

INATIVAÇÃO DE ESPOROS DE *Colletotrichum gloeosporioides* POR AÇÃO COMBINADA DO CITRAL OU ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO E ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Fernando L. Palhano¹, Thábita T. B. Vilches², Reginaldo B. Santos², Marcos T. D. Orlando³,
José Aires Ventura⁴, Patrícia M.B. Fernandes¹

¹ Departamento de Ciências Fisiológicas, ² Departamento de Química, ³ Departamento de Física, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, pat@npd.ufes.br, ⁴ Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural - Incaper, C.P. 391, CEP. 29001-970, Vitória, ES, ventura@incaper.es.gov.br

INTRODUÇÃO

O mamão possui uma casca muito fina, que se danifica facilmente, e pequenas lesões durante o manuseio são portas de entrada para microorganismos. Antracnose é a mais importante doença pós-colheita do mamão, sendo causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz e Saccardo). Um método efetivo para o controle de várias doenças, incluindo a antracnose, é o tratamento hidrotérmico dos frutos. Entretanto, esse tratamento pode causar alterações no metabolismo do fruto e conseqüente descaracterização da palatabilidade, implicando rígido controle da temperatura da água e do tempo de imersão. Além disso, para tornar o tratamento hidrotérmico mais eficiente, usualmente é adicionada a água um fungicida (ZAMBOLIM et al., 2002).

O potencial da alta pressão hidrostática (HHP), como um método não-térmico para a inativação de microorganismos e para preservar alimentos, vem sendo muito estudado em todo mundo nos últimos anos. Alguns exemplos de alimentos comercializados tratados por alta pressão hidrostática são: presunto, na Espanha; guacamole, nos EUA; suco de laranja, na França; tendereização da carne, no Japão; entre outros. Alterações morfológicas em microorganismos, como mudanças na distribuição das organelas celulares e alterações na membrana celular são conseqüência de tratamentos com altas pressões hidrostáticas.

Uma nova maneira para reduzir a proliferação de microorganismos é o uso de óleos essenciais de plantas. As propriedades fungicidas e bactericidas de vários óleos essenciais têm sido descritas por vários trabalhos (PUPO et al., 2003). Óleos essenciais atuam causando uma desestruturação da membrana do microorganismo, levando-o à morte. O uso de óleos essenciais é uma alternativa com grande potencial de uso no controle de doenças fúngicas, pois permite a diminuição ou substituição do uso de fungicidas, causando menor impacto ambiental e maior aceitabilidade do produto.

Citral é o maior componente (> 70 %) do óleo essencial do capim-limão (*Cymbopogon citratus* Stapf.). Esse monoterpene mostrou-se efetivo no controle do crescimento micelial e da germinação de esporos de *C. gloeosporioides* (PUPO et al., 2003). Além disso, é um dos flavorizantes mais utilizados pela indústria mundial. Neste trabalho, foi investigado o efeito do tratamento simultâneo do citral, ou óleo essencial de capim-limão, e HHP no controle de *C. gloeosporioides*.

MATERIAL E MÉTODOS

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* foi isolado diretamente de frutos naturalmente infectados e foram mantidos em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). O fungo foi cultivado em meio líquido batata-dextrose (BD) e incubado a 28 °C, em sistema de rotação (180 rpm.min⁻¹), por sete dias. Após ser filtrado em gaze, os conídios foram lavados com água três vezes e ressuspensos em uma solução isotônica (0,9% NaCl) contendo

0,1% de Tween 80, para prevenir dispersão dos conídios e facilitar a diluição do óleo.

Para a extração do óleo essencial e purificação do monoterpene, foram usadas folhas do capim-limão submetidas à destilação a vapor, usando-se diclorometano para remover o óleo da parte aquosa; em seguida, a solução foi desidratada, adicionando-se sulfato de sódio. Essa solução foi filtrada e rota- evaporada até a obtenção do extrato bruto. O monoterpene citral foi purificado por cromatografia com sílica gel. As amostras obtidas foram comparadas com um padrão (Dragoco Perfumes e Aromas Ltda; SP, Brasil). Análises por cromatografia gasosa mostraram a presença de 81% de citral no óleo de capim-limão e 80-95% de pureza no monoterpene citral purificado.

Para a avaliação da inibição da germinação dos conídios, utilizou-se citral ou óleo de capim-limão, os quais foram adicionados à suspensão de conídios ($8-10 \times 10^6$ conídios. ml^{-1}) até uma concentração final de 0, 0.15, 0.30, 0.45, 0.75 e 1.5 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ e incubados a 25 °C por 30 min. Suspensões de esporos ($8-10 \times 10^6$ esporos. ml^{-1}) com ou sem citral ou óleo de capim-limão foram pressurizadas (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ou 400 MPa) em ausência de bolhas de ar a 25 °C por 30 min. Após o tratamento, as amostras foram lavadas três vezes em água, diluídas apropriadamente e aplicadas em meio BDA. Após dois dias de crescimento, a viabilidade foi determinada por contagem das unidades formadoras de colônias (cfu).

Amostras de esporos foram fixadas por três horas em solução fixadora (0,1 M fosfato de potássio, pH 7,0; 0,2 % de formaldeído) e seqüencialmente desidratadas em 30, 50, 60, 70, 80, 90, 95 e 100% de etanol, sendo cobertas com carbono e observadas usando-se o microscópio eletrônico de varredura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eficiência na inibição da germinação pelo citral ou óleo de capim-limão foi dose dependente (Figura 1).

Com o resultado desse experimento, foi escolhida a concentração de 0.75 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, em que já existe inibição da germinação de conídios em ambos os óleos. A viabilidade dos esporos tratados com citral ou com óleo de capim-limão e pressão hidrostática foi similar. Houve forte sinergismo entre os tratamentos, fazendo com que a pressão necessária para inativação completa dos esporos fosse reduzida de 350 MPa, na ausência do óleo, para apenas 150 MPa (1 atm = 0,1 MPa) na presença de qualquer um dos dois óleos (Figura 2).

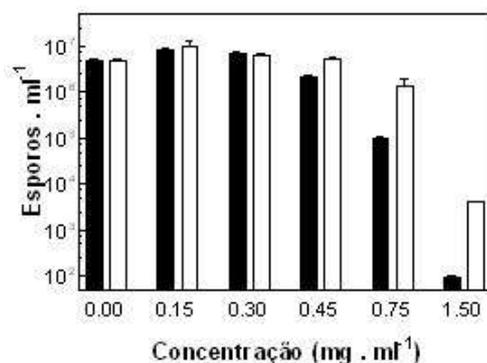


FIGURA 1 – Efeito de diferentes concentrações de citral (<) e óleo de capim-limão (0) na germinação de esporos de *C. gloeosporioides*.

Para visualizar os efeitos do citral, da pressão hidrostática e do sinergismo entre eles, esporos de *C. gloeosporioides* foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura após diferentes tratamentos.

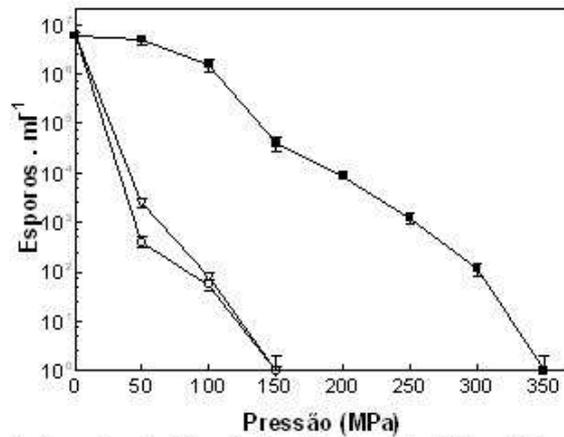


FIGURA 2 – Efeito do tratamento de 30 min de alta pressão hidrostática na viabilidade de esporos de *C. gloeosporioides*. (\triangleleft) sem óleo; (D) com 0,75 mg.ml⁻¹ de citral e (O) com 0,75 mg.ml⁻¹ de óleo de capim limão.

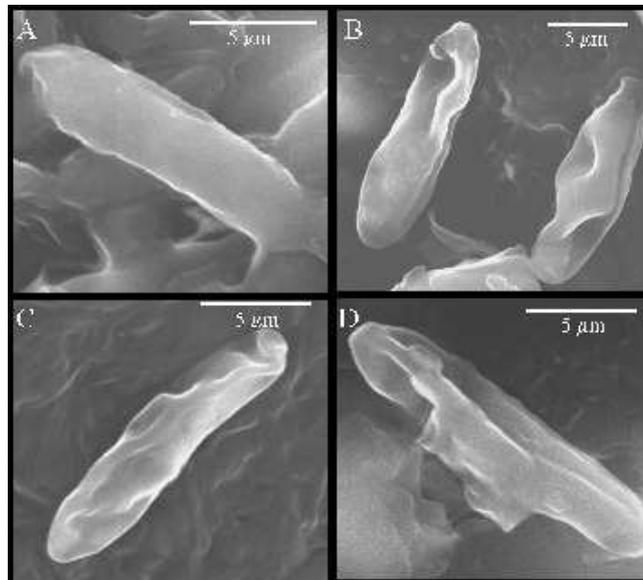


FIGURA 3 – Microscopia eletrônica de conídios de *C. gloeosporioides* (A) antes do tratamento; (B) após 30 min de tratamento com 1.5 mg.ml⁻¹ de citral; (C) após 150 MPa por 30 min e (D) após o tratamento combinado com 0.75 mg.ml⁻¹ de citral e 150 MPa por 30 min.

CONCLUSÃO

O uso do óleo de capim-limão como alternativa no controle de doenças de frutas pode ser possível, já que seu maior constituinte (citral) é normalmente usado na indústria de alimentos. Há potencial do uso combinado de óleos essenciais e HHP para o controle de *C. gloeosporioides* em pós-colheita de frutas. Este processo é interessante, pois elimina o uso de fungicidas químicos, além disso o sinergismo entre o uso de óleo essencial e HHP diminui a quantidade de óleo essencial a ser usada e a intensidade da HHP aplicada.

AGRADECIMENTOS

Ao PIBIC/UFES, à FINEP, ao IME e ao CNPq.

REFERÊNCIAS

PUPO, M.S.; ALVES, E.S.S.; SANTOS, R.B.; VENTURA, J.A.; FERNANDES, P.M.B. Antifungal activity of monoterpenes against the plant pathogens *Colletotrichum gloesporioides*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium subglutinans* f.sp. *ananas*. **Applied and Environmental Microbiology** (submetido, 2003).

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; VENTURA, J.A.; VALE, F.X.R. Controle de doenças em pós-colheita de fruteiras tropicais. In: ZAMBOLIM, L. et al. (ed.). **Manejo integrado de doenças e pragas de fruteiras tropicais**. Viçosa-MG: UFV, 2002. p. 443-512.