



USO DE QUITOSANA PARA CONTROLE DE *Penicillium* SPP.

Willian Naves **Duarte**¹; Mariana Nadjara **Klein**²; Larissa **Peressim**³; Gilmar S. **Sousa Jr**⁴; Katia
Cristina **Kupper**⁵

Nº 14140

RESUMO – *A cultura dos citros enfrenta vários problemas de natureza fitossanitária e, dentre esses, destacam-se as doenças que ocorrem na pós-colheita. Os bolores causados pelos fungos *Penicillium digitatum* e *P. italicum* são responsáveis por grandes perdas de frutos cítricos na comercialização, tornando-se muitas vezes um fator limitante na produção. O controle dessas doenças é geralmente realizado pela utilização de produtos químicos durante o beneficiamento dos frutos cítricos, sendo o imazalil o fungicida mais utilizado. Porém, com o crescente aumento pelo consumo de alimentos isentos de resíduos de agrotóxicos, por consumidores preocupados com maior qualidade de vida e saúde, produtores têm buscado novas alternativas de controle de doenças e, dentre essas, encontra-se a utilização de produtos naturais para o controle de doenças. Portanto, este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de quitosana no controle de *Penicillium digitatum* e *P. italicum*, agentes causais do bolor verde e bolor azul, respectivamente. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que quitosana inibe a germinação e o crescimento micelial de *Penicillium* spp. O produto, em concentrações de 0,05% e 0,10%, quando aplicada de forma curativa sobre frutos de laranja pêra, apresentou eficiência no controle do bolor azul; não apresentando efeito preventivo para o controle da doença.*

Palavras-chaves: *Controle alternativo, bolor verde, bolor azul*

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Agroecologia, UFSCar, Araras-SP; willnduarte@gmail.com

2 Colaboradora, Aluna de Doutorado, UNESP, Jaboticabal-SP.

3 Colaboradora, Aluna de Graduação em Agronomia, UFSCar, Araras-SP.

4 Colaborador, Aluno de Graduação em Agroecologia, UFSCar, Araras-SP.

5 Orientadora: Pesquisadora Científica do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Cordeirópolis-SP; katia@centrodecitricultura.br.



ABSTRACT- *The orange crop faces several problems of phytosanitary nature and, among these, there are the diseases that occur in postharvest. The mold caused by *Penicillium digitatum* and *P. italicum* are responsible for large losses of citrus fruits in the market, making it often a limiting factor in production. The control of these diseases is usually accomplished by the use of chemicals during the processing of citrus fruits, being the most widely used fungicide imazalil. However, with increasing the consumption of foods free from pesticide residues, preoccupied with higher quality of life and health consumers, producers have pursued new alternatives for disease control and, among these, are the use of natural products for disease control. Therefore, this study aimed to evaluate the efficiency of chitosan in the control of *Penicillium digitatum* and *P. italicum*, the causal agent of green mold and blue mold, respectively. The results of this study showed that chitosan inhibits germination and mycelial growth of *Penicillium* spp. The product, in concentrations of 0.05% and 0.10% when applied curatively on orange fruits “Pêra”, was efficient in controlling blue mold; showing no preventive effect for the disease control.*

Key-words: Alternative control, green mold, blue mold

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, respondendo por cerca de 37% da produção da fruta e 57% da produção de suco. O cinturão citrícola (Estado de São e Triângulo Mineiro) é responsável por 80% da produção nacional (Agrianual, 2013). No entanto, o setor citrícola enfrenta vários problemas de natureza fitossanitária e, dentre esses, encontram-se as doenças que ocorrem na fase de pós-colheita. Os bolores, causados pelos fungos *Penicillium digitatum* e *P. italicum*, são responsáveis por grandes perdas de frutos cítricos, tornando-se muitas vezes um fator limitante na produção da cultura.

Em geral, o controle dessas doenças é realizado por produtos químicos, os quais são aplicados aos frutos durante o beneficiamento. Porém, em decorrência dos efeitos negativos de tais aplicações, como o acúmulo de resíduos nos frutos, problemas de saúde pública e ao desenvolvimento de linhagens resistentes dos patógenos pelo uso indiscriminado de fungicidas (Palou et al., 2002; Duffy et al. 2003; Zhu et al., 2006; Kinay et al., 2007), têm-se tornado imprescindível a busca de novas alternativas de controle.

Neste contexto, o uso de produtos naturais, como a quitosana, se apresenta como uma alternativa de controle promissora ao uso de produtos químicos, resultando em aplicação de revestimento natural, seguro e ecologicamente correto.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

A quitosana é um polissacarídeo de alta massa molecular, solúvel em ácidos orgânicos, é comestível e segura para os seres humanos (Bautista-Banões et al., 2006) e oferece um promissor e versátil polímero biodegradável para embalagens de alimentos (Dutta et al., 2007). Tal produto natural tem se mostrado efetivo para o controle de doenças devido à capacidade para formar filmes protetores, similares às ceras empregadas no revestimento de frutas e, assim, atuar na regulação das trocas de gases e de umidade entre o produto e o ambiente, além da possibilidade de induzir respostas de resistência nos tecidos vegetais (El Ghaouth et al., 1992b).

A quitosana tem apresentado efeito, quando aplicada em frutos de morango durante a pós-colheita, para o controle dos fungos *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* e *Penicillium* spp., os quais são responsáveis pelas doenças: mofo cinzento, podridão mole e mofo azul, respectivamente (Romanazzi et al., 2013).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de quitosana no controle de *P. digitatum* e *P. italicum*, agentes causais do bolor verde e bolor azul, respectivamente, em frutos cítricos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Efeito de quitosana, em diferentes concentrações, na germinação de *Penicillium* spp.

Para esse ensaio foi utilizado quitosana com baixo peso molecular e grau de desacetilação de 75-85% (Sigma-Aldrich Co). Diferentes concentrações de quitosana foram obtidas por meio da diluição do produto em água destilada com adição de ácido acético glacial, de acordo com a metodologia descrita por Jiang & Li (2001).

Para determinação do efeito de quitosana na germinação dos fitopatógenos, gotas de 10 µL do produto, nas concentrações de 0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%, juntamente com 10 µL da suspensão do fungo (1×10^5 conídios/mL), foram depositadas em áreas demarcadas de lâminas, previamente preparadas, com meio ágar-água. Para o tratamento testemunha foram colocadas gotas de água destilada e esterilizada no lugar do produto (Kupper et al., 2009). As culturas foram incubadas em estufa para B.O.D., no escuro a 25°C por 14 e 18 horas, para *P. digitatum* e *P. italicum*, respectivamente. A avaliação correspondeu à contagem de conídios germinados e não germinados, em um total de 100 conídios, efetuando-se o cálculo da porcentagem de germinação. Considerou-se germinado o conídio cujo tamanho do tubo germinativo estava maior ou igual à largura do conídio. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 10 repetições.



2.2. Efeito de quitosana, em diferentes concentrações, no crescimento micelial de *Penicillium* spp.

Para determinação do efeito de quitosana no crescimento micelial dos patógenos, adicionou-se quitosana ao meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) nas seguintes concentrações: 0; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%, seguindo a metodologia de Kupper et al. (2009). Como testemunhas foram utilizados os meios contendo BDA acrescido de água no lugar do produto. Depois de vertidos os meios nas placas de Petri, discos de 05 mm de diâmetro, obtidos de colônias ativas de cada fitopatógeno, foram transferidos para o centro das mesmas, justapondo-se a face contendo a colônia diretamente sobre o meio de cultivo. A incubação das culturas se deu em estufa para B.O.D a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo 12/12h. A determinação do crescimento micelial foi realizada quando a colônia do patógeno, no tratamento testemunha, atingiu a extremidade da placa. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições para cada ensaio. Para comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3. Efeito de diferentes concentrações de quitosana no controle do bolor azul, em frutos de laranja Pêra.

Para realização deste estudo foi utilizado o isolado de *P. italicum* pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC – Cordeirópolis/SP.

Frutos de laranja Pêra foram esterilizados superficialmente com hipoclorito de sódio a 2% e, feridos em dois pontos equidistantes, na região equatorial dos frutos, com agulhas esterilizadas a uma profundidade de 03 mm. Em seguida, os frutos foram inoculados com o fitopatógeno (1×10^5 conídios/ml), 24h antes e 24h depois da realização dos tratamentos com quitosana.

Os tratamentos corresponderam à aplicação de diferentes concentrações de quitosana (0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,25%). Como tratamento químico utilizou-se o fungicida Imazalil, na dose recomendada pelo comerciante para o controle da doença ($2,0 \text{ mL L}^{-1}$) e, como tratamento testemunha, utilizou-se frutos tratados somente com água destilada e esterilizada.

Após a inoculação e realização dos tratamentos, os frutos foram armazenados por 15 dias, em câmara fria ($10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e com 90% de umidade relativa (UR)). A incidência foi avaliada pela porcentagem de frutos doentes observados no último dia de avaliação. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 3 repetições com 20



frutos por repetição. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) usando o software de estatística ASSISTAT 7.7 e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito de quitosana, em diferentes concentrações, na germinação de *Penicillium* spp.

Todas as concentrações de quitosana testadas (0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,25%) inibiram 100% a germinação dos conídios de *P. digitatum* e *P. italicum*. Camili et al. (2007) também observaram efeito positivo de quitosana sobre conídios de *Botrytis cinerea*, porém, em concentrações mais elevadas (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%). Os autores mencionam ainda, que as hifas do fungo se apresentavam deformadas, possuindo ramificação excessiva ou atrofiadas.

Hernández-Lauzaro et al. (2008) relataram diferenças entre as quitosanas com baixa e alta massa molecular sobre *Rhizopus stolonifer*. De acordo com os autores, quitosana de baixa massa teve maior efeito na redução do crescimento micelial enquanto que, a de alta massa molecular afetou o formato do esporo, a esporulação e a germinação. No presente ensaio, utilizando quitosana de baixa massa molecular, além do efeito sobre o crescimento micelial dos fitopatógenos, houve, também, ação sobre a germinação dos fungos, embora, aparentemente não tenha apresentado nenhuma deformação dos conídios. Por outro lado, Rapussi et al. (2009), também observaram falhas e deformidades na germinação de conídios e na formação de apressórios de *Guignardia citricarpa* a partir de concentrações de 1% de quitosana. EL Ghaouth et al. (1992a) observaram que concentrações de quitosana acima de 1.5mg/ml causaram alterações morfológicas nas hifas de *R. stolonifer*, efeito não observado em *B. cinerea*. Esse fato indica que os efeitos da quitosana podem variar conforme o fungo.

3.2. Efeito de quitosana, em diferentes concentrações, no crescimento micelial de *Penicillium* spp.

Todas as concentrações de quitosana testadas (0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,50; 1,0; 1,5 e 2,0%) inibiram 100% o crescimento das colônias de *P. digitatum* e *P. italicum*. Os dados obtidos neste trabalho corroboram com os obtidos por outros autores. De acordo com CIA et al. (2010), quitosana em concentrações a partir de 0,5% inibiram completamente o crescimento micelial de *R. stolonifer* sob condições *in vitro*. Camili et al., 2007 relata que *B. cinerea evita o contato com quitosana*, cujo produto apresenta um efeito tóxico para o seu desenvolvimento. Dados semelhantes foram obtidos por Rapussi et al. (2009), onde todas as concentrações de quitosana



utilizadas (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0%) mostraram efetividade na inibição do crescimento micelial de *Guignardia citricarpa*. Segundo Bautista-Baños et al. (2003), há inibição total do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* quando utilizado concentrações de quitosana de 2 a 3%, no qual também houve alterações morfológicas dos conídios e redução na esporulação.

3.3. Efeito de diferentes concentrações de quitosana no controle do bolor azul, em frutos de laranja Pêra.

Os resultados apresentados na Figura 01 indicam que não houve controle preventivo de quitosana para o controle do bolor azul em frutos de laranja pêra. Entretanto, quando os frutos foram tratados curativamente, as menores concentrações de quitosana 0,05% e 0,10% proporcionaram 67% e 54% de controle, respectivamente, em relação ao tratamento testemunha. O tratamento com imazalil apresentou 100% de controle, tanto curativamente como preventivamente.

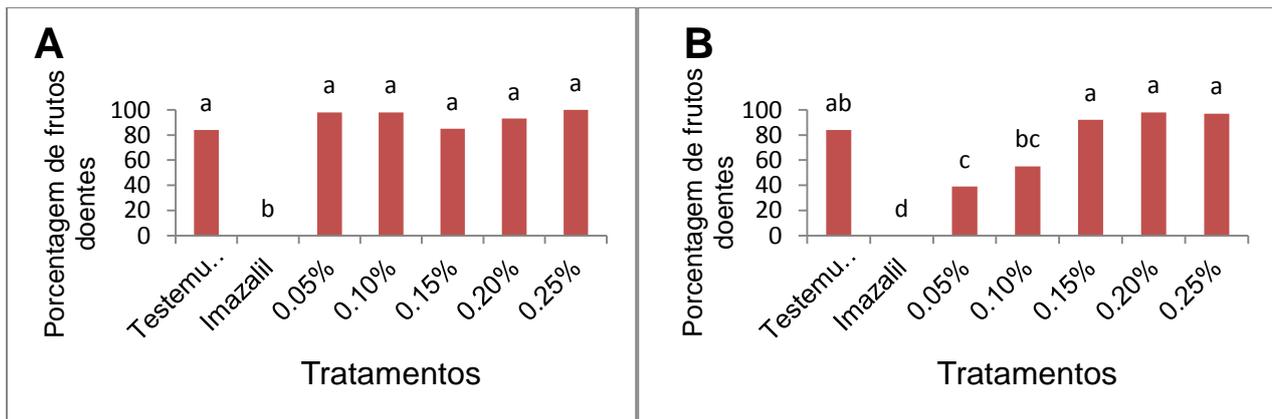


Figura 1: Porcentagem de frutos doentes, após tratamento preventivo (A) e tratamento curativo (B) com diferentes concentrações de quitosana, sob condições de armazenamento a 10°C e 90% de UR, por 15 dias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os dados relatados por Camili et al. (2007), segundo os autores, tratamento com quitosana para o controle de mofo cinzento em uva se mostrou mais eficiente quando aplicado de forma curativa quando comparado ao tratamento preventivo. Constataram ainda, que a ocorrência da podridão foi menor nos cachos de uva tratados com 1,5 e 2,0% de quitosana.

Por outro lado, Capdeville et al. (2002) ao avaliarem o efeito de quitosana no controle do mofo azul em maçã, causado por *P. expansum*, verificaram controle da doença quando os frutos



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

foram tratados preventivamente com concentrações do produto a 1 e 2%. Segundo, os autores as atividades de quitinase, β -1,3-glucanase, fitoalexina, peroxidase e polifenoloxidase aumentaram em frutos tratados com quitosana. Portanto, acredita-se que, o potencial de controle da quitosana sobre a doença pode estar não só relacionada com o efeito fungicida sobre o fitopatógeno, mas, também sobre a capacidade de induzir resistência no fruto, ou, pela combinação destes modos de ação. (El Ghaouth et al., 1991; RAPUSSI et al., 2009).

Tendo em vista as possíveis variáveis em torno das metodologias a serem empregadas para o controle de doenças por meio de produtos naturais e, os possíveis modos de ação que possam estar envolvidos, novos estudos devem ser realizados na busca de informações sobre a concentração ideal e a forma mais eficiente de aplicação do produto em frutos cítricos.

4. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que:

- a) Quitosana inibe a germinação e o crescimento micelial de *Penicillium* spp.;
- b) Quitosana, nas concentrações de 0,05% e 0,10%, quando aplicada de forma curativa sobre frutos de laranja Pêra, apresentou eficiência no controle do bolor azul;
- c) O produto não proporcionou controle da doença, quando aplicado preventivamente em frutos de laranja Pêra.

5. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida e ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC pela oportunidade de estágio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL, Anuário da Agricultura Brasileira, Citros, São Paulo: **FNP**, p.249-264, 2013.

BAUTISTA-BANOS, S. et al. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**, v.22, p.1087–1092, 2003.

BAUTISTA-BANÓS, S.; HERNANDEZ-LAUZARDO, A.N.; VELAZQUEZ-DEL VALLE, M.G.; HERNÁNDEZ-LOPEZ, M.; BARKA, E.A.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C.L. Chitosan as a potencial natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, v.25, p.108-118, 2006.

CAMILI, E. C.; BENATO, E. A.; PASCHOLATI, S. F.; CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*. **Summa Phytopathologica**, v.33, p.3, p.215-221, 2007.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

- CAPDEVILLE, G. et al. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'Red Delicious' apple fruit. **Phytopathology**, v. 92, p. 900-908, 2002.
- CIA, P.; BENATO, E.A.; PASCHOLATI, S.F.; GARCIA, E.O. Quitosana no controle pós-Colheita da podridão mole em caqui 'Rama Forte'. **Bragantia**, v. 69, p.745-752, 2010.
- DUFFY, B.; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J.M. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, v. 41, p. 501-38, 2003.
- DUTTA, P.K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G.K.; DUTTA, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, v. 114, p.1173-1182, 2007.
- EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, v.82, p.398-402, 1992a.
- EL GHAOUTH, A.; PONNAMPALAM, R.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. **HortScience**, v. 27, p. 1016-1018, 1992b.
- EL GHAOUTH, A. et al. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. **Journal of Food Science**, v. 56, p.1618-1620, 1991.
- HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M.G.; MÉNDEZ-MONTEALVO, M.G.; SÁNCHEZ-RIVERA, M.M.; BELLO-PÉREZ, L.A. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. **Carbohydrate Polymers**, v.73, p.541-547, 2008.
- JIANG, Y.M.; LI, Y.B. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. **FoodChemistry**, v. 73, p.139-143, 2001.
- KINAY, P.; MANSOUR, M. F.; GABLER, F. M.; MARGOSAN, D. A.; SMILANICK, J. L. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. **Crop Protection**, 26, n. 4, p. 647-656, 2007.
- KUPPER, K.C.; BELLOTTE, J.A.M.; GOES, A. de Controle Alternativo de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 1004-1015, 2009.
- PALOU, L.; USALL, J.; MUNOZ, A.; SMILANICK, J.L.; VINAS, I. Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. **Postharvest Biology and Technology**, 24: 93–96, 2002.
- RAPPUSSI, M. C. C. et al. Chitosan Reduces Infection by *Guignardia citricarpa* in Postharvest. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, Brazil, v.52, p. 513-521, 2009.
- ROMANAZZI, G.; FELIZIANI, E.; SANTINI, M. LANDI, L. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, v. 75, p. 24–27, 2013.
- TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, p. 1-13, 2003.
- ZHU, J.; XIE, Q.; LI, H. Occurrence of imazalil-resistant biotype of *Penicillium digitatum* in China and the resistant molecular mechanism. **Journal of Zhejiang University SCIENCE A**, v.7 (Suppl. II), p. 362-365, 2006.