



Substâncias GRAS no controle do crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium guttiforme* in vitro

Eskálath Morganna Silva FERREIRA^[1,*]; Camilla Martins MALTA^[1]; Cristiane Martins COELHO^[1]; Raphael Sanzio PIMENTA^[2]

^[1] Universidade Federal do Tocantins, Campus Palmas. Laboratório de Microbiologia geral e Aplicada. Avenida NS 15, 109 Norte - Plano Diretor Norte, 77001-090. Palmas-TO, Brasil. Email: camillamalta_17@hotmail.com, criscoelho@uft.edu.br,

^[2] Professor do programa de Pós-Graduação Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (BIONORTE). Laboratório de Microbiologia geral e Aplicada. Avenida NS 15, 109 Norte - Plano Diretor Norte, 77001-090. Palmas-TO, Brasil. E-mail: biorapha@yahoo.com.br

INFORMAÇÕES	RESUMO
Recebido em: 06/09/2015	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Fusarium guttiforme</i> são fungos fitopatogênicos causadores de diversas doenças pós-colheita em frutos. As substâncias "GRAS" - (<i>Generally d Regarded As Safe</i>), são uma alternativa no controle de microorganismos na fase pós-colheita, devido seus efeitos fungistáticos e fungicidas comprovados. O presente estudo observou os efeitos de cinco substâncias "GRAS" no controle de crescimento dos fungos fitopatogênicos <i>C. gloeosporioides</i> e <i>F. guttiforme</i> in vitro. Meios de cultura (BDA) foram suplementados com 1%, 3% e 5% de bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, carbonato de cálcio, cloreto de cálcio e 0,1%, 0,5%, 1% de cloreto de potássio. Foram inoculados 10µl de solução de esporo na concentração de 5x10 ³ esporo/ml. Das cinco substâncias utilizadas nos testes, bicarbonato de sódio e carbonato de sódio inibiram 100% o crescimento do fungo <i>C. gloeosporioides</i> , as demais não foram limitantes para o desenvolvimento do fungo quando comparado ao controle. Carbonato de sódio inibiu em 100% o crescimento de <i>F. guttiforme</i> em todas as concentrações. Foram positivos também, bicarbonato de sódio nas concentrações de 3% e 5%. O tratamento utilizando 5% de cloreto de cálcio reduziu em 51% o crescimento deste fitopatógeno. As outras substâncias não reduziram ou inibiram o crescimento micelial do fitopatógeno quando comparado com o controle. Das cinco substâncias "GRAS" testadas neste trabalho, carbonato de sódio e bicarbonato de sódio, foram eficazes em inibir o crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> . Carbonato de sódio, bicarbonato de sódio e cloreto de cálcio se mostraram capazes de inibir o crescimento micelial <i>F. guttiforme</i> .
Aceito em: 25/11/2015	
Publicado em: 23/12/2015	
Document Object Identifier 10.18067/jbfs.v2i4.67	
Termos de indexação: Controle biológico integrado Biocontrole Bicarbonato de sódio	
*Autor para correspondência morganna_ferreira@hotmail.com	

GRAS substances in control of *Colletotrichum gloeosporioides* growth and *Fusarium guttiforme* vitro

ABSTRACT- *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium guttiforme* are phytopathogenic fungi causing various post-harvest diseases in fruits. Substances "GRAS" - (*Generally Regarded Ase Safe*), they are an alternative for the control of microorganisms in the post-harvest phase, due to their fungistatic and fungicide effects. The objective of this study was to evaluate the inhibitory effects of five "GRAS" substances over the growth of pathogenic fungi *C. gloeosporioides* and *F. guttiforme* in vitro. Culture media (PDA) were supplemented with 1%, 3% and 5% sodium bicarbonate, sodium carbonate, calcium carbonate, calcium chloride and 0.1% 0.5% 1% potassium chloride. 10µl spore solution was inoculated at a concentration of 5x10³ml/spore. From the five substances used in the tests, sodium bicarbonate and sodium carbonate inhibited 100% of *C. gloeosporioides* growth, the others were not limiting to the development of the fungus when compared to control. Sodium carbonate inhibited 100% of *F. guttiforme* growth at all concentrations. Were also positive, sodium bicarbonate in concentrations of 3% and 5%. The treatment with 5% calcium chloride at 51% reduced the growth this phytopatogen. Other substances not reduced or inhibited the mycelial growth of the pathogen when compared to the control. From the five substances "GRAS" tested in this work, sodium carbonate and sodium bicarbonate, were effective in inhibiting the mycelial growth of *C. gloeosporioides*. Sodium carbonate, sodium bicarbonate and calcium chloride were able in to reduce the growth of *F. guttiforme*.

Index terms: integrated biological control; Biocontrol; Sodium bicarbonate.



Copyright: © 2015 JBFS all rights. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Financiamento: Os autores reportam que houve suporte e auxílio financeiro pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Bolsa de doutorado com auxílio bancada.

Conflito de interesse: Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Como referir esse documento (ABNT):

FERREIRA, E. M. S.; MALTA, C. M.; COELHO, C. M.; PIMENTA, R. S. Substâncias GRAS no controle do crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium guttiforme* in vitro. **Journal of Bioenergy and Food Science**, Macapá, v.2, n.4, p.183-188, out./dez., 2015. <http://dx.doi.org/10.18067/jbfs.v2i4.67>

INTRODUÇÃO

Colletotrichum gloeosporioides e *Fusarium guttiforme* são fungos fitopatogênicos envolvidos em um grande número de doenças pós-colheita, desenvolvendo-se principalmente na fase de armazenamento de frutos [1, 2].

O gênero *Colletotrichum* apresenta as espécies que estão entre os mais bem-sucedidos fungos patogênicos de plantas, causando significativos prejuízos econômicos às plantações das regiões tropicais, subtropicais e temperadas. As espécies pertencentes ao gênero, geralmente são responsáveis pela antracnose e outras doenças em uma grande variedade de culturas incluindo cereais, leguminosas, olerícolas e frutos [3-6].

O fungo *Fusarium guttiforme* é o principal agente causador da fusariose que é a mais importante doença pós-colheita para a cultura do abacaxi. Pode causar danos de alta intensidade (cerca de 80%) nos frutos. Sendo esta doença também conhecida por gomose, devido à exsudação de seiva, observada na base do fruto, em caules, folhas e nos frutinhos atacado pelo patógeno [2].

A utilização de fungicidas ainda é a forma de controle mais utilizada para minimizar os danos ocasionados por estes microrganismos durante a fase pós-colheita de frutos. No entanto, a utilização destes produtos depende do mercado ao qual a produção está destinada. Para o mercado nacional, o controle destas doenças tem contado com a utilização massiva de fungicidas sintéticos, pois não existe regulamentação para o uso de tais produtos químicos no Brasil. Todavia, quando se trata de frutos destinados a exportação, alguns mercados já têm imposto marcos regulatórios sobre a utilização de fungicidas e tem tornado cada vez mais restritivos as exportações de frutos que fazem uso de pesticidas químicos [7, 8]. Por outro lado, além das barreiras de fiscalização terem aumentado em diversos países, os consumidores também têm demonstrado uma maior preocupação com os impactos gerados pelo uso de pesticidas químicos, no que diz respeito à qualidade dos produtos alimentícios consumidos e os impactos gerados ao meio ambiente. O que impulsiona a produção de alimentos mais saudáveis e a utilização de métodos alternativos de controle [9, 10].

Diante deste cenário, a transição da aplicação de pesticidas químicos para a utilização de métodos mais seguros, como a utilização de substâncias “GRAS” (*Generally Recognized As Safe*), ou seja, uma substância considerada segura, se mostra como uma boa alternativa no controle de fitopatógenos, pois auxiliam outros agentes biológicos em sua ação antagonista, ou podendo sozinhos causar efeito

fungistático ou fungicida aos patógenos alvo de controle [11-13].

Entre estas substâncias, as mais conhecidas são o bicarbonato de sódio, cloreto de cálcio, quitosana, carbonato de sódio, etanol, nisina, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, entre outras. Estas por sua vez, são muito empregadas como aditivos pela indústria alimentícia. E compõem uma lista de substâncias sancionadas pela FAO/FDA o que assegura não causar danos a saúde e não necessitar de avaliação prévia de uso e comercialização [11, 13].

Sendo assim, o presente trabalho, teve como objetivo testar os efeitos de cinco substâncias “GRAS” no controle do crescimento dos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium guttiforme*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo foram selecionadas cinco substâncias listadas pela FAO/FDA, sendo elas: (1) bicarbonato de sódio, (2) carbonato de sódio, (3) carbonato de cálcio, (4) cloreto de cálcio e (5) cloreto de potássio.

a) Preparação do Inóculo

Os fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium guttiforme* foram reativados previamente em meio de cultivo NYDA (0,3% extrato de carne; 0,5% extrato de levedura; 0,5% peptona; 1% glicose; 2% ágar; 0,02% cloranfenicol) e incubados a 25 °C por 7 dias. Após o crescimento, as placas com os fitopatógenos foram raspadas com auxílio de alça microbiológica estéril e os esporos adicionados a uma solução salina (0,85%) estéril, afim de se obter uma solução de esporos. Com o auxílio de Câmara de Neubauer as soluções dos fitopatógenos foram ajustadas a concentração de 5×10^3 esporos/ml.

b) Preparação dos Meios

Foram preparadas placas de petri contendo o meio de cultivo NYDA suplementado com 1%, 3% e 5% de bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, carbonato de cálcio e cloreto de cálcio. Para cloreto de potássio, foi adicionado uma concentração foi de 0,1%, 0,5% e 1%, pois, de acordo com a FAO/FDA o limite de suplementação em alimentos por esta substância é de no máximo 1%.

c) Teste de Sensibilidade

Foram inoculados no centro das placas e erlenmeyer 10µl de cada suspensão de esporos na concentração de 5×10^3 esporos/mL. Como controle

positivo, 10µl das suspensões contendo os esporos dos fitopatógenos foram inoculados em placas de NYDA isentas de substâncias “GRAS”. As placas foram incubadas a 25°C por um período de 7 dias. O diâmetro do micélio fúngico foi mensurado com o auxílio de um paquímetro digital e comparado com o controle positivo nos dias 3, 5 e 7 do período de incubação. Todos os testes foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as substâncias GRAS testadas, carbonato de sódio, carbonato de cálcio, bicarbonato de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de

potássio, somente carbonato de sódio e bicarbonato de sódio foram capazes de inibir significativamente o crescimento do fitopatógeno *C. gloeosporioides* em todas as concentrações testadas. Carbonato de sódio e bicarbonato de sódio inibiram em 100% do crescimento micelial deste fitopatógeno (**Figura 1**). Por outro lado, cloreto de cálcio, carbonato de cálcio e cloreto de potássio não inibiram o crescimento fúngico em nenhuma das concentrações avaliadas e não foram observadas diferenças estatísticas a 5% de significância pelo Teste de Tukey para as três concentrações (**Figura 2**).

Figura 1: Efeito das diferentes substâncias GRAS em diferentes concentrações sobre o crescimento de *C. gloeosporioides*, após 7 dias de incubação a 25° C. As barras verticais representam a média de 3 repetições. *Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas barras, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). (CS) = Carbonato de sódio; (BS) = Bicarbonato de sódio; (CCa) = Carbonato de cálcio; (CLCa) = Cloreto de cálcio e (CLP) = Cloreto de potássio.

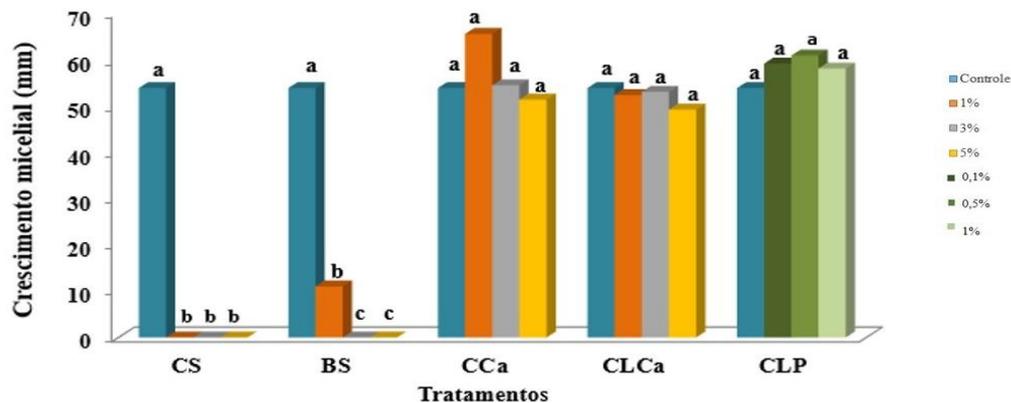
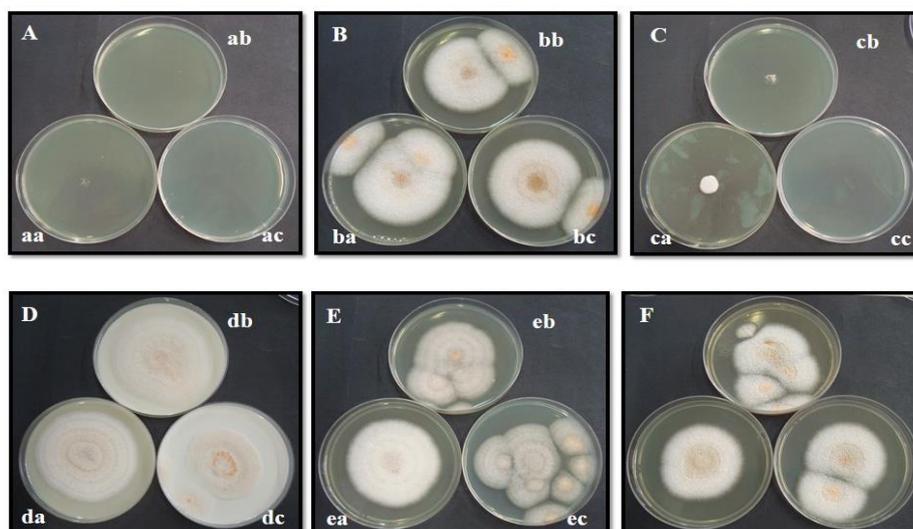


Figura 2. Crescimento micelial do fitopatógeno *C. gloeosporioides*. (A) = meio suplementado com carbonato de sódio. (aa) = 1%, (ab) = 3%, (ac) = 5%. (B) = meio suplementado com cloreto de potássio. (ba) = 0,1%, (bb) = 0,5%, (bc) = 1%. (C) = meio suplementado com bicarbonato de sódio. (ca) = 1%, (cb) = 3%, (cc) = 5%. (D) = meio suplementado com carbonato de cálcio. (da) = 1%, (db) = 3%, (dc) = 5%. (E) = meio suplementado com cloreto de cálcio. (ea) = 1%, (eb) = 3%, (ec) = 5%. (F) = controle positivo.



De acordo com Madani et al. [14] ao estudar o efeito da aplicação de cloreto de cálcio em mamão nas fases pré e pós colheita sobre a antracnose, observaram que o cloreto de cálcio nas concentrações de 0,5 e 1% estimularam o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, enquanto nas concentrações de 1,5 e 2% o crescimento micelial apresentou-se igual ao do controle, resultado este semelhante ao encontrado neste estudo.

Para o fitopatógeno *F. guttiforme*, das cinco substâncias GRAS testadas três demonstraram eficiência em inibir seu crescimento micelial. Carbonato de sódio reduziu 52%, 72% e 100% do

crescimento micelial nas concentrações de 1%, 3% e 5% respectivamente. Foram positivos para bicarbonato de sódio os tratamentos nas concentrações de 3% e 5%, reduzindo 72% e 87% do crescimento micelial. O tratamento utilizando 5% de cloreto de cálcio foi o único desta substância que reduziu em 51% o crescimento do *F. guttiforme* (Figura 3). As substâncias “GRAS” carbonato de cálcio e cloreto de potássio não apresentaram capacidade de reduzir ou inibir o crescimento do fitopatógeno e não foram observadas diferenças estatísticas a 5% de significância pelo Teste de Tukey para as três concentrações (Figura 4).

Figura 3. Efeito das diferentes substâncias GRAS em diferentes concentrações sobre o crescimento de *F. guttiforme*, após 7 dias de incubação a 25° C. As barras verticais representam a média de 3 repetições. *Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas barras, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). (CS) = Carbonato de sódio; (BS) = Bicarbonato de sódio; (CCA) = Carbonato de cálcio; (CLCa) = Cloreto de cálcio e (CLP) = Cloreto de potássio.

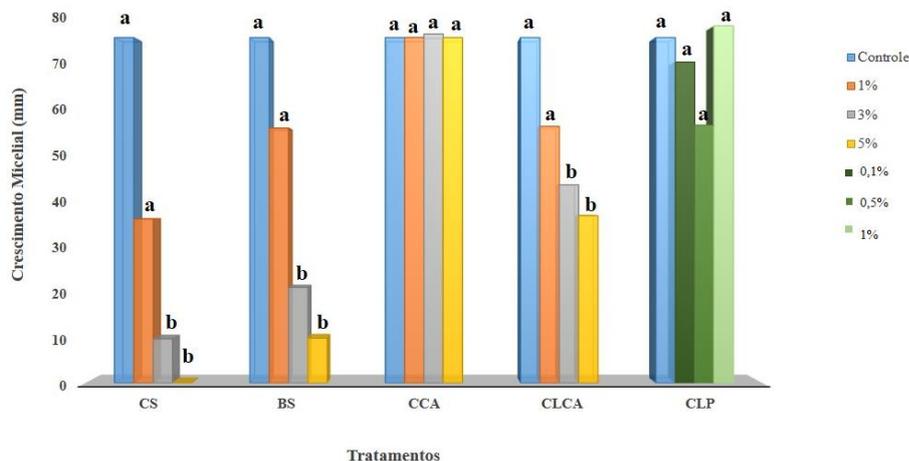
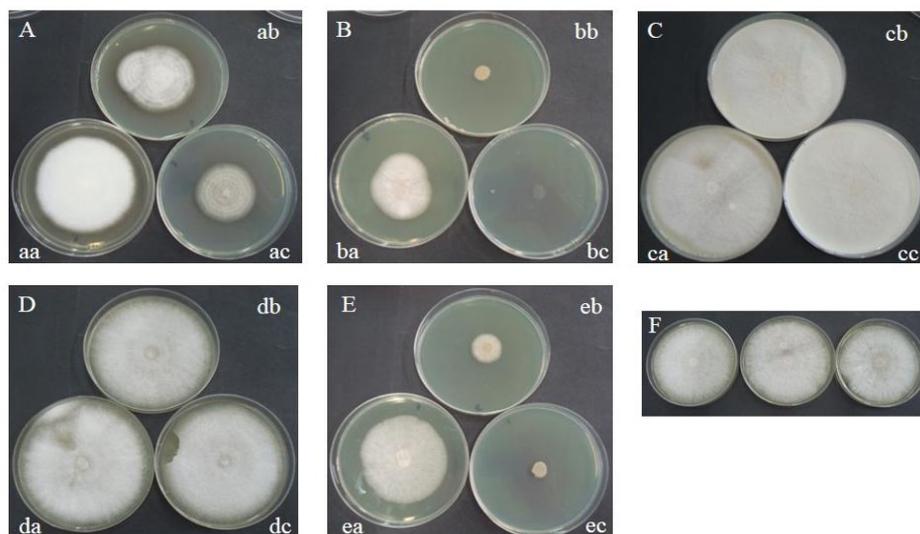


Figura 4. Crescimento micelial do fitopatógeno *F. guttiforme*. (A) = meio suplementado com cloreto de cálcio. (aa) = 1%, (ab) = 3%, (ac) = 5%. (B) = meio suplementado com carbonato de sódio. (ba) = 1%, (bb) = 3%, (bc) = 5%. (C) = meio suplementado com carbonato de cálcio. (ca) = 1%, (cb) = 3%, (cc) = 5%. (D) = meio suplementado com cloreto de potássio. (da) = 0,1%, (db) = 0,5%, (dc) = 1%. (E) = meio suplementado com bicarbonato de sódio. (ea) = 1%, (eb) = 3%, (ec) = 5%. (F) = controle positivo.



Todavia os efeitos de compostos denominados GRAS, assim como de sais de carbonatos e outros aditivos, já são conhecidos contra uma grande variedade de patógenos e são utilizados por terem uma ação principalmente fungistática e serem pouco persistentes [15].

Segundo Janisiewicz e Conway [16], o efeito dos tratamentos de sais de bicarbonatos e carbonatos é principalmente fungistático porque os esporos fúngicos não são inativados, somente a sua germinação é adiada. Os mesmos autores ainda afirmam que os esporos geminados parecem ser mais facilmente inativados pela presença destas substâncias que os esporos não germinados.

CONCLUSÃO

O carbonato e bicarbonato de sódio mostraram uma boa eficiência no controle do crescimento do *C. gloeosporioides*, sendo que ambas foram eficazes na menor concentração testada.

Contra *F. guttiforme* das cinco substâncias “GRAS” testadas três se mostraram capazes de reduzir e inibir o crescimento micelial *in vitro*, sendo elas carbonato de sódio, bicarbonato de sódio e cloreto de cálcio.

O que evidência o possível emprego destas substâncias como possíveis agentes fungistáticos ou fungicidas sobre estes fungos e sua possível

utilização no controle biológico integrado. Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para se confirma esta hipótese.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Tocantins e Laboratório de Microbiologia Ambiental e Aplicada pelo apoio e concessão de recursos. Ao CNPq pelo apoio financeiro.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

1. Condução e avaliação do experimento, análises estatísticas e elaboração do artigo:

[Camilla Martins Malta](#)

[Eskálath Morganna Silva Ferreira](#)

[Cristiane Martins Coelho](#)

2. Planejamento, orientação e revisão final do artigo:

[Dr. Raphael Sanzio Pimenta](#)

[Camilla Martins Malta](#)

REFERÊNCIAS

- [1]. BONETT, L.P.; MULLER, G.M.; WESSLING, C.R.; GAMELLO, F.D. Extrato etanólico de representantes de cinco famílias de plantas e óleo essencial da família Asteraceae sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* coletados de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Agroecologia**. v.7, p.116-125, 2012.
- [2]. STEPIEŃ, L.; KOCZYK, G.; WAŚKIEWICZ, A. Diversity of *Fusarium* species and mycotoxins contaminating pineapple. **Journal Applied Genetics** v.5, p.367-380, 2013. DOI:10.1007/s13353-013-0146-0.
- [3]. AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5 th ed. San Diego: Academic Press, 2005. p.922.
- [4]. CANNON, P.F.; DAMM, V.; JOHNSTON, P.R., WEIR, B.S. *Colletotrichum*-current status and future directions. **Studies in Mycology**. v.73, p.181-213, 2012. DOI:10.3114/sim0014
- [5]. GUPTA, V. K. et al. Genetic characterization of mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. By random amplified polymorphic DNA analysis. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 26, p. 4009-4013, 2010.
- [6]. RAMPERSAD, S. N. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with Antracnose desiasse of papaya in Trinidad. **Plant Disease**. 95. 1244-1254. 2011. DOI:10.1094/PDIS-02-11-0080
- [7]. HILLOCKS, R.J. Farming with fewer pesticides: EU pesticide review and resulting challenges for UK agriculture. **Crop Protection**, v. 31, p.85 e 93, 2012. DOI: 10.1016/j.cropro.2011.08.008
- [8]. BAUTISTA-BAÑOS, S.B.; SIVAKUMAR,D.; BELLO-PERÉZ, A.; VILLANUEVA, A.; HERNADEZ-LOPEZ,M. A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. **Crop Protecion**. v.49, p.8-20, 2013. DOI:10.1016/j.cropro.2013.02.011
- [9]. MELO, I.S.; AZEVEDO, I.L. Controle Biológico. Jaguariuna: **Embrapa Meio Ambiente**. 2000. v.3, 387p.
- [10]. PIMENTA, R.S.; MORAIS, P.B.; ROSA, C.A.; CORRÊA, J. Utilization of Yeasts in Biological Control Programs, Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. **Springer Science**. 2000. p.200-212, 2009.
- [11]. JANISIEWICZ, W. J; KURTZMAN, C. P.; BUYER, J. S. Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot.

- Yeast. v.27, p.389-398, 2010.
DOI:10.1002/yea.1763.
- [12]. PIMENTA, R.S.; SILVA, J.F.M.; BUYER, J.S.; JANISIEWICZ, W.J. Endophytic Fungi from Plums (*Prunus domestica*) and Their Antifungal Activity against *Monilinia fructicola*. **Journal of Food Protection**. v. 75, n. 10, p. 1883–1889, 2012. DOI:10.4315/0362-028X.JFP-12-156.
- [13]. TALIBI, H.; BOUBAKER, H.; BOUDYACH, E.H ; BEN AOUMAR, A.A. Alternative methods for the control of postharvest citru. **Journal of Applied Microbiology**. p.3-17, 2014. DOI:10.1111/jam.12495
- [14]. MADANI, B.; MOHAMED, M.T.M.; BIGGS, A.R.; KADIR, J.; AWANG, Y.; TAYEBIMEIGOONI, A.; SHOJAEI, T.R. Effect of pre-harvest calcium chloride applications on fruit calcium level and post-harvest anthracnose disease of papaya. **Crop Protection**. v.55, p.55-60, 2013. DOI:10.1016/j.cropro.2013.10.009
- [15]. KUPPER, K.C.; CERVANTES, A.L.L.; KLEIN, M.N.; SILVA, A.C. Avaliação De Microrganismos Antagônicos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal – SP**. v. 35, n. 2, p. 425-436, 2013.
- [16]. JANISIEWICZ, J.W.; CONWAY, W.S. Combining biological control with physical and chemical treatments to control fruit decay after harvest. **Stewart Postharvest Review**. p.1- 3, 2010. doi: 10.2212/spr.2010.1.3