



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

Controle da podridão azul em maçãs pós-colheita

Control of blue rot in postharvest apples

Laura Fernandes Campos*, Alexandre Rodrigo Coelho[†],
Fabiana Fiusa Ferreira[‡], Douglas Rangel da Costa[§], Marianne Ayumi Shirai[¶],
Lyssa Setsuko Sakanaka[‡]

RESUMO

Este trabalho avaliou o efeito antifúngico de revestimento elaborado com toxina killer de levedura antagonista no controle da podridão azul em maçãs pós-colheita. O revestimento com propriedade antifúngica (RFEB) foi preparado com o extrato livre de células de *Hansenula wingei* e aplicado em maçãs pós-colheita, seguido de fermento dos frutos e inoculação com *Penicillium expansum*. As maçãs foram armazenadas a 25°C por 12 dias e o efeito antifúngico do revestimento RFEB foi avaliado por meio percentagem de frutos doentes, percentagem de ferimentos infectados, severidade da doença e controle das lesões. A podridão dos frutos foi avaliada pela determinação do pH, sólidos solúveis totais e percentagem de perda de massa. Após o armazenamento a 25°C/12 dias, 90% das maçãs revestidas com RFEB estavam doentes e 80% dos ferimentos estavam infectados. Entretanto, a ação inibitória do RFEB sobre a severidade da doença foi significativa, cujo controle das lesões foi 53%. As maçãs apresentaram teores de pH e sólidos solúveis correspondentes ao processo de amadurecimento natural dos frutos e o revestimento reduziu significativamente a perda de massa. O revestimento antifúngico contendo a toxina killer de *Hansenula wingei* pode ser usado como uma nova estratégia para o controle da podridão azul em maçãs pós-colheita.

Palavras-chave: Levedura, Fruta, Antagonismo, Toxina killer, *Penicillium expansum*

ABSTRACT

This work evaluated the antifungal effect of a coating made with killer toxin of an antagonistic yeast in the control of blue rot in postharvest apples. The coating with antifungal property (RFEB) was prepared with the cell-free extract of *Hansenula wingei* and applied to postharvest apples, followed by wounding the fruits and inoculation with *Penicillium expansum*. The apples were stored at 25°C for 12 days and the antifungal effect of the RFEB coating was evaluated by the percentage of diseased fruits, the percentage of infected wounds, the severity of disease and the control of lesions. Fruit rot was evaluated by determining pH, total soluble solids and the percentage of weight loss. After storage at 25°C/12 days, 90% of the RFEB-coated apples were diseased and 80% of the wounds were infected. However, the inhibitory action of RFEB on the severity of the disease was significant, whose control of lesions was 53%. The apples showed pH and soluble solids corresponding to the natural ripening process of the fruits and the coating significantly reduced mass loss. The antifungal coating containing the *Hansenula wingei* killer toxin can be used as a new strategy for the control of blue rot in postharvest apples.

Keywords: Yeast, Fruit, Antagonism, Killer toxin, *Penicillium expansum*

* Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil; lauracampos@hotmail.com

[†] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina; arcoelho@utfpr.edu.br

[‡] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil; fabianaf.f@hotmail.com

[§] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil; douglas.costa@agraria.com.br

[¶] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil; marianneshirai@utfpr.edu.br

[‡] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil; lyssa@utfpr.edu.br



1 INTRODUÇÃO

As podridões de ordem fúngica são as principais doenças pós-colheita de maçã e as infecções podem ocorrer nos pomares ou nas câmaras frias durante o armazenamento (OGOSHI et al., 2019). A podridão azul, causada por *Penicillium expansum*, é a doença pós-colheita mais comum em maçãs (PITT, HOCKING, 2009).

É possível que alguma tecnologia contenha as podridões de ordem fúngica, diminuindo assim o desperdício de frutos e garantindo qualidade na conservação e tempo de vida do alimento?

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). Com o intuito de reduzir perdas dos frutos e devido às restrições de resíduos de agrotóxicos aplicados na pós-colheita, surge a oportunidade de novos métodos para o controle de podridão. A utilização de revestimentos antifúngicos seria uma alternativa viável, que reduziria a incidência de podridão, preservando a qualidade dos frutos, e consequentemente minimizando maiores perdas econômicas (CANAVAR, DI PIERO, 2011).

Com base no pressuposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antifúngico de revestimento elaborado com composto antifúngico de levedura antagonista no controle da podridão azul em maçãs pós-colheita.

2 MÉTODO

2.1 Obtenção do antifúngico natural

Para a obtenção do composto antifúngico, *Hansenula wingei* AM2₂ (CMRP4947) foi ativada em 25 mL de caldo MPL (25°C / 24h), padronizada (3,0 x 10⁶ células) e transferida para Erlenmeyers contendo 50 mL do mesmo Caldo. O cultivo (96h / 25°C) foi centrifugado a 10.000 rpm por 15min e filtrado em membrana de 0,20 µm (COELHO, et al., 2009). O extrato bruto (EB) contendo composto antifúngico foi homogeneizado e armazenado em frascos âmbar a - 20°C para elaboração da solução filmogênica.

2.2 Elaboração do revestimento antifúngico

O revestimento foi elaborado conforme descrito por Costa et al. (2019), empregando-se a técnica de *casting*, com dispersão de amido de aveia em água destilada e glicerol, como agente plastificante. Em um becker contendo 90 mL de EB com composto antifúngico foi adicionado 4 g de amido, seguido de agitação (agitador magnético) por 15 min em temperatura ambiente. Paralelamente, uma solução de glicerol a 20% foi preparada, utilizando-se 0,8 mL de glicerol em 9,2 mL de EB. Como controle, foi elaborada uma formulação do revestimento sem o composto antifúngico, substituindo-o integralmente o volume de EB com água destilada. As duas formulações foram aquecidas a 90°C por 30 min para a gelatinização dos grânulos de amido de aveia, originando os revestimentos antifúngico e aquoso (controle).

2.3 Ensaio antifúngico *in situ*

O ensaio antifúngico *in situ* compreendeu 3 Tratamentos: T1 (RFA): Fruto revestido com formulação à base de água destilada, seguido de fermento e inoculação com *P. expansum*; T2 (RFEB): Fruto revestido com formulação à base de EB (extrato livre de células contendo composto antifúngico), seguido de fermento e inoculação com *P. expansum*; C (Controle): Fruto sem revestimento, ferido e inoculado com *P. expansum*.



Para a aplicação do revestimento, os frutos foram submersos individualmente por 1 min em um béquer contendo a solução filmogênica a 30°C, seguido de secagem em BOD (25°C / 24 horas). Dois ferimentos (2,5 mm de profundidade e 3,0 mm de largura) foram realizados na porção superior do fruto, seguido de inoculação de uma alíquota de 10 µL da suspensão de *P. expansum* (previamente padronizado em 10⁵ conídios/mL). Os frutos foram armazenados individualmente em potes plásticos higienizados (10,0 cm Largura X 8,5 cm altura), e incubados em BOD a 25°C por 12 dias.

O efeito antifúngico do revestimento RFEB foi avaliado por meio da determinação da porcentagem de frutos doentes, porcentagem de ferimentos infectados, severidade da doença e controle das lesões. Para estas análises, 4 frutos de cada tratamento foram avaliados nos tempos 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias.

Para a determinação da porcentagem de frutos doentes, o fruto foi considerado doente quando pelo menos um ferimento apresentasse sinal de podridão. Na determinação da porcentagem de ferimentos infectados, foi considerado positivo o ferimento que apresentasse sinais de infecção de desenvolvimento do fungo.

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. A porcentagem de controle das lesões (%CL) foi calculada da seguinte forma: $(\%CL) = [(D_c - D_t) / D_c] \times 100$, onde D_c é a média do diâmetro das lesões no fruto sem revestimento (controle) e D_t é a média do diâmetro das lesões no fruto com revestimento.

2.4 Análises físico-químicas e perda de massa

A podridão dos frutos foi avaliada pela determinação do pH e sólidos solúveis totais (AOAC, 1995) e pela porcentagem de perda de massa. As análises de pH e sólidos solúveis totais foram realizadas em triplicata, nos tempos inicial e final (0 e 12 dias). Para determinar a porcentagem de perda de massa, foi utilizada 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 tempos de armazenamento de 2 e 12 dias.

2.5 Análise estatística

Os dados obtidos para a severidade da doença foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Foi empregado o programa Statistica 12.0 (Statsoft, USA).

3 RESULTADOS

Os dados apresentados na Figura 1A e 1B mostram que a incidência da doença e de ferimentos infectados ocorreu nos frutos, independentemente do revestimento aplicado. Enquanto a doença atingiu 90 e 100% dos frutos revestidos com e sem composto antifúngico, respectivamente, após 12 dias, a porcentagem de ferimentos infectados foi de aproximadamente 80 e 90%.

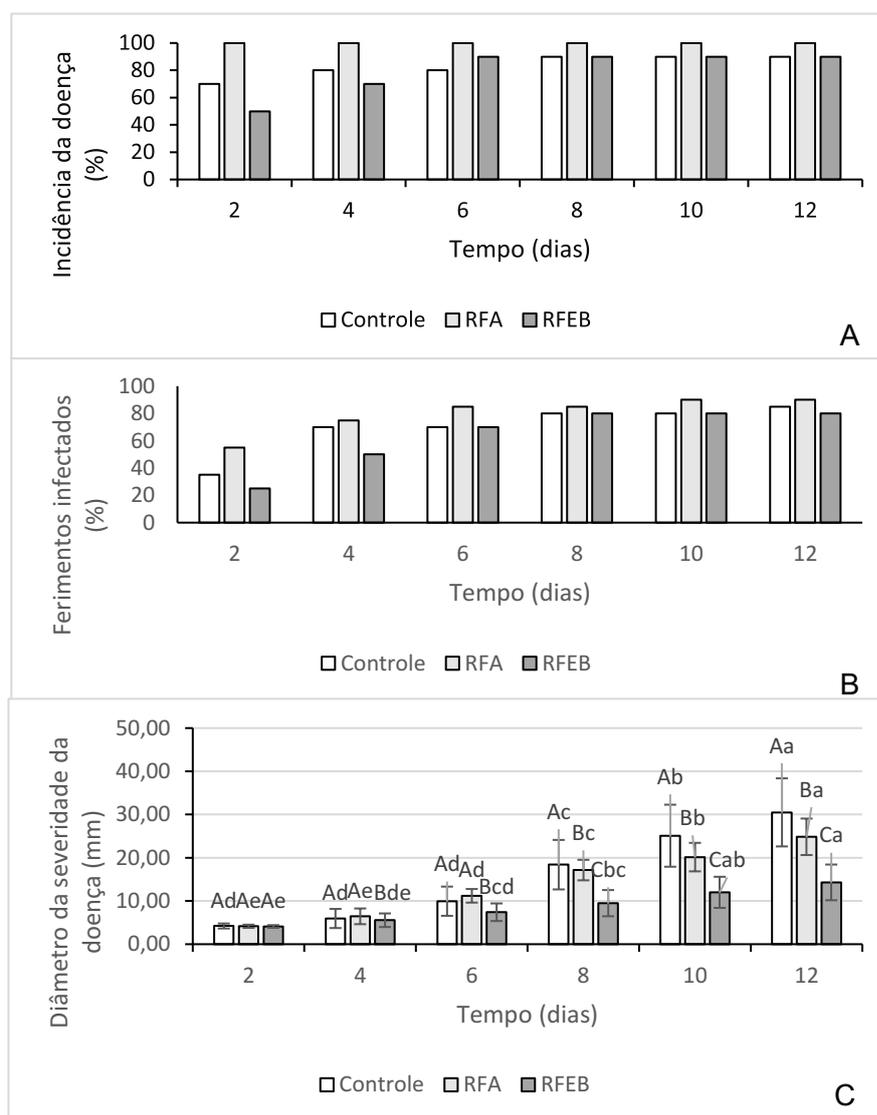
Entretanto, a ação inibitória do REFB sobre a severidade da doença foi significativa após 12 dias de armazenamento (Figura 1C), onde a doença foi controlada em 53% ($p \leq 0,05$). Para o revestimento RFA, o controle da severidade da doença foi de apenas 18% no final do experimento (Figura 1C).

A variação dos diâmetros das lesões nos frutos RFEB entre o segundo e o décimo segundo dia foi baixa (10 mm), enquanto que nos frutos RFA e sem revestimento, foi de aproximadamente 21 e 26 mm (Figura 1C).



Estas variações evidenciam um efeito retardado na deterioração dos frutos revestidos com composto antifúngico ao longo do armazenamento, quando comparado com uma velocidade mais acelerada nos demais tratamentos. Os dados reforçam uma forte ação inibitória do composto antifúngico presente no RFEB contra o desenvolvimento de *P. expansum*, quando comparado com o revestimento RFA.

Figura 1 – Incidência de doença e de ferimentos infectados por *P. expansum* em maçãs armazenadas a 25°C por 12 dias, com e sem revestimento fúngico.



A: incidência da doença (média aritmética de 4 respostas); **B:** incidência de ferimentos infectados (média aritmética de 4 respostas); **C:** severidade da doença (média \pm desvio padrão de 8 respostas), sendo que em cada tempo de armazenamento, letras maiúsculas iguais, e em cada tratamento, letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. Controle: Fruto sem revestimento, ferido e inoculado com *P. expansum*; RFA: revestimento aquoso / ferimento / inoculação; RFEB: revestimento antifúngico / ferimento / inoculação.



Fonte: Autoria própria (2021)

Na Tabela 1 estão apresentados os valores de pH, sólidos solúveis e a porcentagem de perda de massa dos frutos armazenados por 12 dias. Os parâmetros físico-químicos analisados não foram considerados como fatores limitantes para o desenvolvimento do fungo; ao contrário, possibilitaram as condições ideais para a germinação dos conídios e crescimento das hifas. Enquanto os valores de pH mantiveram-se estáveis, com variação de 0,1 nos frutos sem revestimento, 0,1 nos frutos com revestimento aquoso e 0,2 nos frutos com revestimento antifúngico, o aumento dos teores de sólidos solúveis foi de 2,2, 3,9 e 2,5, respectivamente (Tabela 1). Portanto, o retardamento na severidade da doença em maçãs revestidas está diretamente relacionado ao efeito protetor do revestimento, principalmente antifúngico, e não aos parâmetros físico-químicos.

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos e perda de massa dos frutos armazenados a 25°C por 12 dias.

	pH		Sólidos solúveis (°Brix)		Perda de massa (%)	
	0 dias	12 dias	0 dias	12 dias	2 dias	12 dias
Controle	4,2±0,2 ^{Aa}	4,3±0,2 ^{Aa}	13,4±0,5 ^{Ab}	15,6±0,7 ^{Aa}	1,64±0,32 ^{Ab}	9,15±1,7 ^{Aa}
RFA	4,3±0,2 ^{Aa}	4,4±0,2 ^{Aa}	12,4±0,7 ^{Bb}	16,3±1,8 ^{Aa}	1,63±0,27 ^{Ab}	8,50±1,40 ^{Ba}
RFEB	4,2±0,1 ^{Aa}	4,4±0,2 ^{Aa}	12,9±0,4 ^{ABb}	15,4±1,7 ^{Aa}	1,56±0,34 ^{Ab}	8,52±1,60 ^{Ba}

Média ± desvio padrão de triplicata. 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 (2021).

A porcentagem de perda de massa dos frutos analisados aumentou significativamente em todos os tratamentos entre o segundo e o décimo segundo dia de armazenamento (Tabela 1). Entretanto, após 12 dias os tratamentos RFA e RFEB apresentaram menor perda de massa quando comparado com o controle. A variação da perda de massa nos frutos não revestidos (controle) foi de 7,5%, e com revestimento à base de água (RFA) foi de 6,9%, enquanto que nos frutos revestidos com composto antifúngico (RFEB) a variação foi de 7,0%, após 12 dias de armazenamento.

4 CONCLUSÃO

O revestimento contendo composto antifúngico não inibiu a ocorrência de doença e de infecções por *Penicillium expansum* nas maçãs armazenadas por 12 dias a 25°C, porém controlou significativamente as lesões causadas pelo fungo nos frutos. As maçãs apresentaram pH e teor de sólidos solúveis correspondentes ao processo de amadurecimento natural dos frutos e o revestimento reduziu significativamente a perda de massa.

O revestimento antifúngico contendo a toxina killer de *Hansenula wingei* pode ser usado como uma nova estratégia para o controle de *Penicillium expansum* em maçãs pós-colheita.

AGRADECIMENTOS



Os autores deste trabalho agradecem a Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR campus Londrina, pelo apoio financeiro, e a Fundação Araucária, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica à Laura Fernandes Campos.

REFERÊNCIAS

- OGOSHI, Cláudio, et al. Podridões pós-colheita em maçã: perdas econômicas e alternativas de manejo. *In: Encontro nacional sobre fruticultura de clima temperado, XVI*, 2019, Friburgo, SC. Anais [...]. Caçador: Epagri, vol. 1 (palestras), 2019. p.130. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1114434/1/AnaisXVIEnfrutePalestras2019.pdf#page=83>. Acesso em: 10 jan. 2020.
- PITT, J. I., HOCKING, A. D. *Fungi and food spoilage*. *In: Penicillium and Related Genera*. Cap.7. p. 169-263. New York: Springer, p.519. 2009. DOI 10.1007/978-0-387-92207-2. Disponível em: [https://www.scirp.org/\(S\(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45\)\)/journal/paperinformation.aspx?paperid=84342](https://www.scirp.org/(S(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45))/journal/paperinformation.aspx?paperid=84342). Acesso em: 14 out. 2019.
- 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.
- CANAVER, B. S.; DI PIERO, R. M. Quitosana e adjuvantes para o controle preventivo do mofo azul da macieira. *Tropical Plant Pathology*, v. 36, n. 6, p. 419-423, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1982-56762011000600013&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 25 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.
- COSTA, D.; FERREIRA, F. F.; SHIRAI, M. A.; SAKANAKA, L. S.; COELHO, A. R. Caracterização de filme à base de amido de resíduo de aveia com composto antifúngico natural. *Higiene Alimentar*, v. 33, n. 3, p. 2734-2743, 2019. Disponível em: https://www.higienealimentar.com.br/wp-content/uploads/2019/06/Anais-Higienistas-2019_web-2.pdf. Acesso em: 15 jun. 2019.