

# ARTIGOS

## Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*

Elisângela Clarete Camili<sup>1,2</sup>, Eliane Aparecida Benato<sup>2</sup>, Sérgio Florentino Pascholati<sup>3</sup>, Patrícia Cia<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda do Departamento de Produção Vegetal, Horticultura, Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP, CP 237, CEP 18603-970, Botucatu, SP., Brasil, e-mail: ecamili@hotmail.com; <sup>2</sup>Instituto de Tecnologia de Alimentos, FrutotecGEPC, CP 139, CEP 13073-001, Campinas, SP., Brasil; <sup>3</sup>Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ, USP, CP 09, CEP 13418-900, Piracicaba, SP., Brasil; <sup>4</sup>Centro de Engenharia e Automação, do Instituto Agrônomico. Rod. Gabriel Paulino Bueno Couto, km 65, C.P. 26, CEP 13201-970, Jundiaí, SP, Brasil; Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor.

Autor para correspondência: Elisângela Clarete Camili

Data de chegada: 30/08/2004. Aceito para publicação em: 08/03/2007.

1134

### RESUMO

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.

Perdas significativas ocorrem durante o armazenamento e a comercialização de uvas de mesa devido, principalmente, à ocorrência do mofo cinzento (*Botrytis cinerea* Pers.:Fr.) e, para o controle de patógenos emprega-se, geralmente, o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>). Diante da restrição crescente ao uso de produtos químicos em pós-colheita, tem ocorrido considerável interesse em métodos alternativos de controle. Este trabalho teve como principal objetivo avaliar os efeitos da quitosana, na proteção pós-colheita de uva 'Itália' contra *B. cinerea*. *In vivo*, avaliou-se o efeito direto e indireto da quitosana pelo tratamento dos cachos de uva, antes e após a inoculação com o patógeno. Utilizou-se quitosana nas concentrações de 0,00; 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 e 2,00 % (v/v). Para inoculação, em 10 bagas de cada cacho de uva foram feitos ferimentos de ±2 mm de profundidade,

procedendo-se em seguida, a aspersão da suspensão de conídios (±10<sup>5</sup> conídios.mL<sup>-1</sup>) de *B. cinerea*. Após os tratamentos, os cachos foram mantidos a 25±1 °C / 80-90 % UR e avaliados diariamente quanto à incidência e severidade da podridão. Avaliações *in vitro* do efeito do produto sobre o patógeno também foram realizadas analisando-se o crescimento micelial e a germinação dos conídios de *B. cinerea*. A solução de quitosana, nas concentrações de 1,5 e 2,0 % (v/v), quando empregada após a inoculação com *B. cinerea*, reduziu significativamente o índice de doença no entanto, quando os cachos foram tratados antes da inoculação, não houve efeito significativo do tratamento sobre o desenvolvimento da doença. Nos ensaios *in vitro*, a solução de quitosana, nas maiores concentrações, suprimiu o crescimento micelial do patógeno e retardou a germinação dos conídios.

Palavras-chave adicionais: *Vitis vinifera* L., mofo cinzento, indução de resistência, controle.

### ABSTRACT

Camili, E. C.; Benato, E. A.; Pascholati, S. F.; Cia, P. Evaluation of chitosan on postharvest protection of 'Itália' grapes against *Botrytis cinerea*. *Summa Phytopathologica*, v.33, p.3, p.215-221, 2007.

Significant losses of table grapes are seen during storage and marketing due mainly to the occurrence of gray mold (*Botrytis cinerea* Pers.:Fr.), which has been frequently controlled by using sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>). Due to increase in restrictions on the postharvest use of chemical products, considerable interest in alternative control measures has arise. The main objective of this study was to evaluate the effects of chitosan in 'Itália' grapes, aimed at post-harvest protection against *B. cinerea*. The direct and indirect effects of chitosan were evaluated *in vivo* by treating bunches of grapes before and after inoculation with the pathogen. Chitosan was used in the concentrations of 0.00; 0.25; 0.50; 1.00; 1.50 and 2.00 % (v/v). For inoculation, 10 grapes in each bunch

were injured by piercing the grape to a depth of ±2 mm, followed spraying with *B. cinerea* conidia (± 10<sup>5</sup> conidia.mL<sup>-1</sup>). After the treatments, the bunches were kept at 25±1°C/80-90% RH. Disease incidence and severity evaluations were carried out daily. *In vitro* evaluations regarding the effect of the product were also carried out based upon mycelial growth and germination of *B. cinerea* conidia. When applied after inoculation with *B. cinerea*, 1.5 and 2.0 % (v/v) solutions of chitosan significantly reduced the occurrence of the disease, although when applied before inoculation there was no significant effect on the development of the disease. The higher concentrations of chitosan suppressed mycelial growth of the pathogen and delayed conidium germination.

Additional keywords: *Vitis vinifera* L., gray mold, induced resistance, control.

O desenvolvimento de fungos durante o armazenamento e transporte de uvas de mesa é a maior causa de perdas pós-colheita, sendo *Botrytis cinerea* Pers.:Fr., agente causal do mofo cinzento, o de maior incidência (4). *B. cinerea* causa perdas de importância econômica, não apenas na pré-colheita, mas também durante o transporte e armazenamento, portanto, por mais eficiente que seja o tratamento fitossanitário efetuado no campo, o mesmo não é suficiente para dispensá-lo na pós-colheita. Na pós-colheita importantes medidas de controle incluem manuseio cuidadoso, resfriamento rápido e uso de SO<sub>2</sub>, aliados ao armazenamento refrigerado, sob temperaturas próximas a 0°C. Porém, alternativas ao SO<sub>2</sub> são necessárias, principalmente devido ao sulfito ser alérgico para algumas pessoas (18), e o mesmo estar sendo banido ou restrito para uso em certos produtos de origem vegetal.

A ênfase em proteção de frutos pós-colheita contra podridões tem sido desviada do uso de produtos químicos para várias técnicas alternativas de controle, que garantam a segurança do produto e que não coloque em risco a saúde dos consumidores, minimizando ou substituindo o uso de fungicidas e, prolongando o período de conservação dos frutos.

A atividade antimicrobiana de substâncias naturais bioativas como a quitina, quitosana e seus derivados contra diferentes grupos de microrganismos, tais como, bactérias, leveduras e fungos tem recebido atenção nos últimos anos (25). O tratamento de frutos com quitosana, um polissacarídeo catiônico de alto peso molecular, solúvel em ácidos orgânicos, tem se mostrado promissor no controle de doenças em pós-colheita de frutos (11, 16), por apresentar atividade antifúngica contra vários patógenos, inclusive *B. cinerea* (2, 7, 21, 23, 24).

A quitosana pode exercer dupla função, interferindo diretamente no desenvolvimento do patógeno e ativando várias respostas de defesa no tecido vegetal (1, 9, 10). Quanto às propriedades fungistática e fungicida contra patógenos de vários frutos e hortaliças, a quitosana possui diferentes mecanismos de ação que incluem o acúmulo de quitinase, síntese de inibidores de proteinase, lignificação, indução da síntese de calose (9, 10), e eliciação da produção de fitoalexinas e peróxido de hidrogênio (1, 7). Ainda, a quitosana pode induzir a atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) (17, 23). Devido à sua habilidade de formar um filme semi-permeável, pode modificar a atmosfera ao redor do produto e diminuir as perdas por transpiração e desidratação dos frutos (7, 16, 21, 29), além de atrasar o amadurecimento e o escurecimento enzimático de alguns frutos (16, 20, 29). Testes realizados com animais domésticos demonstraram que a quitosana é um produto atóxico e biologicamente seguro (7, 29).

A expressão de barreiras estruturais pelo tecido do hospedeiro após o tratamento com quitosana pode restringir a expansão do patógeno invasor, bem como, atrasar a retomada de desenvolvimento de infecções quiescentes. Em geral, muitas doenças pós-colheita originam de infecções quiescentes que se tornam ativas com o declínio do potencial biossintético do tecido em produzir compostos antimicrobianos (10).

Estudos demonstraram que a aplicação de quitosana (1,0 ou 1,5%) reduziu significativamente a podridão de *B. cinerea* em morangos armazenados por 21 dias a 13 °C sem diferença significativa entre os tratamentos com quitosana e com o fungicida iprodione. Além de induzir a atividade das enzimas quitinase e β-1,3-glucanase, o tratamento com quitosana manteve os frutos mais firmes e diminuiu a taxa de respiração dos mesmos durante o armazenamento por 21 dias a 4 °C (7).

Ainda em morangos, a pulverização das plantas com a concentração de 6 g.L<sup>-1</sup> de quitosana, protegeu os frutos do mofo cinzento em pós-colheita e atrasou a senescência, mantendo a qualidade dos frutos a um nível aceitável durante quatro semanas de

armazenamento a 3 °C (21). Além disso, os tratamentos com quitosana mantiveram os frutos mais firmes e a taxa de desenvolvimento de antocianinas foi menor. Os autores sugerem que o controle da doença pode ser atribuído à propriedade fungistática da quitosana e sua habilidade em induzir enzimas de defesa e fitoalexinas nas plantas, ou ainda, a combinação desses fatores (21).

Bautista-Baños et al. (2) obtiveram controle do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da antracnose em mamão, tanto *in vitro* como *in vivo*. Nos frutos, a aplicação de solução de quitosana a 1,5 % antes da inoculação, reduziu significativamente a doença, porém, quando os frutos foram inoculados antes do tratamento nenhuma diferença significativa foi observada e, a incidência foi alta em todos os tratamentos (acima de 95 %). *In vitro*, quitosana acima de 2,5 % inibiu completamente o crescimento micelial do patógeno e a 1,5 % causou alterações morfológicas nos conídios do fungo.

A pulverização de plantas de pepino com solução de quitosana a 1, 4 ou 24 h antes da inoculação com *B. cinerea*, reduziu a incidência do mofo cinzento em 65 %, 82 % e 87 %, respectivamente. Entretanto, a pulverização de quitosana nas folhas 1 h após a inoculação com o patógeno, diminuiu apenas 52 % do mofo cinzento (3). Os autores concluíram que, embora um duplo modo de ação esteja envolvido no controle da incidência da podridão, a atividade antifúngica da quitosana foi o fator essencial no controle da doença. Estes resultados sugerem que, uma vez estabelecido no tecido, o controle do patógeno com quitosana se torna mais difícil.

Romanazzi et al. (23) obtiveram redução significativa do mofo cinzento em uva 'Itália' tratada com solução de quitosana (1 %) na pós-colheita, tanto em uvas armazenadas sob temperatura ambiente (± 22 °C) como em uvas mantidas sob refrigeração (± 0 °C). A aplicação de quitosana na pré-colheita, em todas as concentrações testadas (1,0; 0,5 e 0,1 %) reduziu significativamente o mofo cinzento na pós-colheita. A atividade da FAL na epiderme das bagas de uva 24 ou 48 h após o tratamento com quitosana a 1,0 % foi duas vezes maior do que nas bagas não tratadas. Assim, o efeito inibitório da quitosana ao *B. cinerea* parece originar da combinação da propriedade antifúngica e da habilidade de estimular respostas de defesa nas bagas de uva.

O uso de filmes e coberturas comestíveis para estender o período de conservação e manter a qualidade de frutos frescos, congelados ou processados, tem sido evidenciado durante os últimos anos, devido a sua natureza biodegradável e segura, comparado com o sulfito (25). Assim, a quitosana, por ser um produto comestível, exibindo potencial para ser utilizado como um material de cobertura antifúngico para frutos na pós-colheita (9).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da quitosana na proteção pós-colheita de cachos de uva 'Itália', contra o mofo cinzento causado por *B. cinerea* e, seu efeito sobre o desenvolvimento do patógeno *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados nos laboratórios de Tecnologia Pós-Colheita do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL.

### Obtenção de isolados de *Botrytis cinerea*

Para a obtenção do patógeno *B. cinerea*, foram realizados isolamentos a partir de uvas provenientes de diferentes regiões produtoras do estado de São Paulo. Para conservação dos isolados, utilizou-se tubos de cultura com meio de cultivo Batata Dextrose Agar (BDA) mais 2 mL de óleo mineral Nujol ou água destilada esterilizada em frascos de penicilina (método de Castellani) (12, 27).

### Inoculação de *Botrytis cinerea* em cachos de uva 'Itália'

Para inoculação, em 10 bagas de cada cacho foram feitos ferimentos, de aproximadamente 2 mm de profundidade, com o auxílio de uma seringa de cromatografia (28). Após o ferimento, os cachos foram inoculados por aspersão de suspensão de conídios na concentração de  $\pm 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>, determinada pela contagem em hemocítmetro, com adição de Tween 20 na proporção de uma gota para 100 mL da suspensão, de acordo com metodologia descrita por Romanazzi et al. (23) e Thomas et al. (26), com modificações.

### Tratamento dos cachos de uva 'Itália' com solução de quitosana

Para avaliação do efeito direto da quitosana sobre o desenvolvimento de *B. cinerea*, os cachos de uva foram inoculados com o patógeno e, após 4 h, aspergidos com diferentes concentrações de solução de quitosana (2,0; 1,5; 1,0; 0,5; 0,25 ou 0,0 %) e, em seguida, os cachos foram dispostos sobre papel absorvente para retenção do excesso de umidade e secagem sob ventilação (Ensaio 1). Posteriormente, com o objetivo de avaliar o potencial da quitosana na indução de resistência, cachos de uva foram ou não, aspergidos com solução de quitosana (1,5 %) e, inoculados após 24, 48, 72 ou 96 h com o fungo *B. cinerea* (Ensaio 2).

Utilizou-se quitosana (fornecida pela empresa Cyrbe do Brasil, Sumaré/SP) extraída em ácido acético e diluída em água até a concentração de 2 %, com pH de 4,4. O produto apresentando alta viscosidade foi diluído em água destilada esterilizada para obtenção das concentrações desejadas.

No ensaio 1, os cachos que haviam sido inoculados quatro horas antes do tratamento, foram acondicionados em caixas de papelão e mantidos a  $25 \pm 1$  °C / 80-90 % UR, por um período de seis dias. No ensaio 2, os cachos também acondicionados em caixas de papelão permaneceram a  $1 \pm 1$  °C / 85-95% UR até o momento do tratamento, sendo posteriormente transferidos para câmara de armazenamento a  $25 \pm 1$  °C / 80-90 % UR e, após 24, 48, 72 ou 96 h inoculados com *B. cinerea*, retornando às mesmas condições por mais quatro dias para avaliação da doença.

Avaliações de incidência e severidade (escala de notas) foram realizadas diariamente nas 10 bagas inoculadas de cada cacho. A escala de notas adotada para avaliação da severidade da doença variou de 1 a 6, com base na área da lesão, correspondendo, aproximadamente, a 2, 5, 10, 20, 30 e 50 % da área da baga lesionada, respectivamente. Os resultados foram expressos em índice de doença calculado através da fórmula:  $ID (\%) = \{[(n_1 \times 1) + \dots + (n_6 \times 6)] \times (6 \times N)^{-1}\} \times 100$ , onde,  $n_{1...6}$  = n° de bagas infectadas com a respectiva nota e  $N$  = n° total de bagas inoculadas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, no ensaio 1 e, fatorial (2x4), representados por tratamento e intervalo de tempo entre o tratamento e a inoculação, no ensaio 2; com 10 repetições e um cacho de uva como unidade experimental. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. Para efeito de análise estatística, as médias resultantes da avaliação fitopatológica foram transformadas em  $\sqrt{x+0,5}$ . Além da comparação de médias, análises de regressão polinomial foram feitas para se verificar a relação entre dose e índice de doença (13).

### Testes *in vitro*

Com o objetivo de avaliar o efeito da quitosana na germinação de conídios de *B. cinerea*, placas de poliestireno contendo meio de cultivo Ágar-Água (AA) foram divididas em quatro quadrantes. Cada um destes recebeu uma gota ( $\pm 30$  mL) de suspensão de conídios ( $\pm 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>), adicionada de solução de quitosana nas proporções de

0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 ou 2,0 %. Na avaliação, contou-se 50 conídios por quadrante, pela observação em microscópio óptico. Foi considerado germinado quando o tubo germinativo apresentava tamanho igual ou superior ao maior diâmetro do conídio (9, 19).

Para avaliação do produto no crescimento micelial do fungo, quitosana foi incorporada em meio de cultivo BDA acrescido de antibiótico oxitetraciclina (50 ug.mL<sup>-1</sup>) à 45 °C, nas proporções de 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 ou 2,0 %. Após solidificação do meio, cada placa recebeu, na parte central, um disco de 3 mm de diâmetro contendo micélio de *B. cinerea*, retirados da borda de colônias provenientes de culturas com três dias de cultivo. O crescimento micelial de *B. cinerea* foi determinado diariamente, medindo-se o diâmetro da colônia em direções ortogonais, até o momento em que as colônias do tratamento testemunha atingiram a borda da placa (2, 9).

Para os ensaios de germinação dos conídios ou crescimento do micélio, as placas, uma como unidade experimental, foram mantidas a  $\pm 22$  °C sob alternância de luz de 12 h. Para ambos os ensaios, o delineamento foi inteiramente casualizado com cinco e nove repetições por tratamento no primeiro e segundo ensaios, respectivamente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Tratamento pós-inoculação (Ensaio 1)

As diferentes concentrações de quitosana, quando aplicadas 4 h após a inoculação dos cachos de uva, foram eficientes em reduzir o índice de doença causado por *B. cinerea* (Figura 1). Nota-se que, com exceção da concentração de 0,25 % de quitosana, de um modo geral, as demais reduziram o índice de doença comparados aos índices obtidos em cachos não tratados; sendo observados os menores valores de ocorrência de podridão nos cachos tratados com 1,5 e 2,0 % de quitosana ao longo dos dias de avaliação. Nos quatro primeiros dias de armazenamento, as doses de 1,5 e 2,0 % diferiram significativamente da testemunha, sendo esta diferença menos acentuada nos dois últimos dias de avaliação.

El Ghaouth et al. (7) não verificaram qualquer efeito adicional no controle de *B. cinerea* em morangos com o aumento na concentração de quitosana de 1,0 % para 1,5 %. Como a quitosana tem a capacidade

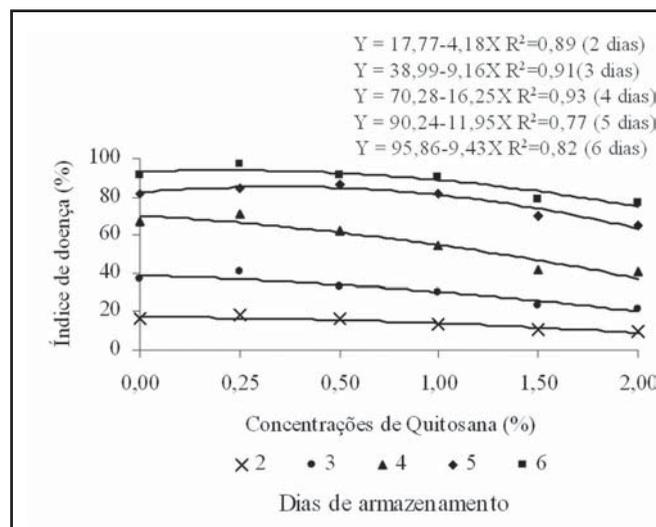


Figura 1. Índice de doença (%) em cachos de uva 'Itália', inoculados com *Botrytis cinerea*, em função das concentrações de quitosana, à 25 °C. Média de dez repetições.

de inibir o crescimento de vários fungos, induzir a produção de quitinase e eliciar a produção de fitoalexinas no tecido do hospedeiro, os autores sugeriram que o controle da doença em morangos podia ser devido à propriedade fungistática da quitosana ou pela sua habilidade de induzir enzimas de defesa (quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase) e fitoalexinas, ou a combinação de mais de um modo de ação. Os mesmos autores em 1992, também trabalhando com morango, não obtiveram redução adicional nas doenças causadas por *B. cinerea* e *R. stolonifer* quando a concentração de quitosana passou de 10 para 15 mg.mL<sup>-1</sup>. Neste caso, os autores afirmaram que o controle da doença parecia estar mais relacionado à propriedade fungistática da quitosana do que à sua habilidade de induzir enzimas de defesa tais como quitinase, quitosanase e  $\beta$ -1,3-glucanase, tendo em vista que estas enzimas não foram ativadas (9).

O aumento na concentração de quitosana de 1,0 para 1,5 % resultou em menor perda de massa e cor, menor taxa respiratória, enrugamento e ataque de fungos, especificamente *B. cinerea*, *Erwinia* e *Alternaria* em pimentões e pepinos mantidos a 13 e 20 °C (8).

Embora não tendo sido avaliada, sabe-se que uma das principais causas de perdas de uvas de mesa na pós-colheita advém da sua alta suscetibilidade à desidratação (14), principalmente quando armazenadas por longos períodos. Neste sentido, El Ghaouth et al. (8) mostraram que pimentões e pepinos tratados com 1,0 e 1,5 % de quitosana apresentaram menor perda de massa quando armazenados a 13 ou 20 °C. Conseqüentemente, o emprego de quitosana em cachos de uva visando o controle de *B. cinerea* e a desidratação dos cachos apresenta-se como uma medida promissora, pois, ambos podem aumentar as perdas qualitativas e quantitativas desta fruta em pós-colheita.

Cachos de uva tratados com quitosana não apresentaram qualquer sintoma aparente de fitotoxicidade, como observado por outros autores em morangos, pêras, kiwis, pimentões (6, 7, 10). Cachos de uva tratados com as maiores concentrações de quitosana mostraram-se

brilhantes (Figura 2); o mesmo foi observado por Romanazzi et al. (23), também em uva 'Itália'.

Pelo fato das maiores concentrações apresentarem os melhores resultados de controle da doença, optou-se por utilizar a solução de quitosana no segundo experimento (tratamento-inoculação) na concentração de 1,5 %.

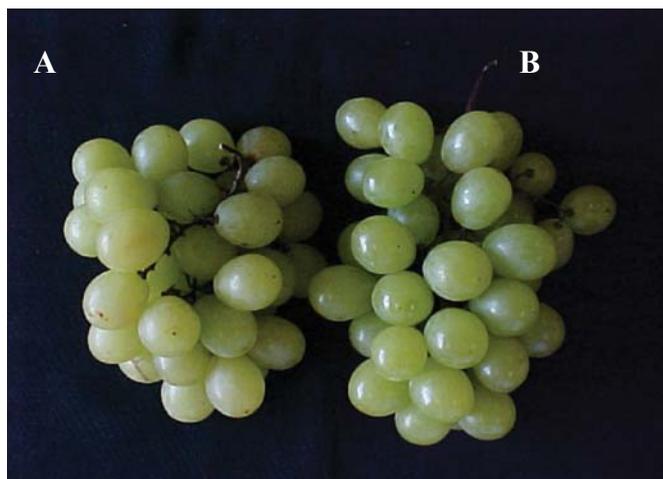


Figura 2. Cachos de uva 'Itália' tratados com solução de quitosana a 2,0 % (B) e testemunha (A). Escala – 1:1.

#### Tratamento pré-inoculação (Ensaio 2)

Observando-se a Tabela 1, constata-se que os fatores intervalo de tempo entre o tratamento e a inoculação e tratamento com ou sem quitosana, não exerceram influência significativa sobre o índice de doença causada por *B. cinerea*. De maneira geral, no decorrer dos dias de avaliação nota-se, embora não significativa, redução no índice de doença em cachos tratados com solução de quitosana 24 ou 48 h antes

Tabela 1. Índice de doença (%) em cachos de uva 'Itália' tratados com solução de quitosana (1,5 %) e inoculados com *Botrytis cinerea*, armazenados a 25±1 °C / 80-90 % UR.

Dias de Armazenamento	Tratamentos	Intervalo de tempo entre tratamento e inoculação <sup>z</sup>					Média	
		24 h	48 h	72 h	96 h			
2	Com Quitosana	8,00 <sup>y</sup>	4,67	6,50	5,00	6,04 a	n.s.	
	Sem Quitosana	8,17	6,33	7,50	4,67	6,67 a		
	Média	8,08 A	5,50 A	7,00 A	4,83 A			
C.V. (%)		64,45						
3	Com Quitosana	23,50	17,00	24,50	16,67	20,42 a	n.s.	
	Sem Quitosana	24,17	19,83	23,67	14,50	20,54 a		
	Média	23,83 A	18,42 A	24,08 A	15,58 A			
C.V. (%)		50,20						
4	Com Quitosana	50,67	39,33	53,83	39,83	45,92 a	n.s.	
	Sem Quitosana	56,00	46,00	52,17	36,50	47,67 a		
	Média	53,33 A	42,67 A	53,00 A	38,17 A			
C.V. (%)		40,77						

<sup>y</sup> Média de dez repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e, minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey  $P < 0,05$ ).

<sup>z</sup> Significância do teste *F* da análise de variância para o efeito dos tratamentos sobre índice de doença, n.s. = não significativo; \*, \*\* = significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente. Interação = n.s., para todos os dias de armazenamento.

da inoculação com o patógeno, porém quando inoculados 72 ou 96 h após o tratamento, o índice de doença em cachos tratados foi maior do que nos não tratados com solução de quitosana.

Em maçãs, Capdeville et al. (5) constataram o efeito positivo das concentrações de 1 e 2 % de quitosana no controle do mofo azul (*Penicillium expansum*), quando os frutos foram tratados 48 ou 96 h antes da inoculação.

Ben-Shalom et al. (3) obtiveram redução de 65 % na incidência de mofo cinzento (*B. cinerea*) em plantas de pepino tratadas com quitosana 1 h antes da inoculação com o patógeno.

Com base nos resultados obtidos nos dois ensaios, inoculação antes ou após o tratamento com quitosana, é possível inferir que a solução de quitosana teve maior efeito curativo do que protetor em uva 'Itália' contra *B. cinerea*, em vista de sua maior eficiência quando aplicada após a inoculação com o patógeno.

### Efeito da solução de quitosana *in vitro* na germinação de conídios e no crescimento micelial de *Botrytis cinerea*

Tem-se conhecimento que quitosana interfere no crescimento de vários fungos fitopatogênicos, incluindo *B. cinerea* (10). O crescimento micelial de *B. cinerea* foi completamente inibido pelas concentrações de quitosana de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 % durante o período de incubação de cinco dias a  $22\pm 1$  °C, enquanto que, no decorrer do experimento, notou-se que no meio acrescido de 0,25 % de quitosana o fungo *B. cinerea* formou colônias compactas com micélio aéreo crescendo verticalmente e, o mesmo patógeno crescendo em meio não acrescido de quitosana (testemunha) formou colônias amplas, as quais aderiram à superfície do meio (Figura 3). A mesma característica de crescimento foi observada para o patógeno *Mucor racemosus* crescido em meio suplementado com  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de quitosana (22) e, para *B. cinerea* e *R. stolonifer* crescidos nas concentrações de quitosana maiores que  $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  (9). A diferença qualitativa na morfologia das colônias de *B. cinerea* crescidas com ou sem quitosana em meio BDA sugerem que o microrganismo procurou crescer longe da superfície na tentativa de evitar o contato direto com o efeito tóxico da quitosana. Com base nas observações deste e de outros trabalhos (22), pode-se inferir que a atividade antimicrobiana da quitosana contra fungos pode ser melhorada pelo maior contato entre o produto e o microrganismo ao qual pretende-se controlar.

Resultados obtidos por Roller e Covill (22), onde meio de cultura acrescido de  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de quitosana foi exposto a  $121$  °C por 10, 15, 20, 25 ou 30 min, sugerem que a atividade antimicrobiana da



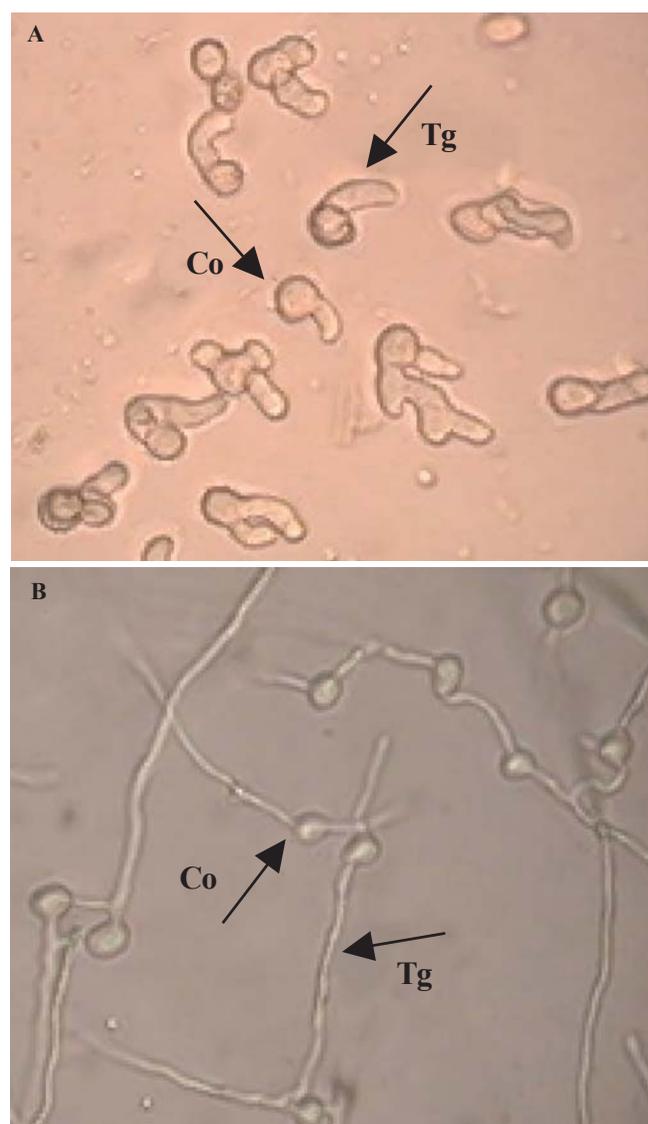
**Figura 3.** Crescimento micelial de *Botrytis cinerea* em meio BDA, após cinco dias de incubação a  $22\pm 1$  °C. Placas superiores, sem adição de quitosana e; placas inferiores, meio BDA acrescido de 0,25 % de quitosana. Escala - 1:1.

quitosana não foi afetada pelo processo de autoclavagem do meio por até 30 min.

Quanto aos efeitos da quitosana na germinação dos conídios, notou-se que conídios suspensos apenas em água destilada esterilizada (testemunha) germinaram após 8 h de incubação a  $22\pm 1$  °C. Por sua vez, nos tratamentos com quitosana, independente da concentração, os conídios germinaram após 24 h. Embora sendo considerados germinados, pôde-se observar que os conídios submetidos à solução de quitosana apresentaram hifas atrofiadas, mais espessas e muitas vezes com ramificação excessiva (Figura 4).

Estudos mostram que sob concentração relativamente baixa ( $20$  a  $30 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), a quitosana causou inibição de 50 % na germinação de conídios de *B. cinerea* e, quase total inibição foi observada a  $50 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  (3). Assim como mostrado neste trabalho, Ben-Shalom et al. (3) também observaram que a quitosana reduziu a elongação do tubo germinativo.

Quitosana inibiu a germinação de esporos e o crescimento micelial de *B. cinerea* e *R. stolonifer*. Completa inibição, todavia, não foi obtida com a concentração de  $6 \text{ mg.mL}^{-1}$ , indicando que o modo de ação da quitosana é mais fungistático do que fungicida (9). *R. stolonifer*



**Figura 4.** Efeito da solução de quitosana na germinação de conídios de *Botrytis cinerea*, 24 h após o tratamento com 1,5 % de quitosana (A) e testemunha (B). Escala - 1:20. Co = conídio; Tg = tubo germinativo.

mostrou-se mais sensível do que *B. cinerea* à quitosana e, concentrações maiores que 1,5 mg.mL<sup>-1</sup> induziram mudanças morfológicas em *R. stolonifer*, caracterizadas pela excessiva ramificação das hifas (9), indicando que o efeito da quitosana pode variar com o fungo.

Quitosana a 2,0 e 3,0 % exerceu efeito fungicida contra *C. gloeosporioides*. Mudanças morfológicas nos conídios foram observadas com a concentração de 1,5 % de quitosana após 7 h de incubação (2). Por sua vez, o exame do tecido de pimentões tratados com quitosana e inoculados com *B. cinerea* revelou que as células do patógeno apresentavam vários graus de desorganização, desde vacuolização até completa desintegração do protoplasma (11).

*Zygosaccharomyces bailii* foi exposta a duas concentrações de quitosana (5,0 e 0,5 g.L<sup>-1</sup>) sob temperatura ambiente para verificação de mudanças morfológicas. Na presença de 5,0 g.L<sup>-1</sup> de quitosana, a levedura apresentou evidências de plasmólise dentro dos primeiros 45 s de exposição à quitosana e este efeito permaneceu inalterado nos 60 min seguintes. Quando exposta a 0,5 g.L<sup>-1</sup> de quitosana, similar reação foi observada, mas, após 10 min uma pequena proporção da levedura demonstrou reação de desplasmólise e retomou sua aparência normal. Isto evidencia que, sob baixas concentrações os efeitos antifúngicos da quitosana foram reversíveis (22). De acordo com Hirano e Nagao, (15), o aumento na concentração deste composto resulta em aumento no grau de inibição do crescimento de fitopatógenos.

A quitosana pode ligar-se ao DNA e a inibição da síntese de mRNA ocorrer via penetração do produto no núcleo do microrganismo, interferindo também com a síntese de proteínas (25). O mecanismo de inibição do crescimento de patógenos pela quitosana difere do mecanismo utilizado pelos fungicidas sintéticos (15). O crescimento micelial e a morfologia dos conídios neste e em outros trabalhos, com diferentes fungos, foram afetados pela quitosana, indicando que este produto atua em vários estádios de desenvolvimento dos patógenos, inclusive de *B. cinerea*.

Baseado nos resultados dos estudos *in vitro* e, no primeiro ensaio *in vivo*, inoculação seguida de tratamento com quitosana, ressalta-se a inibição do mofo cinzento em uva como função da propriedade fungistática da quitosana, sendo que suas propriedades eliciadoras requerem mais estudos.

Embora os resultados com a aplicação de quitosana em pós-colheita para o controle de *B. cinerea* em uva tenha apresentado resultados promissores, pela característica quiescente do patógeno e pelas vantagens de se molhar os cachos na pós-colheita, novas pesquisas deverão juntar-se à de Romanazzi et al. (23) para avaliar o efeito da aplicação de quitosana no campo sobre o desenvolvimento do *B. cinerea* em pós-colheita de uvas de mesa, em escala comercial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGRAWAL, G. K. et al. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, n. 12, p. 1061-1069, 2002.
2. BAUTISTA-BAÑOS, S. et al. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**, Oxford, v. 22, n. 9, p. 1087-1092, 2003.
3. BEN-SHALOM, N. et al. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. **Crop Protection**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 285-290, 2003.
4. BULIT, J.; DUBOS, B. *Botrytis* bunch rot and blight. In: PEARSON, R.C.; GOHEEN, A.C. (Ed.). **Compendium of grape diseases**. St. Paul: APS Press, 1990. p. 13-15.
5. CAPDEVILLE, G. et al. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'Red Delicious' apple fruit. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 8, p. 900-908, 2002.
6. DU, J.; GEMMA, H.; IWAHORIM, S. Effects of chitosan coating on the storage of peach, japanese pear, and kiwifruit. **Journal of Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v. 66, n. 1, p. 15-22, 1997.
7. EL GHAOUTH, A. et al. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 6, p. 1618-1620, 1991.
8. EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; PONNAMPALAM, R. Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits. **Journal of Food Processing and Preservation**, Trumbull, v. 15, n. 5, p. 359-368, 1991.
9. EL GHAOUTH, A. et al. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, n. 4, p. 398-402, 1992.
10. EL GHAOUTH, A. et al. Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell pepper fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 44, n. 6, p. 417-432, 1994.
11. EL GHAOUTH, A. et al. Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 183-194, 1997.
12. FIGUEIREDO, M. B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para a conservação de fungos patógenos em plantas. **O Biológico**, São Paulo, v. 33, p. 9-13, 1967.
13. GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. rev. e ampl. Piracicaba: Nobel. 1990. 467 p.
14. GONZALEZ, U. A. et al. Improving postharvest resistance in fruits by external application of *trans*-resveratrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 1, p. 82-89, 2003.
15. HIRANO, S.; NAGAO, N. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 53, n. 11, p. 3065-3066, 1989.
16. JIANG, Y.; LI, Y. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. **Food Chemistry**, Oxford, v. 73, n. 2, p. 139-143, 2001.
17. KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMIGH, D. L. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. **Journal of Plant Physiology**, Jena, Germany, v. 160, n. 8, p. 859-863, 2003.
18. LICHTER, A. et al. Ethanol controls postharvest decay of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 301-308, 2002.
19. MERCIER, J. et al. Shortwave ultraviolet irradiation for control of decay caused by *Botrytis cinerea* in Bell pepper: induced resistance and germicidal effects. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 126, n. 1, p. 128-133, 2001.
20. PEN, L. T.; JIANG, Y. M. Effects of chitosan coating on shelf life and quality of fresh-cut Chinese water chestnut. **Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie**, San Diego, v. 36, n. 3, p. 359-364, 2003.
21. REDDY, M. V. B. et al. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 20, n. 1, p. 39-51, 2000.
22. ROLLER, S.; COVILL, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 47, n. 1-2, p. 67-77, 1999.
23. ROMANAZZI, G. et al. Effects of pre and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. **Food Microbiology and Safety**, Chicago, v. 67, n. 5, p. 1862-1867, 2002.
24. ROMANAZZI, G.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A. Short hypobaric treatments potentiate the effect of chitosan reducing storage decay of sweet cherries. **Postharvest Biology and Technology**,

- Amsterdam, v. 29, n. 1, p. 73-80, 2003.
25. SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 10, n. 2, p. 37-51, 1999.
26. THOMAS, C. S.; MAROIS, J. J.; ENGLISH, J.T. The effects of wind speed, temperature, and relative humidity on development of aerial mycelium and conidia of *Botrytis cinerea* on grape. **Phytopathology**, St Paul, v. 78, n. 3, p. 260-265, 1988.
27. TUIITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess Press, 1969. 239 p.
28. ZAHAVI, T. et al. Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 20, n. 2, p. 115-124, 2000.
29. ZHANG, D.; QUANTICK, P. C. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 195-202, 1997.