

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO HIDROTÉRMICO NO CONTROLE DE *Penicillium digitatum* Sacc. EM LARANJA PÊRA^a

INFLUENCE OF HYDROTHERMAL TREATMENT TO CONTROL *Penicillium digitatum* Sacc. IN ORANGE

Lavinia dos Santos Mascarenhas¹
Noelma Miranda de Brito²
Vânia Jesus dos Santos de Oliveira³

Atualmente percebe-se o crescente número de estudos com métodos alternativos no controle de microrganismos na pós-colheita de frutos, visando diminuir o uso de agrotóxicos. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do tratamento hidrotérmico no controle da podridão causada por *Penicillium digitatum* Sacc. em laranja pêra (*Citrus* (L.) Osbeck). Os isolados dos fungos foram obtidos de lesões da doença em frutos de laranja pêra provenientes de Governador Mangabeira e Muritiba, Bahia. No estudo *in vitro* realizou-se a determinação da inibição micelial, da esporulação e da germinação colocando discos fúngicos dos isolados a banho maria, a 50° e 60 °C por 1, 2, 3, 4 e 5 minutos. Na análise *in vivo*, foi aplicado o mesmo tratamento, sendo inoculados vinte frutos com dois discos fúngicos cada. As laranjas utilizadas como controle foram apenas inoculadas com os diferentes isolados de *P. digitatum*. As laranjas de cada tratamento foram mantidas por 10 dias a temperatura ambiente e avaliadas quanto à incidência e severidade da infecção. Nas análises *in vitro*, nos fungos de ambas as cidades, destacou-se o tratamento a 60° C. Nos dados obtidos *in vivo*, constatou-se que não ocorreram mudanças significativas entre os índices, porém as laranjas submetidas ao tratamento apresentaram sintomas de contaminação somente após 4 dias. Constata-se que o tratamento hidrotérmico a 60 °C inibe a fisiologia do fungo *P. digitatum in vitro*, retardando a sua ação sobre os frutos.

Palavras-chave: Termoterapia. Tratamento Pós Colheita. Citrus.

Currently, the growing number of studies with alternative methods to control microorganisms in post-harvest fruits is aimed at reducing the use of pesticides. The objective of this work was to study the effect of hydrothermal treatment on the control of orange fruits (*Citrus* (L.) Osbeck) rotting. Fungi isolates were obtained from lesions in orange fruits grown in Governador Mangabeira and Muritiba, Bahia. The *in vitro* study assessed the mycelial, sporulation and germination inhibition after putting fungal disks in a water bath at 50 ° and 60 ° C for 1, 2, 3, 4 and 5 minutes. In the *in vivo* analysis, the same treatment was applied, and 20 oranges were inoculated with two fungal disks. The controls were inoculated with the different *P. digitatum* isolates. In each treatment the oranges were maintained during 10 days at room temperature and the incidence and severity of the infection was evaluated. With regard to the *in vitro* analyses, the best results were obtained at 60 ° C for oranges from both cities. In the data obtained *in vivo* no significant changes were observed; however, the oranges that were submitted to treatment showed signs of contamination only after 4 days. We may conclude that the hydrothermal treatment at 60 ° C inhibits the physiology of the fungus *P. digitum in vitro* and retards its action over the fruits.

Keywords: Thermotherapy. Post-Harvest. Citrus.

^aTrabalho apresentado no XV Seminário Estudantil de Pesquisa da FAMAM e selecionado pela comissão científica do evento para publicação.

¹Graduanda em Biomedicina pela Faculdade Maria Milza, Governador Mangabeira, Bahia, <http://lattes.cnpq.br/9355429650015477>, email: lavimasc@gmail.com.

²Doutora pela Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, <http://lattes.cnpq.br/6073446004860963> Email: britonoelma@yahoo.com.br.

³Doutora pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, <http://lattes.cnpq.br/252474204156963>, Email: vania79br@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

Um dos pilares da economia brasileira é a agricultura, e para ela ser competitiva, se faz necessário desenvolver tecnologias entre as quais se encontram produtos químicos que visam proteger a produção agrícola de pragas como moscas e microrganismos, para aumentar a sua produtividade. Entretanto, o uso desenfreado e incorreto destes produtos químicos tem causado impactos negativos sobre o meio ambiente e o conjunto da sociedade (PEREIRA *et al.*, 2017).

Rigotto, Vasconcelos e Rocha (2014) afirmam que o Brasil ocupa o primeiro lugar no ranking da comercialização de agrotóxicos, mostrando, assim, a realidade do uso de produtos químicos na agricultura do país. A utilização de agrotóxicos tornou-se um problema de saúde pública, uma vez que expõe a população e o meio ambiente aos seus efeitos nocivos, o que eleva as taxas de acidentes de trabalho, principalmente por intoxicação. No entanto, a subnotificação de essas ocorrências no sistema de saúde não permite avaliar a real dimensão do problema.

O aumento do uso e conseqüente descarte de produtos sintéticos vem acarretando danos ambientais como contaminação de alimentos, de animais, do solo e dos lençóis freáticos, que acabam contaminando as correntes hídricas, causando desequilíbrios ambientais e afetando a qualidade de vida das populações. Para evitar esses efeitos deletérios, novos estudos propõem o uso de controles alternativos, que tenham a mesma eficiência mas sem afetar o equilíbrio ecológico (FONSECA *et al.*, 2015).

Devido às exigências da sociedade para diminuir o uso de produtos químicos, e buscando se manter no mercado, os agricultores estão procurando soluções em controles alternativos para as pragas como, por exemplo, extratos e caldas de plantas, rúmen e urina bovinos e algumas bactérias como *Bacillus thurigiensis*, considerados biofertilizantes (SOUZA *et al.*, 2012).

As medidas alternativas ganharam espaço dentro da agricultura por, em alguns casos, não deixarem resíduos no fruto, o que representa uma vantagem para sua comercialização. A termoterapia se destaca dentre esses tratamentos por não apresentar riscos à saúde humana nem ao ambiente, e por proteger o fruto contra, principalmente, fitopatologias de pós-colheita, evitando que os agentes causadores de doenças se reproduzam e atinjam fisiologicamente os frutos (PESSOA *et al.*, 2007).

A hidroterapia é capaz de minimizar ou, até mesmo, erradicar o patógeno do fruto e reduzir desordens fisiológicas, sem causar efeitos colaterais deletérios. No entanto, esse método requer que a temperatura que gera a morte do fitopatógeno seja menor que a máxima suportada pelo fruto. Baseada na passagem de calor através da água, a termoterapia age na fisiologia do microrganismo desnaturando proteínas essenciais (BRITO *et al.*, 2008).

METODOLOGIA

O isolado de *P. digitatum* foi obtido a partir de frutos de laranja pêra provenientes da feira livre dos municípios de Governador Mangabeira e Muritiba, com indução de aparecimento de sintomas típicos da doença, utilizando câmara úmida.

Os frutos de laranja pêra com sintomas característicos da doença foram lavados em água corrente e sabão, e logo após foram efetuados pequenos cortes de aproximadamente 1,0 cm, com estilete flambado, na região de transição da lesão, seguido da desinfestação superficial em álcool a 70% durante 30 segundos e em hipoclorito de sódio a 2,5%, por 3 minutos. Posteriormente, os frutos foram lavados duas vezes consecutivas em água destilada esterilizada (ADE). Para retirar o excesso de umidade, os segmentos foram depositados com uma pinça flambada sobre papel de filtro esterilizado.

O material foi plaqueado em meio BDA (Batata-dextrose-ágar) e as placas vedadas com papel filme. O procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. Após sete dias de incubação, em condição de luz natural ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas), as colônias que apresentaram crescimento micelial regular e sem contaminação visual foram utilizadas para a manutenção do isolado, visando estudos posteriores.

Discos de colônias jovens foram retirados do isolado em meio BDA e colocados em frascos de vidro contendo ADE e em tubos de ensaio contendo BDA. Os frascos foram armazenados a temperatura ambiente (CASTELLANI, 1967) e os tubos a 4°C.

O teste de patogenicidade foi realizado com frutos de laranja, variedade Pêra. Os frutos foram lavados com água e sabão e posteriormente depositados em baldes contendo uma solução de hipoclorito a 2,5% por 3 minutos, seguido de três lavagens sucessivas em água corrente. Posteriormente, foram acondicionados em bandejas plásticas e postos para secar a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Em seguida, os frutos foram feridos com um corte transversal de aproximadamente 2 mm e inoculados com discos de micélio fúngico de *P. digitatum* de 6 mm de diâmetro, obtidos de colônias puras do fungo.

Após a inoculação do fungo, os frutos foram submetidos a câmara úmida por um período de 24 horas, cobrindo-se as bandejas com sacos plásticos umedecidos com água destilada estéril (ADE).

Os frutos foram imersos em água aquecida em banho-maria e vapor d'água a 55 °C e 60 °C por um período de 1, 2, 3, 4 e 5 minutos. No tratamento hidrotérmico, as frutas passaram pela aspersão de água a 25°C, durante dois minutos, para interromper o efeito da temperatura elevada. Foram considerados como testemunha os frutos não submetidos ao tratamento hidrotérmico e os tratados com o fungicida thiabendazole (485 g i.a. 100 l⁻¹).

Durante o tratamento termoterápico os frutos foram acondicionados em bandejas plásticas e secos a temperatura ambiente. As avaliações da incidência e severidade da doença foi realizada 10 dias após o tratamento. Para cada ferimento foi medido o diâmetro médio da lesão nas posições horizontal e vertical, acompanhando a curvatura do fruto. No caso da severidade, foi medida a altura dos frutos com paquímetro, seguindo o seu formato a cada ensaio. A incidência e a severidade foram medidas de acordo com as fórmulas:

$$\text{Incidência} = (\text{N}^\circ \text{ de frutos infectados} / \text{N}^\circ \text{ total de frutos}) \times 100$$

$$\text{Severidade} = (\text{Diâmetro das lesões} / \text{Altura média dos frutos}) \times 100$$

A percentagem de controle da doença foi calculada através do diâmetro médio das lesões de cada tratamento, descontando-se 2 mm (FRANCO; BETTIOL, 2000).

Cinco discos de colônia fúngica foram depositados em tubos de ensaio contendo 10 mL de ADE, mantidos em banho-maria a 55 °C e 60 °C, por um período de 1, 2, 3, 4 e 5 minutos. Em seguida, os discos foram transferidos para placas de Petri contendo BDA e incubados em câmara de crescimento tipo BOD, a temperatura de 25 ± 2 °C, durante sete dias. Para cada tratamento foram utilizadas cinco repetições. Para a contagem das colônias produzidas pelo fungo, as placas de Petri de cada tratamento foram dispostas individualmente em um contador de colônias Hipsômetro, com sua base inferior voltada para cima, marcando-se as colônias com uma caneta de retroprojektor.

Após o crescimento fúngico durante sete dias a temperatura ambiente, foram adicionados 20 ml de ADE em cada placa de Petri, passando sobre a colônia uma escova de cerdas macias para a retirada do micélio, que foi coado através de duas gazes esterilizadas. A esta solução foi adicionada 1 gota de Tween 80 e a contagem de esporos foi realizada com o uso da câmara de Neubauer.

Da suspensão de esporos (10^5 esporos/ml) provenientes de colônias puras de *P. digitatum* em meio BDA, foi retirada uma alíquota de 10 µL e transferida para tubos de ensaio, contendo batata-dextrose e mantidos em banho-maria nas condições anteriormente descritas. Para cada tratamento foram realizadas cinco repetições. As avaliações foram realizadas 48 horas após os tratamentos, determinando-se a percentagem de conídios germinados, cujo tubo germinativo devia ter, pelo menos, o dobro do tamanho do esporo (MORAES *et al.*, 2005).

Os dados foram submetidos à frequência relativa em porcentagem (fr_i %), o que permite encontrar os valores a partir das razões entre as frequências simples (f_i) e a frequência total ($\sum f_i$) (CRESPO, 2004).

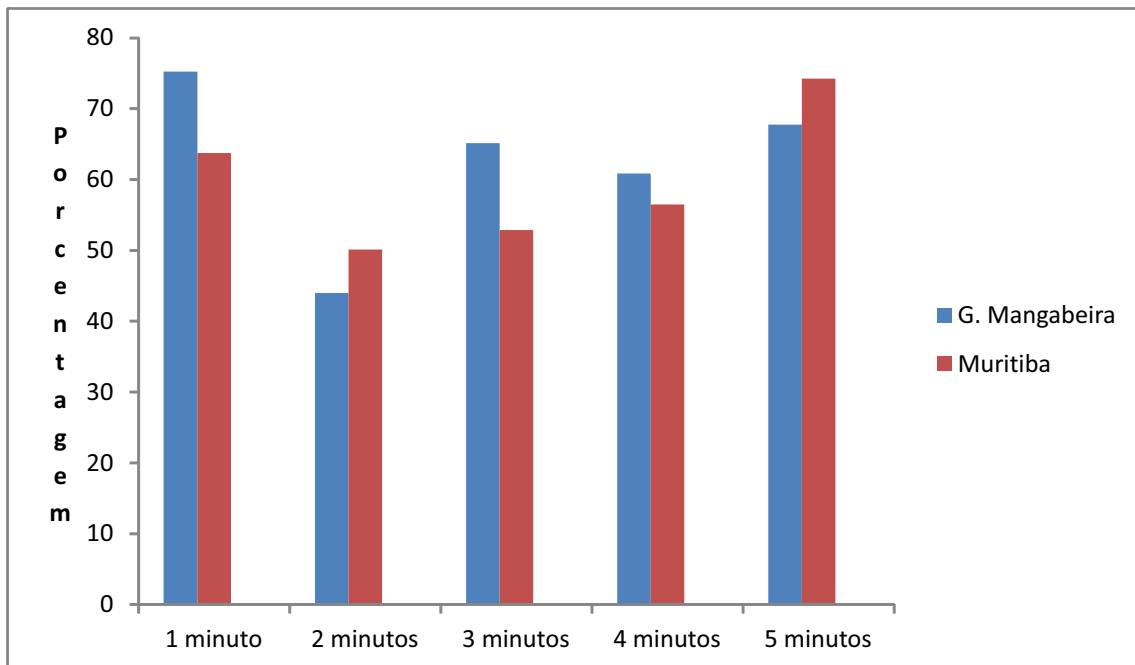
$$fr_i (\%) = (f_i / \sum f_i) \times 100$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve resultados positivos do tratamento hidrotérmico a 50 °C, tanto para o isolado do fungo *P. digitatum* do município de Governador Mangabeira, quanto o coletado em Muritiba; os mesmos se igualaram aos resultados apresentados pelo controle, mostrando assim sua ineficiência para controlar o fungo nas condições analisadas. Entretanto, o tratamento a 60°C conseguiu inibir fisiologicamente o fungo em todos os parâmetros testados, *in vitro* e *in vivo*, comprovando a eficiência do tratamento hidrotérmico a esta temperatura.

Nos estudos feitos por Brito *et al.* (2008), a temperatura de 50°C foi efetiva sobre patógenos em pós-colheita apenas em fruto da cajazeira, quando o tempo de exposição ao tratamento excedeu 20 minutos. Levando em conta os tempos utilizados neste estudo, todos abaixo de 10 minutos, pode-se pensar no fator tempo como determinante para os resultados negativos obtidos a 50°C.

Gráfico 1. Percentual de inibição de crescimento micelial do fungo proveniente de Governador Mangabeira e Muritiba no tratamento a 60°C.



Para o crescimento micelial, o tratamento na temperatura de 60°C apresentou um resultado positivo, uma vez que em todos os tempos utilizados a inibição nunca foi inferior a 40%, sendo que para os testes relacionados ao fungo de Governador Mangabeira, o tempo de 1 minuto obteve o maior índice de inibição (72,25%). Já com os fungos provenientes de Muritiba, o tempo que apresentou maior inibição (74,25%) foi o de 5 minutos.

Esse resultado foi também observado por Eschionato *et al.* (2017), que encontraram que temperaturas acima de 60°C inibiam o crescimento micelial dos fungos *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phoma caricae-papayae* e *Lasiodyplodia theobromae*, que são patógenos do mamão em pós-colheita.

Em relação à esporulação dos fungos, em todos os tempos testados, em frutos de ambas as cidades observou-se inibição acima de 70%. O tempo de 3 minutos inibiu 94,75% da esporulação, sendo este o maior índice para Governador Mangabeira; o maior percentual encontrado para os frutos de Muritiba foi de 97,56% no tempo de 5 minutos.

Nos estudos realizados por Albergaria *et al.* (2007), o termotratamento também foi capaz de inibir o desenvolvimento de ovos e larvas de *Ceratitis capitata*.

Gráfico 2. Percentual de inibição de esporulação do fungo proveniente de Governador Mangabeira e Muritiba no tratamento de 60°C.

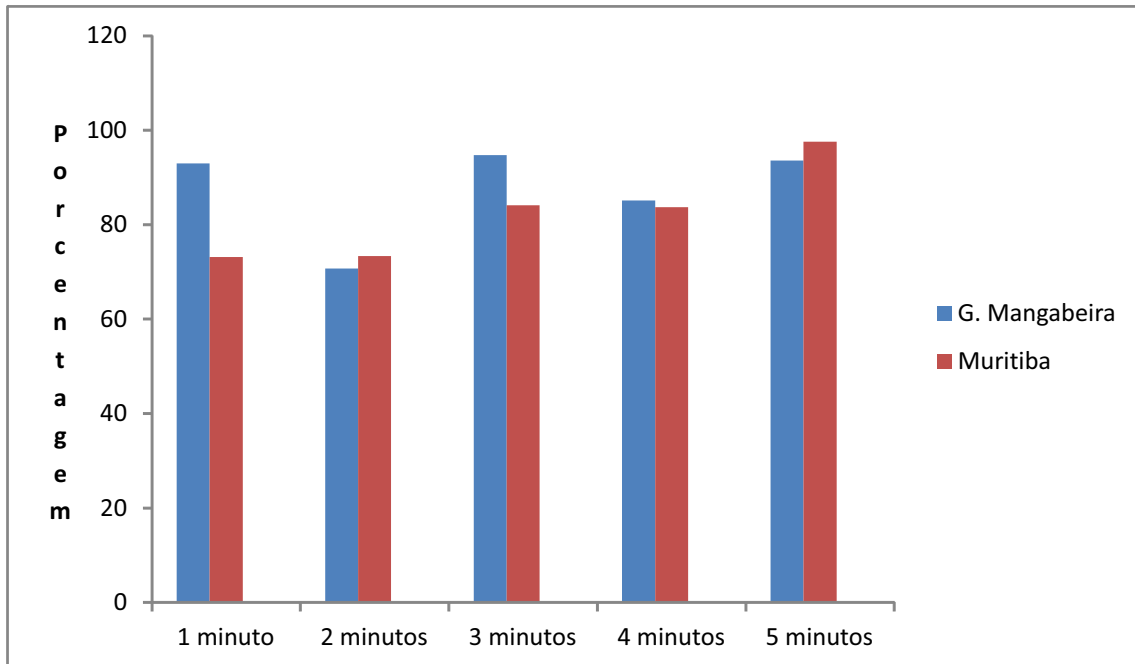
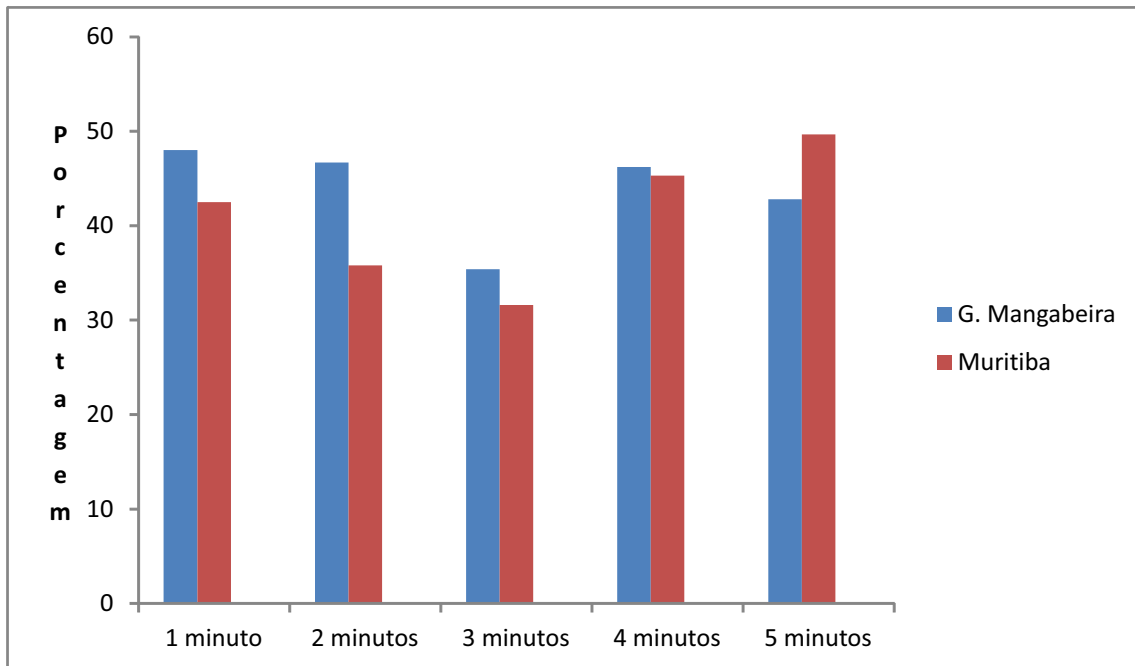


Gráfico 3. Percentual de inibição de germinação do fungo proveniente de Governador Mangabeira e Muritiba no tratamento a 60°C.



O maior percentual (49,65%) de inibição da germinação foi observado no tempo de 5 minutos com o fungo de Muritiba. Para o fungo de Governador Mangabeira, observou-se 48% de inibição, quando o fungo foi submetido ao tratamento por 1 minuto. Apesar dos números encontrados serem mais baixos que os das outras variáveis testadas, o resultado encontrado foi positivo, por permitir que uma parcela dos esporos não germinasse.

Nas avaliações feitas *in vivo*, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados dos ensaios e os controles, no que diz respeito aos índices de incidência e severidade. No

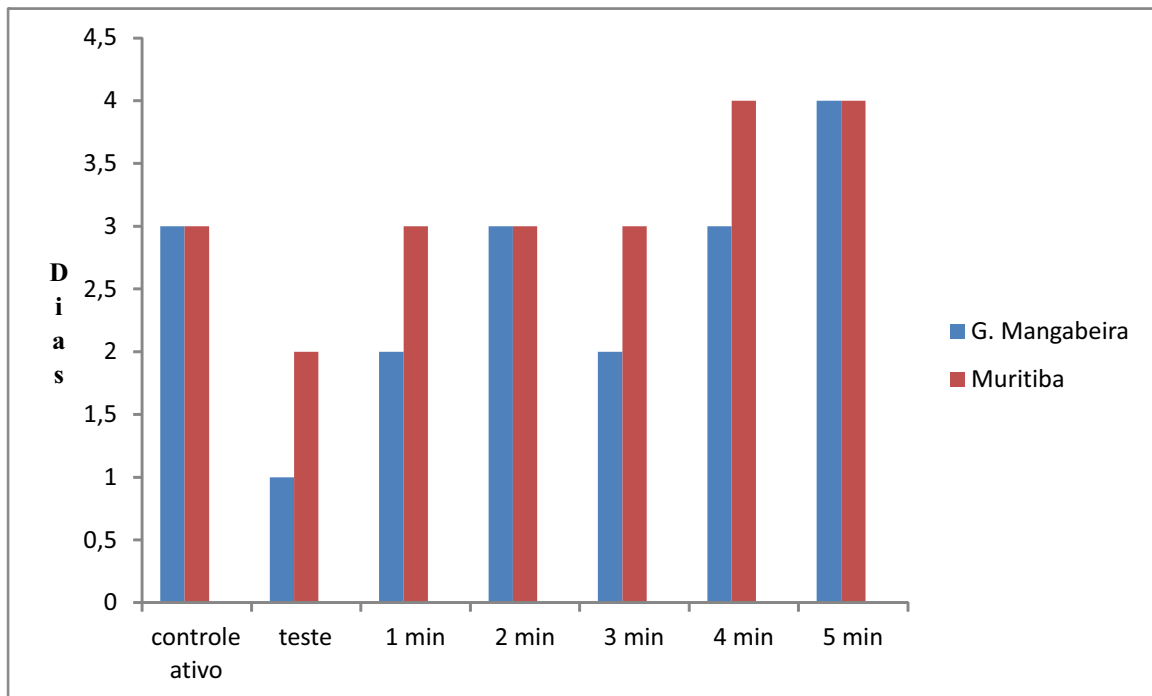
primeiro caso, após 10 dias todas as laranjas apresentavam sinais visíveis de contaminação. No segundo, a média dos ferimentos encontrados ultrapassava 95% em todos os tratamentos e nos controles.

Em estudos com banana “prata-anã”, Silva *et al.* (2018) afirmam que a termoterapia não foi eficaz em diminuir a incidência da doença (11,11%), apesar do tempo de conservação do fruto ser maior. Assim também para Sponholz *et al.* (2004) que, ao trabalhar com bananas atingidas por antracnose, avaliaram que, apesar das frutas apresentarem lesões após 12 dias, a incidência se manteve a mesma quando comparada ao tratamento.

Entretanto, observou-se que as laranjas submetidas ao tratamento de 60°C, em todos os tempos de exposição, demoraram 4 dias para apresentarem sinais de infecção, enquanto ambos os sinais nos frutos teste de Mangabeira apareceram no primeiro dia e nos de Muritiba no segundo. O controle ativo de Governador Mangabeira e Muritiba exibiram lesões características após 3 dias de observação.

Nishijima *et al.* (1992) observaram que o tratamento térmico do mamão, mesmo variando o tempo de exposição, não provocou mudanças significativas quanto à incidência nos testes *in vivo*. Porém, para Viecelli, Silva e Terraio (2015), o índice de incidência foi abaixo de 5%, em laranjas infectadas por *Penicillium digitatum*, demonstrando eficiência no tratamento a 52°C.

Gráfico 4. Tempo para a aparição dos primeiros sinais, do teste *in vivo*, nas laranjas submetidas ao tratamento de 60°C.



Assim, por se tratar de um tratamento para uma patologia que afeta o fruto na pós-colheita, este resultado se torna importante por demonstrar que o tratamento térmico consegue conservar a laranja intacta por mais tempo, em comparação ao uso do fungicida. Para Peruch *et al.* (2002), a termoterapia, além de reduzir a deteriorização do tecido, impede que a doença ganhe progressão, evitando também a perda de umidade.

Estudando a resistência da *Musa ssp* ao *Colletotrichum musae*, Moraes *et al.* (2005) perceberam que, apesar de retardar a ação do fungo sobre o fruto, o tratamento hidrotérmico não impediu a progressão da doença. Brito *et al.* (2008) acreditam que a eficiência da hidrotermia depende da faixa de temperatura e do tempo de exposição, sendo este mais viável para frutas que suportam temperaturas entre 50° e 60°C.

CONCLUSÃO

Diante dos dados apresentados, constata-se que o tratamento hidrotérmico pode ser recomendado como uma alternativa para o tratamento do *P. digitatum* em laranja pêra, por inibir a fisiologia do mesmo e assim interferir negativamente na sua ação sobre o fruto, retardando o aparecimento de lesões. Porém, o tratamento hidrotérmico dos frutos de laranja pêra não apresentou resultados satisfatórios com relação à incidência e à severidade.

Podemos considerar o tratamento em questão um viés de escape para o uso de agrotóxicos, por ter efeitos melhores em relação à conservação do fruto, sem ser nocivo. Este estudo poderá servir como base para outros trabalhos na área de controle alternativo, que visem promover futuramente uma diminuição no uso de produtos químicos na agricultura e conseqüentemente ajudar na conservação do meio ambiente e na saúde da população.

REFERÊNCIAS

- ALBERGARIA, Nuno Miguel Soares *et al.* Tratamento hidrotérmico de frutos de laranjeira (*Citrus sinensis*) Var. 'Valência', visando ao controle de ovos e larvas de *Ceratitis capitata* (Wied., 1824) (Diptera: Tephritidae). **Científica**, Jaboticabal, v.35, n.2, p.146 - 154, 2007.
- BRITO, Carlos Henrique *et al.* Termoterapia para o controle de patógenos em pós-colheita em frutos da cajazeira. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 1, p.19-23, 2008.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p. 181-184, 1967.
- CRESPO, Antônio Arnot. **Estatística Fácil**. Ed. 17, São Paulo: Saraiva, 2002.
- ESCHIONATO, Raquel Andrade *et al.* **Ação da temperatura no controle de fungos causadores de doenças póscolheita em mamão**. 11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 2017.
- FONSECA, M.C.M *et al.* Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.1, p.45-50, 2015.
- FRANCO, D. A. S.; BETTIOL, W. Controle do bolor verde em pós-colheita de citros com produtos alternativos. **Embrapa Meio Ambiente**, n. 10, p. 1-4, 2000.
- MORAES, W. S. *et al.* Termoterapia de banana prata-anã no controle de podridões em pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 6, p.603-608, 2005.
- NISHIJIMA, K.A. *et al.* Effect of forced, hot-air treatment of papaya fruit on quality and incidence of postharvest disease. **Plant Dis.**, v. 78, n. 7, p. 723-727, 1992.
- PERUCH, L.A.M. *et al.* Métodos de controle integrado da antracnose do maracujazeiro. **Agropecuária Catarinense**, v. 15, n. 1, p. 5-9, 2002.
- PEREIRA, Vanessa Gabriele Martins *et al.* A relação entre o uso de agrotóxico e o aumento de índice de câncer no Brasil. **Revista Gestão em Foco**, n. 9, 2017.
- PESSOA, Wagner Rogério Leocádio Soares *et al.* Efeito do tratamento hidrotérmico associado a indutores de resistência no manejo da antracnose da boiaba em pós-colheita. **Revista Caatinga**, v. 20, n. 3, p.129-135, jul-set, 2007.
- RIGOTTO, Raquel Maria; VASCONCELOS, Dayse Paixão; ROCHA, Mayara Melo. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, v.30, n.7, p.1-3, jul, 2014.
- SILVA, Laís Maia *et al.* Tratamento hidrotérmico no manejo da antracnose em bananeira 'Prata-Anã' produzida no semiárido de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira Fruticultura**, v.40, n.2, 2018.

SOUZA, Marcia Ferreira *et al.* Tipos de controle alternativo de pragas e doenças nos cultivos orgânicos no estado de Alagoas, Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.7, n.1, p.132-138, 2012.

SPONHOLZ, C; BATISTA, UG; ZAMBOLIM, L. Efeito do tratamento hidrotérmico e químico de frutos de banana Prata no controle da antracnose em pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.29, n.5, p.480-485, 2004.

VIECELLI, Monica Pirola; SILVA, Adriane Maria; TERAPO, Daniel. **Aplicação de tratamento hidrotérmico por aspersão, sobre escovas rolantes, no controle do bolor verde em laranja.** CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8., 2014, Campinas.