

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

KARINA FELIX DIAS FERNANDES

**APLICAÇÃO DE REVESTIMENTOS À BASE DE ALGINATO DE SÓDIO
INCORPORADOS DE BACTÉRIAS LÁTICAS PARA CONTROLE DE
ANTRACNOSE EM GOIABA E MANGA**

João Pessoa
2021

KARINA FELIX DIAS FERNANDES

**APLICAÇÃO DE REVESTIMENTOS À BASE DE ALGINATO DE SÓDIO
INCORPORADOS DE BACTÉRIAS LÁTICAS PARA CONTROLE DE
ANTRACNOSE EM GOIABA E MANGA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, como requisito obrigatório para obtenção de Título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza.

Co-orientadora: Dra. Kataryne Árabe Rimá de Oliveira.

João Pessoa

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F363a Fernandes, Karina Felix Dias.

Aplicação de revestimentos à base de alginato de
sódio

incorporados de bactérias lácticas para controle de
antracnose em goiaba e manga / Karina Felix Dias
Fernandes. - João Pessoa, 2021.

94 f. : il.

Orientação: Evandro Leite de Souza.

Coorientação: Kataryne Árabe Rimá de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Controle biológico. 2. Bactérias lácticas. 3.
Probióticos. 4. Colletotrichum spp. 5. Frutas
tropicais. I. Souza, Evandro Leite de. II. Oliveira,
Kataryne Árabe Rimá de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 632 (043)

KARINA FELIX DIAS FERNANDES

**APLICAÇÃO DE REVESTIMENTOS À BASE DE ALGINATO DE SÓDIO
INCORPORADOS DE BACTÉRIAS LÁTICAS PARA CONTROLE DE
ANTRACNOSE EM GOIABA E MANGA**

Dissertação APROVADA em 29 de setembro de 2021

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Evandro Leite de Souza
ORIENTADOR (DN/CCS/UFPB)
Presidente da Banca Examinadora



Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira
Examinadora interna (DN/CCS/UFPB)



Profa. Dra. Ana Elizabeth Cavalcante Fai
Examinadora externa (DNBE/UERJ)

Aos meus Pais e Irmão,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua misericórdia, por ter me concedido o dom da vida, por me dar fé, coragem e ser meu sustento em todos os momentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos durante a realização do mestrado.

A Universidade Federal da Paraíba, em especial ao Departamento de Nutrição e aos Professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, por todos os ensinamentos e oportunidade de realização do mestrado.

Ao Professor Dr. Evandro Leite de Souza, por aceitar me orientar no mestrado. Agradeço a confiança, incentivo, disponibilidade, dedicação, profissionalismo e ensinamentos constantes.

Aos membros da banca examinadora, Professora Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira e Professora Dra. Ana Elizabeth Cavalcante Fai, pela disponibilidade e valiosas contribuições ao trabalho.

A Dra. Kataryne Árabe Rimá de Oliveira, por aceitar ser co-orientadora deste trabalho. Agradeço os ensinamentos, confiança, incentivo, gentileza, parceria na execução dos experimentos, colaboração na escrita do artigo, e por todo apoio no último ano da realização deste trabalho.

A todos que fazem parte do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica dos Alimentos (DN/CCS/ UFPB), pela convivência, companheirismo e todos os ensinamentos prestados.

A Professora Dra. Maria Lúcia da Conceição, por todo incentivo desde o início da graduação, e pela oportunidade de ter sido estagiária, monitora e aluna de iniciação científica sob sua orientação, a senhora é exemplo de força, humildade e profissionalismo.

A Claudinete Felix Dias Fernandes e Genival Fernandes da Silva, meus amados pais, por todo carinho, amor, incentivo, dedicação, ensinamentos, por confiarem que a educação é o melhor

caminho, por sempre acreditarem nos meus sonhos e me ajudarem a realizá-los. Amo vocês e serei eternamente grata.

A Kaio Felix Dias Fernandes, meu irmão, por todo apoio, incentivo, amor, companheirismo diário e por ser fundamental na minha formação pessoal.

A toda minha família, em especial a minha tia Arleide Felix Dias, por todo apoio em João Pessoa, por me oferecer mais que uma casa, me dar um lar, carinho e compreensão.

A Miguel Veríssimo da Silva Neto, meu namorado, por todo amor, companheirismo e incentivo diário, tudo se torna mais leve e agradável por estarmos juntos.

A Elizabeth Lourdes Soares da Silva, grande amiga, que me acompanhou durante as disciplinas do mestrado, por sempre me ouvir, incentivar e apoiar em todos os momentos.

A Ana Cristina Alves Gomes, amiga de todas as horas, por me ouvir, ajudar e dar os grandes conselhos, sua gentileza e atenção me fortaleceram.

Aos meus colegas de turma de mestrado, em especial as minhas amigas Julia Caju, Karine Aquino, Larissa Brandão e Naís Lira por todo apoio durante as disciplinas, pela troca de experiências e companheirismo, vocês foram fundamentais na minha trajetória.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa pesquisa, meu muito obrigada!

RESUMO

A antracnose causada por fungos do gênero *Colletotrichum* spp. é considerada uma das principais doenças pós-colheita que atacam goiaba e manga, em decorrência da severidade dos sintomas desenvolvidos, os quais provocam perdas econômicas significativas. O método tradicionalmente aplicado para controle dessa infecção é o uso de fungicidas químicos. Contudo, o mercado consumidor tem se preocupado cada vez mais com os danos nocivos causados por essas substâncias a longo prazo, tanto para o meio ambiente, quanto para saúde humana. Desse modo, surge a demanda por tecnologias alternativas para o controle de agentes causadores da antracnose em goiaba e manga. Dentre as tecnologias emergentes, a aplicação de agentes de controle biológico, como bactérias láticas, tem sido considerada uma estratégia inovadora de biopreservação, prolongando a vida útil de frutas frescas e minimamente processadas. A aplicação de agentes de biocontrole, em combinação com materiais de revestimento, aumentam a eficácia na inibição do crescimento de fitopatógenos. O alginato de sódio é um polissacarídeo comumente utilizado para formular revestimentos comestíveis devido a capacidade de formação de filme, e por suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade. Este estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar a eficácia da aplicação de revestimentos formulados a base de alginato de sódio e adicionados de cepas de bactérias láticas potencialmente probióticas, para reduzir o desenvolvimento e a severidade da antracnose causada por diferentes espécies patogênicas de *Colletotrichum* (*C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. siamense*, *C. karstii*, *C. gloeosporioides*) durante 15 dias de armazenamento à temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C) em goiaba cv. Paluma e manga cv. Palmer. Os efeitos dos revestimentos formulados sobre alguns parâmetros físico-químicos indicativos da qualidade geral pós-colheita durante o armazenamento também foram avaliados. As oito cepas de bactérias láticas testadas causaram forte inibição do crescimento micelial (29,2 – 100%) de todas as espécies de *Colletotrichum* alvo *in vitro*. Dentre as oito cepas de bactérias láticas testadas, *Levilactobacillus brevis* 59, *Lactiplatibacillus pentosus* 129, *Limosilactobacillus fermentum* 263 apresentaram os maiores efeitos inibitórios sobre às diferentes cepas de *Colletotrichum* testadas, sendo selecionadas para incorporação em revestimentos de alginato de sódio. Essas cepas de bactéria láticas apresentaram contagens de células viáveis superiores a 6 log UFC/mL nos revestimentos de alginato de sódio durante 15 dias de armazenamento à temperatura ambiente. A aplicação dos revestimentos formulados com alginato de sódio e *L. brevis* 59, *L. pentosus* 129 ou *L. fermentum* 263 retardou o progresso e diminuiu a severidade das lesões de antracnose em goiabas e mangas, artificialmente contaminadas com todas as espécies de *Colletotrichum* testadas, durante o armazenamento sob temperatura ambiente. Ainda, esses revestimentos causaram efeitos positivos em parâmetros físico-químicos indicadores da qualidade pós-colheita de goiaba e manga, destacando-se a redução da perda de peso e diminuição da perda de ácido ascórbico durante o armazenamento. Os revestimentos de alginato de sódio adicionados das cepas de bactérias láticas potencialmente probióticas derivadas de frutas podem ser considerados estratégias inovadoras e eficazes para reduzir o desenvolvimento de antracnose pós-colheita e prolongar a capacidade de armazenamento de goiaba e manga.

Palavras-chave: revestimentos; controle biológico; bactérias láticas; probióticos; *Colletotrichum* spp.; frutas tropicais.

ABSTRACT

Anthrachnose caused by fungi of the *Colletotrichum* spp. it is considered one of the main post-harvest diseases that attack guava and mango, due to the severity of the developed symptoms, which cause significant economic losses. The method traditionally applied to control this infection is the use of chemical fungicides. However, the consumer market has been increasingly concerned about the long-term harmful damage caused by these substances, both to the environment and to human health. Thus, there is a demand for alternative technologies to control the causative agents of anthracnose in guava and mango. Among the emerging technologies, the application of biological control agents, such as lactic acid bacteria, has been considered an innovative biopreservation strategy, extending the shelf life of fresh and minimally processed fruits. The application of biocontrol agents, in combination with coating materials, increases the effectiveness in inhibiting the growth of phytopathogens. Sodium alginate is a polysaccharide commonly used to formulate edible coatings due to its film-forming capacity, biodegradability, biocompatibility and low toxicity characteristics. This study aimed to develop and evaluate the application potential of coatings formulated based on sodium alginate and added with potentially probiotic lactic bacteria strains, as well as evaluating the effectiveness of coatings to reduce the development and severity of anthracnose caused by different pathogenic species of *Colletotrichum* (*C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. siamense*, *C. karstii*, *C. gloeosporioides*) during 15 days of storage at room temperature (25 ± 0.5 °C) in guava cv. Paluma and sleeve cv. Palmer. The effects of the formulated coatings on some physicochemical parameters indicative of the general postharvest quality during storage were also evaluated. The eight strains of lactic acid bacteria tested caused strong inhibition of mycelial growth (29.2 - 100%) of all *Colletotrichum* target species *in vitro*. Among the eight tested lactic acid bacteria strains, *Levilactobacillus brevis* 59, *Lactiplatibacillus pentosus* 129, *Limosilactobacillus fermentum* 263 showed the greatest inhibitory effects on the different strains of *Colletotrichum* tested, being selected for incorporation in sodium alginate coatings. These lactic acid bacteria strains showed viable cell counts greater than 6 log CFU/mL in the sodium alginate coatings during 15 days of storage at room temperature. The application of coatings formulated with sodium alginate and *L. brevis* 59, *L. pentosus* 129 or *L. fermentum* 263 delayed the development and decreased the severity of anthracnose lesions in guavas and mangoes, artificially contaminated with all species of *Colletotrichum* tested, during storage at room temperature. Furthermore, these coatings impacted positively on physicochemical parameters indicative of the postharvest quality of guava and mango, outstanding their effects on reduction of weight loss and ascorbic acid losses during storage. Sodium alginate coatings added from potentially probiotic fruit-derived lactic acid bacteria strains can be considered innovative and effective strategies to reduce postharvest anthracnose development and prolong the storability of guava and mango.

Keywords: coating; biological control; probiotics; *Colletotrichum* spp.; tropical fruit.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1 - Frutas de goiaba (<i>Psidium guajava</i> L.) cv. Paluma.	18
Figura 2 - Frutas de manga (<i>Mangifera indica</i> L.) cv. Palmer.	19
Figura 3 - Sintomas de antracnose causada por <i>Colletotrichum</i> em goiaba cv. Paluma.	23
Figura 4 - Sintomas de antracnose causada por <i>Colletotrichum</i> em mangas cv. Palmer.	24
Figura 5 - Etapas do desenho experimental do estudo.	32
Figura 6 - Colônia de <i>Colletotrichum tropicale</i> CMM 4071 em ABD (A) e verso da colônia (B).	34
Figura 7 - Avaliação da atividade antifúngica de cepas de BAL frente a <i>Colletotrichum</i> spp. pelo método de ágar <i>spot</i>	35
Figura 8 - Avaliação da atividade antifúngica de cepas de BAL frente a <i>Colletotrichum</i> spp. pelo método de dupla camada de ágar.	36
Figura 9 - Avaliação da atividade antifúngica de cepas de BAL frente <i>Colletotrichum</i> spp. pelo método de difusão em poço de ágar.	37
Figura 10 - Esquema da preparação dos revestimentos com alginato de sódio e BAL.	38
Figura 11 - Esquema de aplicação de revestimento de alginato de sódio e BAL em goiaba e manga.	40

FIGURAS DO ARTIGO

Fig. 1 - Viable counts (CFU/g; average $\pm$ standard deviation) of potentially probiotic lactic acid bacteria strains loaded into sodium alginate (SA) coating during 15 days of room temperature storage (25 ± 0.5 °C).	89
Fig. 2 - Severity index (%) of anthracnose lesion in guava cv. Paluma coated with sodium alginate (SA) alone or loaded with potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains and inoculated with different pathogenic <i>Colletotrichum</i> species after 15 days of room temperature storage (25 ± 0.5 °C).	90
Fig. 3 - Severity index (%) of anthracnose lesion in mango cv. Palmer coated with sodium alginate (SA) alone or loaded with potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains and inoculated with different pathogenic <i>Colletotrichum</i> species after 15 days of room temperature storage (25 ± 0.5 °C)	91

S1 - In vitro antifungal activity of potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains (<i>L. brevis</i> 59 or <i>L. fermentum</i> 263) against different <i>Colletotrichum</i> species after a 5-day incubation (25 ± 0.5 °C). Evaluation was done with different methods: (A) negative control - without adding LAB strain; (B) negative control - agar well diffusion method; (C) agar spot method; (D) dual-culture agar method; and (E) agar well-diffusion method.....	92
S2 - Anthracnose lesion inhibition in guava cv. Paluma and mango cv. Palmer coated with sodium alginate (SA) alone or loaded with potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains and inoculated with different <i>Colletotrichum</i> species after 15 days of room temperature storage (25 ± 0.5 °C). (A) negative control - lesion severity (uncoated fruit) in guava cv. Paluma; (AA) guava cv. Paluma coated with SA + <i>L. brevis</i> 59; (AAA) guava cv. Paluma coated with SA + <i>L. pentosus</i> 129; (AAAA) guava cv. Paluma coated with SA + <i>L. fermentum</i> 263. (B) negative control - lesion severity (uncoated fruit) in mango cv. Palmer; (BB) mango cv. Palmer coated with SA + <i>L. brevis</i> 59; (BBB) mango cv. Palmer coated with SA + <i>L. pentosus</i> 129; (BBBB) mango cv. Palmer coated with SA + <i>L. fermentum</i> 263.	93
S3. Physicochemical parameters (average $\pm$ standard deviation) of guava cv. Paluma uncoated (negative control) and coated with sodium alginate (SA) alone or loaded with potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains during 15 days of room temperature storage (25 ± 0.5 °C).....	94
S4 - Physicochemical parameters (average $\pm$ standard deviation) of mango cv. Palmer uncoated (negative control) and coated with sodium alginate (SA) alone or loaded with potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains during a 15 day-room temperature storage (25 °C).....	95

LISTA DE TABELAS

TABELAS DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1 - Produção mundial de manga, mangostão e goiaba em 2019.....	17
Tabela 2 - Composição nutricional de goiaba e manga por 100 gramas de parte comestível.	20
Tabela 3 – Estudos de produção e aplicação de revestimentos comestíveis à base de alginato de sódio adicionados de bactérias lácticas em frutas e vegetais (in natura e minimamente processados).	30

TABELAS DO ARTIGO

Table 1 - Mycelial growth inhibition (MGI%, average $\pm$ standard deviation) caused by potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains against distinct <i>Colletotrichum</i> species after a 5-day incubation (25 ± 0.5 °C), as measured by agar spot method.....	68
Table 2 - Mycelial growth inhibition (MGI%, average $\pm$ standard deviation) caused by potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains against distinct <i>Colletotrichum</i> species after a 5-day incubation (25 ± 0.5 °C), as measured by well-diffusion method.....	69
Table 3 - Percentage (average $\pm$ standard deviation) of anthracnose lesion diameter reduction in guava cv. Paluma coated with sodium alginate (SA) or loaded with potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains and inoculated with distinct pathogenic <i>Colletotrichum</i> species during 15 days of room temperature storage (25 ± 0.5 °C).	73
Table 4 - Percentage (average $\pm$ standard deviation) of anthracnose lesion diameter in mango cv. Palmer coated with sodium alginate (SA) alone or loaded with potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains and inoculated with distinct pathogenic <i>Colletotrichum</i> species during 15 days of room temperature storage (25 ± 0.5 °C).....	74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 CULTURA E COMERCIALIZAÇÃO DE GOIABA E MANGA.....	17
2.2 FATORES CAUSADORES DE PERDAS PÓS-COLHEITA EM FRUTAS	20
2.2.1 Antracnose em goiaba e manga.....	22
2.3 CONTROLE BIOLÓGICO E BACTÉRIAS LÁTICAS COMO AGENTES DE BIOPRESERVAÇÃO DE FRUTAS.....	25
2.4 REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS COMO TECNOLOGIAS PÓS-COLHEITA EM FRUTAS.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 OBTENÇÃO DOS MATERIAIS.....	31
3.2 CEPAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	32
3.3 CEPAS DE <i>Colletotrichum</i> E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	33
3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CEPAS DE BAL FRENTE A <i>Colletotrichum</i> spp. <i>in vitro</i>	34
3.4.1 Método ágar spot.....	34
3.4.2 Método de dupla camada de ágar	35
3.4.3 Método de difusão em poço de ágar.....	36
3.5 PREPARAÇÃO DE REVESTIMENTOS COM ALGINATO DE SÓDIO E BACTÉRIAS LÁTICAS	37
3.6 ENUMERAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE BACTÉRIAS LÁTICAS INCORPORADAS NO REVESTIMENTO DE ALGINATO DE SÓDIO	38
3.7 EFEITOS DE REVESTIMENTOS DE ALGINATO DE SÓDIO COM CEPAS DE BAL SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE ANTRACNOSE EM GOIABA E MANGA DURANTE O ARMAZENAMENTO	39
3.8 EFEITOS DE REVESTIMENTOS DE ALGINATO DE SÓDIO COM BACTÉRIAS LÁTICAS SOBRE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE GOIABA E MANGA DURANTE O ARMAZENAMENTO	39
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	41
4 RESULTADOS	43
REFERÊNCIAS	44
APÊNDICES	53

APÊNDICE A - Artigo.....54

1 INTRODUÇÃO

A goiaba (*Psidium guajava* L.) e manga (*Mangifera indica* L.) estão entre as frutas tropicais de maior importância comercial, sendo bem aceitas e consumidas em todo o mundo. Essas frutas são fontes de diversos nutrientes, como açúcares, minerais, fibras, ácido ascórbico e carotenoides, além de compostos fenólicos com atividade antioxidante (ANJUM *et al.*, 2020; SIDDIQ; BRECHT; SIDHU, 2017). Contudo, goiaba e manga são frutas climatéricas com alta taxa de respiração e metabolismo pós-colheita, o que repercute em maior suscetibilidade à ação de patógenos, deterioração mais acelerada e curto período de armazenamento e comercialização (FRANCISCO *et al.*, 2020; NAIR *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2018a).

A antracnose causada por fungos do gênero *Colletotrichum* spp. é considerada uma das mais importantes doenças pós-colheita que ataca goiabas e mangas, devido à severidade dos sintomas desenvolvidos e às significativas perdas econômicas decorrentes do estabelecimento dessa infecção (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2018a). Embora *C. gloesporioides* tenha sido considerado tradicionalmente o principal agente causador da antracnose em goiabas e mangas, diferentes espécies de *Colletotrichum*, como *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. siamense* e *C. karstii*, também foram associadas com o desenvolvimento de lesões de antracnose nessas frutas (LIMA *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2018a).

A aplicação de fungicidas químicos é utilizada como principal estratégia para reduzir o desenvolvimento e severidade da antracnose pós-colheita em frutas (BRAGA *et al.*, 2019; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). No entanto, a crescente preocupação dos consumidores com relação aos impactos negativos causados, a longo prazo, para o meio ambiente e para a saúde humana como consequência do uso generalizado e contínuo de fungicidas químicos, além da relatada capacidade dessas substâncias em induzir aumento da resistência antifúngica, têm estimulado a busca por métodos alternativos para controlar fungos patogênicos pós-colheita em diversas frutas de interesse comercial (BRAGA *et al.*, 2019; MARÍN *et al.*, 2019).

A aplicação de agentes de controle biológico tem sido reconhecida como estratégia promissora para o controle de doenças pós-colheita e prolongamento do período de armazenamento/comercialização de frutas (MARÍN; ATARÉS; CHIRALT, 2017). As bactérias lácticas (BAL) estão entre os microrganismos mais prevalentes que formam a microbiota autóctone de frutas, tendo, consequentemente, uma adaptação natural às condições encontradas nesses ambientes (ALBUQUERQUE *et al.*, 2018; GARCIA *et al.*, 2016).

Lactobacilos, e alguns dos gêneros recentemente reclassificados em sua taxonomia (ZHENG *et al.*, 2020), têm sido tradicionalmente utilizados de forma segura como culturas iniciadoras ou probióticas em diferentes tipos de alimentos (BAMBACE *et al.*, 2019; KHODAEI; HAMIDI-ESFAHANI, 2019; SHIGEMATSU *et al.*, 2018; TEMIZ; OZDEMIR, 2021), sendo geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) e recebido a presunção qualificada de segurança (QPS) (AGRIOPOULOU *et al.*, 2020). O uso de BAL vem sendo citado como estratégia inovadora para a biopreservação de frutas frescas e minimamente processadas (AGRIOPOULOU *et al.*, 2020; DIANIN *et al.*, 2019), com ênfase na aplicação de espécies de lactobacilos e gêneros relacionados (BARRAGÁN-MENÉNDEZ *et al.*, 2020; LV *et al.*, 2018; RUSSO *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2020).

A incorporação de BAL em matrizes adequadas caracteriza-se como aspecto importante para garantir a propagação e sobrevivência destes microrganismos quando aplicados como estratégias de tecnologias de preservação de alimentos, a exemplo da incorporação em coberturas comestíveis com a finalidade de controlar fungos patogênicos causadores de doenças pós-colheita em frutas. Os revestimentos comestíveis são caracterizados como camadas finas de materiais poliméricos comestíveis formados diretamente nas superfícies dos alimentos, vindo a atuar como barreiras semipermeáveis ao oxigênio, dióxido de carbono e vapor de água, reduzindo a perda de água, alterações na firmeza e de processos oxidativos nos produtos revestidos (GROSSO *et al.*, 2020; NICOLAU-LAPEÑA *et al.*, 2021).

O alginato de sódio é um polissacarídeo comumente utilizado para formular revestimentos comestíveis devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade e propriedades adequadas para formar filmes. Esse composto químico também tem sido incorporado em diversos produtos alimentícios devido às suas propriedades de geleificação e espessamento (NAIR *et al.*, 2020; SHIGEMATSU *et al.*, 2018). A aplicação de revestimentos formulados com alginato de sódio e inulina adicionados de *Lactobacillus rhamnosus* com propriedades probióticas causou melhorias nos parâmetros físico-químicos e microbiológicos de mirtilos minimamente processados durante o armazenamento refrigerado (BAMBACE *et al.*, 2019). Outros estudos também demonstraram a eficácia de revestimentos à base de biopolímeros adicionados de *Lactobacillus* ou espécies de gêneros relacionados para inibir a deterioração e prolongar o período de armazenamento de uvas (MARÍN *et al.*, 2019), morangos (KHODAEI; HAMIDI-ESFAHANI, 2019; TEMIZ; OZDEMIR, 2021), kiwis (HASHEMI; JAFARPOUR, 2021) e bananas (LI *et al.*, 2020). No entanto, investigações com

foco na avaliação da eficácia de revestimentos comestíveis adicionados de BAL para reduzir o desenvolvimento de antracnose em frutas ainda são escassos ou inexistentes.

Estudos anteriores caracterizaram diferentes cepas isoladas de subprodutos do processamento de frutas, e pertencentes a espécies distintas de BAL, como tendo propriedades compatíveis com o uso como probióticos, incluindo a capacidade de antagonizar patógenos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2018; GARCIA *et al.*, 2016), o que poderia ser uma propriedade específica a ser explorada na formulação de revestimentos comestíveis aplicados para fins de controle de doenças pós-colheita em frutas, resultando em funcionalidades tecnológicas adicionais para estas cepas.

Neste contexto, este estudo teve como objetivo desenvolver e aplicar novos revestimentos formulados com alginato de sódio e adicionados de algumas dessas cepas de BAL potencialmente probióticas derivadas de subprodutos do processamento de frutas, bem como avaliar a eficácia dos revestimentos formulados para reduzir o progresso e severidade da antracnose causada por diferentes espécies de *Colletotrichum* em goiaba cultivar (cv) Paluma e manga cv. Palmer. Os efeitos dos revestimentos formulados sobre alguns parâmetros físico-químicos indicadores da qualidade geral pós-colheita de goiaba e manga durante o armazenamento também foram avaliados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CULTURA E COMERCIALIZAÇÃO DE GOIABA E MANGA

O setor da fruticultura no Brasil, especialmente na região Nordeste, desempenha importante papel econômico no cenário local, além de marcante participação no mercado nacional e internacional. O total de frutas destinadas ao mercado abrange várias espécies, contudo algumas têm se destacado por suas características nutricionais e pelo volume de produção, a exemplo de goiaba (*Psidium guajava* L.) e manga (*Mangifera indica* L.) (TREICHEL *et al.*, 2016).

A FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) contabiliza em conjunto manga (*Mangifera indica* L.), mangostão (*Garcinia mangostana* L.) e goiaba (*Psidium guajava* L.) quanto à produção mundial, a qual está distribuída em mais de 100 países. No entanto, a maior concentração de produção tem ocorrido no Sudeste da Ásia, sendo a Índia o maior produtor mundial (Tabela 1). Em 2019, o Brasil ocupou a sétima posição nesse *ranking* com a produção de 1,9 milhões de toneladas destas frutas, sendo que mais de 10% da produção foi destinada ao mercado exterior, tornando o país o quarto maior exportador (FAO, 2021). De acordo com o Anuário brasileiro de fruticultura (2021), o Brasil produziu em 2019, 578 toneladas de goiaba e 1,4 milhões de toneladas de manga, onde os estados de Pernambuco e Bahia se destacam como os maiores produtores. O valor da produção dessas frutas juntas alcançou a marca de mais de 2,5 milhões de reais neste período.

Tabela 1 - Produção mundial de manga, mangostão e goiaba em 2019.

País	Produção (t)
Índia	25.631.000
Indonésia	3.294.817
China	2.415.000
México	2.396.675
Paquistão	2.270.229
Malawi	2.083.471
Brasil	1.998.561
Tailândia	1.628.192
Egito	1.473.538
Bangladesh	1.456.331

Fonte: FAO, 2021.

Goiaba (*Psidium guajava* L.) é uma fruta tropical nativa da América Central, que apresenta importante valor comercial, sendo muito apreciada por seu sabor doce e aroma característico, que repercutem em ampla aceitação e consumo. A safra da goiaba acontece principalmente entre os meses de janeiro e março, no entanto sua colheita pode acontecer em todo ano (CHAWLA; DEVI; JAIN, 2018; TOVAR *et al*, 2019). As variedades de goiaba são classificadas de acordo com a cor da polpa. Exemplos de cultivares com polpa de cor branca são Kumagai e Chinesa, enquanto de polpa vermelha são Paluma, Pedro Sato e Sassaoka, as quais têm tempos de armazenamento comparativamente mais curtos (ABREU *et al.*, 2012). O cv Paluma (Figura 1) é o mais produzido no Brasil devido sua maior aceitação para consumo *in natura* e para o processamento industrial (GERMANO *et al.*, 2019; VITTI; LIMA; MARTINES FILHO, 2020).

O aumento do cultivo de goiaba no Brasil tem sido relacionado ao crescente consumo da fruta fresca, mas ocorre, principalmente, devido ao seu uso para a fabricação de produtos da indústria alimentícia, como suco, néctar, polpa, geleia e fruta em calda, o que destaca a importância econômica desta fruta (KADAM; KAUSHIK; KUMAR, 2012; QUINTAL *et al.*, 2017).

Dentre as suas características fisiológicas, a goiaba apresenta maior taxa de respiração e continua seu processo de amadurecimento após a colheita, provocando diversas alterações químicas e físicas relacionadas a elevada perecibilidade e diminuição da vida de prateleira (NAIR *et al.*, 2018; FRANCISCO *et al.*, 2020). Em condições de armazenamento sob temperatura ambiente, as goiabas têm uma vida de prateleira de dois a três dias, porém esse tempo pode ser prolongado quando as frutas são acondicionadas sob refrigeração (ETEMADIPOOR *et al.*, 2019; GERMANO *et al.*, 2019).

Figura 1 - Frutas de goiaba (*Psidium guajava* L.) cv. Paluma.



Fonte: Própria, 2021.

A manga (*Mangifera indica* L.) é uma fruta originária do nordeste asiático, que se destaca entre as principais frutas tropicais cultivadas no mundo, no Brasil sua safra acontece entre os meses de setembro e janeiro. Essa fruta apresenta características nutricionais e sensoriais muito apreciadas pelos consumidores, tais como cor e sabor atraentes, além de ser valorizada pela indústria alimentícia em decorrência da ampla possibilidade de aplicações tecnológicas. Contudo a manga vem sendo principalmente utilizada para consumo *in natura*, embora também ocorra amplo uso para a produção de sucos, néctares, geleias e barras de frutas (EVANS; BALLEEN; SIDDIQ, 2017; SOGI *et al.*, 2013).

No Brasil, existe grande diversidade de cultivares de manga, os quais variam de acordo com a região de cultivo; contudo, de forma geral, há predomínio da comercialização dos cultivares Tommy Atkins, Palmer, Rosa, Espada, Keitt e Haden. Os cultivares de manga preferidos para exportação no Brasil são Tommy Atkins e Palmer, tendo como principais compradores países da União Europeia e Estados Unidos da América (SANTOS *et al.*, 2013).

O cultivar Palmer (Figura 2) apresenta maior teor de sólidos solúveis e menor quantidade de fibras quando comparado ao cultivar Tommy Atkins, características que vão ao encontro das preferências dos consumidores e da indústria alimentícia (CARVALHO *et al.*, 2004). Outras características atrativas do cultivar Palmer incluem a coloração da casca e polpa mais próxima à tonalidade vermelha e maior resistência ao manuseio e transporte (EMBRAPA, 2021). Entretanto, os diferentes cultivares de mangas possuem a similaridade de serem altamente perecíveis após a colheita, de modo que o cultivar Palmer encerra seu amadurecimento em aproximadamente oito dias após colheita, quando a qualidade visual da fruta começa a diminuir (NUNES *et al.*, 2007).

Figura 2 - Frutas de manga (*Mangifera indica* L.) cv. Palmer.



Fonte: CEAGESP, 2021.

Dentre as características relatadas para essas frutas, a qualidade nutricional merece ênfase. Com isso, a composição centesimal de goiaba e manga está descrita na Tabela 2. Dentre os principais constituintes, destacam-se o alto teor de carboidratos, dos quais grande parte é de fibras, como pectina, e a quantidade de vitamina C. Na composição destas frutas, há presença de compostos bioativos, como vitamina A, minerais, carotenoides e compostos fenólicos, relacionados à promoção da saúde humana (ANJUM *et al.*, 2020; SOUSA *et al.*, 2021).

Tabela 2 - Composição nutricional de goiaba e manga por 100 gramas de parte comestível.

	Goiaba vermelha	Manga cv. Palmer
Umidade (%)	85	79,7
Energia (kcal)	54	72
Proteínas (g)	1,1	0,4
Lipídeos (g)	0,4	0,2
Carboidratos (g)	13	19,4
Fibras (g)	6,2	1,6
Vitamina C (mg)	80,9	65,5

Fonte: TACO, 2011.

Além de tudo mencionado, goiaba e manga são classificadas como frutas climatéricas e apresentam a característica de um aumento rápido e significativo da respiração durante o amadurecimento. Este é um processo complexo, caracterizado por alterações de parâmetros fisiológicos, bioquímicos e químicos, como a biossíntese das antocianinas, degradação da clorofila e amido, aumento da degradação enzimática na parede celular, teor de açúcares, taxa respiratória, produção de etileno e alterações de compostos aromáticos (GIOVANNONI *et al.*, 2017).

2.2 FATORES CAUSADORES DE PERDAS PÓS-COLHEITA EM FRUTAS

Os fatores pós-colheita que influenciam na qualidade de frutas são classificados em duas categorias: fatores intrínsecos e extrínsecos. São considerados fatores intrínsecos aqueles que estão relacionados às características próprias das frutas, como a espécie e cultivar, estágio de maturação no momento da colheita e suscetibilidade a distúrbios fisiológicos. Os fatores extrínsecos estão relacionados ao ambiente e as tecnologias de produção, incluindo o manejo

que envolve a colheita, embalagem, transporte, armazenamento e comercialização, assim como os aspectos tecnológicos que incluem controle de temperatura e umidade relativa do ambiente de armazenamento, além de aplicação de processos físicos (por exemplo, irradiação) e tratamentos químicos para controle de insetos e microrganismos fitopatogênicos (BRASIL; SIDDIQUI, 2018).

As perdas pós-colheita da qualidade de frutas estão relacionadas às mudanças bioquímicas e fisiológicas desencadeadas ao longo do amadurecimento. Esses processos ocorrem com aumento da taxa respiratória, produção de etileno e atividade enzimática, causando rápida deterioração da qualidade das frutas na ausência de tecnologias de conservação. Dentre as principais características relacionadas à perda de qualidade em frutas, se destacam a perda de peso, amolecimento dos tecidos, degradação da clorofila, redução dos ácidos orgânicos e elevação do teor de açúcares, sólidos solúveis e pigmentos carotenoides (SOUSA *et al.*, 2021).

As perdas pós-colheita de goiaba e manga estão diretamente associadas com as alterações bioquímicas, quando a cor das frutas é modificada de verde para amarelo e ocorre amolecimento extremo devido, principalmente, a solubilização da pectina. Essa alteração da textura é provocada também por ação de microrganismos, sobretudo pela deterioração fúngica (ABREU *et al.*, 2012; GERMANO *et al.*, 2019; TOVAR *et al.*, 2019).

O armazenamento de frutas sob temperatura ambiente normalmente causa perdas pós-colheitas substanciais, principalmente em decorrência da diminuição da umidade e estabelecimento da atividade microbiana, o que torna a vida útil das frutas mais curta. Muitas frutas também são sensíveis a baixas temperaturas, de modo que podem apresentar retardo no amadurecimento e danos causados pelo frio quando expostas por longos períodos a temperaturas abaixo de 10 °C (ANJUM *et al.*, 2020; NUNES *et al.*, 2007). Ainda, torna-se importante destacar que muitas frutas incompatíveis com os padrões de comercialização são normalmente descartadas, gerando grandes quantidades de resíduos agroecológicos (SOGI *et al.*, 2013).

Durante a cadeia de abastecimento de produtos frutícolas também ocorrem perdas econômicas significativas, das quais as mais consideráveis devem-se principalmente à infecção por microrganismo, destacando-se os danos provocados por contaminação fúngica que podem causar perdas de até 50% da produção total em algumas ocasiões, em que ocorrem condições favoráveis ao desenvolvimento das doenças (BORDOH *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2018; TOVAR *et al.*, 2019). As duas doenças mais prejudiciais são o mofo cinzento causada por *Botrytis cinerea*, e a podridão dos frutos por antracnose causada por espécies

de *Colletotrichum* (SWETT *et al.*, 2020). Por isso a podridão das frutas é um dos principais desafios na produção, ameaçando a estabilidade econômica e o crescimento contínuo da indústria.

2.2.1 Antracnose em goiaba e manga

Antracnose é uma doença fúngica causada por *Colletotrichum* spp., sendo responsável por grande impacto econômico na agricultura, pois pode infectar todas as partes aéreas das plantas hospedeiras, incluindo folhas, caules, pecíolos, frutos e quaisquer outras seções, assim como pode causar podridões pós-colheita em frutas (SILVA *et al.*, 2017).

A elevada patogenicidade de diferentes espécies de *Colletotrichum* leva à redução da produtividade de um grande número de lavouras em todo o mundo, principalmente de frutas, a exemplo de goiaba e manga, durante o processo de amadurecimento (BELLÉ *et al.*, 2020; DAMASCENO *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2018a; ZHAO *et al.*, 2021). Em geral, as espécies de *Colletotrichum* apresentam comportamentos diferentes que variam entre grupos de espécies, podendo ser amplamente categorizados como necrotróficos, hemibiotróficos, latentes ou quiescentes e endofíticos, dos quais a hemibiotrofia é a mais comum (SILVA *et al.*, 2017).

As perdas drásticas na comercialização de frutas provocadas por antracnose limitam tanto o mercado nacional, como também a possibilidade de exportação ao reduzir significativamente o período possível de armazenamento das frutas acometidas pela doença (BENATAR; WIBOWO, 2021; SHAH *et al.*, 2021). Por isso, os efeitos desta doença causam grande preocupação para os produtores de goiaba e manga, pois o progresso afeta diretamente a qualidade e valor de mercado das frutas (LIMA *et al.*, 2015; TOVAR *et al.*, 2019).

O manejo da doença é dificultado, em alguns casos, pela presença de várias espécies de *Colletotrichum* spp. associadas a um único hospedeiro, bem como pela capacidade de uma única espécie infectar múltiplos hospedeiros. Esses aspectos tornam a antracnose uma doença importante nos estágios pré e pós-colheita, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, e colocam *Colletotrichum* spp. entre os principais gêneros de fungos fitopatogênicos, considerando os impactos econômicos causados (SILVA *et al.*, 2020).

Na maioria das vezes, os sintomas da antracnose só aparecem nas frutas após a colheita, durante o armazenamento a frio ou no transporte de longa distância. Os sintomas mais comuns da doença são manchas nas folhas e flores e podridão das frutas, mas também pode afetar as raízes e outras partes da planta (BAGGIO *et al.*, 2018).

Nas folhas, as lesões podem aderir e formar grandes áreas necróticas, especialmente ao longo das margens. Nos galhos, os sintomas começam como pequenas lesões ovais e necróticas que se expande. Durante infecções graves, o fungo pode invadir galhos e causar a morte da planta. Pequenas lesões circulares escuras também se desenvolvem nos pedicelos e pedúnculos. As frutas podem ser infectadas em qualquer estágio de seu desenvolvimento, contudo, em frutas imaturas, o fungo geralmente permanece dormente até que a fruta comece a amadurecer. Com isso, surgem manchas que aumentam até formar lesões, as quais podem se aderir e cobrir quase toda a superfície do fruto (KONSUE; DETHOUP; LIMTONG, 2020; TOVAR-PEDRAZA *et al.*, 2020).

Os principais sintomas nas frutas são as lesões, que podem ser marrons ou pretas, circulares, afundadas, podendo apresentar massa viscosa de esporos, com linha nítida de demarcação entre as áreas infectadas e não infectadas do tecido vegetal. Sintomas característicos da antracnose em goiaba e manga são ilustrados nas Figuras 3 e 4, respectivamente. Essas lesões aceleram o processo de deterioração de frutas, afetando sua qualidade geral e provocando perdas econômicas em toda cadeia de produção até a aceitação do consumidor (JIN *et al.*, 2021; PORAT *et al.*, 2018; TOVAR *et al.*, 2019).

Figura 3 - Sintomas de antracnose causada por *Colletotrichum* em goiaba cv. Paluma.



Fonte: Própria, 2021.

Figura 4 - Sintomas de antracnose causada por *Colletotrichum* em mangas cv. Palmer.



Fonte: Própria, 2021.

A temperatura e umidade relativa do ar são fundamentais para o desenvolvimento da antracnose em frutas. A doença é favorecida por longos períodos de alta umidade e temperaturas que variam de 15 a 30 °C, quando os sintomas surgem com maior severidade. Para o crescimento micelial (*in vitro* e *in situ*) de *Colletotrichum* foi estabelecido que a temperatura ótima varia entre 20 e 25 °C (BAGGIO *et al.*, 2018; FORCELINI *et al.*, 2017; GAVA; ALVES; DUARTE, 2019).

Tradicionalmente, o uso de fungicidas sintéticos aplicados em pomares e no pós-colheita tem sido o método mais utilizado para o controle de doenças fúngicas, como antracnose em frutas. Esta aplicação acontece desde a floração até a colheita, buscando considerável redução da extensão da podridão pós-colheita das frutas, embora ainda ocorra a necessidade de tratamento pós-colheita (LIMA *et al.*, 2015; SHAH *et al.*, 2021). Esse controle também pode ser feito por meio de métodos alternativos não químicos ou fungicidas não seletivos, como carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, cloro ativo e ácido ascórbico (MARÍN *et al.*, 2019).

A produção de frutas sem antracnose depende principalmente da aplicação de fungicidas sintéticos, a exemplo do Prochloraz® (DISKIN *et al.*, 2019). Este controle pós-colheita também é feito por meio do uso de fungicidas benzimidazol ou inibidores da biossíntese de ergosterol, como tiabendazol e imazalil, respectivamente (DAMASCENO *et al.*, 2019). Entretanto, os fungicidas sintéticos mais utilizados no controle de doenças pós-colheita têm se tornando ineficientes em intervalos de tempo considerados curtos, além de favorecerem o desenvolvimento de cepas de patógenos resistentes e serem reportados como

causadores potenciais de efeitos negativos sobre a saúde humana e animal em decorrência da exposição prolongada (HERNANDEZ-MONTIEL *et al.*, 2018).

Devido aos efeitos deletérios relatados em decorrência do uso de fungicidas, existe atualmente grande mobilização científica para desenvolver métodos alternativos de prevenção do desenvolvimento de antracnose em frutas (WU *et al.*, 2021), bem como de outras doenças causadas por fitopatógenos (ROMANAZZI *et al.*, 2017). Tecnologias pós-colheita eficazes para conservar a qualidade das frutas e também controlar a antracnose precisam ser desenvolvidas, especialmente aquelas que são seguras, ecologicamente corretas, econômicas e compatíveis com as práticas comerciais de manuseio (GERMANO *et al.*, 2019; SHAH *et al.*, 2021). Nessa perspectiva, avanços significativos têm sido alcançados para explorar microrganismos antagonistas (leveduras e bactérias) como potenciais agentes de biopreservação para controle de doenças pós-colheita (ZHANG *et al.*, 2018).

2.3 CONTROLE BIOLÓGICO E BACTÉRIAS LÁTICAS COMO AGENTES DE BIOPRESERVAÇÃO DE FRUTAS

O uso de microrganismos como agentes de biocontrole tem demonstrado grande potencial na redução ou substituição do uso de fungicidas sintéticos. Fungos, leveduras e bactérias são microrganismos potenciais a serem utilizados como antagonistas no controle de doenças pós-colheita de frutas e vegetais. Tais microrganismos são capazes de colonizar o hospedeiro rapidamente, podem crescer em substratos de baixo custo e apresentar diferentes mecanismos antagônicos, como competição por espaço e nutrientes, produção de enzimas hidrolíticas e indução de resistência do hospedeiro (HERNANDEZ-MONTIEL *et al.*, 2018; MARÍN; ATARÉS; CHIRALT, 2017).

O controle biológico alcançado por microrganismos é considerado uma estratégia ambientalmente mais segura e eficaz para a proteção efetiva das plantas (WU *et al.*, 2021). Para esta abordagem biológica, são introduzidos artificialmente microrganismos selecionados como potenciais antagonistas e que não pertencem à microbiota original do fruto ou da planta para o qual deseja-se sua aplicação (DAMASCENO *et al.*, 2019). Um aspecto importante para a utilização de microrganismos no controle de fitopatógenos é a substituição aos fungicidas tradicionais, o que é uma das características que possibilita a certificação de alimentos “orgânicos”, reconhecida como tendência mundial de agregação de valor a esses produtos (VILAPLANA *et al.*, 2018).

O princípio fundamental para a aplicação de microrganismos antagonistas no controle de doenças pós-colheita, como a antracnose, em frutas frescas, é tornar possível que o microrganismo benéfico colonize a superfície da fruta, impedindo a entrada e a permanência do patógeno nos estágios iniciais do processo de infecção (GAVA; ALVES; DUARTE, 2019). A maioria das bactérias utilizadas como agentes de biocontrole, com destaque para BAL, possui plasticidade suficiente e podem se desenvolver e se adaptar a ambientes adversos, incluindo baixas necessidades nutricionais e condições de temperatura (DUKARE *et al.*, 2019). Bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são os microrganismos benéficos mais comumente empregados no setor alimentício (SHIGEMATSU *et al.*, 2018). Como agentes de biocontrole, estas bactérias são capazes de se adaptar ao ambiente onde o patógeno se encontra, o que é fundamental para um potencial antagonista pós-colheita.

As BAL são amplamente distribuídas na natureza, as quais incluem os gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactoshaepa*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (PATRICK, 2012). Quanto a sua morfologia, possuem a forma de cocos, cocobacilos ou bastonetes, sendo caracterizadas como Gram-positivas, ácido tolerantes, não esporuladas, nutricionalmente fastidiosas, anaeróbias e aeróbias facultativas, mesófilas ou termófilas, com temperaturas ótimas de crescimento entre 30 - 37 °C e 45 - 50 °C, respectivamente. Este grupo de bactérias é funcionalmente relacionado devido a sua capacidade comum de produzir primariamente ácido láctico a partir de hexoses (STEFANOVIC; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2017).

As BAL são também consideradas o principal grupo de microrganismos probióticos. De acordo com Hill *et al.* (2014), os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades suficientes, são capazes de conferir benefícios à saúde do hospedeiro. Entre os principais efeitos benéficos à saúde humana, se destacam o equilíbrio da microbiota intestinal, diminuição da população de patógenos, promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose, alívio da constipação, aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (SPERANZA *et al.*, 2018).

Além dos benefícios proporcionados à saúde humana, a presença de probióticos em alimentos ou materiais de embalagens pode contribuir para controlar o crescimento de microrganismos deteriorantes e patógenos por meio de mecanismos de competição, prologando a vida útil dos produtos com a qualidade desejada pelos consumidores (ESPITIA *et al.*, 2016). Nesse sentido, alguns estudos investigaram o efeito antagonista de cepas de microrganismos probióticos frente a fungos patogênicos em frutas. De Simone *et al* (2021)

avaliou a eficácia de inibição de cepas de BAL potencialmente probióticas frente a *Botrytis cinerea* em kiwis minimamente processados, apresentando uma capacidade promissora de retardar o crescimento do fungo. As propriedades antifúngicas de cepas de BAL foram testadas contra *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp. e *Rhizopus stolonifer* em tomates cereja e foi constatado o poder inibitório das cepas sobre os fungos avaliados (MELO *et al.*, 2021). *Lactiplantibacillus plantarum* C10 foi testado frente à *Trichothecium roseum*, causador do apodrecimento em melão, sendo reportado efeito inibitório sobre o crescimento fúngico (LV *et al.*, 2018).

Contudo, apesar dessas características promissoras, a aplicação de probióticos isoladamente em frutas pode ocasionar impactos sensoriais indesejáveis, podendo também diminuir a sobrevivência durante o armazenamento. A incorporação de culturas probióticas em revestimentos comestíveis foi proposta como uma alternativa viável para melhorar a estabilidade probiótica, sendo aplicada pela primeira vez por Tapia *et al.* (2007), em um revestimento composto com alginato e gelatina carregado com *Bifidobacterium lactis* Bb-12 para chips de maçã e mamão.

Desde então, outras investigações foram realizadas para avaliar a eficácia antimicrobiana de probióticos em revestimentos para frutas, sendo observado um aumento do potencial de inibição do crescimento de patógenos vegetais. *Lactiplantibacillus rhamnosus* CECT 8361 teve seu efeito antagônico testado frente *Escherichia coli* e *Listeria innocua* após a aplicação em revestimentos a base de alginato e inulina em mirtilos minimamente processados, sendo reportado reduções significativas das contagens dos patógenos nas frutas armazenadas por até 14 dias (BAMBACE *et al.*, 2019). A aplicação de revestimentos a base de gelatina e inulina adicionados de *L. rhamnosus* inibiu o crescimento de leveduras e bolores em morangos durante armazenamento refrigerada, além de melhorar a qualidade físico-química das frutas (TEMIZ; ÖZDEMİR, 2021).

Além do controle biológico, existe um crescente interesse em avaliar os efeitos de microrganismos probióticos adicionados em revestimentos para preservação das características físico-químicas de frutas e vegetais frescos e minimamente processados. A adição de *Lactobacillus acidophilus* em revestimento comestível à base de alginato foi eficiente para preservação do teor de umidade e cor de cenouras ao longo do armazenamento (SHIGEMATSU *et al.*, 2018). O uso de *L. plantarum* em revestimento à base de alginato ou quitosana aplicado em maçã e melão também causou melhora na aceitação destas frutas ao longo do armazenamento (SPERANZA *et al.*, 2018). A incorporação de *Lactocaseibacillus casei* em filme comestível à base de “whey protein” foi avaliada em uvas e tomates, sendo

relatado como uma alternativa para prolongar o amadurecimento e promover benefícios à saúde do consumidor (DIANIN *et al.*, 2019).

2.4 REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS COMO TECNOLOGIAS PÓS-COLHEITA EM FRUTAS

Como alternativa aos antifúngicos tradicionais, os revestimentos podem ser usados como estratégias inovadoras para controle da podridão fúngica e de parâmetros indicadores de qualidade pós-colheita, uma vez que são caracterizados como finas camadas de proteção para superfície das frutas. Esses revestimentos podem ser aplicados diretamente, pulverizados ou por imersão das frutas em soluções formadoras de revestimentos (BATISTA *et al.*, 2020; BRAGA *et al.*, 2019).

Os revestimentos comestíveis também podem conter aditivos naturais e são considerados como alternativas para estender a vida útil de alimentos, pois aumentam a ação protetora sobre a fruta por meio da prevenção de perda de água, mudanças de cor, lesões mecânicas, preservação de nutrientes, e até mesmo deterioração microbiana. Ainda, a aplicação desses revestimentos repercute, geralmente, em estabelecimento de aparência brilhante à superfície das frutas (FORMIGA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2021).

Quando comparados ao método de refrigeração, os revestimentos são mais baratos e podem prolongar ainda mais o período de armazenamento das frutas (NAIR *et al.*, 2018). Além disso, o uso de revestimentos comestíveis para proteger e preservar frutas apresenta vantagens em relação aos materiais sintéticos, como biodegradabilidade, sustentabilidade ambiental e segurança para a saúde dos consumidores. Porém, o sucesso da aplicação de revestimentos no controle de qualidade de frutas frescas depende da escolha adequada da matéria-prima para a sua elaboração (SOUSA *et al.*, 2021).

Esse material deve ser isento de componente tóxico, alérgico ou não digerível, deve ser facilmente produzido e economicamente viável. Além disso, deve fornecer propriedades adequadas para manter a estabilidade microbiana do produto para o qual foi aplicado durante o período de armazenamento e comercialização (MARÍN; ATARÉS; CHIRALT, 2017). As condições em que os revestimentos são formulados, bem como o tipo e concentração de aditivos, também devem ser consideradas, visto que estas características influenciam diretamente às propriedades reológicas, propriedades ópticas (brilho e opacidade), efeito de

barreira contra o fluxo de gases e contaminação microbiana (RODRIGUES; CEDRAN; GARCIA, 2018).

Nos últimos anos, os materiais formadores de revestimento aplicados em frutas mais estudados incluem: celulose (FRANCISCO *et al.*, 2020), gelatina (TEMIZ; ÖZDEMİR, 2021); goma arábica (ANJUM *et al.*, 2020; ETEMADIPOOR *et al.*, 2019), Carboximetilcelulose (KHODAEI; HAMIDI-ESFAHANI, 2019; LI *et al.*, 2020), quitosana (BARRAGÁN-MENÉNDEZ *et al.*, 2020; BRAGA *et al.*, 2019; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; MACEDO *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2018a) e alginato de sódio (ALVAREZ *et al.*, 2021; BAMBACE *et al.*, 2019; PARREIDT *et al.*, 2019; SHIGEMATSU *et al.*, 2018; SPERANZA *et al.*, 2018; TAPIA *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2020).

O alginato de sódio é um dos materiais mais utilizado e tem sido reportado como possuidor de propriedades de sustentabilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade, sendo caracterizado como um polímero linear extraído de algas marinhas (GAO *et al.*, 2017). Estruturalmente, consiste em frações de α -L-guluronato ligadas por (1 $\rightarrow$ 4) e manuronato β -D-ligadas (1 $\rightarrow$ 4) (NAIR *et al.*, 2020). O alginato de sódio pode ser utilizado para a produção de revestimentos de elevada qualidade devido à sua estrutura química e propriedades de geleificação (BLANCO-PASCUAL *et al.*, 2014).

Os revestimentos formados por alginato de sódio são transparentes, uniformes e solúveis em água (MAHCENE *et al.*, 2020). Além disso, tais revestimentos têm menor permeabilidade para gorduras, óleos e oxigênio. Essa baixa permeabilidade pode retardar a oxidação lipídica e a perda de umidade de vários vegetais e frutas, o que pode auxiliar na redução da perda de peso e do crescimento microbiano (XU *et al.*, 2020). A aplicação desses revestimentos também pode ser utilizada como tecnologia pós-colheita, visto que retardam o processo de respiração, amadurecimento e a deterioração microbiana, repercutindo em ampliação do período de armazenamento (PARREIDT *et al.*, 2019).

Os revestimentos à base de alginato de sódio têm sido comumente utilizados como carreadores de microrganismos probióticos (Tabela 3) para aplicação em frutas, sendo relatados resultados promissores em relação à conservação destes produtos (ALVAREZ *et al.*, 2021; BAMBACE *et al.*, 2019; SHIGEMATSU *et al.*, 2018; SPERANZA *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2020). Além disso, revestimentos de alginato mostraram vantagens tecnológicas, em relação a outros revestimentos de polissacarídeos em frutas, não afetando a sobrevivência dos probióticos durante o armazenamento (SPERANZA *et al.*, 2018).

Tabela 3 – Estudos de produção e aplicação de revestimentos comestíveis à base de alginato de sódio adicionados de bactérias lácticas em frutas e vegetais (*in natura* e minimamente processados).

Composição do revestimento	Alimento	Referência
Alginato de sódio e <i>L. plantarum</i>	Maçã e melão	SPERANZA <i>et al.</i> , 2018
Alginato de sódio e <i>L. acidophilus</i>	Cenoura	SHIGEMATSU <i>et al.</i> , 2018
Alginato de sódio, <i>L. rhamnosus</i> e inulina	Mirtilo	BAMBACE <i>et al.</i> , 2019
Alginato de sódio e ciclolipopeptídeos produzidos por <i>Bacillus subtilis</i>	Mirtilo	XU <i>et al.</i> , 2020
Alginato de sódio, inulina e oligofrutose e <i>L. rhamnosus</i>	Maçã	ALVAREZ <i>et al.</i> , 2021

Considerando as vantagens potenciais do uso combinado de alginato de sódio e bactérias lácticas, a aplicação de revestimentos formulados com alginato de sódio e cepas de BAL potencialmente probióticas isoladas de subprodutos do processamento de frutas para a inibição de espécies patogênicas de *Colletotrichum* pode-se representar como uma alternativa viável para a preservação da qualidade pós-colheita de goiaba e manga. A aplicação dessa tecnologia poderia proporcionar vantagens para a comercialização de goiaba e manga, considerando as dificuldades que os produtores enfrentam para o controle da antracnose nessas frutas e as consideráveis perdas econômicas para a sua cadeia produtiva decorrentes do progresso da doença.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido em diferentes etapas que estão apresentadas no esquema da Figura 5. Inicialmente, foram realizados os testes *in vitro*, nos quais foi avaliada a atividade antagônica das diferentes cepas de BAL testadas frente a diferentes cepas de *Colletotrichum* spp. utilizadas como microrganismo alvo. Posteriormente, as distintas formulações de revestimentos de alginato de sódio adicionados das cepas selecionadas de BAL foram preparadas e testadas *in situ* quanto à eficácia na diminuição da taxa de progresso da antracnose em manga e goiaba durante o armazenamento sob temperatura ambiente. Também foram realizadas análises da preservação de algumas características físico-químicas de manga e goiaba após a aplicação dos diferentes revestimentos ao longo do armazenamento. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos/Departamento de Nutrição/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Paraíba – Campus I.

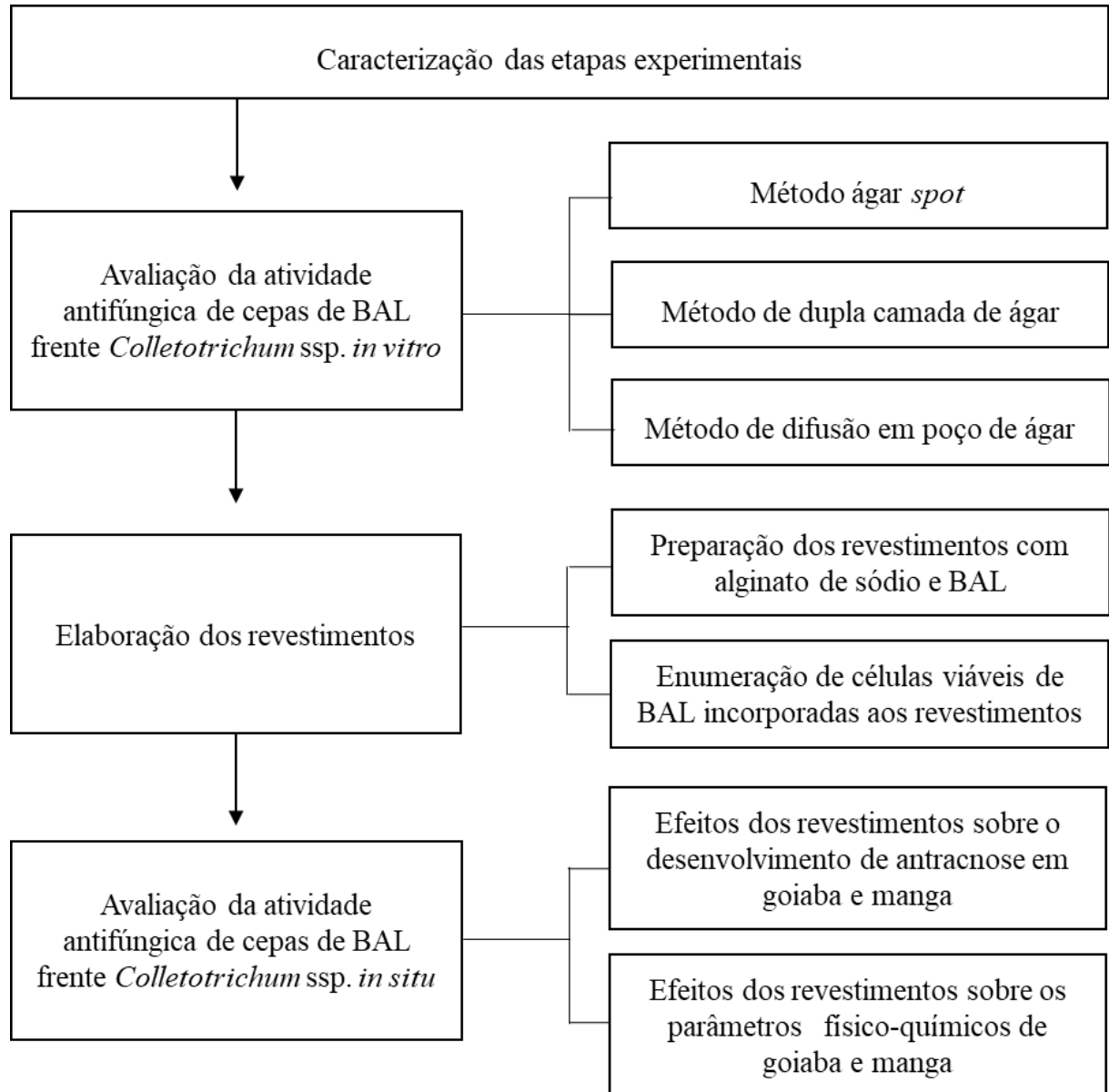
3.1 OBTENÇÃO DOS MATERIAIS

Goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Paluma, caracterizadas por estarem no segundo estágio de maturação, ou seja, com até 80% de casca verde e °Brix ≥ 10 (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020), e mangas (*Mangifera indica* L.) cv. Palmer, caracterizadas por estarem em estágio de maturação média com 50% da casca amarela ou vermelha e °Brix ≥ 12 (SOUSA *et al.*, 2021), foram adquiridas na EMPASA (Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas, João Pessoa, Paraíba, Brasil). As frutas selecionadas estavam livres de lesões físicas e sinais visíveis de infecção, sendo escolhidas e padronizadas com base no tamanho, aparência, cor e forma. Antes do uso nos experimentos, as frutas foram higienizadas com detergente neutro e água corrente potável, desinfetadas superficialmente por meio de imersão (hipoclorito de sódio, 150 ppm, pH 7,2 ajustado com NaOH 1 M) por 15 minutos, enxaguadas com água estéril e secas por duas horas em temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C) em cabine de segurança (OLIVEIRA *et al.*, 2018a).

O alginato de sódio (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Indaiatuba, São Paulo, Brasil), glicerol (Química Moderna, Barueri, São Paulo, Brasil), óleo de girassol (Cargill Agrícola SA, Recife, Pernambuco, Brasil) e tween 80 (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram utilizados para formular os revestimentos. O cloreto de cálcio (PA) (Synth, Diadema,

São Paulo, Brasil) foi aplicado nas frutas revestidas para formar um gel por meio de reticulação com alginato de sódio.

Figura 5 - Etapas do desenho experimental do estudo.



Fonte: Própria, 2021.

3.2 CEPAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Oito diferentes cepas de BAL previamente caracterizadas como tendo propriedades potencialmente probióticas em uma série de testes de segurança, tecnológicos e funcionais *in vitro* foram utilizadas neste estudo, a citar: *Lactiplantibacillus plantarum* 49, *L. plantarum* 53, *Levilactobacillus brevis* 59, *Lacticaseibacillus paracasei* 106, *L. paracasei* 108,

Lactiplantibacillus pentosus 129, *Limosilactobacillus fermentum* 263 e *L. fermentum* 296 (ALBUQUERQUE *et al.*, 2018; GARCIA *et al.*, 2016). Essas cepas foram previamente isoladas de subprodutos do processamento de frutas e identificadas com análise parcial da sequência do gene 16S rRNA (GARCIA *et al.*, 2016). Os estoques foram armazenados ($-20 \pm 0,5$ °C) em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (HiMedia, Mumbai, Índia) com glicerol (Sigma Aldrich; 20 mL/100 mL). As culturas de trabalho foram mantidas em ágar MRS (HiMedia) sob refrigeração ($4 \pm 0,5$ °C) e transferidas para um novo meio de manutenção mensalmente. Antes do uso, cada cepa foi cultivada anaerobicamente (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) em caldo MRS ($37 \pm 0,5$ °C) por 20-24 horas. As células testadas foram coletadas por centrifugação ($4500 \times g$, 10 min, 4 °C), lavadas e ressuspensas em solução salina esterilizada (NaCl, 0,85 g/100 mL) para obter uma suspensão de células (densidade óptica a 625 nm de 1 - 1,2) com contagens de células viáveis entre 9 - 10 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), quando semeadas em ágar MRS. Cada cepa de BAL foi testada separadamente em todos os experimentos.

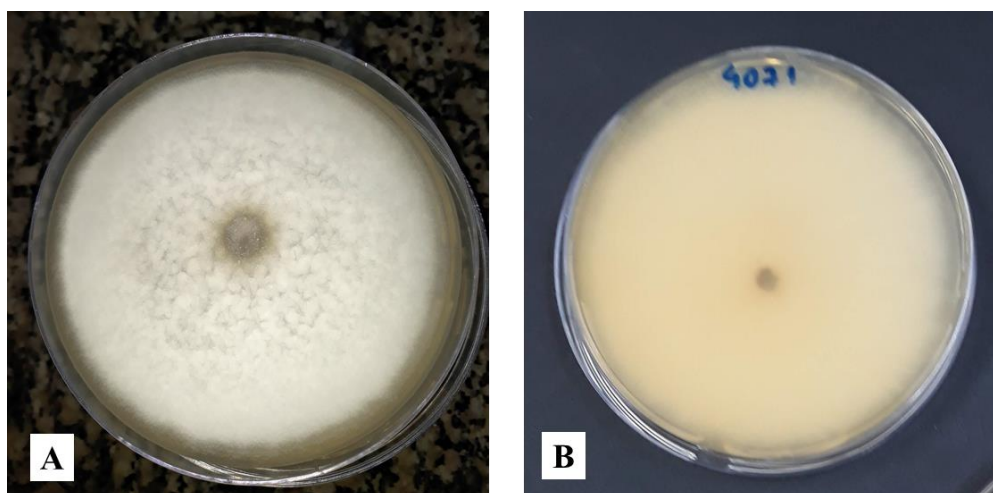
3.3 CEPAS DE *Colletotrichum* spp. E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Seis diferentes cepas de espécies distintas de *Colletotrichum*, nomeadamente *C. asianum* CMM 4057, *C. fructicola* CMM 4069, *C. tropicale* CMM 4071, *C. siamense* CMM 4077, *C. karstii* CMM 4101 e *C. gloeosporioides* CMM 320, foram gentilmente fornecidas pela coleção de cultura de Fungos Fitopatogênicos “Prof. Maria Menezes” (Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil), e utilizadas como microrganismo-alvo nos ensaios antifúngicos. Essas cepas foram previamente identificadas com inferência filogenética (LIMA *et al.*, 2013; VIEIRA *et al.*, 2013), sendo capazes de induzir o desenvolvimento de sintomas característicos da antracnose em goiaba cv. Paluma e manga cv. Palmer (LIMA *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2015).

As culturas estoques foram mantidas em ágar batata dextrose (ABD; HiMedia) sob refrigeração ($4 \pm 0,5$ °C) e proteção da luz. Antes do uso nos experimentos, as culturas de trabalho foram cultivadas em ABD por sete dias ($25 \pm 0,5$ °C) (Figura 6). Cada cepa foi inoculada separadamente em uma goiaba e manga e, após o desenvolvimento da lesão com sintomas característicos da antracnose, as cepas foram recuperadas das lesões e cultivadas em ABD ($25 \pm 0,5$ °C, 7 dias). Todas as cepas de *Colletotrichum* induziram o desenvolvimento de lesões de antracnose com características semelhantes nas frutas, as quais compreendiam manchas marrons irregulares, deprimidas e, em alguns casos, com áreas encharcadas para

goiaba (OLIVEIRA *et al.*, 2018a); e manchas profundas, proeminentes e, geralmente, arredondadas de marrom escuro a preto para manga (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017). Cada cepa foi testada separadamente em todos os experimentos.

Figura 6 - Colônia de *Colletotrichum tropicale* CMM 4071 em ABD (A) e verso da colônia (B).



Fonte: Própria, 2021

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CEPAS DE BAL FRENTE A *Colletotrichum* spp. *in vitro*

3.4.1 Método ágar *spot*

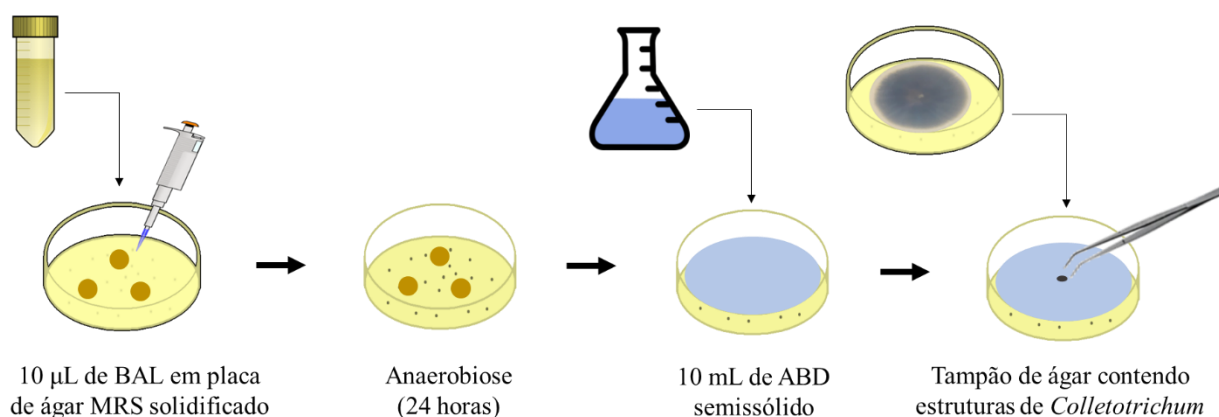
Uma triagem preliminar da atividade antifúngica das cepas de BAL potencialmente probióticas contra as diferentes cepas alvo de *Colletotrichum* foi realizada utilizando o método ágar *spot* (AFZALI *et al.*, 2020) (Figura 7). Uma alíquota de 10 μ L da suspensão da cepa de BAL testada (9 - 10 log UFC/mL) cultivada durante 18 - 20 horas em caldo MRS sob anaerobiose (Anaerogen) foi dispensada como gota em pontos discretos da superfície de ágar MRS com 0,2% (p/v) de glicose e 1,2% (p/v) de ágar bacteriológico (HiMedia), seguido por incubação sob anaerobiose (Anaerogen) durante 24 horas ($37 \pm 0,5$ °C). No final do período de incubação, as placas com ágar MRS previamente inoculadas foram cobertas com 10 mL de ABD semissólido, inoculadas (no centro da superfície da camada de ABD) com um tampão de ágar (5 mm de diâmetro) contendo estruturas da cepa de *Colletotrichum* alvo (previamente cultivada por sete dias a $25 \pm 0,5$ °C em ABD), seguido por incubação sob aerobiose por cinco dias ($25 \pm 0,5$ °C). Em paralelo, uma placa contendo ágar MRS não inoculado com a

cepa BAL foi utilizada como controle negativo. Os efeitos antifúngicos das cepas de BAL testadas foram medidos com base na redução do crescimento micelial do fungo com a equação:

$$\text{ICM\%} = [(CT - TT) / CT] \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

onde ICM% é o percentual de inibição do crescimento micelial; CT é o crescimento total de fungos no ensaio de controle e TT é o crescimento total de fungos no ensaio com cepas de BAL (HUSAIN *et al.*, 2017).

Figura 7 - Avaliação da atividade antifúngica de cepas de BAL frente a *Colletotrichum* spp. pelo método de ágar spot.



Fonte: Própria, 2021.

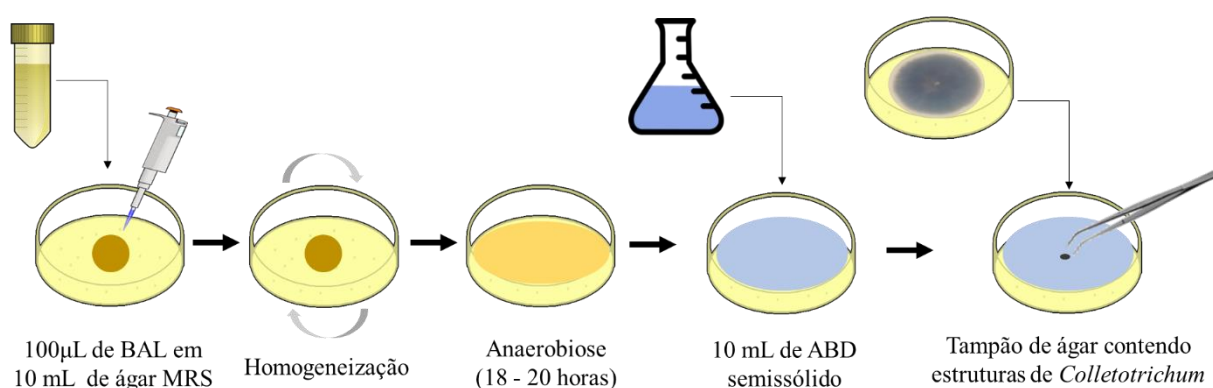
Após a triagem, as cepas de BAL com melhor desempenho na inibição das cepas de *Colletotrichum* testadas foram selecionados para utilização nos ensaios de avaliação da atividade antagônica pelos métodos de dupla camada de ágar e difusão em poço de ágar (KHARAZIAN *et al.*, 2017; CANPOLAT *et al.*, 2018).

3.4.2 Método de dupla camada de ágar

Para o método de dupla camada de ágar, inicialmente, uma alíquota de 100 µL da suspensão da cepa de BAL testada (9 - 10 log UFC/mL) foi homogeneizada com 10 mL de ágar MRS em placas de Petri esterilizadas. Após a solidificação, as placas de ágar MRS foram incubadas durante 18 - 20 horas (37 ± 0,5 °C) e sobrepostas com ABD semissólido. Um tampão contendo estruturas da cepa alvo de *Colletotrichum* previamente cultivada em ABD (25 ± 0,5 °C, sete dias) foi inoculado no centro da superfície da camada de ABD em cada placa e incubado aerobicamente (Anaerogen) por cinco dias (25 ± 0,5 °C). No final do

período de incubação, os efeitos inibitórios das cepas de BAL testadas foram avaliados medindo o diâmetro do crescimento micelial fúngico em cada placa, o qual foi utilizado para calcular a porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM%), conforme descrito na equação 1 (seção 3.4.1) (HUSAIN *et al.*, 2017) (Figura 8). Placas com dupla camada de ágar não inoculadas com as cepas de BAL foram utilizadas como controle (KHARAZIAN *et al.*, 2017).

Figura 8 - Avaliação da atividade antifúngica de cepas de BAL frente a *Colletotrichum* spp. pelo método de dupla camada de ágar.



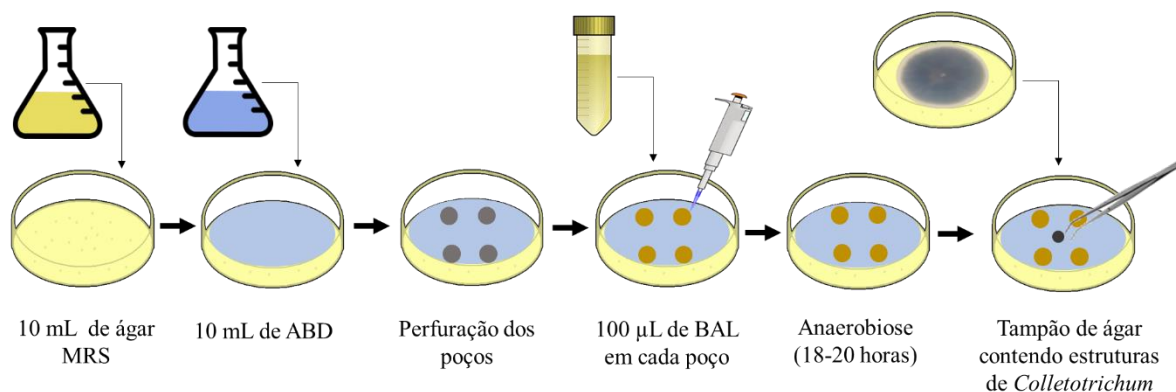
Fonte: Própria, 2021.

3.4.3 Método de difusão em poço de ágar

Para o método de difusão em poço de ágar, poços de 6 mm de diâmetro foram perfurados em placa de Petri com dupla camada de ágar MRS e ABD com distância de dois cm do ponto central. Em seguida, uma alíquota de 100 µL de uma suspensão da cepa de BAL testada (9-10 log UFC/mL) foi dispensada em cada poço. Para permitir a difusão no ágar, as placas foram pré-incubadas durante 18-20 horas ($37 \pm 0,5$ °C) sob anaerobiose (Anaerogen). O caldo MRS em substituição a suspensão da cepa de BAL foi usado como controle negativo para cada aplicação (KHARAZIAN *et al.*, 2017). Um tampão de ágar (5 mm de diâmetro) contendo estruturas da cepa alvo de *Colletotrichum* foi transferido para o centro da placa com ágar MRS sobreposto com ABD, seguido por incubação ($25 \pm 0,5$ °C) por cinco dias (CANPOLAT *et al.*, 2018) (Figura 9). Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM%), que foi calculada conforme equação 1 (seção 3.4.1). As cepas de BAL que apresentaram efeitos antifúngicos mais destacados nestes ensaios foram

selecionadas para incorporação em revestimentos de alginato de sódio e uso para aplicação em frutas.

Figura 9 - Avaliação da atividade antifúngica de cepas de BAL frente *Colletotrichum* spp. pelo método de difusão em poço de ágar.



Fonte: Própria, 2021.

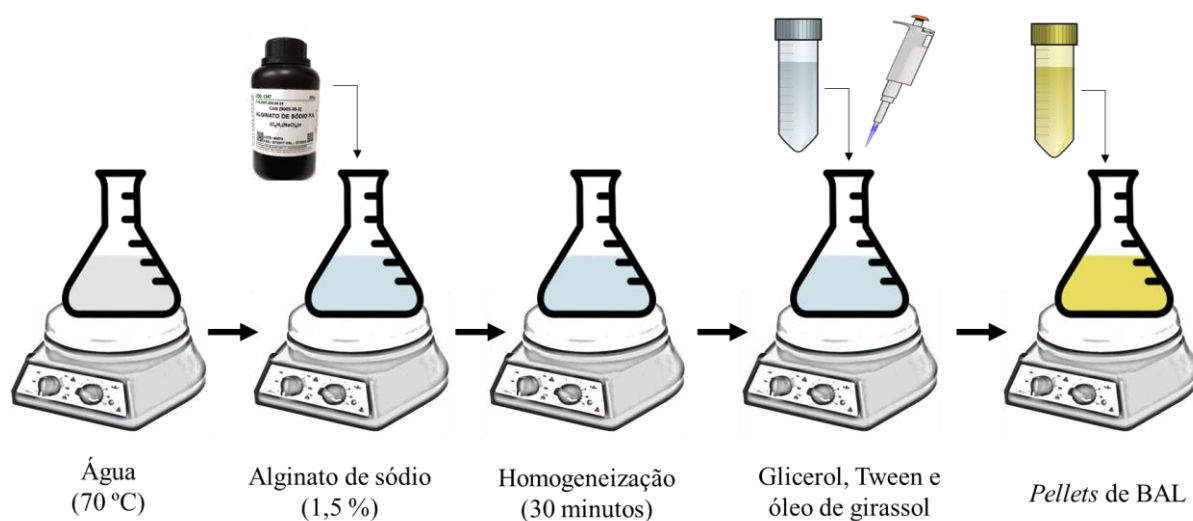
3.5 PREPARAÇÃO DE REVESTIMENTOS COM ALGINATO DE SÓDIO E BACTÉRIAS LÁTICAS

O alginato de sódio (1,5 g/100 mL) foi dissolvido em água destilada esterilizada aquecida (70 °C) sob agitação magnética (MARCONI, MA 085,240 rpm) por 30 minutos até a dissolução completa. O glicerol (0,75 g/100 g) foi incorporado na dispersão de alginato de sódio para aumentar a flexibilidade dos revestimentos formulados. O surfactante tween 80 (0,05 g/100 g) foi incorporado aos revestimentos para melhorar a aderência às frutas. O óleo de girassol (0,04 g/100g) foi incorporado aos revestimentos como fonte de lipídios para aumentar as características de barreira à água. Todos os componentes da formulação dos revestimentos foram misturados e agitados por 10 minutos sob temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C) até a dissolução completa (SHIGEMATSU *et al.*, 2018).

As células de uma suspensão de 50 mL das cepas de BAL testadas foram colhidas por centrifugação (4500 x g, 4 °C, 15 minutos), o sobrenadante foi descartado, os *pellets* celulares foram lavados com solução salina esterilizada (NaCl, 0,85%, p/v) e ressuspensos diretamente na dispersão formadora do revestimento (KHODAEI; HAMIDI-ESFAHANI, 2019), sendo alcançado uma concentração celular final entre 9,5 – 10,5 log UFC/mL (SPERANZA *et al.*, 2018). As cepas de BAL selecionadas foram incorporadas separadamente nas dispersões de alginato de sódio (Figura 10). Revestimentos de alginato de sódio sem adição de BAL, bem

como a aplicação de água destilada esterilizada adicionada de glicerol (2,5 mL/100 mL) também foram preparados e utilizados como controles negativos. Cloreto de cálcio (2 g/100mL) diluído em água destilada esterilizada foi aplicado a cada fruta após imersão na dispersão do revestimento para induzir o mecanismo de geleificação e reação de reticulação (PARREIDT *et al.*, 2019).

Figura 10 - Esquema da preparação dos revestimentos com alginato de sódio e BAL.



Fonte: Própria, 2021

3.6 ENUMERAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE BACTÉRIAS LÁTICAS INCORPORADAS NO REVESTIMENTO DE ALGINATO DE SÓDIO

As células viáveis das cepas de BAL incorporadas aos revestimentos de alginato de sódio foram enumeradas após a formulação e desidratação parcial dos revestimentos. Uma alíquota de 20 mL de cada formulação de revestimento foi transferida assepticamente para placas de Petri esterilizadas e colocadas para secar por aproximadamente 24 horas ($37 \pm 0,5$ °C) (SOUKOULIS *et al.*, 2017). Os revestimentos foram armazenados em câmaras assépticas sob temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C) e em diferentes intervalos de tempo de armazenamento (1, 3, 6, 9, 12 e 15 dias), 1 g do revestimento formulado foi diluído em 9 mL de água peptonada esterilizada (0,1 g/100 mL), homogeneizado (180 rpm) em agitador de soluções (PHOENIX, AP 56) durante 10 minutos, seguido por preparação de diluições em série ($1:9$, 10^{-1} – 10^{-5}) no mesmo diluente e inoculação (10 μ L) das diluições em ágar MRS. As placas foram incubadas ($37 \pm 0,5$ °C) por 48 horas sob anaerobiose (Anaerogen) e os resultados ajustados foram expressos como UFC/g (SHIGEMATSU *et al.*, 2018).

3.7 EFEITOS DE REVESTIMENTOS DE ALGINATO DE SÓDIO COM CEPAS DE BAL SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE ANTRACNOSE EM GOIABA E MANGA DURANTE O ARMAZENAMENTO

A epiderme de cada fruta (goiaba e manga) foi ferida (cinco feridas por fruta) com o uso de agulha esterilizada (3 mm de profundidade e 2 mm de largura) na região central do mesmo lado da fruta. Posteriormente, cada fruta foi cuidadosamente imersa em 400 mL da dispersão formadora do revestimento de alginato de sódio (1,5 g/100 mL) adicionado da cepa de BAL por dois minutos e, em seguida, imersa em solução de cloreto de cálcio (2 g/100 mL) por um minuto como forma de promover a reticulação do revestimento. As frutas foram secas ao ar sob papel de filtro absorvente e mantidas em uma cabine de biossegurança por duas horas para secagem completa. Um tampão de ágar (5 mm de diâmetro) contendo estruturas do isolado de *Coletotrichum* (obtidas da margem de uma colônia cultivado em ABD por sete dias a 25 °C) foi inoculado no ponto de punção da fruta. O tampão de ágar foi fixado na superfície da fruta com o auxílio de fita adesiva (BRAGA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2018a). As frutas foram imersas por dois minutos nos revestimentos de alginato de sódio (1,5 g/100 mL), bem como em água destilada esterilizada com glicerol (2,5 mL/100mL) como controle negativo.

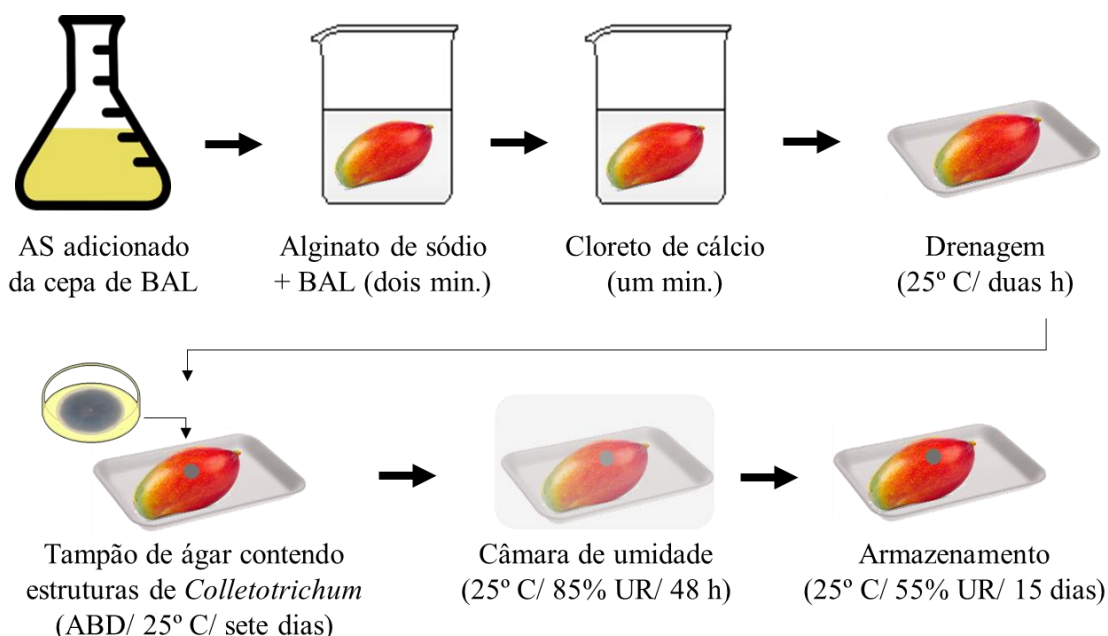
Posteriormente, as frutas foram distribuídas individualmente em recipientes de polietileno forrados com papel toalha umedecido com água destilada esterilizada para formar uma câmara úmida e cobertas com saco plástico comercialmente esterilizado para manter a umidade relativa do ar elevada (aproximadamente 85%). Os recipientes foram mantidos em temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C) e as câmaras de umidade removidas após 48 horas de armazenamento ($25 \pm 0,5$ °C, 55% UR) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017) (Figura 11). Em diferentes intervalos de tempo de armazenamento (6, 9, 12 e 15 dias), as frutas foram examinadas quanto ao progresso dos sintomas característicos visíveis de antracnose e medição do diâmetro da lesão de antracnose (BRAGA *et al.*, 2019).

Os resultados foram expressos como porcentagem de redução do diâmetro da lesão de antracnose (%RDLA), o qual foi medido com base na diferença do diâmetro da lesão nas frutas revestidas com alginato de sódio + dispersão da cepa de BAL em comparação com o diâmetro da lesão nas frutas não tratadas (controle negativo) e calculado com a seguinte equação (BRAGA *et al.*, 2019):

$$\%RDLA = [(N - F / N) \times 100 \quad \text{(Equação 2)}$$

onde N é o diâmetro da lesão de antracnose em frutas não tratadas (controle negativo) e F é o diâmetro da lesão de antracnose em frutas revestidas.

Figura 11 - Esquema de aplicação de revestimento de alginato de sódio e BAL em goiaba e manga.



Fonte: Própria, 2021.

3.8 EFEITOS DE REVESTIMENTOS DE ALGINATO DE SÓDIO COM BACTÉRIAS LÁTICAS SOBRE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE GOIABA E MANGA DURANTE O ARMAZENAMENTO

As frutas não revestidas e revestidas com as coberturas de alginato de sódio adicionadas de BAL ou apenas com alginato de sódio, porém não contaminadas com cepas de *Colletotrichum*, foram avaliadas em relação aos teores de sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável (AT), pH, teor de ácido ascórbico e perda de peso no dia zero (imediatamente após a aplicação do revestimento) e após 6, 9, 12 e 15 dias de armazenamento em temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C).

Para a determinação de SST, cada fruta foi cortada longitudinalmente em duas metades. A casca e a semente (na manga) foram retiradas e a polpa esmagada em processador de frutas doméstico. Duas gotas foram extraídas e depositadas no prisma de um refratômetro digital (Brix/RI Chek Model, Reichert Analytical Instruments, Depew, NY, EUA) para leitura

(AOAC 2016, método 932,12). Os resultados foram corrigidos para $20 \pm 0,5$ °C e expressos em °Brix.

A AT foi determinada com 10 mL de polpa, homogeneizada com 100 mL de água estéril e filtrada, por meio de titulação com NaOH 0,1 M na presença de fenolftaleína como indicador. Os resultados foram expressos em gramas de ácido cítrico por 100 g de fruta (AOAC, 2016, método 920,15).

Os valores de pH foram determinados com 10 mL de polpa, homogeneizada com 100 mL de água estéril e filtrada, utilizando potenciômetro com eletrodo de vidro combinado (Modelo Q400AS, Quimis, São Paulo, Brasil) calibrado com solução tampão com pH 7 e 4 (AOAC, 2016; Método 981,12).

O conteúdo de ácido ascórbico foi determinado pelo método de titulação de neutralização com solução de 2,6-diclorofenol indofenol (OLIVEIRA *et al.*, 2018b). Para isso, 10 g de polpa triturada foram homogeneizados e diluídos em ácido oxálico 0,5%. Uma alíquota de 10 mL foi removida da solução final para titulação com 2,6-diclorofenol indofenol até aparecimento de tonalidade rosa claro. O volume de titulação foi usado na seguinte equação:

$$\text{Ácido ascórbico (mg/100g)} = (V \times F / A) \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

onde V é o volume da solução de 2,6-diclorofenol indofenol gasto na titulação; F é o fator da solução de 2,6-diclorofenol indofenol e A é a quantidade em mL da amostra utilizada. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico por 100 g de fruta (OLIVEIRA *et al.*, 2018b).

A perda de peso das frutas foi determinada com base no peso inicial (dia zero) e no peso final da fruta em cada período de armazenamento. Os resultados foram expressos como porcentagem da perda de peso inicial (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise dos efeitos sobre o crescimento micelial fúngico foram realizadas em triplicata (replicatas técnicas) em três experimentos independentes (replicatas biológicas). A análise do progresso da lesão de antracnose e dos parâmetros físico-químicos das frutas foi realizada considerando um delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições para cada grupo experimental (tratamentos) e seis frutos por repetição em três experimentos independentes. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A análise de variância (ANOVA) seguida do teste *post hoc* de Tukey foram executados para

determinar as diferenças ($p \leq 0,05$) entre os resultados. A área abaixo da curva de progresso da doença foi utilizada para avaliar a severidade da doença (antracnose) nas frutas (MACEDO *et al.*, 2020). A análise estatística foi realizada com o software computacional Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, CA, EUA).

4 RESULTADOS

Conforme as normas estipuladas pelo colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição/CCS/UFPB, os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de um artigo original apresentado no apêndice A.

O artigo apresentado no apêndice A intitulado “Application of potentially probiotic fruit-derived lactic acid bacteria loaded into sodium alginate coatings to control anthracnose development in guava and mango during storage” aborda a eficácia de novos revestimentos formulados com alginato de sódio adicionados de cepas de BAL isoladas de subprodutos do processamento de frutas, e previamente caracterizadas como potencialmente probióticas, para causar redução do progresso e da severidade da antracnose causada por diferentes espécies de *Colletotrichum* em goiaba cv. Paluma e manga cv. Palmer durante o armazenamento.

No presente estudo, foi observado nos testes *in vitro* que as oito cepas de BAL testadas causaram forte inibição do crescimento de diferentes espécies patogênicas de *Colletotrichum*. A aplicação de revestimentos de alginato de sódio adicionados de *L. brevis* 59, *L. pentosus* 129 ou *L. fermentum* 263 foram eficazes para reduzir o progresso e a severidade de lesões de antracnose em goiaba e manga contaminadas artificialmente com diferentes espécies patogênicas de *Colletotrichum* durante 15 dias de armazenamento em temperatura ambiente. O revestimento de alginato de sódio com *L. brevis* 59 foi o mais eficaz em inibir a evolução da severidade da antracnose em goiaba e manga. Os revestimentos de alginato de sódio adicionado das cepas de BAL selecionadas causaram efeitos positivos em parâmetros físico-químicos indicadores da qualidade pós-colheita de goiaba e manga, destacando-se a redução da perda de peso e diminuição das perdas de ácido ascórbico durante o armazenamento. Os revestimentos formulados com alginato de sódio e *L. brevis* 59, *L. pentosus* 129 ou *L. fermentum* 263 podem ser estratégias inovadoras de biocontrole para proteção de goiaba e manga do desenvolvimento de doenças pós-colheita, especialmente de antracnose, e para prolongar o período de armazenamento dessas frutas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. R. *et al.* Histochemistry and morphoanatomy study on guava fruit during ripening. **Food Science and Technology**, London, v. 32, p. 179-186, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612012005000019>.
- AFZALI, S. *et al.* Determination of the anti-yeast activity of *Lactobacillus* spp. isolated from traditional Iranian cheeses in vitro and in yogurt drink (Doogh). **Scientific Reports**, United Kingdom, v. 10, p. 1-11, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63142-0>.
- AGRIOPOULOU, S. *et al.* Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables: Quality and safety aspects. **Microorganisms**, [s.l.], v. 8, p. 952, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060952>.
- ALBUQUERQUE, T. M. R. *et al.* In vitro characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, United States, v. 10, p. 704-716, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>.
- ALVAREZ, M. V. *et al.* Prebiotic-alginate edible xuing on fresh-cut apple as a new carrier for probiotic lactobacilli and bifidobacteria. **LWT: Food Science and Technology**, [s.l.], v. 137, p. 110483, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110483>.
- ANJUM, M. A. *et al.* Effect of gum arabic and Aloe vera gel based edible coatings in combination with plant extracts on postharvest quality and storability of ‘Gola’ guava fruits. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 271, p. 109506, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109506>.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 20th ed, Gaithersburg: AOAC 50 International, 2016.
- BAGGIO, J. S. *et al.* Baseline sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates from Brazilian strawberry fields to azoxystrobin, difenoconazole, and thiophanate-methyl. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 43, p. 533-542, 2018. <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0232-2>.
- BAMBACE, M. F. *et al.* Novel functional blueberries: Fructo-oligosaccharides and probiotic lactobacilli incorporated into alginate edible coatings. **Food Research International**, Essex, v. 122, p. 653-660, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.040>.
- BARRAGÁN-MENÉNDEZ, C. *et al.* Films of chitosan and Aloe vera for maintaining the viability and antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* TEP6. **Coatings**, [s.l.], v. 10, p. 259, 2020. <https://doi.org/10.3390/coatings10030259>.
- BELLÉ, C. *et al.* Detection of *Colletotrichum coccodes* causing leaf anthracnose on *Pisum sativum* in southern Brazil. **Journal of Plant Pathology**, [s.l.], v. 102, p. 255-255, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00392-6>.

BENATAR, G. V.; WIBOWO, A. First report of *Colletotrichum asianum* associated with mango fruit anthracnose in Indonesia. **Crop Protection**, [s.l.], v. 141, p. 105432, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105432>.

BLANCO-PASCUAL, N. *et al.*, Antioxidant film development from unrefined extracts of brown seaweeds *Laminaria digitata* and *Ascophyllum nodosum*. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 37, p. 100-110, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.021>.

BORDOH, P. K. *et al.* A review on the management of postharvest anthracnose in dragon fruits caused by *Colletotrichum* spp. **Crop Protection**, [s.l.], v. 130, p. 105067, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.105067>.

BRAGA, S. P. *et al.* Application of coatings formed by chitosan and *Mentha* essential oils to control anthracnose caused by *Colletotrichum gloesporioides* and *C. brevisporum* in papaya (*Carica papaya* L.) fruit. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 139, p. 631-639, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.010>.

BRASIL, I. M.; SIDDIQUI, M. W. Postharvest quality of fruits and vegetables: An overview. In: SIDDIQUI, M. W (ed.). **Preharvest modulation of postharvest fruit and vegetable quality**. London Wall: Academic Press, 2018.

CANPOLAT, E. *et al.* Antifungal activity of some lactic acid bacteria against several soil-borne fungal pathogens isolated from strawberry plants. **Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology**, [s.l.], v. 6, p. 1163-1167, 2018. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v6i9.1163-1167.1975>.

CARVALHO, C. R. L. *et al.* Avaliação de cultivares de mangueira selecionadas pelo Instituto Agrônômico de Campinas comparadas a outras de importância comercial. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 26, p. 264-271, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452004000200021>.

CEAGESP. Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo. **Manga palmer é o produto destaque da semana (7/1)**. São Paulo, 01 jan. 2020. Disponível em: <http://www.ceagesp.gov.br/comunicacao/noticias/manga-palmer-e-o-produto-destaque-da-semana-71/> Acesso em: 06 jul. 2021.

CHAWLA, S.; DEVI, R.; JAIN, V. Changes in physicochemical characteristics of guava fruits due to chitosan and calcium chloride treatments during storage. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, [s.l.], v. 7, p. 1035-1044, 2018.

DAMASCENO, C. L. *et al.* Postharvest biocontrol of anthracnose in bananas by endophytic and soil rhizosphere bacteria associated with sisal (*Agave sisalana*) in Brazil. **Biological Control**, San Diego, v. 137, p. 104016, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104016>.

DE OLIVEIRA, K. Á. R. *et al.* Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. **Food microbiology**, London, v. 66, p. 96-103, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.012>.

DE OLIVEIRA, L. I. G. *et al.* Characterization and efficacy of a composite coating containing chitosan and lemongrass essential oil on postharvest quality of guava. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [s.l.], v. 66, p. 102506, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102506>.

DE SIMONE, N. *et al.* Screening of lactic acid bacteria for the bio-control of *Botrytis cinerea* and the potential of *Lactiplantibacillus plantarum* for eco-friendly preservation of fresh-cut kiwifruit. **Microorganisms**, [s.l.], v. 9, p. 773, 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040773>.

DIANIN, I. B. *et al.* Edible biofilms formulated with whey protein isolate and *L. casei* probiotic culture: Characterization and application in tomatoes and grapes. **Chemical Engineering Transactions**, Milano, v. 75, p. 469-474, 2019. <https://doi.org/10.3303/CET1975079>.

DISKIN, S. *et al.* Fludioxonil–A potential alternative for postharvest disease control in mango fruit. **Crop Protection**, [s.l.], v. 124, p. 104855, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104855>.

DUKARE, A. S. *et al.* Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 59, p. 1498-1513, 2019. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1417235>.

ETEMADIPOOR, R. *et al.*, The potential of gum arabic enriched with cinnamon essential oil for improving the qualitative characteristics and storability of guava (*Psidium guajava* L.) fruit. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 251, p. 101-107, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.021>.

ESPITIA, P. J. P. *et al.* Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties-A review. **Food hydrocolloids**, [s.l.], v. 35, p. 287-296, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.005>.

EVANS, E. A.; BALLEEN, F. H.; SIDDIQ, M. Mango production, global trade, consumption trends, and postharvest processing and nutrition. **Handbook of Mango Fruit; John Wiley & Sons: Chichester, UK**, p. 1-16, 2017.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Crop statistics recorded for 173 products. 2021. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. Acesso em: 10 maio 2021.

FORCELINI, B. B. *et al.* Effect of inoculum concentration and interrupted wetness duration on the development of anthracnose fruit rot of strawberry. **Plant disease**, [s.l.], v. 101, p. 372-377, 2017. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-16-1175-RE>.

FORMIGA, A. S. *et al.* Use of edible coatings based on hydroxypropyl methylcellulose and beeswax in the conservation of red guava ‘Pedro Sato’. **Food chemistry**, Barking, v. 290, p. 144-151, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.142>.

FRANCISCO, C. B. *et al.* Shelf-life of guavas coated with biodegradable starch and cellulose-based films. **International journal of biological macromolecules**, Guildford, v. 152, p. 272-279, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.249>.

GAO, C. *et al.* Properties of glycerol-plasticized alginate films obtained by thermo-mechanical mixing. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 63, p. 414-420, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.023>.

GARCIA, E. F. *et al.* Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. **Frontiers in microbiology**, [Switzerland], v. 7, p. 1371, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01371>.

GAVA, C. A. T; ALVES, Í. L. S.; DUARTE, N. C. Timing the application of *Bacillus subtilis* QST 713 in the integrated management of the postharvest decay of mango fruits. **Crop Protection**, [s.l.], v. 121, p. 51-56, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.03.013>.

GERMANO, T. A. *et al.* Galactomannan-carnauba wax coating improves the antioxidant status and reduces chilling injury of 'Paluma' guava. **Postharvest Biology and Technology**, [s.l.], v. 149, p. 9-17, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.013>.

GIOVANNONI, J. *et al.* The epigenome and transcriptional dynamics of fruit ripening. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 68, p. 61-84, 2017. 10.1146 / annurev-arplant-042916-040906.

GROSSO, A. L. *et al.* Increase of walnuts' shelf life using a walnut flour protein-based edible coating. **LWT: Food Science and Technology**, [s.l.], v. 118, p. 108712, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108712>.

HASHEMI S. M. B.; JAFARPOUR D. Bioactive edible film based on Konjac glucomannan and probiotic *Lactobacillus plantarum* strains: Physicochemical properties and shelf life of fresh-cut kiwis. **Journal of Food Technologists**, Chicago, v. 86, p. 513-522, 2021. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15568>.

HERNANDEZ-MONTIEL, L. G. *et al.* Mechanisms employed by *Debaryomyces hansenii* in biological control of anthracnose disease on papaya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, [s.l.], v. 139, p. 31-37, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.01.015>.

HILL, C. *et al.* Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, London, v. 1, 506-514, 2014. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.

HUSAIN, A. *et al.* Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from soil rhizosphere on *Fusarium* species infected chilli seeds. **American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences**, [s.l.], v. 29, p. 182-202, 2017. <http://ddms.usim.edu.my:80/jspui/handle/123456789/16043>.

JIN, M. *et al.* Isolation and identification of a new *Colletotrichum* species causing anthracnose of *Astragalus membranaceus*. **Crop Protection**, [s.l.], v. 143, p. 105470, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105470>.

KADAM, D.M.; KAUSHIK, P.; KUMAR, R. Evaluation of guava products quality. **International Journal of Food Science and Nutrition Engineering**, [s.l.], v. 2, p. 7-11, 2012. <https://doi.org/10.5923/j.food.20120201.02>.

KHARAZIAN, Z. A. *et al.* Biocontrol potential of *Lactobacillus* strains isolated from corn silages against some plant pathogenic fungi. **Biological Control**, San Diego, v. 110, p. 33-43, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.04.004>.

KHODAEI, D.; HAMIDI-ESFAHANI, Z. Influence of bioactive edible coatings loaded with *Lactobacillus plantarum* on physicochemical properties of fresh strawberries. **Postharvest Biology and Technology**, [s.l.], v. 156, p. 110944, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.110944>.

KIST, B. B *et al.* **Anuário brasileiro de Horti&Fruti 2021**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2021. Disponível em: https://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wp-content/uploads/2021/04/HORTIFRUTI_2021.pdf. Acesso em: 01 set. 2021.

KONSUE, W.; DETHOUP, T.; LIMTONG, S. Biological control of fruit rot and anthracnose of postharvest mango by antagonistic yeasts from economic crops leaves. **Microorganisms**, [s.l.], v. 8, p. 317, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030317>.

LI, S. *et al.* Cassava starch/carboxymethylcellulose edible films embedded with lactic acid bacteria to extend the shelf life of banana. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 248, p. 116805, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116805>.

LIMA, N. B. *et al.* Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in northeastern Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 141, p. 679-688, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0570-y>.

LIMA, N. B. *et al.* Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, [s.l.], v. 61, p. 75-88, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0237-6>.

LIU, J. *et al.* The impact of the postharvest environment on the viability and virulence of decay fungi. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 58, p. 1681-1687, 2018. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1279122>.

LV, X. *et al.* Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* C10 against *Trichothecium roseum* and its application in promotion of defense responses in muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit. **Journal of food science and technology**, [s.l.], v. 55, p. 3703-3711, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3300-1>.

MACEDO, S. A. *et al.* Combined chitosan and *Cymbopogon citratus* (DC ex Nees) Stapf. essential oil to inhibit the fungal phytopathogen *Paramyrothecium roridum* and control crater rot in melon (*Cucumis melo* L.). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 51, p. 2057-2065, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00378-y>.

- MAHCENE, Z. *et al.* Development and characterization of sodium alginate based active edible films incorporated with essential oils of some medicinal plants. **International journal of biological macromolecules**, Guildford, v. 145, p. 124-132, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.093>.
- MARÍN, A. *et al.* Lactic acid bacteria incorporated into edible coatings to control fungal growth and maintain postharvest quality of grapes. **HortScience**, [s.l.], v. 54, p. 337-343, 2019. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13661-18>.
- MARÍN; ATARÉS; CHIRALT. Improving function of biocontrol agents incorporated in antifungal fruit coatings: a review. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 27, p. 1220 -1241, 2017. <https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1390068>.
- MELO, J. J. M. *et al.* Antagonistic activity of lactic acid bacteria against phytopathogenic fungi isolated from cherry tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*). **Current Microbiology**, New York, v. 78, p. 1399-1408, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02416-w>.
- NAIR, M. S. *et al.* Effect of chitosan and alginate based coatings enriched with pomegranate peel extract to extend the postharvest quality of guava (*Psidium guajava* L.). **Food chemistry**, Barking, v. 240, p. 245-252, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.122>.
- NAIR, M. S. *et al.* Enhancing the functionality of chitosan-and alginate-based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 164, p. 304-320, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.083>.
- NICOLAU-LAPEÑA, I. *et al.* Combination of ferulic acid with Aloe vera gel or alginate coatings for shelf-life prolongation of fresh-cut apples. **Food Packaging and Shelf Life**, [s.l.], v. 27, p. 100620, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100620>.
- NUNES, M. C. N. *et al.* Quality curves for mango fruit (cv. Tommy Atkins and Palmer) stored at chilling and nonchilling temperatures. **Journal of Food Quality**, [s.l.], v. 30, p. 104-120, 2007. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4557.2007.00109.x>.
- OLIVEIRA, P. D. L. *et al.* Control of anthracnose caused by *Colletotrichum* species in guava, mango and papaya using synergistic combinations of chitosan and *Cymbopogon citratus* (DC ex Nees) Stapf. essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 266, p. 87-94, 2018a. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.018>.
- OLIVEIRA, V. R. L. *et al.* Use of biopolymeric coating hydrophobized with beeswax in post-harvest conservation of guavas. **Food Chemistry**, Barking, v. 259, p. 55-64, 2018b. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.101>.
- PARREIDT, T. S. *et al.* The development of a uniform alginate-based coating for cantaloupe and strawberries and the characterization of water barrier properties. **Foods**, [s.l.], v. 8, p. 203, 2019. <https://doi.org/10.3390/foods8060203>.
- PATRICK, O. M. Lactic acid bacteria in health and disease. **Rwanda Journal of Health Sciences**, [s.l.], v.1, p. 39- 50, 2012.

PORAT, R. *et al.* Postharvest losses of fruit and vegetables during retail and in consumers' homes: Quantifications, causes, and means of prevention. **Postharvest Biology and Technology**, [s.l.], v. 139, p. 135-149, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.11.019>.

QUINTAL, S. S. R. *et al.* Selection via mixed models in segregating guava families based on yield and quality traits. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 39, p. e-866, 2017. <https://doi.org/10.1590/0100-29452017866>.

RODRIGUES, F. J.; CEDRAN, M. F.; GARCIA, S. Influence of linseed mucilage incorporated into an alginate-base edible coating containing probiotic bacteria on shelf-life of fresh-cut yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Food and Bioprocess Technology**, [s.l.], v. 11, p. 1605-1614, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2128-z>.

ROMANAZZI, G. *et al.* Shelf life extension of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment. **Critical reviews in food science and nutrition**, Boca Raton, v. 57, p. 579-601, 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.900474>.

RUSSO, P. *et al.* *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 247, p. 48-54, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.027>.

SANTOS, C.E. *et al.* **Anuário brasileiro da fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Ed. Gazeta, 2013.

SANTOS, T. M. *et al.* Enhancing storage stability of guava with tannic acid-crosslinked zein coatings. **Food chemistry**, Barking, v. 257, p. 252-258, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.021>.

SHAH, S. *et al.* Pre-storage chitosan-thyme oil coating control anthracnose in mango fruit. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 284, p. 110139, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110139>.

SHIGEMATSU, E. *et al.* Edible coating with probiotic as a quality factor for minimally processed carrots. **Journal of Food Science and Technology**, [s.l.], v. 55, p. 3712-3720, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3301-0>.

SIDDIQ, M.; BRECHT, J. K.; SIDHU, J. S. (Ed.). **Handbook of mango fruit: production, postharvest science, processing technology and nutrition**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2017.

SILVA, D. D. *et al.* Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. **Fungal Biology Reviews**, [s.l.], v. 31, p. 155-168, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.05.001>.

SILVA, L. L. *et al.* *Colletotrichum*: Species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 104, p. 1891-1904, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10363-y>.

- SOGI, D. S. *et al.* Total phenolics, antioxidant activity, and functional properties of ‘Tommy Atkins’ mango peel and kernel as affected by drying methods. **Food Chemistry**, Barking, v. 141, p. 2649-2655, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.053>.
- SOUKOULIS, C. *et al.* Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG incorporated in edible films: Impact of anionic biopolymers and whey protein concentrate. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 70, p. 345-355, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.014>.
- SOUSA, F. F. *et al.* Conservation of ‘palmer’ mango with an edible coating of hydroxypropyl methylcellulose and beeswax. **Food Chemistry**, Barking, v. 346, p. 128925, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128925>.
- SPERANZA, B. *et al.* Viability of *Lactobacillus plantarum* on fresh-cut chitosan and alginate-coated apple and melon pieces. **Frontiers in Microbiology**, [Switzerland], v. 9, p. 2538, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02538>.
- STEFANOVIC, E.; FITZGERALD, G.; MCAULIFFE, O. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. **Food Microbiology**, London, v. 61, p. 33 - 49, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.08.009>.
- SWETT, C. L. *et al.* Using model-based fungicide programing to effectively control *Botrytis* and anthracnose fruit rots in mid-atlantic strawberry fields and co-manage strawberry sap beetle (*Stelidota geminata*). **Crop Protection**, [s.l.], v. 134, p. 105175, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105175>.
- Núcleo de estudos e pesquisas em alimentação – NEPA. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO**. 4. ed. Revisada e ampliada. Campinas: NEPA – UNICAMP. 2011.
- TAPIA, M. S. *et al.* Alginate and gellan based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. **Journal of food science**, Chicago, v. 72, p. 190-196, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00318.x>.
- TEMIZ, N.; ÖZDEMİR, K. S. Microbiological and physicochemical quality of strawberries (*Fragaria* × *ananassa*) coated with *Lactobacillus rhamnosus* and inulin enriched gelatin films. **Postharvest Biology and Technology**, [s.l.], v. 173, p. 111433, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111433>.
- TOVAR, C. D. G. *et al.* *Colletotrichum gloesporioides* inhibition in situ by chitosan-*Ruta graveolens* essential oil coatings: effect on microbiological, physicochemical, and organoleptic properties of guava (*Psidium guajava* L.) during room storage. **Biomolecules**, [Switzerland], v. 9, p. 1-26, 2019. <https://doi.org/10.3390/biom9090399>.
- TOVAR-PEDRAZA, J. M. *et al.* Distribution and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Mexico. **Plant Disease**, [s.l.], v. 104, p. 137-146, 2020. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-19-0178-RE>.
- TREICHEL, M. *et al.* Anuário Brasileiro da Fruticultura. Santa Cruz do Sul: **Editora Gazeta Santa Cruz**, 2016.

VIEIRA, W. A. S. *et al.* First report of papaya fruit anthracnose caused by *Colletotrichum brevisporum* in Brazil. **Plant Disease**, [s.l.], v. 97, p. 1659-1659, 2013. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0520-PDN>.

VILAPLANA, R. *et al.* Control of anthracnose, caused by *Colletotrichum musae*, on postharvest organic banana by thyme oil. **Postharvest Biology and Technology**, [s.l.], v. 138, p. 56-63, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.12.008>.

VITTI, K. A.; LIMA, L. M.; MARTINES FILHO, J. G. Agricultural and economic characterization of guava production in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 42, p. e-447, 2020. <https://doi.org/10.1590/0100-29452020447>.

WU, Y. M. *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* strains control strawberry anthracnose through antagonistic activity and plant immune response intensification. **Biological Control**, San Diego, v. 157, p. 104592, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104592>.

XU, L. *et al.* Preparation and characterization of antifungal coating films composed of sodium alginate and cyclolipopeptides produced by *Bacillus subtilis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 143, p. 602-609, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.051>.

ZHANG, H. *et al.* Recent developments in the enhancement of some postharvest biocontrol agents with unconventional chemicals compounds. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 78, p. 180-187, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.002>.

ZHAO, Y. *et al.* Characterization of *Lysobacter* spp. strains and their potential use as biocontrol agents against pear anthracnose. **Microbiological Research**, Jena, v. 242, p. 126624, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126624>.

ZHENG, J. *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 70, p. 1-12, 2020. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Artigo

Application of potentially probiotic fruit-derived lactic acid bacteria loaded into sodium alginate coatings to control anthracnose development in guava and mango during storage

Running title: Probiotic-loaded sodium alginate coatings

Abstract

This study evaluated the efficacy of potentially probiotic fruit-derived lactic acid bacteria (LAB) strains loaded into sodium alginate (SA) coatings to control the anthracnose development in guava cv. Paluma and mango cv. Palmer caused by distinct pathogenic *Colletotrichum* species (*C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. siamense*, *C. karstii* and *C. gloeosporioides*) during 15 days of room temperature storage (25 ± 0.5 °C). The effects of the formulated coatings on physicochemical parameters indicative of overall postharvest quality of guava and mango were evaluated. The eight examined LAB strains caused strong inhibition on the mycelial growth of all target *Colletotrichum* species *in vitro*. LAB strains with the highest inhibitory effects (*Levilactobacillus brevis* 59, *Lactiplantibacillus pentosus* 129 and *Limosilactobacillus fermentum* 263) on the target *Colletotrichum* species were incorporated into SA coatings. These strains had viable counts of >6 log CFU/mL in SA coatings during 15 days of room temperature storage. Application of coatings with SA + *L. brevis* 59, SA + *L. pentosus* 129 and SA + *L. fermentum* 263 delayed the development and decreased the severity of anthracnose lesions in guava and mango artificially contaminated with any of the tested *Colletotrichum* species. These coatings impacted positively on some physicochemical parameters indicative of postharvest quality and more prolonged storability of guava and mango. The formulated SA coatings loaded with tested fruit-derived potentially

probiotic LAB strains could be innovative and effective strategies to control postharvest anthracnose and extend the storability of guava and mango.

Key-words: Coating, lactic acid bacteria, probiotic, *Colletotrichum* spp., tropical fruit, biocontrol.

Introduction

Guava (*Psidium guajava* L.) and mango (*Mangifera indica* L.) are among the most commercially important tropical fruit, being well-accepted and consumed worldwide. These fruit are sources of different nutrients, such as sugars, minerals, fiber, ascorbic acid and carotenoids, as well as of phenolic compounds with antioxidant activities [1,2]. Guava and mango are climacteric fruit with high respiration rate and postharvest metabolism leading to increased susceptibility to pathogens, fast decay and short storability [3,4].

Anthrachnose has been the most important postharvest disease attacking guava and mango due to the severity of symptoms and losses for commercialization [4,5]. Although *Colletotrichum gloesporioides* has been considered traditionally the main causative agent of anthracnose in guava and mango, different *Colletotrichum* species, such as *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. siamense* and *C. karstii*, have been also associated with anthracnose lesions in these fruit [4,6,7]. The application of chemical fungicides has been the main strategy to reduce the postharvest anthracnose development and severity in fruit [8,9]. However, the increasing concerns of consumers regarding the long term negative impacts of the widespread and continued use of chemical fungicides to environment and human health, besides of their reported capability of inducing increased antifungal resistance, have stimulated the search for alternative methods to control postharvest pathogenic fungi [8,10].

The application of biological control agents has arisen as promising strategy to control postharvest diseases and prolong fruit storability [11]. LAB are among the most prevalent microorganisms forming the autochthonous microbiota of fruit, with a natural adaptation to the conditions found in fruit environment [12,13]. Lactobacilli and some recently amended genera [14] have a long safe use as starter or probiotic cultures in foods [15-18], being conferred the status of generally recognized as safe (GRAS) and qualified presumption of safety (QPS) to many of their species [19]. The use of LAB has been considered an innovative strategy for the biopreservation of fresh and minimally processed fruit [19,20], with emphasis on lactobacilli and amended genera [14,21,22,23].

The incorporation of LAB into suitable matrices is important to guarantee their propagation and survival when applied in technologies to preserve foods, such as their incorporation into edible coatings to antagonize pathogenic fungi causing fruit postharvest rot. Edible coatings are thin layers of edible polymeric materials formed directly on the food surface functioning as semi-permeable barriers to oxygen, carbon dioxide and water vapor, avoiding the water loss, firmness alteration and oxidation [24,25]. Sodium alginate is a polysaccharide commonly used to formulate edible coatings because of its biodegradability, biocompatibility, low toxicity and film-forming properties, besides of being incorporated into several food products due to its gelling and thickening properties [3,17]. A sodium alginate-inulin coating loaded with probiotic *Lactobacillus rhamnosus* caused improvements in physicochemical and microbiological parameters of minimally processed blueberries during refrigeration storage [15]. Other studies have shown the efficacy of biopolymer-based coatings loaded with *Lactobacillus* (or amended) strains to inhibit the decay and prolong the storability of grape [10], strawberry [16,18], kiwi [26] and banana [27]. However, there is no study in available literature evaluating the

efficacy of edible coatings loaded with LAB to control the anthracnose development in fruit.

Early investigations have characterized different strains belonging to distinct LAB species isolated from fruit by-products as having properties compatible with probiotic use, including the capability of antagonizing pathogens [12,13], which could be an aptitude to be exploited in formulation of tailored edible coatings to control postharvest disease in fruit and give additional functionalities to these strains. This study aimed to develop and evaluate the efficacy of novel coatings formulated with sodium alginate loaded with some of these potentially probiotic fruit-derived LAB strains to control the anthracnose development and severity in guava cv. Paluma and mango cv. Palmer caused by distinct pathogenic *Colletotrichum* species through *in vitro* and *in situ* experiments. The effects of the formulated coatings on some physicochemical parameters indicative of general postharvest quality of guava and mango during storage were investigated.

Materials and methods

Raw materials

Guavas cv. Paluma, characterized as being in the second maturation stage with up to 80% of green peel and °Brix of ≥ 10 [9], and mangos cv. Palmer, characterized as being in the medium-ripe stage with 50% of yellow or red peel and °Brix of ≥ 12 [28], were obtained from EMPASA (Supplies and Services Company of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil). Fruit without physical injury and visual infections were selected and standardized based on their size, appearance, color and shape. Fruit were washed with neutral detergent and potable running water, surface disinfected (sodium hypochlorite, 150 ppm, pH 7.2 adjusted with 1 M NaOH) for 5 min, rinsed with potable water and dried for 2 h under room temperature (25 ± 0.5 °C) in a safety cabinet [4].

Sodium alginate (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Indaiatuba, SP, Brazil), glycerol (Química Moderna, Barueri, SP, Brazil), sunflower oil (Cargill Agrícola S.A, Recife, PE, Brazil) and tween 80 (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used to formulate the coatings. Calcium chloride was used to form a gel by crosslinking with sodium alginate (Synth, Diadema, SP, Brazil).

Potentially probiotic fruit-derived LAB and growth conditions

Eight LAB strains previously characterized as having potential probiotic properties in a series of *in vitro* safety, technological and functional-related tests were used in this study, to cite: *Lactiplantibacillus plantarum* 49, *L. plantarum* 53, *Levilactobacillus brevis* 59, *Lactiacaseibacillus paracasei* 106, *L. paracasei* 108, *Lactiplantibacillus pentosus* 129, *Limosilactobacillus fermentum* 263 and *L. fermentum* 296 [12,13]. These strains were isolated from fruit by-products and identified with partial 16S rRNA gene sequence analysis [13]. Stocks were maintained (-20 ± 0.5 °C) in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (HiMedia, Mumbai, India) with glycerol (Sigma Aldrich; 20 mL/100 mL). Working cultures were kept on MRS agar (HiMedia) under refrigeration (4 ± 0.5 °C) and transferred to a new media monthly. Prior to use, each strain was cultivated anaerobically (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) in MRS broth (37 ± 0.5 °C) for 20 - 24 h. Cells were collected with centrifugation ($4500 \times g$, 10 min, 4 °C), washed and resuspended in sterile saline solution (NaCl, 0.85 g/100 mL) to obtain a cell suspension (optical density at 625 nm of 1 – 1.2) with viable counts in the range of 9 - 10 colony forming units per milliliter (CFU/mL) when plated on MRS agar. Each strain was tested separately in the experiments.

Colletotrichum strains and growth conditions

Six different *Colletotrichum* strains of distinct species, namely *C. asianum* CMM 4057, *C. fruticola* CMM 4069, *C. tropicale* CMM 4071, *C. siamense* CMM 4077, *C. karstii* CMM 4101 and *C. gloeosporioides* CMM 320, gently supplied by Culture Collection of Phytopathogenic Fungi Prof. Maria Menezes (Federal Rural University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil), were used as target organisms. These strains were previously identified with phylogenetic inference [6,29] and are capable of inducing anthracnose development in guava cv. Paluma and mango cv. Palmer [6,7].

Stock cultures were maintained in potato dextrose agar (PDA; HiMedia) under refrigeration (4 ± 0.5 °C) in the dark. Before use in the experiments, working cultures were grown on PDA for 7 days (25 ± 0.5 °C). Each strain was inoculated separately in guava and mango and, after development of lesion with characteristic anthracnose symptoms, the strains were recovered from these lesions and cultured on PDA (25 ± 0.5 °C, 7 days). All *Colletotrichum* strains induced similar anthracnose characteristic symptoms in fruit, which were irregular brown spots, depressed and, in some cases, soaked areas for guava [4]; and sunken, prominent and generally rounded dark brown to black spots for mango [5]. Each strain was tested separately in the experiments.

Evaluation of the antifungal activity of LAB strains against *Colletotrichum* spp. *in vitro*

Agar spot method

A preliminary screening of the antifungal activity of the potentially probiotic LAB strains against the distinct target *Colletotrichum* strains was done with an agar spot method [30]. A 10- μ L aliquot from a suspension of the tested LAB strain ($9 - 10$ log CFU/mL) cultivated overnight in MRS broth under anaerobiosis was dispensed as spots on the surface of MRS agar with 0.2% (w/v) glucose and 1.2% (w/v) bacteriological agar (HiMedia) and incubated anaerobically for 24 h (37 ± 0.5 °C). At the end of the incubation period, the plates

were overlaid with 10 mL of semi-solid PDA, inoculated (on the center of PDA layer surface) with an agar plug (5 mm diameter) with mycelia from target *Colletotrichum* strain (previously grown for 7 days at 25 ± 0.5 °C in PDA) and incubated aerobically for 5 days (25 ± 0.5 °C). Agar non-inoculated with LAB strain was used as a negative control. The antifungal effects of the LAB strains were measured based on the reduction of fungal mycelial growth with the equation:

$$\text{MGI\%} = [(CT - TT) / CT] \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

Where MGI% is the percentage of mycelial growth inhibition, CT is the total mycelial growth of the target fungi in control assay and TT is the total mycelial growth of the target fungi in media with the tested LAB strain [31].

After the screening, the LAB strains causing the stronger antifungal effects were used in further experiments to measure their antagonistic activity *in vitro*.

Dual-culture agar method

A 100 µL-aliquot of a suspension of tested LAB strain ($9 - 10 \log \text{ CFU/mL}$) was homogenized with 10 mL of MRS agar in sterile Petri dishes. After the solidification, MRS agar plates were incubated overnight (37 ± 0.5 °C) and overlaid with semisolid PDA. A mycelial plug of the target *Colletotrichum* strain previously grown (25 ± 0.5 °C, 7 days) in PDA was inoculated on the center of the PDA layer surface in each plate and incubated aerobically for 5 days (25 ± 0.5 °C). At the end of the incubation period, the inhibitory effects of the tested LAB strain were evaluated by measuring the diameter of the fungal mycelial growth in each plate, which was used to calculate the percentage of mycelial growth inhibition (MGI%), as described in equation 1 [31]. Dual agar plate non-inoculated with LAB strain was used as a control [32].

Agar-well diffusion method

Six mm-diameter wells were punched in dual-agar plate with distance of 2 cm away from central point. A 100- μ L aliquot of a suspension of the tested LAB strain (9 - 10 log CFU/mL) was dispensed in wells. In order to allow the diffusion into the agar, the plates were pre-incubated overnight (37 ± 0.5 °C) under anaerobiosis. MRS broth was used as control for each application [32]. An agar plug (5 mm diameter) with mycelia from target *Colletotrichum* strain was transferred to the center of the MRS plate overlaid with PDA and incubated aerobically (30 ± 0.5 °C) for 5 days [33]. The percentage of the mycelial growth inhibition (MGI%) was calculated as described in equation 1 [31]. LAB strains showing the stronger antifungal effects in these experiments were selected for incorporation into the sodium alginate coatings to be applied on fruit.

Preparation of coatings with sodium alginate and LAB strains

Sodium alginate (1.5 g/100 mL) was dissolved in distilled sterile heated water (70 °C) under stirring (240 rpm) for 30 min until its complete dissolution. Glycerol (0.75 g/100 g) was incorporated into the sodium alginate dispersion to increase the flexibility of the formulated coatings. The surfactant tween 80 (0.05 g/100 g) was incorporated into the coatings to improve their adherence to the fruit. Sunflower oil (0.04 g/100 g) was incorporated into the coatings as a source of lipids to increase the water barrier characteristics. All ingredients were stirred for 10 min under room temperature until their complete dissolution [17].

Cells of a 50 mL-suspension of tested LAB strain were harvested with centrifugation ($4,500 \times g$, 4 °C, 15 min). The supernatant was discarded, cell pellet was washed with sterile NaCl (0.85%, w/v) solution and re-suspended into the coating-forming dispersions [16] to reach a final cell concentration in the range of 9.5 - 10.5 log CFU/mL [34]. The selected LAB strains were incorporated separately into the sodium alginate coatings. A sodium alginate

(SA) coating with glycerol (2.5 mL/100 mL) but without LAB was also prepared as a negative control. Calcium chloride (2 g/100g) dispersed in sterile distilled water was applied on the fruit after coating to induce gelling mechanism and crosslinking reaction [35].

Enumeration of the viable counts of LAB in sodium alginate coatings

The viable counts of LAB strains incorporated into the sodium alginate coatings were enumerated after formulation and partial dehydration of coatings. A 20 mL-aliquot of each coating formulation was aseptically transferred to sterile Petri dishes and placed for drying for approximately 24 h (37 ± 0.5 °C) [36]. On different room temperature (25 ± 0.5 °C) storage time intervals (day 1, 3, 6, 9, 12 and 15), 1 g of the formulated coating was diluted in 9 mL of sterile peptone water (0.1 g/100 mL) and homogenized with a sterile mechanical shaker (180 rpm) during 10 min. Serial dilutions (1:9) were prepared in the same diluent and plated on MRS agar. Plates were incubated (37 ± 0.5 °C) for 48 h under anaerobic conditions and results were expressed as CFU/g [17].

Effects of the sodium alginate coatings with LAB strains on the anthracnose lesion development in guava and mango during storage

The surface (epidermis) of each fruit (guava or mango) was wounded (five wounds per fruit) with a sterilized needle (3 mm-deep and 2 mm-wide) in the middle region on a same fruit side. Each fruit was carefully immersed in 400 mL of sodium alginate + LAB coating-forming dispersion for 2 min and immersed in calcium chloride solution (2 g/100 mL) for 1 min. Fruit were air-dried on absorbent filter papers and maintained in a biosafety cabinet for 2 h for drying. An agar plug (5 mm diameter) with mycelia obtained from the margin of a 7 day-old colony of the target *Colletotrichum* strain grown on PDA (25 ± 0.5 °C, 7 days) was

inoculated on the puncture point of an individual fruit. Agar plug was fixed with the aid of a tape on fruit surface [4,8].

Fruit were immersed for 2 min in a sodium alginate coating dispersion (1.5 g/100 mL) with glycerol (2.5 mL/100 mL) as a negative control. Fruit were distributed individually in polyethylene containers lined with paper towels previously moistened with sterile distilled water to form a humid chamber and covered with a commercially sterile plastic bag to keep a high relative humidity (approximately 85%). Containers were maintained at room temperature (25 ± 0.5 °C) and humidity chambers were removed after 48 h of storage [5], which are conditions similar to those of fruit during retail commercialization. On different storage time intervals (day 6, 9, 12 and 15), the fruit were examined for visible characteristic symptoms of anthracnose and anthracnose lesion diameter measurements [8]. Fruit were evaluated from day 6 to 15 of storage because the first visible signs of anthracnose lesions arose from day 6 of storage onward in coated and uncoated fruit contaminated with *C. asianum* CMM 4057, *C. fructicola* CMM 4069, *C. tropicale* CMM 4071, *C. siamense* CMM 4077 and *C. karstii* CMM 4101, while these signs arose from day 9 of storage onward in uncoated and coated fruit contaminated with *C. gloeosporioides* CMM 320.

Results were expressed as the percentage of anthracnose lesion diameter reduction (ALDR%) measured based on the difference of the lesion diameter in fruit coated with sodium alginate + LAB strain dispersion when compared to the lesion diameter in untreated fruit (negative control) and calculated with the equation [8]:

$$\%ALDR = [(N - F/N) \times 100] \quad (Eq. 2)$$

Where N is the anthracnose lesion diameter in untreated fruit (negative control) and F is the anthracnose lesion diameter in coated fruit.

Effects of sodium alginate coatings with LAB strains on the physicochemical characteristics of guava and mango during storage

Fruit uncoated and coated with sodium alginate + LAB strain or with sodium alginate alone (but not contaminated with *Colletotrichum* strains) were evaluated for total soluble solids (TSS), titratable acidity (TA), pH, ascorbic acid contents and weight loss on day zero (immediately after coating application) and after 6, 9, 12 and 15 days of room temperature storage (25 ± 0.5 °C).

For TSS measurements, each fruit was cut longitudinally in 2 halves. Peel and seeds (in mango) were removed and pulp was crushed with a domestic fruit processor. Two drops were extracted and deposited on the prism of a digital refractometer (Brix/RI Chek Model, Reichert Analytical Instruments, Depew, NY, USA) for reading [37] (method 932.12). Results were corrected to 20 ± 0.5 °C and expressed in °Brix. The TA was determined in 10 mL of homogenized pulp by titration with 0.1M NaOH in the presence of phenolphthalein as an indicator. Results were expressed as grams of citric acid per 100 g of fruit [37] (method 920.15). The pH values were determined in 10 mL of homogenized pulp with a potentiometer with combined glass electrode (Model Q400AS, Quimis, SP, Brazil) calibrated with buffer solution pH 7 and 4 [37] (method 981.12). The ascorbic acid contents were determined with neutralization titration method using 2,6-dichlorophenol indophenol solution. Ten g of crushed pulp were homogenized and diluted in 0.5% oxalic acid. A 10 mL-aliquot was removed from final solution for titration with 2,6-dichlorophenol indophenol until reaching a light pink color. The titration volume was used in the following equation:

$$\text{Ascorbic acid (mg/100 g)} = (V \times F/A) \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Where V is the volume of 2,6-dichlorophenol indophenol solution spent on the titration, F is the factor of 2,6-dichlorophenol indophenol solution and A is the quantity (mL) of the sample used [38]. Results were expressed as mg of ascorbic acid per 100 g of fruit. The fruit

weight loss was determined based on the initial weight (day zero) and final weight of fruit at each storage period. Results were expressed as a percent of initial weight loss [28].

Statistical analysis

The analysis of the effects on the fungal mycelial growth was done in triplicate in three independent experiments. The analysis of the anthracnose lesion development and physicochemical parameters in fruit were done considering a completely randomized experimental design with three replicates for each experimental group (treatments) and eight fruit per replicate in three independent experiments. The results were expressed as average $\pm$ standard deviation. Kolmogorov-Smirnov normality test was run to assess whether the obtained data had normal distribution. Levene's test was run to assess if data satisfied the homogeneity assumption (equal variance). Analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Tukey test were run to determine differences ($p < 0.05$) among the results. Area below the disease progress curve was run to assess the disease severity in fruit [39]. Statistical analysis was done with the software Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, CA, USA).

Results

Antifungal effects of LAB strains on *Colletotrichum* spp. *in vitro*

The antifungal effects of the eight tested potentially probiotic LAB strains on the mycelial growth of the six distinct pathogenic *Colletotrichum* strains was initially evaluated with an agar spot method. The eight LAB strains were capable of inhibiting the mycelial growth of the six target *Colletotrichum* strains, being found MGI% values in the range of 39.0 – 100 %. *L. brevis* 59, *L. pentosus* 129 and *L. fermentum* 263 caused overall the highest inhibition ($p < 0.05$) with MGI% in the range of 55.8 – 100%, 66.3 – 100% and 58.6 – 100%, respectively. Furthermore, these LAB strains caused MGI% of $>70\%$ against

at least five of the six target *Colletotrichum* strains. *C. tropicale* CMM 4071, *C. siamense* CMM 4077 and *C. karstii* CMM 4101 were overall the target strains most sensitive to the tested LAB strains ($p < 0.05$), being found MGI% of $>50\%$ (Table 1).

Considering that all the tested LAB strains inhibited the mycelial growth of the target *Colletotrichum* strains, only one strain of each LAB species causing the highest MGI% values ($p < 0.05$), namely *L. plantarum* 49, *L. brevis* 59, *L. paracasei* 108, *L. pentosus* 129 and *L. fermentum* 263, was selected for use in dual-culture agar method. All the tested LAB strains caused a complete mycelial growth inhibition (MGI%: 100%) of the target *Colletotrichum* strains in dual-culture agar method (data not shown). These results could be due to the generation of an anaerobic condition caused by application of a second agar layer on a first agar layer used in these assays, which could possibly overestimate the inhibitory effects of the tested LAB strains. Considering this fact, additional *in vitro* assays using the agar-well diffusion method were performed.

In the agar-well diffusion method, *L. brevis* 59, *L. pentosus* 129 and *L. fermentum* 263 caused total mycelial growth inhibition (MGI%: 100%) on the target *Colletotrichum* strains. *L. plantarum* 49 caused total mycelial growth inhibition on *C. gloeosporioides* CMM 320 and caused MGI% in the range of 29.2 – 74.4% on the other *Colletotrichum* strains. *C. asianum* CMM 4057 was the target strain less sensitive to the inhibitory effects of *L. plantarum* 49 and *L. paracasei* 108 ($p < 0.05$), with MGI% of 29.2 and 19.9%, respectively. *C. gloeosporioides* CMM 320 was the most sensitive target strain, being caused a 100% inhibition of its growth by all tested LAB strains (Table 2). When measured by agar spot method, the MGI% caused by tested LAB strains against *C. tropicale* CMM 4071, *C. siamense* CMM 4077 and *C. karstii* CMM 4101 were always of $>50\%$. Sodium alginate (SA, 1.5 g/100 mL) had no inhibitory effects on the mycelial growth of the tested *Colletotrichum* strains (data not shown).

The MGI% caused by tested LAB strains on the six target *Colletotrichum* strains were high overall regardless of the *in vitro* method used to measure these effects (Supplementary information, S1). *L. brevis* 59, *L. pentosus* 129 and *L. fermentum* 263 were selected to load the SA coatings because these strains caused total mycelial growth inhibition on most of the target *Colletotrichum* strains in agar spot, dual-culture agar and agar well-diffusion methods.

Table 1. Mycelial growth inhibition (MGI%, average $\pm$ standard deviation) caused by potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains against distinct *Colletotrichum* species after a 5-day incubation (25 ± 0.5 °C), as measured by agar spot method.

LAB strains	MGI%					
	<i>C. asianum</i> CMM 4057	<i>C. fructicola</i> CMM 4069	<i>C. tropicale</i> CMM 4071	<i>C. siamense</i> CMM 4077	<i>C. karstii</i> CMM 4101	<i>C. gloeosporioides</i> CMM 320
<i>L. plantarum</i> 49	57.0 (± 2.6) ^{Cc}	68.5 (± 2.5) ^{BCb}	52.0 (± 1.6) ^{Dc}	63.9 (± 1.9) ^{Cb}	65.4 (± 2.1) ^{Bb}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}
<i>L. plantarum</i> 53	50.3 (± 2.2) ^{Dcd}	45.6 (± 2.7) ^{DEd}	69.0 (± 1.9) ^{BCa}	70.8 (± 2.0) ^{Ba}	57.4 (± 0.7) ^{Cb}	52.2 (± 2.0) ^{Cc}
<i>L. brevis</i> 59	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	73.6 (± 2.0) ^{Bb}	76.0 (± 1.8) ^{Ab}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	55.8 (± 1.1) ^{Cc}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}
<i>L. paracasei</i> 106	39.0 (± 1.5) ^{Ec}	40.6 (± 1.2) ^{Ec}	53.0 (± 1.5) ^{Db}	65.4 (± 0.3) ^{Ca}	56.4 (± 1.2) ^{Cb}	66.2 (± 2.7) ^{Ba}
<i>L. paracasei</i> 108	50.3 (± 2.5) ^{Db}	62.6 (± 2.7) ^{Ca}	63.6 (± 2.1) ^{Ca}	68.5 (± 0.7) ^{Ba}	54.5 (± 2.5) ^{Cb}	39.9 (± 3.1) ^{Dc}
<i>L. pentosus</i> 129	70.7 (± 2.3) ^{Bbc}	74.0 (± 2.1) ^{Bb}	74.4 (± 2.5) ^{ABb}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	66.3 (± 1.6) ^{Bc}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}
<i>L. fermentum</i> 263	58.6 (± 1.7) ^{Cc}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	77.6 (± 2.4) ^{Ab}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}
<i>L. fermentum</i> 296	60.7 (± 2.7) ^{Cb}	48.0 (± 2.3) ^{Dde}	51.1 (± 0.9) ^{Dcd}	69.5 (± 0.8) ^{Ba}	53.9 (± 1.1) ^{Cc}	44.0 (± 1.3) ^{De}

^{A-E}: Average values in the same column with different uppercase letters are significantly different ($p < 0.05$), based on Tukey's test.

^{a-e}: Average values in the same row with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$), based on Tukey's test.

Table 2. Mycelial growth inhibition (MGI%, average $\pm$ standard deviation) caused by potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains against distinct *Colletotrichum* species after a 5-day incubation (25 ± 0.5 °C), as measured by well-diffusion method.

LAB strains	MGI%					
	<i>C. asianum</i> CMM 4057	<i>C. fructicola</i> CMM 4069	<i>C. tropicale</i> CMM 4071	<i>C. siamense</i> CMM 4077	<i>C. karstii</i> CMM 4101	<i>C. gloeosporioides</i> CMM 320
<i>L. plantarum</i> 49	29.2 (± 3.7) ^{Bd}	48.7 (± 3.5) ^{Bc}	50.7 (± 1.5) ^{Cc}	52.2 (± 3.8) ^{Cc}	74.4 (± 3.7) ^{Bb}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}
<i>L. brevis</i> 59	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}
<i>L. paracasei</i> 108	19.9 (± 2.4) ^{Ce}	44.7 (± 2.7) ^{Bd}	60.4 (± 1.7) ^{Bc}	77.5 (± 0.8) ^{Bb}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}
<i>L. pentosus</i> 129	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}
<i>L. fermentum</i> 263	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}	100.0 (± 0.0) ^{Aa}

Results are expressed as percent inhibition rates of radial mycelial growth compared with control treatment (without adding potentially probiotic *Lactobacillus*).

^{A-C}: Average values in the same column with different uppercase letters are significantly different ($p < 0.05$), based on Tukey's test.

^{a-e}: Average values in the same row with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$), based on Tukey's test.

Viable counts of LAB strains in sodium alginate coatings during storage

The viable counts of *L. brevis* 59, *L. pentosus* 129 and *L. fermentum* 263 incorporated into the SA coatings were evaluated during 15 days of room temperature storage (Fig. 1). The initial viable counts (time zero) of all tested LAB strains in SA coatings were as high as >9.5 log CFU/g, being the highest viable counts found for *L. pentosus* 129 (10.40 ± 0.10 log CFU/mL). A sharp decrease in viable counts of *L. brevis* 59, *L. pentosus* 129 and *L. fermentum* 263 in SA coatings to close to 7 log CFU/g was found until day 6 of storage. A more linear decrease in viable counts for all LAB strains was found from day 6 of storage onward, being reached viable counts close to 6.2 log CFU/g on day 15 of storage.

Effects of sodium alginate coatings loaded with LAB on anthracnose lesion development and severity in guava and mango during storage

The effects of the coatings with SA + *L. brevis* 59, SA + *L. pentosus* 129 and SA + *L. fermentum* 263 or SA alone on the anthracnose lesion development in guava and mango artificially contaminated with distinct pathogenic *Colletotrichum* strains were evaluated during 15 days of room temperature storage (Table 3 and 4; Supplementary information, S2). Coatings with SA loaded with tested LAB strains were effective to reduce the anthracnose lesion development in guava and mango contaminated with either of the tested *Colletotrichum* strains during storage. However, the ALDR% values were variable among the different tested coating formulations and target *Colletotrichum* strains.

Coatings with SA + *L. brevis* 59, SA + *L. pentosus* 129 and SA + *L. fermentum* 263 caused ALDR% values in the range of 13.6 – 84.0% in guava contaminated with tested *Colletotrichum* strains during the measured storage period. The highest ALDR% values ($p < 0.05$) were found in most cases in guava contaminated with *C. asianum* CMM 4057 and

C. siamense CMM 4077 and coated with SA + *L. brevis* 59 and SA + *L. pentosus* 129 (ALDR%: 75.7 - 78.9% and 81.7 - 83.9 %, respectively). The highest ALDR% values ($p < 0.05$) in guava contaminated with *C. fructicola* CMM 4069 and *C. tropicale* CMM 4071 were caused by coatings with SA + *L. brevis* 59 and SA + *L. fermentum* 263 (ALDR%: 59.6 - 63.3% and 83.5 - 84.0%, respectively). The highest ALDR% values ($p < 0.05$) in guava contaminated with *C. karstii* CMM 4101 and *C. gloeosporioides* CMM 320 were caused by coatings with SA + *L. pentosus* 129 (ALDR%: 62.3 - 63.2% and 65.1 - 78.6%, respectively). Overall, the lowest ALDR% values ($p < 0.05$) were found in guava contaminated with *C. fructicola* CMM 4069 and *C. karstii* CMM 4101 (ALDR%: 13.6 - 21.3% and 15.1 - 18.4%, respectively), specially on day 6 of storage. Guava coated with SA loaded with LAB strains had ALDR% values in the range of 32.72 - 83.37% on day 15 of storage (Table 3).

Coatings with SA + *L. brevis* 59, SA + *L. pentosus* 129 and SA + *L. fermentum* 263 caused ALDR% values in the range of 17.6 – 85.7% in mango contaminated with tested *Colletotrichum* strains during the measured storage period. The highest ALDR% values ($p < 0.05$) in mango contaminated with *C. asianum* CMM 4057 and *C. siamense* CMM 4077 were caused in most cases by coatings with SA + *L. brevis* 59 and SA + *L. fermentum* 263 (ALDR%: 70.4 - 80.2% and 72.1 - 79.9%, respectively). The highest ALDR% values ($p < 0.05$) in mango contaminated with *C. fructicola* CMM 4069 and *C. gloeosporioides* CMM 320 were caused by coatings with SA + *L. brevis* 59 and SA + *L. pentosus* 129 (ALDR%: 72.7 - 75.1% and ALDR% 71.5 - 85.7%, respectively). The highest ADLR% values ($p < 0.05$) in mango contaminated with *C. tropicale* CMM 4071 were caused by coatings with SA + *L. fermentum* 263 (ALDR%: 81.1 - 83.1%), while in mango contaminated with *C. karstii* CMM 4101 were caused by coatings with SA + *L. brevis* 59 and SA + *L. fermentum* 263 (ALDR%: 62.7 - 64.0%), especially on day 15 of storage. The

lowest ALDR% values ($p < 0.05$) were found overall in mango contaminated with *C. karstii* CMM 4101 and coated with SA + *L. pentosus* 129 (ALDR%: 17.6 – 41.8%). Mango coated with SA loaded with tested LAB strains had ALDR% values in the range of 41.8 - 85.7% on day 15 of storage (Table 4).

Coatings with SA alone caused lower ALDR% values ($p < 0.05$) in guava and mango when compared to coatings with SA loaded with tested LAB strains regardless of the inoculated *Colletotrichum* strain and measured storage time period. Results from analysis of the area below the disease progress curve showed that coatings with SA + *L. brevis* 59 led overall to the lowest disease severity indexes (measured by injured fruit area; $p < 0.05$) in guava and mango. The exceptions were guava contaminated with *C. karstii* CMM 4101 and mango contaminated with *C. asianum* CMM 4057 and *C. tropicale* CMM 4071, where the lowest disease severity indexes ($p < 0.05$) were caused by coatings with SA + *L. pentosus* 129 and SA + *L. fermentum* 263, respectively. Fruit coated with SA alone or uncoated had the highest disease severity indexes ($p < 0.05$) (Fig. 2 and 3).

Table 3. Percentage (average $\pm$ standard deviation) of anthracnose lesion diameter reduction in guava cv. Paluma coated with sodium alginate (SA) or loaded with potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains and inoculated with distinct pathogenic *Colletotrichum* species during 15 days of room temperature storage (25 ± 0.5 °C).

<i>Colletotrichum</i> strains	Coatings	Day of storage			
		6	9	12	15
<i>C. asianum</i> CMM 4057	SA + <i>L. brevis</i> 59	21.8 (± 0.9) ^{Ac}	75.7 (± 1.5) ^{Aa}	78.9 (± 1.1) ^{Aa}	64.2 (± 2.8) ^{Bb}
	SA + <i>L. pentosus</i> 129	14.4 (± 1.8) ^{Bc}	69.0 (± 1.5) ^{Bb}	75.9 (± 1.6) ^{Aa}	68.6 (± 1.3) ^{Ab}
	SA + <i>L. fermentum</i> 263	21.3 (± 1.6) ^{Ad}	65.08 (± 1.1) ^{Cb}	71.2 (± 1.0) ^{Ba}	57.5 (± 2.1) ^{Cc}
	SA	5.4 (± 1.6) ^{Cc}	48.2 (± 1.8) ^{Da}	48.6 (± 0.6) ^{Ca}	29.9 (± 0.7) ^{Db}
<i>C. fruticola</i> CMM 4069	SA + <i>L. brevis</i> 59	20.2 (± 1.8) ^{Ab}	63.3 (± 4.1) ^{Aa}	63.0 (± 3.4) ^{Aa}	59.6 (± 1.3) ^{Aa}
	SA + <i>L. pentosus</i> 129	13.6 (± 1.4) ^{Bc}	50.7 (± 0.7) ^{Bb}	56.2 (± 1.2) ^{Ba}	58.9 (± 1.9) ^{Aa}
	SA + <i>L. fermentum</i> 263	21.3 (± 1.6) ^{Ac}	53.1 (± 1.8) ^{Bb}	60.8 (± 0.9) ^{Aa}	60.6 (± 0.6) ^{Aa}
	SA	3.8 (± 1.6) ^{Cc}	30.2 (± 1.8) ^{Ca}	18.2 (± 1.8) ^{Cb}	21.3 (± 1.3) ^{Bb}
<i>C. tropicale</i> CMM 4071	SA + <i>L. brevis</i> 59	84.0 (± 1.2) ^{Aa}	83.5 (± 3.9) ^{Aa}	80.1 (± 1.5) ^{Ab}	78.5 (± 0.7) ^{Ab}
	SA + <i>L. pentosus</i> 129	77.8 (± 1.0) ^{BCb}	79.3 (± 0.5) ^{Bab}	78.5 (± 0.6) ^{Aab}	79.8 (± 0.8) ^{Aa}
	SA + <i>L. fermentum</i> 263	79.6 (± 1.0) ^{Bb}	83.8 (± 1.1) ^{Aa}	78.3 (± 0.8) ^{Ab}	79.2 (± 1.3) ^{Ab}
	SA	74.7 (± 2.0) ^{Ca}	67.9 (± 1.2) ^{Cb}	65.2 (± 1.6) ^{Bb}	68.0 (± 0.5) ^{Bb}
<i>C. siamense</i> CMM 4077	SA + <i>L. brevis</i> 59	71.7 (± 2.5) ^{Ab}	83.9 (± 0.8) ^{Aa}	81.7 (± 1.5) ^{Aa}	83.4 (± 1.2) ^{Aa}
	SA + <i>L. pentosus</i> 129	72.9 (± 1.3) ^{Ab}	81.8 (± 1.2) ^{Aa}	82.6 (± 0.4) ^{Aa}	82.7 (± 0.6) ^{Aa}
	SA + <i>L. fermentum</i> 263	68.0 (± 1.1) ^{Bc}	74.6 (± 0.8) ^{Bb}	75.5 (± 0.7) ^{Bb}	79.2 (± 1.8) ^{Ba}
	SA	72.9 (± 1.5) ^{Aa}	71.4 (± 2.1) ^{Ca}	65.5 (± 0.7) ^{Cb}	57.3 (± 1.8) ^{Cc}
<i>C. karstii</i> CMM 4101	SA + <i>L. brevis</i> 59	17.8 (± 2.5) ^{Ac}	54.8 (± 1.0) ^{Aa}	33.4 (± 2.3) ^{Cb}	32.7 (± 1.5) ^{Bb}
	SA + <i>L. pentosus</i> 129	18.4 (± 1.6) ^{Ac}	54.8 (± 1.0) ^{Ab}	62.3 (± 1.8) ^{Aa}	63.2 (± 1.1) ^{Aa}
	SA + <i>L. fermentum</i> 263	15.1 (± 1.6) ^{Ad}	42.6 (± 1.3) ^{Bc}	48.9 (± 1.6) ^{Bb}	59.7 (± 1.3) ^{Aa}
	SA	3.6 (± 1.6) ^{Bd}	39.0 (± 2.1) ^{Ba}	17.1 (± 1.6) ^{Dc}	25.7 (± 2.1) ^{Cb}
<i>C. gloeosporioides</i> CMM 320	SA + <i>L. brevis</i> 59	Nd	66.1 (± 1.2) ^{Aa}	61.3 (± 1.8) ^{Bb}	69.4 (± 2.2) ^{Ba}
	SA + <i>L. pentosus</i> 129	Nd	65.3 (± 1.6) ^{Ab}	65.1 (± 0.7) ^{Ab}	78.6 (± 0.4) ^{Aa}
	SA + <i>L. fermentum</i> 263	Nd	59.5 (± 2.1) ^{Ba}	46.2 (± 0.7) ^{Cb}	60.6 (± 2.2) ^{Ca}
	SA	Nd	55.9 (± 2.0) ^{Ca}	36.6 (± 1.8) ^{Db}	37.8 (± 2.3) ^{Db}

Results are expressed as percentage reduction rates of anthracnose lesion diameter in coated guava compared with the uncoated fruit. Nd: Not determined. The first visible signs of anthracnose lesions arose from day 6 of storage onward in coated and uncoated guava contaminated with *C. gloeosporioides* CMM 320.

^{A-D}: Average values in a same column, for a same *Colletotrichum* strain, with different uppercase letters are significantly different ($p < 0.05$), based on Tukey's test.

^{a-d}: Average values in a same row with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$), based on Tukey's test.

Table 4. Percentage (average $\pm$ standard deviation) of anthracnose lesion diameter in mango cv. Palmer coated with sodium alginate (SA) alone or loaded with potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains and inoculated with distinct pathogenic *Colletotrichum* species during 15 days of room temperature storage (25 ± 0.5 °C).

<i>Colletotrichum</i> strains	Coatings	Day of storage			
		6	9	12	15
<i>C. asianum</i> CMM 4057	SA + <i>L. brevis</i> 59	66.3 (± 1.6) ^{Ab}	71.5 (± 2.1) ^{Aa}	62.6 (± 1.5) ^{Cb}	68.5 (± 1.3) ^{Bab}
	SA + <i>L. pentosus</i> 129	69.5 (± 1.4) ^{Aa}	65.6 (± 1.4) ^{Bb}	69.5 (± 0.5) ^{Ba}	71.6 (± 1.7) ^{Ba}
	SA + <i>L. fermentum</i> 263	62.7 (± 1.2) ^{Bc}	70.4 (± 1.8) ^{ABb}	79.1 (± 1.5) ^{Aa}	80.2 (± 1.2) ^{Aa}
	SA	62.3 (± 2.2) ^{Bb}	67.0 (± 1.4) ^{Ba}	61.9 (± 1.5) ^{Cb}	61.7 (± 1.7) ^{Cb}
<i>C. fructicola</i> CMM 4069	SA + <i>L. brevis</i> 59	50.1 (± 1.9) ^{Ad}	64.0 (± 1.2) ^{Ac}	75.1 (± 1.4) ^{Aa}	69.9 (± 1.4) ^{Ab}
	SA + <i>L. pentosus</i> 129	46.3 (± 1.9) ^{Bc}	59.7 (± 1.5) ^{Bb}	74.9 (± 1.2) ^{Aa}	72.7 (± 1.5) ^{Aa}
	SA + <i>L. fermentum</i> 263	35.2 (± 1.9) ^{Cc}	60.6 (± 1.0) ^{Bb}	67.8 (± 1.5) ^{Ba}	65.7 (± 1.6) ^{Ba}
	SA	35.9 (± 1.2) ^{Cc}	41.7 (± 2.3) ^{Cb}	51.7 (± 1.1) ^{Ca}	36.6 (± 2.1) ^{Cc}
<i>C. tropicale</i> CMM 4071	SA + <i>L. brevis</i> 59	50.4 (± 2.3) ^{Ac}	64.6 (± 2.2) ^{ABb}	72.5 (± 2.0) ^{Ba}	71.7 (± 1.8) ^{Ba}
	SA + <i>L. pentosus</i> 129	45.7 (± 2.1) ^{Bc}	63.2 (± 2.1) ^{Bb}	71.7 (± 1.3) ^{Ba}	68.8 (± 0.5) ^{Ba}
	SA + <i>L. fermentum</i> 263	48.8 (± 1.8) ^{ABc}	67.0 (± 1.5) ^{Ab}	81.3 (± 0.9) ^{Aa}	81.1 (± 0.4) ^{Aa}
	SA	45.7 (± 2.1) ^{Bc}	63.3 (± 2.1) ^{ABb}	69.1 (± 1.3) ^{Ba}	43.9 (± 1.8) ^{Cc}
<i>C. siamense</i> CMM 4077	SA + <i>L. brevis</i> 59	66.6 (± 1.9) ^{Ab}	79.9 (± 1.6) ^{Aa}	76.2 (± 1.3) ^{Aa}	67.0 (± 2.2) ^{Bb}
	SA + <i>L. pentosus</i> 129	52.6 (± 1.6) ^{Bb}	68.0 (± 2.4) ^{Ca}	69.9 (± 1.3) ^{Ba}	70.1 (± 0.7) ^{ABa}
	SA + <i>L. fermentum</i> 263	48.0 (± 1.0) ^{Cb}	73.0 (± 2.0) ^{Ba}	72.1 (± 0.9) ^{Ba}	72.3 (± 2.0) ^{Aa}
	SA	42.9 (± 1.6) ^{Dc}	67.5 (± 1.6) ^{Ca}	63.8 (± 2.0) ^{Cab}	61.8 (± 2.1) ^{Cb}
<i>C. karstii</i> CMM 4101	SA + <i>L. brevis</i> 59	38.8 (± 1.6) ^{Ac}	50.1 (± 2.1) ^{Ab}	51.2 (± 2.5) ^{Ab}	62.7 (± 3.0) ^{Aa}
	SA + <i>L. pentosus</i> 129	25.7 (± 2.1) ^{Bb}	17.6 (± 2.2) ^{Cc}	20.4 (± 2.2) ^{Dbc}	41.8 (± 2.0) ^{Ba}
	SA + <i>L. fermentum</i> 263	25.0 (± 1.6) ^{Bc}	29.1 (± 2.2) ^{Bc}	45.7 (± 3.3) ^{Bb}	64.0 (± 3.0) ^{Aa}
	SA	16.8 (± 2.2) ^{Cb}	29.9 (± 1.6) ^{Ba}	33.6 (± 1.5) ^{Ca}	30.0 (± 2.0) ^{Ca}
<i>C. gloeosporioides</i> CMM 320	SA + <i>L. brevis</i> 59	32.2 (± 1.4) ^{Ad}	41.9 (± 1.1) ^{Ac}	67.2 (± 1.0) ^{Bb}	85.7 (± 0.7) ^{Aa}
	SA + <i>L. pentosus</i> 129	32.1 (± 1.3) ^{Ad}	37.6 (± 2.4) ^{Bc}	71.5 (± 1.3) ^{Ab}	85.1 (± 1.1) ^{Aa}
	SA + <i>L. fermentum</i> 263	24.9 (± 2.1) ^{Bd}	30.4 (± 3.0) ^{Cc}	66.6 (± 1.3) ^{Bb}	84.6 (± 0.6) ^{Aa}
	SA	12.2 (± 2.1) ^{Cd}	15.4 (± 1.1) ^{Dc}	25.9 (± 2.0) ^{Cb}	35.1 (± 1.1) ^{Ba}

Results are expressed as percentage reduction rates of anthracnose lesion diameter in coated mango compared with uncoated mango.

^{A-D}: Average values in a same column, for a same *Colletotrichum* strain, with different uppercase letters are significantly different ($p < 0.05$), based on Tukey's test.

^{a-d}: Average values in the same row with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$), based on Tukey's test.

Effects of sodium alginate coatings with LAB strains on physicochemical parameters of guava and mango during storage

The effects of coatings with SA + *L. brevis* 59, SA + *L. pentosus* 129, SA + *L. fermentum* 263 or SA alone on physicochemical parameters of guava and mango during 15 days of room temperature storage are shown in supplementary information (S3 and S4). Guava and mango uncoated (negative control) and coated with SA + *L. brevis* 59, SA + *L. pentosus* 129, SA + *L. fermentum* 263 or SA alone had overall an increase in TSS contents during storage ($p < 0.05$). TSS contents were lower in coated fruit when compared to uncoated fruit ($p < 0.05$).

The TA values decreased from day 9 or 12 of storage onward in uncoated and coated guava and mango ($p < 0.05$). TA values were higher in guava and mango coated with SA + *L. brevis* 59, SA + *L. pentosus* 129 and SA + *L. fermentum* 263 when compared to uncoated fruit ($p < 0.05$). No difference in TA values of guava uncoated and coated with SA alone was found on day 15 of storage ($p \geq 0.05$). Guava coated with SA + *L. brevis* 59, SA + *L. pentosus* 129, SA + *L. fermentum* 263 or with SA alone had lower pH values when compared to uncoated guava on day 15 of storage ($p < 0.05$). However, mango coated with SA + *L. brevis* 59, SA + *L. pentosus* 129, SA + *L. fermentum* 263 or SA alone had lower pH values than uncoated mango from day 6 of storage onward ($p < 0.05$). Guava and mango coated with SA + *L. brevis* 59, SA + *L. pentosus* 129, SA + *L. fermentum* 263 or SA alone had higher ascorbic acid contents than uncoated fruit on day 12 and 15 of storage, being the highest contents found for fruit coated with SA loaded with LAB strains ($p < 0.05$).

Guava and mango coated with SA + *L. brevis* 59, SA + *L. pentosus* 129, SA + *L. fermentum* 263 or SA alone had overall lower weight loss during storage than uncoated

fruit ($p < 0.05$). However, guava coated with SA loaded with LAB strains had lower weight loss than fruit coated with SA alone from day 6 of storage onward ($p < 0.05$).

Discussion

The selection of antagonistic bacteria using *in vitro* methods has been considered more convenient and quick to test their inhibitory properties against target microorganisms of interest; however, the combination of *in vitro* and *in situ* methods could be a more accurate approach to select bacteria with promising antagonistic activity to be exploited in biocontrol strategies against pathogenic fungi in fruit [40,41]. The use of this combined approach enabled to verify the inhibitory effects of eight different potentially probiotic fruit-derived LAB strains against six distinct pathogenic *Colletotrichum* species through multiple *in vitro* tests and further application of selected LAB strains when embedded into SA coatings on guava and mango.

The major function of LAB exploited in food preservation strategies has been linked to their inhibitory effects against pathogenic microorganisms [19]. The environment pH reduction caused by the production of organic acids (e.g., lactic, citric, acetic, fumaric, malic acid and phenyllactic acid) and production of different antimicrobial molecules (e.g., hydrogen peroxide, CO₂, diacetyl, ethanol, reuterin, acetaldehyde, acetoin and ammonia) are the main factors causing the inhibition of pathogenic microorganisms contaminating fruit by LAB [26,42]. An early study evaluating the antifungal capacity of *L. plantarum*, *L. pentosus* and *L. brevis* reported the heat resistance (pasteurization and autoclaving) and activity in a wide pH range (3.8 – 7.0) of the produced antifungal compounds [43]. Another important mechanism of the LAB antagonism should be the production of antimicrobial peptides and bacteriocins, which have been found to be produced by *L. plantarum* and *L. brevis* [44,45]. The competition for nutrients among antagonistic LAB

and target microorganisms co-existing in the same environment could be an additional factor to control pathogens in fruit [42].

L. plantarum has been the LAB species most commonly reported as having inhibitory effects against fungal pathogens [16,23,34,46]. However, in this study, strains of different LAB species, including *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. paracasei*, *L. pentosus* and *L. fermentum*, had strong inhibitory effects on the mycelial growth of distinct *Colletotrichum* species pathogenic for fruit. Only a previous study has reported the capability of *L. plantarum*, *L. paracasei* and *L. pentosus* of inhibiting *C. gloeosporioides* *in vitro* [45].

Three strains, namely *L. brevis* 59, *L. pentosus* 129 and *L. fermentum* 263, had outstanding inhibitory effects toward the target *Colletotrichum* strains, being selected for loading SA coatings. In addition to the antagonistic effects, another important aspect regarding the incorporation of antagonistic LAB into polymeric coatings applied to preserve fruit should be their capability of keeping high viable counts in these materials during storage. This is an important technological feature since the concentration of the inoculated cells and their survival over time should affect directly the inhibitory effects achieved against target microorganisms [26,47].

L. brevis 59, *L. pentosus* 129 and *L. fermentum* 263 had viable counts of >6 log CFU/mL in SA coatings at the end of the 15 days of storage, indicating these coatings as suitable vehicles providing a stable environment for the survival of the loaded LAB strains. Early studies have reported that SA coatings could contribute to cell stability of LAB [17,47,48], causing a superior protection to these bacteria when compared to other materials applied to coat fruit [34]. The decrease in viable counts (3.5 – 4.2 log CFU/mL) of *L. brevis* 59, *L. pentosus* 129 and *L. fermentum* 263 in SA coatings found in the earlier days of storage could be caused by partial dehydration of formulated coatings over time [17,20]. The application of carboxymethyl cellulose loaded with *L. plantarum* reduced the

mould and yeast counts on strawberries during storage and these reductions correlated inversely with the dose of *L. plantarum* cells into the coatings [16].

The application of SA coatings loaded with *L. brevis* 59, *L. pentosus* 129 and *L. fermentum* 263 were effective to delay the development and decrease the severity of anthracnose in guava and mango during 15 days of room temperature storage. LAB loaded into edible coatings can protect fruit from fungal infection through direct competition and antagonistic interaction due to the production of compounds capable of inhibiting fungi contaminating fruit surface, delaying fruit decay and rot [26]. Production of organic acids might cause acidification of fruit surface and affect negatively the growth of pathogenic fungi [10]. An early study reported that potato starch and sodium caseinate coatings loaded with *L. plantarum* reduced the incidence and severity of *Botrytis cinerea* infection in grapes [49].

Increased production of antimicrobial substances by LAB incorporated into polymeric matrices could be also associated with the inhibition of pathogenic fungi on fruit surface [50,51]. SA coatings loaded with *L. brevis* 59 caused overall the highest inhibition of anthracnose severity evolution in guava and mango, which may be related to a superior capability of *L. brevis* of producing antifungal molecules with disturbing effects on cell wall and cell membranes of fungi [27,52], affecting the capability of postharvest pathogenic fungi of causing infection in fruit tissues.

In addition to reduce the anthracnose development and severity in mango and guava, the application of SA coatings loaded with *L. brevis* 59, *L. pentosus* 129 and *L. fermentum* 263 had positive effects on some of the measured physicochemical parameters related to ripening and postharvest quality of these fruit during 15 days of room temperature storage. As climacteric fruit, guava and mango increase the TSS contents and pH during ripening/storage, besides of increasing TA [53]. The lower TSS contents found

in guava and mango coated with SA loaded with tested LAB strains indicate a delayed fruit ripening probably due to the decreased activity of enzymes responsible for hydrolysis of starch to soluble sugars [28]. TA was lower and pH was higher in guava and mango coated with SA loaded with tested LAB strains during storage. These results are in agreement with findings of early studies evaluating the effects of coatings with gelatin or carboxymethyl cellulose loaded with *L. rhamnosus* on physicochemical parameters of strawberries during storage [16,18]. Reduced TA and increased pH in coated guava and mango could be related to decreased use of organic acids as substrates in respiratory metabolism as a consequence of delayed fruit ripening [54].

Coatings with SA loaded with tested LAB strains caused increased retention of ascorbic acid in guava and mango during storage. This result could be linked to the capability of formulated coatings of reducing oxygen diffusion and slowing respiration rate in fruit [26], since oxidation is the major cause of postharvest ascorbic acid reduction in fruit [1]. Increased ascorbic acid retention during storage was also found in strawberries coated with gelatin loaded with *L. plantarum* [16]. Coatings with SA and tested LAB strains caused decreased weight loss in guava and mango over time, indicating the action of these coatings as barriers to moisture losses delaying the fruit dehydration [10,16]. No early investigation was found in available literature concerning the application of edible coatings loaded with potentially probiotic LAB strains to guava and mango, making difficult a deeper comparative discussion of the results found in this study.

In conclusion, the eight examined fruit-derived potentially probiotic LAB strains were inhibitory to distinct pathogenic *Colletotrichum* species identified as causative agents of anthracnose in fruit. Application of SA coatings loaded with *L. brevis* 59, *L. pentosus* 129 and *L. fermentum* 263 controlled the development and reduced the severity of anthracnose in guava and mango artificially contaminated with distinct pathogenic

Colletotrichum species during 15 days of room temperature storage. SA coating loaded with *L. brevis* 59 was the most effective to reduce the anthracnose severity evolution in guava and mango. Furthermore, SA coatings loaded with either of the selected LAB strains impacted positively on some quality parameters indicative of overall postharvest quality and more prolonged storability of these fruit. The formulated SA coatings loaded with *L. brevis* 59, *L. pentosus* 129 and *L. fermentum* 263 could be innovative and effective biocontrol strategies to protect guava and mango from postharvest diseases, especially anthracnose, and to extend the storability of these fruit.

Acknowledgments

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) for partial funding of this research (Finance code 001), as well as for the scholarships awarded to K.F.D.F. (M.Sc. scholarship) and K.A.R. de Oliveira (Post-doctoral scholarship).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contribution

Conceptualization: KFDF, KARO, ELS. Data curation: KFDF, KARO; Formal analysis: KFDF, KARO, ELS; Funding acquisition: ELS; Investigation: KFDF, KARO, ELS; Methodology: KFDF, KARO, ELS; Project administration: ELS; Supervision: KARO, ELS; Validation: KFDF, KARO.; Writing – original draft: KFDF, KARO, ELS; Writing – review & editing: KARO, ELS.

Data availability

All data are available in the present manuscript.

References

1. Anjum MA, Akram H, Zaidi M, Ali S (2020) Effect of gum Arabic and *Aloe vera* gel based edible coatings in combination with plant extracts on postharvest quality and storability of ‘Gola’ guava fruits. *Sci Hortic* 272:109506. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109506>
2. Zafar TA, Sidhu JS (2017) Composition and nutritional properties of mangoes. In J. K. B. and J. S. S. Muhammad Siddiq (Ed.), *Handbook of Mango Fruit: Production, Postharvest Science, Processing Technology and Nutrition* (1st ed., pp. 217–236). Oxford: John Wiley & Sons Ltd.
3. Nair MS, Saxena A, Kaur C (2018) Effect of chitosan and alginate based coatings enriched with pomegranate peel extract to extend the postharvest quality of guava (*Psidium guajava* L.). *Food Chem* 240:245-252. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.122>
4. Oliveira PDL, de Oliveira KÁR, Vieira WAS, Câmara MPS, de Souza EL (2018a) Control of anthracnose caused by *Colletotrichum* species in guava, mango and papaya using synergistic combinations of chitosan and *Cymbopogon citratus* (D.C. ex Nees) Stapf. essential oil. *Int J Food Microbiol* 266:87-94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.018>
5. de Oliveira KÁR, Berger LRR, Araújo AS, Câmara MPS, de Souza EL (2017) Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. *Food Microbiol* 66:96-103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.012>
6. Lima NBA, Batista MV, de Moraes MA, Barbosa MAG, Michereff SJ, Hyde KD, Câmara, MPS (2013). Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Divers* 61:75-88. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0237-6>
7. Lima NB, Lima WG, Tovar-Pedraza JM, Michereff SJ (2015) Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in northeastern Brazil. *Eur J Plant Pathol* 141: 679-688. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0570-y>

8. Braga SP, Lundgren GA, Macedo SA, Tavares JF, Vieira WAS, Câmara MPS, Souza EL (2019) Application of coatings formed by chitosan and *Mentha essential* oils to control anthracnose caused by *Colletotrichum gloesporioides* and *C. brevisporum* in papaya (*Carica papaya* L.) fruit. *Int J Biol Macromol* 139:631-639.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.010>
9. de Oliveira LIG, de Oliveira KÁR, Medeiros ESM, Batista AUD, Madruga MS, Lima MS, de Souza EL, Magna Marín A, Plotto A, Atarés L, Chiralt A (2019) Lactic acid bacteria incorporated into edible coatings to control fungal growth and maintain postharvest quality of grapes. *Hortscience* 52:337-342.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI13661-18>
10. de Oliveira, LIG, de Oliveira KÁR, Medeiros ESM, Batista AUD, Madruga MS, Lima MS, de Souza EL, Magnani M (2020) Characterization and efficacy of a composite coating containing chitosan and lemongrass essential oil on postharvest quality of guava. *Innov. Food Sci Emerg Technol* 66:102506.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102506>
11. Marín A, Atarés L, Chiralt A (2017) Improving function of biocontrol agents incorporated in antifungal fruit coatings: a review. *Biocontrol Sci Technol* 27:1220-1241. <https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1390068>
12. Albuquerque TMR, Garcia EF, Araújo AO, Magnani M, Saarela M, Souza EL (2018) *In vitro* characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. *Probiotics Antimicrob Proteins* 10:704-716.
<https://doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>
13. Garcia EF, Luciano WA, Xavier DE, da Costa WCA, Oliveira KS, Franco OL, de Moraes Júnior MA, Lucena BTL, Picão RC, Magnani M, Saarela M, de Souza EL (2016) Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing by products and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. *Front Microbiol* 7:1-11.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01371>
14. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, O'Toole PW, Pot B, Vandamme P, Walter J, Watanabe K, Wuyts S, Felis GE, Gänzle MG, Lebeer S (2020) A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 70:2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

15. Bambace MF, Alvarez MV, Moreira MR (2019) Novel functional blueberries: Fructo-oligosaccharides and probiotic lactobacilli incorporated into alginate edible coatings. *Food Res Int* 122:253-266. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.040>
16. Khodaei D, Hamidi-Esfahani Z (2019) Influence of bioactive edible coatings loaded with *Lactobacillus plantarum* on physicochemical properties of fresh strawberries. *Postharvest Biol Technol* 156:110944. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.110944>
17. Shigematsu E, Dorta C, Rodrigues FJ, Cedran MF, Giannoni JA, Oshiiwa M, Mauro MA (2018) Edible coating with probiotic as a quality factor for minimally processed carrots. *J Food Sci Technol* 55:3712–3720. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3301-0>
18. Temiz NN, Özdemir KS (2020) Microbiological and physicochemical quality of strawberries (*Fragaria × ananassa*) coated with *Lactobacillus rhamnosus* and inulin enriched gelatin films. *Postharvest Biol Technol* 173:111433. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111433>
19. Agriopoulou S, Stamatelopoulou E, Sachadyn-Król M, Varzakas T (2020) Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables: quality and safety aspects. *Microorganisms* 8:952. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060952>
20. Dianin I, Oliveira Junior A, Pimentel T, Hernandez N, Costa G (2019) Edible biofilms formulated with whey protein isolate and *L. casei* probiotic culture: characterization and application in tomatoes and grapes. *Chem Eng Sci* 75:469-474. <https://doi.org/10.3303/CET1975079>
21. Barragán-Menéndez C, Gálvez-López D, Rosas-Quijano R, Salvador-Figueroa M, Ovando-Medina I, Vázquez-Ovando A (2020) Films of chitosan and *Aloe vera* for maintaining the viability and antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* TEP6. *Coatings* 10:259. <https://doi.org/10.3390/coatings10030259>
22. Lv X, Ma H, Lin Y, Bai F, Ge Y, Zhang Y, Li J (2018) Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* C10 against *Trichothecium roseum* and its application in promotion of defense responses in muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit. *J Food Sci Technol* 55:3703-3711. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3300-1>
23. Russo P, Arena MP, Fiocco D, Capozzi V, Drider D, Spano G (2017) *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and

- shelf-life of cereal-based products. *Int J Food Microbiol* 247:48-54.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.027>
24. Grosso AL, Asensio CM, Grosso NR, Nepote V (2020) Increase of walnuts' shelf life using a walnut flour protein-based edible coating. *LWT - Food Sci Technol* 118:108712. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108712>
 25. Nicolau-Lapeña I, Aguiló-Aguayo I, Kramer B, Abadias M, Viñas I, Muranyi P (2021) Combination of ferulic acid with *Aloe vera* gel or alginate coatings for shelf-life prolongation of fresh-cut apples. *Food Packag Shelf Life* 27:100620. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100620>
 26. Hashemi SMB, Jafarpour D (2021) Bioactive edible film based on Konjac glucomannan and probiotic *Lactobacillus plantarum* strains: Physicochemical properties and shelf life of fresh-cut kiwis. *J Food Sci* 86:513-522. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15568>
 27. Li S, Ma Y, Ji T, Sameen DE, Ahmed S, Qin W, Dai J, Li S, Liu Y (2020) Cassava starch/carboxymethylcellulose edible films embedded with lactic acid bacteria to extend the shelf life of banana. *Carbohydr Polym* 248:116805. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116805>
 28. Sousa FF, Pinsetta Junior JS, Oliveira KTEF, Rodrigues ECN, Andrade JPA, Mattiuz B (2021) Conservation of 'Palmer' mango with an edible coating of hydroxypropyl methylcellulose and beeswax. *Food Chem* 346:128925. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128925>
 29. Vieira WAS, Nascimento RJ, Michereff SJ, Hyde KD, Câmara MPS (2013) First report of papaya fruit anthracnose caused by *Colletotrichum brevisporum* in Brazil. *Plant Dis* 97:1659. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0520-PDN>
 30. Afzali S, Dovom MRE, Najafi MBH, Tehrani MM (2020). Determination of the anti-yeast activity of *Lactobacillus* spp. isolated from traditional Iranian cheeses in vitro and in yogurt drink (Doogh). *Sci Rep* 10:1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63142-0>
 31. Husain A, Hassan Z, Huda-Faujan N, Lani MN (2017) Antifungal activity of Lactic Acid Bacteria isolated from soil rhizosphere on *Fusarium* species infected chilli seeds. *Am Sci Res J Eng Technol Sci* 29:182-202.
 32. Kharazian ZA, Jouzani GS, Aghdasi M, Khorvash M, Zamani M, Mohammadzadeh H (2017) Biocontrol potential of *Lactobacillus* strains isolated from corn silages against

- some plant pathogenic fungi. Biol Cont 110:33-43.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.04.004>
33. Canpolat E, Doğaner MM, Derviş S, Serçe ÇU (2018) Antifungal activity of some lactic acid bacteria against several soil-borne fungal pathogens isolated from strawberry plants. Turk J Agric Food Sci Technol 6:1163-1167.
<https://doi.org/10.24925/turjaf.v6i9.1163-1167.1975>
 34. Speranza B, Campaniello D, Bevilacqua A, Altieri C, Sinigaglia M, Corbo MR (2018) Viability of *Lactobacillus plantarum* on fresh-cut chitosan and alginate-coated apple and melon pieces. Front Microbiol 9:2538. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02538>
 35. Parreidt TS, Lindner M, Rothkopf I, Schmid M, Müller K (2019) The development of a uniform alginate-based coating for cantaloupe and strawberries and the characterization of water barrier properties. Foods 8:203.
<https://doi.org/10.3390/foods8060203>
 36. Soukoulis C, Behboudi-Jobbehdar S, Macnaughtan W, Parmenter C, Fisk D (2017) Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG incorporated in edible films: Impact of anionic biopolymers and whey protein concentrate. Food Hydrocoll 70:345-355.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.014>
 37. AOAC (2016) Official Methods of Analysis of AOAC International, 20th ed. AOAC 50 International, Gaithersburg, MD, USA.
 38. Oliveira VRL, Santos FKG, Leite RHL, Aroucha EMM, Silva KNO (2018b) Use of biopolymeric coating hydrophobized with beeswax in post-harvest conservation of guavas. Food Chem 259:55-64. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.101>
 39. Macedo SA, Lundgren GA, Braga SP, de Souza EL, Câmara MPS (2020) Combined chitosan and *Cymbopogon citratus* (D.C. Ex Nees) Stapf. essential oil to inhibit the fungal phytopathogen *Paramyothecium roridum* and control crater rot in melon (*Cucumis melo* L.). Braz J Microbiol 51:2057-2065. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00378-y>
 40. Melo JJM, Álvarez A, Ramirez C, Bolivar G (2021) Antagonistic activity of Lactic Acid Bacteria against phytopathogenic fungi isolated from cherry tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*). Curr Microbiol 78:1399-1408.
<https://doi.org/10.1007/s00284-021-02416-w>
 41. Shi J, Sun C (2017) Isolation, identification, and biocontrol of antagonistic bacterium against *Botrytis cinerea* after tomato harvest. Braz J Microbiol 48:706-714.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.03.002>

42. Guimarães A, Abrunhosa L, Pastrana LM, Cerqueira MA (2018) Edible films and coatings as carriers of living microorganisms: A new strategy towards biopreservation and healthier foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 17:594-614.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12345>
43. Abouloifa H, Gaamouche S, Rokni Y, Hasnaoui I, Bellaouchi R, Ghabbour N, Karboune S, Brasca M, D'Hallewin G, Salah RB, Saalaoui E, Asehraou A (2021) Antifungal activity of probiotic *Lactobacillus* strains isolated from natural fermented green olives and their application as food bio-preservative. *Biocontrol* 152:104450.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104450>
44. Linares-Morales JR, Gutiérrez-Méndez N, Rivera-Chavira BE, Pérez-Vega SB, Nevárez-Moorillón GV (2018) Biocontrol processes in fruits and fresh produce, the use of lactic acid bacteria as a sustainable option. *Front. Sustain. Food Syst.* 2:50.
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00050>
45. Barrios-Roblero C, Rosas-Quijano R, Salvador-Figueroa M, Gálvez-López D, Vázquez-Ovando A (2019) Antifungal lactic acid bacteria isolated from fermented beverages with activity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Food Biosci* 29:47-54.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.03.008>
46. Shahrapour D, Khomeiri M, Razavi SMA, Kashiri M (2020) Development and characterization of alginate/pectin edible films containing *Lactobacillus plantarum* KMC 45. *LWT - Food Sci Technol* 118:108758.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108758>
47. Campaniello D, Speranza B, Bevilacqua A, Altieri C, Corbo MR, Sinigaglia M (2020) Industrial validation of a promising functional strain of *Lactobacillus plantarum* to improve the quality of Italian sausages. *Microorganisms* 8:116.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8010116>
48. Tapia, M.S., Rojas-Graü, M.A., Rodríguez, F.J., Ramírez, J., Carmona, A., Martín-Belloso, O., 2007. Alginate-and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. *J Food Sci* 72:E190-E196. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00318.x>
49. Marín A, Plotto A, Atarés L, Chiralt A (2019) Lactic acid bacteria incorporated into edible coatings to control fungal growth and maintain postharvest quality of grapes. *HortScience* 54:337-343. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13661-18>

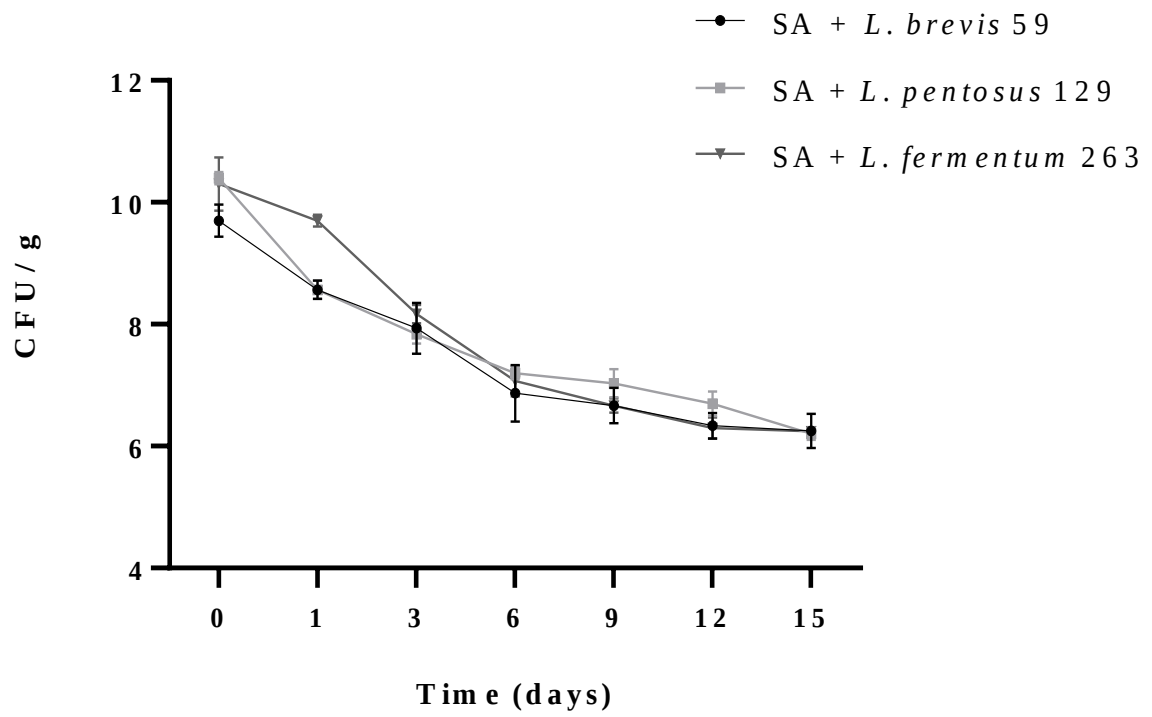
50. Sánchez-González, L., Saavedra, J.I.Q., Chiralt, A., 2013. Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. Food Hydrocoll 33, 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.011>
51. Sánchez-González L, Saavedra JIQ, Chiralt A (2014) Antilisterial and physical properties of biopolymer films containing lactic acid bacteria. Food Cont 35:200-206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.001>
52. Møller COA, Freire L, Rosim RE, Margalho LP, Balthazar CF, Franco LT, Sant'Ana AS, Corassin CH, Rattray FP, Oliveira CAF (2021) Effect of lactic acid bacteria strains on the growth and aflatoxin production potential of *Aspergillus parasiticus*, and their ability to bind aflatoxin B1, ochratoxin A, and zearalenone *in vitro*. Front Microbiol 12:655386. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.655386>
53. Parven A, Sarker MR, Megharaj M, Meftaul IM (2020) Prolonging the shelf life of Papaya (*Carica papaya* L.) using *Aloe vera* gel at ambient temperature. Sci Hortic 265:109228. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109228>
54. Batista-Silva W, Nascimento VL, Medeiros DB, Nunes-Nesi A, Ribeiro DM, Zsögön A, Araújo WL (2018) Modifications in organic acid profiles during fruit development and ripening: correlation or causation? Front Plant Sci 9:1689. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01689>

Figure captions

Fig. 1. Viable counts (CFU/g; average $\pm$ standard deviation) of potentially probiotic lactic acid bacteria strains loaded into sodium alginate (SA) coating during 15 days of room temperature storage (25 ± 0.5 °C). (●) *L. brevis* 59; (■) *L. pentosus* 129; and (▼) *L. fermentum* 263

Fig. 2. Severity index (%) of anthracnose lesion in guava cv. Paluma coated with sodium alginate (SA) alone or loaded with potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains and inoculated with different pathogenic *Colletotrichum* species after 15 days of room temperature storage (25 ± 0.5 °C). ^{a-e}: Average values followed by different letters for the same isolate are significantly different ($p < 0.05$), based on Tukey's test.

Fig. 3. Severity index (%) of anthracnose lesion in mango cv. Palmer coated with sodium alginate (SA) alone or loaded with potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains and inoculated with different pathogenic *Colletotrichum* species after 15 days of room temperature storage (25 ± 0.5 °C). ^{a-e}: Average values followed by different letters for the same isolate are significantly different ($p < 0.05$), based on Tukey's test.

**Fig. 1**

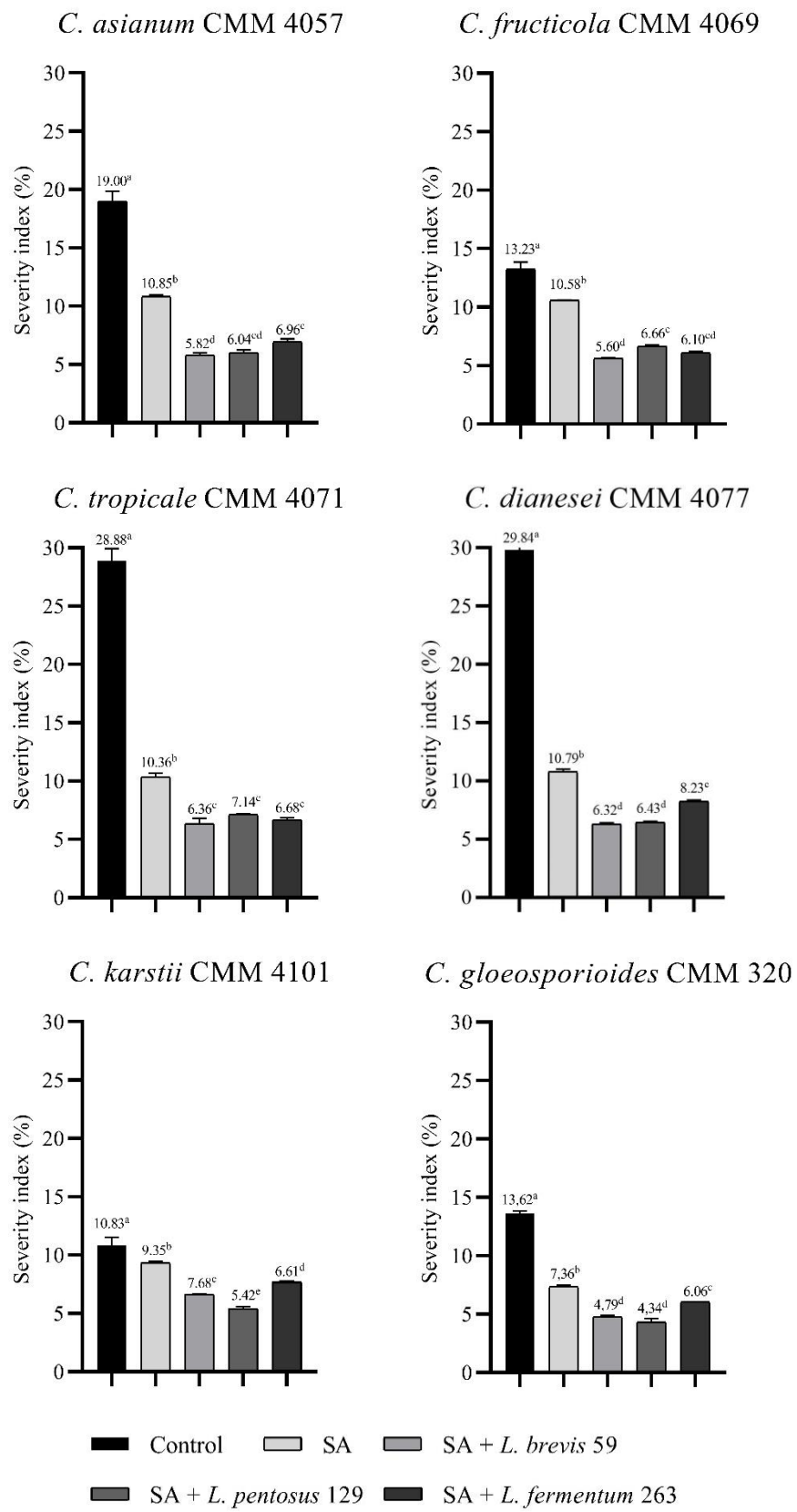


Fig. 2

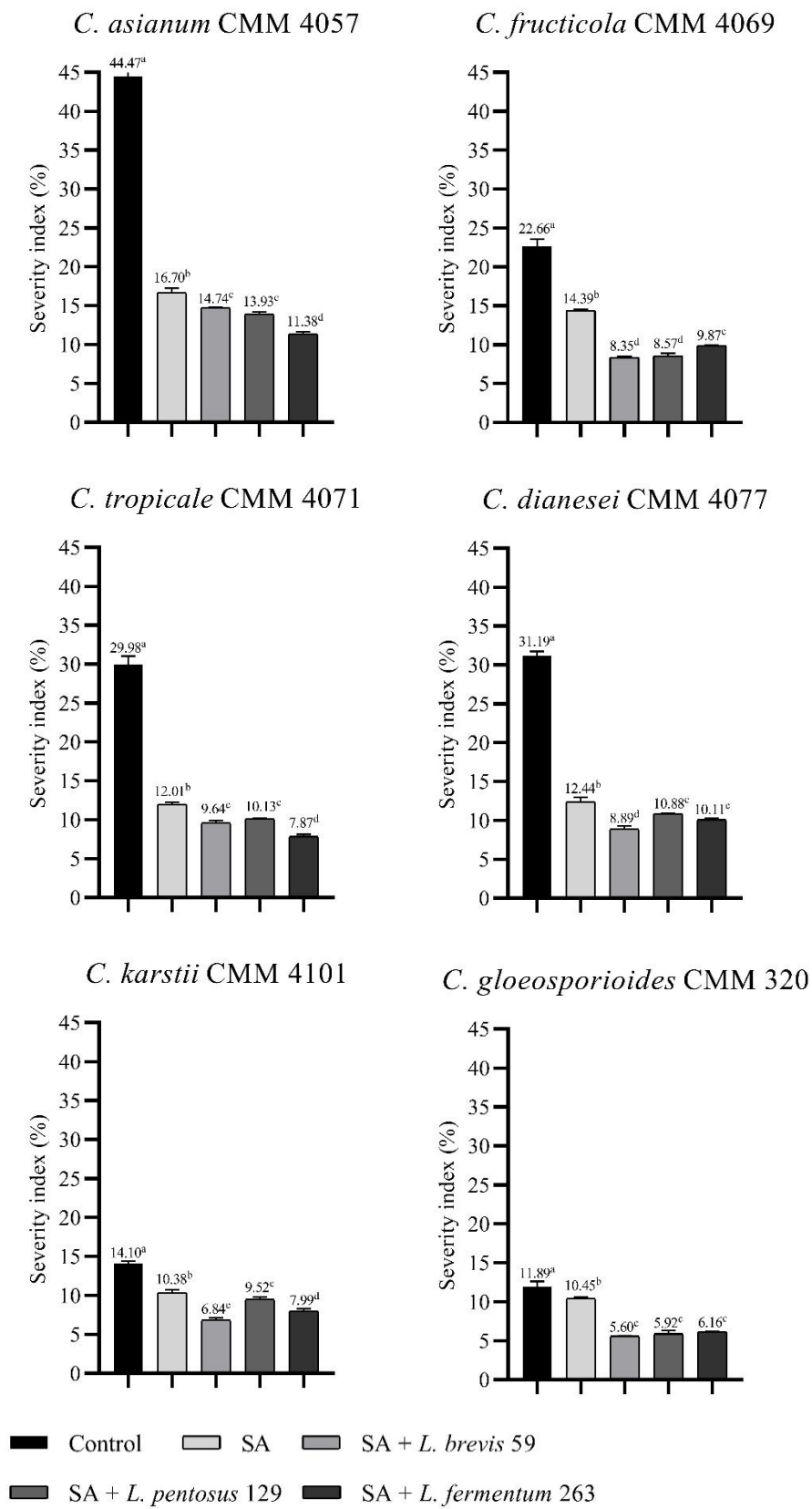
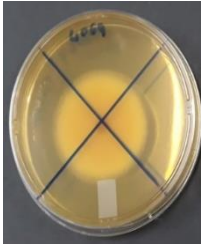
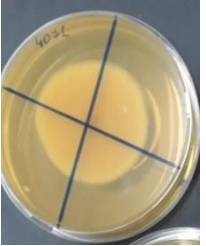
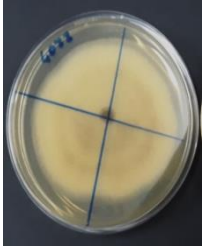
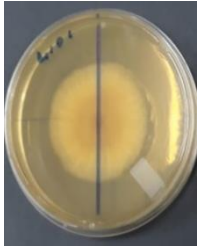
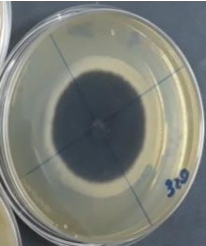
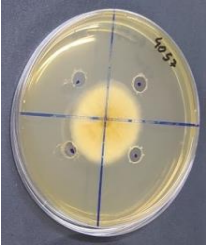
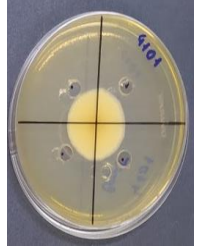
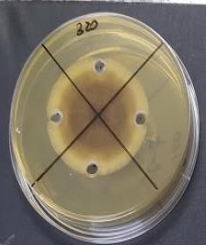
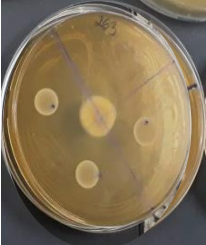
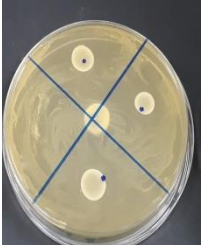
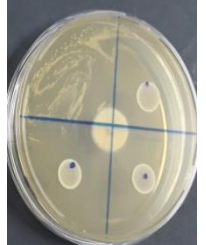
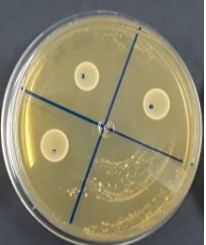
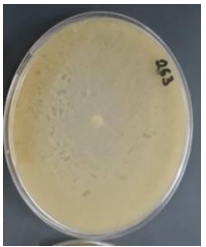
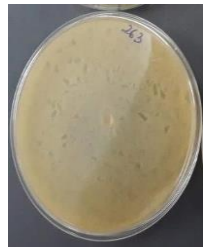
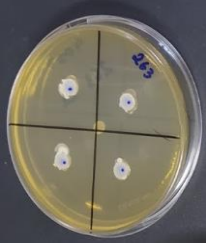
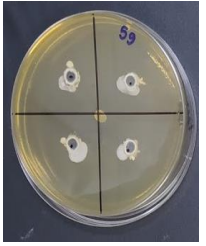
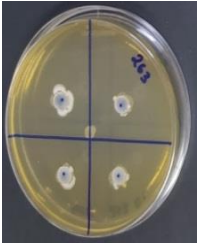
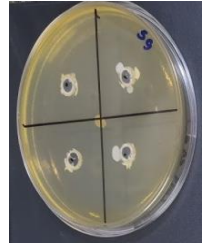
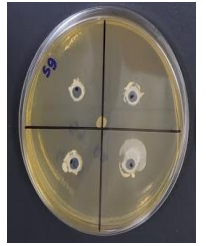
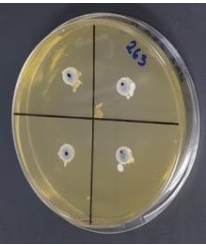
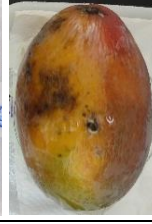
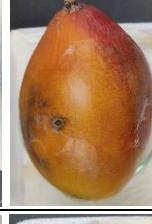


Fig. 3

S1. In vitro antifungal activity of potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains (*L. brevis* 59 or *L. fermentum* 263) against different *Colletotrichum* species after a 5-day incubation (25 ± 0.5 °C). Evaluation was done with different methods: **(A)** negative control - without adding LAB strain; **(B)** negative control - agar well diffusion method; **(C)** agar spot method; **(D)** dual-culture agar method; and **(E)** agar well-diffusion method.

Methods	<i>C. asianum</i> CMM 4057	<i>C. fructicola</i> CMM 4069	<i>C. tropicale</i> CMM 4071	<i>C. siamense</i> CMM 4077	<i>C. karstii</i> CMM 4101	<i>C. gloeosporiodes</i> CMM 320
A						
B						
C						
D						
E						

S2. Anthracnose lesion inhibition in guava cv. Paluma and mango cv. Palmer coated with sodium alginate (SA) alone or loaded with potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains and inoculated with different *Colletotrichum* species after 15 days of room temperature storage (25 ± 0.5 °C). (A) negative control - lesion severity (uncoated fruit) in guava cv. Paluma; (AA) guava cv. Paluma coated with SA + *L. brevis* 59; (AAA) guava cv. Paluma coated with SA + *L. pentosus* 129; (AAAA) guava cv. Paluma coated with SA + *L. fermentum* 263. (B) negative control - lesion severity (uncoated fruit) in mango cv. Palmer; (BB) mango cv. Palmer coated with SA + *L. brevis* 59; (BBB) mango cv. Palmer coated with SA + *L. pentosus* 129; (BBBB) mango cv. Palmer coated with SA + *L. fermentum* 263.

Fungi	Fruit							
	A	AA	AAA	AAAA	B	BB	BBB	BBBB
<i>C. asianum</i> CMM 4057								
<i>C. fructicola</i> CMM 4069								
<i>C. tropicale</i> CMM 4071								
<i>C. siamense</i> CMM 4077								
<i>C. karstii</i> CMM 4101								
<i>C. gloeosporioides</i> CMM 320								

S3. Physicochemical parameters (average $\pm$ standard deviation) of guava cv. Paluma uncoated (negative control) and coated with sodium alginate (SA) alone or loaded with potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains during 15 days of room temperature storage (25 ± 0.5 °C).

Parameters/Coatings	Days of storage				
	Zero	6	9	12	15
TSS* (° Brix)					
SA + <i>L. brevis</i> 59	10.40 (± 0.10) ^{Abc}	10.73 (± 0.15) ^{Abc}	10.90 (± 0.17) ^{Bb}	10.30 (± 0.20) ^{Dc}	11.96 (± 0.38) ^{Da}
SA + <i>L. pentosus</i> 129	10.43 (± 0.15) ^{Ac}	10.86 (± 0.25) ^{Ac}	12.16 (± 0.25) ^{Ab}	12.30 (± 0.10) ^{Bb}	13.20 (± 0.36) ^{Ca}
SA + <i>L. fermentum</i> 263	9.10 (± 0.20) ^{Bc}	10.36 (± 0.21) ^{Bab}	10.33 (± 0.23) ^{Cab}	10.86 (± 0.25) ^{Ca}	10.10 (± 0.27) ^{Eb}
SA	10.80 (± 0.53) ^{Ab}	10.93 (± 0.40) ^{Ab}	11.57 (± 0.29) ^{Bb}	11.30 (± 0.10) ^{Cb}	14.20 (± 0.10) ^{Ba}
Negative control	10.37 (± 0.47) ^{Ad}	11.33 (± 0.40) ^{Ac}	12.43 (± 0.32) ^{Ac}	14.20 (± 0.10) ^{Ab}	15.43 (± 0.67) ^{Aa}
TA** (g/100g)					
SA + <i>L. brevis</i> 59	0.68 (± 0.04) ^{Aa}	0.66 (± 0.04) ^{Aa}	0.63 (± 0.01) ^{Aab}	0.62 (± 0.05) ^{Aab}	0.51 (± 0.06) ^{Ab}
SA + <i>L. pentosus</i> 129	0.69 (± 0.02) ^{Aa}	0.68 (± 0.07) ^{Aa}	0.65 (± 0.02) ^{Aa}	0.60 (± 0.04) ^{ABa}	0.59 (± 0.07) ^{Aa}
SA + <i>L. fermentum</i> 263	0.70 (± 0.06) ^{Aa}	0.62 (± 0.04) ^{Aab}	0.60 (± 0.07) ^{Aab}	0.56 (± 0.04) ^{ABb}	0.53 (± 0.04) ^{Ab}
SA	0.66 (± 0.04) ^{Aa}	0.60 (± 0.07) ^{Aab}	0.58 (± 0.06) ^{Aab}	0.53 (± 0.04) ^{ABab}	0.45 (± 0.11) ^{Bb}
Negative control	0.66 (± 0.10) ^{Aa}	0.60 (± 0.04) ^{Aab}	0.58 (± 0.06) ^{Aab}	0.49 (± 0.04) ^{Bbc}	0.41 (± 0.04) ^{Bc}
pH					
SA + <i>L. brevis</i> 59	3.80 (± 0.02) ^{Bd}	3.87 (± 0.05) ^{Ac}	3.96 (± 0.08) ^{Abc}	4.03 (± 0.01) ^{Aab}	4.11 (± 0.02) ^{Ba}
SA + <i>L. pentosus</i> 129	3.80 (± 0.08) ^{Bb}	3.85 (± 0.03) ^{Ab}	3.86 (± 0.02) ^{Ab}	4.04 (± 0.03) ^{Aa}	4.12 (± 0.02) ^{Ba}
SA + <i>L. fermentum</i> 263	3.78 (± 0.06) ^{Bd}	3.87 (± 0.05) ^{Ac}	3.93 (± 0.03) ^{Abc}	4.00 (± 0.05) ^{Aab}	4.09 (± 0.01) ^{Ba}
SA	3.70 (± 0.03) ^{Bc}	3.84 (± 0.02) ^{Ab}	3.84 (± 0.04) ^{Ab}	3.99 (± 0.02) ^{Aa}	4.09 (± 0.09) ^{Ba}
Negative control	3.85 (± 0.04) ^{Ab}	3.93 (± 0.09) ^{Ab}	3.98 (± 0.10) ^{Ab}	3.98 (± 0.14) ^{Aab}	4.22 (± 0.02) ^{Aa}
Ascorbic acid (mg/100g)					
AC+ <i>L. brevis</i> 59	81.23 (± 1.40) ^{Aa}	74.63 (± 1.93) ^{Ab}	65.19 (± 1.15) ^{Ac}	61.10 (± 1.25) ^{Ac}	46.00 (± 2.35) ^{Bd}
AC + <i>L. pentosus</i> 129	80.36 (± 0.60) ^{Aa}	74.04 (± 1.43) ^{Ab}	66.16 (± 0.72) ^{Ac}	61.12 (± 1.02) ^{Ad}	46.37 (± 1.67) ^{Be}
AC + <i>L. fermentum</i> 263	81.13 (± 0.87) ^{Aa}	74.71 (± 1.66) ^{Ab}	68.37 (± 2.19) ^{Ac}	58.70 (± 0.78) ^{Ad}	49.73 (± 0.80) ^{Ae}
AC	80.10 (± 0.80) ^{Aa}	73.53 (± 2.28) ^{Ab}	68.43 (± 2.34) ^{Ab}	52.55 (± 1.92) ^{Bc}	40.07 (± 1.76) ^{Cd}
Negative control	80.43 (± 1.39) ^{Aa}	72.88 (± 1.98) ^{Ab}	65.37 (± 1.11) ^{Ac}	49.71 (± 0.63) ^{Bd}	36.20 (± 0.95) ^{De}
Weight loss (%)					
SA + <i>L. brevis</i> 59	Nd	7.64 (± 0.34) ^{Cd}	12.37 (± 0.13) ^{Dc}	15.21 (± 0.57) ^{Db}	18.15 (± 0.79) ^{Da}
SA + <i>L. pentosus</i> 129	Nd	10.73 (± 0.31) ^{Bd}	12.72 (± 0.41) ^{Dc}	15.54 (± 0.41) ^{Db}	18.97 (± 0.37) ^{Da}
SA + <i>L. fermentum</i> 263	Nd	11.36 (± 0.38) ^{Bd}	17.09 (± 0.36) ^{Cc}	22.05 (± 0.59) ^{Cb}	26.21 (± 0.46) ^{Ca}
SA	Nd	22.40 (± 0.51) ^{Ad}	30.75 (± 0.43) ^{Bc}	36.38 (± 0.15) ^{Bb}	44.22 (± 0.19) ^{Ba}
Negative control	Nd	22.12 (± 0.72) ^{Ad}	33.83 (± 0.23) ^{Ac}	41.79 (± 0.29) ^{Ab}	48.20 (± 0.57) ^{Aa}

*Total Soluble Solids

** Titrable Acidity

Negative control: uncoated guava (sterile distilled water + glycerol 2.5 mL/100 mL).

Nd: Not determined.

^{A-E}: Average values in the same column, for a same measured parameter, with different uppercase letters are significantly different ($p < 0.05$), based on Tukey's test.

^{a-e}: Average values in the same row with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$), based on Tukey's test.

S4. Physicochemical parameters (average $\pm$ standard deviation) of mango cv. Palmer uncoated (negative control) and coated with sodium alginate (SA) alone or loaded with potentially probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains during a 15 day-room temperature storage (25 °C).

Parameters/Coatings	Days of storage				
	Zero	6	9	12	15
TSS* (° Brix)					
SA + <i>L. brevis</i> 59	16.90 (± 0.10) ^{Ac}	17.10 (± 0.10) ^{Bc}	17.30 (± 0.20) ^{Bbc}	17.93 (± 0.06) ^{Bb}	19.37 (± 0.49) ^{Ba}
SA + <i>L. pentosus</i> 129	16.70 (± 0.17) ^{Ac}	17.03 (± 0.23) ^{BCc}	17.10 (± 0.10) ^{BCc}	18.03 (± 0.12) ^{Bb}	19.53 (± 0.55) ^{Ba}
SA + <i>L. fermentum</i> 263	16.47 (± 0.85) ^{Ab}	16.53 (± 0.51) ^{BCb}	16.57 (± 0.59) ^{BCb}	16.83 (± 0.15) ^{Cb}	18.60 (± 0.66) ^{Ca}
SA	16.17 (± 0.06) ^{Ac}	16.33 (± 0.12) ^{Cc}	16.37 (± 0.15) ^{Cc}	17.57 (± 0.25) ^{Bb}	20.07 (± 0.21) ^{Ba}
Negative control	17.00 (± 0.10) ^{Ad}	18.30 (± 0.20) ^{Ac}	19.80 (± 0.06) ^{Ab}	20.20 (± 0.35) ^{Ab}	21.70 (± 0.09) ^{Aa}
TA** (g/100g)					
SA + <i>L. brevis</i> 59	0.28 (± 0.09) ^{Aa}	0.21 (± 0.03) ^{BCab}	0.19 (± 0.01) ^{Bab}	0.17 (± 0.03) ^{Bab}	0.15 (± 0.03) ^{Ab}
SA + <i>L. pentosus</i> 129	0.29 (± 0.04) ^{Aa}	0.25 (± 0.02) ^{Bab}	0.23 (± 0.03) ^{Babc}	0.17 (± 0.03) ^{Bbc}	0.15 (± 0.03) ^{Ac}
SA + <i>L. fermentum</i> 263	0.33 (± 0.01) ^{Aa}	0.35 (± 0.03) ^{Aa}	0.34 (± 0.04) ^{Aa}	0.30 (± 0.05) ^{Aa}	0.21 (± 0.03) ^{Ab}
SA	0.33 (± 0.07) ^{Aa}	0.33 (± 0.02) ^{Aa}	0.32 (± 0.03) ^{Aa}	0.20 (± 0.02) ^{Bb}	0.19 (± 0.03) ^{Ab}
Negative control	0.30 (± 0.04) ^{Aa}	0.17 (± 0.03) ^{Cb}	0.16 (± 0.03) ^{Bb}	0.15 (± 0.03) ^{Bb}	0.13 (± 0.02) ^{Ab}
pH					
SA + <i>L. brevis</i> 59	4.32 (± 0.06) ^{Ae}	5.34 (± 0.01) ^{Bd}	5.54 (± 0.03) ^{Bc}	5.69 (± 0.02) ^{Bb}	5.99 (± 0.01) ^{Ba}
SA + <i>L. pentosus</i> 129	4.26 (± 0.04) ^{Bd}	5.01 (± 0.02) ^{Cc}	5.09 (± 0.02) ^{Db}	5.66 (± 0.02) ^{Ba}	5.71 (± 0.02) ^{Ca}
SA + <i>L. fermentum</i> 263	4.12 (± 0.04) ^{Ce}	4.34 (± 0.01) ^{Ed}	4.58 (± 0.01) ^{Ec}	4.71 (± 0.01) ^{Db}	5.15 (± 0.04) ^{Da}
SA	4.11 (± 0.01) ^{Ce}	4.87 (± 0.01) ^{Dd}	5.15 (± 0.01) ^{Cc}	5.24 (± 0.02) ^{Cb}	5.97 (± 0.05) ^{Ba}
Negative control	4.13 (± 0.02) ^{Ce}	5.94 (± 0.02) ^{Ad}	6.02 (± 0.03) ^{Ac}	6.29 (± 0.02) ^{Ab}	6.38 (± 0.02) ^{Aa}
Ascorbic acid (mg/100g)					
SA + <i>L. brevis</i> 59	69.40 (± 0.70) ^{Aa}	64.17 (± 1.45) ^{Ab}	52.27 (± 1.05) ^{ABc}	50.60 (± 1.70) ^{Ac}	42.93 (± 1.03) ^{Bd}
SA + <i>L. pentosus</i> 129	69.17 (± 0.90) ^{Aa}	65.99 (± 1.35) ^{Ab}	54.73 (± 0.85) ^{Ac}	51.33 (± 1.27) ^{Ad}	45.60 (± 0.82) ^{Ae}
SA + <i>L. fermentum</i> 263	69.50 (± 1.40) ^{Aa}	64.56 (± 1.27) ^{Ab}	53.05 (± 1.19) ^{ABc}	52.13 (± 1.10) ^{Ac}	45.68 (± 1.19) ^{Ad}
SA	69.80 (± 0.92) ^{Aa}	55.06 (± 1.30) ^{Bb}	52.14 (± 0.32) ^{Bc}	45.73 (± 1.04) ^{Bd}	40.33 (± 0.45) ^{Ce}
Negative control	68.30 (± 1.28) ^{Aa}	57.53 (± 1.20) ^{Bb}	50.71 (± 0.98) ^{Bc}	43.77 (± 1.46) ^{Bd}	33.67 (± 1.08) ^{De}
Weight loss (%)					
SA + <i>L. brevis</i> 59	Nd	6.48 (± 0.50) ^{Bd}	8.56 (± 0.51) ^{Bc}	11.47 (± 0.15) ^{Bb}	14.19 (± 0.09) ^{Ca}
SA + <i>L. pentosus</i> 129	Nd	7.60 (± 0.29) ^{ABd}	10.84 (± 0.37) ^{Ac}	14.10 (± 0.11) ^{Ab}	15.87 (± 0.03) ^{Aa}
SA + <i>L. fermentum</i> 263	Nd	4.81 (± 0.61) ^{Cd}	7.83 (± 0.71) ^{BCc}	10.33 (± 0.28) ^{Cb}	15.31 (± 0.06) ^{Ba}
SA	Nd	4.07 (± 0.65) ^{Cd}	6.39 (± 0.38) ^{Cc}	9.56 (± 0.34) ^{Db}	12.94 (± 0.32) ^{Da}
Negative control	Nd	7.94 (± 0.17) ^{Ad}	11.71 (± 0.70) ^{Ac}	14.17 (± 0.26) ^{Ab}	16.11 (± 0.13) ^{Aa}

*Total soluble solids

** Titrable acidity

Negative control: uncoated mango (sterile distilled water + glycerol 2.5 mL/100 mL).

Nd: Not determined.

^{A-E}: Average values in the same column, for a same measured parameter, with different uppercase letters are significantly different (p < 0.05), based on Tukey's test.

^{a-e}: Average values in the same row with different lowercase letters are significantly different (p < 0.05), based on Tukey's test.