

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO FUNGO *Penicillium digitatum* COM QUITOSANA

T. C. COUTINHO¹, R. A. L. RODRIGUES¹ e E. N. OLIVEIRA JUNIOR.¹

¹Universidade Federal de São João del Rei, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos
E-mail: eniobio@ufsj.edu.br

RESUMO – O emprego da quitosana na agricultura está tomando importância pela sua atividade antimicrobiana sobre uma grande variedade de fitopatógenos, incluindo fungos e bactérias. Foi avaliada a ação inibitória do polímero quitosana no crescimento do fungo *Penicillium digitatum* isolado de três cultivares de laranjas. Os fungos obtidos foram chamados de S (isolado da laranja Serra d'água), P (isolado da laranja Pêra Rio) e B (isolado da laranja Bahia). As amostras 1, 2 e 3 de quitosanas variaram quanto a diferentes massas molares, sendo 132, 234 e 245 kDa, respectivamente. Variou-se também as concentrações de quitosana através das quais obteve-se a concentração inibitória mínima (CIM) para cada fungo. A faixa de CIM dos três isolados de *P. digitatum* foi de 80 a 180 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$, constatando a atividade antifúngica da quitosana contra o fungo em estudo. Observou-se que fungos tratados com quitosanas de maiores massas molares obtiveram menor CIM.

1. INTRODUÇÃO

Desde os anos 80, o Brasil tornou-se o maior e o mais competitivo produtor no mercado mundial de laranja (Costa *et al.*, 2012). O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mensurou a safra de 2013 de produção de laranja no Brasil em 16,3 milhões toneladas. Entretanto, esse valor já foi maior em anos anteriores, quando o Brasil produzia em média 19,4 milhões de toneladas da fruta. Isso mostra que o setor tem passado por uma das crises mais severas, influenciada pela diminuição do consumo de suco de laranja no mercado externo e elevados estoques. Segundo Conselho Nacional de Abastecimento (CONAB), essa crise tem como uma das principais causas o elevado custo de produção, consequência do aumento de doenças causadas por fitopatógenos. As perdas econômicas ocasionadas por doenças de pós-colheita representam um dos principais obstáculos da citricultura mundial, uma vez que comprometem a qualidade e a quantidade dos frutos colhidos (Fisher *et al.*, 2007).

Diversas doenças podem comprometer a produtividade de citros em várias fases da cultura. As doenças em pós-colheita dos citros podem ser responsáveis por até 50 % de perdas (Ladaniya, 2008). Entre as várias doenças pós-colheita de frutos cítricos, os bolores são as de maior importância econômica. Eles também podem ocorrer durante a fase final de maturação. Contudo, eles causam maiores prejuízos quando ocorrem após a colheita, durante as operações de processamento, armazenamento e transporte (Kimati *et al.*, 1997). Entre os bolores, o bolor verde é o que ocorre com

maior frequência nas culturas nacionais. Ele pode ser causado por três espécies de fungos do gênero *Penicillium*, causando podridões moles nos frutos (Ladaniya, 2008). Dentre as espécies de *Penicillium* causadores de bolores em frutos cítricos, *Penicillium digitatum* é a mais frequente no Brasil (Fisher *et al.*, 2008), na qual o fungo desenvolve um micélio branco sobre o tecido afetado, que depois é revestido por uma densa massa de esporos (Kimati *et al.*, 1997).

O fungicida mais utilizado contra o mofo verde em citros é do grupo dos benzimidazóis (Fisher *et al.* 2007). Entretanto, ele possui várias restrições de uso, como a de selecionar estirpes de *Penicillium* resistentes, sem contar que as populações resistentes proliferam-se facilmente resultando em resistência múltipla (Ladaniya, 2008). Além disso, a situação se agrava no caso de frutos para exportação, uma vez que existem diferenças entre as legislações dos países consumidores na aceitação de determinados fungicidas, bem como na concentração de resíduos tolerada. Para retomar sua liderança no mercado internacional, o Brasil precisa de esforços constantes em processos produtivos mais sustentáveis (Santos, 2013). A sustentabilidade agrícola depende do desenvolvimento contínuo de novos defensivos que sejam menos persistentes, biodegradáveis e atinjam mais acuradamente as pragas alvo (Townsend *et al.*, 2006).

A quitosana é um biopolímero do tipo polissacarídeo, derivado da desacetilação da quitina, a qual constitui a maior parte dos exoesqueletos dos insetos, crustáceos e parede celular dos fungos (Azevedo *et al.*, 2007). Sendo assim, ela é considerada um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável. As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, que em muitos casos as consideram poluentes (Mirani *et al.*, 2014). Devido a essas características a quitosana tem sido proposta como um material potencialmente atraente para usos diversos, como na área alimentícia, biotecnologia, ciência dos materiais, tratamento de água, produtos farmacêuticos, agricultura, proteção ambiental (Azevedo *et al.*, 2007). Na agricultura, seu emprego está tomando importância pela sua atividade antimicrobiana sobre uma grande variedade de fitopatógenos, incluindo fungos e bactérias, como: *Solanum lycopersicum* em tomateiros (Peña *et al.*, 2014), *Rhizoctonia solani* Kuhn (Freddo *et al.*, 2014), *Colletotrichum musae* em bananas (Negreiros *et al.*, 2013), *Penicillium expansum* em maçã (Britto e Assis, 2012), *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Rhizopus stolonifer* (Oliveira Junior *et al.*, 2012).

Acredita-se no potencial do polímero quitosana como uma substância alternativa no controle de *P. digitatum* causador da podridão branca em pós-colheita de citros. Como já mencionado, ela apresentou atividade antimicrobiana e antifúngica contra diversos microrganismos. Este trabalho tem o objetivo de avaliar a inibição do crescimento de *P. digitatum* com quitosana.

2. METODOLOGIA UTILIZADA

2.1 Micro-organismos: isolamento e cultivo

As cepas do fungo *P. digitatum* foram obtidas de laranjas de diferentes cultivares (Serra d'água, Pêra-Rio e Bahia) expostas ao ambiente para contaminação. O *P. digitatum* foi isolado por técnicas de estriamento em placas com ágar *Sabouraud* dos frutos que apresentaram sinais de incidência do mofo verde. A pureza da cultura foi assegurada após o isolamento, e durante os experimentos, através de

microscopia óptica. A padronização do inóculo foi feita pela contagem em câmara de *Neubauer* dos esporos obtidos por filtração com gaze e solução salina 0,85 %. Os esporos de *P. digitatum* foram nomeados como S para os isolados de laranja Serra D'água, como P para os isolados de laranja Pêra-Rio e como B para os isolados de laranja Bahia.

2.2 Amostras de quitosana

As amostras de quitosana, obtidas do camarão *Pandalus Borealis*, foram adquiridas da Primex e os seus dados fornecidos pelo fabricante são mostrados na Tabela 1. A solução estoque de quitosana foi preparada com ácido acético 0,15 M, na concentração $4 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$.

Tabela 1- Características das amostras de quitosana fornecidas pela Primex

Amostra	Lote	Teor de massa seca	Viscosidade (cP)	Grau de desacetilação	Densidade (g/mL)	Turbidez (NTU)
1	TM3493	94,5 %	5	90 %	0,61	23
2	TM3529	90,8 %	520	95 %	0,34	47
3	TM3142	90,2 %	1300	91 %	0,32	19

Para a determinação da massa molar média absoluta as amostras de quitosana foram dissolvidas em tampão acetato de sódio pH 4 na proporção 1:100 (m/v), filtradas em filtros $0,45 \mu\text{m}$ e, em seguida, submetidas a cromatografia de permeação em gel. A análise foi realizada utilizando duas colunas em série Ultrahydrogel™ Linear 7,8 x 300 mm, um injetor Viscotek GPCmax VE 2001 Solvent/SAMPLE MODULE, detector Viscotek TDA 302 Triple Detector Array, tendo como fase móvel tampão acetato de sódio pH 4. O volume injetado foi de $100 \mu\text{L}$ a uma vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e o equipamento é dotado dos seguintes detectores: índice de refração (IR), viscosidade (DP) e espalhamento de luz (RALS).

2.3 Bioensaio

A atividade antifúngica das amostras de quitosana com diferentes massas molares e diferentes graus de acetilação foi testada avaliando seu efeito no crescimento das cepas de *P. digitatum*. O meio *Sabouraud* líquido tinha a seguinte composição em $\text{g} \times \text{L}^{-1}$: 20 de glicose, 5 de extrato de levedura e 10 de peptona. O pH do meio foi ajustado para 5,5 para garantir a solubilidade da quitosana. O bioensaio ocorreu em micro placas de poliestireno contendo 96 poços, na qual foram adicionados, respeitando a seguinte ordem e totalizando o volume de $200 \mu\text{L}$: i) Qsp $200 \mu\text{L}$ de água destilada estéril; $115 \mu\text{L}$ de meio estéril *Sabourad*; ii) quitosana (concentrações de acordo com a Tabela 2); iii) $10 \mu\text{L}$ da suspensão padrão de esporo do *P. digitatum* (exceto no branco o qual foi substituído por $10 \mu\text{L}$ de água). O controle foi feito através de uma replicata incubada nas mesmas condições de cultivo, porém com ausência de quitosana. O procedimento foi realizado em triplicata.

Tabela 2- Concentrações dos componentes adicionados nos bioensaios

Meio (μL)	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115
Inóculo (μL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Quitosana (μL)	0	1	2	4	6	10	20	40	50	60	70
Água (μL)	75	74	73	71	69	65	55	35	25	15	5
Quitosana (μg × mL ⁻¹)	0	20	40	80	120	200	400	800	1000	1200	1400

Após o preparo, as placas foram incubados a 25°C com agitação de 180 rpm. A inibição do crescimento microbioano foi monitorada através da densidade óptica medida a 405 nm em intervalos de 24 horas por 5 dias. Os fungos *P. digitatum* P, B e S tiveram seu crescimento analisado com as três amostras de quitosana, totalizando nove análises. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi encontrada após novas análises seguindo o mesmo roteiro, cujas concentrações de quitosana foram aproximadas do intervalo de confiança obtido nas primeiras análises.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados observados demonstraram efeito significativo e inversamente proporcional das diferentes concentrações de quitosana sobre o crescimento do fungo *P. digitatum* em cultivo *in vitro*, ou seja, havendo diminuição progressiva do crescimento micelial de acordo com o aumento da concentração de quitosana. As leituras de densidade óptica (OD) variaram de 0 a 1,2. Os gráficos da Figura 1 permitem observar que concentrações acima de 800 μg × mL⁻¹ inibiram completamente o crescimento dos fungos, com as três amostras de quitosanas e para os três isolados de *P. digitatum*. Sendo assim, aumentou-se esse intervalo para encontrar a CIM, avaliando a inibição da quitosana nas seguintes concentrações: 0, 40, 80, 100, 120, 140, 200, 400 e 800 μg × mL⁻¹. Esses resultados estão apresentados na Figura 2. Considerou-se a CIM como os menores valores de OD cuja concentração de quitosana inibiu completamente os fungos. A faixa de CIM dos três isolados de *P. digitatum* foi de 80 a 180 μg × mL⁻¹. Para o Inóculo S, a CIM foi de 140, 180 e 120 μg × mL⁻¹ para as quitosanas 1, 2 e 3, respectivamente. Para o Inóculo P, a CIM foi de 180, 160 e 100 μg × mL⁻¹ para as quitosanas 1, 2 e 3, respectivamente. Para o Inóculo B, a CIM foi de 140 e 80 μg × mL⁻¹ para as quitosanas 2 e 3, respectivamente (as amostras com a quitosana 1 apresentaram sintomas de contaminação, por isso, os resultados foram desconsiderados).

A massa molar das amostras 1, 2 e 3 de quitosana foram, respectivamente, 132, 234 e 245 kDa. Pode-se observar que a quitosana 3, que apresentou maior massa molar, representou a maior eficiência na inibição do crescimento dos fungos. A relação entre massa molar (MM) e atividade antimicrobiana de quitoligômeros foi estudada por Jeon et al. (2001). Quitoligômeros com três

diferentes massas molares, classificados em alto, médio e baixo, tiveram seu efeito antimicrobiano testado contra bactérias gram positivas e gram negativas, mostrando que quitoligômeros de maior MM (entre 1 a 10 kDa) tiveram melhor atuação na inibição dos microrganismos e sua eficácia aumentou proporcionalmente com a massa molar. Os efeitos de quitoligômeros no crescimento miceliano de fungos também foi avaliado por Oliveira Junior (2006). Foi observado que misturas de quitoligômeros de DP (grau de polimerização) 5 a 8, DP 2 a 12 e DP 2 a 11, promoveram menor efeito no crescimento fúngico de *A. alternata*, *B. cinerea*, *P. expansum* e *R. stolonifer* na concentração de $1000 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ do que as quitosanas DP 45 a 3850.

Estudos sobre o mecanismo de ação da atividade antimicrobiana da quitosana sugere que esse polímero interfira nos grupos negativamente carregados das macromoléculas expostas na superfície da parede celular fúngica e, desta maneira, há modificação da permeabilidade da membrana plasmática, o que conduz a liberação de proteínas e outros constituintes intracelulares (Benhamou, 1996). Portanto, o aumento da disponibilidade de grupos amino que interagem com as paredes das células na quitosana (refletidos pelo maior grau de desacetilação), significa maior atividade antimicrobiana. Entretanto, não foi possível observar esse comportamento, uma vez que a quitosana 2, que apresenta maior grau de desacetilação não mostrou menores CIM para os três fungos em estudo.

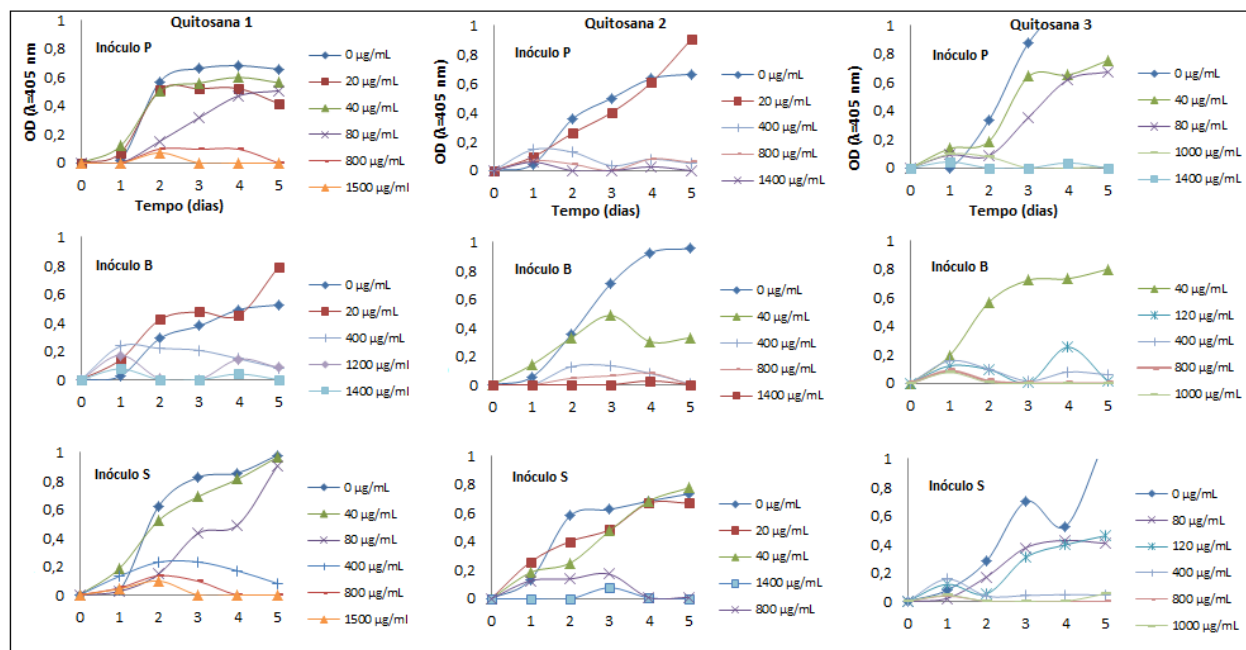


Figura 1- Gráficos do efeito de inibição das quitosanas 1, 2 e 3 com concentrações de 0 a $1500 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ no crescimento dos três isolados de *P. digitatum*; P, S e B. Algumas curvas foram omitidas para melhor visualização do gráfico. O eixo x representa o avanço dos cinco dias de crescimento, e o eixo y representa a OD, medida no comprimento de onda de 405 nm.

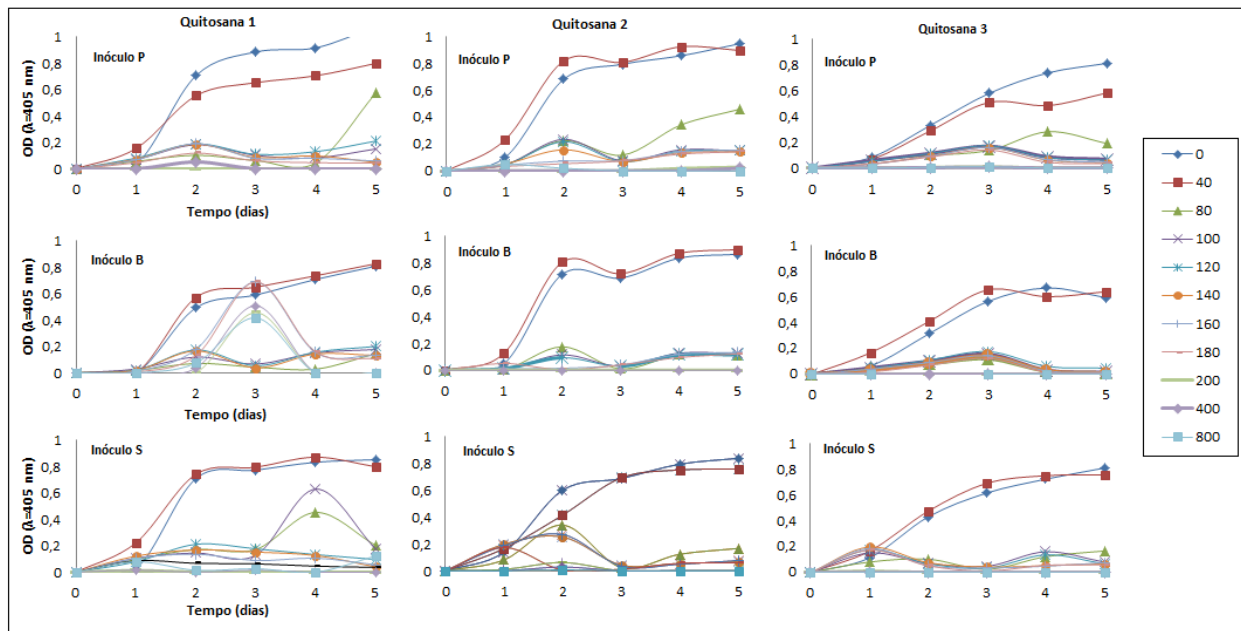


Figura 2- Gráficos do efeito de inibição das quitosanas 1, 2 e 3 com concentrações de 0 a 800 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ no crescimento dos três isolados de *P. digitatum*; S, P e B. O eixo x representa o avanço dos cinco dias de crescimento, e o eixo y representa a OD, medida no comprimento de onda de 405 nm. Todas as curvas foram mostradas para ilustrar que concentrações abaixo da CIM apresentaram comportamento semelhante.

5. CONCLUSÃO

A quitosana mostrou-se um polímero com ação antifúngica contra o fungo *P. digitatum*, causador do mofo verde em citrus, apresentando CIM entre 80 a 180 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ para os três isolados do fungo testados. Os resultados desse estudo confirmam o fato de que polímeros de quitosanas com maiores massas molares são antimicrobianos mais eficientes. No entanto, estudos futuros serão necessários para avaliar se a inibição da quitosana foi fungicida ou fungistática. Além disso, análises *in vivo* poderão averiguar a eficácia da aplicação de quitosana no controle de *P. digitatum* em campo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOK, M. V.; COSTA, A. C. F. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Rev. Eletr. de Mater. e Proces.*, v. 2.3, p. 27-34, 2007.
- BENHAMOU, N. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* v. 1, p. 233-240, 1996.

BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos de revestimento de quitosana como ativo quaternário em maçãs fatiadas. *Ciênc. e Tecnol. de Alimen.* [online]. v. 32, p. 599-605, 2012.

COSTA, C. K. F.; MAIA, S. F.; SAMPAIO, L. M. B. Exportações brasileiras de suco de laranja e subsídios americanos: uma análise empírica de estratégias comerciais (1992-2006). *Rev. de Econom. e Sociolog. Rural*, Piracicaba, v. 50, n. 1, p. 82-106, 2012.

Companhia Nacional de Abastecimento (Conab): Acompanhamento da Safra Brasileira de 2013/2014 de Laranja. Disponível em:

http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_09_14_40_40_boletim_laranja_2o_2013.pdf. Acesso em 10/03/2014.

FISCHER, I. H.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Doenças pós colheita em citros e caracterização da população fúngica ambiental no mercado atacadista de São Paulo. *Trop. Plant Pathol.* v. 33, p. 219-226, 2008.

FISCHER, I. H.; TOFFANO, L.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Caracterização dos danos pós-colheita em citros procedentes de "packinghouse". *Fitopatol. Bras.* v. 32, p. 304-310, 2007.

FREDDO, A. R.; MAZARO, S. M.; BRUN, E. J.; WAGNER-JR, A. A quitosana como fungistático no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Ciênc. Rural* [online]. v. 44, p. 1-4, 2014.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Ibge): Estatística da Produção Agrícola, Setembro de 2013. Disponível em:

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201309.pdf. Acesso em 31/03/2014.

JEON, Y.J., PARK P.J.; KIM S.K. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymer.* v. 44, p. 71-76, 2001.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN, A. F.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v. 2, p. 246-275, 1997.

LADANIYA, M. S. *Citrus fruit: biology, technology and evaluation*. San Diego: Elsevier Academic. p. 417-450, 2008.

MIRANI, Y. A.; ALEMÁN, A.; CALVO, M. M.; CABALLERO, M. E. L.; MONTERO, P.; GUILLÉ, C. G. Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp (*Litopenaeus vannamei*) waste materials. *Food Hydroc.* v. 35, p. 710 e 717, 2014.

NEGREIROS, R. J. Z.; SALOMÃO, L. C. C.; PEREIRA, O. L.; CECON, P. R.; SIQUEIRA, D. M. Controle da antracnose na pós-colheita de bananas-'prata' com produtos alternativos aos agrotóxicos

convencionais. *Rev. Bras. Frutic.* [online]. v. 35, p. 51-58, 2013.

OLIVEIRA JUNIOR, E. N.; EL GUEDDARI, N. E.; MOERSCHBACHER, B. M.; FRANCO, B. M. Growth rate inhibition of phytopathogenic fungi by characterized chitosans. *Brazil. Journal of Microbiol.* v. 43, p. 800-809, 2012^a.

OLIVEIRA JUNIOR, E. N. Caracterização dos efeitos de quitosanas na inibição de fungos fitopatogênicos. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Campinas, 2006. 132 p. Tese (Doutorado).

PEÑA, G. D.; COSTALES, D.; FALCON, A. B. Influencia de un polímero de quitosana en el crecimiento y la actividad de enzimas defensivas en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultrop* [online]. v. 35, p. 35-42, 2014.

SANTOS, R. M.; NAAS, I. A.; MOLLO NETO, M.; VENDRAMETTO, O. An overview on the Brazilian orange juice production chain. *Rev. Bras. Frutic.* [online]. vol. 35, p. 218-225, 2013.

TOWNSEND, C. R., BEGON, M., HARPER J. L. *Fundamentos em Ecologia*. 2a ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.