

Incidência de infecção fúngica em frutos contendo revestimento comestível com composto antifúngico natural

Incidence of fungal infection in fruits containing an edible coating with natural antifungal compound

RESUMO

A maçã está entre as principais frutas produzidas no Brasil, cujo consumo per capita em 2017 foi de 5 kg. Entretanto, o desenvolvimento da fruticultura depende da redução das perdas pós-colheita, que podem atingir até 30% do total produzido. A infecção fúngica corresponde até 90% dos danos causados nos frutos. A incorporação de agentes antimicrobianos em filmes comestíveis é uma alternativa interessante, no sentido de impedir ou reduzir o crescimento indesejável de fungos filamentosos deteriorantes, possibilitando o aumento de vida útil de frutos frescos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a incidência da podridão azul em frutos com o revestimento comestível elaborado com composto antifúngico de levedura antagonista, aplicado de forma preventiva e curativa. Foram determinadas a porcentagem de frutos doentes, a porcentagem de frutos infectados e a porcentagem de controle das lesões. Os tratamentos preventivos e curativos não impediram a ocorrência da doença e da infecção, mas o tratamento preventivo controlou significativamente a evolução das lesões causadas por *Penicillium expansum*, cujo valor médio de controle foi de 59%. A utilização de composto antifúngico de levedura antagonista em revestimento indica perspectivas positivas para o controle de *Penicillium expansum* em maçãs frescas.

PALAVRAS-CHAVE: *Penicillium expansum*, levedura antagonista, amido de aveia.

ABSTRACT

The apple is among the main fruits produced in Brazil, and the per capita consumption was 5 kg on 2017. However, the development of fruit production depends on the reduction of post-harvest losses, which can reach up to 30% of the total produced. Fungal infection corresponds up to 90% of the damage caused to the fruits. An incorporation of antimicrobial agents in edible films is an interesting alternative, not preventing or reducing the undesirable growth of deteriorating filamentous fungi, making it possible to increase the useful life of fresh fruits. This work aimed to evaluate the incidence of blue rot in fruits with the antifungal edible coating, applied as preventive and curative. It was determined the percentage of diseased fruits, infected fruits and the control of lesions. Preventive and curative treatments did not prevent the occurrence of disease and infection, but preventive treatment controlled significantly the evolution of injuries caused by *Penicillium expansum*,

Deyse Sanae Ota
deysesanae@gmail.com
Universidade Federal do Paraná,
Londrina, Paraná, Brasil.

Laura Fernandes Campos
lauracampos@hotmail.com
Universidade Federal do Paraná,
Londrina, Paraná, Brasil.

Fabiana Fiusa Ferreira
fabanaf@hotmail.com
Universidade Federal do Paraná,
Londrina, Paraná, Brasil.

Douglas Rangel da Costa
douglas@sementesparana.com.br
Universidade Federal do Paraná,
Londrina, Paraná, Brasil.

Lyssa Setsuko Sakanaka
lyssa@utfpr.edu.br
Universidade Federal do Paraná,
Londrina, Paraná, Brasil.

Marianne Ayumi Shirai
marianneshirai@utfpr.edu.br
Universidade Federal do Paraná,
Londrina, Paraná, Brasil.

Alexandre Rodrigo Coelho
arcoelho@utfpr.edu.br
Universidade Federal do Paraná,
Londrina, Paraná, Brasil.

Recebido: 19 ago. 2020.
Aprovado: 01 out. 2020.
Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



whose average control value was 59%. The use of antifungal compound of antagonist yeast in coating indicates positive perspectives in controlling *Penicillium expansum* in fresh apples.

KEYWORDS: *Penicillium expansum*. Antagonist yeast. Oat starch.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, ficando atrás somente da Índia e da China (SCOGNAMIGLIO, 2017). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, no ranking de produção brasileira de frutas frescas, a maçã está entre as principais frutas produzidas, e entre as cinco mais vendidas no ano de 2016 (IBGE, 2016). O fruto teve o seu consumo per capita em 2017 no Brasil de 5 kg (KIST et al., 2018).

Entretanto, o desenvolvimento da fruticultura depende principalmente da redução das perdas pós-colheita, que podem atingir até 30% do total produzido (ANDRADE, 2017). Dentre as causas são fatores climáticos, transporte, armazenamento incorreto, entre outros, causando fermentos e rachaduras, ocorrendo ataque de fungos deteriorantes, na qual são os principais responsáveis (80 a 90 %) pelos danos (PARISI, 2004).

Embora o controle de fungos em nível de campo e pós-colheita ainda seja realizado por meio de fungicidas químicos, pesquisas com novas alternativas estão sendo estudadas, a fim de minimizar os riscos ao meio ambiente e diminuir os resíduos nos frutos tratados (OLIVEIRA; SANTOS, 2015). Segundo Assis e Britto (2014), a aplicação de revestimentos comestíveis vem sendo utilizada para prolongar a vida útil do fruto, além de melhorar a sua aparência e torná-lo mais atraente para o consumidor. Estudos comprovam o aumento de vida útil por meio de revestimentos comestíveis em frutos.

A incorporação de agentes antimicrobianos em filmes comestíveis é uma alternativa interessante, no sentido de impedir ou reduzir o crescimento indesejável de fungos filamentosos deteriorantes, possibilitando o aumento de vida útil de frutos frescos. Pois muitos micro-organismos antagonistas vêm sendo utilizados no combate de fungos filamentosos em frutas, quando aplicados na fase pós-colheita e armazenamento (MACARISIN et al., 2010). Algumas espécies de leveduras são capazes de secretar metabólitos proteicos de massa molar variável, chamados de toxinas killer, capazes de inibir ou matar outros micro-organismos por alterações na parede ou membrana celular (BUZZINI et al., 2007).

Assim, o projeto teve como intuito avaliar a incidência da podridão dos frutos com o revestimento comestível com composto antifúngico natural.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração do composto.

Para o desenvolvimento da análise primeiramente foi feito a extração do composto antifúngico, na qual inicialmente ativada em 25 mL de caldo MPL - (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 1%, sulfato de amônio 0,5%, ágar 1,8%) a 25°C por 24h,

seguido de padronização do inóculo na Escala número 1 de MacFarland, e transferência de uma alíquota de 100 µL (correspondente a $3,0 \times 10^6$ células), para frasco Erlenmeyers contendo 50 mL de Caldo MPL. O cultivo estático de 96h a 25°C foi centrifugado (15min a 10.000 rpm) e filtrado em membrana de 0,20 µm para remoção das células (COELHO et al., 2009). O sobrenadante livre de células (Extrato Bruto) foi homogeneizado e armazenado em frascos âmbar a - 20°C para elaboração da solução filmogênica.

Revestimento antifúngico.

Para a elaboração do revestimento antifúngico, empregou-se a técnica de *casting*, com dispersão de amido de aveia em água destilada e glicerol, como agente plastificante. Como controle, foi elaborada uma formulação do revestimento sem o composto antifúngico, substituindo-o integralmente pelo volume com água destilada. As duas formulações foram aquecidas a 90°C por 30 minutos para a gelatinização dos grânulos de amido de aveia, originando as soluções filmogênicas.

Análises de incidência da doença e perda de massa.

Para iniciar as análises, foram definidos três pilotos. O piloto 1 consistiu de 20 frutos, para o acompanhamento da incidência da doença (porcentagem de frutos doentes, porcentagem de frutos infectados e diâmetro das lesões), e a análise da perda de massa. As análises foram realizadas aos 5, 10 e 15 dias de armazenamento a 25°C. Nos pilotos 2 e 3, 20 frutos foram armazenados a 25°C por 10 e 12 dias, e o acompanhamento da doença foi realizado em intervalos de 2 e 3 dias, respectivamente.

Cada piloto consistiu de 5 tratamentos, sendo: T1 (RFA): Fruto revestido com formulação à base de água destilada, seguido de ferimento e inoculação com *P. expansum*; T2 (FRA): Fruto ferido, revestido com formulação à base de água destilada e inoculado com *P. expansum*; T3 (RFEB): Fruto revestido com formulação à base de extrato livre de células (Extrato bruto), seguido de ferimento e inoculação com *P. expansum*; T4 (FREB): Fruto ferido, revestido com formulação à base de extrato livre de células (Extrato bruto) e inoculado com *P. expansum*; C (Controle): Fruto ferido e inoculado com *P. expansum* (sem revestimento). A ordem de aplicação do revestimento foi realizada com o intuito de verificar a eficácia do tratamento, como preventivo (ferimento após a aplicação do revestimento) e curativo (ferimento antes da aplicação do revestimento).

Na determinação da incidência da doença, o fruto foi considerado doente quando pelo menos um ferimento apresentasse sinal de podridão, na análise da incidência de frutos infectados, foi considerado positivo o ferimento que apresentasse sinais de infecção de desenvolvimento do fungo e para a determinação da severidade da doença, foi determinado o diâmetro da podridão (lesão) dos ferimentos nos frutos com o auxílio de um paquímetro. Os resultados foram expressos em milímetros e em porcentagem de controle das lesões, calculado da seguinte forma:

Controle das lesões (%) = $D_c - D_T / D_c \times 100$, onde: D_c = Média aritmética do diâmetro das lesões no controle; D_T = Média aritmética do diâmetro das lesões no tratamento;

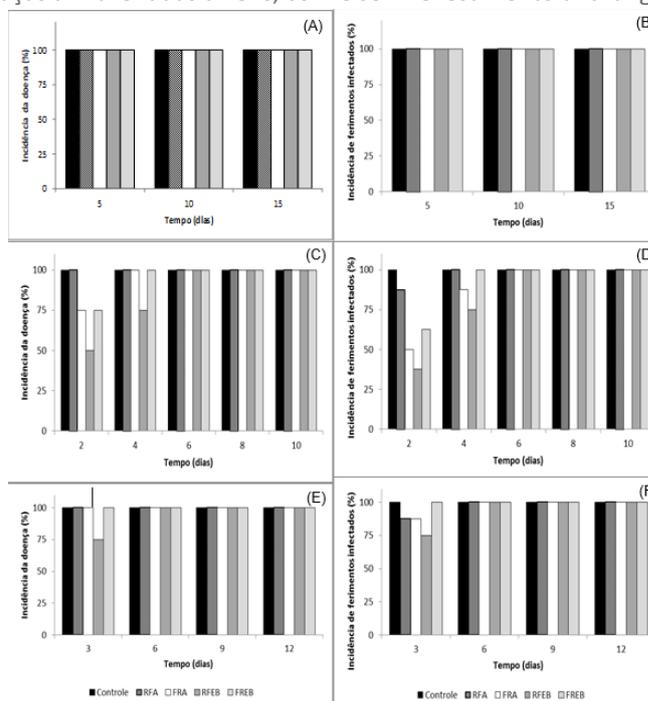
Para a análise de perda de massa, utilizou-se uma balança eletrônica semi-analítica considerando a diferença entre a massa inicial do fruto e a massa obtida a cada intervalo de tempo de amostragem. As análises foram realizadas em triplicata, nos intervalos pré-determinados. A média dos resultados foi expressa em porcentagem, calculado da seguinte forma:

Perda de Massa (%) = $P_i - P_f / P_i \times 100$, onde: P_i = peso inicial do fruto; P_f = peso final do fruto.

RESULTADO E DISCUSSÃO

A incidência da doença e de ferimentos infectados foi controlada até o quarto dia de armazenamento, nos frutos contendo revestimento antifúngico aplicado com função preventiva (RFEB), ao passo que os elaborados com solução aquosa (RFA e FRA) mostraram pouco ou nenhum controle sobre os parâmetros analisados. No segundo dia de armazenamento, o revestimento RFEB controlou em 50% a ocorrência da doença e 62,5% da infecção nos ferimentos, enquanto que a inibição pelos elaborados com solução aquosa foi de 25 e 50%. Após o quinto dia, a incidência de frutos doentes e de ferimentos infectados atingiu 100%, independente do revestimento testado e a ordem de aplicação. Em relação à ordem de aplicação dos revestimentos antifúngicos, o efeito preventivo prevaleceu, ou seja, mesmo que o fungo se instale, o seu desenvolvimento para evolução da infecção ocorre de forma mais lenta. (Figura 1).

Figura 1. Incidência de doença e de ferimentos infectados por *Penicillium expansum* em maçãs armazenadas a 25°C, com e sem revestimento antifúngico.

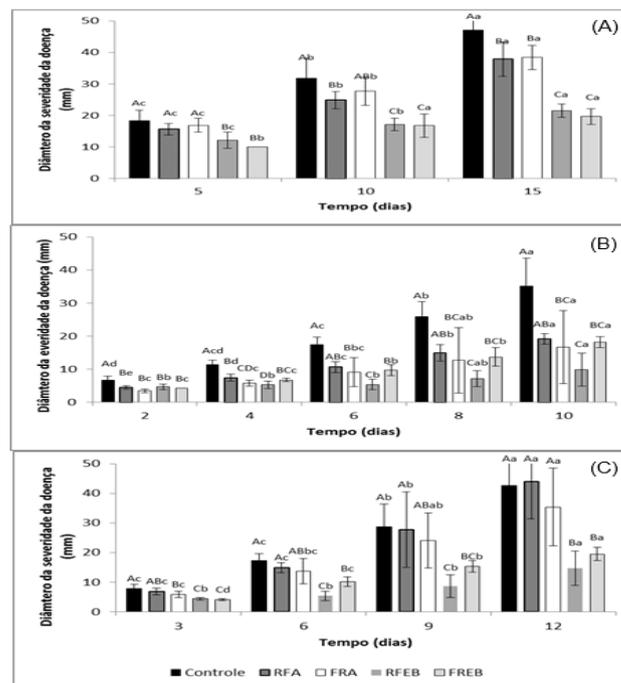


Controle: Fruto sem revestimento, ferido e inoculado com *P. expansum*; RFA: revestimento à base de água / ferimento / inoculação; FRA: ferimento / revestimento à base de água / inoculação; RFEB: revestimento antifúngico / ferimento / inoculação; FRES: ferimento / revestimento antifúngico / inoculação. (A e B) Piloto 1 - tempos 5, 10 e 15 dias, (C e D) Piloto 2 - tempos 2, 4, 6, 8 e 10 dias, (E e F) Piloto 3 - tempos 3, 6, 9 e 12 dias. Fonte: Autoria própria (2020).

Na Figura 2 estão apresentados os resultados dos diâmetros das lesões (severidade da doença) ao longo do período de armazenamento a 25°C nos três pilotos realizados.

Os revestimentos contendo composto antifúngico apresentaram um controle eficiente do aumento das lesões infectadas até o último dia de observação, quando comparados com os frutos não revestidos ($p \leq 0,05$). Por outro lado, o controle das lesões nos frutos revestidos sem composto antifúngico foi bastante variável. As primeiras 48 horas foram caracterizadas pela colonização, adaptação e infecção do fruto, não sendo diferenciado o comportamento dos revestimentos com e sem antifúngico. Porém, a partir do quarto dia, foi possível observar, o tratamento RFEB que se destacou, com inibição de 67,26% do diâmetro das lesões no decimo dia (Figura 2B).

Figura 2. Severidade da doença em maçãs armazenadas a 25°C, com e sem revestimento antifúngico.



Média \pm desvio padrão de 8 dados. Em cada tempo de armazenamento, letras maiúsculas iguais, e em cada tratamento, letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de significância (teste Tukey). Controle: Fruto sem revestimento, ferido, inoculado com *P. expansum*; RFA: revestimento à base de água / ferimento / inoculação; FRA: ferimento / revestimento à base de água / inoculação; RFEB: revestimento antifúngico / ferimento / inoculação; FREB: ferimento / revestimento antifúngico / inoculação. (A) Piloto 1 - tempos 5, 10 e 15 dias, (B) Piloto 2 - tempos 2, 4, 6, 8 e 10 dias, (C) Piloto 3 - tempos 3, 6, 9 e 12 dias. Fonte: Autoria própria (2020).

Na Tabela 1 estão apresentados os valores médios das lesões nos frutos e os valores médios de controle das lesões, levando-se em consideração os três pilotos simultaneamente. Os valores médios de controle das lesões pelo revestimento antifúngico e de água (controle) foram de 55% e 20% respectivamente, com destaque para o revestimento antifúngico aplicado antes do ferimento, cujo valor médio do controle foi de 59,0%.

Tabela 1. Controle das lesões causadas por *Penicillium expansum* em maçãs.

	Valor médio das lesões (mm)*	Valor médio do controle das lesões (%)
RFA	19,03 ± 3,79 ^{AB}	21,27
FRA	19,46 ± 5,43 ^{AB}	19,49
RFEB	9,89 ± 2,45 ^B	59,08
FREB	12,05 ± 1,58 ^B	50,15
Controle	24,17 ± 4,81 ^A	-

O valor médio das lesões corresponde à média ± desvio padrão de 96 dados, nos três pilotos, durante o período de armazenamento a 25°C. Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey. O valor médio do controle das lesões corresponde à porcentagem de inibição dos frutos revestidos em relação ao controle (sem revestimento). RFA: revestimento à base de água / ferimento / inoculação; FRA: ferimento / revestimento à base de água / inoculação; RFEB: revestimento antifúngico / ferimento / inoculação; FREB: ferimento / revestimento antifúngico / inoculação. Fonte: Autoria Própria (2020).

A análise da perda de massa está relacionada com a taxa de respiração do fruto e seu ambiente de armazenamento, como umidade relativa e temperatura do ambiente, bem como com o processo deteriorativo, caracterizado pelo murchamento, amolecimento e perda de suculência do fruto (KADER, 2002). Na Tabela 2, observam-se os cinco tipos de tratamentos e os intervalos de 5, 10 e 15 dias que foram avaliados a perda de massa.

Tabela 2 – Porcentagem de perda de massa nos frutos de maçã Fuji armazenados em BOD a 25°C, ao longo de 15 dias no Piloto 1.

Tratamentos	Perda de massa (%)		
	5 dias	10 dias	15 dias
Controle	3,67±0,34 ^{Ac}	6,38±0,17 ^{ABb}	10,61±2,35 ^{Aa}
RFA	2,65±0,09 ^{Bc}	4,75±0,77 ^{Cb}	9,54±1,23 ^{ABa}
FRA	3,19±0,15 ^{ABc}	5,11±1,29 ^{Cb}	7,69±0,89 ^{Ba}
RFEB	3,15±0,04 ^{ABc}	7,11±0,24 ^{Ab}	9,02±0,76 ^{ABa}
FREB	3,11±0,68 ^{ABc}	5,76±0,12 ^{BCb}	8,92±1,34 ^{ABa}

Desvio padrão de triplicata de 4 frutos. Em cada tempo, letras maiúsculas iguais na mesma coluna, e em cada tratamento, letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey. Fonte: Autoria própria (2020).

Com os dados obtidos podemos observar a porcentagem de perda de massa nos frutos aumentou gradualmente em todos os tratamentos ao longo do período de armazenamento. A variação da perda de massa nos frutos não revestidos e com revestimento à base de água foi de 6,9%, enquanto nos frutos revestidos com composto antifúngico a variação foi de 5,9%, após 15 dias de armazenamento.

Os frutos com tratamento FRA apresentaram menor perda de massa após 10 e 15 dias, quando comparados ao controle e aos frutos com revestimento antifúngico. Isso poderia ser explicado pelo fato de que o fruto revestido após o ferimento, para análise de

efeito curativo, o que manteve a sua superfície intacta sem zonas de descontinuidade. A perda de massa evidenciada nos frutos revestidos com composto antifúngico, independente da ordem de aplicação, pode estar associado com a formação de zonas de descontinuidade entre o amido e o extrato, o que permitiu maior permeabilidade de gases, o aumento da taxa de respiração e conseqüentemente a perda de água, pois por se tratar de um fruto climatérico, é comum ocorrer um aumento da taxa de respiração ao final da fase de amadurecimento, provocando assim a perda de água e conseqüentemente, a perda de massa. Teores de umidade relativa inferiores a 90% podem acelerar o processo respiratório, ocasionando a perda de água e o murchamento dos frutos (YANG; PRATT, 1978).

Os resultados indicam que o processo de deterioração pelo fungo não é o principal fator responsável pela perda de massa dos frutos. O desenvolvimento do fungo, associado às condições de armazenamento, possibilitaram o aumento da transpiração e conseqüentemente a perda de massa em todos os frutos independente do tratamento testado.

CONCLUSÃO

O revestimento elaborado com composto antifúngico de levedura antagonista não impediu a ocorrência da doença e da infecção em maçãs, mas controlou significativamente a evolução das lesões causadas por *Penicillium expansum*.

A utilização de composto antifúngico de levedura antagonista em revestimento indica perspectivas positivas para o controle de *Penicillium expansum* em maçãs frescas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Araucária pela concessão da bolsa de Iniciação Científica, a UTFPR e ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTAL, pelo apoio financeiro, e ao LabMulti-LD, pelos equipamentos fornecidos.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, P. F. S. SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. DERAL- Departamento de Economia Rural. Fruticultura. Análise da conjuntura agropecuária safra 2016/17. Mar. 2017. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2017/Fruticultura_2016_17.pdf. Acesso em: 05 nov. 2018.

ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D. D. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. Brazilian Journal of Food Technology, Campinas, v. 17, n. 2, p. 87-97, 2014. Disponível em:

<https://search.proquest.com/openview/e711d9de36a7372b558edd818f449997/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2030117>. Acesso em: 13 nov. 2018.

BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; VAUGHAN-MARTINI, A. E. The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: the state of the art, potentialities and limitations. *FEMS yeast research*, v. 7, n. 6, p. 749-760, 2007. Disponível em:

<https://academic.oup.com/femsyr/article/7/6/749/532280>. Acesso em: 21 nov. 2018.

COELHO, A.R.; TACHI, M.; PAGNOCCA, F.C.; NÓBREGA, G.M.A.; HOFFMANN, F.L.; HARADA, K. HIROOKA, E.Y. Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia ohmeri* killer toxin as active agent against *Penicillium expansum*. *Food Additives and Contaminants*, v. 26, n. 1, p. 73-81, 2009. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030802227227>. Acesso em: 11 nov. 2018.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes. Rio de Janeiro, v. 43, p.1-62, 2016. Disponível em:

https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2016_v43_br.pdf. Acesso em: 12 out. 2019.

KADER, A. A. Postharvest Biology and Technology: an Overview. *In*: KADER, A. A. **Postharvest Technology of Horticultural Crops**. 3. ed. Oakland: UCANR Publications, 2002. cap. 4

KIST, B. B. et al. Anuário brasileiro da maçã 2018. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2018. 56 p. Disponível em:

http://www.abpm.org.br/site_us/anuariodamacabrasileira2018.pdf. Acesso em: 05 nov. 2018.

MACARISIN, D.; DROBY, S.; BAUCHAN, G.; WISNIEWSKI, M. Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist-fruit interaction: A new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol? *Postharvest Biology and Technology*, v. 58, n 3, p. 194-202, 2010. DOI: Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925521410001584?via%3Dihub>. Acesso em: 21 set. 2019

OLIVEIRA, E. N. A.; SANTOS, D. C. Tecnologia e processamento de frutos e hortaliças. Natal: IFRN, 234p., 2015. Disponível em:

<https://memoria.ifrn.edu.br/bitstream/handle/1044/363/Tecnologia%20e%20Processamento%20de%20Frutos%20e%20Hortalic%CC%A7as%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y> .

Acesso em: 10 nov. 2018.

PARISI, M. C. M.; HENRIQUE, C. M.; PRATI, P. Doenças pós-colheita: um entrave na comercialização. *Pesquisa & Tecnologia*, vol. 12, n. 2, jul- dez 2015. PEREIRA, Márcio Eduardo Canto et al. Aplicação de revestimento comestível para conservação pós-colheita da manga Tommy Atkins em temperatura ambiente. In: Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO E FRUTICULTURA, 2004, Florianópolis. Anais [...]. SBF: Governo do Estado: Epagri, 2004. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPATSA/30144/1/OPB835.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2018.

SCOGNAMIGLIO, H. Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo. Assessoria de Comunicação e Imprensa da FAAC, 11 dezembro 2017. Disponível em: <https://acifaacunesp.com/2017/09/17/brasil-e-o-terceiro-maior-produtor-de-frutas-do-mundo/>. Acesso em: 31 out. 2018.

YANG, S.F.; PRATT, H.K. The physiology of ethylene in wounded plant tissue. In: KAHL, G. (Ed.). **Biochemistry of wounded plant tissues**. Berlin: Walter de Gruyter, 1978. p.596-622.