

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CURSO DE AGRONOMIA

AValiação de QUITOSANA PARA O CONTROLE DA PODRIDÃO
AMARGA DA MACIEIRA

Ricardo Barbosa Felipini

Monografia apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo no curso de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis
2008

AVALIAÇÃO DE QUITOSANA PARA O CONTROLE DA PODRIDÃO AMARGA DA MACIEIRA

Ricardo Barbosa Felipini

Termo de aprovação

Monografia apresentada como requisito parcial para a obtenção de grau de Engenheiro Agrônomo no curso de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

BANCA EXAMINADORA:

ROBSON MARCELO DI PIERO
Prof. Dr., Depto. de Fitotecnia/CCA/UFSC - Orientador

MARCIEL JOÃO STADNIK
Prof. Dr., Depto. de Fitotecnia/CCA/UFSC

PEDRO MONDINO
Prof. Dr., UDELAR - URUGUAY

BRUNO SACCONI CANAVER
Engenheiro Agrônomo

IDENTIFICAÇÃO DO ESTÁGIO

Estagiário: Ricardo Barbosa Felipini

E-mail: ricardo_felipi@yahoo.com.br

Supervisor e Orientador: Prof. Robson Marcelo Di Piero

Área de Estágio: Fitotecnia / Fitopatologia

Período do Estágio: 4 de Março a 9 de Junho

Carga Horária: 560 horas

Local do Estágio: CCA/UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

Endereço: Laboratório de Fitopatologia CCA/UFSC

Rodovia Admar Gonzaga, 1346. Cx. Postal 476

CEP 88040-900 – Florianópolis/SC

Telefone: 55 – 48 – 3721 5423

Home page: <http://www.cca.ufsc.br/labfitop>

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina por disponibilizar o curso de Agronomia, e aos funcionários que diariamente fazem desta instituição um lugar comprometido com a formação dos estudantes.

À minha família, mãe e irmãs, pelo apoio, compreensão e força nesta jornada.

Ao Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero pela oportunidade de realização do estágio, e pelos conhecimentos técnicos transmitidos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa de estudos;

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia que me ajudaram na realização dos trabalhos.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
A cultura da macieira	8
Aspectos botânicos e fisiológicos	8
Aspectos agroeconômicos	9
Colheita e pós-colheita	10
<i>Colletotrichum acutatum</i>	11
Quitosana e aplicações na fitopatologia	12
3. OBJETIVOS	14
Objetivo geral	14
Objetivos específicos	14
4. METODOLOGIA	17
Obtenção do isolado	17
Obtenção da quitosana	17
Obtenção dos frutos	17
Bioensaios <i>in vitro</i>	17
Germinação de esporos	17
Crescimento micelial	18
Bioensaios <i>in vivo</i>	19
Avaliação da atividade de peroxidases nos frutos	20
Análise estatística	21
5. RESULTADOS	21
Bioensaios <i>in vitro</i>	22
Bioensaios <i>in vivo</i>	23
6. DISCUSSÃO	28
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
8. REFERÊNCIAS	33

RESUMO

O estado de Santa Catarina é atualmente o maior produtor de maçãs no Brasil, atendendo tanto o mercado nacional quanto as exportações para vários países. Entre as doenças que acarretam danos à cultura da macieira encontra-se a Podridão Amarga, causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum*. Neste trabalho procurou-se avaliar o efeito *in vitro* da quitosana sobre o fitopatógeno e *in vivo* sobre maçãs inoculadas com *C. acutatum*, analisando-se o efeito do polissacarídeo sobre a severidade da doença. Para isso, nos ensaios *in vitro*, suspensões de esporos do fungo com concentração de 10^5 esporos/mL foram colocadas em lâminas escavadas, sobre as quais foram testadas as concentrações de 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de quitosana, além das testemunhas de água destilada e ácido clorídrico a 5%. Também avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de quitosana (1, 2, 3, 4 e 5 mg/mL) sobre o crescimento micelial, quando o polissacarídeo foi incorporado ao meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar. Nos testes *in vivo*, para avaliar o efeito da quitosana no controle da Podridão Amarga, maçãs (cv. Fuji) foram inoculadas com suspensão de esporos de *C. acutatum* com concentração (10^5 conídios/mL) e, após 24 horas em câmara úmida, os frutos foram imersos em suspensão de quitosana. Primeiramente, foram testadas as concentrações de 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg/mL de quitosana com pH ajustado para 5,6. Posteriormente, avaliou-se o efeito da dose mais eficaz (10 mg/mL) sobre maçãs inoculadas com diferentes concentrações de *C. acutatum* (10^3 , 10^4 e 10^5 esporos/mL), bem como o efeito do pH da solução de quitosana. Na seqüência, avaliou-se o efeito da quitosana com pH 4,0 sobre maçãs cv. Gala inoculadas com o agente causal da Podridão Amarga. Finalmente, foi avaliado o efeito da quitosana, da inoculação com o patógeno e de fermentos para a indução da atividade de peroxidases nos frutos. Nos testes *in vitro*, foi observado que a quitosana reduziu a germinação de esporos do fitopatógeno, além de causar alterações morfológicas no tubo germinativo. Quanto ao crescimento micelial, a quitosana a 4 mg/mL teve efeito fungistático, reduzindo em mais de 40% o progresso do crescimento micelial quando comparada à testemunha.. Em pós-colheita a quitosana reduziu a severidade da Podridão Amarga, sendo seu efeito diretamente relacionado com a dose utilizada, e que sua eficiência também está relacionada ao pH em que é aplicada, sendo mais eficaz nos experimentos o pH 4,0. Com relação ao teste enzimático, não houve aumento na atividade de peroxidases em frutos tratados com quitosana. Com base nos resultados, a redução da severidade da Podridão Amarga foi relacionada ao efeito direto da quitosana sobre o fitopatógeno.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Santa Catarina é hoje o estado que mais produz maçãs no Brasil, favorecido por condições ambientais dos municípios situados em maior altitude, assim como pelo desenvolvimento de pesquisas nos últimos anos que levaram à difusão da cultura (EPAGRI, 2002).

A Podridão Amarga causada por *Colletotrichum acutatum* em maçãs é uma das doenças de maior importância na cultura da macieira (DENARDI et al., 2003). A infecção ocorre ainda no campo, e pode permanecer latente por tempo variável de acordo com as condições do ambiente, vindo a se manifestar ainda no campo ou nos frutos armazenados. Preconiza-se no manejo convencional da doença a aplicação de fungistáticos ainda no campo, quando em condições favoráveis ao patógeno, e armazenamento em câmara fria dos frutos, com atmosfera controlada ou modificada (BONETI et al., 2002).

Materiais ricos em quitina, tais como a carapaça de crustáceos, são encontrados em grande quantidade no litoral brasileiro e, muitas vezes, acarretam custos associados ao seu destino final (PENISTON; JOHNSON, 2008). A partir da desacetilação desta matéria-prima, se obtém a quitosana, e a possível utilização dessa biomolécula na agricultura, visando o controle de doenças em plantas, poderia trazer benefícios à sociedade dos pontos de vista agrônomo, econômico e ambiental.

Inicialmente empregada na área farmacêutica, a quitosana tem sido pesquisada para sua utilização na agricultura, com destaque para o controle de fitopatógenos, devido às suas propriedades antimicrobianas.

O presente trabalho foi desenvolvido a partir do Estágio de Conclusão de Curso realizado no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias, na Universidade Federal de Santa Catarina, entre o período de março a junho de 2008. Neste estudo se buscou avaliar o potencial de utilização da quitosana no agronegócio da macieira para o controle da Podridão Amarga, bem como estudar os mecanismos de ação envolvidos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cultura da macieira

2.1.1. Aspectos botânicos e fisiológicos

A evolução da macieira iniciou há cerca de 25 milhões de anos, originando-se no Cáucaso, região montanhosa da Ásia, entre o Mar Negro, Cáspio e o leste da China, em uma altitude de cerca de 2.000 metros. Supõe-se que o início do seu cultivo ocorreu na Grécia cerca de 200 a.C. Hoje existem mais de 7.000 variedades de maçãs conhecidas, porém aproximadamente 40 apresentam importância econômica (BLEICHER, 2002).

A macieira, *Malus domestica*, pertence à família Rosaceae, a qual abrange aproximadamente 100 gêneros e mais de 2000 espécies. A subfamília da qual faz parte, Pomoideae, caracteriza-se por um profundo receptáculo na forma de taça, cujas paredes inferiores se unem aos carpelos, os quais se unem entre si e contém dois grandes óvulos. O fruto é constituído pelo receptáculo desenvolvido, carnudo, e envolve os ovários, cujo endocarpo é coriáceo e contém uma única semente. Quando adulta, é uma planta lenhosa, decídua, de clima temperado, adaptando-se bem em diferentes condições (LUCHI, 2002).

A importância das baixas temperaturas consiste em diminuir os inibidores de crescimento, e aumentar a concentração de promotores de crescimento, fazendo com que a planta saia do período de dormência, que ocorre durante o inverno. Quando não há frio suficiente, a quebra de dormência pode ser auxiliada por métodos culturais, incluindo a aplicação de produtos químicos. Condições adequadas para a saída do período de dormência favorecem a frutificação mais uniforme (PETRI et al., 2002b).

Dentre as principais cultivares produzidas no Brasil, destacam-se a Fuji e a Gala. A cultivar Fuji é uma das mais plantadas no país (38% da área cultivada), por suas qualidades organolépticas e alta produtividade. Originada no Japão, foi introduzida no Brasil em 1967. Se comparada com a Gala, a Fuji é mais exigente em frio hibernal. É suscetível à Podridão Amarga e à Sarna. A maturação dos frutos ocorre entre o final de março e o início de abril, sendo mais tardia em regiões mais frias. Possui tamanho médio a grande, com formato redondo a oblongo, cálice grande e aberto e pedúnculo médio. Em regiões mais quentes, os frutos tornam-se menores, e de tamanho desuniforme. A epiderme é rosa-pálida, estriada, lisa, com coloração de fundo verde, tornando-se amarelo com o amadurecimento. A polpa é aromática, amarelo-clara, firme, crocante e suculenta. Em câmara fria, conserva-se por até seis meses em atmosfera comum e até doze meses em atmosfera controlada (CAMILO; DENARDI, 2002).

A cultivar Gala também é bastante cultivada no Brasil. Sua popularidade vem crescendo devido à qualidade degustativa e aparência dos frutos. Originária da Nova Zelândia, a planta adapta-se bem em altitudes superiores a 1300 metros. Trata-se de uma cultivar precoce, produzindo entre a segunda quinzena de janeiro e a segunda quinzena de fevereiro, de maneira desuniforme, necessitando vários repasses. Os frutos apresentam epiderme vermelho-rajada sobre fundo amarelo, lisa, brilhante, sendo a coloração mais intensa em locais mais expostos ao sol. O tamanho dos frutos é de pequeno a médio, com formato redondo cônico, polpa amarelo-creme, firme, crocante, suculenta. O armazenamento dos frutos de maçã da cultivar Gala em câmara fria convencional é feito por até três meses, perdendo o sabor e a textura quando mantidos além deste período, ou até cinco meses quando em atmosfera controlada (CAMILO; DENARDI, 2002).

Conforme Luchi (2002), as taxas de crescimento, a forma e o tamanho na maturidade dos frutos variam conforme a cultivar, assim como o local onde a planta é cultivada. Durante o desenvolvimento fisiológico do fruto, primeiramente há alta taxa metabólica e respiração, devido ao intenso processo de divisão celular, desde o início da formação até três a quatro semanas após a plena floração.

No segundo estágio, inicia-se a diferenciação dos tecidos, e o aumento do fruto, juntamente com o teor de matéria seca. O terceiro estágio é caracterizado pela maturação fisiológica, e ao final ocorre a maturação comercial do fruto, quando inicia a oxidação de ácidos orgânicos e a hidrólise de amido, juntamente com a modificação da coloração da casca e produção de antocianinas e carotenóides, que varia de acordo com a cultivar, incidência de luz e temperatura. Ainda neste período ocorre o aumento da produção endógena de etileno e aceleração da atividade enzimática (LUCHI, 2002).

2.1.2. Aspectos agroeconômicos

A cultura da macieira em Santa Catarina foi impulsionada a partir da década de 1970, influenciada por uma política de incentivos fiscais visando aumentar a produção e diminuir as importações de maçãs. Neste contexto, o estado se tornou o maior produtor deste fruto do país (NACHTIGALL, 2004).

Conforme os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2005), o estado possuía, em 2005 a área plantada de mais de 18.000 hectares, com valor correspondente a aproximadamente 260 milhões de reais por ano.

Dados fornecidos pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – (EPAGRI), descritos por Vieira (2007), indicam que a área plantada na safra de 2007, no estado, foi superior a 19.000 ha, com produtividade média de 31 toneladas/ha. Isto corresponde a mais de 50% da área total cultivada com esta frutífera no país, que ficou acima de 37.000 ha. Assim, Santa Catarina se manteve como o maior produtor de maçãs no Brasil.

Ainda conforme os dados apresentados pelo mesmo autor, apesar da valorização do Real frente ao Dólar, as exportações na primeira metade do ano passado dobraram em relação ao ano anterior. Entre os principais destinos da maçã brasileira encontram-se países da União Européia como Holanda, Reino Unido, França, Alemanha, Suécia, Portugal e Itália. Mais recentemente, houve incremento em outros mercados, como Japão, Índia e Canadá.

2.1.3. Colheita e pós-colheita

A colheita é realizada de acordo com as características físico-químicas, determinadas por parâmetros como penetrometria, teor de sólidos solúveis totais, índice de iodo-amido e coloração de fundo da película. Os frutos devem ser colhidos com o pedúnculo, evitando danos mecânicos durante esta etapa.

Antes de serem encaminhados à classificação, deve haver uma pré-seleção a campo dos frutos, excluindo aqueles com ferimentos ou com problemas fitossanitários, principalmente podridões (PETRI et al., 2002a).

O processo de classificação das maçãs ocorre de acordo com normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, para facilitar o processo de distribuição e comercialização. Para tanto, consideram-se no processo as características dos frutos, principalmente coloração da casca, forma e tamanho, agrupando-os em quatro classes distintas, entre tipos de 1 a 4, que por fim são acondicionadas em caixas, geralmente de papelão, com tamanho também padronizado por portaria do MAPA.

O armazenamento convencionalmente ocorre em atmosfera controlada, onde além do controle de temperatura e umidade, monitoram-se as concentrações de oxigênio e gás carbônico. O principal objetivo é retardar o processo de senescência, através da diminuição do metabolismo, sem alterar as qualidades das maçãs (PETRI et al., 2002a).

Armazenar sob baixas temperaturas também é uma forma de retardar o desenvolvimento de patógenos que causam danos no pós-colheita, principalmente de fungos. O ataque inicial de doenças que se desenvolvem no pós-colheita geralmente ocorre como resultado de um dano mecânico durante a colheita, transporte ou beneficiamento, ou ainda pela predisposição do fruto ao ataque por mudanças físicas ou fisiológicas. Há então uma

infecção inicial por um ou vários patógenos, potencializada pela infecção secundária por microrganismos saprófitas não específicos. Deste processo ocorrem perdas quantitativas, pela quebra extensiva dos tecidos sadios do hospedeiro, ou qualitativas, devido aos defeitos ou doença na superfície do fruto, que os tornam menos atrativos aos consumidores (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

O fungo causador da Podridão Amarga em maçãs, apesar de poder atacar frutos intactos, possui maior agressividade e progresso da doença mais rápido em frutos com ferimentos (CLINTON apud DENARDI et al., 2003). As perdas de maçãs pela Podridão Amarga podem chegar a mais de 50% da produção, conforme Bleicher (1980).

2.2. *Colletotrichum acutatum*

Classificado na ordem *Melanconiales* da classe *Coelomycetes*, o fungo deste gênero, junto com sua fase perfeita, é considerado um dos maiores patógenos de plantas no mundo. *C. acutatum*, que causa Podridão Amarga em maçãs, é uma espécie cuja fase perfeita corresponde ao ascomiceto do gênero *Glomerella* (BAXTER et al. apud HAMADA, 2005).

Conforme Boneti et al. (1999), *C. gloeosporioides*, *Colletotrichum* sp. e *C. acutatum* são espécies patogênicas a folhas e frutos, porém as duas primeiras são mais agressivas no caso de manchas foliares. A metodologia utilizada por Crusius et. al. (2002) indica a diferenciação das espécies pela coloração da colônia, temperatura ótima de desenvolvimento, forma dos conídios e sensibilidade ao fungicida Benomyl.

Uma das doenças mais importantes na cultura da macieira é a Podridão Amarga. Conforme observações feitas nos Estados Unidos, citadas por Bleicher (2002), a Podridão Amarga nos frutos causada por *Glomerella cingulata* está associada à presença de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. É possível que seja o mesmo complexo etiológico que causa Podridão Amarga no sul do Brasil. Há grande variação entre raças fisiológicas, tanto em relação aos sintomas, quanto às condições ideais para a infecção.

Os esporos de *C. acutatum* são dispersos a partir dos acérvulos, principalmente pela água, e ao se depositarem na planta, germinam, quando o ambiente está favorável, podendo emitir apressórios e penetrar através das lenticelas ou ferimentos. Esta infecção pode ocorrer logo após a floração, no início do desenvolvimento do fruto, que se torna mais suscetível a medida que amadurece. Os sintomas podem aparecer ainda no campo, ou permanecerem latentes, de acordo com o ambiente, vindo a se manifestar durante o período de armazenamento (BLEICHER, 2002).

Inicialmente, verificam-se pequenas lesões pardas a marrons-claras, que ao atingirem 2 cm de diâmetro ficam deprimidas. Em condições favoráveis, torna-se visível a presença de massa de esporos, de coloração avermelhada, produzida nos acérvulos.

O fungo também pode atacar ramos jovens, e quando se desenvolve no pedúnculo do fruto, pode causar a queda precoce. Nas regiões mais quentes, e em cultivares mais suscetíveis como a “Golden Delicious” pode resultar em perdas de produção significativas.

Para o controle da Podridão Amarga, tem-se recomendado a adoção de medidas sanitárias, como a eliminação de frutos contaminados ainda no campo, buscando assim diminuir a fonte de inóculo. Evitar injúrias durante tratamentos culturais, as quais favorecem a infecção com o fitopatógeno é importante (BLEICHER, 2002).

A aplicação de fungicidas como Dithianon e Mancozeb, entre outros, também é indicada, dois meses após a plena floração, quando se obtiver precipitação acumulada nos últimos 10 dias maior que 40 mm de chuva e a temperatura média tiver sido igual ou superior a 18 °C, reiniciando a contagem após cada aplicação.

2.3. Quitosana e aplicações na fitopatologia

O aumento crescente da consciência mundial sobre os riscos no uso de agrotóxicos tem motivado o desenvolvimento de sistemas de produção que abdicuem o uso destes produtos, como no caso de produção orgânica, ou que os minimizem, como no caso da Produção Integrada de Maçãs. Tanto pelo novo cenário do mercado interno e externo, quanto pelos riscos ao homem e ao ambiente, salienta-se a necessidade da racionalização do uso de agroquímicos (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2003).

Além das motivações por parte dos consumidores, a busca por outros métodos de controle de doenças em plantas também se faz necessária devido à seleção de populações de fitopatógenos resistentes a determinados princípios ativos pela aplicação destes agrotóxicos na agricultura convencional (TRIPATHI; DUBEY, 2004).

A quitina, precursora da quitosana, foi descoberta em 1811 por Henri Braconnot a partir de cogumelos, recebendo então o nome de fungina. Em 1823, Odier isolou-a de insetos e a denominou de quitina, porém, apenas em 1843 Payen descobriu que havia nitrogênio na sua estrutura (BERGER, 2008). Como quitosana entende-se o biopolímero obtido da desacetilação da quitina, que é o maior constituinte de exoesqueletos de crustáceos e outros animais marinhos (MATTEUS, 1997).

O beneficiamento de crustáceos, como o camarão, por exemplo, pode gerar grande quantidade de resíduos, devido ao baixo valor comercial do cefalotórax, o qual representa até

33% do tamanho do animal no caso de *Litopenaeus vannamei*. Nunes (2001) informa que estes resíduos podem ser fonte de poluição, acarretando custos ambientais e econômicos no seu descarte, o qual ocorre praticamente sem aproveitamento tecnológico.

Entre 2003 e 2006 o Brasil produziu 50.000 t de camarão descabeçado. Dependendo do tipo de aproveitamento, assim como da espécie, a quantidade de resíduos de crustáceos pode chegar a 85% do peso inicial (PENISTON; JOHNSON, 2008).

A quitosana é insolúvel em água e, em soluções diluídas de ácidos, comporta-se como um biopolímero catiônico, de composição variável em função do grau de desacetilação. Quanto maior a quantidade de grupos amino protonados, maior a solvatação, devido à repulsão eletrostática entre as cadeias (SANTOS et al., 2003). Este biopolímero, formado por repetições de D-glucosamina, tem sido estudado por suas características de formar géis e por seu efeito antimicrobiano (KHOR; LIM, 2003).

O polissacarídeo pode formar biofilmes sobre produtos vegetais *in natura* ou minimamente processados, contribuindo para aumentar a vida de prateleira com a manutenção das características qualitativas, pois esta camada na superfície pode evitar a desidratação dos frutos e o desenvolvimento de microrganismos (ASSIS; LEONI, 2003; BOTREL et al., 2007). Outra possibilidade é a utilização da quitosana para recobrir sementes, podendo influenciar positivamente a germinação e o vigor em algumas espécies (TANADA-PALMU et al., 2005).

O que tem dificultado o emprego deste polissacarídeo é a variedade de produtos comerciais com diferentes características (ASSIS; LEONI, 2003). Geralmente, o grau de desacetilação de quitosanas comerciais varia entre 70% e 95%, variando também a massa molar, sendo estes dois parâmetros intimamente relacionados às suas propriedades. Assim, esforços têm sido feitos para caracterizar os diferentes tipos de quitosanas comerciais (CANELLA; GARCIA, 2001; SANTOS et al., 2003).

A atuação da quitosana em testes *in vitro* tem sido documentada, e o efeito sobre fitopatógenos é geralmente correlacionado com a concentração, indicando a importância de estudos que busquem taxas mais eficazes (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006). Feng et al. apud Assis & Leoni (2003) informam que o efeito antimicrobiano da quitosana aumenta com o percentual de desacetilação, pois entre os mecanismos de ação cita-se a sua natureza catiônica, que favorece a ligação com o ácido siálico nos fosfolipídios, dificultando o movimento de moléculas através da membrana, e ainda a capacidade de atuar sobre a transcrição do DNA.

Diversos testes *in vitro* demonstram que algumas espécies de fungos, quando germinam na presença de quitosana, apresentam alterações morfológicas no tubo germinativo.

Também pode haver danos às células de hifas e retardamento do crescimento micelial quando os fungos crescem em meio de cultura contendo quitosana. (EL GHAOUTH et al., 1992; EL GHAOUTH et al., 1994; CIA, 2005; CAMILLI et al., 2007; LIU, 2007).

Camilli et al. (2007) confirmaram que *Botrytis cinerea*, agente causal do Mofo Cinzento em uvas, foi afetado pela quitosana nos testes *in vitro*, a qual reduziu a germinação de esporos, alterou a morfologia do tubo germinativo e diminuiu o crescimento micelial do fungo em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA).

Devido às suas propriedades, a quitosana tem sido aplicada em pós-colheita de frutos, através de diferentes métodos, ou ainda associado com outros métodos de controle, buscando-se maior eficácia do produto em doenças de pós-colheita.

Em tratamentos de pós-colheita, a quitosana pode retardar a severidade de doenças causadas por diferentes patógenos, em frutos como mamões, tomates, pepinos, maçãs, uvas. Entre os mecanismos de ação envolvidos encontram-se o efeito direto sobre o fitopatógeno, a indução de mecanismos de resistência no hospedeiro, e a prevenção de contaminações quando utilizada para recobrir ferimentos (EL GHAOUTH et al., 1994; DE CAPDEVILLE et al. 2002; BEN-SHALON et al., 2003; CIA, 2005; LIU et al., 2007).

El Ghaouth et al. (1992) demonstraram que a suspensão de quitosana, em doses de até 10 mg/mL, diminuiu a incidência de doença em frutos inoculados com *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer*. Este resultado foi atribuído ao efeito fungistático da quitosana sobre o patógeno, demonstrado pelos testes *in vitro*, onde o polissacarídeo reduziu a germinação de esporos e o crescimento micelial, principalmente de *B. cinerea*, e o polissacarídeo não aumentou a atividade de enzimas peroxidases nos frutos.

Romanazzi et al. (2002) observaram redução na incidência e severidade do Mofo Cinzento causado por *B. cinerea* em uvas, quando a quitosana (10 mg/mL) foi aplicada na forma de gotas sobre ferimentos, preventivamente à inoculação. Liu et al. (2007) obtiveram resultados semelhantes quando a mesma dose de quitosana foi aplicada previamente na forma de gotas sobre ferimentos em tomates, à inoculação com *P. expansum* e *B. cinerea*.

El Ghaouth et al. (2000) obtiveram aumento da eficiência do uso de quitosana (5 mg/mL) quando esta é associada ao antagonista *Candida saitoana* para o controle de doenças em pós-colheita de citrus, quando aplicados na forma de gotas sobre o ferimento em pré-inoculação.

Romanazzi et al. (2003) observaram que houve incremento no efeito da quitosana (10 mg/mL) inibindo o desenvolvimento de podridões em frutos de cereja armazenados por até 2 anos, quando estes foram imersos na suspensão do polissacarídeo, e posteriormente mantidos sob baixa pressão (0,5 atm) por 4 horas.

Outra característica da quitosana que vem sendo estudada é a capacidade de induzir respostas de defesa em algumas plantas e frutos. A resistência induzida pode ser desencadeada através de indutores bióticos ou abióticos. Como indutores bióticos encontram-se aqueles oriundos de organismos vivos, como leveduras, bactérias, ou mesmo fungos micorrízicos, que quando em contato com a planta, estimulam-nas através de moléculas eliciadoras a desencadear seus mecanismos de defesa. Tanto mecanismos físicos, como a formação de papilas, quanto químicos, como a produção de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese, podem ser acionados. Como indutores abióticos encontra-se a radiação ultravioleta, pH, temperatura, injúrias mecânicas, e compostos químicos, que podem desencadear os mesmos tipos de reação nas plantas (STADNIK; MARASCHIN, 2004; CAVALCANTI et al., 2005).

A capacidade da quitosana, assim como de outros agente alternativos, de induzir resistência em frutos de maçã colhidos foi demonstrada por De Capdeville et al. (2002). Os frutos tratados com gotas de quitosana e posteriormente inoculados com *Penicillium expansum* tiveram o progresso da doença mais lento que aqueles tratados apenas com água. O efeito foi relacionado com o intervalo de tempo entre a exposição ao agente indutor e a inoculação com o patógeno, além do tempo de armazenamento do fruto.

A ação da quitosana assemelha-se a o que ocorre com a planta atacada por fungos, quando monômeros de quitina produzidos pela degradação da hifa na superfície foliar, disparam reações bioquímicas, por gerar um sinal no sítio de recepção nas células, culminando com a expressão da Resistência Sistêmica Adquirida – RSA. A RSA se caracteriza pelo acúmulo de PR-proteínas, e outros mecanismos de defesa da planta (SOBRINHO et al., 2005). Conforme Stadnik & Maraschin (2004), esta capacidade da quitosana de ligar-se a receptores da membrana celular das plantas, desencadeia uma reação semelhante à que ocorre na interação entre a planta resistente e o patógeno avirulento, acionando as respostas de defesa da planta. A aplicação da indução de resistência em plantas, por se tratar de um ramo relativamente novo, requer ainda mais estudos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a eficiência da quitosana sobre o controle da Podridão Amarga da Macieira e estudar os mecanismos de ação envolvidos.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar o efeito de diferentes doses de quitosana sobre o desenvolvimento da Podridão Amarga em frutos de maçã;
- Avaliar o efeito fungicida da quitosana sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de *Colletotrichum acutatum*, através de bioensaios *in vitro*;
- Estudar a capacidade da quitosana em induzir resistência em frutos de macieira;
- Monitorar o efeito da quitosana sobre a atividade de enzimas relacionadas à defesa, peroxidases, em frutos de maçã;
- Sugerir uma utilização e uma valorização de um resíduo da indústria pesqueira catarinense, dentro do agronegócio da macieira;
- Contribuir para a geração de tecnologias limpas e baratas, para a utilização no agronegócio da macieira.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção do isolado

O isolado de *C. acutatum* foi gentilmente cedido pelo pesquisador Yoshinori Katsurayama, da EPAGRI de São Joaquim, SC. Em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), o fungo forma colônias de coloração cinza-gelo à alaranjada, colorida pela presença de esporulações rosadas em praticamente toda a colônia. O isolado foi mantido em meio de cultura BDA, sendo os cultivos repicados periodicamente.

4.2. Obtenção da quitosana

A quitosana utilizada nos experimentos foi fornecida pelo Prof. Dr. Luiz Henrique Beirão, do departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos da UFSC e apresenta 85% de desacetilação.

As suspensões de quitosana foram preparadas dissolvendo-se o polissacarídeo em solução de HCl 0,05N e ajustando o pH, de acordo com o tratamento, pela adição de NaOH 2N.

4.3. Obtenção dos frutos

Os frutos de maçã utilizados nos experimentos foram obtidos através da cooperativa Cooperserra, situada em São Joaquim/SC, mesma região de onde os frutos foram colhidos. Os frutos da cultivar Fuji foram colhidos na safra 2007, enquanto que os da cultivar Gala foram provenientes da safra 2008. As caixas de papelão contendo 18 Kg de maçãs Classe III foram armazenadas em câmara fria a temperatura de 4°C.

4.4. Bioensaios *in vitro*

Como bioensaios *in vitro* realizaram-se testes para avaliar o efeito de diferentes doses de quitosana sobre a germinação de esporos e crescimento micelial de *C. acutatum*. Os testes foram realizados no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

4.4.1. Germinação de esporos

A partir de uma suspensão estoque de 1000 µg/mL de quitosana em HCl 0,05N, com pH ajustado para 5,6 foram realizadas as respectivas diluições em HCl 0,05N (pH 5,6) para se obter as concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100 µg/mL. Como testemunhas utilizaram-se água destilada e HCl 0,05N (pH 5,6).

A suspensão de esporos em água destilada foi obtida de placas de Petri com o cultivo do fungo em meio BDA, ajustando-se a concentração para 10^5 esporos/mL com a utilização de hemacitômetro. À suspensão de esporos foram adicionados 2% de dextrose (m/v).

Os testes foram realizados em lâminas escavadas, adicionando-se 20 μ L da suspensão de quitosana em 20 μ L da suspensão de esporos. Posteriormente, as lâminas foram dispostas no interior de placas de Petri, sob alta umidade relativa, e incubadas em condições de $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de luz diárias, avaliando-se a germinação dos esporos após 20 horas, em microscópio óptico.

Para a avaliação, contaram-se no mínimo 100 esporos por unidade experimental, observando se estavam germinados ou não. Como germinado considerou-se o esporo que possuía o comprimento do tubo germinativo maior que o do esporo (EL GHAOUTH et al., 1992).

4.4.2. Crescimento micelial

Quitosana foi dissolvida em 0,05 N HCl ajustando-se o pH para 5,6. O polissacarídeo foi incorporado junto ao meio de cultura BDA em concentrações de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mg/mL. As soluções de quitosana e o meio BDA foram autoclavados separadamente, combinados após a autoclavagem, e então vertidos em placas de Petri. Volumes iguais de ácido foram usados em todas as concentrações de quitosana, para manter constante a concentração de sais. Um disco (6 mm de diâmetro) contendo crescimento micelial de *C. acutatum*, oriundo de colônias de 10 a 15 dias, foi repicado para o centro de uma placa de Petri. As placas foram incubadas em sala de crescimento com temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 1$ e fotoperíodo de 12 horas. O delineamento experimental foi completamente casualizado com 5 repetições por tratamento. O diâmetro de todas as colônias foi medido quando a colônia com a maior velocidade de crescimento atingiu a extremidade da placa.

4.5. Bioensaios *in vivo*

Foram efetuados bioensaios *in vivo* para verificar o efeito da quitosana sobre o desenvolvimento de doenças de pós-colheita causadas por *C. acutatum*, assim como os mecanismos de ação envolvidos. Os testes em pós-colheita foram realizados no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

Em todos os casos, os frutos foram lavados em solução de hipoclorito de sódio a 10% (v/v) por dois minutos e, em seguida, em água corrente, deixando-os secar à temperatura ambiente. Depois de secos, os frutos foram inoculados na região equatorial, em lados opostos,

com 20 µL de suspensão de esporos, através de injeção (agulha de insulina, com 0,25 mm de diâmetro e 5 mm de comprimento). Vinte e quatro horas após a inoculação, os frutos foram imersos durante 1 minuto nas soluções de quitosana e dispostos no interior de bandejas plásticas retangulares (400 x 270 x 133 mm), sobre placas de Petri descartáveis, sob câmara úmida.

Cada unidade experimental foi composta por quatro frutos, e foram realizadas quatro repetições por tratamento. As bandejas foram acondicionadas em sala climatizada com temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, em delineamento completamente casualizado. A avaliação do diâmetro das lesões foi realizada em sentidos ortogonais, periodicamente, com o auxílio de uma régua. A partir do valor médio do diâmetro das lesões ao longo do tempo, em cada bandeja, construiu-se a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para cada repetição, conforme Shaner & Finney apud De Capdeville (2002): $\text{AACPD} = \sum [(y_i + y_{i+1})/2 \times (t_{i+1} - t_i)]$, onde y_i representa o diâmetro médio da lesão no tempo t_i , em dias, e y_{i+1} é o diâmetro da lesão no tempo t_{i+1} .

Em um primeiro experimento, buscou-se avaliar o efeito de diferentes concentrações de solução de quitosana (0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg/mL), (pH 5,6), sobre maçãs da cultivar Fuji (Safrá 2007) inoculadas com *C. acutatum* a 10^5 esporos/mL.

A partir dos resultados obtidos no experimento I, avaliou-se a dose mais eficaz de quitosana (10 mg/mL, pH 5,6) sobre maçãs da cultivar Fuji (Safrá 2007) inoculadas com diferentes concentrações de esporos: 10^3 , 10^4 e 10^5 esporos/mL.

Posteriormente, avaliou-se o efeito do pH da solução de quitosana sobre o desenvolvimento da Podridão Amarga. Para tal, foram testadas duas concentrações de quitosana (10 e 20 mg.mL⁻¹) combinadas com três valores de pH (2,4; 4,0 e 5,6) sobre frutos da cultivar Fuji (Safrá 2008) inoculados com *C. acutatum* a 10^5 esporos/mL.

Finalmente, em um quarto experimento, avaliaram-se diferentes concentrações de quitosana (0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg/mL) sobre maçãs da cultivar Gala (Safrá 2008) inoculadas com *C. acutatum* a 10^5 esporos/mL. Nesse experimento, o pH das soluções de quitosana foi ajustado para 4,0.

4.5.1. Avaliação da atividade de peroxidases nos frutos de maçã

Maçãs da cv. Gala (safrá 2008) foram inoculadas com 20 µL de água destilada ou suspensão de esporos de *C. acutatum* (10^5 conídios/mL), à profundidade de 5 mm e, 24 horas depois, os frutos foram imersos em água destilada ou suspensão de quitosana (10 mg/mL) por

1 minuto, resultando em 4 tratamentos. Também foi realizado um tratamento apenas imergindo as maçãs em água destilada (testemunha absoluta).

Cada tratamento foi composto por cinco bandejas, cada uma das quais com cinco frutos. Aleatoriamente, nos intervalos de tempo de 0, 24, 48, 72 e 96 horas, foi amostrado um fruto de cada bandeja.

De cada fruto foram extraídos 5 cubos de 5 mm de diâmetro e 8 mm de profundidade. Cada repetição foi composta por cinco cubos, oriundos de cinco maçãs diferentes que receberam um mesmo tratamento. As amostras foram retiradas, nos diferentes períodos de tempo, no local onde foi realizada a inoculação com o patógeno ou a injeção com água destilada, removendo-se a casca, e armazenando-as sob refrigeração a -20°C , embrulhadas em papel alumínio.

Para determinar a atividade de peroxidases, as amostras foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e homogeneizadas em 1,5 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) e centrifugadas a 20.000 g/30 min, a 4°C . Os sobrenadantes foram coletados e utilizados para avaliar a atividade de peroxidases através da determinação espectrofotométrica a 470 nm em cubeta descartável, a partir da reação que consistiu de 0,3 mL do sobrenadante e 2,7 mL de tampão de reação a 40°C contendo guaiacol 0,25% (v/v) e peróxido de hidrogênio 0,1 M. A reação ocorreu durante 4 min, anotando-se as medidas de densidade óptica a cada 30 s, iniciando-se 1 min após a adição do extrato ao substrato. Usou-se o método de Bradford (1976) para a determinação de proteínas totais das amostras pela comparação com a curva padrão de Albumina de Soro Bovino (ASB). Os resultados da atividade de peroxidases foram expressos em unidades de Densidade Óptica a 470 nm/ min / proteína total (mg).

4.6. Análise estatística

No software Statistica 6.0, os dados foram submetidos ao teste de Levene para verificar se as variâncias dos tratamentos apresentavam-se homogêneas. Em caso positivo, foi realizada a análise de variância e o respectivo F-teste (5%).

Para a verificação do efeito de doses de quitosana, aplicou-se a análise de regressão linear pelo software Sisvar 5.0 (DEX/UFLA), observando o modelo que melhor se ajustava aos resultados, com base nos valores do teste-t ao nível de significância de 5%. Os gráficos foram construídos com o auxílio do software Microsoft[®] Excel 2000.

Na avaliação dos testes qualitativos, quando o F-teste apresentou-se significativo, aplicou-se o teste de separação de médias de Tukey ao nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Bioensaios *in vitro*

Avaliando-se o crescimento micelial de *C. acutatum*, a dose de quitosana que resultou em menor diâmetro das colônias foi a de 4 mg/mL, a qual reduziu em cerca de 41% (Figura 1A e 1B), quando comparada com a testemunha. Não houve incremento do efeito com o aumento da dose para 5 mg/mL.

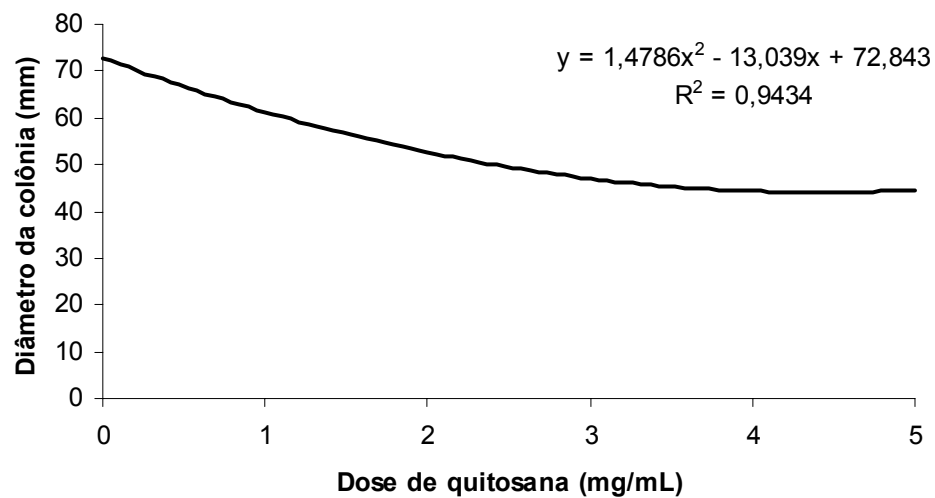


Figura 1A. Efeito de diferentes doses de quitosana sobre o crescimento micelial de *C. acutatum in vitro* em meio BDA, avaliado pelo diâmetro das colônias. Houve efeito de doses de quitosana pelo F-teste, ao nível de significância de 5%. R^2 significativo, pelo teste-t, ao nível de 5% de significância. Coeficiente de variação=11,17%.



Figura 1B. Colônias de *C. acutatum* crescendo em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de quitosana: 0;1;2;3;4 e 5 mg/mL. Observa-se a redução do diâmetro das colônias com o aumento da dose do polissacarídeo.

No teste ilustrado pela Figura 2A, pode-se notar que houve efeito de doses de quitosana sobre a germinação de esporos de *C. acutatum*, conforme resultado do F-teste ao nível de significância de 5%. Além do efeito quantitativo, nos tratamentos com quitosana a partir de 50 µg/mL, houve efeito qualitativo, evidenciado pelas alterações morfológicas no tubo germinativo (Figura 2B). Foi possível constatar que todas as doses testadas diminuíram a porcentagem de germinação de esporos, sendo esta inibição incrementada com o aumento da dose até 100 µg/mL. Na maior dose testada, a germinação do fitopatógeno foi 66% menor que o controle com água destilada.

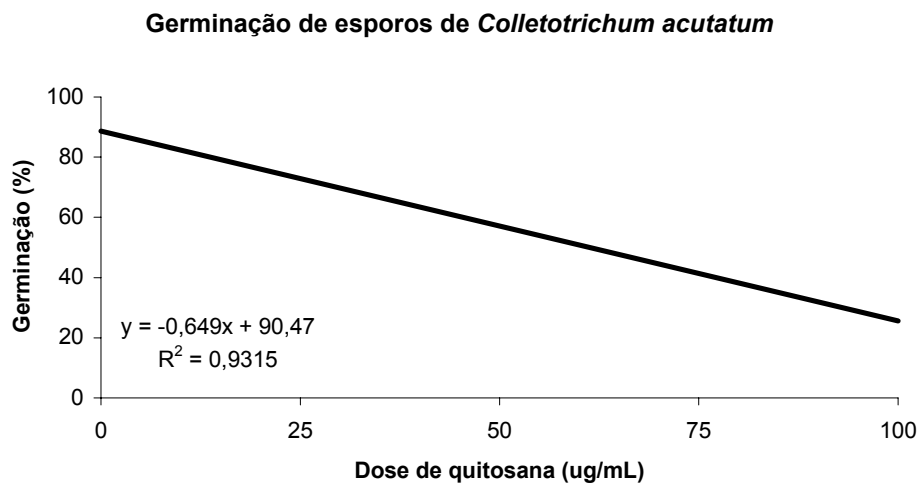


Figura 2A. Efeito de diferentes doses de quitosana sobre a germinação de esporos de *C. acutatum in vitro*. Houve efeito de doses de quitosana pelo F-teste, ao nível de significância de 5%. R^2 significativo, pelo teste-t, ao nível de 5% de significância. Coeficiente de variação=12,08%.

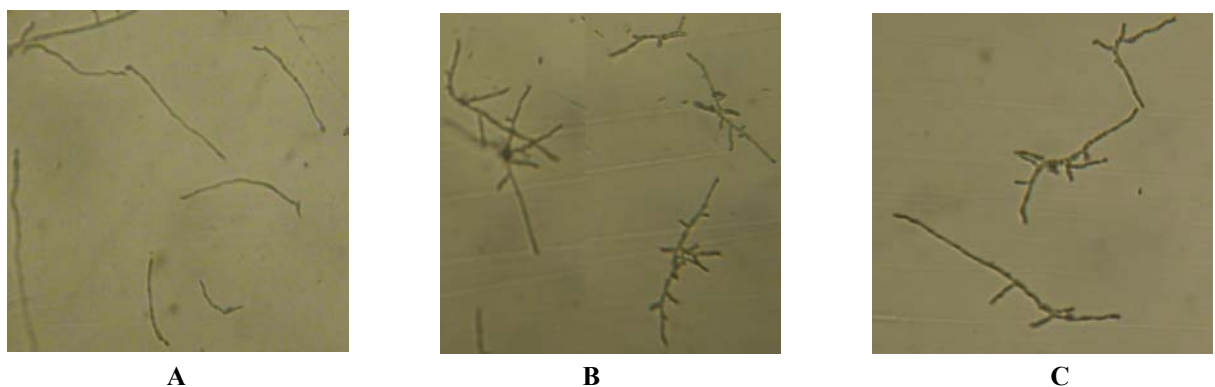


Figura 2B. Tubo germinativo (em aumento de 40 X) de *C. acutatum* após 20 horas em água (A); em 50 µg/mL de quitosana (B), dose em que o tubo germinativo apresentou-se espesso e ramificado; em 100 µg/mL de quitosana (C), onde também foram observadas alterações morfológicas no tubo germinativo do fungo, que se tornou ramificado e espesso.

5.2. Bioensaios *in vivo*

Avaliando diferentes concentrações de quitosana sobre maçãs cv. Fuji inoculadas com *C. acutatum* (Figura 3), houve efeito de doses do polissacarídeo, a 5% de significância pelo teste-F, sobre a severidade da Podridão Amarga.

Pode-se notar, através do software Sisvar 6.0, que o modelo que mais se adaptou a esta situação foi o linear. Conseqüentemente, o resultado mais expressivo na diminuição da AACPD foi a maior dose de quitosana (10 mg/mL).

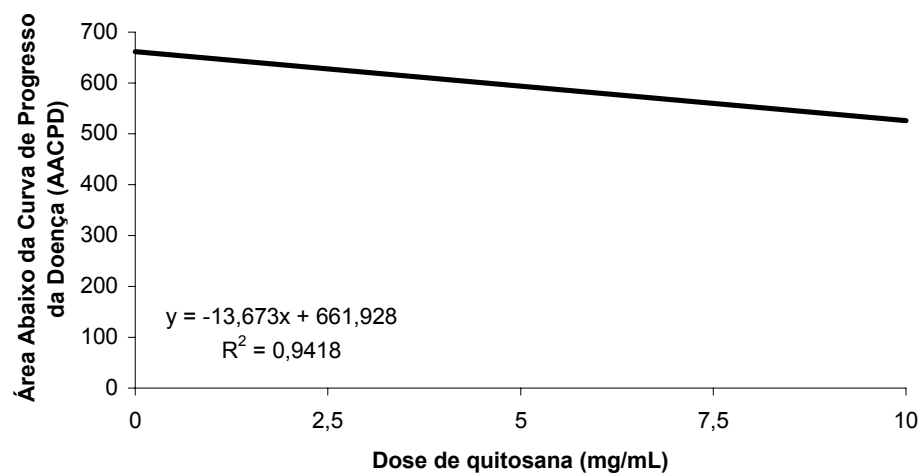


Figura 3. Efeito da quitosana (pH 5,6) sobre a severidade da Podridão Amarga, avaliada pela AACPD. As maçãs (cv. Fuji) foram inoculadas com *C. acutatum* e, 24 horas depois, tratadas. Houve efeito de doses de quitosana pelo F-teste, ao nível de significância de 5%. R^2 significativo, pelo teste-t, ao nível de 5% de significância. Coeficiente de variação=5,36%.

No teste posterior, avaliando-se a dose de quitosana mais eficaz (10 mg/mL) com pH 5,6, sobre maçãs cv. Fuji inoculadas com diferentes concentrações de esporos, pode-se notar, através de análise estatística em esquema fatorial, que houve efeito da imersão em quitosana quando comparada com a imersão em água destilada, mas não houve efeito de concentração de inóculo, e a interação entre os dois fatores não foi significativa.

A imersão em quitosana reduziu a AACPD quando comparada com a imersão em água destilada (Figura 4A). Quanto ao fator concentração de inóculo (Figura 4B), não houve diferença na severidade da doença entre as diferentes concentrações de inóculo testadas, conforme o resultado do F-teste (5%).

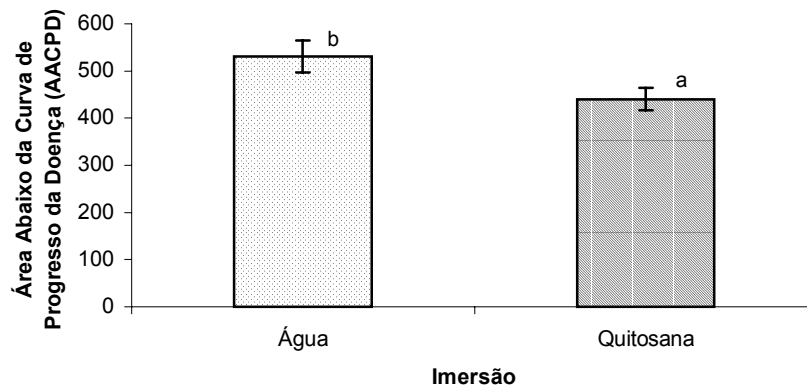


Figura 4A. Efeito da quitosana (10 mg/mL) sobre a severidade da Podridão Amarga, avaliada pela AACPD. As maçãs (cv. Fuji) foram inoculadas com diferentes concentrações de esporos de *C. acutatum* e, 24 horas depois, tratadas. Houve efeito da quitosana pelo F-teste, ao nível de significância de 5%. Coeficiente de variação=5,89%.

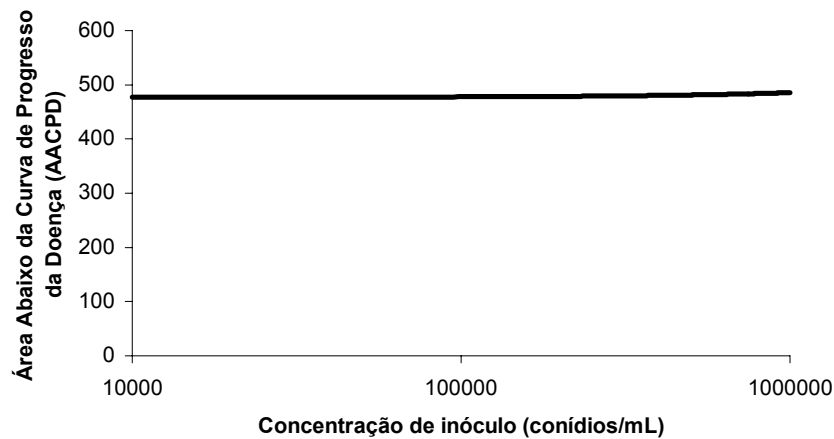


Figura 4B. Efeito de diferentes concentrações de inóculo de *C. acutatum* (conídios/mL) sobre a severidade da Podridão Amarga, avaliada pela AACPD. As maçãs (cv. Fuji) foram imersas em água ou quitosana (10 mg/mL) 24 horas após a inoculação. Não houve efeito da concentração de inóculo pelo F-teste, ao nível de significância de 5%. Coeficiente de variação = 9,51%.

Com relação à incidência de esporulações nas lesões (Tabela 1), pode-se observar que esta foi menor nos tratamentos com quitosana nas maiores concentrações de inóculo (10^4 e 10^5 conídios/mL).

Tabela 1. Incidência de lesões provocadas por *C. acutatum* contendo esporulação do fungo. As maçãs da cv. Fuji foram inoculadas com diferentes concentrações de conídios e, 24 horas depois, imersas em água ou quitosana (10 mg/mL).

Tratamento	Média (%)	Desvio Padrão
10^3 conídios.mL ⁻¹ – Água	92	± 17
10^3 conídios.mL ⁻¹ - Quitosana	88	± 16
10^4 conídios.mL ⁻¹ – Água	96	± 8
10^4 conídios.mL ⁻¹ - Quitosana	38	± 21
10^5 conídios.mL ⁻¹ – Água	94	± 7
10^5 conídios.mL ⁻¹ - Quitosana	19	± 24

Avaliando o efeito da suspensão de quitosana com diferentes pH sobre frutos de maçã cv. Fuji inoculados com *C. acutatum*, a severidade da Podridão Amarga foi reduzida significativamente em todos os tratamentos imersos em quitosana quando comparados com imersão em água destilada, pelo teste de Dunnett a 5% (Figura 5).

Na avaliação estatística envolvendo os tratamentos onde houve imersão dos frutos em quitosana, houve efeito de doses e de pH, assim como a interação entre doses e pH foi significativa.

Quanto ao efeito das concentrações de quitosana, a dose de 20 mg/mL reduziu significativamente a severidade da doença nos pH 2,4 e 4,0 quando comparado com a dose de 10 mg/mL, porém, no pH 5,6, as duas concentrações do polissacarídeo não diferiram entre si, de acordo com o F-teste (5%). No caso da avaliação dos diferentes pH dentro de cada concentração de quitosana, a solução do polissacarídeo com pH ajustado para 4,0 reduziu significativamente a AACPD quando comparado com os demais pH testados, tanto a 10 como a 20 mg/mL (Tabela 2).

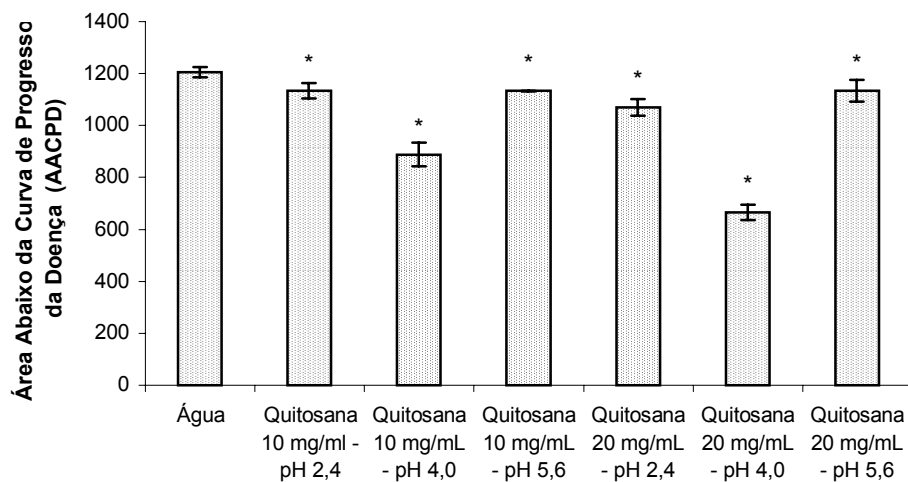


Figura 5. Efeito de diferentes concentrações de quitosana (10 e 20 mg/mL) com diferentes pHs sobre a severidade da Podridão Amarga em maçãs (cv. Fuji), avaliada pela AACPD. Os frutos foram imersos em água destilada ou quitosana 24 horas após a inoculação. * Diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Dunnett a 5% de significância. Coeficiente de variação=3,04%.

Tabela 2. Efeito das diferentes concentrações de quitosana em diferentes pH sobre a severidade da Podridão Amarga em maçãs (cv. Fuji), avaliada pela AACPD. As maçãs foram tratadas por imersão 24 horas depois da inoculação. Valores seguidos com mesma letra (maiúsculas na coluna ou minúsculas na linha) não diferem pelo teste de Tukey (5%). Coeficientes de variação, respectivamente: nas linhas = 2,91% e 3,61%; nas colunas = 2,74%, 4,8% e 2,76%.

Treatment	pH 2,4	pH 4,0	pH 5,6
Quitosana 10 mg/mL	1205 B b	888 B a	1125 B b
Quitosana 20 mg/mL	1070 A b	665 A a	1134 B b

Avaliando-se o efeito de diferentes concentrações de quitosana (pH 4,0) sobre maçãs cv. Gala inoculadas com 10^5 esporos/mL, pode-se notar que houve redução da AACPD também nesta cultivar (Figura 6), sendo esta linearmente correlacionada com a dose utilizada, e, conseqüentemente a maior, dose foi mais eficiente em reduzir a severidade da doença.

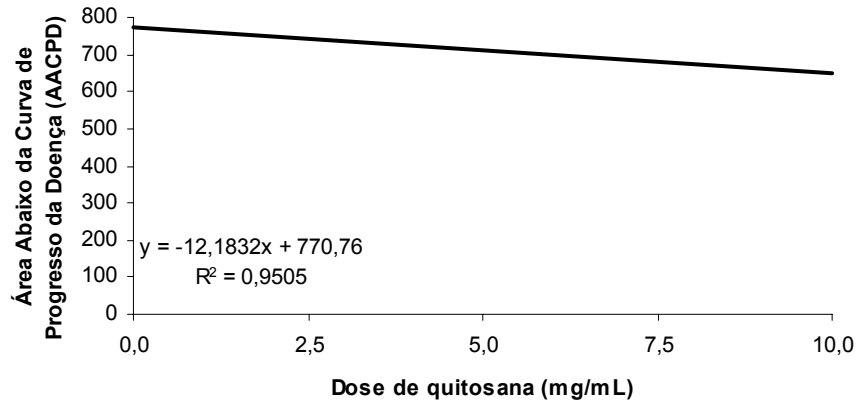


Figura 6. Efeito de diferentes doses de quitosana com pH 4,0 sobre a severidade da Podridão Amarga em maçãs (cv. Gala), avaliada pela AACPD. Os frutos foram imersos nos tratamentos 24 horas depois de inoculados. Houve efeito de doses de quitosana, pelo F-teste, ao nível de significância de 5%. R^2 significativo, pelo teste-t, ao nível de 5% de significância. Coeficiente de variação=5,21%

Na avaliação da atividade de peroxidases (Figura 7 e Tabela 3), através da análise estatística em esquema fatorial, não houve interação significativa entre os fatores Tratamentos e Tempo, e não houve diferença entre os tempos, mas o fator Tratamento foi significativo. Comparando-se os diferentes tratamentos, nota-se que ocorreu uma elevação na atividade de peroxidases nos frutos feridos que não foram inoculados. Os frutos inoculados com *C. acutatum*, independente da imersão posterior em quitosana, apresentaram a mesma atividade de peroxidases da testemunha absoluta (frutos imersos apenas em água, sem ferimentos). O tratamento com quitosana também não provocou o aumento da atividade de peroxidases (Tabela 3).

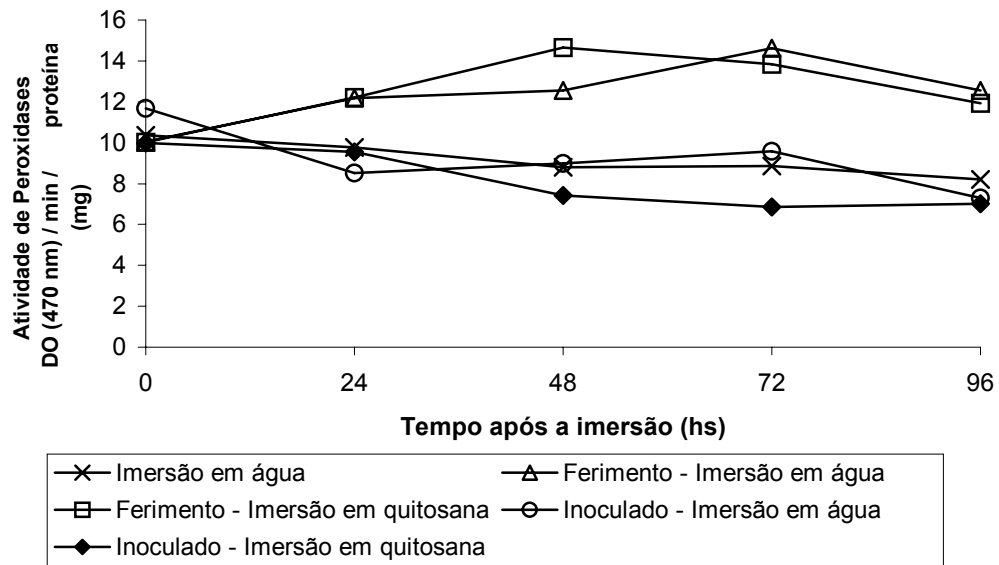


Figura 7. Atividade de peroxidases em maçãs (cv. Gala) feridas ou inoculadas com *C. acutatum* e 24 horas depois, imersas em água ou quitosana (10 mg/mL). * Houve diferença entre os tratamentos feridos e inoculados, pelo F-teste ao nível de 5% de significância.

Tabela 3. Atividade de peroxidases em Densidade Óptica / min / proteína total (mg) em frutos de maçã da cultivar Gala feridos ou inoculados e 24 horas depois imersos em água ou suspensão de quitosana (10 mg/mL). Médias com a mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (5%).

Tratamento	Atividade de peroxidases (DO / min / mg de proteína)	
Imersão em água	9,53	± 2,48 a
Ferimento - Imersão em água	12,81	± 4,38 b
Ferimento - Imersão em quitosana	12,53	± 3,99 b
Inoculado - Imersão em água	9,36	± 3,67 a
Inoculado - Imersão em quitosana	8,17	± 2,63 a

Os resultados representam a média ± desvio padrão.
Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

6. DISCUSSÃO

O polissacarídeo quitosana reduziu a severidade da Podridão Amarga em frutos de maçã da cultivar Fuji imersos em suspensão de quitosana (pH 5,6) 24 horas depois da inoculação. No entanto, o nível de controle para a dose de 10 mg/mL foi de apenas 19%, quando os frutos foram pré-inoculados com 10^5 conídios/mL .

Posteriormente, testando-se esta dose mais eficaz sobre maçãs inoculadas com diferentes concentrações de esporos de *C. acutatum*, pôde-se notar que a quitosana reduziu a severidade da doença em todas as concentrações de inóculo, quando comparada com a imersão em água destilada, e que não houve aumento da severidade da Podridão Amarga com o aumento da concentração de inóculo até 10^5 conídios/mL.

Buscando-se melhorar a eficiência de redução da doença, foram testados diferentes valores de pH para a suspensão do polissacarídeo. A solução de quitosana com pH 4,0 foi a mais eficaz para o controle da Podridão Amarga nas duas doses de quitosana testadas (10 e 20 mg/mL). O pH é um dos fatores que podem afetar as características da quitosana, como a protonação dos grupamentos amino e a capacidade de solvatação (SANTOS et al., 2003).

O pH geralmente utilizado para suspensões de quitosana nos experimentos de pós-colheita é em torno de 5,6. Nessa faixa de pH, alguns autores obtiveram redução de doença em pós-colheita de frutos como morangos, cerejas e uvas, quando estes foram inoculados com fungos fitopatogênicos, e posteriormente imersos em quitosana, ou ainda quando uma gota da suspensão do polissacarídeo foi depositada sobre o ferimento em pré-inoculação (EL GHAOUTH et al, 1992; ROMANAZZI et al., 2002; ROMANAZZI et al., 2003).

No entanto, outros trabalhos obtiveram redução de doença com pH da suspensão calibrado para outros valores. Camilli et al. (2007) demonstraram que houve redução de Mofo Cinzento em uvas quando estas foram aspergidas por suspensão de quitosana com pH 4,4. Cia (2005) avaliando o efeito da quitosana sobre a antracnose do mamão (*C. gloeosporioides*) demonstrou que a suspensão do polissacarídeo com pH 3,5 surtiu efeito, diminuindo a severidade da doença nos frutos tratados por imersão.

A diferença do valor de pH utilizado nas suspensões de quitosana entre os diferentes experimentos pode estar relacionada à forma de aplicação. Sabe-se que em pHs mais elevados, pela redução na protonação das cadeias do biopolímero, estas se aproximam, resultando em maior viscosidade (SANTOS et al., 2003).

A elevação da concentração de quitosana para 20 mg/mL resultou em menor severidade da Podridão Amarga. Apesar disso, a utilização dessa dose tornou-se mais difícil devido à alta viscosidade, o que inviabilizaria sua aplicação em larga escala. Dessa forma, doses maiores que 10 mg/mL não foram testadas nos experimentos subseqüentes.

Na cultivar Gala, a redução da AACPD também foi linearmente correlacionada com a dose utilizada, sendo conseqüentemente a maior dose testada (10 mg/mL) a mais eficaz. Comparando-se com o tratamento controle, houve redução da AACPD em torno de 15%. Denardi et al. (2003) observaram que a cultivar Gala teve maior incidência de doença e progresso mais rápido quando comparada com outras cultivares como a Fuji. Desta forma, o efeito da quitosana sobre a Podridão Amarga em Gala pode não ter sido incrementado, apesar da utilização de um pH mais eficiente, por esta cultivar ser mais susceptível à doença.

Com a finalidade de avaliar o mecanismo de ação da quitosana no controle da Podridão Amarga, foram realizados testes para verificar o efeito direto do polissacarídeo sobre o fitopatógeno e para estudar a capacidade da quitosana em induzir uma resposta de defesa (peroxidases) nos frutos de maçã.

Através dos resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, foi possível constatar que a quitosana teve efeito sobre a germinação de esporos e no crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*.

O efeito da quitosana na germinação de esporos e no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos já foi relatado por diversos autores. Cia (2005), avaliando o efeito da quitosana sobre *C. gloeosporioides*, agente causal da antracnose em mamões, observou que doses a partir de 2500 µg/mL inibiram completamente a germinação do fungo *in vitro*, dose bem maior que as utilizadas no presente estudo. Contudo, a mesma dose não reduziu a germinação de *B. cinerea* isolado de uvas por Camilli et al. (2007), porém resultou em alterações na morfologia do tubo germinativo.

El Ghaouth et al. (1992) obtiveram a redução de 90 e 75% na germinação de esporos de *B. cinerea* e de *Rhizopus stolonifer* isolados de morangos em doses de 6000 µg/mL, respectivamente. Liu et al. (2007) relataram que a dose de 5000 µg/mL inibiu completamente a germinação de *Penicillium expansum*, agente causal do Bolor Azul em tomates. Ben-Shalon et al. (2003) obtiveram redução de 50% na germinação de esporos de *B. cinerea* em concentrações de quitosana (20-30 µg/mL) semelhantes às utilizadas no presente estudo.

Na avaliação realizada neste trabalho, o isolado de *C. acutatum*, obtido de um pomar do município de São Joaquim/SC, teve a germinação de conídios diminuída em doses muito menores, quando comparadas com a maioria dos trabalhos citados, surtindo efeito a partir de

25 µg/mL. Contudo, completa inibição não foi observada até a dose de 100 µg/mL, a qual reduziu em 66% a germinação quando comparada com os controles, porém ficaram evidenciadas alterações no tubo germinativo.

Estudos sugerem que a ação da quitosana sobre a germinação de esporos de alguns fitopatógenos acontece por alterações na parede celular, danos à membrana plasmática e no vacúolo. Liu et al. (2007) demonstraram que a quitosana causou danos à membrana plasmática de *B. cinerea* e *P. expansum*, enquanto que os danos à parede celular e ao vacúolo de *Pythium aphanidermatum* foram observados por El Ghaouth et al. (1994), que em alguns casos notaram também a desintegração do protoplasma.

Sobre o crescimento micelial do fungo, a quitosana retardou o desenvolvimento *in vitro* de *C. acutatum*, quando incorporada ao meio de cultura BDA, em concentrações de até 4 mg/mL, não havendo acréscimo de efeito com o aumento da dose para 5 mg/mL. Desta forma, pode-se dizer que a quitosana teve efeito fungistático sobre o crescimento micelial de *C. acutatum*, não o inibindo por completo, porém retardando seu crescimento.

Efeitos da quitosana sobre o crescimento micelial de fungos, quando incorporada ao meio de cultura, também já foram relatados para outras espécies de fitopatógenos. Cia (2005) estudando a quitosana sobre *C. gloeosporioides* observou que doses a partir de 2,5 mg/mL inibiram completamente o crescimento micelial do fungo. Outras espécies também são afetadas quando em meio de cultura acrescido de quitosana, como *B. cinerea*, *P. expansum* e *Pythium aphanidermatum* (EL GHAOUTH et al., 1992; CAMILLI et al., 2007; LIU et al., 2002; EL GHAOUTH et al., 1994).

Além do efeito direto sobre *C. acutatum*, a quitosana poderia reduzir a severidade da Podridão Amarga ativando mecanismos de defesa nos frutos de maçã. No presente trabalho, testou-se a capacidade da quitosana em induzir respostas de defesa relacionadas à síntese de peroxidases.

A utilização da cultivar Gala neste caso se deu pelo fato de estes frutos terem sido recentemente colhidos, quando espera-se uma resposta maior aos estímulos para induzir a atividade de enzimas de defesa quando comparados aos frutos armazenados por longos períodos de tempo (DE CAPDEVILLE et al., 2002). Não foi possível utilizar frutos da cultivar Fuji por estes ainda não terem sido colhidos na data da realização do experimento.

A resistência induzida depende, entre outros fatores, do intervalo de tempo entre a exposição do vegetal ao agente indutor e a inoculação com o patógeno (BONALDO et al., 2005). Capdeville et al. (2002) observaram que a quitosana induziu resistência em frutos de

maçã, diminuindo a severidade da doença quando os frutos frescos foram inoculados 96 horas após a aplicação do agente indutor.

Normalmente, o possível agente indutor de resistência é aplicado antes da inoculação. Contudo, no atual estudo, buscou-se avaliar a indução da síntese de peroxidases em maçãs tratadas com quitosana após a inoculação com o fitopatógeno, pois, de acordo com a etiologia da Podridão Amarga, os frutos chegam ao pós-colheita já infectados com o fungo, o qual permanece quiescente até obter condições favoráveis ao seu desenvolvimento (BLEICHER, 1999).

Os tratamentos onde os frutos foram feridos tiveram a atividade de enzimas peroxidases aumentada, enquanto que naqueles onde foi inoculado o patógeno, a atividade enzimática permaneceu em níveis semelhantes ao da testemunha absoluta (frutos apenas imersos em água destilada, sem ferimentos).

Marriot et al. apud Campos et al. (2004) informam que o aumento na atividade de peroxidases, associado com ferimentos em vegetais, é indicativo da biossíntese de lignina, a qual atua como uma barreira à infecção microbiana, sendo que a reação ocorre em células vizinhas às infectadas ou feridas, as quais direcionam um sistema de defesa à área do ferimento.

Desta forma, pode-se inferir que as células dos frutos de maçãs inoculadas com *C. acutatum* não responderam, através dos seus mecanismos de defesa, na velocidade necessária para que evitassem o desenvolvimento do patógeno, apesar de neste tratamento também ocorrer o ferimento durante a inoculação dos frutos. Com o passar do tempo, a morte das células vizinhas ao local inicial da infecção cessou qualquer capacidade de resposta, resultando na manutenção da quantidade de enzimas peroxidases constitutivas, quando comparado com a testemunha absoluta que não foi nem ferida nem inoculada. No caso dos tratamentos em que houve ferimento e injeção de água, por não haver o patógeno, e conseqüentemente a morte do tecido ao redor do local onde foi inserida a agulha, as células foram capazes de responder à agressão, resultando no aumento da atividade de peroxidases a partir de 72 horas da injeção. Por outro lado, o tratamento com quitosana não alterou a atividade de peroxidases em relação aos frutos tratados com água.

Pelo exposto, entre os mecanismos estudados, a ação direta da quitosana sobre o fitopatógeno provavelmente foi a responsável pela redução da severidade da Podridão Amarga.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alternativas aos fungicidas convencionais estão sendo buscadas, devido aos possíveis danos dos resíduos à saúde humana, como também ao ambiente e ainda à seleção de fitopatógenos resistentes a alguns princípios ativos utilizados.

O Brasil, por possuir extenso litoral e ser ter disponibilidade de recursos pesqueiros, tem o potencial de aproveitamento de resíduos de crustáceos, tornando-os em produtos utilizáveis para diversas finalidades, como é o caso da quitosana.

Atualmente, o biopolímero disponível necessitaria de maior padronização pois as suas propriedades variam conforme as características físico-químicas, o que tem dificultado o desenvolvimento de tecnologias consistentes para sua utilização.

A aplicação da quitosana na agricultura tem sido pesquisada, e sabe-se que esta pode contribuir para o controle ou prevenção de algumas doenças. Produtos comerciais com quitosana entre seus constituintes, já são disponibilizados no mercado, como o Elexa[®].

Devido à grande variabilidade de organismos fitopatogênicos e diferentes formas de respostas, tanto dos patógenos, quanto das plantas ao polissacarídeo, estudos são necessários para esclarecer os mecanismos de ação envolvidos, e assim poder auxiliar na otimização da eficácia do produto no controle das doenças.

Para o controle da Podridão Amarga, a quitosana demonstrou que pode reduzir a severidade da doença nos frutos inoculados artificialmente, e o resultado se deve prioritariamente ao seu efeito direto sobre o fitopatógeno, demonstrado pelos testes *in vitro*, e por não ter aumentado a atividade de enzimas relacionadas com mecanismos de defesa do fruto (peroxidases).

8. REFERÊNCIAS

1. ASSIS, O.B.G.; LEONI, A.M.. Biofilmes comestíveis de quitosana: ação biofungicida sobre frutas fatiadas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, São Paulo, n. 30, p.33-38, 2003.
2. BAUTISTA-BAÑOS, S. et al. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, v.25, p.108–118, 2006.
3. BEN-SHALON, N. et al. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. **Crop protection**, Oxford, v.22, n.9, p.1087-1092, 2003.
4. BERGER, G. **Quitosana: a fibra do futuro**. Disponível em: <http://www.polymar.com.br/produtos/lv_quitosana/cap3.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2008.
5. BLEICHER, J. **Fatores predisponentes para a ocorrência da podridão amarga, *Glomerella cingulata*, em maçã**. Florianópolis, Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária, 1980. 17p.
6. BLEICHER, J. História da macieira. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002.
7. BONALDO, S.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S. et. al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005.
8. BONETI, J.I. da S. *et al.* **Manual de identificação de doenças e pragas da macieira**. Florianópolis: Epagri, 1999. 149p.
9. BONETI, J.I.; KATSURAYAMA, Y.; BLEICHER, J. **Doenças da macieira**. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002.
10. BOTREL, D.A. et al. Qualidade de alho (*Allium sativum*) minimamente processado envolvido com revestimento comestível antimicrobiano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.27, n.1, jan./mar. 2007.
11. BRADFORD, M.A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1/2, p.248-254, 1976.
12. CAMILO, A.P.; DENARDI, F. Cultivares: descrição e comportamento no sul do Brasil. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002.
13. CAMPOS, A. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.39, n.7, p.637-643, 2004,
14. CAMILLI, E.C. et al. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva “Itália” contra *Botrytis cinerea*. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.3, p.215-221, 2007.

15. CANELLA, K. M. N. de; GARCIA, R.B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel - influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, São Paulo, v.24, n.1, 2001.
16. CAVALCANTI, L.S. et. al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005.
17. CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2005.
18. CIA, P. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita de antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*)**. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queirós, Piracicaba, 2005.
19. CRUSIUS, L.U.; FORCELINI, C.A.; SANHUEZA, R.M.V.; FERNANDES, J.M.C. Epidemiology of apple leaf spot. **Fitopatologia brasileira**, 27:065-070, 2002.
20. DE CAPDEVILLE, G. et al. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvest ‘Red Delicious’ apple fruit. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, p.900-908, 2002.
21. DENARDI, F.; BERTON, O.; SPENGLER, M.M. Resistência genética à podridão amarga em maçãs, determinada pela taxa de desenvolvimento da doença em frutos com e sem ferimentos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 494-497, dez. 2003.
22. DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito de cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**, v.30, p.57-62, 2004.
23. 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.
24. EL GHAOUTH, A. et al. Effect of chitosan on cucumber plants: supression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defence reactions. **Phytopathology**, St. Paul, v.84, n.3, p.313-320, 1994.
25. EL GHAOUTH, A. et al. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.19, p.103-110, 2000.
26. EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002.
27. HAMADA, N.A. Universidade Federal de Santa Catarina. **Caracterização morfológica, patogênica e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. em macieira**. Florianópolis, 2005. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

28. IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estados**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/>>. Acesso em: 2 mar. 2008.
29. KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v.24, p.2339–2349, 2003.
30. LEVER, M.A. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v.47, p.273-279, 1972.
31. LIU, L. et al. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruits. **Postharvest biology and tecnologia**, v.44, p.300-306, 2007.
32. LUCHI, V.L. **Botânica e fisiologia**. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002.
33. MATTEUS, F.A.G. **Application of chitin and chitosan**. Switzerland: Technomic Publishing AG, 1997.
34. NACHTIGALL, G. R. **Maçã: produção**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. 171p.
35. NUNES, A. J. P. O cultivo de camarões marinhos no nordeste do Brasil. **Panorama da Aquicultura**, v. 11, p. 29-33, maio/junho, 2001.
36. PENISTON, Q. P; JOHNSON, E. L. **Recovering of chitosan and other by-products from shellfish waste and the like**. Disponível em: <<http://www.google.com/patents?vid=USPAT3862122&id=K0ktAAAAEBAJ&printsec=abstract&zoom=4&dq=%22Peniston%22+%22METHOD+OF+RECOVERING+CHITOSAN+AND+OTHER+BY-PRODUCTS+FROM+...%22+#PPA3-IA1,M1>>. Acesso em: 23 mai. 2008.
37. PETRI, J.L.; LEITE, G.B.; CESA, J.D. Padronização e classificação da maçã. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002a.
38. PETRI, J.L.; PALLADINI, L.A.; POLA, A.C. Dormência e indução de brotação da macieira. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002b.
39. ROMANAZZI G. et al. Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage Grey Mold of table grapes. **Journal of food science**, v. 67, n.5, p.1862-1867, 2002.
40. ROMANAZZI, G. et al. Short hypobaric treatments potentiate the effect of chitosan in reducing storage decay of sweet cherries. **Postharvest Biology and Technology**, v.29, p.73-80, 2003.
41. SANTOS, J.E. dos; SOARES, J da P.; DOCKAL, E.R.; FILHO, S.P.C.; CAVALHEIRO, E.T.G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros**, São Carlos, v.13, n.4, 2003.
42. SOBRINHO, C.A.; FERREIRA, P. de T. de O.; CAVALCANTI, L.S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L.S. et. al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005.

43. TANADA-PALMU, P.S. et al. Recobrimento de sementes de brócolos e salsa com coberturas e filmes biodegradáveis. **Bragantia**, Campinas, v.64, n.2, 2005.
44. STADNIK, M.J.; MARASCHIN, M. Indução de resistência de plantas a fitopatógenos. In: **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004.
45. TRIPATHI, P.; DUBEY, N.K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v.32, p.235-245, 2004.
46. VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. **Produção integrada de maçãs no Brasil**. Embrapa Uva e Vinho, 2003. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/>>. Acesso em: 12 mai. 2008.
47. VIEIRA, L.M. Desempenho da produção vegetal: maçã. In: **Síntese da agricultura catarinense 2006-2007**. Florianópolis: EPAGRI, 2007.