2005; FAGUNDES, 2016; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2016; MOROZINI et al., 2005). O Brasil também exporta o alho em pó, atingindo exportação de 7,0 toneladas, cerca de 18,9 mil dólares, até agosto de 2016 (FAGUNDES, 2016).

Trata-se de uma planta medicinal utilizada desde a antiguidade no tratamento de várias doenças nos seres humanos, tendo como principais atividades biológicas: o combate às infecções, a capacidade de baixar a pressão arterial e o colesterol, a prevenção ao câncer; além de ser empregada como antibiótica, antifúngica, antiviral, anti-helmíntica, antidiabética, antioxidante, hepatoprotetora, anti-inflamatória e na cicatrização de feridas (BORLINGHAUS et al., 2014; CORZO-MARTÍNEZ; CORZO; VILLAMIEL, 2007; GARCÍA GÓMEZ; SÁNCHEZ-MUNIZ, 2000; LONDHE et al., 2011; YEH; LIU, 2001).

Tais propriedades medicinais citadas anteriormente, assim como suas aplicações para fins alimentícios e agrícolas, no controle de pragas e doenças, ocorrem devido à sua

composição fitoquímica, sendo encontrados a alicina e os tiosulfatos, que são responsáveis por grande parte das propriedades medicinais do alho, como as atividades antibiótica, antiviral e antifúngica, anticancerígena, antioxidante, hipotensora, redução da síntese de colesterol endógeno e inibição da agregação plaquetária (BORLINGHAUS et al., 2014); a aliina, que está associada ao efeito hipotensor e hipoglicemiante (GARCÍA GÓMEZ; SÁNCHEZ-MUNIZ, 2000); o ajoeno, utilizado para a prevenção de coágulos, além do efeito anti-inflamatório, vasodilatador, hipotensor e antibiótico (CORZO-MARTÍNEZ; CORZO; VILLAMIEL, 2007); o S-alilcisteína, que auxilia no efeito hipocolesterolemia do alho (YEH; LIU, 2001); a adenosina, que é vasodilatadora, hipotensora e miorelaxante (GARCÍA GÓMEZ; SÁNCHEZ-MUNIZ, 2000); o fructano, relacionado à atividade cardioprotetora (GARCÍA GÓMEZ; SÁNCHEZ-MUNIZ, 2000); a inulina, polissacarídeo de reserva que age como fibra alimentar e prebiótico (DALONSO et al., 2009); além de vitaminas A, B e C, proteínas, sais minerais, entre outros (SILVA et al., 2010), sendo os bulbilhos a parte mais utilizada por ser o local em que os constituintes ativos estão em maior quantidade (CHAGAS et al., 2012).

A ocorrência de fitopatógenos é um fator que pode depreciar a qualidade do produto, que é de extrema importância para sua comercialização, sendo fundamental o controle da presença e manifestação de pragas e doenças em todo o processo produtivo, uma vez que podem provocar reduções tanto na produção agrícola, quanto na qualidade do alho (MOURA et al., 2013).

A fim de evitar a podridão branca (*Sclerotium cepivorum*), muitos produtores estão adiantando aproximadamente um mês a data de plantio do alho (28 de janeiro e 15 de fevereiro), uma vez que nesse período os solos são mais quentes do que no tempo tradicional de plantio (15 de março a 15 de abril), sendo desfavorável ao desenvolvimento do fitopatógeno (PINTO et al., 2000). Porém, a condição quente e úmida é favorável ao desenvolvimento de outros fitopatógenos, como é o caso do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, que é uma espécie generalista causadora de doenças em mais de 500 espécies em todo o mundo, sendo considerado um dos patógenos de plantas mais devastadores e cosmopolitas (BOLAND; HALL, 1994; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; JACCOUD FILHO et al., 2017). Como o alho é uma espécie hospedeira do *S. sclerotiorum* (BOLAND; HALL, 1994; JACCOUD FILHO et al., 2017), o seu plantio em condições que favorecem o crescimento desse patógeno pode propiciar a ocorrência de danos na cultura do alho (Figura 1.3), além de permitir a manutenção deste fungo no solo sustentando a contaminação de outras culturas que são susceptíveis.

Figura 1.1 – Escleródio de *Sclerotinia sclerotiorum* formando apotécio nas raízes de *Allium sativum*.



Legenda: Ocorrência em São Gotardo - MG, na região do Alto Paranaíba, em Julho de 2017.

Fonte: Do autor (2018).

2.2 *Sclerotinia sclerotiorum*

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary produz micélio branco, formado por hifas hialinas, finas e septadas, e escleródios grandes (1,0 – 30,0 mm) de formato irregular, rígidos e de coloração preta. Os escleródios são agregados de hifas somáticas, sendo estruturas que promovem a sobrevivência do fungo em longo prazo, quando as condições são desfavoráveis ao seu crescimento (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; JACCOUD FILHO et al., 2017).

De acordo com as condições ambientais os escleródios podem germinar produzindo (1) micélio, que podem atacar diretamente os tecidos vegetais, ou (2) apotécio, que produz ascósporos (esporos meióticos) que podem ser disseminados até 100 metros de distância, sendo o principal meio de infecção em grande parte das plantas hospedeiras (JACCOUD FILHO et al., 2017; SHARMA et al., 2017).

É um fungo necrotrófico que, apesar de desencadear diferentes sintomas dependendo do hospedeiro, geralmente causa o desenvolvimento de lesões irregulares inicialmente aquosas, seguida de necrose dos tecidos vegetais infectados e desenvolvimento de micélio branco cotonoso e escleródios interna e externamente (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; JACCOUD FILHO et al., 2017; SHARMA et al., 2017).

Sua patogenicidade está relacionada à secreção do ácido oxálico e de enzimas líticas, como pectinases, celulases, hemicelulases, proteases, xilanases e glicosidases, que atuam macerando os tecidos vegetais degradando os componentes da parede celular (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; JACCOUD FILHO et al., 2017; SHARMA et al., 2017). O ácido oxálico tem papel fundamental na infecção de *S. sclerotiorum*, uma vez que atua: (1) penetrando no tecido vegetal antes das hifas e reduzindo o pH para em torno de 4-5, que é o pH ótimo para a atividade das enzimas líticas; (2) quelando o cálcio na parede celular, permitindo que a poligalacturonase hidrolise os pectatos, interrompendo assim a integridade da parede celular hospedeira, além de comprometer as respostas de defesa da planta que são dependentes do cálcio; (3) manipulando a função das células guarda pela inibição da produção do ácido abscísico, que induz o fechamento dos estômatos, provocando a abertura dos estômatos e murcha das folhas; (4) suprimindo a explosão oxidativa e limitando a resposta de defesa vegetal (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; JACCOUD FILHO et al., 2017; WALZ et al., 2008). Além disso, o ambiente acidificado pode enfraquecer a planta e torná-la mais susceptível ao crescimento do fitopatógeno (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

O *Sclerotinia sclerotiorum* apresenta ocorrência em diversas culturas distribuídas em quase todos os continentes, podendo ser em áreas relativamente úmidas e de temperaturas mais amenas, assim como em regiões quentes e secas, sendo a alta umidade imprescindível para o sucesso da germinação dos ascósporos e a infecção do tecido vegetal, enquanto a temperatura ótima para o desenvolvimento da doença é em torno de 15 a 25°C (JACCOUD FILHO et al., 2017). Ademais, existem outros fatores que favorecem a ocorrência da doença, como a irrigação excessiva, monoculturas, sementes infectadas com o micélio ou contaminadas com escleródios, restos infectados deixados nos campos, aplicação de fertilizantes de maneira desequilibrada, pois o aumento de fertilizante nitrogenado também aumenta a incidência da doença (SHARMA et al., 2017).

O controle do *S. sclerotiorum* é muito difícil devido à sua ampla gama de hospedeiros e à longa sobrevivência dos escleródios, sendo recomendado, portanto, a integração de várias medidas. Entre as medidas adotadas para o manejo dessa doença destacam-se: uso adequado da água na irrigação e dos fertilizantes no solo, rotação de culturas e uso de cobertura morta com espécies não suscetíveis, utilização de sementes livres de micélio e escleródios, tratamento das sementes, integração da lavoura com pastagens e controle biológico (JACCOUD FILHO et al., 2017; SHARMA et al., 2017).

Os vastos danos em culturas de importância econômica, a falta de hospedeiros com níveis elevados de resistência e os desafios no controle da doença causada por *S. sclerotiorum*

têm impulsionado as pesquisas sobre esse patógeno (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

2.3 Controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum*

Considerando o fato do controle de fitopatógenos não ser eficaz através de uma única prática cultural ou química, como, por exemplo, o uso de fungicidas ou a rotação cultural com plantas resistentes (SOUSA; BLUM, 2013), destaca-se a importância do uso do controle biológico, pois é uma relevante ferramenta complementar a ser adotada. O controle biológico apresenta diversas vantagens por ser um método seguro, eficiente, economicamente viável e que causa menos poluição que o uso de agroquímicos, sendo uma alternativa de interesse para o manejo sustentável de doenças na agricultura orgânica (D'AGOSTINO; MORANDI, 2009).

O mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, é uma doença de difícil controle, conforme comentado anteriormente, sendo utilizadas grandes quantidades de fungicidas que muitas vezes não apresentam resultados satisfatórios, uma vez que nem sempre são capazes de controlar a germinação dos escleródios no solo, atuando principalmente no controle das infecções aéreas por ascósporos. Além disso, os agroquímicos provocam desequilíbrios ambientais e grandes gastos econômicos, fatores que podem ser reduzidos com a aplicação de agentes de controle biológico como uma abordagem complementar para o manejo da doença, além de apresentarem potencial para melhorar a qualidade e aumentar a produtividade das culturas (CARDOSO; OLIVEIRA; FLOR, 2017).

Apesar do grande número de trabalhos voltados para o controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum*, não foram encontrados estudos para o controle biológico de *S. sclerotiorum* em *Allium sativum*. Tendo em vista o aumento no risco de infecção do alho por este fitopatógeno, devido às alterações no seu período de plantio para condições em que o desenvolvimento do fungo é favorecido, conforme já comentado, surge o interesse no controle deste fitopatógeno no alho, visando a prevenção da infecção da própria cultura do alho, assim como evitar a manutenção deste fungo no solo, conseqüentemente, não sustentando sua ocorrência e evitando a contaminação de outras culturas que são susceptíveis.

2.3.1 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares que participam da microbiota epifítica, endofítica e do solo onde se desenvolvem as plantas (MELLO et al., 2011). Estas têm sido

utilizadas no controle de fungos fitopatogênicos principalmente por sua capacidade de colonizar rapidamente, crescer em lesões superficiais e competir com o fitopatógeno por nutrientes e espaço, uma vez que apresentam maior taxa de crescimento por serem organismos unicelulares, em contraste com os fungos filamentosos que são multicelulares (ÚBEDA et al., 2014). As leveduras também são capazes de promover a indução de resistência nas plantas, conforme observado por Droby et al. (2002), em que a aplicação de suspensões de células de *Candida oleophila* em tecido de casca de frutos de pomelo (*Citrus paradisi* cv. Marsh Seedless) provocou o acúmulo de fitoalexinas, além de aumentar a biossíntese de etileno, a atividade de fenilalanina amônia liase e os níveis de quitinase e proteína β -1,3-endoglucanase.

Foi observado por Chi et al. (2015) a formação de biofilme pela levedura *Pichia kudriavzevii*, sendo o biofilme uma forma morfológica mais resistente a temperaturas elevadas e ao estresse oxidativo, além de estar envolvida na atividade de controle biológico. Klein e Kupper (2018) relataram uma correlação positiva entre o aumento da atividade antagônica e o aumento da produção de biofilme, destacando também a formação do biofilme como uma importante característica no controle biológico através da colonização de lesões, protegendo a planta contra o ataque de fitopatógenos.

Entre diversas espécies de leveduras, Úbeda et al. (2014) destacaram a espécie *Pichia kudriavzevii* como boa candidata para o biocontrole e para a biorremediação no tratamento de águas residuais contaminadas por metais pesados, uma vez que inibiu os bolores avaliados, *Phaeoconiella chlamydospora*, *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia seriata*, *Phaeoacremonium aleophilum* e *Aspergillus niger*, e acumulou a maior proporção dos três metais testados, Cr(VI), Pb(II), Cd(II). Kupper et al. (2013) avaliaram *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* no controle de *Penicillium digitatum*, observando redução do crescimento micelial do fitopatógeno por grande parte dos isolados bacterianos e por todos os isolados de leveduras; e inibição da germinação de conídios por apenas um dos isolados bacterianos (72%) e resultados superiores apresentados por dois isolados de *S. cerevisiae* (78 e 85,7 %).

Remlei-Starosta et al. (2016) aplicaram leveduras para controlar o mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, em Virginia mallow (*Sida hermaphrodita*), observando maior inibição da doença após o tratamento com cepas de *Candida albida* e *Pichia anomala*, sendo verificada a produção de enzimas extracelulares, tais como: amilases, quitinases, proteases e pectinases. Reeleder (2004) relatou que as leveduras *Cryptococcus albida* e *Pichia anomala* também apresentam potencial para o controle do mofo branco, embora esse controle da doença em ambiente controlado e em testes de campo tenha sido menos

expressivo do que o observado para o fungicida iprodiona ou para o agente de controle biológico *Epicoccum nigrum*.

Microorganismos antagonistas já estão comercialmente disponíveis, como é o caso das leveduras *Candida oleophila* e *Cryptococcus albidus*, encontradas com o nome comercial Aspire (Ecogen Inc., Langhorn, PA) e YieldPlus (Anchor Yeast, Cidade do Cabo, África do Sul), respectivamente (DROBY et al., 2002).

2.3.2 *Bacillus* spp.

Assim como as leveduras, bactérias do gênero *Bacillus* também são de grande interesse na agricultura, tanto por serem bactérias promotoras de crescimento em plantas, quanto por apresentarem uma ampla gama de mecanismos antagônicos, sendo capazes de driblar as defesas do fitopatógeno (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010). As bactérias desse gênero colonizam as raízes, formando microcolônias ou biofilmes em locais preferidos de exsudação das raízes, e atuam como agentes rizosféricos, com capacidade para degradar substratos derivados de fauna, flora e compostos de origem orgânica, promovendo os processos de fixação de nitrogênio e solubilização de fosfatos, auxiliando na promoção do crescimento das plantas (CHEN et al., 2007; CHOUDHARY; JOHRI, 2009; CORRALES RAMÍREZ et al., 2017; KUMAR; DUBEY; MAHESHWARI, 2012). Atuam também produzindo substâncias antagonistas de fitopatógenos e/ou induzindo mecanismos de resistência na planta, entre outras formas de controle biológico (CHAURASIA et al., 2005; CHEN et al., 2007; CHOUDHARY; JOHRI, 2009; GOND et al., 2015; HUANG et al., 2012; KUMAR; DUBEY; MAHESHWARI, 2012). Além destes dois benefícios, o gênero *Bacillus* apresentar grande diversidade fisiológica, que ocorre devido à formação de endósporos que lhe permitem estar em ambientes com condições variáveis, possibilitando a sua longa manutenção e sobrevivência em habitats específicos (CORRALES RAMÍREZ et al., 2017; LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010).

Bactérias do gênero *Bacillus* mostraram-se eficientes no controle de *S. sclerotiorum* através de antibiose (KUMAR et al., 2012; VINODKUMAR et al., 2017; WU et al., 2014). Assim como observado para *Sclerotium rolfsii*, os isolados de *Bacillus* agem no campo através da liberação na rizosfera de compostos extracelulares, substâncias antimicrobianas e hormônios vegetais, que suprimem as doenças das plantas, promovem o seu crescimento e ajudam na absorção de nutrientes presentes no solo (SUNEETA; AIYANATHAN; NAKKEERAN, 2016). Vinodkumar et al. (2017) observaram que *Bacillus amyloliquefaciens*

provocou inibição de 45% do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e 100% da sua produção de escleródios, atividade relacionada à produção de diversos antibióticos, como a iturina, bacilisina, bacilomicina, surfactina, subtilina e subtilosina, além da produção de outros metabólitos associados à inibição de *S. sclerotiorum*, identificados como fenóis e ácidos graxos.

A imersão das raízes de cravo em suspensão bacteriana de estirpes efetivas de *Bacillus* spp. foi considerado promissor para o controle do mofo branco nas hastes de cravos cultivados, com redução na incidência da doença e promoção de crescimento da planta (VINODKUMAR et al., 2017).

Wu et al. (2014) verificaram que a suspensão de células de *Bacillus amyloliquefaciens* (10^8 UFC/ml) diminuiu a incidência do mofo branco em 83,3%, semelhante ao observado para o fungicida comercialmente disponível (Dimetaclone). Entre os mecanismos de ação desta bactéria foram identificados: (1) a produção de compostos antifúngicos não voláteis (homólogos de iturina) e voláteis (tolueno, fenol, benzotiazole); (2) produção de biofilme; (3) produção de sideróforos; (4) produção de enzimas que degradam a parede celular (protease e β -1,3-glucanase), destacando este microorganismo como um potencial agente para o controle do mofo branco causado por *S. sclerotiorum* (WU et al., 2014).

Um importante mecanismo de ação dos microorganismos antagonistas ao *S. sclerotiorum* é a produção de enzimas hidrolíticas que degradam as células do fitopatógeno e, conseqüentemente, suprimem o seu desenvolvimento através de micoparasitismo dos escleródios e das hifas, conforme observado através de micrografias de luz e eletromicrografias de varredura a ocorrência de deformidades e lise da parede celular do micélio, anormalidades no apotécio e falha na germinação de ascósporos através da interação do *S. sclerotiorum* com isolados de *Bacillus* (RAHMAN et al., 2016).

No mercado existem diversos produtos registrados para o controle biológico de fitopatógenos com linhagens comerciais de bactérias do gênero *Bacillus*, entre estes temos alguns com indicação para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, como é o caso do Amylo-X® (Intrachem Bio Italia SpA), produto à base de *Bacillus amyloliquefaciens*, que atua por competição, antibiose e indução de resistência; o Ballad® (AgraQuest), produto elaborado com *Bacillus pumilus*, com atuação através de antibiose, competição, promoção de crescimento e indução de resistência; e FZB24® (ABiTEP GmbH), elaborado a partir do isolado FZB24 de *Bacillus subtilis*, que age estimulando o crescimento das plantas, aumentando o rendimento e induzindo resistência contra estresses e infecções por

fitopatógenos, não tendo sido observada até então nenhuma atividade direta contra fitopatógenos no solo (D'AGOSTINO; MORANDI, 2009).

2.4 Interações planta x patógeno e os agentes de controle biológico

Por ser um fungo necrotrófico, *S. sclerotiorum* consegue se nutrir de células mortas do hospedeiro, driblando a resposta hipersensível da planta, geralmente relacionada a uma estratégia de defesa inicial da planta, em que é provocada a morte das células no local da infecção para conter o crescimento do patógeno (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; WALZ et al., 2008). Outra estratégia desse fitopatógeno está relacionada à liberação de ácido oxálico que, entre seus diversos mecanismos de ação, também pode atuar inibindo a explosão oxidativa da planta em resposta à infecção, impedindo a sinalização da planta para indução de respostas de defesa secundárias, como a produção de metabólitos antifúngicos (WALZ et al., 2008).

Nas interações planta x patógeno, a resposta de defesa da planta está frequentemente associada ao estresse oxidativo, inclusive em infecções por *Sclerotinia sclerotiorum* (JAIN et al., 2013; WALZ et al., 2008). A explosão oxidativa é considerada necessária para várias respostas de defesa subsequentes, sendo geradas espécies reativas de oxigênio (ERO) que servem como mensageiros secundários nas vias de sinalização intra e intercelular (JAIN et al., 2013).

Para se protegerem do dano oxidativo provocado pelas ERO na explosão oxidativa as plantas desenvolveram sistemas antioxidantes que auxiliam no gerenciamento de ERO, para que fiquem em níveis o mais baixo possível dentro da célula (JAIN et al., 2013; RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). Este sistema antioxidante é composto por enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase, peroxiredoxina, catalase, polifenol oxidase (NASCIMENTO; BARRIGOSSI, 2014), assim como por antioxidantes não-enzimáticos, como glutathione, tocoferóis, carotenoides, ascorbato, flavonoides e outros compostos fenólicos, sendo a suscetibilidade de uma planta ao estresse oxidativo gerado por fitopatógenos dependente do equilíbrio entre os fatores bióticos que aumentam a geração de oxidantes e os componentes celulares que apresentam uma capacidade antioxidante (JAIN et al., 2013).

Na rizosfera ocorrem importantes interações entre os microorganismos e a planta, as quais podem desempenhar funções na proteção contra fitopatógenos (JAIN et al., 2015). Essas interações podem provocar alterações no estado fisiológico da planta, como é o caso da

indução de resistência sistêmica, provocando alterações no metabolismo secundário que promovem sua adaptação às situações de estresse. Jain et al. (2015) observaram influência da infecção por *S. sclerotiorum* em plantas de ervilhas, tratadas com microorganismos benéficos e não tratadas, no metabolismo dos fenilpropanoides, havendo aumento no teor de compostos fenólicos nas plantas tratadas com *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* e *Pseudomonas aeruginosa*, isoladamente e na forma de consórcio.

Jain et al. (2013) observaram que, quando as plantas de ervilha estavam tratadas com microorganismos benéficos, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* e *Pseudomonas aeruginosa*, isoladamente e em consórcio, houve aumento na produção de H₂O₂ 24 horas após o desafio com *Sclerotinia sclerotiorum*, assim como também houve aumento no teor de ácido ascórbico e na atividade das enzimas antioxidantes peroxidase do ascorbato, catalase, peroxidase de guaiacol e glutatona peroxidase e redução na peroxidação lipídica quando comparadas com as plantas não tratadas.

Rodríguez et al. (2016) observaram relações semelhantes, em que o fungo *Phialomyces macrosporus*, agente de controle biológico, atuou reduzindo a severidade da antracnose em mudas de café através da competição por nutrientes e pela indução de resistência, em que promoveu o crescimento das plantas, colonizou as raízes e hastes, cresceu na superfície das folhas e aumentou a permeabilidade da cutícula, aumentou a atividade das enzimas peroxidase de guaiacol (POX), catalase (CAT) e fenilalanina amônia-liase (PAL), aumentou o conteúdo de compostos fenólicos e a deposição de lignina.

2.5 Influência de microorganismos na composição fitoquímica

Uma das estratégias para o aumento na produção de metabólitos secundários de interesse está em causar condições de estresses bióticos e abióticos (JIMENEZ-GARCIA et al., 2013), uma vez que as plantas possuem habilidade de produzir diversos metabólitos secundários relacionados à adaptação às situações de estresse (SHETTY; WAHLQVIST, 2004). As fitoalexinas são metabólitos secundários produzidos pelas plantas em resposta ao estresse, ataque de microorganismos e/ou tratamentos elicitores, geralmente com ação antimicrobiana e potencialmente exploradas como componentes nutricionais enriquecendo alimentos, apresentando atividade antioxidante, anti-inflamatória, hipocolesterolêmica, inclusive ação anticancerígena (BOUE et al., 2009).

As leveduras competem por nutrientes com os fungos patogênicos, colonizam fermentos e podem induzir respostas de defesa na planta (MELLO et al., 2011), assim como as bactérias do gênero *Bacillus* (CHOUDHARY; JOHRI, 2009; GOND et al., 2015), sendo estes microorganismos cada vez mais estudados como ferramentas na realização do controle biológico de fitopatógenos (ABRAHAM; LAING; BOWER, 2010; JANISIEWICZ; KURTZMAN; BUYER, 2010; KUPPER et al., 2013; MACHADO; BETTIOL, 2010; PUNJA; UTKHEDE, 2003; VARGAS et al., 2012) e na indução de resistência em plantas (ARAUJO; MENEZES, 2009; BERNARDES et al., 2010; ZANARDO; PASCHOLATI; FIALHO, 2009). Nesse contexto, é importante levar em consideração que o uso das leveduras e bactérias do gênero *Bacillus* no controle biológico de fitopatógenos pode induzir respostas de defesa nas plantas, podendo promover alterações na composição fitoquímica.

Baenas, García-Viguera e Moreno (2014) relatam o uso de tratamentos elicitores como promotores de respostas de defesa nas plantas, podendo induzir a síntese de compostos fitoquímicos, tanto através do metabolismo primário, como através do metabolismo secundário. O extrato de leveduras está entre os tratamentos elicitores apresentados na revisão, uma vez que este apresenta vários componentes, como quitina, oligômeros de N-acetilglucosamina, β -glucano, glicopeptídeos e ergosterol, que são capazes de provocar respostas de defesa na planta.

O resveratrol é um polifenol produzido pelas uvas, entre outras espécies vegetais, que apresenta grande interesse para a saúde humana devido a sua atividade antioxidante e propriedades quimiopreventivas contra diversos tipos de câncer e doenças cardiovasculares (ABE et al., 2007; SHANKAR; SINGH; SRIVASTAVA, 2007). Trata-se de uma fitoalexina produzida pela uva em situações de estresse, como a radiação UV e o ataque de fitopatógenos, conforme observado por Jeandet et al. (1995) o aumento no teor de resveratrol em uvas (*Vitis vinifera*) atacadas por *Botrytis cinerea* em condições naturais (Tabela 1.1).

Estudos demonstraram que fungos micorrízicos arbusculares (FMA) podem induzir o acúmulo de carotenoides, compostos fenólicos, antocianinas e tocoferol em folhas de alface (*Lactuca sativa* L.) (Tabela 1.1), sendo uma alternativa suplementar viável para melhorar a qualidade nutricional desta cultura (BASLAM et al., 2013; BASLAM; GOICOECHEA, 2012). Os FMA aumentaram o crescimento das plantas sem causar efeito de diluição em seus compostos bioativos, indicando que a simbiose micorrízica tem potencial para aumentar a ingestão de compostos com atividade antioxidante sem necessidade de aumentar o consumo de alface na alimentação (BASLAM et al., 2013).

Giovannetti et al. (2012) encontraram resultados semelhantes utilizando FMA em tomates (*Solanum lycopersicum* L.), aumentando em 18,5% o teor de licopeno quando comparado ao controle sem a inoculação, sendo este carotenoide um importante metabólito produzido pelo tomate com expressiva atividade antioxidante e papel essencial na prevenção de doenças (SHAMI; MOREIRA, 2004) (Tabela 1.1). Além disso, essa associação da planta com FMA provocou aumento nos teores de Ca, K, P e Zn, melhorando o valor nutricional dos frutos (Tabela 1.1). Os fungos micorrízicos arbusculares apresentam grande potencial de aplicação em sistemas sustentáveis de produção de alimentos, pois além de participarem do equilíbrio ecológico na rizosfera das plantas também é economicamente viável, garantindo menores danos ao ambiente e produção de alimentos de alta qualidade (GIOVANNETTI et al., 2012).

Tabela 1.1 - Alterações nos compostos bioativos e nutricionais das plantas por microorganismos.

Plantas	Agentes elicitores	Compostos	Alteração	Referência
<i>Malus domestica</i> (maçã)	Extrato de levedura com <i>Venturia inaequalis</i>	compostos fenólicos	Aumento	(DIAS et al., 2016)
<i>Curcuma mangga</i> (Açafrão branco)	Extrato de levedura e quitosana	compostos fenólicos	Aumento	
<i>Nicotiana rustica</i> (mapacho)	Gene ornitina descarboxilase de leveduras	nicotina e serotonina	Aumento	(KARUPPUSAMY, 2009)
<i>Medicago truncatula</i>	Extrato de levedura	isoflavonas	Aumento	(SAINI et al., 2013)
<i>Glycyrrhiza echinata</i> (alcaçuz)	Extrato de levedura	flavanona 2-hydroxilase, isoflavona 2'-hydroxilase e isoflavona	Aumento	
<i>Cucumis sativus</i> (pepino)	Leveduras	N, P, K, Fe, Zn, Cu, Mn	Aumento	(SHEHATA; FAWZY; EL-RAMADY, 2012)
<i>Allium sativum</i> (alho)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	compostos organossulfurados	Aumento	(KIM et al., 2016)
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	compostos organossulfurados	Aumento	
	<i>Mimulus pilosus</i>	compostos organossulfurados	Aumento	
<i>Vitis vinifera</i> (uva)	<i>Botrytis cinerea</i>	resveratrol	Aumento	(JEANDET et al., 1995)

Fonte: Do autor (2018).

Tabela 1.1 – Alterações nos compostos bioativos e nutricionais das plantas por microorganismos (continuação).

Plantas	Agentes elicitores	Compostos	Alteração	Referência
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	Polyversum® (<i>Pythium oligandrum</i>)	compostos fenólicos e carotenoides	Redução	(CWALINA-AMBROZIAK; AMAROWICZ, 2012)
<i>L. esculentum</i> (tomate) e <i>Capsicum annuum</i> (pimentão)	Polyversum® (<i>Pythium oligandrum</i>)	pectina	Aumento	
<i>Solanum lycopersicum</i> (tomate)	<i>Glomus intraradices</i> (fungo micorrízico arbuscular - FMA)	licopeno	Aumento	(GIOVANNETTI et al., 2012)
		Ca, K, P e Zn	Aumento	
<i>Lactuca sativa</i> var. Capitata (alface)	<i>Glomus intraradices</i> e <i>G. mosseae</i> (FMA comercial)	compostos fenólicos, antocianinas e carotenoides totais	Aumento	(BASLAM; GOICOECHEA, 2012)

Fonte: Do autor (2018).

Kuhn e Pascholati (2010) testaram um indutor biótico (*Bacillus cereus*) e um abiótico (acibenzolar-S-metil) na indução de resistência em feijoeiro contra a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e observaram que ambos indutores protegeram a cultura contra o fitopatógeno, porém o indutor abiótico reduziu o teor de compostos fenólicos e a biomassa da planta, enquanto o indutor biótico, a bactéria *B. cereus*, não provocou reduções nesses parâmetros comparado ao controle.

Os microorganismos podem ser utilizados para a fortificação de alimentos, como no trabalho de Kim et al. (2016) que promoveram a fermentação do alho com a bactéria *Lactobacillus plantarum*, o fungo filamentosso *Mimulus pilosus* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, obtendo aumento o teor de compostos organossulfurados (Tabela 1.1). Esses resultados despertam o interesse em saber se haverá alguma alteração composicional decorrente da aplicação de leveduras e bactérias no controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* em alho.

2.6 Fatores que alteram a composição fitoquímica do alho

Existem diversos fatores que provocam alterações no teor e composição de metabólitos secundários nas plantas, como o período do plantio e da colheita, a disponibilidade hídrica, ataques de pragas e fitopatógenos, entre outros. O teor de compostos

organossulfurados nos bulbos de alho é alterado durante o seu cultivo e armazenamento (YOO et al., 2010), podendo ocorrer devido a diferentes fatores, conforme será discutido adiante.

Modificações na temperatura, luminosidade e disponibilidade hídrica são notáveis para a cultura do alho, em razão de ser uma planta originária de clima frio apresenta algumas exigências com relação a estas condições, podendo o seu desenvolvimento vegetativo e a produtividade serem afetados por estes fatores (RESENDE; HABER; PINHEIRO, 2015). Montañó et al. (2011) encontraram relação entre as condições climáticas dos locais do cultivo (temperatura média e precipitação total entre o plantio e a colheita) e o teor de aliina, precursor para a produção da alicina; assim como a data de plantio que influenciou os teores de aliina e isoaliina, sendo maiores nas datas normais de plantio. Além disso, foi relatado por Martins, Petropoulos e Ferreira (2016) em sua revisão que o déficit leve de água (redução de 40%) durante a estação de crescimento causou alterações significativas nos compostos antioxidantes e na atividade de enzimas antioxidantes, como catalase, glutathione reductase, glutathione S-transferase, peroxidase e superóxido dismutase.

Os nutrientes fornecidos para a planta é outro fator considerável quando se pretende alterar a composição fitoquímica, conforme apresentado por Bloem, Haneklaus e Schnug (2010), que promoveram fertilização com enxofre e nitrogênio no cultivo do alho provocando aumento no teor de cisteína, glutathione e aliina nas folhas e no bulbo.

O ataque de fitopatógenos causa estresse na planta podendo induzir à produção de metabólitos secundários de defesa, conforme foi observado por Pontin et al. (2015), que encontraram a produção de terpenos com propriedades antifúngicas no alho em resposta à infecção por *Sclerotium cepivorum*. Além disso, podem ser utilizados tratamentos elicitores, bióticos ou abióticos, promovendo a indução de resistência na planta contra os fitopatógenos, levando ao aumento da produção de determinados compostos pela planta como mecanismos de defesa (BAENAS; GARCÍA-VIGUERA; MORENO, 2014).

Dessa forma, pode-se concluir que as condições de cultivo e armazenamento podem afetar consideravelmente a composição química do alho, podendo o cultivo em áreas selecionadas, assim como a aplicação de nutrientes e microorganismos, serem usados para manipular o teor de compostos bioativos, assim como o seu armazenamento de maneira adequada e processamento, influenciando, conseqüentemente, a qualidade do produto final (MARTINS; PETROPOULOS; FERREIRA, 2016).

2.7 Compostos bioativos do alho e sua atividade antioxidante

O alho apresenta diversos compostos bioativos responsáveis pela sua ampla gama de atividades biológicas de interesse medicinal e no controle de pragas e doenças (SLUSARENKO; PATEL; PORTZ, 2008), como é o caso dos compostos fenólicos e dos tiosulfinatos (LANZOTTI, 2006). Estes atuam na proteção da planta contra o estresse oxidativo, provocado por diversas condições adversas, apresentando-se como moléculas antioxidantes também para a aplicação na saúde humana (ASIF, 2015; BORLINGHAUS et al., 2014).

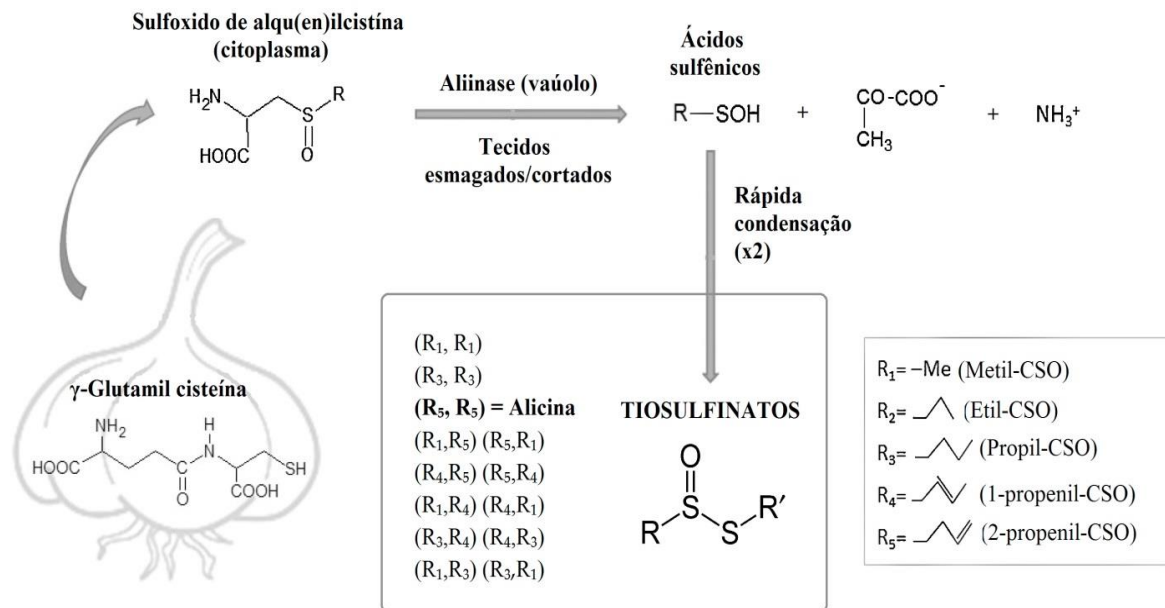
2.7.1 Tiosulfinatos

Os tiosulfinatos são os compostos mais bem estudados em espécies do gênero *Allium* (LANZOTTI, 2006). São originados a partir da aliina, localizada no citoplasma, por meio de uma reação enzimática catalisada pela enzima aliinase, presente nos vacúolos, reação que só ocorre quando o bulbilho é cortado ou esmagado, provocando o contato entre a aliina e a aliinase (Figura 1.1) (LANZOTTI, 2006; LONDHE et al., 2011; SILVA; MORETTI; MATTOS, 2010). A reação inicialmente dá origem a ácidos sulfênicos, intermediários altamente reativos, que imediatamente produzem tiosulfinatos por reação de condensação, sendo a alicina um importante tiosulfinato produzido através desta reação (Figura 1.1) (LANZOTTI, 2006; LAWSON; HUGHES, 1992).

A alicina (dialil tiosulfinato) é uma molécula de defesa do alho (*Allium sativum* L.) com uma ampla gama de aplicações de interesse na medicina e na agricultura orgânica (BORLINGHAUS et al., 2014; CURTIS et al., 2004), apresentando atividade antibiótica contra diversos vírus, bactérias, fungos e parasitas, atuando na sua destruição ou inibição (LONDHE et al., 2011; SILVA et al., 2010), sendo responsável na planta pela sua proteção contra os patógenos e predadores.

Por ser um tiosulfinato, a alicina sofre uma reação redox com os grupos tiol na glutatona e em proteínas, prevenindo sua oxidação, acreditando-se que a maioria dos efeitos da alicina são mediados por mecanismos redox dependentes (BORLINGHAUS et al., 2014).

Figura 1.2 – Esquema da biossíntese dos tiosulfinatos no alho.



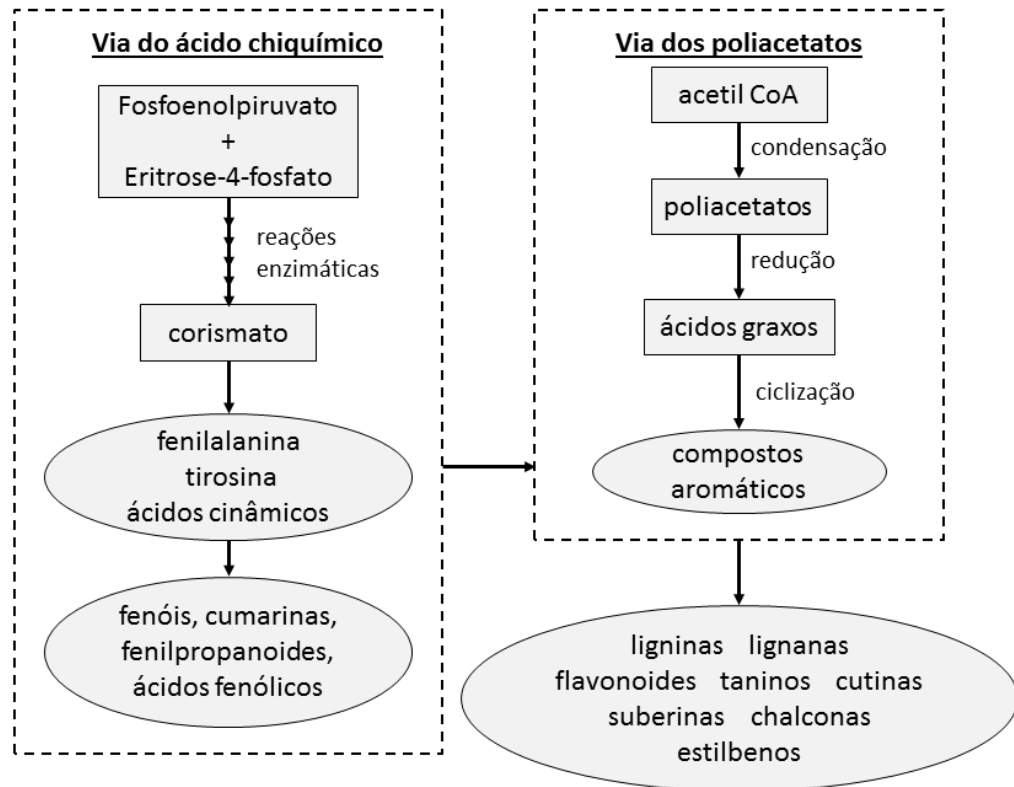
Fonte: Adaptado de RAMIREZ et al. (2017).

2.7.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos apresentam ampla variedade de estruturas e funções, geralmente formados por um anel aromático contendo um ou mais substituintes de grupo hidroxila (-OH). São sintetizados através de duas vias metabólicas primárias, a via do ácido chiquímico e a via dos poliacetatos, sendo produzidos tipicamente a partir dos seguintes precursores biossintéticos: fosfoenolpiruvato, piruvato, acetato e alguns aminoácidos, acetil CoA e malonil CoA (Figura 1.2) (PEREIRA; ANGELIS-PEREIRA, 2014).

As plantas absorvem a radiação do sol e geram altos níveis de oxigênio como produto secundário da fotossíntese, o qual é ativado pela radiação ultravioleta (UV) e pelo calor da luz solar para produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) tóxicas. Consequentemente, as plantas produzem antioxidantes, enzimáticos ou não, a fim de neutralizar e desintoxicar as ERO, sendo estes fitoquímicos amplamente utilizados em benefício da saúde humana com propriedades antioxidantes, quimiopreventiva ou quimioprotetora (ASIF, 2015). Entre estes metabólitos destacam-se os compostos fenólicos, tais como os flavonoides, substâncias que apresentam elevada atividade antioxidante, sendo, portanto, uma das classes mais comuns de metabólitos na natureza (ASIF, 2015; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; SILVA; MORETTI; MATTOS, 2010).

Figura 1.3 – Esquema da biossíntese dos compostos fenólicos nas plantas.



Fonte: Pereira e Angelis-Pereira (2014).

Os compostos fenólicos interferem no processo de oxidação eliminando os radicais livres, através da doação de átomos de hidrogênio ou elétrons, e também quelando cátions metálicos, que são agentes pró-oxidantes, prevenindo a formação dos radicais livres (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; BIANCHI; ANTUNES, 1999; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Além da atividade antioxidante, os compostos fenólicos possuem importantes funções biológicas nas plantas relacionadas: (1) à estrutura, como é o caso da lignina nas paredes celulares, que confere resistência mecânica e rigidez; (2) à polinização, como o exemplo dos flavonoides que conferem cor às flores tornando-as atrativas aos agentes polinizadores; (3) à resistência aos patógenos, com o acúmulo de lignina como resposta imediata no local da infecção para retardar ou parar o crescimento do patógeno, seguida da ativação de respostas secundárias de defesa desencadeando a produção de fitoalexinas antibióticas específicas; entre outras (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; PEREIRA; ANGELIS-PEREIRA, 2014).

2.7.3 Atividade antioxidante

Antioxidantes são substâncias, naturais ou sintéticas, capazes de retardar ou impedir a oxidação quando presente em concentrações menores do que o substrato oxidável (BIANCHI; ANTUNES, 1999; SILVA; MORETTI; MATTOS, 2010). O selênio, os compostos organossulfurados e os compostos fenólicos estão entre os antioxidantes do alho, agindo através da eliminação de radicais livres, protegendo a membrana de danos e mantendo a integridade celular (CHAGAS et al., 2012; DALONSO et al., 2009).

Okada et al. (2005) observaram que as propriedades antioxidantes do extrato de alho são principalmente atribuídas à presença de alicina, uma vez que o extrato apresentou significativa atividade antioxidante quando na presença da alicina, enquanto o extrato preparado sem alicina apresentou resultado bem menos expressivo. Além dos tiosulfatos, o extrato de alho também apresenta compostos fenólicos, como flavonoides e ácidos fenólicos, os quais podem apresentar atividades antioxidantes semelhantes às de antioxidantes sintéticos, como o hidroxianisol butilado (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT) (BENKEBLIA; LANZOTTI, 2007; FUKUMOTO; MAZZA, 2000).

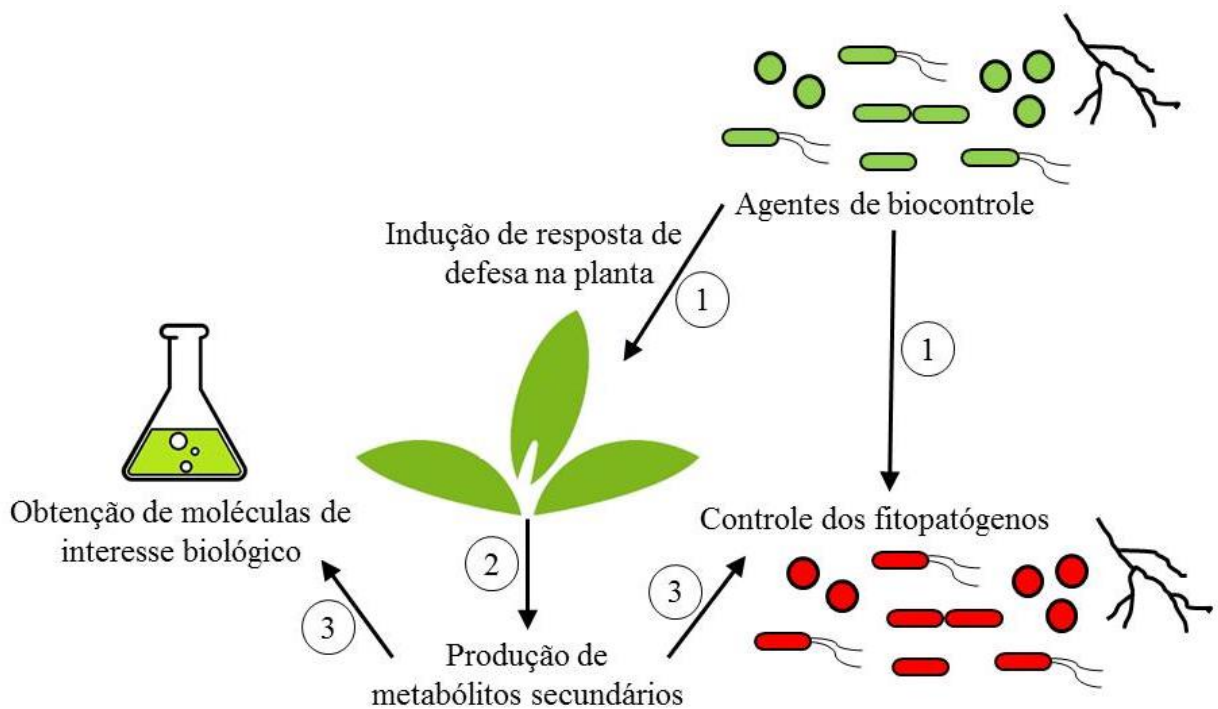
Na saúde humana, os compostos fenólicos, assim como os tiosulfatos, vêm ganhando atenção devido a suas propriedades antimicrobiana, antiviral e antioxidante, protegendo contra o estresse oxidativo, que afeta membranas, componentes celulares e ácidos nucléicos, além do importante papel na prevenção do câncer (BENKEBLIA; LANZOTTI, 2007; FRATIANNI et al., 2016; ROTHWELL; KNAZE; ZAMORA-ROS, 2017).

2.8 Perspectivas da aplicação de leveduras e *Bacillus* spp. no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em *Allium sativum*

Leveduras e *Bacillus* spp. são agentes de biocontrole amplamente utilizados contra diversos fitopatógenos com resultados satisfatórios e produtos comerciais já disponíveis no mercado (D'AGOSTINO; MORANDI, 2009; DROBY et al., 2002). O uso de microorganismos antagonistas no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura do alho é de interesse tendo em vista que este é consumido principalmente *in natura*, sendo importante a redução no uso de agroquímicos. Tanto as leveduras, quanto as bactérias do gênero *Bacillus* já vêm sendo estudadas para aplicação no controle de *S. sclerotiorum* em outras culturas, sendo interessante verificar se promovem o controle biológico deste fitopatógeno no alho.

Ademais, as plantas são capazes de se defender de potenciais agentes patogênicos através de metabólitos secundários, cuja produção é desencadeada por moléculas elicitoras ou agentes indutores. Os metabólitos secundários são moléculas com extensa gama de atividades biológicas, muitas vezes de interesse biológico. Agentes de biocontrole podem atuar como elicitores induzindo respostas de defesa no hospedeiro e provocando a produção destes metabólitos secundários (PUNJA; UTKHEDE, 2003), apresentando grande potencial de aplicação tanto na supressão da doença, quanto para a obtenção destes compostos de interesse (Figura 1.4).

Figura 1.4 - Controle de fitopatógenos e obtenção de metabólitos secundários de interesse através da indução de respostas de defesa na planta por agentes de biocontrole.



Fonte: Do autor (2018).

No uso de agentes de controle biológico deve-se considerar também o potencial destes como agentes elicitoras, levando à produção de metabólitos secundários que podem ser princípios ativos com alto valor nas indústrias farmacêuticas e agronômicas. O alho é uma planta que produz uma ampla gama de moléculas de interesse biológico, sendo desejável a escolha de microorganismos antagonistas que apresentem atividade elicitora para aplicação no controle biológico dos fitopatógenos.

Uma vez que *S. sclerotiorum* é um fitopatógeno cosmopolita encontrado no solo, onívoro e não específico (CHOUDHARY; PRASAD, 2012), e por serem encontrados relatos

de infecção do alho por este fungo (BOLAND; HALL, 1994; JACCOUD FILHO et al., 2017), existe a possibilidade deste patógeno atacar a cultura do alho e causar danos, sendo importante o estudo de potenciais agentes de biocontrole, como as leveduras e bactérias do gênero *Bacillus*, os quais podem tanto agir no controle deste e de outros fitopatógenos, quanto agir como promotores de crescimento e/ou agentes elicitores melhorando a qualidade do produto.

REFERÊNCIAS

ABE, L. T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 394–400, 2007.

ABRAHAM, A. O.; LAING, M. D.; BOWER, J. P. Isolation and *in vivo* screening of yeast and *Bacillus* antagonists for the control of *Penicillium digitatum* of citrus fruit. **Biological Control**, v. 53, n. 1, p. 32–38, 2010.

ARAUJO, F. F. DE; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 169–172, 2009.

ASIF, M. Chemistry and antioxidant activity of plants containing some phenolic compounds. **Chemistry International**, v. 1, n. 1, p. 35–52, 2015.

BAENAS, N.; GARCÍA-VIGUERA, C.; MORENO, D. Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 13541–13563, 2014.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

BASLAM, M. et al. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of major carotenoids, chlorophylls and tocopherol in green and red leaf lettuces. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 7, p. 3119–3128, 2013.

BASLAM, M.; GOICOECHEA, N. Water deficit improved the capacity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of antioxidant compounds in lettuce leaves. **Mycorrhiza**, v. 22, n. 5, p. 347–359, 2012.

BENKEBLIA, N.; LANZOTTI, V. *Allium* thiosulfinates : chemistry, biological properties and their potential utilization in food preservation. **Food j**, v. 2, p. 193–201, 2007.

BERNARDES, F. S. et al. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias em cultivos hidropônicos. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 115–121, 2010.

BIANCHI, M. DE L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123–130, 1999.

BLOEM, E.; HANEKLAUS, S.; SCHNUG, E. Influence of fertilizer practices on S-containing metabolites in garlic (*Allium sativum* L.) under field conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 19, p. 10690–10696, 2010.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93–108, 1994.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.

BORLINGHAUS, J. et al. Allicin: chemistry and biological properties. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12591–12618, 2014.

BOROSKI, M. et al. **Antioxidantes : princípios e métodos analíticos**. 1. ed. Curitiba, PR: Appris, 2015.

BOUE, S. M. et al. Phytoalexin-enriched functional foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2614–2622, 2009.

CARDOSO, C. R.; OLIVEIRA, C. B. DE; FLOR, I. DA M. Agentes biológicos como alternativa no controle do mofo branco. In: JACCOUD FILHO, D. DE S.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G. (Eds.). . **Mofo Branco**. 1. ed. Ponta Grossa, PR: Todapalavra, 2017. p. 520.

CHAGAS, F. C. et al. *Allium sativum* L. Na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares. **BioFar**, v. 7, n. 2, p. 1–11, 2012.

CHAURASIA, B. et al. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. **Microbiological Research**, v. 160, n. 1, p. 75–81, 2005.

CHEN, X. H. et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1007–1014, 2007.

CHI, M. et al. Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. **Biological Control**, v. 90, p. 113–119, 2015.

CHOUDHARY, D. K.; JOHRI, B. N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). **Microbiological Research**, v. 164, n. 5, p. 493–513, 2009.

CHOUDHARY, V.; PRASAD, L. Morpho-pathological, genetic variations and population

structure of *Sclerotinia sclerotiorum*. **International journal of plant research**, v. 25, n. 1, p. 178–183, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Alho**. [s.l.] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, 2005.

CORRALES RAMÍREZ, L. C. et al. *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. **Nova**, v. 15, n. 27, p. 45–65, 2017.

CORZO-MARTÍNEZ, M.; CORZO, N.; VILLAMIEL, M. Biological properties of onions and garlic. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 12, p. 609–625, 2007.

CURTIS, H. et al. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 65, n. 2, p. 79–89, 2004.

CWALINA-AMBROZIAK, B.; AMAROWICZ, R. Effects of Biological and Fungicidal environmental protection on chemical composition of tomato and red pepper fruits. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 21, n. 4, p. 831–836, 2012.

D'AGOSTINO, F.; MORANDI, M. A. B. Análise da viabilidade comercial de produtos à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* para o controle de fitopatógenos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de Doenças de Plantas : uso e perspectivas**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 341.

DALONSO, N. et al. Extração e caracterização de carboidratos presentes no alho (*Allium sativum* L.): proposta de metodologia alternativa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 793–797, 2009.

DIAS, M. I. et al. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: a review. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 9–22, 2016.

DROBY, S. et al. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Phytopathology**, v. 92, n. 4, p. 393–399, 2002.

FAGUNDES, M. H. **ALHO**. [s.l: s.n.]. 2016. p. 22.

FRATIANNI, F. et al. Phenolic constituents, antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities of different endemic Italian varieties of garlic (*Allium sativum* L.). **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 240–248, 2016.

FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds †. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3597–3604, 2000.

GARCÍA GÓMEZ, L. JACINTO; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Revisión: efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). **Archivos Latinoamericanos de nutrición**, v. 50, n. 3, p. 219–229, 2000.

GIOVANNETTI, M. et al. Nutraceutical value and safety of tomato fruits produced by mycorrhizal plants. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 2, p. 242–251, 2012.

GOND, S. K. et al. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. **Microbiological Research**, v. 172, p. 79–87, 2015.

GOUVEA, D. R. et al. Variações do metabolismo secundário vegetal: exemplos com plantas nativas do Brasil. In: CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. (Eds.). . **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 5. ed. Itajaí, SC: Univali, 2016. p. 528.

HUANG, X. et al. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. **Microbiological Research**, v. 167, n. 3, p. 135–143, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. p. 1–82, 2016.

JACCOUD FILHO, D. DE S. et al. Mofo branco: introdução, histórico, situação atual e perspectivas. In: JACCOUD FILHO, D. DE S.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G. (Eds.). . **Mofo Branco**. 1. ed. Ponta Grossa, PR: Todapalavra, 2017. p. 520.

JAIN, A. et al. Microbial consortium-induced changes in oxidative stress markers in pea plants challenged with *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 2, p. 388–398, 2013.

JAIN, A. et al. Phenols enhancement effect of microbial consortium in pea plants restrains *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, v. 89, p. 23–32, 2015.

JANISIEWICZ, W. J.; KURTZMAN, C. P.; BUYER, J. S. Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot. **Yeast**, v. 27, n. 7, p. 389–398, 2010.

JEANDET, P. et al. Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to *Botrytis* attack under natural conditions. **Journal of Phytopathology**, v. 143, n. 3, p. 135–139, 1995.

JIMENEZ-GARCIA, S. N. et al. Current approaches for enhanced expression of secondary metabolites as bioactive compounds in plants for agronomic and human health purposes – a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 63, n. 2, 2013.

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 13, p. 1222–1239, 2009.

KIM, S. et al. UPLC/ESI-MS/MS analysis of compositional changes for organosulfur compounds in garlic (*Allium sativum* L.) during fermentation. **Food Chemistry**, v. 211, p. 555–559, 2016.

KIM, S. M.; KUBOTA, K.; KOBAYASHI, A. Antioxidative activity of sulfur-containing

flavor compounds in garlic. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n. 9, p. 1482–1485, 1997.

KLEIN, M. N.; KUPPER, K. C. Biofilm production by *Aureobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. **Food Microbiology**, v. 69, p. 1–10, 2018.

KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil : atividade de enzimas, síntese de fenóis e lignina e biomassa. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 107–114, 2010.

KUMAR, A. et al. Characterization of an antifungal compound produced by *Bacillus* sp. strain A5F that inhibits *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 670–678, 2012.

KUMAR, P.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**, v. 167, n. 8, p. 493–499, 2012.

KUPPER, K. C. et al. Avaliação de microrganismos antagônicos, controle de *Penicillium digitatum*. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 35, n. 2, p. 425–436, 2013.

KUSANO, M. et al. Unbiased profiling of volatile organic compounds in the headspace of *Allium* plants using an in-tube extraction device. **BMC Research Notes**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2016.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. DE. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, p. 12–20, 2010.

LANZOTTI, V. The analysis of onion and garlic. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1–2, p. 3–22, 2006.

LAWSON, L. D.; HUGHES, B. G. Characterization of the formation of allicin and other thiosulfinates from garlic. **Planta Medica**, v. 58, n. 4, p. 345–350, 1992.

LONDHE, V. P. et al. Review role of garlic (*Allium Sativum*) in various diseases : an overview. **Journal of Pharmaceutical Research and Opinion**, v. 4, p. 129–134, 2011.

MACHADO, M. A. DE C. F.; BETTIOL, W. Potencial para o biocontrole de *Botrytis cinerea* por leveduras em sistema integrado de cultivo de lírio. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 45, n. 6, p. 539–545, 2010.

MARTINS, N.; PETROPOULOS, S.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: a review. **Food Chemistry**, v. 211, p. 41–50, 2016.

MELLO, M. et al. Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 78–83, 2011.

MONTAÑO, A. et al. Effect of genetic characteristics and environmental factors on organosulfur compounds in garlic (*Allium sativum* L.) grown in Andalusia, Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 1301–1307, 2011.

MOROZINI, J. F. et al. A Viabilidade econômica do plantio do alho. **Anais do Congresso Brasileiro de Custos-ABC**, v. 9, p. 1–13, 2005.

MOURA, A. P. DE et al. **Recomendações técnicas para o manejo integrado de pragas da cultura do alho**. Brasília, DF: Embrapa, 2013.

NASCIMENTO, J. B.; BARRIGOSI, J. A. F. O papel de enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian Academy**, v. 1, p. 234–250, 2014.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, n. 1, p. 369–389, 1992.

NUUTILA, A. M. et al. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 81, p. 485–493, 2003.

OKADA, Y. et al. Antioxidant activity of thiosulfinates derived from garlic. **Redox report : communications in free radical research**, v. 10, n. 2, p. 96–102, 2005.

PEREIRA, R. C.; ANGELIS-PEREIRA, M. C. DE. **Compostos fenólicos na saúde humana: do alimento ao organismo**. Lavras, MG: Ed. UFLA, 2014.

PINTO, C. M. F. et al. Production components and yield loss of garlic cultivars planted at different times in a field naturally infested with *Sclerotium cepivorum*. **International Journal of Pest Management**, v. 46, n. 1, p. 67–72, 2000.

PONTIN, M. et al. *Allium sativum* produces terpenes with fungistatic properties in response to infection with *Sclerotium cepivorum*. **Phytochemistry**, v. 115, p. 152–160, 2015.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 9, p. 400–407, 2003.

RAHMAN, M. M. E. et al. Suppressive effects of *Bacillus* spp. on mycelia, apothecia and sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and potential as biological control of white mold on mustard. **Australasian Plant Pathology**, v. 45, n. 1, p. 103–117, 2016.

RAMIREZ, D. A. et al. Analytical methods for bioactive sulfur compounds in *Allium*: An integrated review and future directions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 61, p. 4–19, 2017.

REELEDER, R. D. The use of yeasts for biological control of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **BioControl**, v. 49, n. 5, p. 583–594, 2004.

- REMLEIN-STAROSTA, D. et al. Evaluation of yeast-like fungi to protect Virginia mallow (*Sida hermaphrodita*) against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 96, n. 2, p. 243–251, 2016.
- RESENDE, F. V.; HABER, L. L.; PINHEIRO, J. B. A cultura do Alho. **Embrapa**, 2015.
- RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123–130, 2003.
- RODRÍGUEZ, G. A. A. et al. *Phialomyces macrosporus* decreases anthracnose severity on coffee seedlings by competition for nutrients and induced resistance. **Biological Control**, v. 103, p. 119–128, 2016.
- ROTHWELL, J. A.; KNAZE, V.; ZAMORA-ROS, R. Polyphenols: dietary assessment and role in the prevention of cancers. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 20, n. 6, p. 512–521, 2017.
- SAINI, R. K. et al. Augmentation of major isoflavones in *Glycine max* L. through the elicitor-mediated approach. **Acta Botanica Croatica**, v. 72, n. 2, 2013.
- SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - a review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.
- SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227–236, 2004.
- SHANKAR, S.; SINGH, G.; SRIVASTAVA, R. K. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 12, p. 4839–54, 2007.
- SHARMA, J. et al. *Sclerotinia sclerotiorum* – A threat and challenge for crops. **International Journal of Agricultural and Life Sciences - IJALS**, v. 3, n. 2, p. 188–194, 2017.
- SHEHATA, S. A.; FAWZY, Z. F.; EL-RAMADY, H. R. Response of cucumber plants to foliar application of chitosan and yeast under greenhouse conditions. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 6, n. 4, p. 63–71, 2012.
- SHETTY, K.; WAHLQVIST, M. A model for the role of the proline-linked pentose-phosphate pathway in phenolic phytochemical bio-synthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 1–24, 2004.
- SILVA, E. Y. Y.; MORETTI, C. L.; MATTOS, L. M. Compostos funcionais presentes em bulbilhos de alhos armazenados sob refrigeração, provenientes de cultivos no Brasil e na China. **Ciência Rural**, v. 40, n. 12, p. 2580–2587, 2010.
- SILVA, D. V. G. DA et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e anti-inflamatória do

extrato hidroalcoólico do *Allium sativum* (alho). **Tuiuti: Ciência e Cultura**, v. 43, p. 37–49, 2010.

SLUSARENKO, A. J.; PATEL, A.; PORTZ, D. Control of plant diseases by natural products: Allicin from garlic as a case study. **European Journal of Plant Pathology**, v. 121, n. 3, p. 313–322, 2008.

SOUSA, T. G. DE; BLUM, L. E. B. Uso de *Trichoderma harzianum* e condicionador orgânico de solo para controle da podridão por *Sclerotium rolfsii* em alho. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 1, p. 1616–1623, 2013.

SOUZA, R. J.; MACÊDO, F. S. **Cultura do Alho: tecnologias modernas de produção**. 1. ed. Lavras, MG: UFLA, 2009.

SUNEETA, P.; AIYANATHAN, K. E. A.; NAKKEERAN, S. Efficacy of *Bacillus* spp. in the management of collar rot of *Gerbera* under protected cultivation. **Research on Crops**, v. 17, n. 4, p. 745, 2016.

ÚBEDA, J. F. et al. Bio-prospecting of distillery yeasts as bio-control and bio-remediation agents. **Current Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 594–602, 2014.

VARGAS, M. et al. Isolation and selection of epiphytic yeast for biocontrol of *Botrytis cinerea* Pers. on table grapes. **Chilean journal of agricultural research**, v. 72, n. 3, p. 332–337, 2012.

VINODKUMAR, S. et al. Biocontrol potentials of antimicrobial peptide producing *Bacillus* species: Multifaceted antagonists for the management of stem rot of carnation caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–13, 2017.

WALZ, A. et al. Reactive oxygen intermediates and oxalic acid in the pathogenesis of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, n. 4, p. 317–330, 2008.

WANG, H. et al. Influence of pH, concentration and light on stability of allicin in garlic (*Allium sativum* L.) aqueous extract as measured by UPLC. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 9, p. 1838–1844, 2015.

WU, Y. et al. Biocontrol traits and antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* strain NJZJSB3 against *Sclerotinia sclerotiorum*, a causal agent of canola stem rot. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1327–1336, 2014.

YEH, Y.-Y.; LIU, L. Cholesterol-lowering effect of garlic extracts and organosulfur compounds: human and animal studies. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 3, p. 989S–993S, 2001.

YOO, M. et al. Validation of high performance liquid chromatography methods for Determination of bioactive Sulfur Compounds in Garlic bulbs. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 1619–1626, 2010.

ZANARDO, N. M. T.; PASCHOLATI, S. F.; FIALHO, M. B. Resistência de plântulas de pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* induzida por frações de extrato de *Saccharomyces cerevisiae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1499–1503, 2009.

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM *Allium sativum* L. POR LEVEDURAS E *Bacillus* spp.

RESUMO

O alho (*Allium sativum*) é uma hortaliça que faz parte da tradição popular em todo o mundo e é reconhecida por seus usos alimentícios e medicinais. É uma cultura que pode ser atacada por diversos fitopatógenos, entre eles o *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo branco. O controle biológico é um método eficiente, econômico e que causa menores impactos do que o uso de agroquímicos, apresentando-se como ótima alternativa na prática da agricultura orgânica. Portanto, objetivou-se verificar o efeito de bactérias e leveduras no controle biológico de *S. sclerotiorum* *in vitro* e *in vivo* em *Allium sativum*. Foram testadas duas leveduras *Pichia kudriavzevii* e *Candida labiduridarum* e quatro bactérias *Bacillus acidiceler*, *B. macauenses*, *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus*. Avaliaram-se o efeito de metabólitos antifúngicos voláteis e difusíveis sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* *in vitro*. Para verificar o controle biológico de *S. sclerotiorum* *in vivo* em *Allium sativum* bulbilhos foram imersos em suspensões de cada levedura e bactérias na concentração de 1×10^8 células/ml. Em seguida, foi feita a inoculação do fitopatógeno e os bulbilhos foram mantidos em câmara úmida por 15 dias, quando foi avaliado o diâmetro da lesão. Eletromicrografias foram elaboradas para observação da interação entre o fitopatógeno e os agentes de biocontrole nos bulbilhos de alho. Os resultados evidenciaram maior percentual de inibição no crescimento de *S. sclerotiorum* pelos metabólitos voláteis produzidos por *C. labiduridarum*, *B. macauenses*, *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus*, com variação na inibição do crescimento fúngico de 74,61 % (*C. labiduridarum*) a 87,61 % (*B. pumilus*). Com relação à produção de metabólitos difusíveis, foi observada elevada redução no crescimento de *S. sclerotiorum* na direção de *B. amyloliquefaciens* (84 %), sugerindo que esta produz compostos que inibem o desenvolvimento do fitopatógeno. Não foi observada a inibição do crescimento da colônia do fungo na direção oposta às bactérias e leveduras avaliadas. A redução na área afetada pela doença foi mais expressiva nos bulbilhos de alho tratados com *B. pumilus* (86,74 %) e *C. labiduridarum* (61,47 %). As eletromicrografias mostraram a colonização superficial dos bulbilhos por todos os agentes de biocontrole testados e a colonização das hifas do patógeno por *Pichia kudriavzevii*, *Bacillus acidiceler* e *B. amyloliquefaciens*. Destacaram-se as bactérias *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus* e a levedura *C. labiduridarum* como de interesse em pesquisas para o controle biológico de *S. sclerotiorum* em *A. sativum*.

Palavras-Chave: alho; *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus pumilus*; *Candida labiduridarum*; Biocontrole.

BIOLOGICAL CONTROL OF *Sclerotinia sclerotiorum* IN *Allium sativum* L. BY YEAST AND *Bacillus* spp.

ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum*) is a vegetable that is part of a tradition popular throughout the world and is recognized for its dietary and medicinal uses. It is a crop that can be attacked by several phytopathogens, among them *Sclerotinia sclerotiorum*, which caused the white mold. Biological control is an efficient, economical method and that causes fewer impacts than the use of agrochemicals, presenting itself as a great alternative in the practice of organic agriculture. Therefore, aimed to verify the effect of bacteria and yeast in biological control of *S. sclerotiorum* *in vitro* and *in vivo* in *Allium sativum*. Two yeasts, *Pichia kudriavzevii* and *Candida labiduridarum*, and four bacteria, *Bacillus acidiceler*, *B. macauenses*, *B. amyloliquefaciens* and *B. pumilus* were tested. The effect of volatile and diffusible antifungal metabolites on mycelial growth of *S. sclerotiorum* *in vitro* was evaluated. To verify the biological control of *S. sclerotiorum* *in vivo* garlic cloves were immersed in suspensions of each yeast and bacteria at a concentration of 1×10^8 cells/ml. Then the inoculation of the phytopathogen was carried out and the cloves were kept in a moist chamber for 15 days, when the diameter of the lesion was evaluated. Electromicrographs were elaborated to observe the interaction between the phytopathogen and the biocontrol agents in the garlic cloves. The results showed a higher percentage of inhibition in the growth of *S. sclerotiorum* by the volatile metabolites produced by *C. labiduridarum*, *B. macauenses*, *B. amyloliquefaciens* and *B. pumilus*, with variation in inhibition of fungal growth of 74.61 % (*C. labiduridarum*) to 87.61 % (*B. pumilus*). Regarding the production of antifungal metabolites, a high reduction in the growth of *S. sclerotiorum* in the direction of *B. amyloliquefaciens* (84 %) was observed, suggesting that it produces compounds that inhibit the development of the phytopathogen. No inhibition of fungal colony growth was observed in the opposite direction to the evaluated microorganisms. The reduction in the area affected by the disease was more significant in garlic cloves treated with *B. pumilus* (86.74%) and *C. labiduridarum* (61.47%). Electromicrographs showed the surface colonization of garlic cloves by all tested biocontrol agents and the phytopathogen hyphae colonization by *Pichia kudriavzevii*, *Bacillus acidiceler* and *B. amyloliquefaciens*. Bacteria *B. amyloliquefaciens* and *B. pumilus* and yeast *C. labiduridarum* were of interest in research for the biological control of *S. sclerotiorum* in *A. sativum*.

Key-words: garlic; *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus pumilus*; *Candida labiduridarum*; Biocontrol.

1 INTRODUÇÃO

O alho (*Allium sativum* L.) é uma espécie de hortaliça originária da Ásia, pertencente à família Alliaceae, que faz parte dos hábitos culturais de grande parte da população mundial. É uma planta medicinal utilizada desde a antiguidade no tratamento de várias doenças nos seres humanos, tendo como principais atividades biológicas o combate a infecções, a prevenção ao câncer e a capacidade de baixar a pressão arterial e o colesterol, além de ser empregado como antifúngico, anti-helmínticos, anti-hipertensivo leve, antidiabético, antioxidante, hepatoprotetor, anti-inflamatório e na cicatrização de feridas (BORLINGHAUS et al., 2014; CORZO-MARTÍNEZ; CORZO; VILLAMIEL, 2007; GARCÍA GÓMEZ; SÁNCHEZ-MUNIZ, 2000; LONDHE et al., 2011; YEH; LIU, 2001).

Além de suas aplicações medicinais, é também uma espécie amplamente utilizada como alimentícia e no controle de pragas e doenças (SLUSARENKO; PATEL; PORTZ, 2008), devido à sua composição fitoquímica, em que são encontrados óleos essenciais, compostos sulfurados, carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas, sendo os bulbilhos a parte mais utilizada por ser o local em que os constituintes ativos estão em maior quantidade (CHAGAS et al., 2012; KUSANO et al., 2016).

A ocorrência de fitopatógenos está entre os fatores que pode depreciar a qualidade do produto, além de provocar reduções em sua produção, sendo fundamental o controle da presença e manifestação de pragas e doenças em todo o processo produtivo. A fim de evitar a podridão branca (*Sclerotium cepivorum*), muitos produtores estão adiantando a data de plantio do alho, uma vez que nesse período os solos são mais quentes do que no tempo tradicional de plantio, sendo desfavorável ao desenvolvimento do fitopatógeno (PINTO et al., 2000). Porém, a condição quente e úmida é favorável ao desenvolvimento de outros fitopatógenos, como é o caso do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo branco, que é uma espécie generalista causadora de doenças em mais de 500 espécies em todo o mundo, sendo considerado um dos patógenos de plantas mais devastadores e cosmopolitas (BOLAND; HALL, 1994; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; JACCOUD FILHO et al., 2017; MCDONALD; BOLAND, 2017). Como o alho é uma espécie hospedeira do *S. sclerotiorum* (BOLAND; HALL, 1994; JACCOUD FILHO et al., 2017), o seu plantio em condições que favorecem o crescimento desse patógeno pode propiciar a ocorrência de danos na cultura do alho, além de permitir a manutenção deste fungo no solo sustentando a contaminação de outras culturas que são susceptíveis.

O meio de controle mais utilizado é o químico, cujo uso apresenta grandes riscos para o meio ambiente e para a saúde humana, aumenta os custos da produção, além de não apresentar resultados satisfatórios, pois atuam principalmente controlando a infecção aérea pelos ascósporos, não agindo de maneira eficaz sobre a germinação dos escleródios no solo (CARDOSO; OLIVEIRA; FLOR, 2017). Além disso, o controle do fitopatógeno não é eficaz através de uma única prática cultural ou química, como, por exemplo, o uso de fungicidas ou a rotação cultural com plantas resistentes (SOUSA; BLUM, 2013). Dessa forma, surge a demanda por métodos diversificados para o controle do fitopatógeno, sendo o controle biológico um método bastante estudado pela sua eficiência, por ser mais econômico e causar menores impactos do que o uso de agroquímicos, apresentando-se como uma ótima alternativa na prática da agricultura orgânica.

Nesse contexto, objetivou-se verificar o efeito de leveduras e bactérias do gênero *Bacillus* no controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro* e *in vivo* em *Allium sativum*, (1) através da observação da produção de compostos antifúngicos voláteis e difusíveis *in vitro* e (2) pela redução das lesões mediante o tratamento de semente com os microorganismos antagonistas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e cultivo dos microorganismos antagonistas e do fitopatógeno

As leveduras e bactérias foram obtidas da Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola, da Universidade Federal de Lavras, estando descritos na Tabela 2.1 o código da coleção de cada espécie com os respectivos locais e substratos de origem. Para os primeiros testes, foram escolhidas bactérias conforme gêneros e espécies descritas na literatura como agentes de biocontrole em plantas.

Tabela 2.1 - Microorganismos utilizados, com seus devidos substrato e local de origem.

Código CCMA	Espécie	Local	Substrato
CCMA 0026	<i>Pichia kudriavzevii</i>	Passos, MG, Brasil	Solo úmido
CCMA 0027	<i>Candida labiduridarum</i>	Arcos, MG, Brasil	Solo úmido
CCMA 0057	<i>Bacillus acidiceler</i>	Passos, MG, Brasil	Pimenta-do-Mato
CCMA 0058	<i>Bacillus macauenses</i>	Passos, MG, Brasil	Pimenta-do-Mato
CCMA 0084	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Arcos, MG, Brasil	Ananás
CCMA 0098	<i>Bacillus pumilus</i>	Arcos, MG, Brasil	Pequi

Os isolados dos microorganismos foram cultivados em meio de extrato de levedura – peptona – dextrose (YEPD), sendo constituído por glicose (20 g), peptona (20 g), extrato de levedura (10 g), ágar (15 g) e água destilada (1000 mL). As bactérias e leveduras foram repicadas a cada dois dias para manutenção dos isolados.

O isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* foi obtido a partir de bulbos de *Allium sativum* que apresentava sintomas da doença. Para o isolamento foram coletados sinais do patógeno presentes na lesão no bulbo do alho e posto para crescimento em meio batata – dextrose – ágar (BDA).

2.2 Produção de metabólitos antifúngicos voláteis

O efeito de metabólitos voláteis produzidos pelos isolados de leveduras e bactérias sobre o crescimento de *S. sclerotiorum in vitro* foi avaliado. Para o experimento foram utilizados seis tratamentos, constituídos por cada levedura ou bactéria, e o fitopatógeno como testemunha, com 4 repetições de 1 placa cada.

Um disco do crescimento micelial do fungo foi colocado no centro de uma placa de Petri com 9 cm de diâmetro contendo meio Ágar Nutriente - AN (extrato de carne (3 g), peptona de soja (5 g), ágar (13 g) e água destilada (1000 mL)), e as bactérias e leveduras foram cultivadas por dois dias em outra placa de mesmo tamanho contendo meio YEPD. Em seguida, as placas com os respectivos microorganismos foram unidas com fita adesiva transparente e colocadas em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, ficando a placa do fitopatógeno sobreposta à placa do antagonista (Figura 2.1) (VIEIRA et al., 2017). A medição do crescimento micelial foi realizada ao oitavo dia, tempo decorrido para a testemunha atingir a borda da placa. Avaliou-se o diâmetro do crescimento micelial do fitopatógeno pela mensuração em dois eixos ortogonais, utilizando duas medidas diametralmente opostas.

Figura 2.1 – Esquema de montagem das placas para avaliação dos metabólitos antifúngicos voláteis.



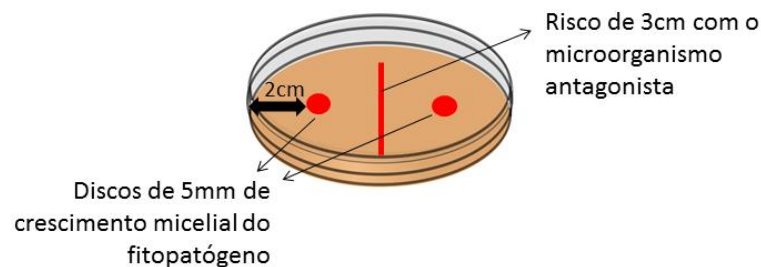
Fonte: Do autor (2018).

2.3 Produção de metabólitos antifúngicos difusíveis

O experimento foi realizado em placas de Petri contendo meio AN, onde discos de 5 mm de diâmetro contendo crescimento de *S. sclerotiorum* foram colocados a 2 cm da borda da placa e uma alça de crescimento das bactérias e leveduras foi espalhada em forma de risco com 3 cm no centro da placa (Figura 2.2) (ROSA et al., 2010). Cada microorganismo constituiu um tratamento, sendo utilizada uma testemunha contendo apenas o fitopatógeno. Fez-se 4 repetições para cada tratamento, sendo cada repetição constituída de 1 placa de Petri.

As placas foram encubadas em BOD à temperatura de ± 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. O crescimento micelial foi realizado oito dias após a incubação, quando a testemunha atingiu a borda da placa medindo-se o crescimento micelial na direção do risco central e na direção oposta.

Figura 2.2 – Esquema de montagem da placa para avaliação dos metabólitos antifúngicos difusíveis.



Fonte: Do autor (2018).

2.4 Avaliação de leveduras e *Bacillus* spp. no controle de *S. sclerotiorum* em alho

Para avaliar o efeito de leveduras e bactérias do gênero *Bacillus* no controle de *Sclerotinia sclerotiorum in vivo* foram utilizados bulbilhos de alho cultivar Gigante roxo. O experimento foi realizado baseando-se nas metodologias descritas por Rahman et al. (2016) e Mello et al. (2011) com algumas adaptações, conforme descrito a seguir.

A partir de placas de Petri contendo as leveduras e bactérias, com 4 dias de crescimento, foram preparadas suspensões aquosas. Foram adicionados 50 ml de água destilada esterilizada às placas de Petri e feita a suspensão utilizando alça de drigalski, ajustando-as para a concentração de 1×10^8 células/mL.

Para a microbiolização os bulbilhos de alho foram imersos na suspensão durante 1 hora e, em seguida, colocados para secar em placas de Petri por 30 minutos. Decorrido esse

tempo foi feita a inoculação do fitopatógeno. Para isso, discos de 3 mm de diâmetro com 8 dias de crescimento micelial do fitopatógeno foram colocados na superfície dos bulbilhos e estes foram mantidos em câmara úmida, à temperatura ambiente (28 ± 3 °C), durante 15 dias. As câmaras úmidas foram constituídas de bases de placa de Petri, onde os bulbilhos foram incubados, com um algodão umedecido em água destilada esterilizada no centro da placa, acondicionados em saco plástico borrifado com água destilada esterilizada (DANTAS et al., 2003).

Para o experimento foram feitos seis tratamentos, constituídos de cada microorganismo individualmente e duas testemunhas, uma positiva, que foi tratada apenas com água destilada esterilizada e inoculada com o fitopatógeno, e uma negativa, a qual foi tratada com água destilada esterilizada sem inoculação do fitopatógeno. Utilizou-se 6 repetições para cada tratamento, sendo cada uma constituída por 2 bulbilhos.

Aos 15 dias os bulbilhos foram retirados da câmara úmida e foi realizada a medição do diâmetro das lesões utilizando paquímetro eletrônico. As medições foram feitas em duas direções, sendo a média das medições utilizada para a avaliação do desenvolvimento da doença.

2.5 Microscopia eletrônica de varredura

Ao final do experimento descrito anteriormente foram coletados fragmentos dos bulbilhos de alho de cada tratamento para observação da interação do fitopatógeno com os microorganismos por imagens geradas em microscópio eletrônico de varredura. Os fragmentos coletados foram imediatamente fixados em solução Karnovsky modificada (Glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, CaCl_2 0,001M), por um período de 24 horas no mínimo. Para o preparo das amostras, os fragmentos fixados foram transferidos para uma solução-tampão de cacodilato (0,05M) e lavados por três vezes durante 10 minutos. Em seguida, foram lavados em água destilada por três vezes e desidratados em soluções com concentrações crescentes de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%). Posteriormente, foram levados à secagem ao ponto crítico com CO_2 líquido em aparelho Balzers CPD 030; em seguida, montados em suportes de alumínio (stubs) e cobertos com ouro (evaporador Balzers SCD 050) para observação em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 (ALVES, 2005).

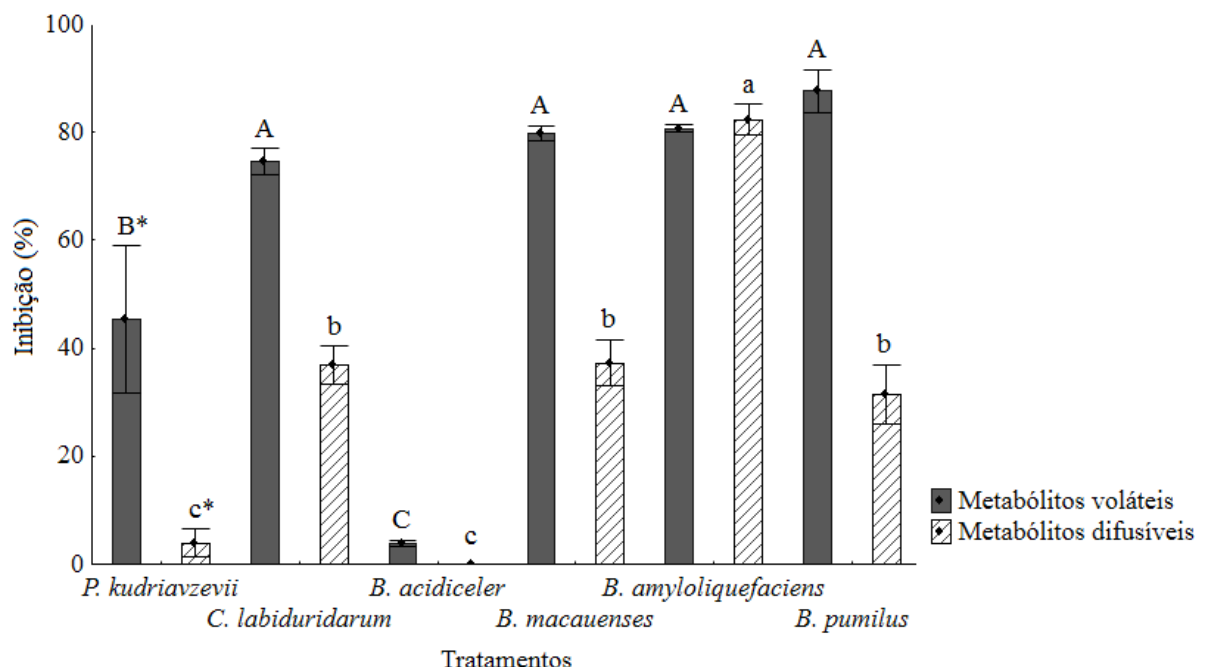
2.6 Avaliação dos resultados

Os dados foram avaliados quanto à sua homogeneidade e normalidade. Confirmados esses parâmetros, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, utilizando a versão gratuita do software STATISTICA versão 10 (STATSOFT, INC., 2011).

3 RESULTADOS

O experimento de inibição através de compostos voláteis produzidos pelos microorganismos evidenciou maior percentual de inibição no crescimento da colônia de *S. sclerotiorum* pelos compostos produzidos por *C. labiduridarum*, *B. macauenses*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, tendo a inibição do crescimento fúngico variado de 74,61 % (*C. labiduridarum*) a 87,61 % (*B. pumilus*) (Figura 2.3, A). A menor taxa de inibição ocorreu pelo *B. acidiceler* (3,78 %).

Figura 2.3 – Inibição do crescimento (%) da colônia de *Sclerotinia sclerotiorum* através da produção de metabólitos antifúngicos voláteis e difusíveis.



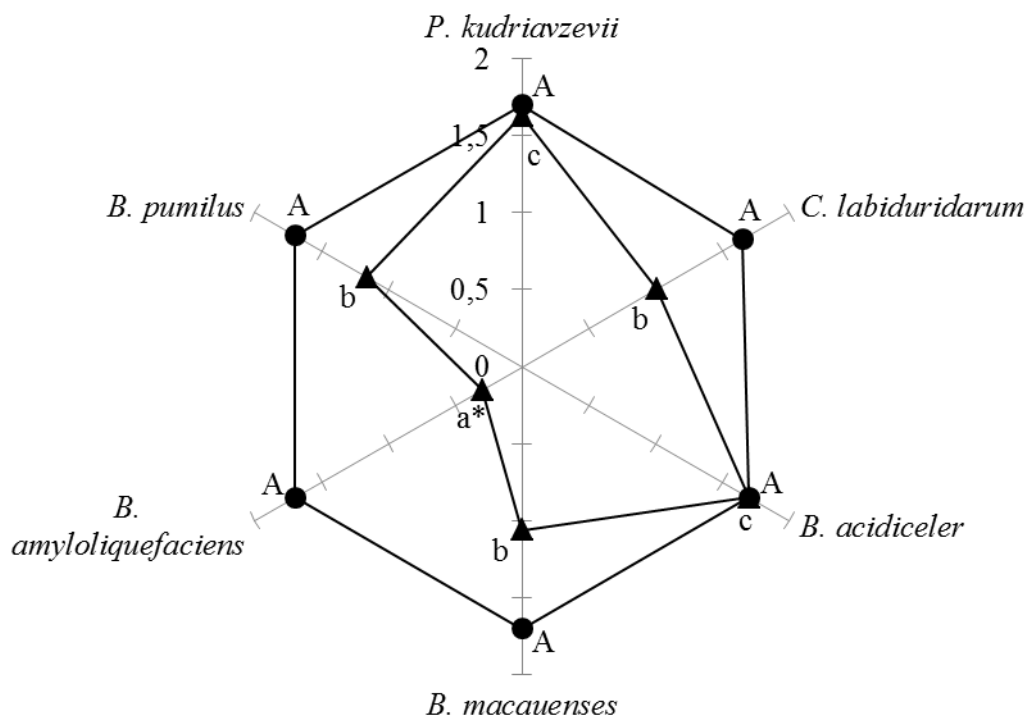
Legenda: *Barras com letras maiúsculas (metabólitos voláteis) e minúsculas (metabólitos difusíveis) iguais não diferem entre si no teste Tukey ($p < 0,05$).

Com relação à produção de metabólitos antifúngicos difusíveis, a Figura 2.4 apresenta o crescimento do fungo (cm) a partir do centro do gráfico até a extremidade na direção de

cada microorganismo antagonista (▲) e na direção oposta ao microorganismo antagonista (●). Dessa forma, observa-se que houve inibição do crescimento da colônia de *S. sclerotiorum* na direção de *B. amyloliquefaciens*, sugerindo a produção de compostos pela bactéria que inibem o desenvolvimento da colônia, sendo este efeito mais acentuado que aquele verificado nos demais microorganismos. A levedura *C. labiduridarum* e as bactérias *B. macauenses* e *B. pumilus* também apresentaram produção de metabólitos antifúngicos que ocasionaram menor inibição no crescimento do fitopatógeno quando comparada com o *B. amyloliquefaciens*.

A bactéria *B. acidiceler* e a levedura *P. kudriavzevii* não apresentaram inibição no crescimento da colônia, sugerindo a não produção de compostos antifúngicos ou uma baixa eficiência dos compostos produzidos (Figura 2.4).

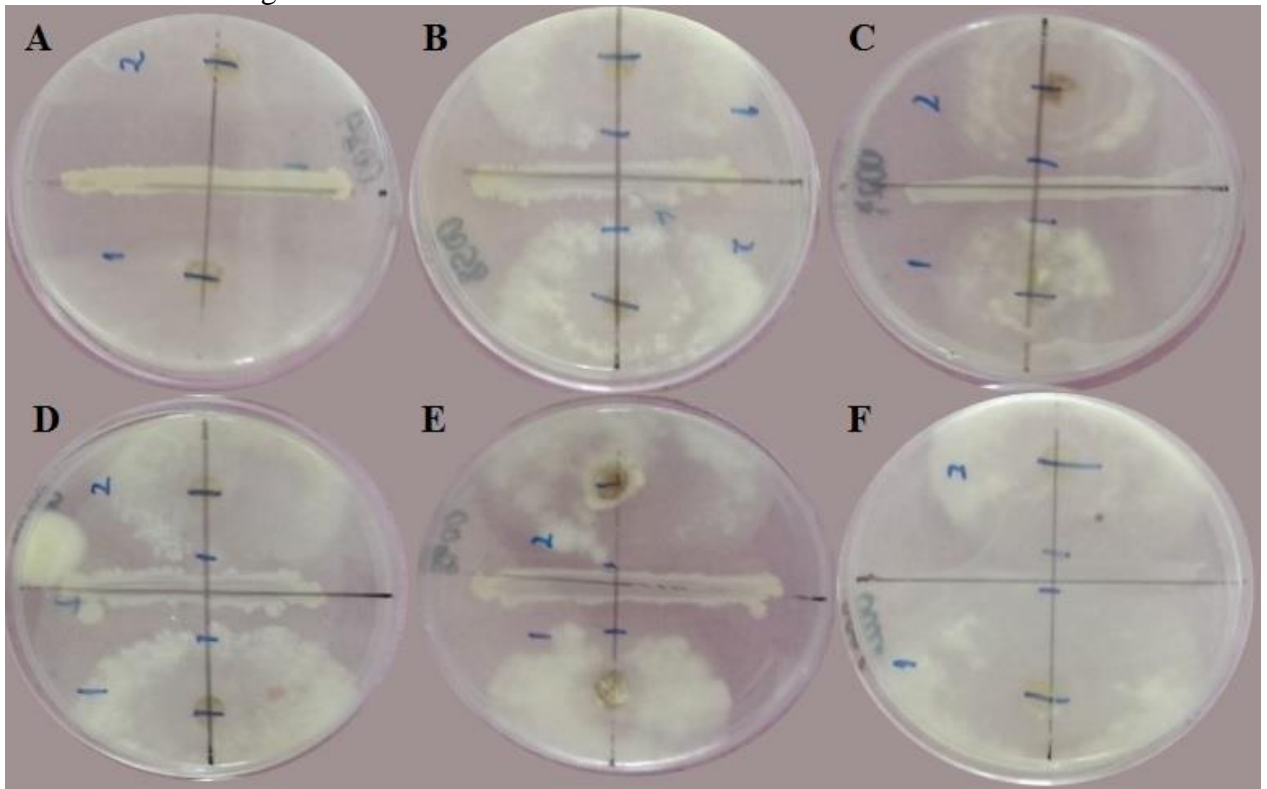
Figura 2.4 – Desenvolvimento da colônia de *S. sclerotiorum* em placa de Petri em conjunto com os microorganismos antagonistas.



Legenda: Crescimento da colônia (cm) do fitopatógeno na direção do microorganismo (▲) e crescimento do fungo na direção da face oposta ao microorganismo (●). *Letras minúsculas (▲) e letras maiúsculas (●) iguais não diferem entre si no teste Tukey ($p < 0,05$).

Não foi observada inibição do crescimento da colônia do fungo na direção oposta ao microorganismo antagonista (Figura 2.4, círculos). As diferenças entre os tratamentos na inibição do crescimento do fungo, no teste de produção de metabólitos antifúngicos, podem ser observadas na Figura 2.5.

Figura 2.5 – Ilustração do experimento de produção de metabólitos antifúngicos no controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro*.



Legenda: A – *Bacillus amyloliquefaciens*; B – *Bacillus macauenses*; C – *Candida labiduridarum*; D – *Pichia kudriavzevii*; E – *Bacillus pumilus*; F – *Bacillus acidiceler*.

O percentual de inibição do crescimento fúngico ocasionado pela bactéria *B. amyloliquefaciens* foi superior a 80 % (Figura 2.3, B), mostrando que o seu uso no controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* pode ser promissor.

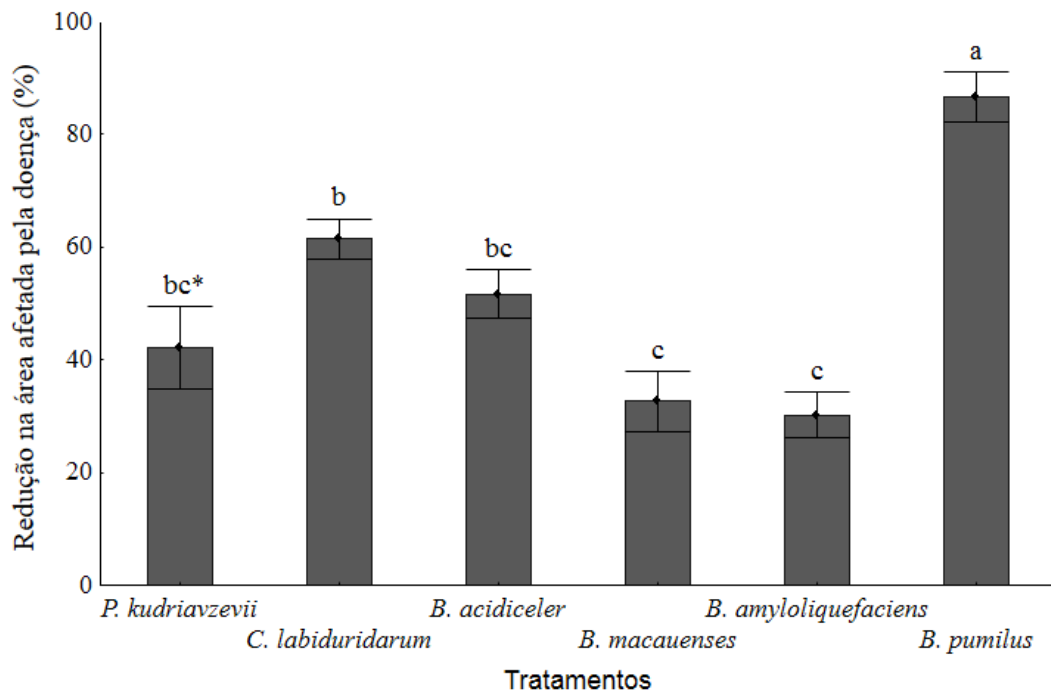
Também foi observada redução nos sintomas da doença causada por *S. sclerotiorum* nos bulbilhos de alho tratados com os microorganismos (Tabela 2.2 e Figura 2.6). Os menores diâmetros de lesão foram observados nos bulbilhos tratados com *B. pumilus* (0,69 mm) e *Candida labiduridarum* (2,02 mm) (Tabela 2.2). O maior controle foi ocasionado pelo tratamento com *B. pumilus*, em que foi registrada a maior redução na área afetada pela doença (86,8 %) quando comparado aos demais tratamentos, que variaram entre 30,18 % para *B. amyloliquefaciens* e 61,47 % para *C. labiduridarum*. As lesões causadas por *S. sclerotiorum* nos bulbilhos de *A. sativum* e a redução na área afetada pela doença nos diferentes tratamentos podem ser observadas na Figura 2.7.

Tabela 2.2 – Diâmetro da lesão (mm) de *Sclerotinia sclerotiorum* em bulbilhos de alho tratados com diferentes microorganismos.

Microorganismos	Diâmetro da lesão (mm)
<i>Pichia kudriavzevii</i>	3,13 bc*
<i>Candida labiduridarum</i>	2,02 ab
<i>Bacillus acidiceler</i>	2,53 bc
<i>Bacillus macauenses</i>	3,53 c
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	3,66 c
<i>Bacillus pumilus</i>	0,69 a
Testemunha	5,24 d

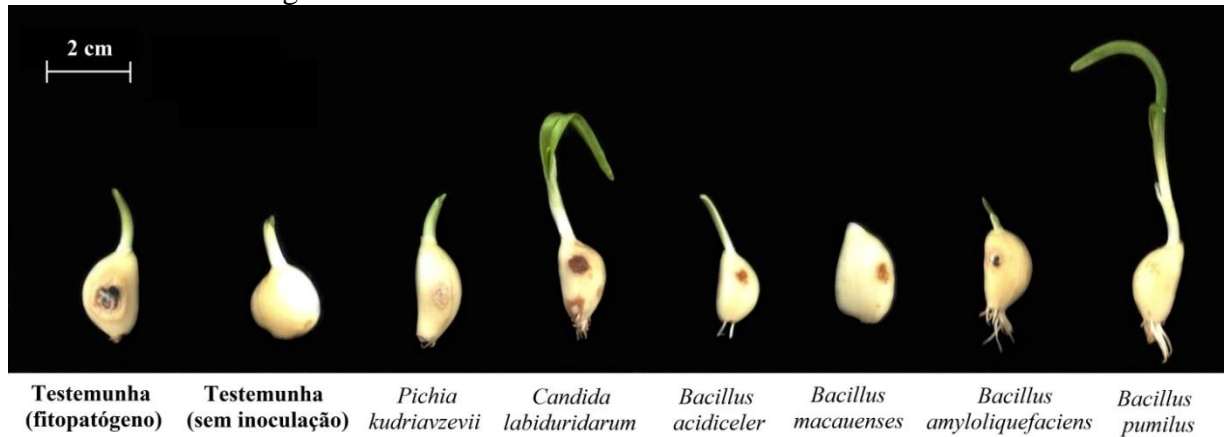
Legenda: *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si no teste Tukey ($p < 0,05$).

Figura 2.6 – Percentual de redução na área afetada pela doença causada por *Sclerotinia sclerotiorum* em bulbilhos de *Allium sativum* tratados com diferentes microorganismos antagonistas.



Legenda: *Barras com letras iguais não diferem entre si no teste Tukey ($p < 0,05$).

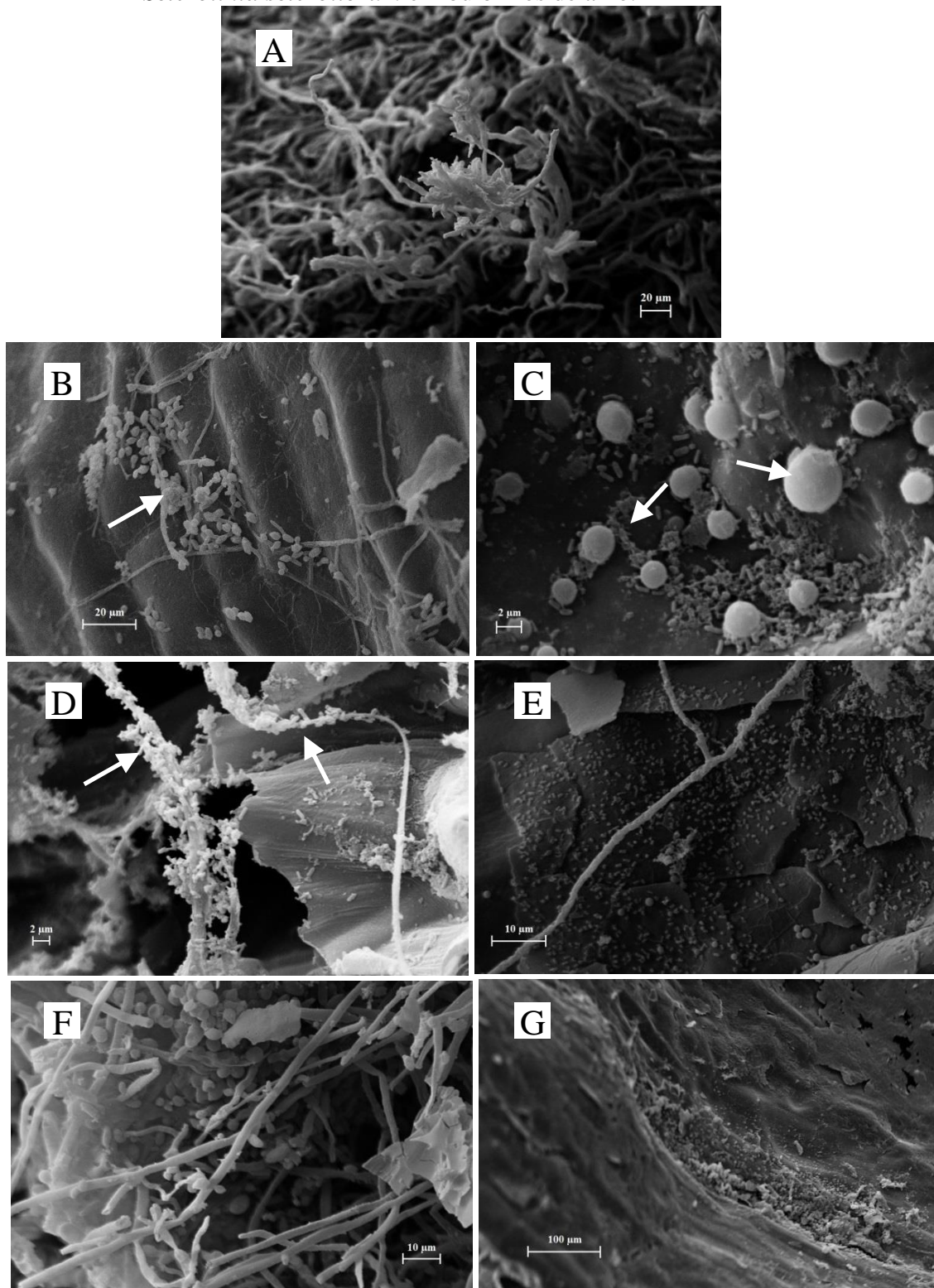
Figura 2.7 – Ilustração do experimento de avaliação dos microorganismos no controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* *in vivo*.



A análise através de imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrou os diferentes agentes de biocontrole colonizando camadas superficiais dos bulbilhos de alho, bem como sua interação com o fitopatógeno (Figura 2.8).

As eletromicrografias também permitem notar a interação entre os microorganismos antagonistas e o fitopatógeno através da colonização das hifas, podendo provocar alterações na morfologia das hifas de *S. sclerotiorum*, auxiliando na contenção da infecção por parte delas, como observado para a levedura *Pichia kudriavzevii* e para as bactérias *Bacillus acidiceler* e *B. amyloliquefaciens* (Figura 2.8).

Figura 2.8 – Eletromicrografias de varredura da interação de leveduras e *Bacillus* com *Sclerotinia sclerotiorum* em bulbilhos de alho.



Legenda: A – Fitopatógeno colonizando o alho sem a inoculação de agentes de biocontrole; B – *Pichia kudriavzevii* colonizando as hifas do fungo (seta); C – *Candida labiduridarum* e bactérias na superfície do alho (seta indicando as leveduras), D – *Bacillus acidiceler* com a seta indicando sua colonização nas hifas do fitopatógeno, E – *Bacillus macauenses* colonizando a superfície do alho, F – Interação entre *Bacillus amyloliquefaciens* e o fitopatógeno, G – Colonização superficial do bulbilho de alho por *Bacillus pumilus*.

4 DISCUSSÃO

Os testes *in vitro* têm sido eficientes para identificar a produção de compostos voláteis por microorganismos que possuem potencial de uso no controle biológico dos principais fitopatógenos. Quatro dos microorganismos utilizados no ensaio de produção de metabólitos antifúngicos voláteis foram eficientes na inibição da colônia do fitopatógeno, indicando a produção de compostos voláteis, uma vez que não havia contato entre o fitopatógeno e o antagonista, e ressaltando a simplicidade e eficiência da metodologia de avaliação *in vitro* da produção desses compostos.

Embora o efeito de compostos voláteis produzidos por bactérias possa ser considerado baixo (15 a 26 %) a moderado (28 a 53 %) no controle de fungos fitopatogênicos, algumas espécies produzem compostos eficazes que atuam na diminuição do crescimento micelial e na germinação dos conídios de fitopatógenos (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010). Os resultados obtidos neste estudo apresentaram variações entre 45,4 e 74,61 % no percentual de inibição no crescimento micelial de *S. sclerotiorum* pelos compostos voláteis produzidos pelas leveduras *Pichia kudriavzevi* e *Candida labiduridarum*, respectivamente, e entre 3,78 e 87,61 % pelas bactérias *Bacillus acidiceler* e *B. pumilus*, respectivamente (Figura 2.3, A). Fernando et al. (2005) também verificaram a produção de compostos orgânicos voláteis com atividade antifúngica em bactérias isoladas de plantas de canola e soja, os quais agiram inibindo a formação de escleródios e a germinação de ascósporos, além de limitar o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum in vitro* e em testes de solo, reduzindo os níveis de doenças. Fialho et al. (2011) verificaram o controle de *S. sclerotiorum in vitro* e a redução na incidência da doença em sementes de feijão através de compostos orgânicos voláteis produzidos pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Entre as bactérias identificadas por Zou et al. (2007) que produzem compostos voláteis com atividade antifúngica, duas cepas de *Bacillus pumilus* apresentaram inibição no crescimento micelial de *Paecilomyces lilacinus* oscilando entre 65,2% e 100%. Campos, Pinho e Freire (2010), em sua revisão, observaram isolados de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus pumilus* com atividade antifúngica contra diversos fitopatógenos, entre eles o *Sclerotinia sclerotiorum*. Foram observados resultados satisfatórios por estas duas bactérias nos ensaios *in vitro*, com redução no crescimento micelial de *S. sclerotiorum* de 87,61 e 80,75 % por metabólitos antifúngicos voláteis produzidos por *B. pumilus* e *B. amyloliquefaciens*, respectivamente, e de 82,35 % por metabólitos antifúngicos difusíveis produzidos por *B. amyloliquefaciens*.

O teste de produção de metabólitos antifúngicos difusíveis identificou a bactéria *B. amyloliquefaciens* como altamente eficiente (acima de 80 %) na inibição do crescimento das hifas de *S. sclerotiorum* e identificaram mais duas bactérias (*Bacillus pumilus* e *B. macauenses*) e uma levedura (*Candida labiduridarum*) com potencial moderado (31,37 - 37,25 %) no controle do fitopatógeno. A produção de metabólitos secundários também tem sido amplamente estudada para aplicação no controle biológico das principais doenças de plantas. Já é comprovado que algumas estirpes de *Bacillus amyloliquefaciens* produzem lipopeptídeos como a C17 bacillomicina D, anteiso-C13 e surfactinas iso-C13 com expressiva ação antifúngica, sendo comprovada sua atuação no controle de *Botrytis cinerea* em tomate e pepino (MASMOUDI et al., 2017; TANAKA et al., 2015). A produção de metabólitos pode explicar a elevada eficiência dessa bactéria na inibição do crescimento da colônia de *S. sclerotiorum* nos testes feitos *in vitro*.

Não foi observada inibição do crescimento da colônia do fungo na direção oposta do microorganismo antagonista (Figura 2.4, círculos), o que sugere que a inibição do desenvolvimento do fitopatógeno está associada à proximidade deste aos microorganismos avaliados, reforçando a possibilidade da produção de compostos inibitórios por parte das bactérias e leveduras. Suneeta, Aiyathan e Nakkeeran (2016) observaram o controle de *Sclerotium rolfii* por isolados de *Bacillus* através de antibiose, com ação destes microorganismos no campo através da liberação de compostos extracelulares, substâncias antimicrobianas e hormônios vegetais na rizosfera, provocando redução no desenvolvimento de doenças, além de auxiliar no crescimento das plantas e ajudar na absorção de nutrientes presentes no solo.

O comportamento do *B. amyloliquefaciens* foi satisfatório nos dois experimentos com produção de metabólitos antifúngicos voláteis e difusíveis nas avaliações *in vitro*, demonstrando seu potencial para aplicação no controle de fitopatógenos. Esse microorganismo já foi utilizado como alternativa aos produtos químicos no controle da podridão marrom, causada por *Monilinia laxa* e *Monilinia fructicola*, reduzindo mais de 60,0 e 75,5 % da incidência e severidade dessa doença em frutos de pêssego em condições laboratoriais, na concentração de 10^7 UFC/ml (GOTOR-VILA et al., 2017).

No estudo de Vinodkumar et al. (2017), *Bacillus amyloliquefaciens* inibiu 45% do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e 100% da sua produção de escleródios nos testes *in vitro*. Essa bactéria também exibiu menor incidência do mofo branco (4,6 %), além de promover o crescimento das plantas de cravo (*Dianthus caryophyllus*) que foram imersas em suspensão bacteriana para os testes *in vivo* (VINODKUMAR et al., 2017). A aplicação de *B.*

amyloliquefaciens na concentração de 10^8 células/ml para o controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* em bulbilhos de *Allium sativum* apresentou uma redução de 31,29 % na área afetada pelo mofo branco (Figura 2.6) e *in vitro* apresentou uma inibição de 82,35 % no desenvolvimento do patógeno (Figura 2.3, B), demonstrando novamente o potencial de controle biológico por parte dessa bactéria.

Já foi constatada ação antifúngica contra *Aspergillus parasiticus* através de compostos extracelulares de baixo peso molecular produzidos pela bactéria *Bacillus pumilus*, que atuam inibindo a germinação de esporos e o desenvolvimento das hifas, além de inibirem a produção de aflatoxinas (BOTTONI; PELUSO, 2003; MUNIMBAZI; BULLERMAN, 1997). A aplicação de *B. pumilus* no alho apresentou resultado satisfatório no controle biológico de *S. sclerotiorum*, o que pode estar relacionado à produção de metabólitos antifúngicos. Além disso, o resultado da bactéria *Bacillus pumilus* no ensaio *in vivo* em *Allium sativum* foi mais expressivo do que nos testes de paridade *in vitro*. Este episódio pode estar relacionado a um efeito de indução de resistência provocada por esta bactéria no alho, aumentando a eficiência no controle do fitopatógeno, sendo necessários mais estudos para confirmar esta atividade.

O fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* é de difícil controle e a falta de resistência genética contra este patógeno levou Bochalya et al. (2016) a estudar indução de resistência sistêmica em mostarda indiana (*Brassica juncea* L.) através do tratamento com rizobactérias, observando maiores médias no controle da doença com a aplicação de *Pseudomonas* e *Bacillus* relacionadas com os maiores teores de fenólicos totais e atividade da polifenol oxidase (PPO), fenilalanina amônia liase (PAL), peroxidase (PO) e quitinase.

A ação inibitória causada por microorganismos na germinação de conídios e desenvolvimento de colônia de fitopatógenos é um dos principais mecanismos de ação buscado pelas principais pesquisas de controle biológico envolvendo bactérias e leveduras. Essa ação pode estar relacionada à antibiose ou ao parasitismo, na qual o microorganismo coloniza e inviabiliza as estruturas do fitopatógeno, como observado em algumas estirpes de *Trichoderma* em estudos no controle de *S. rolfsii* (HIRPARA et al., 2017). Contra o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, há o relato de uma espécie de *Aspergillus* (estirpe ASP-4) que parasita e destrói os seus escleródios (HU et al., 2013), além da espécie *Coniothyrium minitans*, que através de micoparasitismo e antibiose é capaz de degradar o ácido oxálico, importante fator de virulência desse fitopatógeno (ZENG et al., 2014). Também actinobactérias do gênero *Streptomyces* isoladas de solos tropicais brasileiros foram capazes de inibir irreversivelmente o crescimento de *S. sclerotiorum* através da produção de enzimas quitinolíticas, como exoquitinase, endoquitinase, glucanase e peptidase, que degradaram a

parede celular das hifas e dos escleródios do fungo (FRÓES et al., 2012). A colonização das hifas do fitopatógeno por agentes de biocontrole também foi observada nesse trabalho pela levedura *Pichia kudriavzevii* e pelas bactérias *Bacillus acidiceler* e *B. amyloliquefaciens*, indicando possível ocorrência de parasitismo no controle biológico do fungo.

Além da antibiose, da indução de resistência sistêmica e do micoparasitismo (CHAURASIA et al., 2005; DROBY et al., 2002; GOND et al., 2015; HUANG et al., 2012), as leveduras e bactérias também agem através da competição por nutrientes e exclusão de nicho, uma vez que apresentam capacidade de colonizar rapidamente por serem organismos unicelulares, com taxa de crescimento maior do que os fungos filamentosos que são multicelulares (SUN et al., 2017; ÚBEDA et al., 2014). Estas diversas habilidades desenvolvidas pelos microorganismos antagonistas, como a antibiose, micoparasitismo, competição por nutrientes e espaço, entre outras, desempenham importante papel no controle biológico de fitopatógenos, como o *S. sclerotiorum*, destacando-se o fato de que podem agir por meio de mais de um destes mecanismos de ação, aumentando sua eficiência.

Nas eletromicrografias foi possível observar a colonização da superfície de *Allium sativum* pelos microorganismos antagonistas testados, indicando potencial para a competição por nutrientes e espaço e exclusão de nicho, assim como para a formação de biofilmes (Figura 2.8, B-G). Rahman et al. (2016) observaram a formação de biofilmes por todos os isolados de *Bacillus* testados contra *S. sclerotiorum*. O biofilme é um importante mecanismo para a colonização na superfície das raízes e folhas que auxilia na prevenção de diversos fitopatógenos. Chi et al. (2015) também verificaram a formação de biofilme pela levedura *Pichia kudriavzevii*, observando que este, além de estar envolvida na atividade de controle biológico, também trata-se de uma forma morfológica mais resistente à temperaturas elevadas e ao estresse oxidativo.

Kaushal, Kumar e Kaushal (2017) observaram o controle biológico do mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* em couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) através da aplicação da suspensão de células de *Bacillus pumilus* (1×10^8 UFC/ml), suprimindo a severidade da doença em 93% e aumentando a produtividade da cultura em 36%, tratando-se de uma bactéria potencial tanto no biocontrole quanto na promoção de crescimento de plantas. No presente trabalho, a bactéria *B. pumilus* foi a que apresentou maior redução na área afetada pelo mofo branco em bulbilhos *Allium sativum*, atingindo cerca de 86,74 % (Figura 2.6), sendo relevante mais pesquisas para verificar o seu efeito no campo, tanto para o controle de *S. sclerotiorum*, quanto para a produtividade de *A. sativum*.

5 CONCLUSÃO

Os microorganismos antagonistas apresentaram efeito no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, destacando-se *Bacillus amyloliquefaciens* e *B. pumilus* entre as bactérias testadas, e *Candida labiduridarum* entre as leveduras.

Bacillus amyloliquefaciens produz compostos inibitórios para o desenvolvimento de *Sclerotium sclerotiorum in vitro*.

Bacillus pumilus e *Candida labiduridarum* apresentaram maior redução no diâmetro das lesões no teste *in vivo*, exibindo potencial para uso no controle biológico de *S. sclerotiorum* em *Allium sativum*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Capes e ao CNPq pela concessão de bolsas de mestrado e doutorado; à Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela estrutura fornecida para a realização dos experimentos e ao apoio técnico dos professores; e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras, (<http://www.prp.ufla.br/labs/microscopiaeletronica/>) e a FINEP, FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo fornecimento dos equipamentos e suporte técnico para experimentos envolvendo microscopia eletrônica.

REFERÊNCIAS

ALVES, E. **Curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras, MG: UFLA, 2005.

BOCHALYA, M. S. et al. Effect of rhizobacterial isolates on resistance induction and biochemical composition of Indian mustard due to stem rot infection caused by *Sclerotinia sclerotiorum* under screen house conditions. **Annals of Biology**, v. 32, n. 2, p. 209–214, 2016.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93–108, 1994.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.

BORLINGHAUS, J. et al. Allicin: chemistry and biological properties. **Molecules**, v. 19, n. 8,

p. 12591–12618, 2014.

BOTTONE, E. J.; PELUSO, R. W. Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against Mucoraceae and *Aspergillus* species: Preliminary report. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 69–74, 2003.

CAMPOS, V. P.; PINHO, R. S. C. DE; FREIRE, E. S. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 3, p. 525–535, 2010.

CARDOSO, C. R.; OLIVEIRA, C. B. DE; FLOR, I. DA M. Agentes biológicos como alternativa no controle do mofo branco. In: JACCOUD FILHO, D. DE S.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G. (Eds.). . **Mofo Branco**. 1. ed. Ponta Grossa, PR: Todapalavra, 2017. p. 520.

CHAGAS, F. C. et al. *Allium sativum* L. na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares. **BioFar**, v. 7, n. 2, p. 1–11, 2012.

CHAURASIA, B. et al. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. **Microbiological Research**, v. 160, n. 1, p. 75–81, 2005.

CHI, M. et al. Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. **Biological Control**, v. 90, p. 113–119, 2015.

CORZO-MARTÍNEZ, M.; CORZO, N.; VILLAMIEL, M. Biological properties of onions and garlic. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 12, p. 609–625, 2007.

DANTAS, S. A. F. et al. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 528–533, 2003.

DROBY, S. et al. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Phytopathology**, v. 92, n. 4, p. 393–399, 2002.

FERNANDO, W. G. D. et al. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 955–964, 2005.

FIALHO, M. B. et al. Potential of antimicrobial volatile organic compounds to control *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 2, p. 137–142, 2011.

FRÓES, A. et al. Selection of a *Streptomyces* strain able to produce cell wall degrading enzymes and active against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 798–806, 2012.

GARCÍA GÓMEZ, L. J.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Revisión: Efectos cardiovasculares del

ajo (*Allium sativum*). **Archivos Latinoamericanos de nutrición**, v. 50, n. 3, p. 219–229, 2000.

GOND, S. K. et al. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. **Microbiological Research**, v. 172, p. 79–87, 2015.

GOTOR-VILA, A. et al. Biological control of brown rot in stone fruit using *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 under field conditions. **Crop Protection**, v. 102, p. 72–80, 2017.

HIRPARA, D. G. et al. Inhibition coefficient and molecular diversity of multi stress tolerant *Trichoderma* as potential biocontrol agent against *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 55, p. 75–92, 2017.

HU, X. et al. A new mycoparasite, *Aspergillus* sp. ASP-4, parasitizes the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Crop Protection**, v. 54, p. 15–22, 2013.

HUANG, X. et al. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. **Microbiological Research**, v. 167, n. 3, p. 135–143, 2012.

JACCOUD FILHO, D. DE S. et al. Mofo branco: introdução, histórico, situação atual e perspectivas. In: JACCOUD FILHO, D. DE S.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G. (Eds.). . **Mofo Branco**. 1. ed. Ponta Grossa, PR: Todapalavra, 2017. p. 520.

KAUSHAL, M.; KUMAR, A.; KAUSHAL, R. *Bacillus pumilus* strain YSPMK11 as plant growth promoter and bicontrol agent against *Sclerotinia sclerotiorum*. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, p. 90, 2017.

KUSANO, M. et al. Unbiased profiling of volatile organic compounds in the headspace of *Allium* plants using an in-tube extraction device. **BMC Research Notes**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2016.

LONDHE, V. P. et al. Review role of garlic (*Allium Sativum*) in various diseases : an overview. **Journal of Pharmaceutical Research and Opinion**, v. 4, p. 129–134, 2011.

MASMOUDI, F. et al. Combinatorial effect of mutagenesis and medium component optimization on *Bacillus amyloliquefaciens* antifungal activity and efficacy in eradicating *Botrytis cinerea*. **Microbiological Research**, v. 197, p. 29–38, 2017.

MCDONALD, M. R.; BOLAND, G. J. Biology and management of *Sclerotinia* diseases in vegetables. In: JACCOUD FILHO, D. DE S.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G. (Eds.). . **Mofo Branco**. 1. ed. Ponta Grossa, PR: Todapalavra, 2017. p. 520.

MELLO, M. et al. Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 78–83, 2011.

MUNIMBAZI, C.; BULLERMAN, L. B. Inhibition of aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by *Bacillus pumilus*. **Mycopathologia**, v. 140, n. 3, p. 163–169, 1997.

PINTO, C. M. F. et al. Production components and yield loss of garlic cultivars planted at different times in a field naturally infested with *Sclerotium cepivorum*. **International Journal of Pest Management**, v. 46, n. 1, p. 67–72, 2000.

RAHMAN, M. M. E. et al. Suppressive effects of *Bacillus* spp. on mycelia, apothecia and sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and potential as biological control of white mold on mustard. **Australasian Plant Pathology**, v. 45, n. 1, p. 103–117, 2016.

ROSA, M. M. et al. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulasporea globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 1491–1502, 2010.

SLUSARENKO, A. J.; PATEL, A.; PORTZ, D. Control of plant diseases by natural products: Allicin from garlic as a case study. **European Journal of Plant Pathology**, v. 121, n. 3, p. 313–322, 2008.

SOUSA, T. G. DE; BLUM, L. E. B. Uso de *Trichoderma harzianum* e condicionador orgânico de solo para controle da podridão por *Sclerotium rolfsii* em alho. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 1, p. 1616–1623, 2013.

STATSOFT, I. **Statistica (data analysis software system)**, 2011. Disponível em: <www.statsoft.com>

SUN, G. et al. Identification and biocontrol potential of antagonistic bacteria strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and their growth-promoting effects on *Brassica napus*. **Biological Control**, v. 104, p. 35–43, 2017.

SUNEETA, P.; AIYANATHAN, K. E. A.; NAKKEERAN, S. Efficacy of *Bacillus* spp. in the management of collar rot of *Gerbera* under protected cultivation. **Research on Crops**, v. 17, n. 4, p. 745, 2016.

TANAKA, K. et al. Synergistic effects of [Ile⁷] surfactin homologues with Bacillomycin D in suppression of gray mold disease by *Bacillus amyloliquefaciens* biocontrol strain SD-32. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 22, p. 5344–5353, 2015.

ÚBEDA, J. F. et al. Bio-prospecting of distillery yeasts as bio-control and bio-remediation agents. **Current Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 594–602, 2014.

VIEIRA, B. S. et al. Potencial antagonístico do isolado bacteriano (BSV-05) contra os patógenos radiculares do feijoeiro: *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. **Revista Ciência Agrícola**, v. 14, n. 1, p. 59–66, 2017.

VINODKUMAR, S. et al. Biocontrol potentials of antimicrobial peptide producing *Bacillus* species: Multifaceted antagonists for the management of stem rot of carnation caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–13, 2017.

YEH, Y.-Y.; LIU, L. Cholesterol-lowering effect of garlic extracts and organosulfur compounds: human and animal studies. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 3, p. 989S–

993S, 2001.

ZENG, L.-M. et al. Degradation of oxalic acid by the mycoparasite *Coniothyrium minitans* plays an important role in interacting with *Sclerotinia sclerotiorum*. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 2591–2610, 2014.

ZOU, C.-S. et al. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 2371–2379, 2007.

MIXTURE DESIGN OPTIMIZATION OF GARLIC EXTRACTION TO OBTAIN PHENOLIC COMPOUNDS, THIOSULFINATES AND TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY

ABSTRACT

Allium sativum, commonly known as garlic, has played an important dietary and medicinal role throughout the history of mankind. In the last decades, there is an increasing interest in natural antioxidants and particularly in dietary antioxidants. Due their bioactive compounds, such as phenolic and thiosulfinates, garlic has been receiving attention, presenting as potential health-promoter and contributing to protection against oxidative stress in humans. However, active principle extraction is the most important step in the analysis of constituents present in botanicals and herbal preparations. The present study aimed to optimize the extraction process of total phenolic compounds (TPC) and thiosulfinates (TS) from dried garlic powder, and verify the total antioxidant capacity (TAC), using a statistical mixture simplex-axial design (SAD) and the central composite design (CCD), to evaluate the effect of the solvents water, ethanol and acetone, as well as mixtures of these solvents, at three extraction times (15, 30 and 45 min). The CCD demonstrates that extraction for 30 min was sufficient for extracting TPC by sonication from dried garlic powder. The SAD was performed to optimize the best proportion of the three solvents used. The experimental results and their response-surface models showed that water binary and ternary solvent mixture with high portion of water was more efficient for TPC and TS extraction and showed better TAC. The optimum conditions for high total phenolic compounds and thiosulfinates yield, extracted from dried garlic powder, was obtained in 30 minutes of extraction using the binary mixture water/acetone (80 : 20), and shown better total antioxidant activity.

Keywords: *Allium sativum*; simplex axial design; central composite design; thiosulfinates; phenolic compounds; antioxidant activity.

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO ALHO PARA OBTER COMPOSTOS FENÓLICOS, TIOSULFINATOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL POR DESIGN DE MISTURAS

RESUMO

Allium sativum, comumente conhecido como alho, tem desempenhado um importante papel alimentício e medicinal ao longo da história da humanidade. Nas últimas décadas, há um interesse crescente em antioxidantes naturais e, particularmente, em alimentos ricos em antioxidantes. Devido a seus compostos bioativos, como fenólicos e tiosulfinatos, o alho vem recebendo atenção, apresentando-se como potencial promotor de saúde e contribuindo para a proteção contra o estresse oxidativo em humanos. No entanto, a extração dos princípios ativos é o passo mais importante na análise de constituintes presentes em produtos orgânicos e preparações à base de plantas. O presente estudo teve como objetivo otimizar o processo de extração de compostos fenólicos totais (TPC) e tiosulfinatos (TS) a partir de pó de alho seco, e verificar a capacidade antioxidante total (TAC), utilizando o design estatístico de misturas simples-axial design (SAD) e o central composite design (CCD), para avaliar o efeito dos solventes água, etanol e acetona, bem como misturas destes solventes, em três tempos de extração (15, 30 e 45 min). O CCD demonstrou que a extração por 30 min foi suficiente para extrair TPC do alho por sonicação. O SAD foi realizado para otimizar a melhor proporção dos três solventes utilizados. Os resultados experimentais e seus modelos de superfície de resposta mostraram que as misturas de solventes binárias e ternárias com alta parcela de água foram mais eficientes para extração de TPC e TS, assim como para TAC. As condições ideais para o maior teor de compostos fenólicos totais e tiosulfinatos, extraídos de alho seco, foram obtidas utilizando água/acetona (80 : 20) e apresentaram melhor atividade antioxidante total.

Palavras-chave: *Allium sativum*; simplex axial design; central composite design; tiosulfinatos; compostos fenólicos; atividade antioxidante.

1 INTRODUCTION

Garlic (*Allium sativum* L.) is among the oldest cultivated plant (BENKEBLIA; LANZOTTI, 2007), well known for its extensive use in traditional and modern medicine due to thiosulfinates and phenolic compounds (CHEN et al., 2013; MANSOR et al., 2016). The garlic plant and its extracts are used both as food ingredients and as nutraceuticals or phytopharmaceuticals for the prevention and treatment of various illnesses, including cardiovascular disease and cancer (DEL VALLE; MENA; BUDINICH, 2008).

In the last decades, there is an increasing interest in natural antioxidants and particularly in dietary antioxidants, which are present in vegetables including garlic, which possesses a potential health-promoting due to its high phenolic phytochemical, contributing to protection against oxidative stress in humans (CHEN et al., 2013).

Allicin is produced in the greatest abundance among other thiosulfinates, and both are not naturally present in an intact garlic cloves, needing the crushing of them to release of the enzyme alliinase required for enzymatic reaction which produces thiosulfinates (OPONDO et al., 2017). Since garlic extracts have continually been used in herbal therapy, the development and optimisation of rapid and accurate extractive methodologies for the development of garlic extracts rich in phenolic compounds and thiosulfinates is needed.

The term optimization has been commonly used in analytical chemistry as a means of discovering conditions at which to apply a procedure that produces the best possible response (BEZERRA et al., 2008). Extraction is the initial and the most important step in isolating different types of bioactive compounds from fruits (YANG et al., 2011). Solvent extraction is the most commonly used extraction method to recover a wide range of antioxidants and phenolic compounds (ABAD-GARCÍA et al., 2007). In general, optimization study the effects of one independent variable on a response variable over time to achieve maximum benefits. However, this is not sufficient for finding associations between multiple independent variables, necessitating alternative multivariate statistical analyses including response surface methodology (RSM) and mixture design.

In the last years has been highlighted the use and importance of design of experiments (DOE) in process modelling in food science and technology, using design of experiments followed by multiple regression analysis, the so-called response surface methodology (RSM) (GRANATO; DE ARAÚJO CALADO, 2013) for extraction optimisation.

The present investigation aimed to identify the most appropriate solvents mixture for total thiosulfinates and phenolic compounds extractions from garlic, and their total

antioxidant capacity. Beyond that, aimed to find the better extraction time of this bioactive compounds.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Extraction procedure and sample preparation

The extractions were performed in triplicate according to the following procedure: 50 mg of oven dried (40 °C, with air circulation) and pulverized garlic cloves were extracted three times for 15 minutes by sonication with 1 mL of solvents mixture, renewing the solvent every time. After each time, the extracts were centrifuged for 15 minutes at 6000 rpm, and the supernatants were recuperated and stored at 4°C.

2.2 Total phenolic compounds (TPC)

The total phenol content was determined by a modification of the Folin–Ciocalteu method described by Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999) as follows: 20 µL of extract was mixed with 120 µL of Folin–Ciocalteu reagent (0.2 N) in 96 well microplate for 5 minutes and then 120 µL of a Na₂CO₃ solution (75 g L⁻¹) was added. All samples were incubated at room temperature in the dark conditions for 2 h, and their absorbance was read at 760 nm in Infinite 200 *PRO spectrophotometer* (Tecan). The concentration of the calibration curve ($y = 4,5876x - 0,0092$, $R^2 = 0,997$) ranged from 0.008 to 1 mg mL⁻¹ in an ethanolic solution of gallic acid. The experiment was conducted in triplicates and the results are expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) g⁻¹ of dried plant.

2.3 Total antioxidant activity/Phosphomolybdenum assay (TAC)

The total antioxidant activity (TAC) of samples was evaluated by the green phosphomolybdenum complex formation according to Prieto, Pineda and Aguilar (1999). An aliquot of 25 µL of the sample solution was combined with 1 mL of reagent solution (0.6M sulphuric acid, 28mM sodium phosphate, and 4mM ammonium molybdate) in Falcon 15 mL tubes. The Falcon tubes were capped and incubated in a water bath at 95°C for 90 minutes. After the samples had cooled to room temperature, the absorbance of the mixture was measured at 695 nm, against a blank, in Infinite 200 *PRO spectrophotometer* (Tecan). The aqueous ascorbic acid solution calibration curve ($y = 0,7889x + 0,0492$, $R^2 = 0,996$)

comprised concentration range from 5,0 to 0,0039 mg mL⁻¹. The experiment was conducted in triplicates and the results reported (ascorbic acid equivalent antioxidant activity) are mean values expressed as g of ascorbic acid equivalents (AAE) g⁻¹ of dried plant.

2.4 Determination of thiosulfinates (TS)

The quantitative determination of total thiosulfinates in the extracts was carried out, following the methodology described by Li and Xu (2007) with some modifications, and was adapted to be performed directly on the microplate as described below.

The solution of cysteine (20 mM) was freshly prepared in 50 mM Hepes buffer (pH 7.5). The concentration of cysteine was determined by measuring the amount of 2-nitro-5-thiobenzoate (NTB) formed after reaction with 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). All the reactions were carried out at room temperature. Cysteine solution was diluted 20 times and 50 µL was added to the microplate with 50 µL of the sample or the solvent used in the extraction (negative control), and the mixture was incubated for 15 min. This reaction mixture was diluted 2 times adding 100 µL of distilled water. Then, 100 µL of 50 mM Hepes buffer (pH 7.5) containing 1.5 mM DTNB was added and. The absorbance was measured at 412 nm after 15 min using an Infinite 200 PRO spectrophotometer (Tecan). Finally, the thiosulfinates concentration can be determined by the following equation:

$$C_{\text{thiosulfinates}} (\text{mmol mL}^{-1}) = (\Delta A_{412} \times 2) / (2 \times 14150)$$

where $\Delta A_{412} = A_0 - A$. A_0 : absorbance of the negative control. A : absorbance of the reaction with sample. ΔA_{412} is multiplied by 2 due to the dilution made in the reaction mixture, 14150 is the molar extinction coefficient of NTB, and 2 means half amount of cysteine reduced denotes the amount of thiosulfinates.

2.5 Evaluation of solvent effects by simplex axial design (SAD)

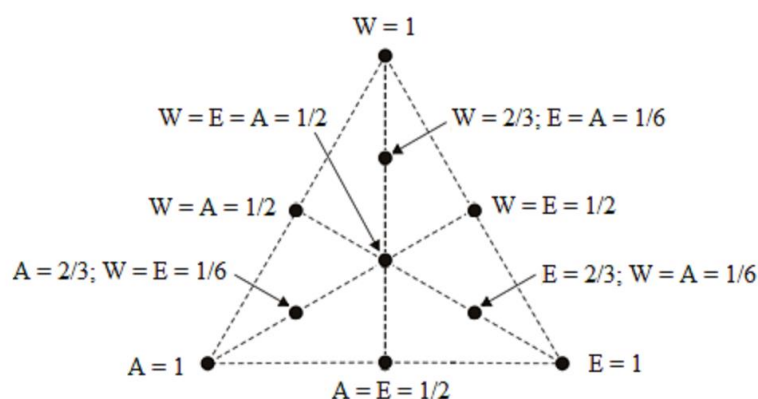
Two different types of standard designs are commonly used for extraction experiments with mixtures: simplex-lattice design and simplex-centroid design. Both of them will evaluate the triangular response surface at the vertices (i.e., the corners of the triangle) and the centroids (sides of the triangle) (MONTGOMERY, 2006).

In the simplex-centroid design, different conditions tested form a triangle, with pure components in the vertex, representing 100% of one of each solvent. Middle points on each side representing permutations of the binary blends ($1/2 : 1/2 : 0$; $1/2 : 0 : 1/2$; $0 : 1/2 : 1/2$), and, the center point as a ternary mixture ($1 : 1 : 1$). This design is sometimes augmented with interior points (axial points) representing $2/3$ of one of the solvents and $1/6$ for the others (Figure 3.1), also known as Simplex Axial Design (SAD) (SAMPAIO et al., 2015).

In order to optimize the extraction process, a mixture design was developed as shown in Figure 3.1. The simplex-centroid design with axial points in three replicates was chosen to determine the solvent combination of water (W), ethanol (E) and acetone (A).

Figure 3.1 presents all conditions tested. This design, permitted the evaluation of linear (W, E and A), quadratic (WE, WA, and EA), and special cubic (WEA) models for the response under study.

Figure 3.1 – Simplex axial design (SAD).



Subtitle: W = Water, E = Ethanol, A = Acetone.

2.6 Statistical analysis

All the experiments for selection of the solvent proportion and time of extraction, as well as total phenolic compounds and thiosulfinates content were performed in triplicate, and the results were reported as mean \pm standard deviation.

Variance analysis (ANOVA) was applied to determine the fit of the multiple regression model ($p < 0.05$) to evaluate the significant effects of the variables and the interactions between them. From the regression coefficients the response and contour surface graphs of the model were generated. The analysis were performed using the free version of STATISTICA version 10 software (STATSOFT, INC., 2011).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Effect of time and solvent mixture composition in TPC and TS extraction

Many applications of the central composite design in the optimization of analytical procedures can be found in the literature (BEZERRA et al., 2008). Central composite design response surface methodology was conducted in the aim of evaluating how the variables (extraction time and solvents mixture composition) affect polyphenol and thiosulfinates extraction.

The extraction was carried out in cycles of 15 minutes of sonication (from 1 to 3 cycles). In the first extraction cycle, the extractive yield of TPC, was solvent mixture dependents and was varying from 43,17 %, to 68,67 % for ethanol and water respectively. This amounts had been increased in the second cycle to range 73,78 % and 91,16 % for the same solvents (Figure 3.2). Similarly, for thiosulfinates in the first sonication cycle (15 min) water showed the highest extractive yield (61,19 %) and ethanol the lowest (23,27 %). In the second cycle (30 min) the variation of extractive yield was 91,40 %, for water, to 58,50 %, for the ternary mixture of ethanol/water/acetone (2/3 : 1/6 : 1/6) (Figure 3.3). Those differences are due to the difference in polarities of the extraction solvents which might influence the solubility of the chemical constituents in a sample and its extraction yield (BUTSAT; SIRIAMORNUN, 2016).

The response surface plots shown that the content of TPC (Figure 3.2) and TS (Figure 3.3) increases with increases of extraction time from 15 to 30 min, same observation had been reported by Yim et al. (2013). Water gave the greatest yield, whereas the ethanol and acetone extract in the same extraction time had the lowest yield, and the increase of water portions increases the extraction yield of TPC and TS in each extraction time. Similar results had been reported for total phenolic compound extraction from *Trichilia catigua* (LONNI et al., 2012), were the extraction yield increases with the increase of time and of water proportion in the solvent mixture.

It can be noted that there is no significant differences in the extraction yield between the second and the third extraction cycles, for solvent with great portion water.

Figure 3.2 – Response surfaces of effect of different times and solvents (A: water, B: ethanol, C: acetone) of extraction on total phenolic compounds.

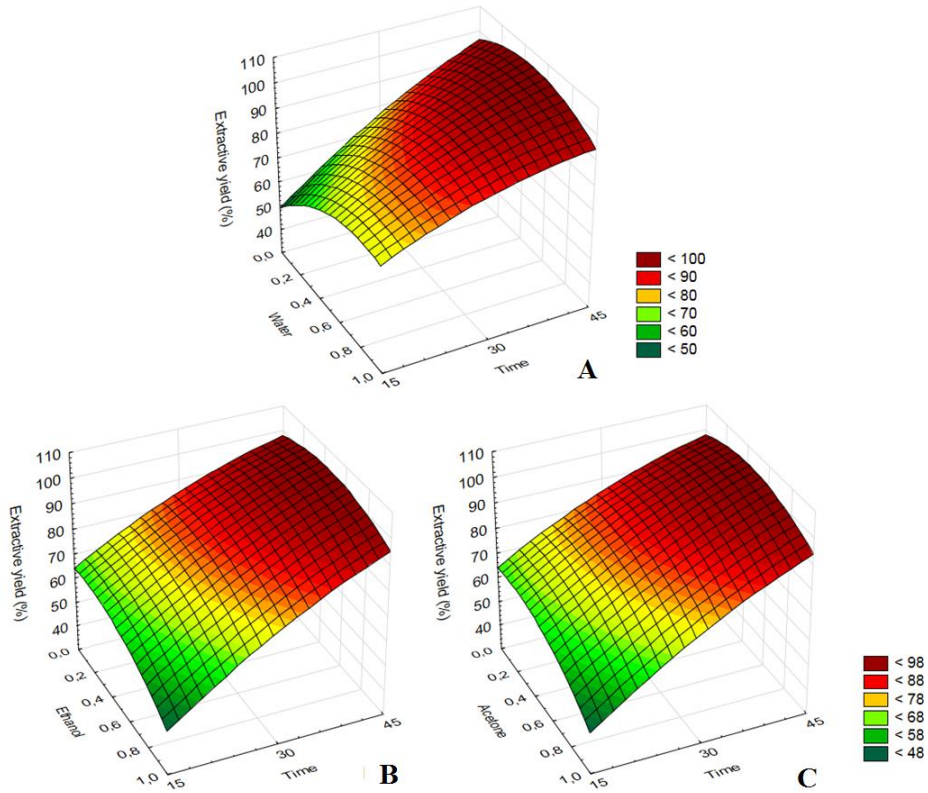


Figure 3.3 – Response surfaces of effect of different times and solvents (A: water, B: ethanol, C: acetone) of extraction on thiosulfates.

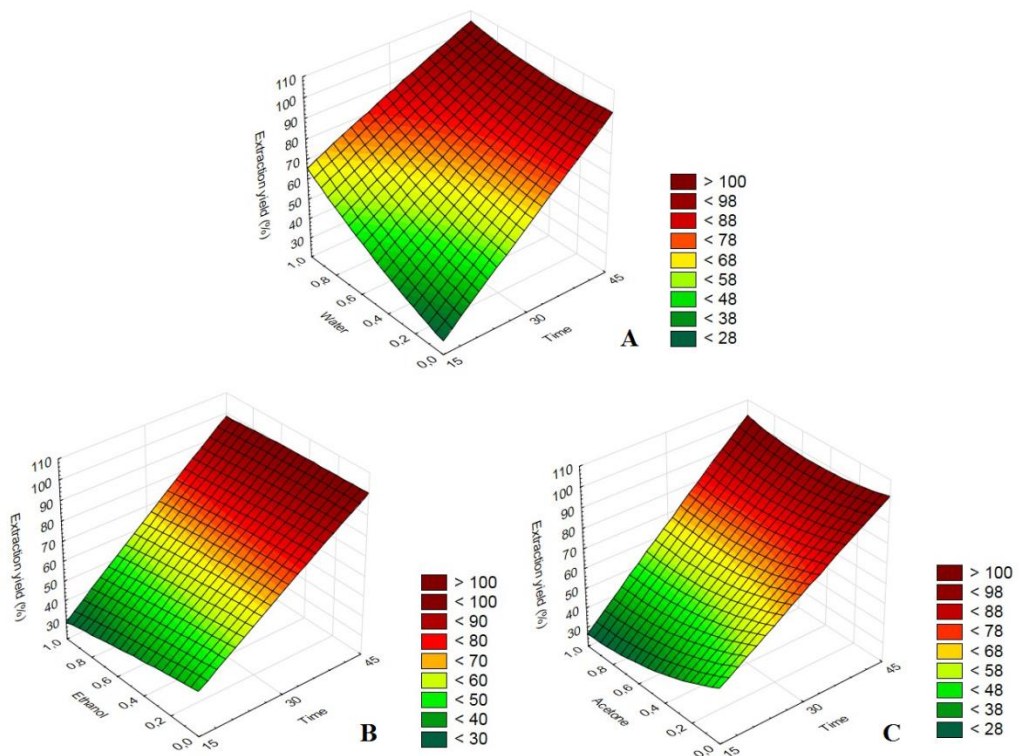


Table 3.1 – Compositions of extraction mixtures, total phenolic compounds (TPC) and thiosulfinates (TS) contents.

Run	Water	Ethanol	Acetone	Time (min)	TPC (mg AGE g ⁻¹ dry plant)	TS (μmol g ⁻¹ dry plant)
1	1	0	0	15	4,54 ± 0,04	4,31 ± 0,03
2	0	1	0	15	0,48 ± 0,03	0,59 ± 0,14
3	0	0	1	15	0,49 ± 0,00	2,43 ± 0,10
4	1/2	0	1/2	15	4,28 ± 0,21	2,93 ± 0,08
5	1/2	1/2	0	15	4,00 ± 0,16	1,63 ± 0,13
6	0	1/2	1/2	15	0,57 ± 0,01	2,31 ± 0,10
7	1/3	1/3	1/3	15	3,60 ± 0,27	2,30 ± 0,00
8	1/6	1/6	2/3	15	2,32 ± 0,24	1,87 ± 0,11
9	1/6	2/3	1/6	15	2,20 ± 0,12	1,30 ± 0,15
10	2/3	1/6	1/6	15	4,19 ± 0,16	4,04 ± 0,02
11	1	0	0	30	6,02 ± 0,10	6,41 ± 0,09
12	0	1	0	30	0,81 ± 0,05	1,30 ± 0,15
13	0	0	1	30	0,83 ± 0,02	5,17 ± 0,25
14	1/2	0	1/2	30	5,42 ± 0,17	5,56 ± 0,11
15	1/2	1/2	0	30	5,16 ± 0,16	2,33 ± 0,18
16	0	1/2	1/2	30	0,96 ± 0,04	4,60 ± 0,16
17	1/3	1/3	1/3	30	4,64 ± 0,36	4,69 ± 0,12
18	1/6	1/6	2/3	30	2,90 ± 0,29	4,19 ± 0,25
19	1/6	2/3	1/6	30	2,90 ± 0,13	2,71 ± 0,22
20	2/3	1/6	1/6	30	5,51 ± 0,16	6,41 ± 0,22
21	1	0	0	45	6,60 ± 0,10	6,99 ± 0,11
22	0	1	0	45	1,10 ± 0,05	2,05 ± 0,24
23	0	0	1	45	1,16 ± 0,04	8,08 ± 0,25
24	1/2	0	1/2	45	5,97 ± 0,18	8,05 ± 0,14
25	1/2	1/2	0	45	5,75 ± 0,15	2,88 ± 0,21
26	0	1/2	1/2	45	1,26 ± 0,04	7,05 ± 0,39
27	1/3	1/3	1/3	45	5,19 ± 0,37	7,15 ± 0,24
28	1/6	1/6	2/3	45	3,37 ± 0,34	6,97 ± 0,30
29	1/6	2/3	1/6	45	3,30 ± 0,15	4,47 ± 0,24
30	2/3	1/6	1/6	45	6,05 ± 0,15	8,13 ± 0,17

Table 3.1 shows the effects of the solvent compositions on TPC and TS content in garlic. Comparing the averages of the TPC content, in 30 minutes of extraction, showed the following trends: the extraction with pure ethanol and acetone showed the lowest values for total phenolic compounds $0,81 \pm 0,05$ and $0,83 \pm 0,02$ mg AGE g⁻¹ dry plant, respectively (Table 3.1). The best results were obtained with pure water $6,02 \pm 0,10$ mg AGE g⁻¹ dry plant which is followed by ternary solvent mixture (water 2/3, ethanol 1/6, and acetone 1/6), exhibiting $5,51 \pm 0,16$ mg AGE g⁻¹ dry plant. Binary and ternary mixtures including water, also exhibited high amounts of TPC. Similarly, previous study showed that the same

extractive behaviour for TPC was observed (DICIAULA et al., 2014). This occurs due to the wide range of phenols that the aqueous mixtures can dissolve and increased solvation provided by water. The combined use of water and organic solvent may facilitate the extraction of molecules that are soluble in water and/or organic solvent (DO et al., 2014).

For TS content, in 30 minutes of extraction, averages showed the following trends: pure ethanol and binary mixture with ethanol/water (1 : 1) showed the lowest values of thiosulfinates, presenting $1,30 \pm 0,15$ and $2,33 \pm 0,18 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry plant, respectively. On the other hand, the highest values of TS were presented by pure water and ternary mixture with higher portion of water, exhibiting $6,41 \pm 0,09$ and $6,41 \pm 0,22 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry plant, respectively (Table 3.1). Most of the articles present extraction of thiosulfinates with pure water (CURTIS et al., 2004; LI; XU, 2007; OLECH; ZABORSKA, 2012). Therefore, despite water is an important solvent to extract thiosulfinates from garlic, the presence of organic solvent in low concentrations increases the extraction of TS over time. As observed at 45 minutes of extraction that the ternary mixture with higher portion of water and low concentrations of organic solvents showed the higher value $8,13 \pm 0,17 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry plant (Table 3.1).

3.2 Mixture designs

3.2.1 Total phenolic compounds (TPC)

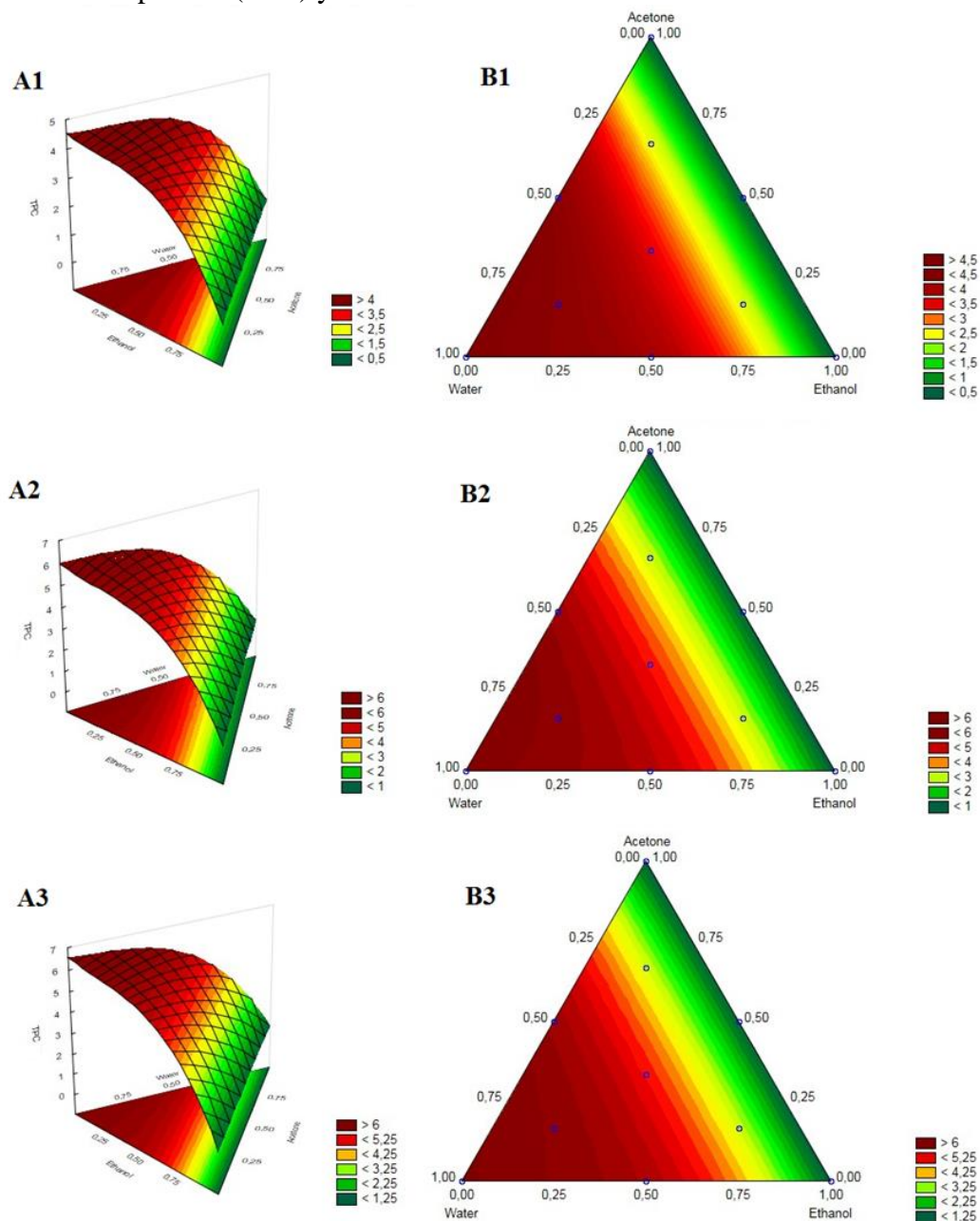
Aqueous, alcohols and acetone, with different levels of water, have been widely used to extract phenolic components from botanical materials, especially herbs (WANG et al., 2008). In this study, we have determined the optimum values of the independent variables (water, ethanol, and acetone) to achieve the maximum response for the extraction of total phenolic compounds from *Allium sativum* dried cloves. The recovery of phenolic compounds depends on the polarity of the solvent used; therefore, in this work, we used ethanol, water, and acetone with a dipolar moment (μ) of 1.69 Debye (D), 1.85 D and 2.88 D, respectively.

The response surfaces obtained for TPC by mixture design as a function of the percentage composition of water, ethanol and acetone, for the three extraction times, are illustrated in Figure 3.4 A, and contour plots are illustrated in Figure 3.4 B.

According to Figure 3.4, pure acetone and pure ethanol, and their mixture extracted the lowest amounts of total phenolic compounds. Water was the solvent that extracted highest amounts of TPC. The amount of extracted phenolic compounds increases with the increase of the amount of water in the solvent mixture using either both ethanol and acetone. Same results

has been reported by Santos Felix et al. (2018) for *Spondias mombin* L. apple bagasse agroindustrial residues, where the lowest contents of phenolic compounds were obtained using 100% acetone, 100% ethanol or mixture 50% acetone/50% ethanol, while the highest were obtained with water only or mixture of water and acetone/ethanol. Maximum total phenols contents can be expected for mixtures mostly rich in water. This shows that the extraction yield increases with increasing polarity of the solvent used in extraction. Same results has been reported by Do et al. (2014) e Rajha et al. (2014).

Figure 3.4 – Cubic response surface for different extraction times (A1:15 min, A2: 30 min, A3: 45min) and contour plot (B1: 15 min, B2: 30 min, B3 45min) for total phenolic compounds (TPC) yields.



The highest value on the contour graph (Figure 3.4, B) occurred between positions: water (100%), water/ethanol/acetone (2/3 : 1/6 : 1/6) and water/acetone (1/2 : 1/2). The proportions optimized according to the response surface were water (80 %), acetone (20 %) and ethanol (0 %), as being the maximum inside the experimental domain.

ANOVA was applied showing fit to the linear, quadratic, and cubic models, with R² of 0,838, 0,985 and 0.992, respectively. Thus, the cubic model is better in predicting the behaviour of the mixture. The cubic model is given by the equation correlating the three variables and the analytical response is:

$$\text{TPC} = + 5,998348187731 * W + 0,7908324407965 * E + 0,8033298927202 * A + 6,8582177520493 * W * E + 7,8824279559722 * W * A + 0,46446029587083 * E * A + 5,8728120211658 * W * E * A - 4,1901351119666 * W * E * (W - E) - 2,5308795744717 * W * A * (W - A) + 0,$$

Statistical analysis was carried out with the experimental values. The analysis of the main effects and their interactions in the form of analysis of variance (ANOVA) are presented in Table 3.2 at the 95% confidence level ($p < 0.05$). Although the lack of fit was significant ($p < 0.05$) for the total content of polyphenols in the three extraction times, the cubic model was adjusted with significant probability ($p < 0.05$).

Table 3.2 – Analysis of variance (ANOVA) results for the mixture models.

Variation source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	Calculated F-value	Probability
TPC 15'					
Model	75,96303	8	9,495379	301,6305	0,000000
Total Error	0,66108	21	0,031480		
Lack of Fit	0,16205	1	0,162048	6,4944	0,019141
Pure Error	0,49904	20	0,024952		
Total Adjusted	76,62412	29	2,642211		
TPC 30'					
Model	118,7178	8	14,83972	323,0966	0,000000
Total Error	0,9645	21	0,04593		
Lack of Fit	0,3225	1	0,32250	10,0461	0,004819
Pure Error	0,6420	20	0,03210		
Total Adjusted	119,6823	29	4,12698		

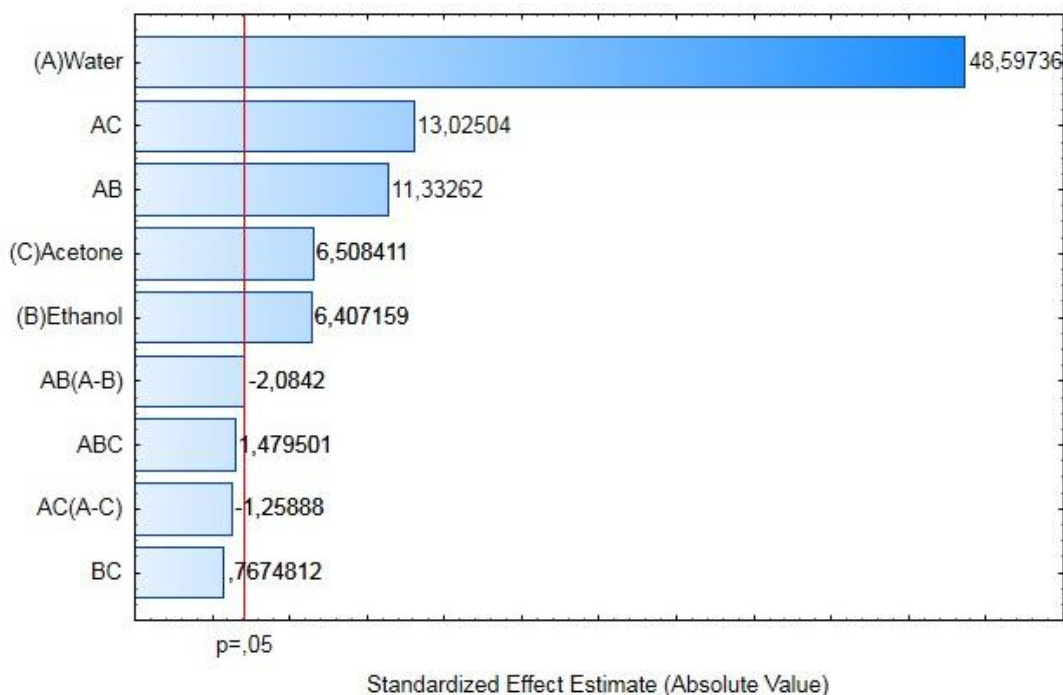
Table 3.2 – Analysis of variance (ANOVA) results for the mixture models (continuation).

Variation source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	Calculated F-value	Probability
TPC 45'					
Model	132,1252	8	16,51565	304,8779	0,000000
Total Error	1,1376	21	0,05417		
Lack of Fit	0,4048	1	0,40483	11,0493	0,003384
Pure Error	0,7328	20	0,03664		
Total Adjusted	133,2628	29	4,59527		
Thiosulfinates 15'					
Model	35,95562	8	4,494453	406,4528	0,000000
Total Error	0,23221	21	0,011058		
Lack of Fit	0,03219	1	0,032187	3,2183	0,087953
Pure Error	0,20003	20	0,010001		
Total Adjusted	36,18784	29	1,247856		
Thiosulfinates 30'					
Model	80,65235	8	10,08154	357,1786	0,000000
Total Error	0,59274	21	0,02823		
Lack of Fit	0,00089	1	0,00089	0,0300	0,864334
Pure Error	0,59185	20	0,02959		
Total Adjusted	81,24509	29	2,80155		
Thiosulfinates 45'					
Model	134,1142	8	16,76428	302,1697	0,000000
Total Error	1,1651	21	0,05548		
Lack of Fit	0,0000	1	0,00004	0,0008	0,978421
Pure Error	1,1650	20	0,05825		
Total Adjusted	135,2793	29	4,66480		
TAC 15'					
Model	53790,60	8	6723,825	82,0354	0,000000
Total Error	1721,21	21	81,963		
Lack of Fit	1634,51	1	1634,509	377,0320	0,000000
Pure Error	86,70	20	4,335		
Total Adjusted	55511,81	29	1914,200		

In order to examine the relative importance of the main effects and their interactions with statistical significance ($p < 0.05$), a standardized Pareto chart (Figure 3.5) was employed. According to Figure 3.5, the main factors Water (A), Ethanol (B), Acetone(C), and their interactions (AC and AB) that extend beyond the reference line were significant at the level of

0.05. Binary interaction between acetone and ethanol, and ternary integrations were not significant.

Figure 3.5 – Analysis of pareto chart of the standardized effects for TPC.



Water (A), represented the most significant effect on phenolic compounds extraction followed by its interaction with acetone (AC) and ethanol (AB), and finally by pure acetone (C) and ethanol (B) (Figure 3.5).

The application of the mixture design was effective to establish the best proportion among the solvents for the extraction of phenolic compounds, thus contributing to reduce the time of extraction.

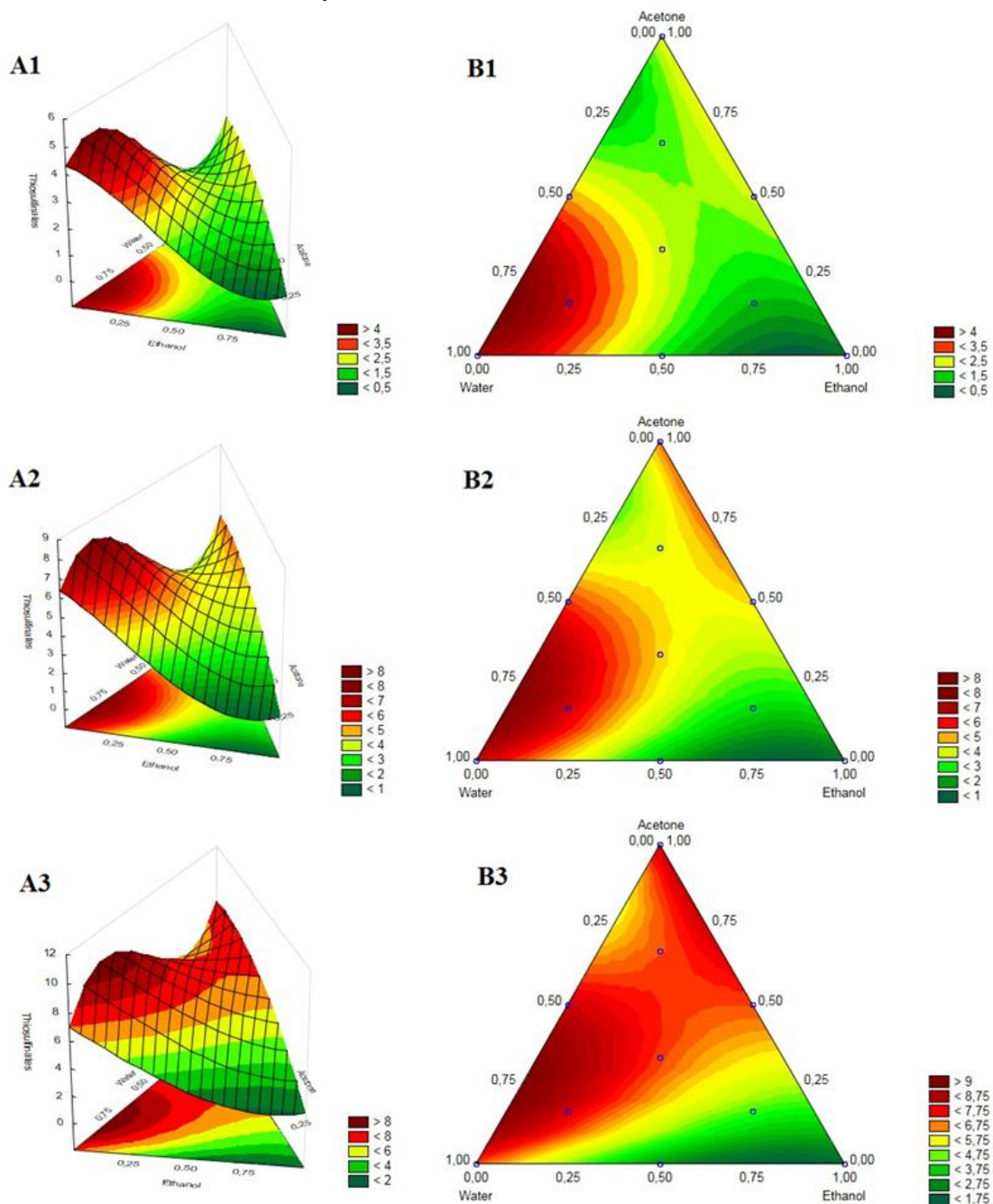
3.2.2 Thiosulfinates (TS)

Table 3.1 shows the effects of the solvent compositions on the yield of garlic thiosulfinates. It can be noticed that ethanol extract was the lowest amounts of thiosulfinates in the three times of extraction. Whereas the highest amounts was observed in water and ternary solvent mixture containing water/ethanol/acetone (2/3 : 1/6 : 1/6), which in the first and last time alternated with each other, the water being better at the beginning and the ternary mixture better at the end, while the intermediate time there was no difference between the two extraction solutions. The amounts of extracted thiosulfinates was solvent mixture

dependent and was ranging from $0,59 \pm 0,14$ to $4,31 \pm 0,03 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry plant for ethanol and water respectively in the first extraction cycle. Those amount has increased with the time of extraction to range from $2,05 \pm 0,24$ to $8,13 \pm 0,17 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry plant, ethanol and ternary solvent mixture containing water/ethanol/acetone (2/3 : 1/6 : 1/6), respectively.

Response surfaces were determined for thiosulfates content and relative color strength as a function of the extraction solvent compositions is presented in the Figure 3.6.

Figure 3.6 – Cubic response surface for diferents extraction times (A1: 15 min, A2: 30 min, A3: 45min) and contour plot (B1:15 min, B2: 30 min, B3: 45min) for thiosulfates yields.



The ANOVA test shown fitting to linear, quadratic, and cubic models, with R^2 of 0,807, 0,880 and 0,993, respectively. Thus, the cubic model is better in predicting the behaviour of the mixture. The cubic model is given by the equation correlating the three variables and the analytical response:

$$\begin{aligned} TS = & + 6,4075598014899*W + 1,2973595553148*E + 5,1644031504659*A - \\ & 6,0885828194788*W*E - 0,90733417371876*W*A + 5,4866344780786*E*A + \\ & 14,921605515148*W*E*A + 4,7479832270682*W*E*(W-E) + \\ & 20,699365624831*W*A*(W-A) + 0, \end{aligned}$$

The cubic model for thiosulfinates yield showed no significant lack of fit at the 95% confidence level at the three extraction times, confirming the model validity due the probability insignificant ($p > 0,05$) and indicating that the model developed is reliable and accurate to predict the relevant responses (CHE SULAIMAN et al., 2017).

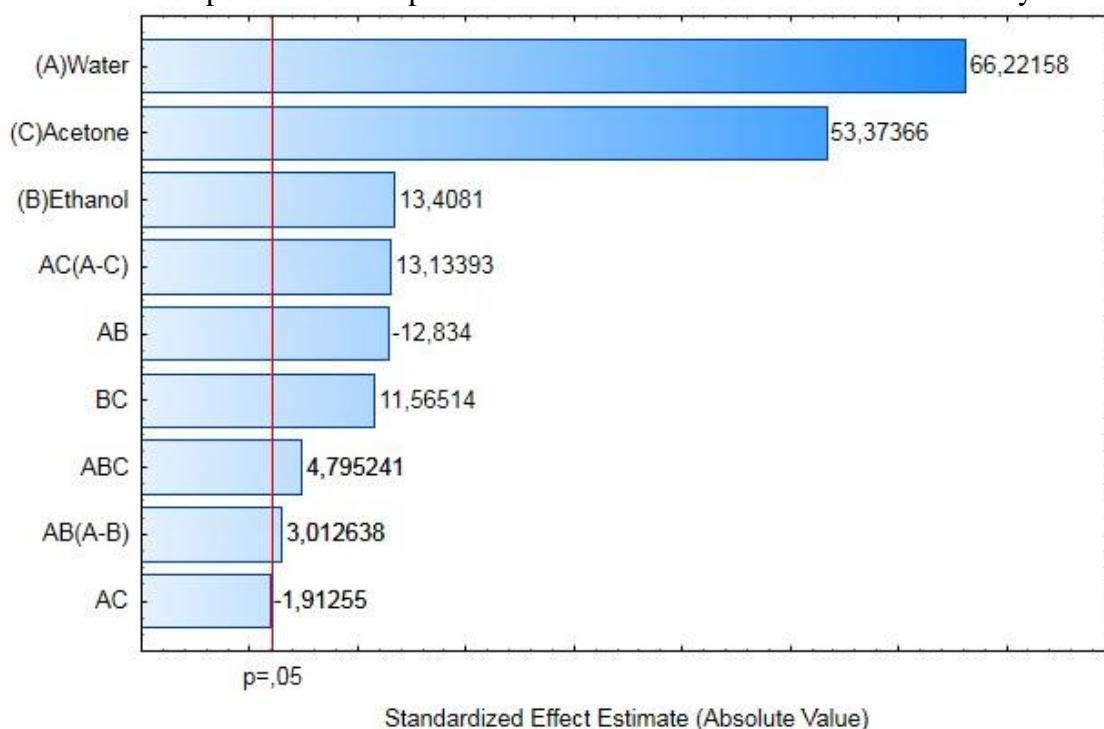
In the two first extractive cycles, pure water, the binary and ternary mixture rich in water was more efficient for thiosulfinates extraction, noting that the water/acetone was the most important. This linear increase for ethanol and acetone it achieves the maximum yield at about 80% of water and start to slightly decrease (Figure 3.6).

The highest yield value on the contour graph (Figure 3.6, B) is seen to occur between the three extraction points: water (100 %), binary solvent mixture (water/acetone, 1 : 1) and ternary solvent mixture (water/ethanol/acetone, 2/6 : 1/6 : 1/6). As for phenolic compounds, the proportions optimized to thiosulfinates extract according to the response surface were water/ethanol/acetone (80 : 20 : 0), and being the maximum inside the experimental domain.

Cañizares et al. (2002) carried out extraction of garlic with different solvents, presenting higher extractive yield with acetone, which them justify by the fact that this solvent has the ability to degrade the cellular walls of vegetables, increasing its permeability and, consequently, increase the extractive power. Cañizares et al. (2004) used acetone for thiosulfinates extraction in garlic. Despite pure acetone did not present the highest contents of thiosulfinates in garlic extracts in this work, the presence of this solvent mixture with high amounts of water showed better results.

The results illustrated in Figure 3.7, confirm that water (A), followed by acetone (C) and ethanol (B) were the most effective parameters at 95% confidence level. Also, the interaction between acetone and ethanol (BC) and the interactions acetone, ethanol and water (ABC) were significant since the standardized effect extends beyond the vertical line.

Figure 3.7 – Standardized ($p < 0.05$) pareto chart representing the estimated effects of parameters and parameter interactions on thiosulfates recovery.



3.2.3 Total antioxidant activity (TAC)

All the extracts were evaluated for their antioxidant activities by phosphomolybdenum assay. The results were depicted as ascorbic acid equivalent by gram of powdered garlic cloves (Table 3.3).

The response surface and contour plot for total antioxidant capacity (TAC) as a function of the percentage composition of water, ethanol and acetone is shown in Figure 3.8. The highest value on the response surface occurred between pure water, and binary solvent mixture (1 : 1) of water/acetone and water/ethanol (Figure 3.8, A). In contour plot (Figure 3.8, B), the red dark region between pure water, binary solvent mixture water/acetone (1 : 1) and ternary solvent mixture water/ethanol/acetone (2/3 : 1/6 : 1/6) indicates the best composition of the extraction solvent to obtain extracts from garlic with high total antioxidant activity.

Table 3.3 – Compositions of extraction mixtures and total antioxidant activity (TAC).

Water	Ethanol	Acetone	TAC (mg EAA g ⁻¹ dry plant)
1	0	0	95,33 ± 0,80
0	1	0	0,95 ± 0,19
0	0	1	0,37 ± 0,12
1/2	0	1/2	94,97 ± 3,16
1/2	1/2	0	91,33 ± 3,90
0	1/2	1/2	0,97 ± 0,50
1/3	1/3	1/3	67,27 ± 3,77
1/6	1/6	2/3	11,08 ± 0,59
1/6	2/3	1/6	14,06 ± 1,59
2/3	1/6	1/6	98,73 ± 0,35

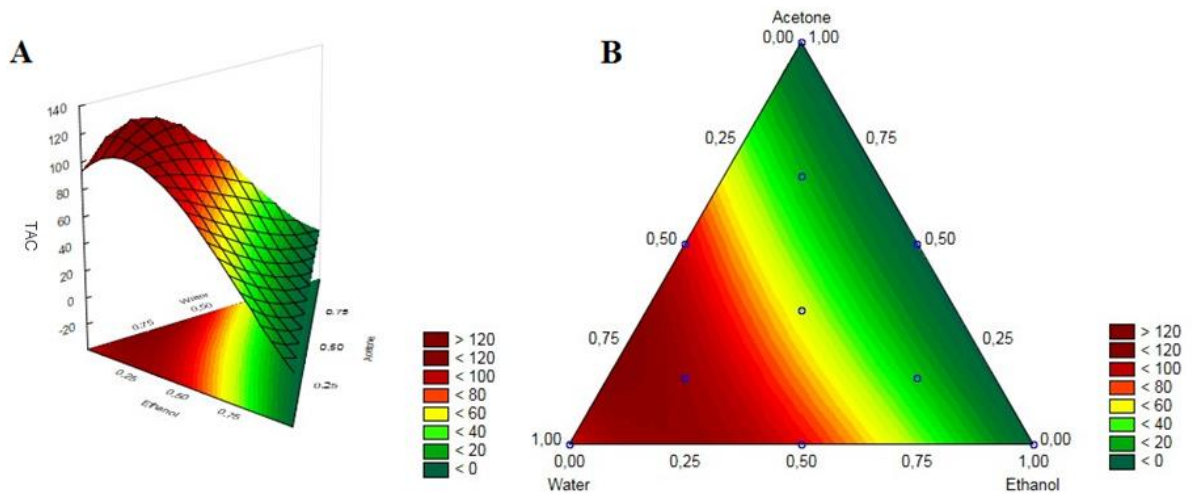
The ANOVA test shown fitting to linear, quadratic, special cubic and cubic models, with R² of 0,812, 0,942, 0,952, and 0,969, respectively. Thus, the cubic model is better in predicting the behaviour of the mixture. Though the lack of fit was significant ($p < 0,05$), the model was adequate due to probability value ($p < 0,05$). The cubic model is given by the equation correlating the three variables and the analytical response:

$$\text{TAC} = + 93,695958315915 * W - 0,68017670863697 * E - 1,268337478509 * A + 166,19634696732 * W * E + 181,95837714908 * W * A - 5,2998253001968 * E * A - 435,0772678457 * W * E * A + 107,25653550065 * W * E * (W - E) + 179,24030019932 * W * A * (W - A) + 0,$$

As shown in Figure 3.8, ethanol and acetone and ternary solvents mixtures, which comprise lower amounts of water, yielded extract with low antioxidant activity. The antioxidant activity of those extract increases with the increase of water in the solvent mixture and attains its maximum activity around 80% of water for both ethanol and acetone mixtures and after that starts to decrease slightly.

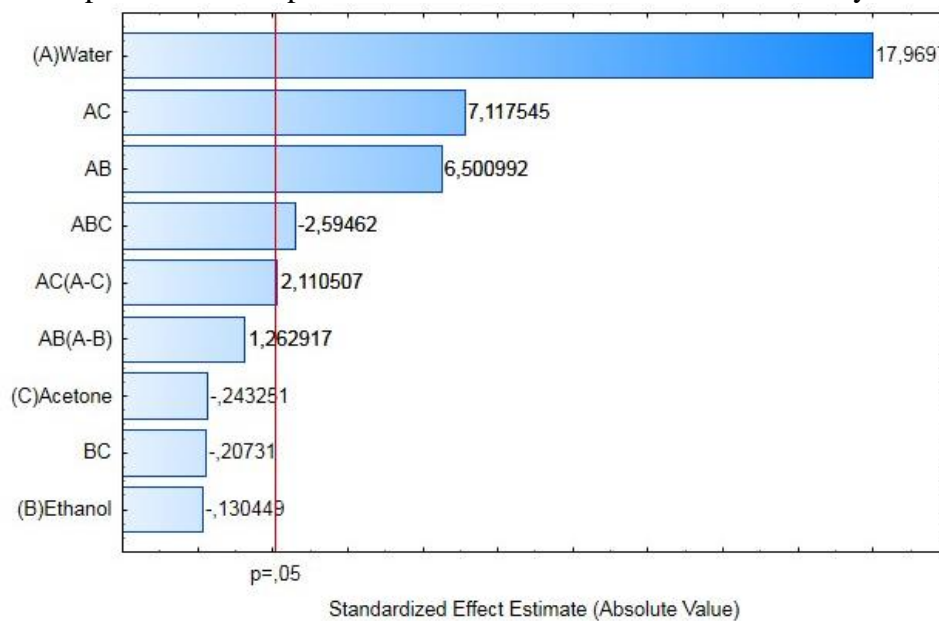
This mixture of solvents that present the highest total antioxidant capacity was the same compositions that present the highest contents of total phenolic compounds and thiosulfinates, highlighting the relationship between these bioactive compounds and antioxidant activity. Phenolic compounds and thiosulfinates are reported to act as antioxidants (BENKEBLIA; LANZOTTI, 2007; JOHNSON; OLALEYE; KOLAWOLE, 2016; OKADA et al., 2005; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Figure 3.8 – Cubic response surface (A) and contour plot (B) for total antioxidants activity.



Pareto chart (Figure 3.9) was applied for investigating the relative contribution of the independent variables on the antioxidant activity. The result showed that the water concentration in the solvent water (A) was the most important factor followed by its interaction with acetone (AC) and ethanol (AB), respectively. Ternary solvent mixtures (ABC), was also significant at level confidence of 95%, whereas pure ethanol (B) and acetone (C) and their interaction (BC) was not significant.

Figure 3.9 – Standardized ($p < 0.05$) pareto chart representing the estimated effects of parameters and parameter interactions on antioxidant activity.



4 CONCLUSION

The binary mixture water/acetone (80 : 20) proved to be the best solvent mixture for total phenolic compounds (TPC) and thiosulfinates (TS) extraction from dried garlic powder, and shown better total antioxidant capacity (TAC). And extraction for 30 minutes was sufficient for extracting TPC and TS by sonication from dried garlic powder.

This study indicated that use of pure water, binary and ternary mixtures with high portion of water was efficient to yielding extracts with high TPC and TS contents, and TAC.

REFERENCES

- ABAD-GARCÍA, B. et al. Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, n. 1–2, p. 87–96, 2007.
- BENKEBLIA, N.; LANZOTTI, V. *Allium* thiosulfinates : chemistry, biological properties and their potential utilization in food preservation. **Food j**, v. 2, p. 193–201, 2007.
- BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.
- BUTSAT, S.; SIRIAMORNPNUN, S. Effect of solvent types and extraction times on phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity in leaf extracts of *Amomum chinense* C. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 1, p. 180–187, 2016.
- CAÑIZARES, P. et al. Optimization of *Allium sativum* solvent extraction for the inhibition of in vitro growth of *Helicobacter pylori*. **Biotechnology progress**, v. 18, n. 6, p. 1227–1232, 2002.
- CAÑIZARES, P. et al. Allyl-thiosulfinates, the bacteriostatic compounds of garlic against *Helicobacter pylori*. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 1, p. 397–401, 2004.
- CHE SULAIMAN, I. S. et al. Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p. 54, 2017.
- CHEN, S. et al. Evaluation of garlic cultivars for polyphenolic content and antioxidant properties. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e79730, 2013.
- CURTIS, H. et al. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 65, n. 2, p. 79–89, 2004.

DEL VALLE, J. M.; MENA, C.; BUDINICH, M. Extraction of garlic with supercritical CO₂ and conventional organic solvents. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 3, p. 535–542, 2008.

DICIAULA, M. C. et al. Optimization of solvent mixtures for extraction from bark of *Schinus terebinthifolius* by a statistical mixture-design technique and development of a UV-Vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 158–163, 2014.

DO, Q. D. et al. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 3, p. 296–302, 2014.

GRANATO, D.; DE ARAÚJO CALADO, V. M. The use and importance of design of experiments (DOE) in process modelling in food science and technology. In: **Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 1–18.

JOHNSON, M.; OLALEYE, O.; KOLAWOLE, O. Antimicrobial and antioxidant properties of aqueous garlic (*Allium sativum*) extract against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **British Microbiology Research Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2016.

LI, Y.; XU, S. Y. Preparation of garlic powder with high allicin content. **Agricultural Sciences in China**, v. 6, n. 7, p. 890–898, 2007.

LONNI, A. A. S. G. et al. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. **Analytica Chimica Acta**, v. 719, p. 57–60, 2012.

MANSOR, N. et al. Quantification and characterization of Allicin in garlic extract. **Journal of Medical and Bioengineering**, v. 5, n. 1, p. 24–27, 2016.

MONTGOMERY, D. C. Design and analysis of experiments. **Technometrics**, v. 48, n. 1, p. 158–158, 2006.

OKADA, Y. et al. Antioxidant activity of thiosulfinates derived from garlic. **Redox report : communications in free radical research**, v. 10, n. 2, p. 96–102, 2005.

OLECH, Z.; ZABORSKA, W. A Spectrophotometric assay for total garlic thiosulfinates content. Kinetic aspects of reaction with chromogenic thiols. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 62, n. 1, 2012.

OPONDO, F. et al. Different approaches for quantification of the bioactive metastable thiosulfinates in garlic using a validated high performance liquid chromatography method. **International Journal of Biochemistry Research & Review**, v. 18, n. 2, p. 1–9, 2017.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the

determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337–41, 1999.

RAJHA, H. N. et al. Extraction of total phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and tannins from grape byproducts by response surface methodology. Influence of solid-liquid ratio, particle size, time, temperature and solvent mixtures on the optimization process. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, n. 4, p. 397–409, 2014.

SAMPAIO, C. R. P. et al. Anthocyanins and phenolic compounds in five ripening stages of *Byrsonima ligustrifolia* after extraction optimization. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 54, n. 4, p. 365–378, 2015.

SANTOS FELIX, A. C. et al. Mixture design and doehlert matrix for the optimization of the extraction of phenolic compounds from *Spondias mombin* L apple bagasse agroindustrial residues. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, p. 1–8, 2018.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1998.

STATSOFT, I. **Statistica (data analysis software system)**, 2011. Disponível em: <www.statsoft.com>

WANG, J. et al. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 804–810, 2008.

YANG, B. et al. Extraction and pharmacological properties of bioactive compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit — A review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1837–1842, 2011.

YIM, H. S. et al. Optimization of extraction time and temperature on antioxidant activity of *Schizophyllum commune* aqueous extract using response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 275–283, 2013.

**BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Allium sativum* L.
WITH YEASTS AND BACTERIA IN *Sclerotinia sclerotiorum* CONTROL**

ABSTRACT

Phytopathogen attack influences the production of secondary metabolites in plants due its defense response, and the use of benefic microorganisms to induce plant resistance also shares this principle, because the plant starts to produce secondary metabolites that will protect it from the attack of the pathogens, making it resistant. Thiosulfinates and phenolic compounds are associated with the protection of the garlic plants, acting as a non-enzymatic antioxidant, and with its defense response, acting like antifungal compounds. The purpose of this study was to evaluate the effect of interactions between plant x pathogen and antagonistic microorganisms in total phenolic compounds and thiosulfinates content, and antioxidant activity (DPPH, total antioxidant capacity - TAC, oxygen radical absorbance capacity - ORAC, reducing power and chelating power) measured in extracts from garlic cloves submitted to different treatments with biological control agents for the purpose of *Sclerotinia sclerotiorum* control. Thiosulfinates varied significantly between treatments and was lower in negative control compared to other treatments. Whereas total phenolic compound, suffered smaller variation. In relation to bioactive compounds content, the highest amount of TPC was observed in garlic treated with *Saccharomyces cerevisiae* (treatment 3), and for the thiosulfinates was the garlic treated with *Bacillus amyloliquefaciens* (treatment 8) and *Acidithiobacillus ferrooxidans* (treatment 10). The *Bacillus macauenses* (treatment 7) showed the best chelating power and antioxidant activity measured by (DPPH and TAC) whereas, *Bacillus pumilus* (treatments 9) and *Bacillus acidiceler* (treatment 6) showed the best ORAC antioxidant activity. Results indicate that the use of biological control agents have potential to improve quality to the final product in addition to promote the control of the phytopathogen.

Keywords: Antioxidant activity; Garlic; *Sclerotinia sclerotiorum*; Thiosulfinates; Total phenolic compounds.

COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Allium sativum* L. COM LEVEDURAS E BACTÉRIAS NO CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum*

RESUMO

O ataque de fitopatógenos influencia a produção de metabólitos secundários nas plantas, devido à sua resposta de defesa, e o uso de microorganismos benéficos para induzir a resistência das plantas também compartilha esse princípio, porque a planta começa a produzir metabólitos secundários que a protegerão do ataque dos agentes patogênicos, tornando-a resistente. Tiosulfinafos e compostos fenólicos estão associados à proteção das plantas de alho, atuando como antioxidante não enzimático, e à resposta de defesa, atuando como compostos antifúngicos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das interações entre planta x fitopatógeno e os microorganismos antagonistas no teor de compostos fenólicos e tiosulfinafos, e atividade antioxidante (DPPH, capacidade antioxidante total - TAC, capacidade de absorver o radical oxigênio - ORAC, poder redutor e poder quelante) medida em extratos de bulbilhos de alho submetidos a diferentes tratamentos com agentes de controle biológico para o propósito do controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. Os tiosulfinafos variaram significativamente entre os tratamentos e foram menores no controle negativo em comparação com os outros tratamentos. Enquanto os compostos fenólicos totais sofreram menor variação. Em relação ao conteúdo de compostos bioativos, a maior quantidade de TPC foi observada no alho tratado com *Saccharomyces cerevisiae* (tratamento 3) e para os tiosulfinafos foi o alho tratado com *Bacillus amyloliquefaciens* (tratamento 8) e *Acidithiobacillus ferrooxidans* (tratamento 10). O *Bacillus macauenses* (tratamento 7) mostrou o melhor poder quelante e atividade antioxidante medida por (DPPH e TAC), enquanto que *Bacillus pumilus* (tratamentos 9) e *Bacillus acidiceler* (tratamento 6) apresentaram a melhor atividade antioxidante de ORAC. Os resultados indicam que o uso de agentes de controle biológico tem potencial para melhorar a qualidade do produto final, além de promover o controle do fitopatógeno.

Palavras-chave: Atividade antioxidante; Alho; *Sclerotinia sclerotiorum*; Tiosulfinafos; Compostos fenólicos totais.

1 INTRODUCTION

Garlic (*Allium sativum* L.) is an important representative of Alliaceae family that has been cultivated for a long time and whose pharmacological properties are related to secondary metabolites presence. Such as organosulfur compounds responsible for their strong characteristic odor, highlighting allicin, which is a thiosulfinate responsible for most of the biological activities of garlic, like antibiotic, antiviral and antifungal (BORLINGHAUS et al., 2014; CURTIS et al., 2004), and phenolic compounds, which are strongly related to antioxidant activity (BOZIN et al., 2008).

During pathogen infection, one of the plants defense form is linked to the promotion of an oxidative explosion that will trigger secondary responses and, consequently, produce reactive oxygen species (ROS) (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). To prevent ROS damage to cells, plants produce enzymatic and non-enzymatic antioxidants (NASCIMENTO; BARRIGOSI, 2014; JAIN et al., 2013). Thiosulfates and phenolic compounds are associated with the protection of the plant, acting as a non-enzymatic antioxidant, and with its defense response, acting like antifungal compounds (LANZOTTI, 2006; CURTIS et al., 2004).

Phytopathogen attack influences the production of secondary metabolites in plants, and the use of benefic microorganisms to induce plant resistance also shares this principle, because the plant starts to produce metabolites that will protect it from the attack of the pathogens, making it resistant (PIETERSE et al., 2014). Therefore, in the hypothesis of the use of yeasts and *Bacillus* spp. to control *Sclerotinia sclerotiorum*, representing an archetype broad-host necrotrophs, in garlic (*Allium sativum* L.), it is desirable to know the effects in the content of secondary metabolites of the plant and if these are of biological and economic interesting.

In this way, work's purpose was to evaluate the effect of interactions between plant x pathogen and antagonistic microorganisms in total phenolic compounds and thiosulfates content, and antioxidant activity (DPPH, total antioxidant capacity - TAC, oxygen radical absorbance capacity - ORAC, reducing power and chelating power) measured in extracts from garlic cloves submitted to different treatments with biological control agents for the purpose of *Sclerotinia sclerotiorum* control.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Biocontrol of *S. sclerotiorum* by yeasts and bacteria in garlic

To evaluate the effect of yeasts and bacteria of the genus *Bacillus* (Table 4.1) on *Sclerotinia sclerotiorum* control were used garlic cloves from cultivar Gigante roxo. The experiment was carried out based on the methodologies described by Rahman et al. (2016) and Mello et al. (2011) with some adaptations, as described below.

Table 4.1 – Microorganisms used, with their due substrate and site of origin.

CCMA code	Species	Location	Substrates
0018	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Parque do Xingú, MT, Brasil	Indigenous drink (Caxiri)
0026	<i>Pichia kudriavzevii</i>	Passos, MG, Brazil	moist soil
0027	<i>Candida labiduridarum</i>	Arcos, MG, Brazil	moist soil
0057	<i>Bacillus acidiceler</i>	Passos, MG, Brazil	Marigold pepper
0058	<i>Bacillus macauenses</i>	Passos, MG, Brazil	Marigold pepper
0084	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Arcos, MG, Brazil	Pineapple
0098	<i>Bacillus pumilus</i>	Arcos, MG, Brazil	Souari nut
0121	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Luminárias, MG, Brazil	Pixirica

Petri dishes containing the yeast and bacteria, with 4 days growth, were used to prepare aqueous suspensions. To this, 50 ml of sterile distilled water was added to the Petri dishes and the suspension was made using drigalski loop, adjusting them to 1×10^8 cells/mL concentration.

For microbiolization, the garlic cloves were immersed at that suspensions, of each treatment, for 1 hour and then placed to dry in Petri dishes for 30 minutes. After this time the inoculation of the phytopathogen was done. For this, 3 mm diameter discs with 8 days of mycelial growth of the phytopathogen were placed on the surface of the garlic cloves and these were kept in a moist chamber for 15 days.

For the experiment, eight treatments, consisting of each individual microorganism and two controls were performed, being one positive, which was treated only with sterile distilled water inoculated with the phytopathogen, and another negative, which was treated only with sterile distilled water without plant pathogen inoculation (Table 4.2). Six replicates were used for each treatment, each consisting of two garlic cloves.

At 15 days, the garlic cloves were removed from the moist chamber and the diameter of the lesions was measured using a digital caliper. Measurements were taken in two directions, being the average used to evaluate the development of the disease.

Table 4.2 – Description of the treatments codes used in results.

Treatments code	Constitution
1	Garlic without any inoculation (Negative control)
2	Garlic + <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Positive control)
3	Garlic + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> + <i>S. sclerotiorum</i>
4	Garlic + <i>Pichia kudriavzevii</i> + <i>S. sclerotiorum</i>
5	Garlic + <i>Candida labiduridarum</i> + <i>S. sclerotiorum</i>
6	Garlic + <i>Bacillus acidiceler</i> + <i>S. sclerotiorum</i>
7	Garlic + <i>Bacillus macauenses</i> + <i>S. sclerotiorum</i>
8	Garlic + <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> + <i>S. sclerotiorum</i>
9	Garlic + <i>Bacillus pumilus</i> + <i>S. sclerotiorum</i>
10	Garlic + <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> + <i>S. sclerotiorum</i>

2.2 Extracts preparation

The extractions were performed in triplicate according to the following procedure: 500 mg of oven dried (40 °C, with air circulation) and pulverized garlic cloves (Dry Garlic Clove: DGC) were extracted twice for 15 min by sonication with 10 ml of acetone:distilled water in proportion 20:80, renewing the solvent every time. After that, the extracts were centrifuged for 15 min at 6000 rpm, and the supernatants were recuperated and stored at 4°C.

2.3 Determination of total phenolic compounds (TPC)

The total phenol content was determined by a modification of the Folin–Ciocalteu method, described by Singleton, Orthofer and Lamuela-Raventós (1999), with some modifications for our extracts as follows: 40 µL of extract was mixed with 120 µL of Folin–Ciocalteu reagent (0.2 N) in 96 well microplate for 5 min and then 120 µL of a Na₂CO₃ solution (75 g L⁻¹) was added. All samples were incubated at room temperature in the dark conditions for 2 h, and their absorbance was read at 760 nm, in Infinite 200 PRO spectrophotometer (Tecan). The concentration of the calibration curve ($y = 14,282x + 0,1102$, $R^2 = 0,999$) ranged from 0.008 to 1 mg mL⁻¹ in an ethanolic solution of gallic acid. The experiment was conducted in triplicates and the results are expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) g⁻¹ dry garlic cloves (DGC).

2.4 Determination of thiosulfinates (TS)

The quantitative determination of total thiosulfinates in the extracts was carried out, following the methodology described by Li and Xu (2007) with some modifications, and was adapted to be performed directly on the microplate as described below.

The solution of cysteine (20 mM) was freshly prepared in 50 mM Hepes buffer (pH 7.5). The concentration of cysteine was determined by measuring the amount of 2-nitro-5-thiobenzoate (NTB) formed after reaction with 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). All the reactions were carried out at room temperature. Cysteine solution was diluted 20 times and 50 μ L was added to the microplate with 50 μ L of the sample or the solvent used in the extraction (negative control), and the mixture was incubated for 15 min. This reaction mixture was diluted 2 times adding 100 μ L of distilled water. Then, 100 μ L of 50 mM Hepes buffer (pH 7.5) containing 1.5 mM DTNB was added and. The absorbance was measured at 412 nm after 15 min using an Infinite 200 PRO spectrophotometer (Tecan). Finally, the thiosulfinates concentration can be determined by the following equation:

$$C_{\text{thiosulfinates}} \text{ (mmol/ml)} = (\Delta A_{412} \times 2) / (2 \times 14150)$$

where $\Delta A_{412} = A_0 - A$. A_0 : absorbance of the negative control. A : absorbance of the reaction with sample. ΔA_{412} is multiplied by 2 due to the dilution made in the reaction mixture, 14150 is the molar extinction coefficient of NTB, and 2 means half amount of cysteine reduced denotes the amount of thiosulfinates.

2.5 Antioxidant activities

2.5.1 Total antioxidant activity (TAC)

The total antioxidant capacity (TAC) of samples was evaluated by the green phosphomolybdenum complex formation according to Prieto, Pineda and Aguilar (1999). An aliquot of 25 μ L of the sample solution was combined with 1 mL of reagent solution (0.6 M sulphuric acid, 28 mM sodium phosphate, and 4 mM ammonium molybdate) in Falcon 15 mL tubes. The Falcon tubes were capped and incubated in a water bath at 95 °C for 90 min. After the samples had cooled to room temperature, the absorbance of the mixture was measured at 695 nm, against a blank, in Infinite 200 PRO spectrophotometer (Tecan). The aqueous ascorbic acid solution calibration curve ($y = 0,3811x + 0,0319$, $R^2 = 0,993$) comprised

concentration range from 2,0 to 0,0078 mg mL⁻¹. The experiment was conducted in triplicates and the results reported (ascorbic acid equivalent antioxidant activity) are mean values expressed as g of ascorbic acid equivalents (AAE) g⁻¹ dry garlic cloves (DGC).

2.5.2 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

Extracts had been dried in oven at 40 °C and resolubilized in 75 mM phosphate buffer (pH 7.4). The ORAC assay was carried out on an Infinite 200 PRO spectrophotometer (Tecan) and the procedure was based on a previous report of Ou, Hampsch-Woodill and Prior (2001). All reagents were prepared at 75 mM phosphate buffer (pH 7.4). In the final assay mixture (0.210 mL total volume), 30 µL of samples were placed in 96 well microplate with 150 µL of fluorescein FL (6.3 x 10⁻⁸ M), representing the target of free radical attack, and were preincubated at 37 °C during 10 min. Then, was added 30 µL of AAPH (1.28 x 10⁻² M), used as a peroxy radical generator. Trolox (0,0019, 0,0039, 0,0078, 0,0156, 0,0312, 0,0625, 0,125 and 0,25 mg mL⁻¹) was used as the control standard. The analyzer was programmed to record the fluorescence of FL every minute for 150 min, with shaking before each read after the addition of AAPH. Results were calculated based on differences in areas under the sodium fluorescein decay curve (AUC) between the blank and a sample. The AUC was calculated as:

$$\text{AUC} = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + f_4/f_0 + \dots + f_{150}/f_0$$

The Trolox calibration curve ($y = 10^9 x + 10^7$, $R^2 = 0,9993$) comprised concentration range from 0,25 to 0,0019 mg mL⁻¹ and results are expressed as mg Trolox equivalent (TE) g⁻¹ dry garlic cloves (DGC).

2.5.3 Reducing power

The reducing property of the treatments was determined by assessing the ability of the extract to reduce FeCl₃ solution as described by Oyaizu (1986). An aliquot of 100 µL of the samples was mixed with 200 µL of 200 mM sodium phosphate buffer (pH 6), and 200 µL of 1% potassium ferrocyanide. The mixture was vortexed and incubated at 50°C for 20 minutes, and then 200 µL of 10% trichloroacetic acid was added, followed by 600 µL of water and,

finally, 120 μL of 0,1% ferric chloride. This mixture was vortexed and the absorbance was measured at 700 nm against a reagent blank. A higher absorbance indicates a higher reducing power. Ascorbic acid was used as positive control. The aqueous ascorbic acid solution calibration curve ($y = 4,7967x + 0,0941$, $R^2 = 0,9992$) comprised concentration range from 5,0 to 0,078 mg mL^{-1} . The experiment was conducted in triplicates and the results reported (ascorbic acid equivalent antioxidant activity) are mean values expressed as g of ascorbic acid equivalents (AAE) g^{-1} dry garlic cloves (DGC).

2.5.4 DPPH free radical scavenging activity

The plant extracts were tested for the scavenging effect on DPPH radical according to the method of Soler-Rivas, Espín and Wichers (2000), adapted to 96-well microplate. Each sample at different concentrations (100 μL) and 500 μL of 60 μM ethanolic solution of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) was added in 1,5 ml Eppendorf tubes and vortexed. After 60 min of reaction at room temperature, the tubes were centrifuged for 10 minutes at 5000 rpm. Finally, the reactions was placed in 96 well microplate and absorbance measurements were made at 517 nm using *Infinite 200 PRO spectrophotometer (Tecan)*.

The percentage of inhibition was calculated using the following equation: Inhibition = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ (%), where A_0 is the absorbance of the control (without sample) and A_1 is the absorbance in the presence of the sample. Tests were carried out in triplicate. The sample concentration providing 50% inhibition (IC_{50}) was obtained by plotting the inhibition percentage against extract concentrations.

2.5.5 Chelating power

The degree of chelating of ferrous ions by garlic extracts of different treatments was evaluated according to Miguel (2010). Briefly, 50 μL of samples and 150 μL of water were incubated with 30 μL FeSO_4 (0,5 mM). After 5 minutes was added 40 μL of 5 mM ferrozine to initiate the reaction, and after 10 minutes, the absorbance at 562 nm was measured. An untreated sample served as the control. The percentage of chelating ability was determined according to the following formula: $[(A_0 - A_1)/A_0 * 100]$, in which A_0 is the absorbance of the control (without sample) and A_1 the absorbance of sample. The values of IC_{50} were determined as reported above.

2.6 Statistical analysis

The experiment was done in triplicate for each treatment. The results were expressed as the mean \pm standard deviation and compared by one-way ANOVA and Tukey's test at the 5% significance level using free version of STATISTICA software version 10 (STATSOFT, INC., 2011).

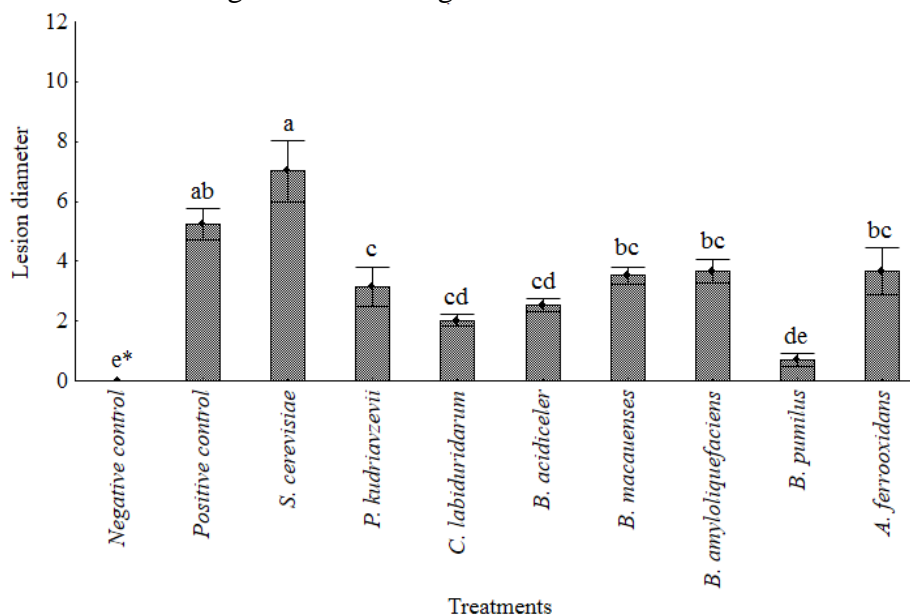
Dynamic curves from an ORAC assay were plotted using free version of NCSS Data analysis software (NCSS 11 STATISTICAL SOFTWARE, 2016).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Lesion diameter

The lesion diameter differs significantly between treatments (Figure 4.1). All biological treatments, consisting in application of microorganisms in order to biocontrol the growth and the symptoms generated by the phytopathogen, on garlic clove had significantly reduced the lesion diameter at different levels, except by the *Saccharomyces cerevisiae* (treatment 3) which had a negative impact by increasing the lesion diameter. *Bacillus pumilus* (treatment 9) was the most efficient microorganism in decreasing the diameter of lesion, followed by *Candida labiduridarum* (treatment 5) and *Bacillus acidicer* (treatment 6) (Figure 4.1).

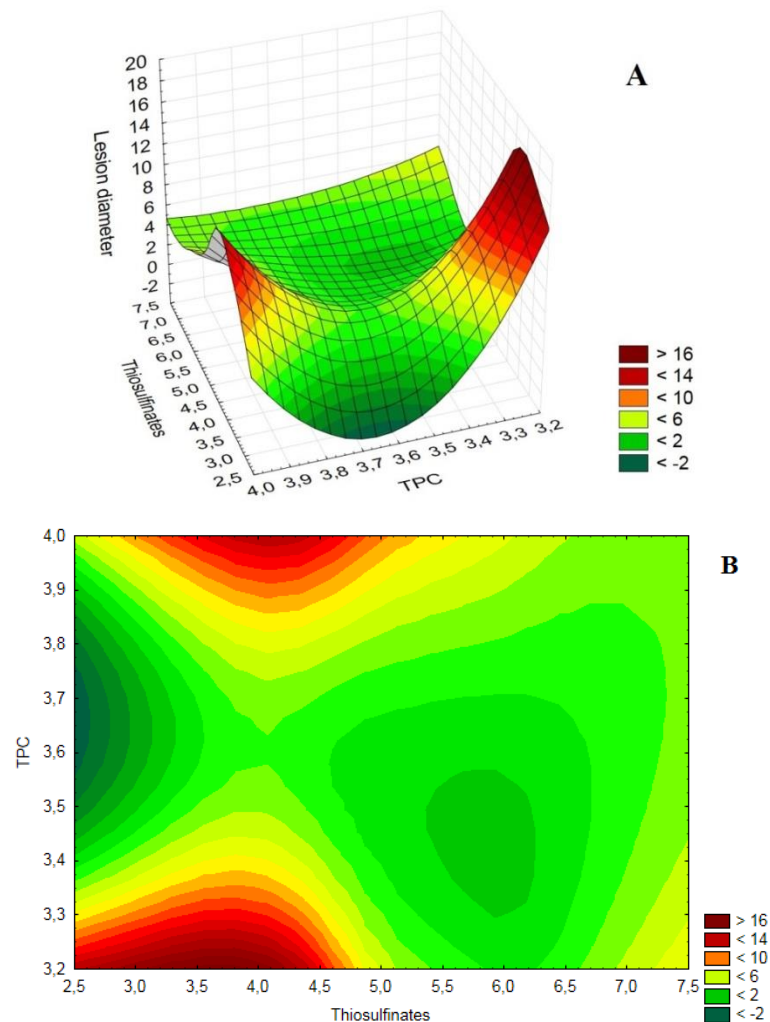
Figure 4.1 – Lesion diameter (mm) of *Sclerotinia sclerotiorum* in garlic cloves treated with different antagonistic microorganisms.



Subtitle: *Bars followed by the same letter do not differ by the Tukey test ($p < 0,05$).

The Figure 4.2 shows the surface plot of lesion diameter against thiosulfinates (TS) and total phenolic compounds (TPC) in garlic cloves. The diameter of the lesion is influenced by the amounts of thiosulfinates and phenolic compounds. Lower amounts of these bioactive compounds are correlated with high diameter lesion. Also, lower amounts of TS and high TPC is correlated with high lesions diameter, what can be associated with the plant response to the infection increasing the phenolic compounds content when the infection is already occurring (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992). Whereas, low lesion diameter are founds when garlic cloves showed high thiosulfinates content.

Figure 4.2 – Surface plot of lesion diameter (mm) against thiosulfinates ($\mu\text{mol/g}$ dry plant) and total phenolic compounds (TPC) (mg EAG/g dry plant).



All the treatments of garlic cloves with antagonistic microorganisms increased thiosulfinates content and showed reduction in diameter of lesion by *Sclerotinia sclerotiorum*. This results emphasize the capacity of benefic microorganisms to improve protection in

plants, increasing the resistance to phytopathogen, besides promote its growth and keeping it healthy (PIETERSE et al., 2014).

3.2 Total phenolic compounds (TPC)

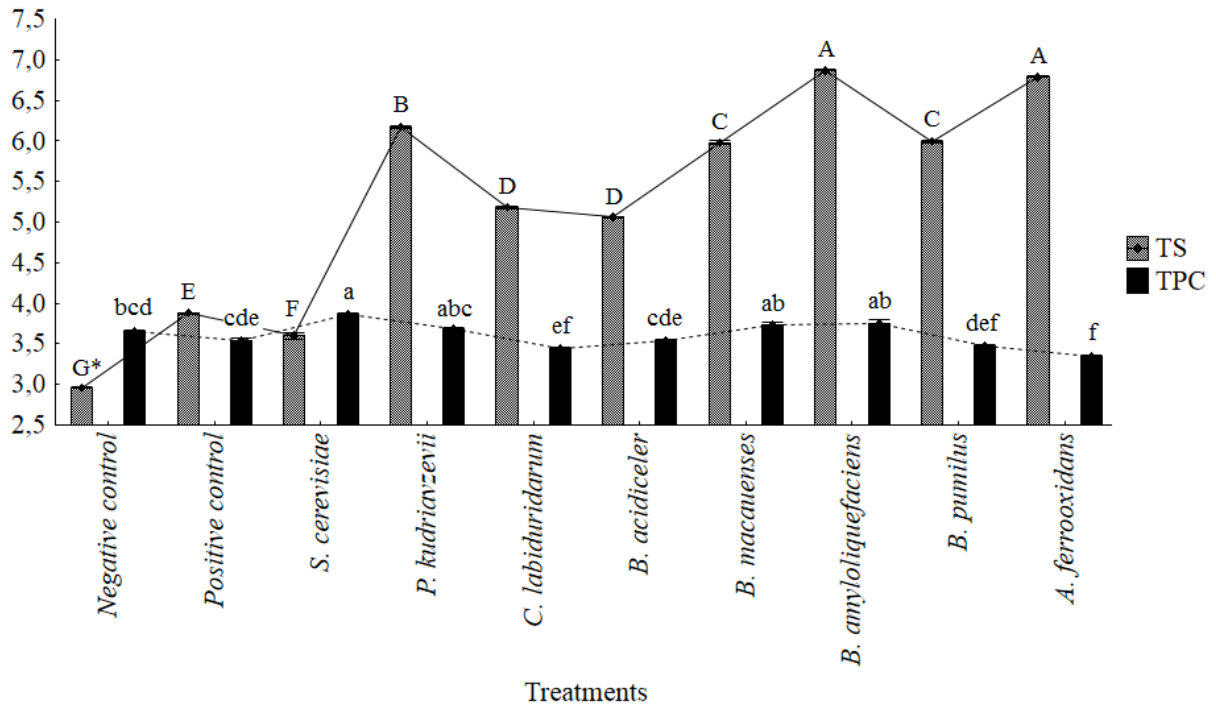
The recovery of phenolic compounds in the extracts, measured using the Folin-Ciocalteu method and expressed as gallic acid equivalents, is shown in Figure 4.3. We can observe only small differences among phenolic amounts. The amount of total phenols in the examined extracts ranged from $3,34 \pm 0,05$ to $3,87 \pm 0,04$ mg GAE g⁻¹ DGC, corresponding to *Acidithiobacillus ferrooxidans* (treatment 10) and *Saccharomyces cerevisiae* (treatment 3), respectively. Previous studies have shown higher amounts ranging from 21,27 to 33,96 mg GAE/g for 43 garlic cultivars (CHEN et al., 2013), while very low amounts of $0,18 \pm 0,006$ mg g⁻¹ DGC has been reported by (BOZIN et al., 2008).

According to Figure 4.3, garlic inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* did not affect the amount of TPC produced by garlic, since there are no significant statistical differences between the negative and positive control at the level 95%. Only the treatments 3, 5 and 10 presented significant differences of the controls, while the treatment 3, corresponding to garlic treated with *Saccharomyces cerevisiae* and infected by *S. sclerotiorum* presented the highest amount of total phenolic compounds, the treatments 5 and 10, garlic treated with *Candida labiduridarum* and *Acidithiobacillus ferrooxidans* and infected by *S. sclerotiorum*, respectively, showed the lowest amounts of TPC (Figure 4.3).

3.3 Thiosulfinates (TS)

Thiosulfinates content in garlic cloves depends on conditions of plant cultivation (OLECH; ZABORSKA, 2012). Figure 4.3 shows the effects of different treatments on the amounts of thiosulfinates produced by garlic cloves. The content of thiosulfinates differed significantly between treatments, and was ranging from $2,96 \pm 0,01$ μmol g⁻¹ DGC, for negative control (treatment 1), to $6,88 \pm 0,01$ μmol g⁻¹ DGC, for *Bacillus amyloliquefaciens* (treatment 8). The highest content of these compounds was detected in treatments 8 and 10 without statistical differences, corresponding to garlic cloves treated with *Bacillus amyloliquefaciens* and *Acidithiobacillus ferrooxidans*, respectively, and infected with the phytopathogen. Followed by the one treated with the yeast *Pichia kudriavzevii* (treatment 4).

Figure 4.3 – Thiosulfinates (TS) ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DGC) and total phenolic compounds (TPC) (mg EAG g^{-1} DGC) contents in garlic from different treatments.



Subtitle: Bars followed by the same capital letter (TS) and lower case letter (TPC) do not differ by the Tukey test ($p < 0,05$).

All the treatments with antagonistic microorganisms and phytopathogen show more thiosulfinates than garlic without any microorganism inoculation (Figure 4.3), this result suggest that the microorganisms induced garlic cloves to improve the thiosulfinates amount as a defense response.

Pontin et al. (2015) showed increase in terpene biosynthesis in different tissues (root, protobulb, leaf sheath and blade) of garlic plants *in vitro* when infected with *Sclerotium cepivorum*. In our study was observed increase in phenolic compounds and thiosulfinates in garlic cloves treated with biological control agents and infected with *Sclerotinia sclerotiorum*, which are compounds related with the plant defense response to phytophathogens (CURTIS et al., 2004; NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992).

3.4 Antioxidant activities

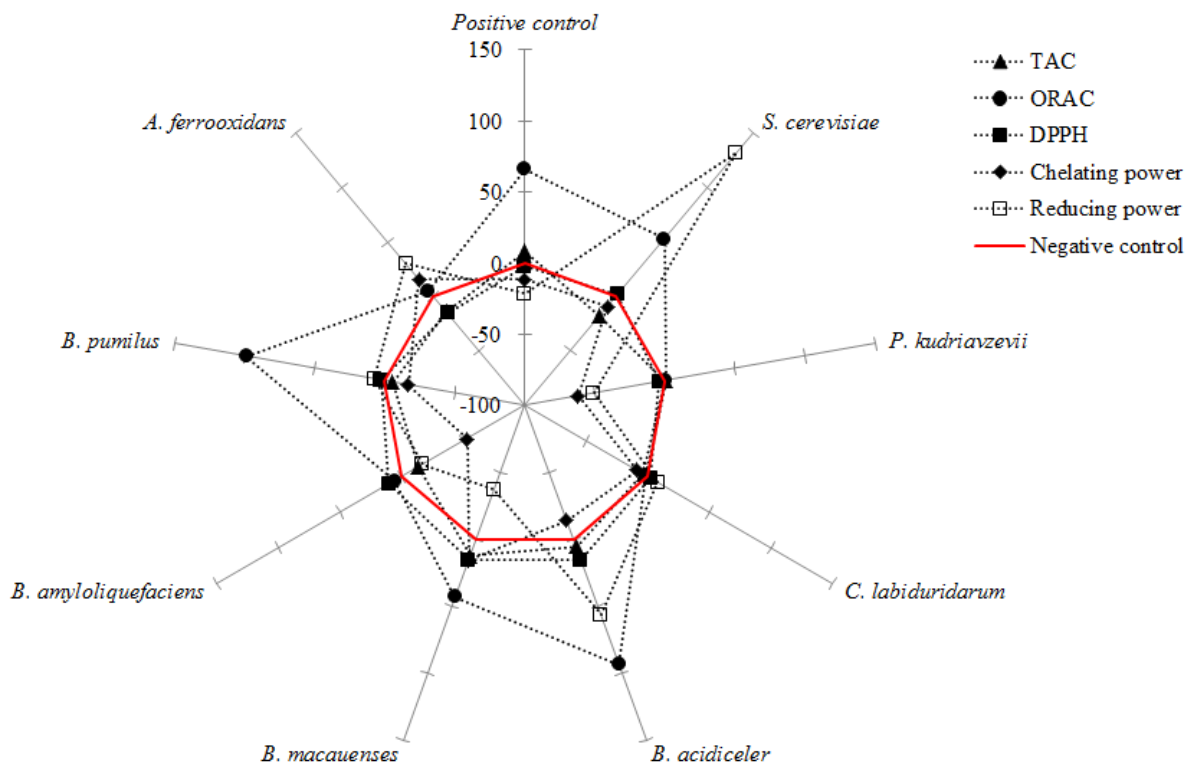
In plant x phytopathogen interactions, plant defense response is often associated with oxidative stress, just as it occurs in *Sclerotinia sclerotiorum* infections (JAIN et al., 2013; WALZ et al., 2008). The oxidative burst is considered necessary for several subsequent

defense responses, generating reactive oxygen species (ROS) that serve as secondary messengers in intra- and intercellular signalling pathways (JAIN et al., 2013).

In order to protect themselves from the oxidative damage caused by ROS in the oxidative explosion, plants developed antioxidant systems that help the management of ROS so that they are at the lowest possible levels within the cell (JAIN et al., 2013; RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). One of this protection mechanisms is the production of organosulfur compounds, such as thiosulfinates, and phenolic compounds, that are directly related to the antioxidant activity of garlic (KIM; KUBOTA; KOBAYASHI, 1997; LANZOTTI, 2006; NUUTILA et al., 2003; WANG et al., 2015), protecting plant from oxidative stress and from phytopathogen attack.

In this way, different antioxidant tests were performed to verify the relationship between inoculation of microorganisms and antioxidant potential of garlic cloves. In Figure 4.4 is possible to observe the percentage of variation in each antioxidant activities evaluated for different treatments with phytopathogen and antagonistic microorganism in relation to the negative control (red line), that represent garlic cloves without inoculation.

Figure 4.4 – Percentage variation in antioxidant activities of different treatments in relation to the negative control.



3.4.1 Total antioxidant activity (TAC)

The quantitative antioxidant capacity was measured spectrophotometrically through the phosphomolybdenum method, which is based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) by the sample and the subsequent formation of green phosphate/Mo (V) complex with a maximum absorption at 695 nm (PISOSCHI; NEGULESCU, 2012). The mean TAC values are shown in Table 4.3.

The total antioxidant activity varied between treatments from $167,67 \pm 4,19$ mg AAE g^{-1} DGC, for *Saccharomyces cerevisiae* (treatment 3), to $229,76 \pm 9,78$ mg AAE g^{-1} DGC, for *B. macauenses* (treatment 7). Treatment 3, garlic treated with *Saccharomyces cerevisiae* and infected with phytopathogen, which presented the highest lesion diameter, exhibited the lowest TAC. Also, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Acidithiobacillus ferrooxidans* (treatments 8 and 10, respectively), that presented the highest amounts of thiosulfinates, showed lower TAC. Only the garlic cloves treated with *Bacillus macauenses* and infected by *S. sclerotiorum* (treatment 7), demonstrated total antioxidant activity significantly higher than the negative control (Table 4.3 and Figure 4.4).

Table 4.3 – Total antioxidant capacity – TAC (mg AAE g^{-1} DGC), Oxygen radical absorbance capacity – ORAC (mg TE g^{-1} DGC) and Reducing power (mg AAE g^{-1} DGC) from different treatments.

Treatments	TAC	ORAC	Reducing power
Negative control	$204,24 \pm 8,61$ bc	$2,37 \pm 0,05$ d	$5,52 \pm 0,21$ cd
Positive control	$221,17 \pm 9,81$ ab	$3,93 \pm 0,23$ b	$4,32 \pm 0,29$ g
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$167,67 \pm 4,19$ e	$3,61 \pm 0,25$ bc	$10,01 \pm 0,24$ a
<i>Pichia kudriavzevii</i>	$203,95 \pm 2,16$ bc	$2,38 \pm 0,02$ d	$4,91 \pm 0,09$ efg
<i>Candida labiduridarum</i>	$196,36 \pm 7,54$ cd	$2,32 \pm 0,06$ d	$5,31 \pm 0,24$ de
<i>Bacillus acidicer</i>	$215,82 \pm 3,36$ abc	$4,59 \pm 0,09$ a	$8,32 \pm 0,05$ b
<i>Bacillus macauenses</i>	$229,76 \pm 9,78$ a	$3,39 \pm 0,19$ c	$5,25 \pm 0,35$ def
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	$176,62 \pm 3,66$ de	$2,51 \pm 0,01$ d	$4,35 \pm 0,03$ g
<i>Bacillus pumilus</i>	$193,11 \pm 9,51$ cd	$4,17 \pm 0,14$ a	$4,67 \pm 0,13$ fg
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	$175,06 \pm 6,83$ de	$2,49 \pm 0,22$ d	$6,09 \pm 0,14$ c

Subtitle: *Means followed by the same letter in the column do not differ by the Tukey test ($p < 0,05$).

3.4.2 Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

The ORAC assay represents a typical hydrogen atom transfer (HAT)-based method, since it employs a competitive reaction scheme between antioxidants and a fluorescence probe (fluorescein) for a radical, usually peroxy radical generated by 2,2- azobis(2-

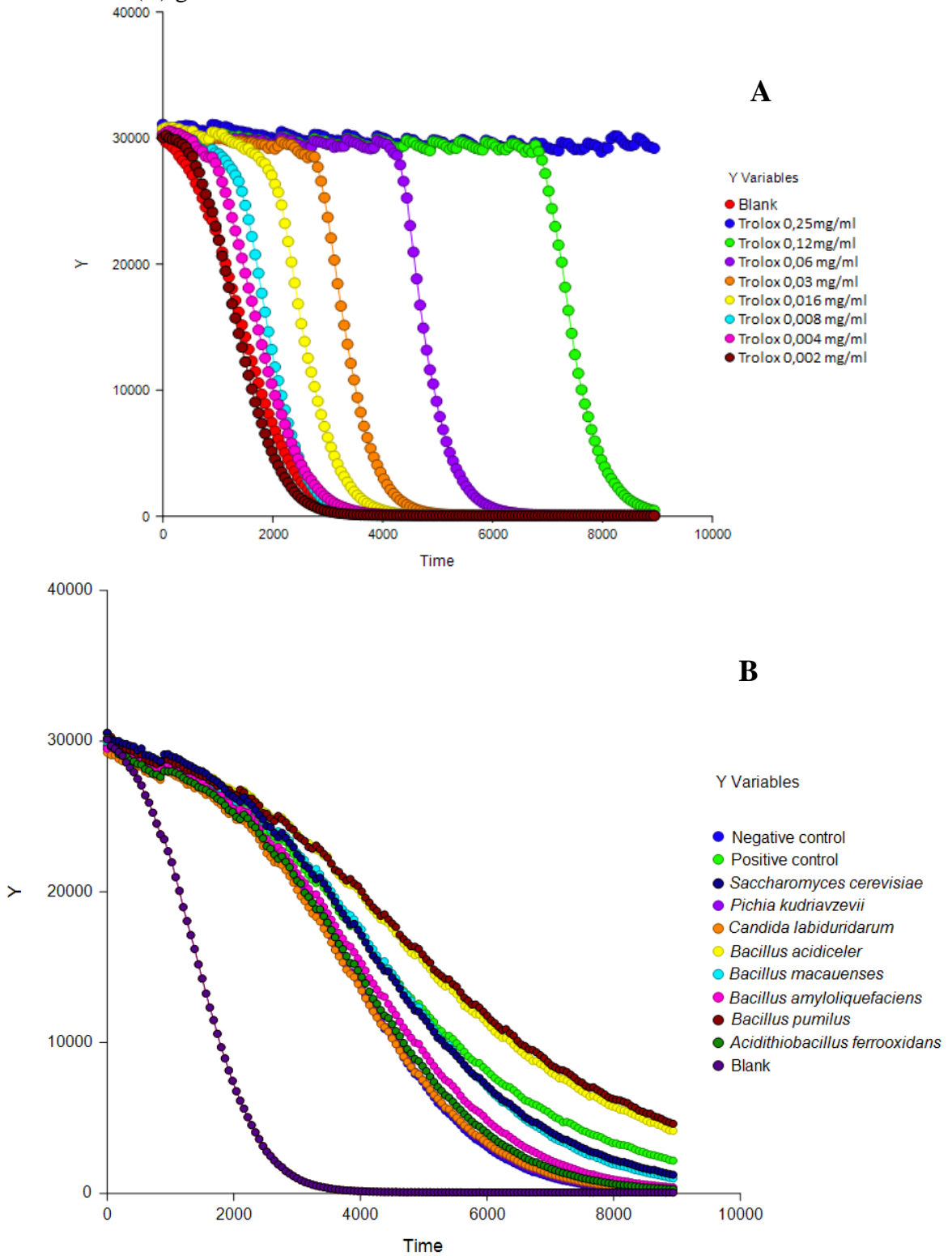
amidinopropane)dihydrochloride (AAPH) (ROY et al., 2010). Results are expressed as mg Trolox equivalent (TE) g⁻¹ of dried garlic cloves (DGC), and varied from 2.32 ± 0.06 mg TE g⁻¹ DGC, for *Candida labiduridarum* (treatment 5), to 4.71 ± 0.14 mg TE g⁻¹ DGC, for *Bacillus pumilus* (treatment 9) (Table 4.3).

Previous studies had reported the antioxidant activity of garlic measured by ORAC method, and was 105 ± 6 mmol TE g⁻¹ extract solids (HO et al., 2010), 100.8 ± 5.01 µmol TE g⁻¹ of freeze-dried garlic (JAVIER MORENO et al., 2006). In our study, the antioxidant activity of treatments range between 9,29 ± 0,29 and 18,85 ± 0,63 µmol TE g⁻¹ DGC for *Candida labiduridarum* (treatment 5) and *Bacillus pumilus* (treatment 9), respectively.

The better oxygen radical absorbance capacity (ORAC) was presented by the garlic cloves treated with *Bacillus pumilus* (treatment 9) and *B. acidiceler* (treatment 6), followed by the garlic infected with *S. sclerotiorum* (treatment 2) and garlic treated with *Saccharomyces cerevisiae* (treatment 3) and *Bacillus macauenses* (treatment 7) (Table 4.3 and Figure 4.4).

The dynamic curves from ORAC assay, showed in Figure 4.5, demonstrates the course of the different treatments extracts in the ability to protect the oxidizable substrate (fluorescein), whose fluorescence is used for measurement, of the pro-oxidant (peroxyl radical), which when the substrate is oxidized this loses fluorescence (BOROSKI et al., 2015). A larger area under the curve representing greater capacity to absorb the oxygen radicals, keeping the fluorescence longer.

Figure 4.5 – Dynamic curves from an ORAC assay for (A) Trolox antioxidant standards and (B) garlic extracts of different treatments.



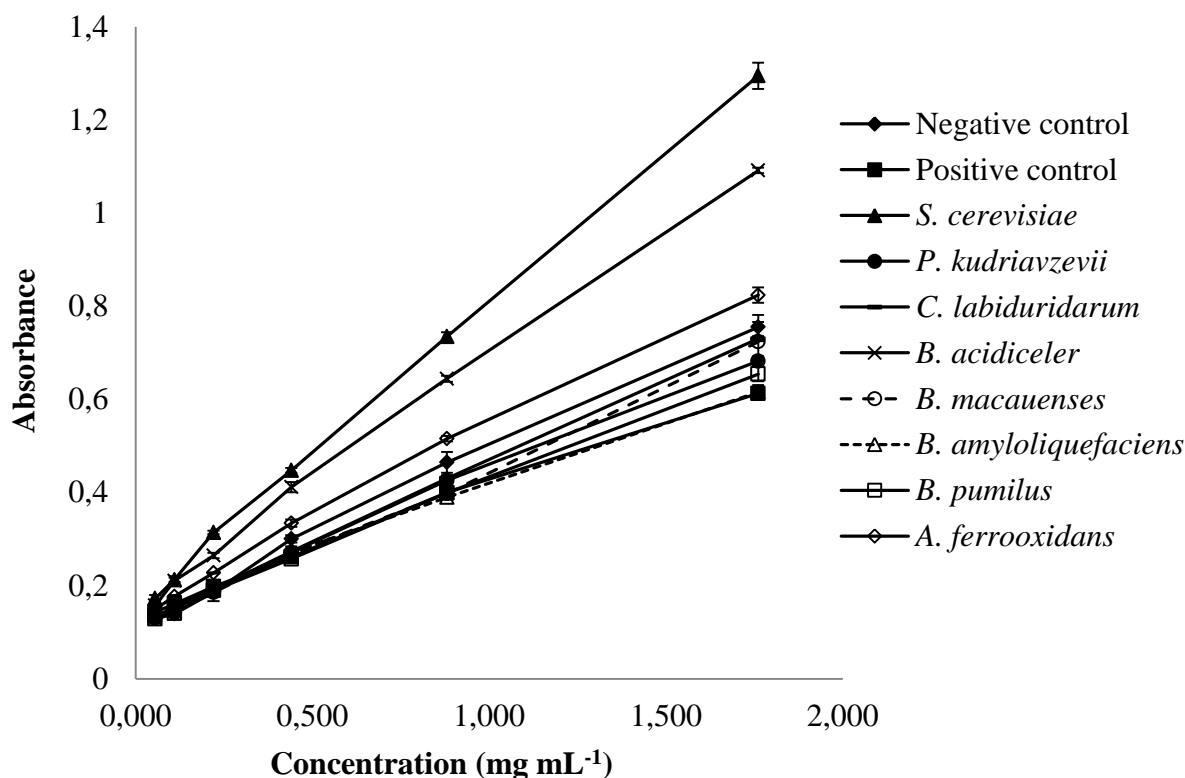
3.4.3 Reducing power

The reducing power assay measures the electron donating ability of antioxidants using the potassium ferricyanide reduction method. Antioxidants cause the reduction of the Fe^{3+} /ferricyanide complex to the ferrous form and activity is measured as the increase in the absorbance at 700 nm (VLADIMIR-KNEŽEVIĆ et al., 2011). The reducing property is generally associated with the presence of reductants which breaks of free radical chain by donation of a hydrogen atom (LOGANAYAKI; SIDDHURAJU; MANIAN, 2013).

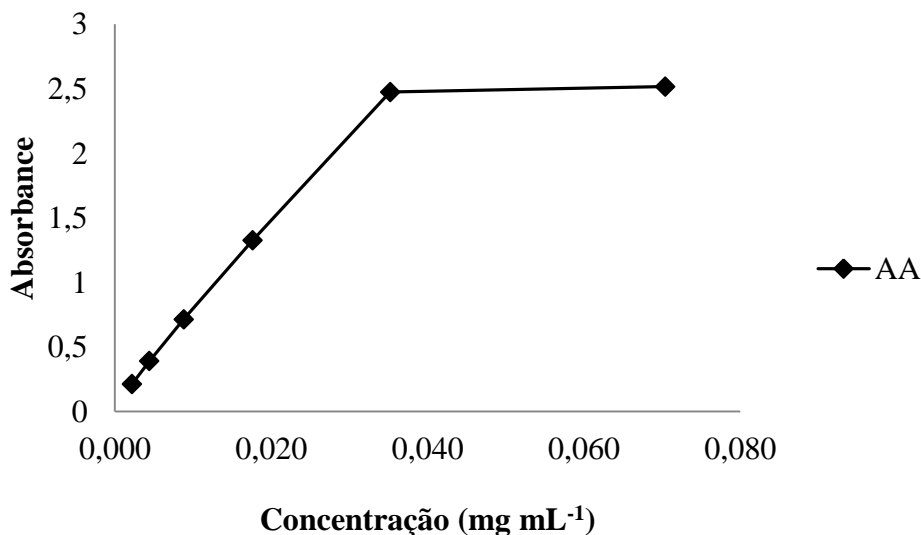
Figure 4.6 shows the plot of reducing power (as indicated by absorbance at 700 nm) by the extracts of different treatments which increased with increasing concentration in dose dependent manner. All extracts possessed the ability to reduce iron (III) ions (Figure 4.6), and this ability was lower compared to ascorbic acid (Figure 4.7).

The garlic cloves treated with *Saccharomyces cerevisiae* (treatment 3) exhibited the best reducing power, corresponding to 10.01 mg AAE g^{-1} DGC, followed by *Bacillus acidiceler* (treatment 6), $8,32 \pm 0,05$ mg AAE g^{-1} DGC, and *Acidithiobacillus ferrooxidans* (treatment 10), $6,09 \pm 0,14$ mg AAE g^{-1} DGC (Table 4.3 and Figure 4.4). Those three treatments, was better than the negative control (treatment 1). Whereas, positive control (treatment 2) showed lower reducing power 4.32 mg AAE g^{-1} DGC (Figure 4.6 and Table 4.3).

Similar absorbance range represented in Figure 4.6 for the reducing power was observed by Gulfraz et al. (2014), with absorbance values around 0.45 ± 0.01 mg g^{-1} for phenolic compounds extracted from dry garlic cloves, and 1.91 ± 0.12 mg g^{-1} for crude garlic.

Figure 4.6 – Reducing power of diferents treatment extracts.

Subtitle: Values are means of triplicate determinations ($n = 3$) \pm standard deviation.

Figure 4.7 – Reducing power of Ascorbic Acid (AA).

Subtitle: Values are means of triplicate determinations ($n = 3$) \pm standard deviation.

3.4.4 DPPH free radical scavenging activity

All the extracts were evaluated for their antioxidant activities by DPPH free radical scavenging assay, and the results were depicted as IC₅₀ value (Table 4.4), the sample

concentration at which the inhibition percentage reaches 50%. The DPPH• is a stable free radical with an absorption band at 515 nm that accepts an electron or hydrogen radical to become a stable diamagnetic molecule and loses this absorption. The DPPH• method is widely used to determine the antiradical/antioxidant activity of purified phenolic compounds as well as natural plant extracts (PÉREZ-HERNÁNDEZ et al., 2012).

All the extracts showed DPPH radical scavenging activities in a dose-dependent manner (results not shown). In the DPPH assay, the IC₅₀ values for ranged from $2,6 \pm 0,05$ to $3,64 \pm 0,02$ mg mL⁻¹ for garlic cloves treated with *Bacillus macauenses* (treatment 7) and *Acidithiobacillus ferrooxidans* (treatment 10), respectively (Table 4.4).

The best scavenging activities corresponding to the lowest IC₅₀ values, that were obtained for treatments 7, 6 and 8, garlic cloves treated with *Bacillus macauenses*, *Bacillus acidiceler* and *Bacillus amyloliquefaciens*, respectively. Whereas, treatment 10, showed the lowest free radical scavenging activity (Table 4.4).

Table 4.4 – DPPH (IC₅₀, mg mL⁻¹) and Chelating power (IC₅₀, mg mL⁻¹) from different treatments.

Treatments	DPPH	Chelating power
Negative control	3,15 ± 0,03 cde	0,33 ± 0,00 b
Positive control	3,22 ± 0,08 de	0,37 ± 0,01 c
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3,10 ± 0,08 cd	0,36 ± 0,02 bc
<i>Pichia kudriavzevii</i>	3,28 ± 0,04 e	0,54 ± 0,01 d
<i>Candida labiduridarum</i>	3,09 ± 0,04 cd	0,36 ± 0,00 bc
<i>Bacillus acidiceler</i>	2,66 ± 0,02 ab	0,38 ± 0,01 c
<i>Bacillus macauenses</i>	2,65 ± 0,05 a	0,28 ± 0,01 a
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2,82 ± 0,04 b	0,51 ± 0,01 d
<i>Bacillus pumilus</i>	3,06 ± 0,05 c	0,39 ± 0,01 c
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	3,64 ± 0,02 f	0,28 ± 0,01 a

Subtitle: *Means followed by the same letter in the column do not differ by the Tukey test ($p < 0,05$).

3.4.5 Ferrous ion chelating power

The transition metal ion Fe²⁺ possesses the ability to perpetuate the formation of free radicals by gain or loss of electrons. Thus, the reduction of the formation of reactive oxygen species can be achieved by the chelating of metal ions with chelating agents that reduces the redox potential, thereby stabilizing the oxidized form of the metal ion (SUDAN et al., 2014).

All extracts from different treatments presented the ability for chelating Fe²⁺ metal ions (Figure 4.4). The metal chelating potential of samples varied significantly ($p < 0,05$) and

the results are depicted as IC₅₀ in Table 4.4. The IC₅₀ varied from 0.28 ± 0.01 mg mL⁻¹ for *Bacillus macauenses* (treatment 7) and *Acidithiobacillus ferrooxidans* (treatment 10) to $0,54 \pm 0.01$ mg mL⁻¹ for *Pichia kudriavzevii* (treatment 4).

The presence of *Sclerotinia sclerotiorum* (treatment 2) did decrease slightly the chelating power of garlic extract (Figure 4.6). All the infected garlic and treated with microorganisms presented chelating activity lower than the negative control, except the garlic treated with *Bacillus macauenses* (treatments 7) and *Acidithiobacillus ferrooxidans* (treatment 10), which presented the best chelating activity, and was almost two folds higher than the one exhibited by the treatments 4 and 8. Liu et al. (2014) found that garlic methanol extracts showed excellent metal chelating activity, and garlic aqueous extract increased the metal chelating activity about 54,7 % after boiling procedure. In our study, we identify two microorganisms that increased the metal chelating activity around 15,6 % in relation to the negative control (Figure 4.4).

4 FINAL CONSIDERATIONS

In relation to bioactive compounds content, the highest amount of TPC was observed in garlic treated with *Saccharomyces cerevisiae* (treatment 3). All treatments increased thiosulfinates content in relation to the negative control, highlighting *Bacillus amyloliquefaciens* (treatment 8) and *Acidithiobacillus ferrooxidans* (treatment 10).

The *Bacillus macauenses* (treatment 7) showed the best chelating power and antioxidant activity measured by (DPPH and CAT) whereas, *Bacillus pumilus* (treatments 9) and *Bacillus acidiceler* (treatment 6) showed the best ORAC antioxidant activity.

Bacillus pumilus (treatment 9) besides the hight reduction on diameter of lesion was the treatment that showed the large ORAC activity and increase in thiosulfinates content, not presenting significant differences in relation to negative control for TPC, CAT and DPPH, exhibiting reduction only in the chelating power, presenting greate interest for application as a biological control agent that will improve garlic thiosulfinates content and antioxidant activity.

In conclusion, the present results show that the interactions between plant x pathogen and antagonistic microorganism have effect on garlic total phenolic compounds and thiosulfinates content, and their antioxidant activities. This indicates that the use of biological control agents have potential to improve quality to the final product in addition to promote the control of the phytopathogen.

REFERENCES

- BORLINGHAUS, J. et al. Allicin: chemistry and biological properties. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12591–12618, 2014.
- BOROSKI, M. et al. **Antioxidantes : princípios e métodos analíticos**. 1. ed. Curitiba, PR: Appris, 2015.
- BOZIN, B. et al. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 925–929, 2008.
- CHEN, S. et al. Evaluation of garlic cultivars for polyphenolic content and antioxidant properties. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e79730, 2013.
- CURTIS, H. et al. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 65, n. 2, p. 79–89, 2004.
- GULFRAZ, M. et al. A comparative study of antimicrobial and antioxidant activities of garlic (*Allium sativum* L.) extracts in various localities of Pakistan. **African Journal of Plant Science**, v. 8, n. 6, p. 298–306, 2014.
- HO, S.-C. et al. Evaluation of peroxynitrite-scavenging capacities of several commonly used fresh spices. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1102–1107, 2010.
- JAIN, A. et al. Microbial consortium-induced changes in oxidative stress markers in pea plants challenged with *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 2, p. 388–398, 2013.
- JAVIER MORENO, F. et al. Changes in antioxidant activity of dehydrated onion and garlic during storage. **Food Research International**, v. 39, n. 8, p. 891–897, 2006.
- KIM, S. M.; KUBOTA, K.; KOBAYASHI, A. Antioxidative activity of sulfur-containing flavor compounds in garlic. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n. 9, p. 1482–1485, 1997.
- LANZOTTI, V. The analysis of onion and garlic. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1–2, p. 3–22, 2006.
- LI, Y.; XU, S. Y. Preparation of garlic powder with high allicin content. **Agricultural Sciences in China**, v. 6, n. 7, p. 890–898, 2007.
- LIU, C. et al. Determination of antioxidant activity in garlic (*Allium sativum*) extracts subjected to boiling process in vitro. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, n. 7, p. 383–387, 2014.
- LOGANAYAKI, N.; SIDDHURAJU, P.; MANIAN, S. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L.

Journal of Food Science and Technology, v. 50, n. 4, p. 687–695, 2013.

MELLO, M. et al. Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 78–83, 2011.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9252–9287, 2010.

NASCIMENTO, J. B.; BARRIGOSI, J. A. F. O papel de enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian Academy**, v. 1, p. 234–250, 2014.

NCSS 11 STATISTICAL SOFTWARE. **NCSS, LLC**. Kaysville, Utah, USA, 2016.
Disponível em: <ncss.com/software/ncss>

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, n. 1, p. 369–389, 1992.

NUUTILA, A. M. et al. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 81, p. 485–493, 2003.

OLECH, Z.; ZABORSKA, W. A spectrophotometric assay for total garlic thiosulfinates content. Kinetic aspects of reaction with chromogenic thiols. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 62, n. 1, p. 23–29, 2012.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619–4626, 2001.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 44, n. 6, p. 307–315, 1986.

PÉREZ-HERNÁNDEZ, L. M. et al. Phenolic characterization, melanoidins, and antioxidant activity of some commercial coffees from *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 56, n. 4, p. 430–435, 2012.

PIETERSE, C. M. J. et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual review of phytopathology**, v. 52, p. 347–75, 2014.

PISOSCHI, A. M.; NEGULESCU, G. P. Methods for total antioxidant activity determination: a review. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2012.

PONTIN, M. et al. *Allium sativum* produces terpenes with fungistatic properties in response to infection with *Sclerotium cepivorum*. **Phytochemistry**, v. 115, p. 152–160, 2015.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant

capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337–41, 1999.

RAHMAN, M. M. E. et al. Suppressive effects of *Bacillus* spp. on mycelia, apothecia and sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and potential as biological control of white mold on mustard. **Australasian Plant Pathology**, v. 45, n. 1, p. 103–117, 2016.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123–130, 2003.

ROY, M. K. et al. ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: Relationship between total polyphenol and individual catechin content. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 61, n. 2, p. 109–124, 2010.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1998.

SOLER-RIVAS, C.; ESPÍN, J. C.; WICHERS, H. J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 5, p. 330–338, 2000.

STATSOFT, I. **Statistica (data analysis software system)**, 2011. Disponível em: <www.statsoft.com>

SUDAN, R. et al. Iron (FeII) chelation, ferric reducing antioxidant power, and immune modulating potential of *Arisaema jacquemontii* (himalayan cobra lily). **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

VLADIMIR-KNEŽEVIĆ, S. et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected micromeria species from Croatia. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 1454–1470, 2011.

WALZ, A. et al. Reactive oxygen intermediates and oxalic acid in the pathogenesis of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, n. 4, p. 317–330, 2008.

WANG, H. et al. Influence of pH, concentration and light on stability of allicin in garlic (*Allium sativum* L.) aqueous extract as measured by UPLC. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 9, p. 1838–1844, 2015.