

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**FLÁVIO ENDRIGO CECHIM**

**QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E CONTROLE *in vitro*  
DE MOFO CINZENTO, PODRIDÃO PARDA E PODRIDÃO AMARGA.**

**TESE**

**PATO BRANCO**

**2014**

FLÁVIO ENDRIGO CECHIM

**QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E CONTROLE *in vitro*  
DE MOFO CINZENTO, PODRIDÃO PARDA E PODRIDÃO AMARGA**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro

Co-Orientadores: Prof. Dr. Cleverson Busso e Prof  
Dra Maristela dos Santos Rey Borin

PATO BRANCO

2014

C387q Cechim, Flávio Endrigo.  
Quitosana na indução de resistência e controle *invitro* de mofo cinzento,  
podridão parda e podridão amarga / Flávio Endrigo Cechim. -- 2014.  
95 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Miguel Mazaro  
Coorientador: Prof. Dr. Cleverson Busso  
Coorientadora: Profa. Dra. Maristela dos Santos Rey  
Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2014.  
Bibliografia: f. 88 – 94.

1. Maçã. 2. Morango. 3. Pêssego. 4. Proteínas. 5. Quitinase. I. Mazaro,  
Sergio Miguel, orient. II. Busso, Cleverson, coorient. III. Rey, Maristela dos  
Santos, IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de  
Pós-Graduação em Agronomia. V. Título.

CDD (22. ed.) 630



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Câmpus Pato Branco  
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



## TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Tese n.º

# QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E CONTROLE *IN VITRO* DE MOFO CINZENTO, PODRIDÃO PARDA E PODRIDÃO AMARGA

por

**Flávio Endrigo Cechim**

Tese apresentada às nove horas do dia dezessete de dezembro de dois mil e quatorze, como requisito parcial para obtenção do título de DOUTOR EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Indução de resistência, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. O candidato será arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados.

Banca examinadora:

---

**Prof. Dr. Luchele Furlan Sirtoli**  
UNISEP/dv

---

**Prof. Dr. Maristela dos Santos Rey**  
UTFPR/DV

---

**Prof. Dr. Cleverson Busso**  
UFPR

---

**Prof. Dr. Sergio Miguel Mazaro**  
UTFPR  
Orientador

Visto da Coordenação:

---

**Prof. Dr. Idalmir dos Santos**  
Coordenador do PPGAG

À minha mulher e ao meu filho, por serem as  
colunas da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pois, sem ele descubro que nada é possível, nada é completamente explicável.

Agradeço a minha esposa, minha companheira, meu amor Michele Potrich, que me incentivou na busca por crescimento, sem você a vida não tem NENHUM sentido, sem você JAMAIS eu conquistaria o pouco que conquistei, saiba que sempre busquei isso para que você tivesse um pouco de orgulho de mim como SEMPRE TIVE E TENHO muito de você. Te amo. Prometo a você que serei cada dia melhor! Que serei cada dia mais companheiro, mais amoroso e mais carinhoso.

Ao meu amado filho Filipe, aprendo com você a cada dia, desculpe as ausências e os humores alterados, mas tenha certeza que o seu papai Flávio, te ama demais e tem um orgulho incalculável de você, meu amor! As noites serão inesquecíveis em 2015 para nos três.

A minha mãe, guerreira, serena, sempre com palavras de conforto, obrigado por incondicionalmente está ao meu lado. Ao meu pai, ano difícil delicado, mas está acabando e com certeza do melhor jeito possível, obrigado pelo exemplo de dedicação e profissionalismo.

Agradeço a minha vó, Maria Pierina, o porto segura da família, Deus a colocou na Terra para iluminar o meu caminho e o da minha família, a senhora e o vô Ivo sempre me incentivaram a lutar e lutar e acalmar e esperar.

Aos meus irmãos Rodrigo, Fabíola e Lucas, cada um do seu jeito contribui para eu conquistar esse título, Rodrigo o cara calmo com palavras pensadas e que se encaixam como luvas nos momentos difíceis, Fabíola com suas palavras quentes e determinadas, acho que puxou a mim por isso brigamos, mas sempre buscamos o bem, e o Lucas o caçula, sempre de bem com a vida e com todos, admiro você, um adolescente e agora um jovem fora de série, poucos são como você.

Ao Tio Ivo e a Tia Maria obrigado nunca esquecerei que vocês é que pagaram a inscrição do vestibular e o meu cursinho, exemplos de pessoas integras, éticas e amorosas. Tia Telma não será esquecida, pois um dia pensei comigo a tia é doutora, eu também quero ser, você colocou as pedrinhas para alguém segui e eu as ví, hoje sou doutor mas acima de tudo sou humano com você.

Jamais podeira de lembrar e agradecer a Iva e ao Zefe, minha sogra e meu sogro, algumas pessoas reclamam da sogra e do sogro, mas seu eu fizer isto, estarei sendo muito injusto, sempre me trataram como filho e sempre foram companheiros nas horas de dificuldade obrigado, amo vocês. Um agradecimento especial para a Nona Dezem, mesmo não sendo a nona a Michele, era minha também, cheia de carinho e preocupação, Deus a

chamou, pois estava precisando de alguém muito especial para ajuda-lo na difícil missão de cuidar, e isso a senhora fez muito bem a vida toda.

Ao meu orientador, Professor Dr. Sérgio Miguel Mazaro, você é um realizador de sonhos, entusiasta sempre a mil, corre, fala, puxa a orelha, mas sempre me ajudando, com você aprendi e nunca esquecerei, muito mais que um orientador, um parceiro, um AMIGO.

Ao ÁLVARO FREDDO quantas viagens e trabalhos, o cara mais calmo e positivista que conheço, responsável pela minha entrada no doutorado, valeu pela ajuda você é um amigo mesmo. Aos colegas Nean, Adriano, Ivan, Douglas e Viniccios, por toda ajuda, amizade, alegrias e pelos momentos compartilhados.

E claro ao meu amigo Junior Rebelatto sempre buscando palavras para amenizar os problemas, aprendo todos os dias com você meu amigo, obrigado pela amizade. Aos APCs Panda, Sostenes, André , Jandi, Edney, Che, Alex e Lelo obrigado por compartilhar vitórias e derrotas, erro e acertos, quando esse grupo se formou, a união aumentou e todos ficamos mais fortes. Realmente o ditado está certo, a união faz a força, obrigado pelo incentivo.

Um agradecimento especial ao meu amigo, veterano, padrinho e muito mais EVERTON. Inúmeras vezes me ajudou mesmo sem ter obrigação alguma e sempre esteve e está presente na minha vida e na da minha família, te considero um irmão. Obrigado por tudo.

Enfim, a todas as pessoas, que de uma forma ou outra colaboraram para a conclusão deste doutorado, meu sincero Obrigado!



*“Somos feitos de carne, mas temos que viver como se fôssemos de ferro.”*

*Sigmund Freud*

## RESUMO

CECHIM, Flávio Endrigo. **QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E CONTROLE *IN VITRO* DE MOFO CINZENTO, PODRIDÃO PARDA E PODRIDÃO AMARGA**. 97 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2014.

Com o crescimento populacional acelerado e a diminuição das áreas para cultivo, o aumento da produtividade de gêneros alimentícios de todos os tipos é essencial para o atendimento da população mundial, no entanto as perdas desde o momento de colheita até a chegada ao consumidor limita a oferta de frutas ao consumidor. Estas perdas na pós-colheita de maçã, morango e pêssego, são na sua maioria causadas por fitopatógenos causando podridões. Estas podridões são causadas por vários fungos, dentre estes estão o *Colletotrichum* sp., causador da podridão amarga em maçãs, *Botrytis cinerea* agente causador do mofo cinzento em morangos e *Monilinia fructicola* em pêssegos o qual causa a podridão parda. Usualmente o controle destes fungos é efetivado com a utilização de fungicidas, no entanto, a utilização de químicos neste processo preocupa os consumidores, pois, podem existir resíduos nas frutas e no ambiente. Desta forma métodos alternativos como a indução de resistência podem ser alternativas para o controle dos microrganismos causadores de doenças na pós-colheita de frutos. A indução de resistência consiste em estimular através de moléculas elicitoras (indutoras) as defesas vegetais, ou seja, a síntese de composto que atuem diretamente sobre o fitopatógeno como as proteínas-RPs, ou que promovam o reforço estrutural nos tecidos adjacentes ao sítio de infecção do fungo. A quitosana retirada da carapaça de crustáceos é uma alternativa de molécula elicitora de baixo custo e sem riscos ao consumidor que vem sendo utilizada na indução de resistência em frutos na pós-colheita. Esse biopolímero apresenta a capacidade de desencadear as respostas defensivas dos frutos; maçã, morango e pêssego contra os fungos, *Colletotrichum* sp., *Botrytis cinerea* e *Monilinia fructicola* respectivamente. Foram desenvolvidos experimentos na Universidade Tecnológica Federal do Paraná durante os anos de 2013 e 2014, com objetivo de verificar a capacidade da quitosana de induzir as defesas dos frutos da maçãs, morangos e pêssegos em pós-colheita, bem como , a atividade fungistática sobre os fungos *Colletotrichum* sp., *Botrytis cinerea* e *Monilinia fructicola* em condições *in vitro*. Para os experimentos com os frutos o indutor foi aplicado nas concentrações 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0% e a testemunha (água destilada), os tratamentos foram organizados em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições de 20 frutos de maçã, 20 frutos de morango e 15 frutos de pêssego. Os frutos foram selecionados e padronizados, sendo em seguida as maçãs e os pêssegos submetidos ao tratamento por imersão em soluções de quitosana, já os morangos foram tratados pulverizando a solução contendo quitosana diretamente sobre os frutos. Após 24 horas, os frutos foram inoculados, com uma suspensão contendo conídios do patógeno *Colletotrichum* sp. nas maçãs, *B. cinerea* em morangos e *M. fructicola* em pêssegos na concentração  $5.10^{-3}$  conídios/ml diretamente sobre os frutos com auxílio de um borrifador e de uma micropipeta. Após a realização dos tratamentos os frutos foram acondicionados em B.O.D. a  $26 \pm 1$  °C para maçãs e pêssegos e a  $10 \pm 1$  °C para os morangos. Foram realizadas avaliações periódicas após a implantação e no término dos experimentos para os seguintes parâmetros, físico-químicas (perda de massa, sólidos e solúveis totais, acidez titulável, firmeza de polpa, incidência de podridões) e bioquímicas (proteínas, açúcares redutores, açúcares totais, antocianinas, flavonoides, e a atividade das enzimas fenilalanina mônia-liase(FAL),

peroxidases, quitinases e  $\beta$ -glucanases). Nos experimentos *in vitro* avaliou-se o efeito da quitosana sobre os patógenos (*Colletotrichum* sp, *B. cinerea* e *M. fructicola*) Os fungos previamente cultivados em placas puras foram transferidos para placas contendo meio B.D.A. com as concentrações de quitosana (0; 0,25; 0,5, 1 e 2%). Sendo após 24 e 48 horas realizadas as medições perpendiculares do diâmetro da colônia para verificar o crescimento micelial. Os dados dos experimentos foram submetidos à análises de normalidade e de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey e de regressão ( $p=0,05$ ), com auxílio do *software* Assistat. Os resultados demonstraram a interferência da quitosana sobre a indução de resistência ao controle da incidência da podridão amarga em pós-colheita de maçãs Gala, ativando a PRPs B-1-3 Glucanase e no controle de *Colletotrichum* sp *in vitro* com ação fungistática. Já em morango o indutor controlou o mofo cinzento ativando as peroxidases e quitinases e  $\beta$ -1-3-Glucanase e diretamente o fungo *B. cinerea in vitro*. Em pêssegos a atuação foi sobre a manutenção da qualidade dos frutos, na indução ativando os genes da quitinase,  $\beta$  1-3 Glucanase e da mesma forma em *in vitro* sobre *M. fructicola*. Conclui-se então que a quitosana apresenta um grande potencial na indução de resistência de frutos na pós-colheita, ativando as defesas contra fungos fitopatogênicos e diretamente sobre os mesmos com atividade fungistática e fungitóxica *in vitro*. Sendo que nos frutos de maçã cv. Gala atuou diretamente sobre os parâmetros físico-químicos reduzindo a perda de massa, mantendo a firmeza de polpa e reduzindo capacidade de esporulação de *Colletotrichum* sp. confirmando também o efeito indutor pela ativação da enzima  $\beta$ -1,3 glucanase e a atividade fungistática sobre *Colletotrichum* sp. *in vitro* com redução do crescimento micelial. Já em morangos cv. Camarosa, ativa a síntese das proteínas-PRs quitinases e  $\beta$ -1-3 glucanases contra o mofo cinzento, mantém a firmeza de polpa em níveis mais elevados e interfere no metabolismo dos açúcares totais e redutores e das flavonoides. E ainda atua diretamente sobre *B. cinerea* diminuindo crescimento micelial *in vitro* em relação controle. Nos frutos de pêssego a quitosana atua na indução de resistência a podridão parda em pós-colheita de pêssegos “delicioso” ativando as enzimas FAL, quitinase e  $\beta$ -1-3-glucanases. E atua sobre *M. fructicola in vitro* com ação fungistática.

**Palavras-chave:** Maçã, Morango, Pêssego, Pós-colheita, Proteínas-PR, quitinase e  $\beta$  1,3-glucanases

## ABSTRACT

CECHIM, Flávio E; CHITOSAN ON INDUCTION OF RESISTANCE AND CONTROL IN VITRO MOFO GRAY , ROT ROT AND BITTER PARDA. 97 p. Thesis (Doctorate in Agronomy) – Agronomy Postgraduate Program (Focus Area: Plant Production), Universidade Federal Tecnológica do Paraná. Pato Branco, 2014.

With the rapid population growth and the reduction of areas for cultivation, the increased productivity of foods of all kinds is essential to meet the world's population demand. However post-harvest losses from the time of harvest until the arrival to the consumer, limits the supply of fruits to the consumer. The losses in the post-harvest of apples, strawberries and peaches, caused by the incidence of rot led by phytopathogenic fungi, is responsible for most of the losses. These rots are caused by various fungi, among these are the *Colletotrichum* sp., cause of bitter rot on apples, *Botrytis cinerea* causative agent of gray mold on strawberries and *M. fructicola* on peaches which causes brown rot. These phytopathogens are fungi with high ability to spread infection and therefore cause serious damage to fruits, generating losses in post-harvest. Usually the fungi control is conducted with the use of fungicides. However, the use of chemicals in the process concerns consumers, since there may be residues in fruits and the environment. Therefore, alternative methods like the resistance induction can be used to control the disease-causing microorganisms in the postharvest fruits. The induction consists on stimulating the plants defenses through (inducing) elicitor molecules, specifically the synthesis of compounds that act directly on the pathogen as phenols, protein-RPs, or producing structural reinforcement of tissues adjacent to the site of infection of the fungus. Currently, chitosan extracted from crustacean shells is an alternative elicitor molecule of low cost and no risk to the consumer that has been used in the induction of the resistance in postharvest fruits. This biopolymer has the ability to trigger the defensive responses of the fruits; apple, peach, and strawberry against fungi *Colletotrichum* sp., *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*, respectively. The inductor was applied at concentrations of 0.25, 0.5; 1.0 and 2.0% and on the control (distilled water). The treatments were arranged in a completely randomized design with four replications of 20 apple fruits, 20 strawberry fruits and 15 peach fruits. The fruits were selected and standardized, and subsequently the apples and peaches were subjected to treatment by immersion in solutions of chitosan, and strawberries were treated by spraying the chitosan-containing solution directly onto the fruits. After 24 hours, the fruits were inoculated with a solution containing conidia of the phytopathogen *Colletotrichum* sp. on apples, *B. cinerea* on strawberries and *M. fructicola* on peaches, in concentrations of  $[5.10]^{-3}$  conidia/ml directly on the fruit, with the help of a spray bottle or with a micropipette in the case of apples, directly inoculating the solution in an wound to the 2 mm bark. After completion of the treatments, the fruits were placed in BOD at  $26 \pm 1$  ° C for apples and peaches, and  $10 \pm 1$  ° C for strawberries, and evaluated after 24 hours to determine the following parameters; weight loss, physical and chemical analysis (solids and total soluble, titratable acidity, firmness, decay incidence) and biochemical (protein, reducing sugars, total sugars, anthocyanins, flavonoids, FAL, peroxidase, chitinase and  $\beta$ -glucanase). An initial sample of the fruits was taken to carry out the initial analyzes, using this data as comparative parameters. In a second experiment, the fungus (*Colletotrichum* sp, *Botrytis cinerea* and *M. fructicola*) were grown in the middle of culture containing the different concentrations of chitosan, to verify the existence of fungitoxic or fungistatic effect of the biomolecule in vitro. The fungi were previously cultivated in clean plates, and subsequently transferred to plates containing PDA medium with the chitosan concentrations (0, 0.25, 0.5, 1

and 2), and after 24 and 48 hours, were performed perpendicular measurements of the diameter of the colony to verify its mycelial growth. Data from experiments were submitted to analysis of normality and variance, and measures were compared by Tukey test and regression test ( $p = 0.05$ ), with the assistance of Assistat software. The results demonstrated the interference of chitosan on the induction of resistance to control the incidence of bitter rot in postharvest Gala apple, activating the PRPs B-1-3 glucanase and control of *Colletotrichum* sp in vitro with fungistatic action. On strawberries, the inductor controlled the gray mold by activating the peroxidase, chitinase and  $\beta$ -1-3-glucanase, directly under the fungus *B. cinerea* in vitro. On peaches, the action was on the maintenance of fruit quality, on the induction, activating genes of chitinase,  $\beta$  1-3 glucanase, and on the same way, on the in vitro of *M. fructicola*. Therefore, it has been concluded that chitosan has great potential in the induction of fruit resistance in post-harvest, activating the defense against pathogenic fungi, and directly over the latter with fungistatic activity and in vitro fungitoxic activity.

**Keywords:** Apple, Strawberry, Peach, Post-Harvest, Protein-PR, chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanases

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 2.1: Perda de massa (A) e firmeza de polpa (B) em frutos de maçã cv Gala e a esporulação do fungo *Colletotrichum* sp. após aplicação de diferentes concentrações de quitosana em pós-colheita, e armazenados a 26°C por 96 horas. UTFPR - Dois Vizinhos-PR, 2014.....38-39
- FIGURA 2.2: Atividade da proteína RP  $\beta$ -1,3-glucanases (UAbs min<sup>-1</sup>/mg proteína) em frutos de maçã cv Gala após aplicação de diferentes concentrações de quitosana em pós-colheita, e armazenados a 26°C por 96 horas. UTFPR - Dois Vizinhos-PR, 2014.....43
- FIGURA 2.3: Crescimento micelial (cm) do fungo *Colletotrichum* sp em meio de cultura com adição de diferentes concentrações de quitosana (0, 0,25, 0,5, 1, 2%) armazenados em câmara de crescimento a 26°C por 24 horas (Figura 3A) e após 48 horas (Figura 3B). UTFPR - Dois Vizinhos-PR, 2014.....44
- FIGURA 3.1: Incidência de podridões (A) e firmeza de polpa (B) em frutos de morango ‘Camarosa’, após aplicação de diferentes concentrações de quitosana em pós-colheita, e armazenados a 10°C por 96 horas. UTFPR - Dois Vizinhos-PR, 2014. ....60
- FIGURA 3.2: Crescimento micelial do fungo *B. cinerea* em meio de cultura com a adição de diferentes concentrações de quitosana (0, 0,25, 0,5, 1 e 2%) após 72 em B.O.D. com temperatura de 24°C - UTFPR - Dois Vizinhos-PR, 2014. ....66
- FIGURA 4.1: Firmeza de polpa de frutos de pêssigo cv Delicioso’, após aplicação de diferentes concentrações de quitosana em pós-colheita, e armazenados em câmara de crescimento a 26°C por 96 horas - UTFPR - Dois Vizinhos-PR, 2014. ....82
- FIGURA 4.2: Perda de Massa de frutos de pêssigo cv Delicioso’, após aplicação de diferentes concentrações de quitosana em pós-colheita, e armazenados em câmara de crescimento a 26°C por 96 horas - UTFPR - Dois Vizinhos-PR, 2014. ....83
- FIGURA 4.3: Crescimento micelial (cm) do fungo *Monilinia fructicola* em meio de cultura com adição de diferentes concentrações de quitosana (0, 0,25, 0,5, 1, 2%) armazenados em câmara de crescimento a 26°C por 48 horas - UTFPR - Dois Vizinhos-PR, 2014. ....88

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 2.1:** Severidade (%), acidez titulável e teor de sólidos solúveis totais (Brix), 96 horas após a aplicação de concentrações de quitosana em pós-colheita de maçãs ‘Gala’ e armazenados a 26°C por 96 horas. UTFPR - Dois Vizinhos-PR, 2014. ....40
- TABELA 2.2** Concentração de açúcares totais (mg.g tecido<sup>-1</sup>), açúcares redutores (mg.g tecido<sup>-1</sup>), proteínas (mg.g tecido<sup>-1</sup>), fenóis (UAbs min<sup>-1</sup>/mg proteína), FAL (UAbs.µg prot.mL<sup>-1</sup>) e quitinase (UAbs.µg prot.mL<sup>-1</sup>) presentes nos extratos de maçã tratados com 5 concentrações de quitosana (0,25, 0,5, 1, 2%) e avaliada após 96 horas. UTFPR - Dois Vizinhos-PR, 2014. ....42
- TABELA 3.1:** Perda de massa (%), acidez titulável e teor de sólidos solúveis totais, 96 horas após a aplicação de concentrações de quitosana em pós-colheita de morangos ‘Camarosa’ e armazenados a 10°C por 96 horas. UTFPR - Dois Vizinhos-PR, 2014. ....62
- TABELA 3.2** Concentração de açúcares totais (mg.g tecido<sup>-1</sup>), açúcares redutores (mg.g tecido<sup>-1</sup>), proteínas (mg.g tecido<sup>-1</sup>), antocianinas (mg.L<sup>-1</sup> cloreto de malvidina), flavonoides (mg.L<sup>-1</sup> cloreto de malvidina), peroxidase (unidade enzimática.minuto<sup>-1</sup>), FAL (UAbs.µg prot.mL<sup>-1</sup>), quitinase (UAbs.µg prot.mL<sup>-1</sup>) proteína e β-1,3 Glucanase (UAbs min<sup>-1</sup>/mg proteína) presentes nos extratos de morango tratados com duas concentrações de quitosana e avaliada em 4 momentos. UTFPR. Dois Vizinhos – PR, 2014. ....63
- TABELA 4.1:** Açúcares Redutores (UAbs min<sup>-1</sup>/mg proteína), Açúcares Totais (UAbs min<sup>-1</sup>/mg proteína), Fenóis, e Peroxidase, 96 horas após a aplicação de concentrações de quitosana em pós-colheita de pêssego e armazenados a 26°C por 96 horas, UTFPR. Dois Vizinhos – PR, 2014. ....84
- TABELA 4.2** Concentração de proteínas (mg.g tecido<sup>-1</sup>), FAL (UAbs.µg prot.mL<sup>-1</sup>), quitinase (UAbs.µg prot.mL<sup>-1</sup>) β-1,3 Glucanase (UAbs min<sup>-1</sup>/mg proteína) presentes nos extratos de pêssegos tratados com quatro concentrações de quitosana e avaliada no término de 96 hs. UTFPR. Dois Vizinhos – PR, 2014. ....86-87

## LISTA DE SIGLAS

ADECE	Agência de Desenvolvimento do Estado do Ceará S/A
AS	Ácido Salicílico
AT	Acidez Titulável
B.O.D.	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DERAL	Departamento de Economia Rural
Dr.	Doutor
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAL	Fenilalanina amônia-liase
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCA	Metanol Clorofórmio e Água
Ns	Não Significativo
pH	Potencial Hidrogeniônico
PR	Unidade da Federação – Paraná
Proteínas-RP	Proteínas Relacionadas à patogenicidade
PVC	policloreto de polivinila
RSA	Resistência Sistêmica Adquirida
SA	Salicylic Acid
SEAB	Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento
SEAB	Secretaria de abastecimento
SST	Sólidos Solúveis Totais
TSS	Total Soluble Solids
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

## LISTA DE SÍMBOLOS

Cm	Centímetros
US\$	Dólar
g	Gramas
°C	Graus Celsius
L	Litro
meq.100 mL <sup>-1</sup>	Miliequivalentes grama por 100 mililitros
mg	Miligramas
mg.100g <sup>-1</sup>	Miligramas por 100 gramas
mg.g <sup>-1</sup>	Miligramas por grama
mg.ml <sup>-1</sup>	Miligramas por Mililitro
mL	Mililitros
mM	Milimol
Min	Minutos
N	Normal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
%	Porcentagem
R\$	Reais
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
UAbs.µg prot.mL <sup>-1</sup>	Unidade de Absorbância por micrograma de proteína por mililitros
UAbs.min <sup>-1</sup> .mg	Unidade de Absorbância por minuto por miligramas

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>16</b>
1.1 INTRODUÇÃO.....	16
1.2 REFERÊNCIAS.....	22
<b>2 QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PODRIDÃO AMARGA EM PÓS-COLHEITA DE MAÇÃS CV. GALA E NO CONTROLE DE COLLETOTRICHUM SP. IN VITRO.....</b>	<b>30</b>
2.1 RESUMO.....	30
2.2 ABSTRACT:.....	30
2.3 INTRODUÇÃO.....	31
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.4.1 Experimento I – Indução de Resistência a podridão amarga.....	33
2.4.2 Experimento II - Efeito da quitosana sobre Colletotrichum sp. In vitro.....	36
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
2.6 CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS.....	44
<b>3. QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO MOFO CINZENTO EM PÓS-COLHEITA DE MORANGOS CV. CAMAROSA E NO CONTROLE DE BOTRYTIS CINEREA IN VITRO. ....</b>	<b>50</b>
3.1 RESUMO.....	50
3.2 ABSTRACT.....	50
3.3 INTRODUÇÃO.....	51
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.4.1 Experimento I – Indução de Resistência a mofo cinzento:.....	53
3.4.2 Experimento II - Efeito da quitosana sobre B. cinerea in vitro.....	56
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	57
3.6 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS.....	65
<b>4 QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PODRIDÃO PARDA EM PÓS-COLHEITA DE PÊSSEGO E NO CONTROLE DE MONILINIA FRUCTICOLA IN VITRO. .</b>	<b>72</b>
4.1 RESUMO.....	72
4.2 ABSTRACT.....	72
4.3 INTRODUÇÃO.....	73
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	75
4.4.1 Experimento I – Indução de Resistência a podridão parda:.....	76
4.4.2 Experimento II - Efeito da quitosana sobre M. fructicola in vitro.....	79
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	80
4.6 CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS.....	87
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>95</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 INTRODUÇÃO

A fruticultura mundial produziu em 2013 cerca de 822,301 milhões de toneladas de frutas ocupando uma área de 73,066 milhões de hectares. Tendo como os três maiores produtores, a China (20,1%), Índia (13,9%) seguida pelo Brasil (6,4%), com 45,1 milhões de toneladas produzidas em 2,2 milhões de hectares distribuídos pelo país (ANUÁRIO, 2014).

Neste setor agrícola o Brasil tem apresentado crescimento contínuo, principalmente pela grande diversidade de espécies cultivadas, constituindo-se em grande parte por frutas de clima temperado. No entanto graças a sua extensão territorial, posição geográfica, condições climáticas e de solo o potencial para a produção de frutas tropicais e subtropicais, é de destaque. Ainda devem-se considerar as exportações que crescem na ordem de 19,53% e a mão de obra empregada na fruticultura, que chega a 5,6 milhões de pessoas, correspondendo a 34% da mão de obra agrícola (BRAZILIANFRUITS, 2010; IBGE, 2011; ANUÁRIO, 2014).

Entre os principais estados produtores de frutas está o Paraná, ocupando a 6ª posição, com uma área cultivada de 70,8 mil hectares produzindo 1,7 milhão de toneladas das mais diversas frutas (34 espécies), distribuídas por todas as regiões do estado, pois o Paraná está localizado em uma região de transição climática com vários tipos de solo, o que segundo a SEAB, (2012) gerou R\$ 1,0 bilhão, em 2011 (ANUÁRIO, 2014).

Dentre as dez principais frutas, produzidas no Estado, estão à cultura da maçã 1,9 mil hectares, onde se obteve 58,2 mil toneladas, do pêssego cultivado em 1,4 mil hectares, com 17,8 mil toneladas e a cultura do morango 570 hectares, que produziram 16,2 mil toneladas (SEAB, 2012).

O Brasil bem como outros países, busca o aumento na produção de frutas para suprir as necessidades da demanda global de alimentos, devido o crescimento populacional que é maior que o crescimento na produção de alimento. Além do aumento na produção e na produtividade medidas que reduzam as perdas em pós-colheita são indispensáveis, segundo Neves Filho et al., (2007) para que a demanda global seja atendida. As perdas ocorrem durante todo o processo de colheita até a chegada ao consumidor, e estão muitas vezes relacionadas com alterações na aparência visual, frescor, cor, defeitos e deterioração, textura, firmeza, resistência, integridade do tecido, sabor, aroma, valor nutricional e segurança e são ocasionadas principalmente pela deterioração normal dos frutos devido o tempo que o mesmo

permanece armazenado ou exposto para a comercialização. Porém as perdas são aumentadas ou aceleradas, pelos danos sofridos após a sua colheita, e pelo ataque de fitopatógenos (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

A diminuição das perdas é um desafio constante, pois os frutos apresentam características que os tornam mais susceptíveis a perdas, como o elevado teor de água e nutrientes, o metabolismo acelerado e as interações com os patógenos causadores de podridões, sendo estas potencializadas pelas injúrias ocorridas na pós-colheita (KADER, 2002).

As perdas em frutos de pêssego segundo Martins et al. (2006), variam de 4,9 a 44,5%, em morangos a incidência média é de 85% de doenças (PARISI; SINIGAGLIA, 2011) e em maçãs as perdas podem chegar a 20%. Sendo ocasionadas na maior parte dos casos por podridões fúngicas.

As podridões são ocasionadas por fungos que infectam e penetram no hospedeiro diretamente pela epiderme, pela cutícula intacta, aberturas naturais, bem como por ferimentos na superfície dos frutos, as quais são aumentadas pelas injúrias sofridas ao longo da colheita, do transporte e do manejo para a comercialização, evoluindo na medida em que a maturação dos frutos ocorre e as condições ambientais favorecem o crescimento do patógeno (BENATO, 1999; ZAMBOLIM et al., 2002).

Dentre as podridões que atingem os frutos de maçãs, a podridão amarga é a mais importante e apresenta ocorrência em praticamente todos os países onde a macieira é cultivada. A infecção inicia-se pela epiderme intacta e evolui com a entrada do patógeno através de um ferimento causado por insetos ou ocorridos durante o manejo na pós-colheita. Essa podridão caracteriza-se pela formação de lesões arredondadas necróticas, aquosa, deprimida, circular e de cor marrom, onde a epiderme afetada pode apresentar círculos concêntricos, com pontos alaranjados de aspecto ceroso, sendo estes pontos frutificações conidiais (SANHUEZA et al., 2002).

Os fungos do gênero *Colletotrichum* sp são representantes da família *Glomerellaceae*, na forma anamórfica do fungo *Glomerella cingulata*, sendo responsáveis pelo desenvolvimento de doenças conhecidas como antracnoses em mais de uma centena de hospedeiros (BERGAMIM FILHO; AMORIM, 2011).

Na forma assexuada produzem acérvulo (corpo de frutificação) do tipo peritécio que são estruturas em forma de garrafa que se comunica com o exterior por uma abertura, um poro ou ostíolo, através da qual os ascósporos são liberados. O canal de liberação dos ascósporos

pode ser forrado por estruturas com morfologia capilar designadas por perífises (BERGAMIM FILHO; AMORIM, 2011).

Os conídios são produzidos durante todo o ano em lesões novas ou velhas de folhas, ramos verdes ou secos, inflorescências mumificadas e nas raques desenvolvidas, sendo disseminados na planta pela água da chuva.

O fungo *Botrytis cinerea* é o responsável por um dos principais problemas em pós-colheita do morango no Brasil. Este fitopatógeno segundo Sanhueza, (2002) é de ocorrência generalizada, afetando pecíolos, folhas, botões florais, pétalas.

Por se tratar de um organismo polífago, afeta mais de 300 espécies de plantas, e ainda podem ser saprofiticos na ausência de hospedeiros, permanecendo no ambiente em restos de cultura.

Nos frutos segundo Fortes (2005) caracteriza-se pela presença de uma massa cinzenta na superfície, deixando os tecidos infectados marrom claro, onde se desenvolve uma abundante massa de micélio e esporos de aspecto cotonoso que evoluem rapidamente tomando todo o fruto seco e rígido (SIMON et al., 2005). O fungo *B. cinerea* pertence a Família *Moniliaceae*, que apresenta conídios e/ou conidióforos hialinos ou levemente coloridos que são facilmente disseminados pelo vento e pela água. No entanto podem ficar latentes nos frutos e se desenvolver após a colheita em frutos aparentemente sadios (REIS; COSTA, 2011).

Já a podridão parda causada pelo patógeno *Monilinia fructicola* em pêsego, é a principal doença das frutas de caroço, sendo responsável pela destruição considerável de frutos maduros, tanto no pomar quanto durante a comercialização (ANDRADE, 1995; CAMPOS et., 2005).

Sua característica básica é a formação de esporos sexuais denominados ascósporos, dentro de uma estrutura chamada asco.

A podridão parda ocorre praticamente em todos os pomares, causando lesões pequenas pardacentas que evoluem para manchas marrons com a colonização dos tecidos vizinhos pelo fungo. Com o passar do tempo os frutos infectados tornam-se completamente cobertos de esporos (GARRIDO; SÔNEGO, 2003), mantendo-se nos pomares em frutos mumificados, em ramos da planta e no solo (CAMPOS et al., 2005).

Estes fitopatógenos são responsáveis por perdas significativas, em consequência do grande potencial de infecção, penetração e do difícil controle (GARRIDO; SÔNEGO, 2003).

Dentre os métodos de controle empregados na pós-colheita de frutos, o controle químico demonstra ser o método mais eficiente na redução de infecções fúngicas, onde os

fungicidas utilizados podem ser de contato, agindo somente quando em contato direto com microrganismo, sistêmico se translocando no interior da planta, translaminares quando atuam na lâmina foliar (limbo) ou mesostêmicos com a capacidade de atuar no mesófilo foliar.

Porém esse método pode ter sua eficiência diminuída quando o patógeno se instala abaixo da cutícula, ou pela resistência dos patógenos ao químico, o que impulsiona a busca por estratégias alternativas para o controle de doenças fúngicas na pós-colheita.

Entre as diversas estratégias, o método alternativo de controle, que se baseia na indução de resistência é uma estratégia promissora, principalmente por não agredir o ambiente, não deixar resíduos nos frutos e pelo baixo custo.

A indução consiste na ativação de respostas de defesa da planta a partir de indutores orgânicos (bióticos) como organismos vivos (vírus, bactérias, fungos ou outra planta) ou substâncias produzidas por estes ou por indutores inorgânicos (abióticos) sendo moléculas que mimetizam a presença de patógenos, promovendo a síntese de proteínas de defesa das plantas protegendo o hospedeiro, de mais de uma gama de patógenos, dentre eles os fungos (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

A indução de resistência foi relatada pela primeira vez em 1901 envolvendo o patossistema *Botrytis cinerea* versus *Begonia* sp (KESSMAN et al., 1994). No entanto os estudos foram aprofundados somente em 1961 por Ross, quando demonstrou que as plantas de Tabaco infectadas com o vírus do mosaico do fumo, desenvolviam resistência sistêmica a vários patógenos.

Segundo Barros et al. (2010) as plantas possuem diversos mecanismos de defesa, eficientes que permanecem inativos ou latentes, sendo ativados, quando são estimulados por indutores. O processo é desencadeado quando um sinalizador externo (indutor) se liga a um receptor de membrana na superfície da célula vegetal e, através dele, o sinal primário é transmitido para o interior da célula, ativando os mensageiros secundários, que amplificam o sinal e regulam a expressão de genes específicos, determinando o desenvolvimento de interações compatíveis (doença) ou incompatíveis (resistência) (LEITE et al., 1997).

No entanto é necessário entender que se trata de uma resposta bioquímica ou estrutural desencadeada pela presença de um patógeno ou molécula indutora, que sensibilizam a planta ativando as defesas da mesma, e não uma atividade antimicrobiana direta sobre o patógeno (SOARES; MACHADO, 2007).

Existem diversas moléculas indutoras com potencial para induzir as defesas das plantas, entre estas moléculas a quitosana apresenta resultados importantes demonstrados por vários autores.

A quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da quitina, presente em invertebrados marinhos, insetos, fungos e leveduras (MATHUR; NARANG, 1990), molécula esta que apresenta considerável efeito fungistático e de indução dos mecanismos de defesa das plantas (TERRY; JOYCE, 2004).

A desacetilação parcial da quitina em soluções alcalinas concentradas permite obter a biomolécula quitosana, um amino polissacarídeo, insolúvel em água, mas que dissolve-se em soluções com ácido acético, ácido fórmico e ácidos minerais, tornando-se polieletrólito catiônico (MATHUR; NARANG, 1990; AZEVEDO et al., 2007).

Por ser um produto natural extraído a partir da carapaça de crustáceos, apresenta baixo custo e não apresenta riscos de contaminação ao ambiente e a saúde do consumidor (MATHUR; NARANG, 1990).

A utilização da quitosana na agricultura é justificada pela sua ação antimicrobiana sobre uma grande variedade de fitopatógenos (EL GHAOUTH et al., 1992; EL GHAOUTH et al., 1997; BHASKARA REDDY et al., 2000; DEVLIEGHIERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004), pela formação de um biofilme preservando frutos, legumes e semente da deterioração e pelo potencial indutor de resistência (BADAWY; RABEA 2008; HERNANDÉZ-LAUZARDO et al., 2008) ocasionando lignificação, indução de síntese de calose, produção de fitoalexinas (EL HADRAMI et al., 2010), de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), acúmulo de quitinase (RABEA et al., 2003), síntese de inibidores de proteinase (BASSETTO, 2006), e indução da atividade da fenil-alanina amônialiase (FAL) (KHAN et al., 2003).

A quitosana segundo Ramos et al. (2011) ainda pode sobre alguns patógenos apresentar potencial para interferir no crescimento micelial, através de efeito fungistático e fungitóxico ou segundo Rabeas induzir alterações morfológica, estruturais e moleculares em fungos que impedem seu desenvolvimento normal.

O que segundo Di Piero (2008) ocorre devido à interação do grupamento amino com as moléculas negativas presente na membrana plasmática dos microrganismos, gerando o rompimento da mesma e a perda de material intracelular. No entanto Liu et al. (1999) creditam que o controle ocorre através da formação de uma camada que isola o fungo dificultando o transporte de nutrientes através da membrana provocando a morte do fungo.

Contudo, a indução de resistência é a hipótese mais provável da ação da quitosana nas plantas, pois ela atua como uma molécula análoga às moléculas estruturais dos fungos causadores de podridões, desta forma o fruto reage com suas defesas como se estivesse sendo atacado por fitopatógenos (LABANCA, 2002).

Essa molécula pode estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), inibir a ação de proteinases, estimular a produção de fitoalexinas, promover a síntese de compostos fenólicos e a lignificação. Segundo Cia et al. (2007); Stamford et al. (2008), a quitosana pode ainda induzir o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) como a enzima quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, fenilalanina amônio-liase e as peroxidases

De uma forma geral, Devlieghere et al. (2004) evidenciam que a quitosana pode atuar de três formas distintas na proteção das plantas: em primeiro momento inibindo o crescimento dos fungos, principalmente se estes possuírem quitina como constituinte principal da parede; em segundo, induzindo a produção da enzima quitinase e da glucanase e por último induzir a produção de fitoalexinas pela planta.

Esta molécula apresenta resultados importantes em pós-colheita de frutos e hortaliças, promovendo a ativação das defesas e, portanto o aumento da durabilidade durante a cadeia pós-colheita (MAZARO et al., 2008; FELIPINI; DI PIERO, 2009; SANTOS et al., 2008). Em frutos de maçãs, a aplicação de quitosana inibiu os fungos *Penicillium expansum* (EL GHAOUTH; SMILANICK; WILSON, 2000). Em experimento *in vitro*, a quitosana apresentou efeito fungistático, reduzindo linearmente o diâmetro das colônias de *Penicillium* sp e em vivo com maçã os tratamentos pós-colheita com quitosana reduziram a incidência de podridões a partir da concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> (BOTELHO et al., 2010). Segundo Felipini; Di piero (2009) a suspensão de quitosana a 10 g L<sup>-1</sup> e pH 4 foi a mais apropriada tecnicamente para o controle da doença, pois reduziu a severidade em 26%. Bem como contra o mofo azul da macieira, reduzindo em 53% e 72%, em média, quando as maçãs foram imersas em quitosana à 0,25% e 0,5% (CANAVAR; DI PIERO, 2011). No entanto o revestimento com quitosana não foi eficaz contra a perda de massa e no escurecimento de maçãs processadas, mas teve efeito sobre a manutenção da firmeza, segundo Haiping et al. (2011). Maratree et al. (2013) relatam que os tratamento das maçãs de rosa cv. Tabtim Chan com 2% de quitosana reduziu a perda de peso, a incidência da doença e mantém a firmeza dos frutos.

Em Pêssegos a aplicação de quitosana durante a pós-colheita também reduziu as podridões nos frutos, quando utilizadas concentrações de 0,25 e 1% (MAZARO; GOUVEA; CITADIN, 2005). Confirmado por Santos et al. (2008) a quitosana promoveu a redução da incidência de podridões em pêssegos Douradão, quando aplicado a 1%. Segundo Zengxin et al. (2013) essa molécula ainda pode ativar genes de defesa, estimulando a síntese de peroxidases e glucanases e El-Badawy (2012) relatam a manutenção da massa e da firmeza com a utilização de 1% de quitosana em pêssegos cv. Flórida Príncipe.

Em morangos, aplicações de quitosana na pré e pós-colheita reduziram as podridões causadas por *B. cinerea* (BHASKARA REDDY et al., 2000). Além disso, a aplicação de quitosana em morangos também reduziu a mancha-de-micosferela, mancha de dendrofoma e flor preta (MAZARO, 2007). Segundo Campos et al. (2011) o tratamento com 2% de quitosana promoveu a menor perda de água, a melhor aparência e o melhor controle contra micro-organismos em morangos. Romanazzi et al. (2013) verificaram que o revestimento dos frutos de morango com quitosana promoveu o controle efetivo do mofo cinzento e da podridão causada por *Rhizopus*. Em outros frutos a ação da quitosana também foi verificada. Em caqui Cia et al. (2010) obtiveram com quitosana, a 1,5%, a redução da severidade e a incidência da podridão mole em caquis e em *in vitro*, a quitosana inibiu completamente o crescimento micelial de *R. stolonifer*, em concentração tão baixa quanto 0,5%. Cia et al. (2007) citam que existem evidências suficientes comprovando a eficiência da quitosana no controle de doenças originárias de infecções quiescentes em frutos.

Mesmo com diversos trabalhos com quitosana em frutos, no Brasil as informações ainda são insuficientes, o que indica a necessidade de novas pesquisas considerando diferentes concentrações, diferentes cultivares e condições de armazenamento.

Contudo o trabalho teve o objetivo de verificar a capacidade da quitosana de induzir as defesas dos frutos de maçãs, morangos e pêssegos em pós-colheita, bem como, a atividade fungistática e fungitóxica sobre os fungos, *Colletotrichum* sp., *Botrytis cinerea* e *Monilinia fructicola* em condições *in vitro*.

## 1.2 REFERÊNCIAS

ADECE Agência de Desenvolvimento do Estado do Ceará S/A. **PERFIL DA PRODUÇÃO DE FRUTAS BRASIL CEARÁ 2013**. Fortaleza, 2013.

ANDRADE, E. R. Doenças do pessegueiro e da ameixeira e seu controle no Estado de Santa Catarina. Florianópolis: Boletim Técnico, 71. **Epagri**, 52p, 1995.

**ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2013**. Cleiton Evandro dos Santos. Santa Cruz do Sul, Editora Gazeta Santa Cruz, 136 p. 2013.

AZEVEDO, V. V. Cordeiro de et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **REMAP**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BARROS, F. C; SAGATA, E; FERREIRA, L. C. C; JULIATTI, F. C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **J. Biosci.** Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 231-239, Mar./Apr. 2010.

BASSETTO E. **Quantificação de danos ao longo da cadeia produtiva de pêssegos e avaliação de métodos alternativos de controle de doenças pós-colheita.** Tese de Doutorado. Piracicaba, São Paulo, ESALQ, USP, 2006.

BENATO, E. A; CIA, P. Doenças de frutos em pós-colheita e controle. Em: Leandro Camargo Neves. (Org.). **Manual Pós-Colheita da Fruticultura Brasileira.** 1ed. Londrina. : Eduel. 2009.v. 1, p. 249-288.

BERGAMIN FILHO, A. & AMORIM, L. **Doenças de Plantas Tropicais: Epidemiologia e Controle Econômico.** São Paulo. Ceres. 1996.

BHASKARA REDDY, M. V. et al. Effect of pre-harvest chitosan sprays in post-harvest infections by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest biol tec.** Amsterdam, v. 20, p. 39-51, 2000.

BRAZILIANFRUIT, CAMPOS, A. D, et al. **Cultivo do Pessegueiro, Doenças e métodos de controle.** Embrapa Clima Temperado Sistemas de Produção, 4 ISSN 1806-9207 Versão Eletrônica Nov./2005. <http://www.brazilianfruit.org.br/Pbr/Fruticultura/Fruticultura.asp>, 23/02/14.

CAMPOS R. P; KWIATKOWSKI, A; CLEMENTE, E. Post-harvest conservation of organic strawberries coated with cassava starch and chitosan. **Ceres**, Viçosa, v. 58, n.5, p. 554-560, set/out, 2011.

CANAVER, B. S; DI PIERO, R. M. Quitosana e adjuvantes para o controle preventivo do mofo azul da macieira, **Trop. Plant Pathol** p.36 (6) Nov – Dec, 2011.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio.** Lavras: FAEPE, 2005. 2ed. 783p.

CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; BENATO, E. A. Indução de resistência no manejo de doenças pós-colheita. In: RODRIGUES, Fabrício Ávila; ROMEIRO, Reginaldo da Silva. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. Cap. 11. Viçosa: UFV, p. 245-280, 2007.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiol**, Amsterdam, v. 21, p. 703-714, 2004.

DI PIERO, R.M.; GARDA, M.V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesqui Agropecu Bras**, v.43, p.1121-1128, 2008.

DI PIERO, R.M.; GARCIA JUNIOR, D.; TONUCCI, N.M. Indutores bióticos. In: CALVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R. da S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.29-50.

EL-BADAWY, H. E. M. Effect of Chitosan and Calcium Chloride Spraying on Fruits Quality of Florida Prince Peach Under Cold Storage. **Res. J. Agric. & Biol. Sci.**, 8(2): 272-281, 2012.

EL GHAOUTH, Ahmed et al. Biochemical and cytochemical aspects of the interaction of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. **Postharvest Biol Tec**, Amsterdam, v. 12, p. 183-194, 1997.

EL GHAOUTH, Ahmed et al. Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 3, p. 313-320, 1994.

EL HADRAMI A., ADAM L.R., EL HADRAMI I., AND DAAYF F. Chitosan in plant protection (review). **Mar. Drugs** 8:968-987. Everest Biotech. Indian Patent 2938/ CHE /2010.

FAO. **Pêssego e nectarinas: produção, área e rendimento**. 2012. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org/sit>>. Acesso em: jul. 2013.

FELIPINI, R. B; DI PIERO, R. M. Redução da severidade da podridão-amarga de maçã em pós-colheita pela imersão de frutos em quitosana. **Pesqui. agropecu. bras.**, Brasília, v.44, n.12, p.1591-1597, dez. 2009.

FERRARESE, L; MORETTO, P; RASCIO, L. T. N; CASADORO, G. Cellulase involvement in the abscission of peach and pepper leaves is affected by salicylic acid. **J. Exp Bot.** v. 47,n 2 p. 251-257, 1996.

FORTES, J. F. **Sistema de Produção do Morango. Doenças do morangueiro.** Sistemas de Produção, 5 ISSN 1806-9207 Versão Eletrônica, Nov./2005, <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/cap06.htm>, Acesso 23/02/14, 9:49.

FRANCO, L.O.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, N.P.; CAMPOS - TAKAKI, G.M. *Cunninghamella elegans* como fonte de quitina e quitosana. **Anal.** 13, 52-56, 2005., 4(14), 40 (2005).

GARRIDO, L. R; SÔNEGO, O. R. Sistema de Produção de Pêssego de Mesa na Região da Serra Gaúcha. Doenças fúngicas e bacterianas do pessegueiro. Embrapa Uva e Vinho **Sistemas de Produção**, 3 ISSN 1678-8761 Versão Eletrônica Jan./2003. <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/PessegodeMesaRegiaoSerraGaucha/doenca.htm>. 23/02/14.

GOMES, M.S.O. **Conservação pós-colheita:frutas e hortaliças.** Brasília. Embrapa-SPI. p. 134. 1996.

HAIPING, Q; WENZHONG, H; AILI, J; MIXIA, T; YINGQIU L. Extending shelf-life of Fresh-cut ‘Fuji’ apples with chitosan-coatings. **Innov Food Sci Emerg Tech**, v.12 p.62–66. (2011)

HERNANDÉZ-LAUZARDO AN, BAUTISTA-BAÑOS MG, VELÁZQUEZ-DEL V, MÉNDEZ-MONTEALVO MG, SÁNCHEZ-RIVERA MM, BELLO-PÉREZ LA, Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill **Carbohydr Polym**, 73, 541, 2008.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola** – out. 2011. [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_201110.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201110.pdf)

KADER, A. (ed.) **Postharvest Technology of Horticultural Crops.** 3ª ed., 535 p., 2002.

KESSMANN H; STAUB, T; HOFMANN, C; MAETZKE, T; HERZOG, J. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annu. Rev. Phytopathol.** 1994.

KHAN W, PRITHIVIRAJ B, SMITH DL, J. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. **Plant Physiol.**, 160, 859 (2003)

LABANCA, E. R. G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de glicolinas em soja (*Glycine max*).** 2002, 107f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Agronomia). ESALQ, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

LEITE, B. et al. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações plantas-fungos patogênicos. **Rapp**, v. 5, p. 235-280. Passo Fundo-RS. 1997.

LIU ZL, HO SH, **J Stored Prod Res**, 35, p.317.1999.

MARATREE, P; SARANYA, L; NATTAPONG, W. Effect of Chitosan on the Quality of Rose Apples (*Syzygium agueum* Alston) cv. Tabtim Chan Stored at an Ambient Temperature. APCBEE Procedia 8 ( 2014 ) 317 – 322. 2013 4th **International Conference on Agriculture and Animal Science** (CAAS 2013) 2013 3rd International Conference on Asia Agriculture and Animal (ICAAA 2013)

MARI M, LEONI O, LORI R, CEMBALI T, Antifungal vapour-phase activity of allyl isothiocyanates against postharvest pear pathogens. **Plant Pathol.**, 51, 231, 2000.

MARTINS, M. C.; LOURENÇO, S. A.; GUTIERREZ, A. S. D.; JACOMINO, A.P.; AMORIM, L. Quantificação de danos pós-colheita em pêssegos no mercado atacadista de São Paulo. **Fitopatol Bras**, Lavras, v.31, n.1, p.5-10, 2006.

MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **J Chem Educ**, Easton, v. 67, n. 11, p. 938-942, 1990.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant and Cell Physiol**, Tokio, v.23, p.1091-1101, 1972.

MAZARO, S. M; DESCHAMPS, C; MAY DE MIO, L. L; BIASI, L. A; GOUVEA, A; SAUTTER, C. K. Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-smetil. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 1, p. 185-190, Março 2008.

MAZARO, S. M; GOUVEA, A; CITADIN, I. Qualidade pós-colheita de pêssegos cv. Flôr da Prince em função da aplicação de quitosana em condições ambientais. In: Congresso Iberoamericano de Tecnologia Pós-colheita e Agroexportação, 4., 2005, Porto Alegre, **Anais eletrônicos 1 CD-ROM**, 2005.

MAZARO, Sérgio Miguel. **Indução de resistência a doenças em morangueiro pelo uso de elicitores**. 2007, 87f. Tese de Doutorado (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

NEVES FILHO, L. DE C; SILVEIRA JÚNIOR, V; CORTEZ, L. A. B. Sem refrigeração correta, perdas atingem níveis indesejáveis. **Rev.Visão Agrícola**, n.7, p.44-49, 2007.

PARISI, M. C. M; SINIGAGLIA, C. Caracterização e quantificação de injúrias pós-colheita em morangos em dois mercados atacadistas de São Paulo. **AptaRegional: Pesquisa & Tecnologia**, v.9, n.6, março de 2012.

RABEA, E. I; BADAWY, M. E. T; STEVENS, C.V; SMAGGHE, G; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, 4(6), p.1457, 2003.

RAMOS, L. R. B; STAMFORD, T. C. M;STAMFORD, N. P. PERSPECTIVAS PARA O USO DA QUITOSANA NA AGRICULTURA. **Revista Iberoamericana de Polímeros** Vol. 12(4), Agosto de 2011.

ROMANAZZI, G; FELIZIANI, E; SANTINI, M; LANDI, L. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. **Postharvest Biol Tec.** 75, p.24–27, 2013

PASCHOLATI, S. F; LEITE, B. HOSPEDEIRO: Mecanismo de resistência. In: Bergamin Filho, A. KIMATI, H. AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, p. 417-453, 1995.

REIS, A. COSTA, H. Principais doenças do morangueiro no Brasil e seu controle. **Circular técnica**. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento Brasília, DF Dezembro, 2011 ISSN 1415-3033.

SANHUEZA. R. M. V. DOENÇAS QUE AFETAM RAMOS, FOLHAS E FRUTAS, **Maçã Produção. Frutas do Brasil**, vol. 37, 2002.

SANHUEZA, R. M. V. Maçã Fitossanidade. DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS E BACTÉRIAS. **Frutas do Brasil**, 38. 2002.

SANTOS, C. A.A; CASTRO, J. V; PICOLI, A. A. ROLIM, G. S. Uso de quitosana e embalagem plástica na conservação pós-colheita de pêssegos ‘douradão’. **Rev. Bras. Frutic.** Jaboticabal - SP, v. 30, n. 1, p. 088-093, Mar 2008.

SCHNEIDER S, ULLRICH W.R. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. **Physiol Mol Plant Pathol**, v. 45, p.291-304, 1994.

SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. DERAL - Departamento de Economia Rural Fruticultura - **Análise da Conjuntura Agropecuária**, Dezembro de 2012

SENHOR, R. F; SOUZA P. A; ANDRADE NETO, R. C; MARACAJÁ, P. B; NASCIMENTO, F. J. Manejo de doenças pós-colheita. **Rev Verde** v.4, n.1, p. 00 - 13 janeiro/março de 2009 <http://revista.gvaa.com.br>

SILVA, R. C.; ANDRADE JR., M. A. E CESTARI, A. R., *Quim. Nova*, 2010,

SILVEIRA, N. S. S; MICHEREFF, S. J; SILVA, I. L. S. S; OLIVEIRA, S. M. A. Doenças fúngicas pós-colheita em frutas tropicais: patogênese e controle (Revisão). **Rev. Caatinga**, Mossoró, v.18, n.4, p.283-299, out./dez. 2005.

SIMON, N. MENEGUZZO, A. CALGARO, A. Sistema de Produção de Morango para Mesa na Região da Serra Gaúcha e Encosta Superior do Nordeste. **Sistema de Produção**, 6 ISSN 1678-8761 Versão Eletrônica Dez./2005. Acesso 23/02/14, 9:49.

SOARES; A. M. S; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **R. Trop. Ci. Agro Bio.** v.1, n. 1, p. 9, 2007.

STAMFORD, T. C. M; STAMFORD, T. L. M; FRANCO, L. O. Produção, propriedades e aplicações da quitosana na agricultura e no ambiente. En: Figueiredo MVB, Burity HA, Stamford, NP, Santos CERS (editores). **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. 1a edição, Guaíba: Agrolivros, p. 568. 2008.

TERRY, L.A. & JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review, **Postharvest Biol Tec**, v.32, p.1-13, 2004.

ZAMBOLIM, L., COSTA, H., VENTURA, J.A. & VALE, F.X.R. Controle de doenças em pós-colheita de frutas tropicais. In: Zambolim, L. (Ed.) **Manejo integrado:fruteiras tropicais – doenças e pragas**. Viçosa. UFV, p.443-511. 2002.

ZENGXIN, M; LINGYU, Y; HAIXIA, Y; KENNEDY, J. F; XIANGHONG, M. Chitosan and oligochitosan enhance the resistance of peach fruit to brown rot. **Carbohydr Polym** 94 p. 272– 277, 2013.

## 2 QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PODRIDÃO AMARGA EM PÓS-COLHEITA DE MAÇÃS CV. GALA E NO CONTROLE DE *COLLETOTRICHUM SP.* *IN VITRO.*

### 2.1 RESUMO

A podridão amarga causada por *Colletotrichum sp.* provoca grandes perda na pós-colheita de maçãs sendo considerada uma das doenças mais importantes da cultura. Objetivou-se, neste trabalho, avaliar diferentes concentrações de quitosana na indução de resistência a podridão amarga em pós-colheita de maçãs “Gala”, e no controle de *Colletotrichum sp. in vitro*. As maçãs foram submetidas ao tratamento por imersão, nas diferentes concentrações de quitosana (0,25; 0,5; 1 e 2%), e na testemunha utilizou-se água destilada. Após o tratamento, os frutos foram inoculados com uma suspensão de esporos de *Colletotrichum sp* ( $5,0 \times 10^{-3}$  esporos  $\text{ml}^{-1}$ ) em dois ferimentos provocados na região equatorial em lados opostos. O delineamento foi inteiramente casualizado, com 4 repetições de 20 frutos. Após 96 horas de armazenamento, na temperatura de  $26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ , avaliou-se a perda de massa, firmeza de polpa, sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável (AT), incidência e severidade da podridão amarga e esporulação de *Colletotrichum sp.* Ainda retirou-se amostras de frutos para determinação dos açúcares totais e redutores, proteínas totais, fenóis e atividade das enzimas relacionadas a patogenicidade (proteínas-RPs), sendo a fenilalanina amônia-liase, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanase. No experimento *in vitro*, a unidade experimental foi uma placa de Petri®, em 4 repetições, sendo a quitosana incorporado ao meio BDA (Batata-Dextrose e Agar) e avaliado o crescimento micelial de *Colletotrichum sp* com 24 e 48 horas. A quitosana atua sobre os parâmetros físico-químicos dos frutos de maçã cv. Gala, reduzindo a perda de massa, mantendo a firmeza de polpa e reduzindo capacidade de esporulação de *Colletotrichum sp.* Apresentou a capacidade de induzir resistência em frutos de maçãs, pela ativação da enzima  $\beta$ -1,3 glucanase e ainda apresenta ação fungistática sobre *Colletotrichum sp. in vitro* com redução do crescimento micelial.

Palavras-chaves: *Malus communis*; peroxidases, fenilalanina amônia-liase, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanase.

### 2.2 ABSTRACT:

The bitter rot caused by *Colletotrichum sp* causes great loss in post-harvest of apples, being considered one of the most important diseases of the crop. The objective of this study was to evaluate different chitosan concentrations in the bitter rot resistance induction in postharvest 'Gala' apples, and on the control of *Colletotrichum sp. in vitro*. The apples were subjected to treatment by immersion in different chitosan concentrations (0.25, 0.5, 1 and 2%) and distilled water was used as the control. After the treatments, the fruits were inoculated with a suspension of spores of *Colletotrichum sp* ( $5.0 \cdot 10^{-3}$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ) in induced wounds on the

equatorial region on opposite sides. The design was completely randomized with four replications of 20 fruits. After 96 hours of storage, with temperature of  $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ , were evaluated the mass loss, firmness, total soluble solids (TSS), titratable acidity (TA), incidence and severity of bitter rot and sporulation of *Colletotrichum* sp. It was also extracted fruit samples for determination of total and reducing sugars, total phenols proteins and activity of enzymes related to pathogenicity (protein-RPs), those being the phenylalanine ammonia lyase, chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. In the In vitro experiment, the experimental unit was one Petri® plate in 4 replications, the chitosan was incorporated into the PDA (Potato Dextrose Agar) and the mycelial growth of *Colletotrichum* sp was evaluated with 24 and 48 hours. Chitosan acts on the physical and chemical parameters of gala apple fruit cv., reducing weight loss, maintaining the firmness and reducing sporulation capacity of *Colletotrichum* sp. It has the ability to induce resistance in apple fruits, by activation of the enzyme  $\beta$  1,3-glucanase. Chitosan presented fungistatic action on *Colletotrichum* sp. in vitro, with reduced mycelial growth.

Keywords: *Malus communis*; peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase, chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase.

## 2.3 INTRODUÇÃO

O Brasil já é consolidado como um dos maiores produtores de frutas do mundo, no entanto, as perdas pós-colheitas relacionadas com a cultura da maçã, representam um grande problema que limita a distribuição e diminui a vida dos frutos para a comercialização, gerando grandes prejuízos econômicos. Essas perdas, em sua grande maioria são causadas pela ação de fungos fitopatogênicos, organismos responsáveis pelas podridões que ocorrem nas maçãs, diminuindo o tempo de prateleira dos frutos (MAPA, 2013).

Segundo dados da Secretaria Estadual de Abastecimento (SEAB) (2012), e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2013) a maçã teve participação de 3,4% no total do volume de frutas produzidas no estado do Paraná, sendo cultivada em 1,8 mil hectares, onde se obteve 47,8 mil toneladas de frutas colhidas, posicionando-se na 7ª posição no cenário nacional. No entanto para que a pomicultura continue crescendo alguns obstáculos que desacelerem essa expansão, como os fatores climáticos e as perdas pós-colheita ocorridas ao longo de toda a cadeia produtiva devem ser vencidos (FIORAVANÇO; LAZZAROTO, 2012)

Dentre os fungos causadores de podridões o *Colletotrichum* sp (*acutatum* e *gloeosporioides*) são os causadores da podridão amarga. A infecção dos frutos tem início na epiderme intacta, no entanto se houverem ferimento o seu desenvolvimento é facilitado. Essa podridão caracteriza-se pelo desenvolvimento de uma mancha firme, aquosa, deprimida,

circular em forma de cone invertido de cor marrom, evoluindo para a formação de conídios de cor alaranjada, os quais são disseminados pela chuva e pelo vento (SANHUEZA, 2002).

O manejo adequado ao longo da cadeia produtiva e principalmente na pós-colheita é um ponto importantíssimo, no entanto o controle de patógenos ocorre normalmente com a utilização de agroquímicos, porém essas moléculas muitas vezes controlam o *C. acutatum* e não *C. gloeosporioides*, além de interferir no ambiente causando danos a saúde dos produtores e consumidores (SANHUEZA, 2002).

Além disso, diversas moléculas já são conhecidas com potencial para induzir respostas de defesa nas plantas como exemplo a quitosana e podem ser utilizadas como uma alternativas mais barata e menos prejudicial ao ambiente e ao consumidor. A quitosana é um indutor de resistência abiótico, obtido a partir da desacetilação da quitina encontrada na carapaça dos crustáceos, e tem sido relatada em diversos trabalhos com potencial na redução de podridões pós-colheita de frutos.

A molécula age ligando-se a receptores presentes na membrana celular das plantas, mimetizando o fenômeno de reconhecimento que ocorre na interação incompatível entre a planta e o patógeno (LABANCA, 2002), podendo inibir as proteinases, promover a lignificação (TERRY; JOYCE, 2004), alterar o metabolismo das fitoalexinas (Mazaro et al., 2008), induzir a formação de compostos fenólicos (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006), peroxidase (ZHANG; QUANTICK, 1998), aumentar a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) (ROMANAZZI et al., 2002; RODRIGUES et al., 2006) e ativar enzimas quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases (ZHANG; QUANTICK, 1998; RODRIGUES et al., 2006).

Apesar de diversos trabalhos já realizados com quitosana, considerando a utilização desta biomolécula em diferentes patossistema maçã x fungos fitopatogênicos, a proposta deste trabalho possui o diferencial, pois, buscou avaliar condições de armazenamento similares as empregadas no processo de comercialização, ou seja, a temperatura dos balcões de exposição não refrigerados a 26°C, enquanto que outros trabalhos consideraram diferentes temperaturas de armazenamento.

O objetivo do trabalho foi avaliar diferentes concentrações de quitosana na indução de resistência a podridão amarga em pós-colheita de maçãs cv. Gala e no controle de *Colletotricum* sp., *in vitro*.

## 2.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Dois Vizinhos, no ano de 2013, sendo que o Experimento I avaliou diferentes concentrações de quitosana na indução de resistência a podridão amarga em pós-colheita de maçãs cv. Gala. Já o experimento II, desenvolvido logo em seguida ao primeiro, avaliou o efeito da quitosana sobre o patógeno, verificando o controle de *Colletotrichum* sp., em condições *in vitro*.

### 2.4.1 Experimento I – Indução de Resistência a podridão amarga

Os frutos de maçã cv. Gala foram colhidos quando apresentavam-se em estágio de maturação de consumo (coloração >90% vermelha; SST valor médio 13°Brix; acidez titulável 11,0 meq./100ml). No laboratório foi realizada a seleção dos frutos, quanto ao tamanho, grau de maturação e ausência de injúrias. Cada unidade experimental foi constituída de 20 frutos acondicionados em redes de polietileno.

As soluções de quitosana foram preparadas com material oriundo de farmácia de manipulação, com 98% de pureza do produto, a qual foi diluída em solução contendo ácido acético a 1%, e então, ajustadas as concentrações com água destilada (0,25; 0,5; 1 e 2%), sendo usada para testemunha somente água destilada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições.

Os frutos foram feridos, em dois pontos opostos na região equatorial com o auxílio de um perfurador (2 mm de diâmetro). Em seguida, aplicou-se o tratamentos com quitosana, por imersão, durante 1 minutos. Então foram armazenados em câmara de crescimento por 96 horas, a  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , sem fotoperíodo.

Após 24 horas da aplicação dos tratamentos, inoculou-se *Colletotrichum* sp. ( $5 \cdot 10^{-3}$  conídios/mL<sup>-1</sup>), na quantidade aproximada de 20 µl por ferimentos com o auxílio de uma micropipeta.

Após 96 horas de armazenamento avaliou-se a perda de massa, firmeza de polpa, sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável (AT), incidência e diâmetro da lesão da podridão amarga (severidade) e esporulação de *Colletotrichum* sp através da observação com o auxílio de uma lente de aumento. Ainda foram retiradas amostras dos frutos de todos os tratamentos para determinação das análises bioquímicas de açúcares totais e redutores, fenóis e proteínas

totais e atividade das enzimas relacionadas a patogenicidade (proteínas-RPs), sendo a, fenilalanina amônia-liase, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases.

A perda de massa das maçãs foi obtida pela diferença de massa do dia da instalação do experimento e do valor encontrado na pesagem após 96 horas de armazenamento, expresso em percentual. A firmeza da polpa foi realizada com auxílio de penetrômetro TR, modelo RT – 327, ponteira de 8 mm de diâmetro. Os resultados foram expressos em libras/cm<sup>2</sup> e transformados para Newton. O teor de SST foi analisado do suco extraído dos frutos, com o auxílio de um extrator manual, e mensurado com auxílio de um refratômetro digital, sendo os valores foram expressos em °Brix. A acidez total titulável (ATT) foi determinada de 10 mL de suco dos frutos diluído em 90 mL de água destilada, seguido por titulação com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N até pH 8,1, sendo expresso em meq.100 mL<sup>-1</sup>. A avaliação da incidência de podridões, tamanho da lesão (severidade) e esporulação foram realizadas com auxílio de um estereomicroscópio binocular, sendo confirmados os sintomas de doença e se as lesões estavam com esporulação. Para o tamanho das lesões as mesmas foram mensuradas com auxílio de um paquímetro, com duas medições cruzadas sobre as lesões.

Nas análises bioquímicas para a quantificação de proteínas totais, as amostras da polpa das maçãs foram maceradas em almofariz com 5 ml de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5). Em seguida, o material foi centrifugado (14.000g / 10 min a 4°C) e o sobrenadante coletado. Para quantificação do conteúdo total de proteínas das amostras foi empregado o teste de Bradford (1976). A leitura de proteínas totais foi realizada em espectrofotômetro a 630 nm, utilizando soro albumina bovina como padrão.

As concentrações de açúcares solúveis totais foram determinadas pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956). As amostras foram maceradas em almofariz contendo 5 mL de tampão fosfato 0,2M – pH 7,5, centrifugadas por 5 minutos a 10.000 g. Utilizando-se 2  $\mu$ L do extrato e adicionando-se 0,5mL de fenol a 5,0% + 2,5 mL ácido sulfúrico concentrado. A leitura das amostras foram realizadas a 490 nm. A concentração de açúcares totais foi determinada através de curva padrão de glicose.

Açúcares redutores foram determinados pelo método do dinitrosalicilato (DNS) (MILLER, 1959). As amostras foram maceradas em almofariz contendo 5 mL de tampão fosfato 0,2M – pH 7,5, centrifugadas por 10 minutos a 14.000 g a 4°C. Utilizando-se 0,5  $\mu$ L do extrato e adicionando-se 1,0 mL de água destilada + 1,0 mL reagente DNS. A leitura das amostras foram realizadas a 540 nm. As concentrações de açúcares redutores foram calculadas em função de curva padrão de glicose.

A quantificação dos fenóis totais foi obtida a partir do método de Bielecki; Turner (1966); Jennings (1981). As amostras de 1 g foram maceradas em almorafiz juntamente com 4 mL da solução MCA (metanol, clorofórmio, água 6/2,5/1,5) ou seja 600ml,250ml e 150ml quando para 1 litro; colocadas no ependorfe e centrifugado a 6.000 rpm a 20 °C por 20 minutos. Em seguida foi retirado o sobrenadante total, sendo o resíduo sólido restante utilizado para realizar nova extração adicionando mais 4 mL de MCA, agitando no vortex e centrifugando novamente a 6.000 rpm, 20 °C por 20 minutos, o mesmo foi coletado e adicionado ao primeiro sobrenadante. Posteriormente adicionou-se mais 1,5 mL de água ao extrato MCA sendo então centrifugado a 6.000 rpm, 20 °C por 15 minutos.

A partir deste extrato MCA foi utilizado 0,5 mL da parte superior do sobrenadante, onde adicionou-se 0,5 mL de água + 0,5 mL do reagente de Folin – Ciocalteau diluído 1:10, misturando em seguida em vortex e após 15 minutos, adicionou-se 5 mL do reagente alcalino (preparado de carbonato de sódio 2% em solução de hidróxido de sódio 0,1 N), novamente agitou-se em vortex e após 50 minutos foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 760 nm. Sendo o resultado expresso em mg g de tecido vegetal.

A fenilalanina amônia-liase foi realizada por quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina, conforme metodologia descrita por Kuhn (2007), aonde se utilizou 0,5 mL do suco das frutas com mais 3,0 mL do tampão TRIS – HCl pH 8,0. Este extrato foi acondicionado em tubos ependorfe devidamente marcados que foram levados para a centrífuga por 10 minutos, a 4 °C e a 6000 rpm. Após, foi transferido uma alíquota de 200 µL para tubo de ensaio identificado, acrescentando-se mais 3,0 mL do tampão de extração. A solução foi agitada, obtendo-se assim, o extrato enzimático. Deste extrato, 1,5 mL foi transferido para outro tubo de ensaio, com mais 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina. Novamente, esta solução foi agitada para homogeneização. E após, os tubos foram incubados em banho-maria por 45 minutos a 40°C. Depois de retirados do banho-maria, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos para interromper a reação e em seguida foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 290 nm.

Para dosagem das atividades de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase foram realizadas com adaptações da metodologia proposta por Wirth; Wolf (1992). As amostras foram maceradas em 2,0 mL de tampão acetato 100 mM (pH 5,0), com posterior centrifugação (20.000 g por 25 min, a -4 °C). O sobrenadante foi coletado e utilizado para a avaliação da atividade das enzimas. A atividade enzimática da quitinase foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (Sigma). Para

determinação espectrofotométrica das atividades de  $\beta$ -1,3-glucanase nos extratos foi utilizado como substrato solução de Curdlan (Sigma).

#### 2.4.2 Experimento II - Efeito da quitosana sobre *Colletotrichum* sp. *In vitro*

O isolado do fungo *Colletotrichum* sp. foi obtido no Laboratório de Fitossanidade da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos/PR. O fungo foi repicado em placas de Petri<sup>®</sup>, contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar), e mantidas em B.O.D. a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas.

Os tratamentos utilizados foram concentrações de quitosana, sendo as mesmas avaliadas no experimento I (0,25; 0,5; 1 e 2%), a unidade experimental foi constituída por placas de Petri<sup>®</sup> de vidro com 9 cm de diâmetro, em quatro repetições.

Os meios de cultura BDA receberam a adição de quitosana nas diferentes concentrações, conforme preparação descrita no experimento I, sendo somente como diferencial que antes de serem inseridas ao meio foram esterilizada em banho-maria a  $60^\circ\text{C}$  por 6 horas. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, os preparados foram vertidos na quantidade de 18 mL por placa de Petri<sup>®</sup>.

Após a solidificação do meio, os discos com 10 mm de diâmetro contendo o micélio do fungo *Colletotrichum* sp. foram dispostos no centro da placa. Então, estas foram tampadas, lacradas com papel filme e acondicionadas em B.O.D. à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas.

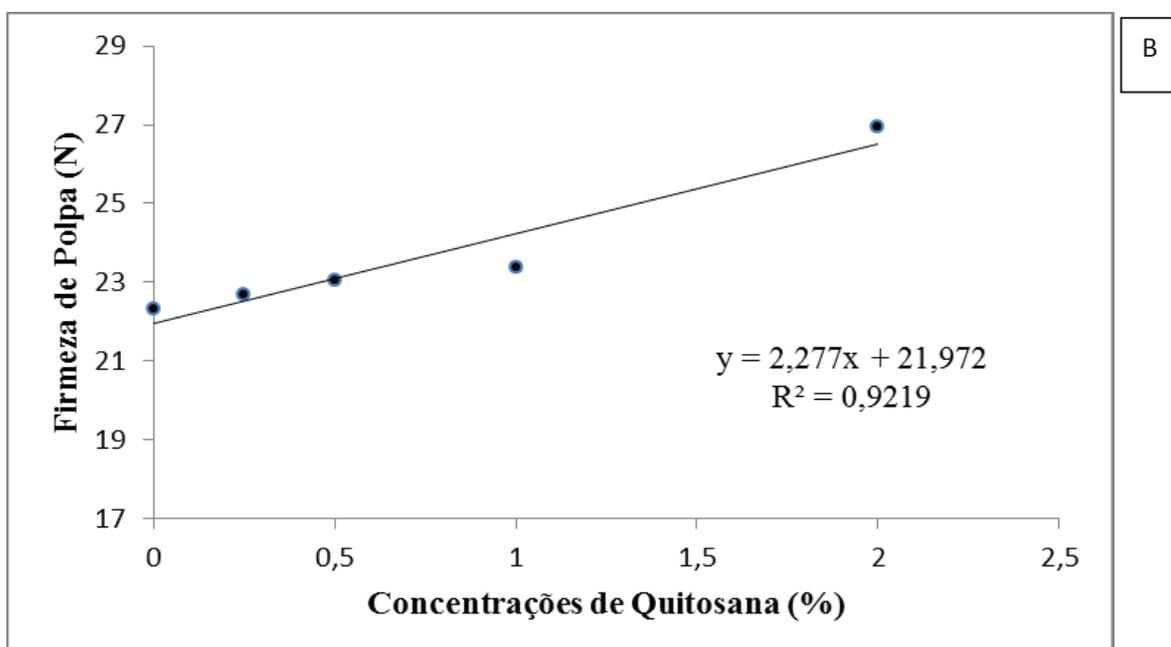
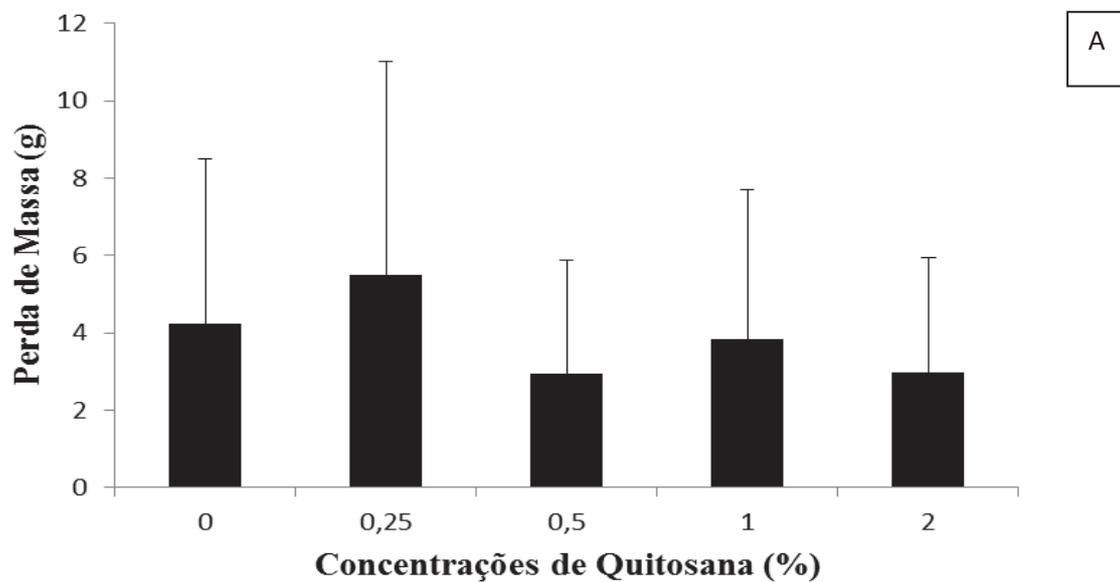
A avaliação do experimento foi realizada com 24 e 48 horas, com a utilização de medição, com auxílio de um paquímetro, perpendicularmente em dois diâmetros (A e B) pré-definidos antes do crescimento micelial do fungo. O experimento foi finalizado quando o fungo *Colletotrichum* sp. atingiu a borda de uma das placas.

Os dados dos experimentos foram submetidos aos testes de Normalidade e posteriormente à análise de variância e regressão. As médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p=0,05$ ), com auxílio do *software* Assistat.

## 2.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados obtidos no Experimento I onde foi avaliado o potencial da quitosana na indução de resistência em pós-colheita de maçãs, demonstraram a ação do indutor sobre as características físico-químicas, perda de massa e firmeza de polpa (Figura 1A e 1B), e no

controle da esporulação do fungo *Colletotrichum* sp. causador da podridão amarga (Figura 1 C).



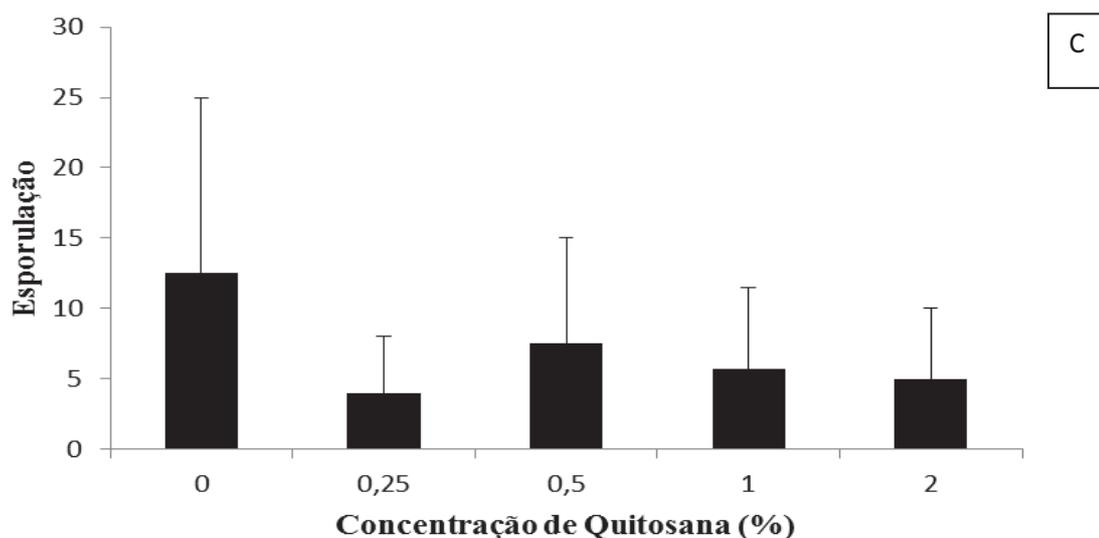


Figura 1: Perda de massa (A) e firmeza de polpa (B) em frutos de maçã cv Gala e a esporulação do fungo (C) *Colletotrichum* sp. após aplicação de diferentes concentrações de quitosana em pós-colheita, e armazenados a 26°C por 96 horas. UTFPR. Dois Vizinhos – PR, 2014.

A perda de massa foi diretamente influenciada pelas diferentes concentrações de quitosana, onde o aumento da concentração promoveu a sua diminuição, sendo que a testemunha apresentou maiores perdas e o tratamento com 2% de quitosana promoveu a menor perda (Figura 1A).

A perda de massa é causada principalmente pela perda de água do fruto através da transpiração e da respiração, eventos que estão intimamente ligados à maturação e a estrutura física e química da cutícula. Portanto acredita-se que a imersão dos frutos de maçãs em concentrações crescentes de quitosana, possa ter promovido à formação de uma camada filmogênica ao redor dos frutos. Desta forma diminuiu a velocidade de maturação e de perda de água pelos frutos. Dados semelhantes foram descritos por Haiping et al. (2011) com maçãs processadas para a comercialização e por Assis (2009) com morango, sendo o tratamento realizado através da imersão dos frutos em quitosana.

Quanto à firmeza de polpa, os tratamentos com quitosana promoveram a manutenção da firmeza de polpa em maçãs de forma linear crescente, onde a solução de quitosana a 2% promoveu a maior manutenção da firmeza (Figura 1B).

A firmeza dos frutos está relacionada com a velocidade de deterioração das estruturas do órgão, como a parede celular e a turgidez dos tecidos. Durante a maturação ocorre um incremento de enzimas que promovem a hidrólise de substâncias pécticas da parede celular, como as enzimas pectinolíticas que transformam protopectinas em pectinas solúveis, a

diminuição da cristalinidade de celulose e o adelgaçamento das paredes celulares (HAIPING et al., 2011).

O biopolímero quitosana nesse experimento, possivelmente inibiu a atividade de enzimas de desestruturação da parede, mantendo os frutos com maior firmeza de polpa, conforme descrito por Bhaskara-Reddy et al. (1998) , porém pode ter atuado ao mesmo tempo sobre as taxas respiratória e de transpiração devido a ação filmogênica diminuindo as mesmas e desta forma reduzindo o metabolismo dos frutos e mantendo as estruturas por mais tempo.

Essa relação direta da aplicação de quitosana e a manutenção da firmeza vêm sendo observada em diversos trabalhos na pós-colheita de frutos, como em maçãs de cv. Rosa tratadas com 2% de quitosana (MARATREE et al., 2014), em morangos (ZHANG, 1998; BHASKARA et al., 2000; MAZARO et al., 2008) e em pêssegos nas concentrações de 5 e 10 mg ml<sup>-1</sup> promovendo a manutenção da firmeza frente ao fungo *M. fructicola*. (LI YU, 2000).

Os resultados relativos aos efeitos da quitosana sobre a severidade, acidez titulável (AT) e sólidos solúveis totais (SST), indicam a não interferência do indutor sobre estes parâmetros (Tabela 1).

Tabela 1: Incidência (%), Severidade (mm), acidez titulável e teor de sólidos solúveis totais (°Brix), 96 horas após a aplicação de concentrações de quitosana em pós-colheita de maçãs ‘Gala’ e armazenados a 26°C por 96 horas. UTFPR. Dois Vizinhos – PR, 2014.

<b>Concentração de quitosana (%)</b>	<b>Incidência (%)</b>	<b>Severidade (mm)</b>	<b>Acidez titulável (meq.100ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Sólidos Solúveis Totais (°Brix)</b>
0,00	100 <sup>ns</sup>	29,45 <sup>ns</sup>	3,02 <sup>ns</sup>	13,05 <sup>ns</sup>
0,25	100	31,32	3,22	13,25
0,50	100	30,98	3,10	12,5
1,00	100	27,96	3,22	12,35
2,00	100	26,36	3,21	12,33
CV		11,81	14,33	6,98
Média	100	23,32	2,55	10,09

<sup>ns</sup> – não significativo pelo teste de análise de variância ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A quitosana não interferiu diretamente na incidência e na severidade da podridão amarga da maçã causada por *Colletotrichum* sp. Quanto a incidência ser 100% demonstra que o processo de infecção foi efetivo, haja vista que todos os frutos desenvolveram a doença. Da mesma forma, na severidade não houve diferenças entre os tratamentos, no entanto, a quitosana promoveu a redução da esporulação de *Colletotrichum* spp. Tal fato é muito importante no controle da doença, considerando o processo de disseminação do patógeno em pós-colheita. Ou seja, se diminui a esporulação haverá menor fonte de inóculo para novas contaminações, o que poderá ser efetivo na redução da incidência de podridões em condições de armazenamento.

Diversos trabalhos relatam a ação direta da quitosana no controle de podridões em frutos em pós-colheita. Botelho et al. (2010), relataram que a aplicação de quitosana em maçãs ‘Castel Gala’, a partir da concentração de 40 mg.L<sup>-1</sup>, reduziram a incidência de podridões nos frutos, Camili et al. (2007) em uva, onde as soluções com concentrações de 1,5 e 2,0 % (v/v), reduziram significativamente a doença e promoveram o controle de *B. cinerea* e Wang; Gao (2013), em seu trabalho evidenciaram o efeito da quitosana na redução de podridões de frutos de morango.

Os sólidos solúveis totais (SST) e a acidez titulável (AT) são variáveis muito importantes em pós-colheita de frutos. A alteração dos SST está relacionado principalmente a hidrólise de amido, gerando açúcares solúveis, fato que ocorre durante o processo de maturação. Chitarra & Chitarra (1990), ainda relatam que a perda de água através da transpiração e da respiração pelo fruto pode gerar um acúmulo de SST.

A manutenção da acidez indica que os frutos estão sendo preservados, pois a perda da acidez está relacionada ao processo natural de maturação dos frutos, através da utilização dos ácidos orgânicos, como substrato no processo respiratório via ciclo de Krebs (MAZARO et al., 2008). Deve-se também levar em consideração que os frutos com ferimentos provocados, apresentavam alta atividade metabólica em pós-colheita, o que pode ter dificultado a observação da gradual perda de acidez dos frutos entre os tratamentos.

A quitosana segundo El Hadrami et al. (2010) apresenta ainda a capacidade de induzir respostas de defesa nos frutos pela produção de compostos fenólicos e proteínas -RPs como FAL, quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases (RABEA et al., 2003; KHAN et al., 2003; BASSETO, 2006).

No entanto às análises bioquímicas (açúcares totais e redutores, proteínas, fenóis, FAL, peroxidase, quitinase e  $\beta$ -1,3 glucanase) mostraram que apenas a  $\beta$ -1,3 glucanase foi alterada após 96 horas da realização dos tratamentos com quitosana (Tabela 2 e Figura 2).

Tabela 2 Concentração de açúcares totais (mg.g tecido<sup>-1</sup>), açúcares redutores (mg.g tecido<sup>-1</sup>), proteínas (mg.g tecido<sup>-1</sup>), fenóis (UAbs min<sup>-1</sup>/mg proteína), FAL (UAbs.µg prot.mL<sup>-1</sup>) e quitinase (UAbs.µg prot.mL<sup>-1</sup>) presentes nos extratos de maçã tratados com 5 concentrações de quitosana (0,25, 0,5, 1, 2%) e avaliada após 96 horas. UTFPR. Dois Vizinhos – PR, 2014.

Tratamentos	Avaliações bioquímicas enzimáticas					
	96 horas					
	<i>Açúcares Totais</i> (mg.g tecido <sup>-1</sup> )	<i>Açúcares Redutores</i> (mg.g tecido <sup>-1</sup> )	<i>Proteínas</i> UAbs min <sup>-1</sup> /mg proteína	<i>Fenóis</i> UAbs min <sup>-1</sup> /mg proteína	<i>FAL</i> UAbs min <sup>-1</sup> /mg proteína	<i>Quitinase</i> UAbs min <sup>-1</sup> /mg proteína
Testemunha	45,13357 <sup>ns</sup>	0,001006 <sup>ns</sup>	1,553 <sup>ns</sup>	0,083 <sup>ns</sup>	0,001012 <sup>ns</sup>	0,0007 <sup>ns</sup>
Quitosana (0,25 mM)	42,19712	0,00108573	1,676	0,246	0,000948	0,0007
Quitosana (0,5 mM)	43,47199	0,00117308	1,633	0,217	0,001281	0,0007
Quitosana (1,0 mM)	41,65498	0,00107973	1,666	0,168	0,001825	0,0006
Quitosana (2,0 mM)	39,31277	0,00086196	1,552	0,244	0,001386	0,0006

\*<sup>ns</sup> – não significativo pelo teste de análise de variância ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Em relação aos parâmetros bioquímicos de açúcares totais, redutores, proteínas totais e, fenóis observou-se que a aplicação de diferentes concentrações de quitosana, não promoveram o aumento significativo nos níveis destas macromoléculas após 96 horas do tratamentos. Possivelmente tal fato deve-se, a metodologia utilizada, já que as avaliações bioquímicas forma realizadas somente no final do experimento, e as diferenças poderiam ter ocorrido em intervalos anteriores ao período de avaliação.

Os açúcares totais (glicose, frutose, maltose e sacarose), redutores (glicose, frutose, maltose) estão diretamente envolvidos no metabolismo primário vegetal, servindo de substrato para rotas do metabolismo secundário (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Da mesma forma os níveis de proteínas, fenóis e da enzima FAL não foram alterados significativamente em função dos tratamentos. Estes compostos estão relacionados com várias

funções, onde a defesa vegetal é uma das principais, já que a FAL está diretamente envolvida na rota do ácido chiquímico, importante rota relacionada com a indução das defesas das plantas por moléculas indutoras (SILVA et al., 2008; PASCHOLATI, 2011).

A atividade das quitinases não foi alterada com a aplicação da quitosana, o que indica que a molécula não foi capaz de desencadear um sinal que estimulasse o gene responsável pela transcrição da enzima quitinase, ou ainda, no momento das avaliações já estivesse ocorrido a expressão dessa enzima, e retornado a níveis semelhantes aos do tratamento controle. Em morangos tratados com quitosana, El Ghaouth et al. (1992) confirmam estes dados, quando observaram efeito na diminuição das podridões, e não sob a atividade enzimática das quitinases e das glucanases.

Contudo a quitosana foi capaz de promover a ativação do gene relacionado com a transcrição da RP  $\beta$ -1,3-glucanase alterando significativamente de forma linear crescente os seus níveis com as concentrações crescentes de quitosana (Figura 2).

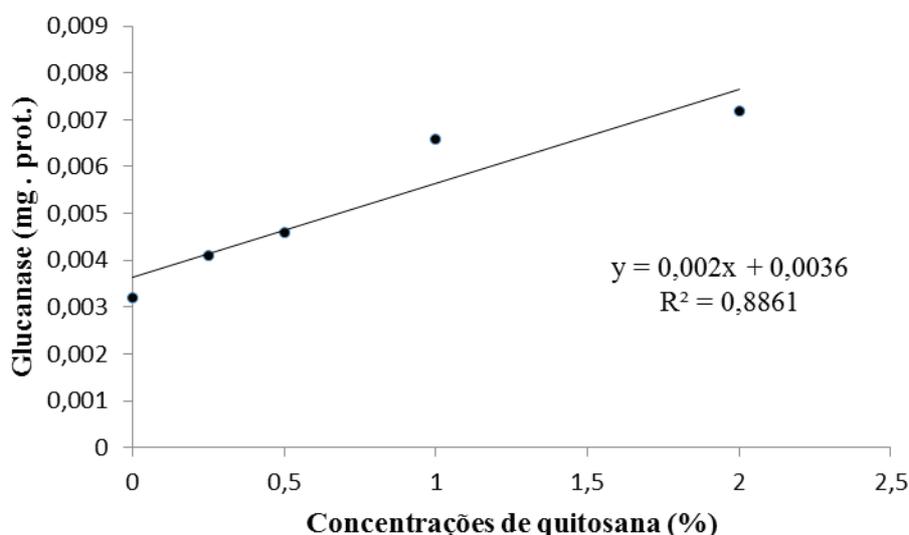


Figura 2: Atividade da proteína RP  $\beta$ -1,3-glucanases em frutos de maçã cv Gala após aplicação de diferentes concentrações de quitosana em pós-colheita, e armazenados a 26°C por 96 horas. UTFPR. Dois Vizinhos – PR, 2014.

Esses resultados demonstram que a quitosana possui ação na indução de resistência em frutos de maçã estimulando a expressão das  $\beta$ -1,3-Glucanases. Estas enzimas são responsáveis pela hidrólise das ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,3 presentes em  $\beta$ -D-glucanas, liberando glucose como produto principal (BAUERMEISTER et al., 2010). Desta forma essa enzima pode promover a degradação da parede celular dos fungos, a qual é constituída por polissacarídeos  $\beta$ -1,3-glucano o principal substrato para a  $\beta$ -1,3-glucanase.

Resultados semelhantes são relatados por Bautista-Baños et al. (2003); no controle de *C. gloeosporioides* em mamão, Zengxin et al. (2013) em frutos de pêssego, onde em ambos os trabalhos, a quitosana atuou como molécula indutora, ativando as respostas de defesa nos frutos expressando aumento dos níveis de  $\beta$ -1,3 glucanase. Ainda, outros autores relataram que o indutor ativou a proteínas PRs em frutos de pêra (XIANGHONG et al., 2010), mangas (PONGPHEN et al., 2007) e em uvas observado por Aziz et al (2006).

Em relação aos dados obtidos no experimento *in vitro*, observou-se que, a solução de quitosana, nas concentrações 0,25 e 0,5%, suprimiram o crescimento micelial *Colletotrichum* sp, após 48 horas, sendo o tratamento testemunha o que apresentou o maior crescimento micelial. (Figura 3).

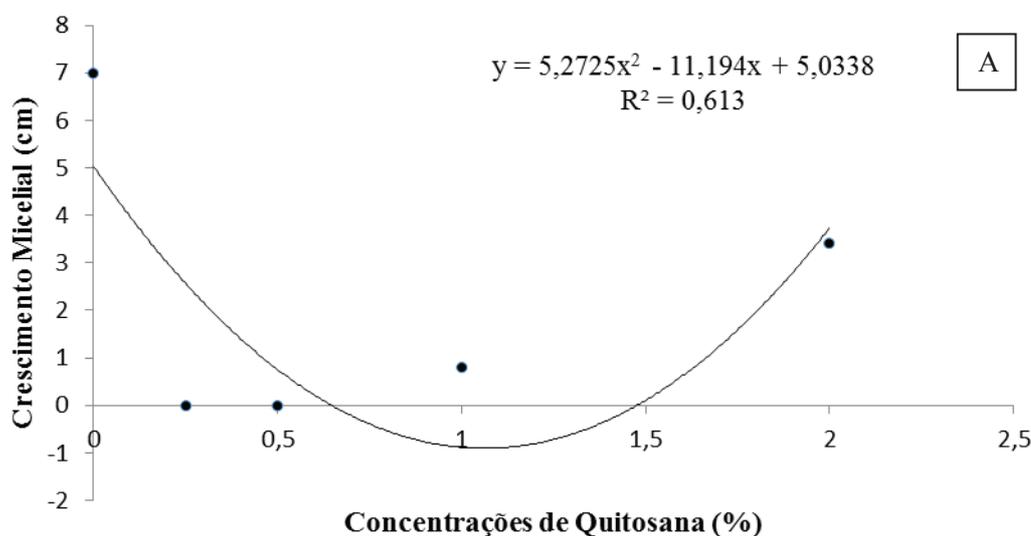


Figura 3: Crescimento micelial (cm) do fungo *Colletotrichum* sp em meio de cultura com adição de diferentes concentrações de quitosana (0, 0,25, 0,5, 1, 2%) armazenados em câmara de crescimento a 26°C por 48 horas, UTFPR. Dois Vizinhos – PR, 2014.

Esses resultados confirmam a atividade fungistática ou fungitóxica possivelmente pela formação de ligações entre as cargas positivas da quitosana com os sítios negativos das proteínas que constituem a parede celular e a membrana da célula do fungo *Colletotrichum* sp., promovendo a desorganização destas estruturas e conseqüentemente a mudanças da permeabilidade e até o rompimento das mesmas, seguida da morte celular (ASSIS 2008). Resultados semelhantes utilizando quitosana em experimentos *in vitro* são relatados por diversos autores

Bautista-Baños et al. (2003); Asgar et al. (2010) relatam a ação da quitosana sob o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* utilizando soluções com 2 e 3 %. Já Maia (2009)

observou que a quitosana inibiu o crescimento em 37 % e 56 % o crescimento micelial de *Botryosphaeria* sp. e *Glomerella cingulata* com solução de 1,5%. Em *Penicillium* sp. em maçã a quitosana teve efeito fungistático, reduzindo linearmente o diâmetro da colônia. (BOTELHO et al., 2002, 2010).

## 2.6 CONCLUSÕES

A quitosana atua sobre os parâmetros físico-químicos dos frutos de maçã cv. Gala, reduzindo a perda de massa, mantendo a firmeza de polpa e reduzindo capacidade de esporulação de *Colletotrichum* sp.;

Confirma-se o efeito de indução de resistência de quitosana em frutos de maçãs, pela ativação da enzima  $\beta$ -1,3 glucanase.

Quitosana apresenta ação fungistática sobre *Colletotrichum* sp. *in vitro* com redução do crescimento micelial.

## REFERÊNCIAS

ASGAR A; MAHMUD, T. M. M; KAMARUZAMAN, S; YASMEEN, S. Potential of chitosan coating in delaying the postharvest anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of Eksotika II papaya. **Int J Food Sci Tech** 2010, vol. 45, p. 2134–2140

ASSIS, A. S. **Produção e caracterização do biofilme de quitosana como envoltório protetor em morangos**. Tese f. 88, (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2009.

ASSIS, O. B. G. THE EFFECT OF CHITOSAN AS A FUNGISTATIC AGENT ON CUT APPLES **Rev. Iber. Tecnología Postcosecha**, vol. 9, núm. 2, 2008, pp. 148-152, Asociación Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, S.C. México.

AZIZ, A; TROTEL-AZIZ, P; DHUICQ, L; JEANDET, P; COUDERCHET, M; VERNET, G. Chitosan Oligomers and Copper Sulfate Induce Grapevine Defense Reactions and Resistance to Gray Mold and Downy Mildew. **The American Phytopathological Society: Disease Control and Pest Management**. Vol. 96, No. 11, 2006.

BADAWY MEI, RABEA EI, *Postharvest Biol. Technol.*  
doi:10.1016/j.postharvbio.2008.05.018. (2008).

BASSETTO E. **Quantificação de danos ao longo da cadeia produtiva de pêssegos e avaliação de métodos alternativos de controle de doenças pós-colheita**, Tese de Doutorado. Piracicaba, São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, ESALQ, USP, 2006.

BAUERMEISTER, A; REZENDE, M. I; GIESE, E. C; DEKKER, R. F. H; BARBOSA, A. M.  $\beta$ -1,3-Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 75-86, jul./dez. 2010.

BAUTISTA-BAÑOS S, HERNÁNDEZ-LAUZARDO AN, VELÁZQUEZ-DEL Valle MG, Hernández-López M, Ait Barka E, Bosquez-Molina E, Wilson CL, **Crop Prot.**, 25, p. 108 2006.

BHASKARA REDDY, M. V; KHALED BELKACEMI, RONAN CORCUFF; FRANC, OIS CASTAIGNE, JOSEPH ARUL . Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. Postharvest **Biol Tech** 20 p. 39–51, 2000.

BHASKARA-REDDY, B.M.V.; AIT BARKA, E.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Biocontrol Sci Tech**, New York, v.8, p.33-43, 1998.

BIELESKI, R.L; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extratcts by thin-layer electrophoresis and chromatograghy. **Anal Biochem**, Orlando, v.17, p.278-293, 1966.

BOTELHO, R.V.; MAIA, A.J.; RICKLI, E.H.; LEITE, C.D.; FARIA, C.M.D.R. Quitosana no controle de *Penicillium* sp.na pós-colheita de maçãs. **Rev Bras Agroecol**, v.5, n.2, p. 200-206, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, Orlando, v.72, p.248 - 254, 1976.

CAMILI, E.C.; BENATO, E.A.; PASCHOLATI, S.F.; CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva ‘Itália’ contra *Botrytis cinerea*. **Summa Phytopatol**, v.33, n.3, p. 215-221, 2007.

CANAVER, B. S; DI PIERO, R. M. Quitosana e adjuvantes para o controle preventivo do mofo azul da macieira, **Trop Plant Pathol** 36 (6) Nov - Dec 2011.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/FAEFE, 320 p. 1990.

CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; BENATO, E.A. Indução de resistência no manejo de doenças pós-colheita. P. 245-280. In: RODRIGUES, F.Á.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Editora UFV, p. , 2007.

CIA, P; BENATO, E. A; PASCHOLATI, S. F; GARCIA, E. O. Quitosana no controle pós-colheita da podridão mole em caqui 'Rama forte'. **Bragantia Campinas**, v. 69, n. 3, p745-752, 2010.

DA SILVA DB, BOBATO TR, BETTONI MM, FABBRIN EG dos, MÓGOR AF. 2012. Uso de quitosana na produção de morangueiro orgânico. **Horticultura Brasileira** 30: S2811-S2815.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analitycal Biochemistry**, Orlando, v.28, p.350-356, 1956.

EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, v.82, n.4, p. 398-402, 1992.

EL HADRAMI, A; ADAM, L. R; EL HADRAMI, I; DAAYF, F. *Chitosan in plant protection (review)*. Mar. Drugs 8:968-987. **Everest Biotech. Indian Patent 2938/ CHE /2010**.

FELIPINI, R. B; DI PIERO, R. M. Redução da severidade da podridão-amarga de maçã em pós-colheita pela imersão de frutos em quitosana. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.44, n.12, p.1591-1597, dez. 2009.

FIORAVANÇO, J. C; LAZZAROTTO, J. J. A CULTURA DA MACIEIRA NO BRASIL: reflexões sobre produção, mercado e fatores determinantes da competitividade futura. . **Informações Econômicas**, SP, v. 42, n. 4, jul./ago. 2012.

HAIPING, Q; WENZHONG, H; AILI, J; MIXIA, T; YINGQIU L. Extending shelf-life of Fresh-cut 'Fuji' apples with chitosan-coatings. **Innov Food Sci and Emerg Tech.** v. 12 p. 62–66 2011

JENNINGS, A.C. The determination of dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. **Anal Biochem**, Orlando, v.118, p.396-398, 1991.

KHAN W, PRITHIVIRAJ B, SMITH DL, *J. Plant Physiol.*, 160, 859 (2003)

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus***: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção. 2007. 140p. Tese (Doutorado) - ESALQ, Piracicaba.

LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de glicolinas em soja (*Glycine max*)**. Piracicaba, 2002, 107p. Dissertação de mestrado. ESALQ, USP.

LI, H; YU, T. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. **J Sci Food Agric** 81:269- p.274. 2000.

MAIA, A. J. **Efeito da quitosana no controle de doenças e no desenvolvimento de plântulas de videira (*Vitis vinifera*)**. Dissertação de mestrado apresentado a Universidade Estadual do Centro-Oeste, do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Produção Vegetal, 2009.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola **Informativo No 54**. Maçã. Ano 6 Vol. 54, março de 2013

MARATREE, P; SARANYA, L; NATTAPONG, W. Effect of Chitosan on the Quality of Rose Apples (*Syzygium agueum* Alston) cv. Tabtim Chan Stored at an Ambient Temperature. **APCBEE Procedia** 8 ( 2014 ) 317 – 322. 2013 4th **International Conference on Agriculture and Animal Science** (CAAS 2013) 2013 3rd International Conference on Asia Agriculture and Animal (ICAAA 2013)

MAZARO, S. M; DESCHAMPS, C; GOUVEA, A; CITADIN, I; JUNIOR, A. W. Indução de resistência a doenças foliares e de flores em morangueiro por quitosana e acibenzolar-s-metil. **Rev. Bras. Agrociência**, Pelotas, v.18 n. 2-4, p.143-150, abr-jun, 2012.

MAZARO, S. M; GOUVEA, A; JUNIOR, A. W; CITADIN, I. Enzimas Associadas à Indução de Resistência em Morangueiro pelo Uso de Quitosana e Acibenzolar-S-Metil. **Rev Ciên Exat Nat**, Vol.14, nº 1, Jan/Jun 2012.

MAZARO, S. M.; CITADIN, I; GOUVÊA, A; LUCKMANN, D; GUIMARÃES, S. S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de Pitangueira, **Ciên Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1824-1829, 2008.

MAZARO, S. M; DESCHAMPS, C.; DE MIO, L. L. M; BIASI, L.A.; GOUVEA, A.; SAUTTER, C. K. Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-S-metil. **Rev Bras Frut**, v.30, n.1, p. 185-190, 2008.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem**, Washington, v.31, p.426-428, 1959.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do Parasitismo: Como as Plantas se Defendem dos Patógenos. In: **Manual de Fitopatologia I: Princípios e Conceitos**. Cap. 35. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 593-636, 2011.

PONGPHEN JITAREERAT A , SUDKANUENG PAUMCHAI B , SIRICHAIR KANLAYANARAT B; SOMSIRI SANGCHOTE. Effect of chitosan on ripening, enzymatic activity, and disease development in mango (*mangifera indica*) fruit. **New Zealand Journal of Crop Hort Sci**, Vol. 35, 2007.

RABEA, EI, BADAWY, MET, STEVENS CV, SMAGGHE G, STEURBAUT W, Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. **Biomacromolecules**, 4(6), 1457 2003.

RODRIGUES, A.A.C. ; NETO, E.B.; COELHO, R.S.B. Indução de Resistência a *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* em Caupi: Eficiência de Indutores Abióticos e Atividade Enzimática Elicitada. **Fitopatol Bras**, v. 31, n.5, p. 492-499, 2006.

ROMANAZZI, G.; FELIZIANI, E.; SANTINI, M.; LANDI, L. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. **Posth Biol Tech**, v.75, n.1, p. 24-27, 2013.

SANHUEZA. R. M. V. Maçã Fitossanidade. DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS E BACTÉRIAS **Frutas do Brasil**, 38. 2002.

SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. DERAL - Departamento de Economia Rural Fruticultura - **Análise da Conjuntura Agropecuária**, Dezembro de 2012.

SILVA, R. C.; ANDRADE JR., M. A. E CESTARI, A. R., **Quim. Nova**, Vol.33, No.4, 2010, 880-884.

SILVA, R.A.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. EMBRAPA **Agrobiol, Documentos 250**, Seropédica, 49p. 2008.

STAMFORD TCM, STAMFORD TLM, FRANCO LO. Produção, propriedades e aplicações da quitosana na agricultura e no ambiente. En: Figueiredo MVB, Burity HA, Stamford, NP, Santos CERS (editores). *Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. 1a edição, Guaíba: **Agrolivros**, p. 568, 2008.

TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Posth Biol Tech**, Amsterdam, v.32, p.1-13. 2004.

WANG, S.Y.; GAO, H.; Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants, antioxidant enzyme system, and postharvest fruit quality of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Food Sci Tech**, v.52, n.1, p. 71-79, 2013.

WIRTH, S.J.; WOLF, G.A.; Micro-plate colourimetric assay for endo-acting cellulose, xylanase, chitinase, 1,3- $\beta$ -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. **Soil Biol Biochem**, v.24, p.511-519, 1992.

XIANGHONG MENG A,B, LINGYU YANG A,1, JOHN F. KENNEDY C, SHIPING TIAN. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. **Carbohyd Polym**. v.81 p.70-75. 2010.

ZENGXIN, M; LINGYU, Y; HAIXIA, Y; KENNEDY, J. F; XIANGHONG, M. Chitosan and oligochitosan enhance the resistance of peach fruit to brown rot. **Carbohyd Polym** 94 p.272- 277, 2013.

ZHANG, D.; QUANTICK, P.C. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. **J. Hort Sci Biotechnol**, Ashford, v.73, p.763-767, 1998.

ZHANG, D.; QUANTIK, P.C. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. **Posth Biol Tech**, v.12, p. 195-202, 1998.

### 3. QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO MOFO CINZENTO EM PÓS-COLHEITA DE MORANGOS CV. CAMAROSA E NO CONTROLE DE *Botrytis cinerea* IN VITRO.

#### 3.1 RESUMO

O mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* é uma doença de grande importância na pós-colheita de morangos, causando grandes perdas ao longo de toda a cadeia produtiva e na pós-colheita dos frutos. Objetivou-se, neste trabalho, avaliar diferentes concentrações de quitosana na indução de resistência ao mofo cinzento em pós-colheita de morangos cv. Camarosa e no controle de *Botrytis cinerea in vitro*. Os frutos de morango foram submetidos ao tratamento por aspersão, nas diferentes concentrações de quitosana (0,25; 0,5; 1 e 2%), e na testemunha utilizou-se água destilada. Após os frutos serem tratados foram inoculados com uma suspensão de esporos de *B. cinerea* ( $5.10^{-3}$  esporos  $ml^{-1}$ ). O delineamento foi inteiramente casualizado, com 4 repetições de 20 frutos., sendo avaliados após 96 horas de armazenamento, na temperatura de 10 °C, quanto a perda de massa, firmeza de polpa, sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável (AT), incidência e severidade do mofo cinzento e esporulação de *B. cinerea*. Em intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas retirou-se amostras de frutos para determinação dos açúcares totais e redutores, antocianinas, flavonoides, proteínas totais e atividade das enzimas relacionadas a patogenicidade (proteínas-RPs), sendo as peroxidases, fenilalanina amônia-liase, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases. No experimento *in vitro*, a unidade experimental foi uma placa de Petri, em 4 repetições, sendo a quitosana incorporado ao meio BDA (Batata-Dextrose e Agar) e avaliado o crescimento micelial de *B. cinerea* com 24 e 48 horas. Os resultados demonstraam que a quitosana atua no controle da incidência do mofo cinzento em pós-colheita de morangos cv. Camarosa, ativando as proteínas-RPs quitinases e  $\beta$ -1-3 glucanases. Mantém a firmeza de polpa em níveis mais elevados, interfere no metabolismo dos açúcares totais e redutores e dos flavonoides. *In vitro* possui ação fungistática no controle de *B. cinerea* diminuindo crescimento micelial em relação controle.

Palavras-chaves: *Fragaria* x *ananassa* Duch; peroxidases, fenilalanina amônia-liase, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanase.

#### 3.2 ABSTRACT

The gray mold caused by *Botrytis cinerea* is a disease of great importance in post-harvest of strawberries, causing major losses over the entire production chain and postharvest fruits. The objective of this study was to evaluate different chitosan concentrations in the gray mold resistance induction of postharvest camarosa strawberries cv., and control of *Botrytis cinerea in vitro*. Strawberry fruits were subjected to treatment by spraying, in different chitosan concentrations (0.25, 0.5, 1 and 2%) and in the control, distilled water was used. Afterwards, the fruits were inoculated with a suspension of *B. cinerea* spores ( $5.10^{-3}$  spores  $ml^{-1}$ ). The design was completely randomized with four replications of 20 fruits. After 96 hours of

storage at 10 ° C temperature, were evaluated the mass loss, firmness, total soluble solids (TSS), titratable acidity (TA), incidence and severity of gray mold and sporulation of *B. cinerea*. At intervals of 24, 48, 72 and 96 hours, were extracted fruit samples for determination of total and reducing sugars, anthocyanins, flavonoids, protein and enzyme activity related to pathogenicity (protein-RPs), those being the peroxidases, phenylalanine ammonia lyase, chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanases. In the In vitro experiment, the experimental unit was one Petri® plate, in 4 replications, being the chitosan incorporated to PDA (Potato Dextrose Agar and) and rated the mycelial growth of *B. cinerea* with 24 and 48 hours. The chitosan acts in controlling the incidence of gray mold in postharvest Camarosa strawberries cv., activating chitinase proteins and  $\beta$ -1-3-glucanases. Keeps firmness at higher levels, interferes with the metabolism of total sugars, reducing sugars and flavonoids. In the In vitro, it has fungistatic action to control *B. cinerea* reducing mycelial growth compared to control.

Keywords: *Fragaria x ananassa*, Duch; peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase; chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase.

### 3.3 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de morango, ocupando a 3º colocação, no entanto, sua produção está ainda limitada a atender o mercado nacional, sendo exportado apenas 1%, o que demonstra a grande possibilidade de crescimento em nível de exportação (ANUÁRIO, 2013). Considerando um país com grande extensão territorial, diversidades edafoclimáticas e capacidade de adaptação da cultura, a produção de morangos pode ocorrer em praticamente todas as regiões, porém concentra-se principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo e o Paraná, sendo a produção em sua grande maioria destinada ao mercado de frutos *in natura* (ANTUNES; JUNIOR, 2007).

As perdas pós-colheitas relacionadas com a cultura do morango, representam um grande problema que limita a distribuição e diminui a vida dos frutos para a comercialização, gerando grande prejuízos econômicos. Essas perdas, em sua grande maioria são causadas pela ação de fungos fitopatogênicos, organismos responsáveis pelas podridões e pela rápida deterioração dos morangos diminuindo o tempo de prateleira dos frutos.

Dentre os fungos causadores de podridões o *Botrytis cinerea* agente causal do mofo-cinzento é o mais importante. De ocorrência generalizada, presente em todas as regiões que cultivam o morangueiro, de difícil controle e com grande capacidade de desenvolver epidemias rápidas e severas (TANAKA et al., 2005; MORANDI; MAFFIA, 2005).

A doença nos frutos surge como manchas marrons claras de tamanho variável, não aquosa, sem linhas demarcando os tecidos afetados. As machas evoluem tomando todo o fruto

que apodrece adquirindo um aspecto seco e firme, com recobrimento cinza, constituído pelas estruturas do fungo (BERGAMIM FILHO; AMORIM, 2011).

O manejo adequado ao longo da cadeia produtiva e principalmente na pós-colheita é um ponto importantíssimo, no entanto os métodos de controle de patógenos mais eficientes normalmente são conseguidos com a utilização de agroquímicos, o que representa um método que interfere no ambiente, causando danos a saúde dos produtores e consumidores.

Para diminuir esses problemas, métodos alternativos vêm sendo amplamente estudados, entre estes o processo de indução de resistência. Os indutores de resistência ou elicitores são produtos bióticos ou abióticos, que ativam a expressão de genes que codificam diversas respostas de defesa a patógenos, conduzindo à indução da resistência, e com isso a proteção de tecidos da planta ainda não atacados, tornando-os resistentes à infecção por patógenos.

A quitosana é um indutor de resistência abiótico, obtido a partir da desacetilação da quitina encontrada na carapaça dos crustáceos, e tem sido relatada em diversos trabalhos com potencial na redução de podridões pós-colheita de frutos. Atua ligando-se a receptores presentes na membrana celular das plantas, mimetizando o fenômeno de reconhecimento que ocorre na interação incompatível entre a planta e o patógeno (LABANCA, 2002), podendo inibir as proteinases e promover a lignificação (TERRY; JOYCE, 2004), alterar o metabolismo das fitoalexinas (MAZARO et al., 2008), induzir a formação de compostos fenólicos (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006), peroxidase (ZHANG; QUANTICK, 1998), fenilalanina amônia-liase (FAL) (ROMANAZZI et al., 2002; RODRIGUES et al., 2006) e ativar enzimas quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases (ZHANG; QUANTICK, 1998; RODRIGUES et al., 2006).

A quitosana em morango vem demonstrando potencial em diversos trabalhos no controle de fitopatógenos. Segundo Mazaro et al. (2008) a quitosana aplicada na pré colheita de morangos, diminui a podridão na pós-colheita causada por *B. cinerea*, além de apresentar ação sobre a maturação dos frutos promovendo menor perda de massa fresca, manutenção da firmeza de polpa e acidez titulável e diminuição na produção de etileno. Em sistema de cultivo de morangos orgânicos, Campos et al. (2011), obtiveram a redução de podridões, perda de massa, e frutos com melhor aparência. Velickova et al. (2013) relataram ainda que a aplicação de quitosana em pós colheita de morangos ‘Camarosa’, aumentaram o período de armazenamento dos frutos por sete dias a uma temperatura de 20°C e 53% de umidade relativa, comparando com frutos sem a aplicação do produto. Silva et al., (2012) observaram que a aplicação de quitosana em morangueiros cv. Diamante estimulou o crescimento dos frutos e o aumento da produtividade.

Apesar de diversos trabalhos já realizados com quitosana, considerando o patossistema morango x *B. cinerea*, a proposta deste trabalho possui o diferencial de ser feito o tratamento pela da pulverização na pós-colheita, já outros trabalhos realizaram tratamentos em pré-colheita ou com a da imersão dos frutos, técnicas que podem ser inviáveis considerando o tratamento em nível de campo ou danos aos frutos por imersão. Também esse trabalho buscou avaliar condições de armazenamento similares as empregadas no processo de comercialização, ou seja, a temperatura dos balcões de exposição refrigerados a 10°C, enquanto que outros trabalhos consideraram temperaturas de armazenamento ou ambiente.

O objetivo do trabalho foi avaliar diferentes concentrações de quitosana na indução de resistência ao mofo cinzento em pós-colheita de morangos cv. Camarosa no controle de *B. cinerea in vitro*.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Dois Vizinhos, no ano de 2013, sendo que o Experimento I buscou avaliar diferentes concentrações de quitosana na indução de resistência ao mofo cinzento em pós-colheita de morangos cv. Camarosa. Já o experimento II, desenvolvido logo em seguida ao primeiro, verificou o efeito da quitosana sobre o patógeno, avaliando o controle de *Botrytis cinerea* em condições *in vitro*.

#### 3.4.1 Experimento I – Indução de Resistência a mofo cinzento:

Os frutos de morangos cv. Camarosa foram colhidos quando apresentavam-se em estágio de maturação de consumo comercial (coloração >90%vermelha; SST valor médio 13°Brix; acidez titulável valor médio 11,0 meq./100ml). Fez-se no laboratório uma seleção dos frutos, quanto ao tamanho, grau de maturação e aparente ausência de injúrias. Cada unidade experimental foi constituída de uma bandeja de polipropileno com dimensões de 20 cm de comprimento por 10 cm de largura, contendo vinte frutos.

As soluções de quitosana foram preparadas com material oriundo de farmácia de manipulação, com 98% de pureza do produto, a qual foi diluída em solução contendo ácido acético a 1%, e então, ajustadas as concentrações com água destilada (0,25; 0,5; 1 e 2%), sendo para testemunha somente água destilada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições.

Os tratamentos foram aplicados logo após o preparo da quitosana, diretamente nos morangos, por aspersão, com borrifador manual, em uma dosagem aproximada de 10ml/20frutos. Em seguida as bandejas foram envolvidas em filme tipo PVC esticável e armazenadas em câmara de crescimento, por 96 horas, a  $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , sem fotoperíodo.

Após 24 horas da aplicação dos tratamentos, inoculou-se *B. cinerea* ( $5.10^3$  conídios/mL<sup>-1</sup>), na quantidade aproximada de 0,01ml por morango.

Após 96 horas de armazenamento avaliou-se a perda de massa, firmeza de polpa, sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável (AT), incidência e diâmetro da lesão de mofo cinzento (severidade) e esporulação de *B. cinerea*. Em intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas foram retiradas amostras de frutos do tratamento testemunha e da maior concentração de quitosana (2%) para determinação de análises bioquímicas de açúcares totais e redutores, antocianinas, flavonoides, proteínas totais e atividade das enzimas relacionadas a patogenicidade (proteínas-RPs), sendo a peroxidase, fenilalanina amônia-liase, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanase.

A perda de massa dos morangos foi obtida pela diferença de massa do dia da instalação do experimento e do valor encontrado na pesagem após 96 horas de armazenamento, expresso em percentual. A firmeza da polpa foi realizada com penetrômetro TR, modelo RT – 327, ponteira de 8 mm de diâmetro. Os resultados foram expressos em libras/cm<sup>2</sup> e transformados para Newton. O teor de SST foi analisado do suco extraído dos frutos, com um extrator manual, e mensurado com um refratômetro digital, sendo os valores expressos em °Brix. A acidez total titulável (ATT) foi determinada de 10 mL de suco dos frutos diluído em 90 mL de água destilada, seguido por titulação com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N até pH 8,1, sendo expresso em meq.100 mL<sup>-1</sup>. A avaliação da incidência de podridões, tamanho da lesão e esporulação foram realizadas com auxílio de um estereomicroscópio binocular, sendo confirmado os sintomas de doenças e se as lesões estavam com esporulação. Para o tamanho das lesões as mesmas foram mensuradas com auxílio de um paquímetro, realizando duas medições cruzadas sobre as lesões.

Nas análises bioquímicas a quantificação de proteínas totais, as amostras da polpa dos morangos foram maceradas em almofariz com 5 ml de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5). Em seguida, o material foi centrifugado (14.000g / 10 min a 4°C) e o sobrenadante coletado. Para quantificação do conteúdo total de proteínas das amostras foi empregado o teste de Bradford (1976). A leitura de proteínas totais foi realizada em espectrofotômetro a 630 nm, utilizando soro albumina bovina como padrão.

Para a quantificação de flavonoides e antocianinas pesou-se 1 g da polpa de morango macerado posteriormente em almofariz, juntamente com 25 ml da solução extratora, formada por etanol 95% + HCl 1,5 N (HCl 1,5 N = 125 ml de HCl puro para análise (P.A.) + 875 ml de água destilada) na proporção de 85:15, ou seja, 850 ml de etanol 95% para 150 ml de HCl 1,5N quando para 1000 ml. Após a maceração, os extratos foram acondicionados em tubos de ensaio ao abrigo da luz e refrigerados a aproximadamente 4°C, por um período de 20 horas. Após este período, os extratos foram filtrados, lavados com mais 25 ml da solução extratora e deixados em repouso em frasco coberto por papel alumínio por 2 horas. Posteriormente retirou-se 1 ml da amostra o qual foi adicionado a 10 ml da solução extratora, em tubo de ensaio e agitado em vortex. Na sequência foi feita a leitura das amostras no espectrofotômetro a 374 nm, para obtenção da absorbância de flavonoides e a 535 nm para obtenção da absorbância de antocianinas.

As concentrações de açúcares solúveis totais foram determinadas pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956). As amostras foram maceradas em almofariz contendo 5 mL de tampão fosfato 0,2M – pH 7,5, centrifugadas por 5 minutos a 10.000 g. Utilizando-se 2 µL do extrato e adicionando-se 0,5mL de fenol a 5,0% + 2,5 mL ácido sulfúrico concentrado. A leitura das amostras foi realizada a 490 nm. A concentração de açúcares totais foi determinada por meio de uma curva padrão de glicose.

Açúcares redutores foram determinados pelo método do dinitrosalicilato (DNS) (MILLER, 1959). As amostras foram maceradas em almofariz contendo 5 mL de tampão fosfato 0,2M – pH 7,5, centrifugadas por 10 minutos a 14.000 g a 4°C. Utilizando-se 0,5 µL do extrato e adicionando-se 1,0 mL de água destilada + 1,0 mL reagente DNS. A leitura das amostras foram realizadas a 540 nm. As concentrações de açúcares redutores foram calculadas em função de curva padrão de glicose.

As peroxidases foram determinadas pelo método preconizado por Matsuno; Uritani (1972), aonde foi retirada uma amostra dos frutos de cada unidade experimental, colocada em um recipiente de porcelana previamente refrigerado, pois esta análise deve-se processar a temperatura inferior a 4 °C. As amostras foram maceradas com 3,0 ml tampão fosfato 0,05 M (pH 7) com mais 0,005g polivinilpirrolidona. O extrato foi acondicionado em tubos e devidamente identificados que foram levados para a centrífuga por 20 minutos, a 4 °C e a 5000 rpm. Após centrifugação, foi retirado 2,0 mL do sobrenadante e colocado em tubos de ensaios identificados, aonde encontrava-se o preparado de 3,0 mL do tampão citrato (pH 5,0) mais 0,5 ml água oxigenada a 3 % e mais 0,5 ml guaiacol 0,5 %. A solução foi agitada e

colocada por 15 minutos em banho-maria 30°C e após 10 minutos em gelo para pararem as reações. Finalmente foi adicionado 0,5 mL de bisulfito de sódio agitado e feita a leitura a 450 nm em espectrofotômetro, obtendo-se assim os valores de absorbância.

A fenilalanina amônia-liase foi quantificação através do método colorimétrico do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina, conforme metodologia descrita por Kuhn (2007), aonde se utilizou 0,5 mL do suco das frutas com mais 3,0 mL do tampão TRIS – HCl pH 8,0. Este extrato foi acondicionado em tubos ependorfe devidamente marcados que foram levados para a centrífuga por 10 minutos, a 4 °C e a 6000 rpm. Após, foi transferido uma alíquota de 200 µL para tubo de ensaio identificado, acrescentando-se mais 3,0 mL do tampão de extração. A solução foi agitada, obtendo-se assim, o extrato enzimático. Deste extrato, 1,5 mL foi transferido para outro tubo de ensaio, com mais 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina. Novamente, esta solução foi agitada para homogeneização. E após, os tubos foram incubados em banho-maria por 45 minutos a 40°C. Depois de retirados do banho-maria, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos para interromper a reação e assim poder ser feita a leitura em espectrofotômetro a 290 nm.

Para dosagem das atividades de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase foram realizadas com adaptações da metodologia proposta por Wirth; Wolf (1992). As amostras foram maceradas em 2,0 mL de tampão acetato 100 mM (pH 5,0), com posterior centrifugação (20.000 g por 25 min, a -4 °C). O sobrenadante foi coletado e utilizado para a avaliação da atividade das enzimas. A atividade enzimática da quitinase foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (Sigma). Para determinação espectrofotométrica das atividades de  $\beta$ -1,3-glucanase nos extratos foi utilizado como substrato solução de Curdlan (Sigma).

#### 3.4.2 Experimento II - Efeito da quitosana sobre *B. cinerea in vitro*

O isolado do fungo *B. cinerea* foi obtido no Laboratório de Fitossanidade da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos/PR. O fungo foi repicado em placas de Petri<sup>®</sup>, contendo meio BDA, e mantidas em B.O.D. a 25 ± 2°C, com fotoperíodo de 12 horas.

Os tratamentos foram concentrações de quitosana, sendo avaliados nas mesmas concentrações anteriores (0,25; 0,5; 1 e 2%) e a testemunha água destilada. A unidade experimental foi constituída por uma placa de Petri<sup>®</sup> de vidro com 9 cm de diâmetro, em quatro repetições.

Os meios de cultura BDA (batata-dextrose- Agar) receberam a adição de quitosana nas diferentes concentrações, conforme preparação descrita no experimento I, sendo somente como diferencial que antes de serem inseridas ao meio, foram esterilizadas em banho-maria a 60°C por 6 horas. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, os preparados foram vertidos na quantidade de 18 mL por placa de Petri®.

Após a solidificação do meio, os discos com 10 mm de diâmetro contendo o micélio do fungo *B. cinerea* foram dispostos no centro da placa. Então, estas foram tampadas, lacradas com filme plástico esticável e acondicionadas em B.O.D. à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação do experimento foi realizada com 24 e 48 horas, com a utilização de medição, com auxílio de um paquímetro, perpendicularmente em dois diâmetros (A e B) pré-definidos antes do crescimento micelial do fungo. O experimento foi finalizado quando o fungo *B. cinerea* atingiu a borda de uma das placas.

Os dados dos experimentos foram submetidos aos testes de Normalidade e posteriormente à análise de variância. As médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p=0,05$ ), com auxílio do *software* Assistat.

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados obtidos no Experimento I onde avaliou-se o potencial da quitosana na indução de resistência em pós-colheita de morangos, demonstraram a ação do indutor sobre as características físico-químicas e no controle da podridão causada por *B.cinerea* (Figura 1A e 1B).

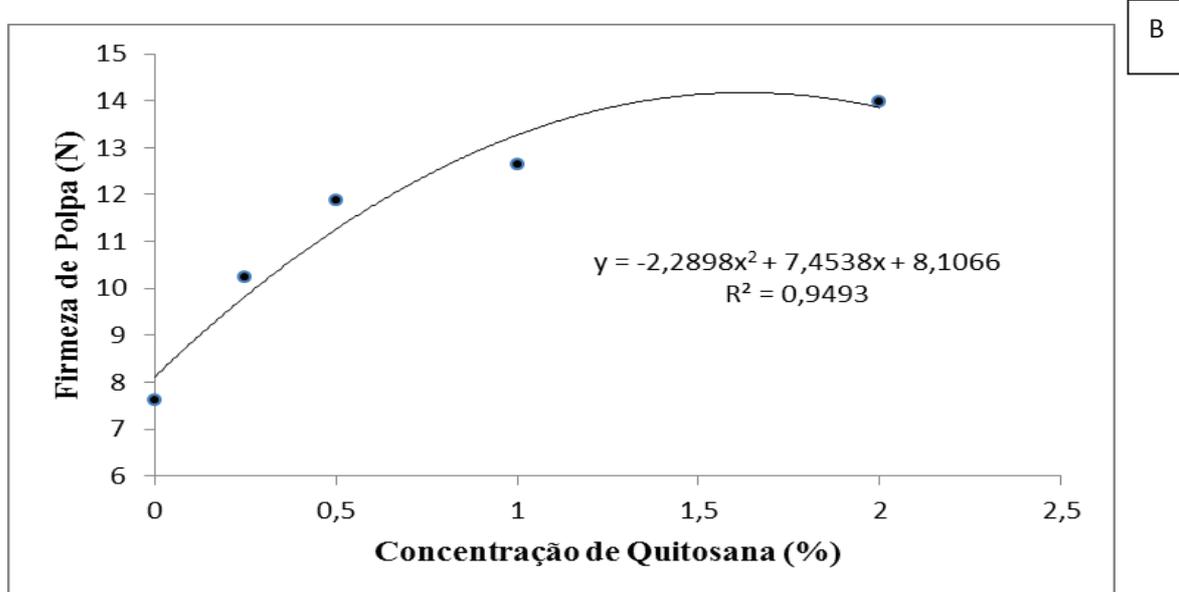
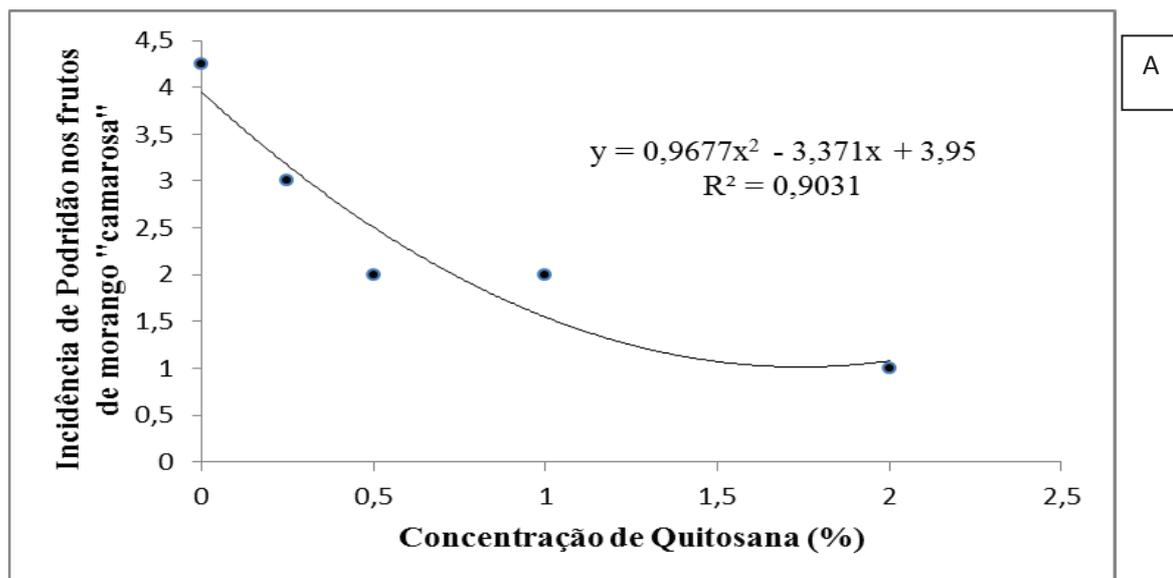


Figura 1: Incidência de podridões (A) e firmeza de polpa (B) em frutos de morango 'Camarosa', após aplicação de diferentes concentrações de quitosana em pós-colheita, e armazenados a 10°C por 96 horas. UTFPR. Dois Vizinhos – PR, 2014.

A ocorrência de podridões nos frutos de morangos 'Camarosa' foi reduzida de forma linear pelos tratamentos nas diferentes concentrações de quitosana, sendo que na testemunha apresentou maiores incidências de podridões (Figura 1A).

Os resultados obtidos podem ser explicados pela ação deste biopolímero interferindo diretamente no crescimento de vários fungos fitopatogênicos, apresentando efeito fungistático ou fungicida com a desorganização molecular e estrutural nos fungos (BERGER et al., 2011).

Ainda o polímero pode ter atuado segundo El Hadrami et al. (2010) na indução das defesas dos frutos através da produção de compostos de defesa como fenóis e proteínas-RPs

como peroxidases, FAL, quitinases,  $\beta$ -1,3 glucanases (RABEAS et al., 2003; KHAN et al., 2003; BASSETO, 2006).

Resultados semelhantes, com efeito no controle de podridões de morangos causadas por *B. cinerea*, foram obtidos por Mazaro et al. (2008) aplicando quitosana na pré-colheita nas concentrações de (0,5, 1 e 1,5%) e por El Ghaouth et al. (1992); Romanazzi et al. (2013) nas concentrações de 10 e 15 mg.L<sup>-1</sup>, que também observaram efeito sobre *Rhizopus stolonifer*. De acordo com Wang e Gao (2013), em seu trabalho ficou mais evidente o efeito da quitosana na redução de podridões de frutos de morango, pois quanto maior foi o período de armazenamento e maior a temperatura de armazenamento, maior foi o efeito do polímero, o que vem a afirmar o potencial do produto na redução de podridões de frutos.

Resultados semelhantes são relatados em outros frutos, evidenciado o efeito de quitosana no controle de podridões pós-colheita como o desenvolvido por Botelho et al. (2010), os quais relatam que a aplicação de quitosana em maçãs ‘Castel Gala’, a partir da concentração de 40 mg.L<sup>-1</sup>, reduziram a incidência de podridões nos frutos. Camili et al. (2007) em uva, onde as soluções com concentrações de 1,5 e 2,0 % (v/v), reduziram significativamente a doença e promoveram o controle de *B. cinerea*.

Quanto à firmeza de polpa, os dados demonstraram que com o aumento das concentrações de quitosana, ocorreu uma maior manutenção da firmeza da polpa dos frutos (Figura 1B).

A firmeza de polpa esta diretamente ligada a velocidade de deterioração das estruturas dos frutos, parede celular e turgidez dos tecidos. Durante a maturação ocorre um incremento de enzimas, principalmente a poligalacturonase, a pectinase e a celulase, degradando os principais constituintes da parede celular, como a transformação de protopectinas em pectinas solúveis. O uso de quitosana, nesse experimento, possivelmente tenha inibido a atividade de enzimas de desestruturação da parede, mantendo os frutos com maior firmeza de polpa, conforme descrito por Bhaskara-Reddy et al. (1998).

Essa relação direta da aplicação de quitosana e a manutenção da firmeza vêm sendo observada em diversos trabalhos na pós-colheita de frutos, como em morangos (ZHANG, 1998; BHASKARA et al., 2000; MAZARO et al., 2008) em maçãs de cv. Rosa tratadas com 2% de quitosana (MARATREE et al., 2014) e 1% segundo Haiping Qi et al. (2010), já em pêssegos as concentrações de 5 e 10 mg ml<sup>-1</sup> promoveram a manutenção da firmeza frente ao fungo *M. fructicola*. (LI; YU, 2000).

Ainda os dados observados nesse trabalho quanto à manutenção da firmeza de polpa e a diminuição da podridão podem ser correlacionados, pois à medida que a concentrações do

indutor aumentou, a incidência de podridões diminuiu e a firmeza se manteve mais elevada, o que sugere que o patógeno encontrou maiores dificuldades para infectar e colonizar os frutos diminuindo dessa forma a incidência de podridões.

Os resultados relativos aos efeitos da quitosana sobre a perda de massa, sólidos solúveis Totais (SST), e acidez titulável (AT) revelaram que o indutor não apresentou efeito sobre tais parâmetros (Tabela 1).

Tabela 1: Perda de massa (%), acidez titulável e teor de sólidos solúveis totais, 96 horas após a aplicação de concentrações de quitosana em pós-colheita de morangos 'Camarosa' e armazenados a 10°C por 96 horas. UTFPR. Dois Vizinhos – PR, 2014.

<b>Concentração de quitosana (%)</b>	<b>Perda de massa (%)</b>	<b>Acidez titulável (meq.100ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Sólidos Solúveis Totais (°Brix)</b>
0,00	12,2 <sup>ns</sup>	11,2 <sup>ns</sup>	13,1 <sup>ns</sup>
0,25	12,5	10,1	13,3
0,50	13,4	11,8	12,5
1,00	13,6	8,7	12,4
2,00	12,2	10,2	12,3
Média	10,34	8,16	10,01

<sup>ns</sup> – não significativo pelo teste de análise de variância ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A perda de massa é causada principalmente pela perda de água do fruto em sua transpiração e respiração, portanto intimamente ligada a maturação, estrutura física e química cuticular. Como não houve diferenças na perda de massa, acredita-se que seja em função da forma como ocorreram os tratamentos, por aspersão e não por imersão, nesse sentido o produto não promoveu um efeito filmogênico, o que poderia ser uma barreira na redução da perda de água do tecido vegetal. Já em trabalhos, aonde utilizaram o processo de imersão dos frutos na quitosana, ocorreu efeito de redução na perda de água (ASSIS, 2009).

Os sólidos solúveis totais (SST), e a acidez titulável (AT) são variáveis importantes na pós-colheita de frutos. A alteração dos SST relaciona-se com a hidrólise de amido, gerando açúcares solúveis durante o processo de maturação. A manutenção da acidez indica que a qualidade dos frutos está sendo mantida, desta forma a perda da acidez está relacionada ao processo natural de maturação dos frutos, pois ocorre uma utilização dos ácidos orgânicos, como substrato no processo respiratório via ciclo de Krebs (MAZARO et al., 2008).

Deve-se levar em consideração que o morango é um fruto que apresenta atividade metabólica em pós-colheita, bem como as condições avaliadas, com temperatura de 10°C, impediu que ocorressem grandes alterações devido os tratamentos. Fato que não descarta alterações nos parâmetros de SST e acidez em condições de baixa temperatura. Resultados semelhantes, quanto a não alteração destes parâmetros também foram descritos por Borsatti (2014) em amora preta tratadas com AS (ácido salicílico).

Quanto às análises bioquímicas (açúcares totais e redutores, proteínas, antocianinas, flavonoides, FAL, peroxidase, quitinase e glucanase) foram alteradas com o passar das horas (24, 48, 72 e 96 horas) após e a realização tratamento com quitosana (tabela 02).

Tabela 2 Concentração de açúcares totais (mg.g tecido<sup>-1</sup>), açúcares redutores (mg.g tecido<sup>-1</sup>), proteínas (mg.g tecido<sup>-1</sup>), antocianinas (mg.L<sup>-1</sup> cloreto de malvidina), flavonoides (mg.L<sup>-1</sup> cloreto de malvidina), peroxidase (unidade enzimática.minuto<sup>-1</sup>), FAL (UAbs.µg prot.mL<sup>-1</sup>), quitinase (UAbs.µg prot.mL<sup>-1</sup>) proteína e β-1,3 Glucanase (UAbs min<sup>-1</sup>/mg proteína) presentes nos extratos de morango tratados com duas concentrações de quitosana e avaliada em 4 momentos. UTFPR. Dois Vizinhos – PR, 2014.

Tratamentos	Avaliações bioquímicas enzimáticas				
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	Média
<b>Proteínas</b>	(mg.g tecido <sup>-1</sup> )				
Testemunha	0,1357 Aa	0,1261 aA	-	0,1392 aA	0,1336
Quitosana (2,0 mM)	0,1238 aA	0,0611 aA	-	0,0842 aA	0,0897
<b>Açúcares Totais</b>	(mg.g tecido <sup>-1</sup> )				
Testemunha	29,32 A	224,17 A	161,00 A	161,82 A	144,08
Quitosana (2,0 mM)	132,77 B	103,91 B	106,74 B	470,84 A	203,6
<b>Açúcares Redutores</b>	(mg.g tecido <sup>-1</sup> )				
Testemunha	0,0026 B	0,0041 A	0,0028 AB	0,0020 B	0,0029a
Quitosana (2,0 mM)	0,0022 B	0,0028 AB	0,0028 AB	0,0035 A	0,0028
<b>Antocianinas</b>	(mg.L <sup>-1</sup> cloreto de malvidina)				
Testemunha	11,64 aB	13,61 aB	25,27 aA	16,54 aB	16,77a
Quitosana (2,0 mM)	15,43 aB	16,06 aB	23,87 aA	17,96 aB	16,33a
<b>Flavonóides</b>	(mg.L <sup>-1</sup> cloreto de malvidina)				
Testemunha	25,92aA	23,54 aA	27,19 aA	18,89 bA	23,88a
Quitosana (2,0 mM)	19,29aAB	10,94 bB	27,47 aA	31,09 aA	22,19a
<b>Peroxidase</b>	(unidade enzimática.min <sup>-1</sup> )				
Testemunha	0,31 aAB	0,09 bB	0,58 aA	0,28 aB	0,31a

Quitosana (2,0 mM)	0,29 aA	0,42 aA	0,36 bA	0,20 aA	0,31a
<b>FAL</b>	UAbs min <sup>-1</sup> /mg proteína				
Testemunha	1,2817	1,1991	1,5375	0,8002	1.20461 a
Quitosana (2,0 mM)	1,3076	1,1352	4,2486	1,4833	2.04367 a
<b>Quitinase</b>	UAbs min <sup>-1</sup> /mg proteína				
Testemunha	0,0158	0,0122	0,0147 b	0,0079 b	0.01261 b
Quitosana (2,0 mM)	0,0161	0,0199	0,0539 a	0,0220 a	0.02796 a
<b>β-1,3 Glucanase</b>	UAbs min <sup>-1</sup> /mg proteína				
Testemunha	0,18 aA	0,30 aA	0,32 aA	0,49 bA	0,32b
Quitosana (2,0 mM)	0,37 aB	0,63 aB	0,7 aB	1,54 aA	0,81a

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e pelas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). ns=não significativo

Em relação aos parâmetros bioquímicos das macromoléculas proteínas totais, açúcares totais e redutores observou-se que a aplicação de quitosana a 2% na pós-colheita de morango, promoveu o aumento nos níveis de açúcares totais e redutores, após 96 horas do tratamento, no entanto não interferiu sobre os níveis de proteínas totais. As proteínas, açúcares totais (glicose, frutose, maltose e sacarose) e os redutores (glicose, frutose, maltose) estão diretamente envolvidos no metabolismo primário vegetal, sendo, no caso dos açúcares, substrato para as rotas do metabolismo secundário. A alteração dos açúcares, conforme observado no tratamento com quitosana, com destaque para 96 horas, demonstra que o indutor apresentou ação sobre o metabolismo primário. Tal ação nos açúcares pode estar relacionada a manutenção da qualidade pós-colheita de morangos, conforme observado por Albuquerque et al., (2010), aonde associou teores de açúcares redutores com o metabolismo fisiológico envolvido na maturação.

Os níveis de antocianinas não tiveram interferência em função dos tratamentos, já para flavonoides com 96 horas, ocorreram os maiores valores quando utilizado o indutor em comparação com a testemunha. Ainda, para esses parâmetros, ocorreram alterações no decorrer do tempo de avaliação, o que é normal, uma vez que a síntese ou a degradação destes compostos ocorre naturalmente durante o processo de maturação dos frutos. A alteração dos flavonoides 96 horas após o tratamento, pode ser associado a alteração dos açúcares totais e redutores que ocorreu no mesmo período, o que demonstra sinergismo no processo de relação entre o metabolismo primário e secundário, haja visto que os flavonóides são metabolitos

secundários, e os açúcares substrato na rota dos fenilpropanóides no processo de síntese dos mesmos.

Segundo Taiz e Zeiger (2006) os flavonoides são sintetizados em resposta a infecção por fungos, estas moléculas apresentam atividade antimicrobiana dificultando a penetração e a colonização de fungos. Desta forma o aumento na concentração flavonóides pode estar relacionado com a aplicação da quitosana, já que a esta molécula é capaz de induzir a resposta de defesa das plantas por ser semelhante a quitina presente na parede celular dos fungos. Da mesma forma que a antocianina os flavonoides estão relacionados com a síntese de compostos fenólicos, são a maior classe de compostos desta origem, e assim como as antocianinas estes, são sintetizados a partir da rota do ácido chiquímico ou do ácido malônico.

A rota do ácido chiquímico, ou também denominada dos fenilpropanóides é a principal via de formação de compostos fenólicos, sendo que a FAL é a enzima chave na síntese destes compostos. A FAL atua na desaminação da L-fenilalanina, formando ácido trans-cinâmico e amônia. O ácido trans-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico), os quais estão presentes na formação de ésteres, cumarinas, flavonóides e ligninas (CAVALCANTI et al., 2005). Os dados obtidos quanto a atividade da FAL, apesar de demonstrar valores mais levados na média geral das avaliações, quando se aplicou o indutor, não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Em relação às peroxidases, ocorreu alteração pelo uso dos indutores e também em função do tempo, sua maior atividade foi observada com 48 horas após a aplicação do indutor. Já para a testemunha com 72 horas, indicando que a quitosana, estimulou a síntese dessa enzima de forma antecipada. As peroxidases, entre suas ações sintetizam ligninas, modificando a estrutura e a arquitetura das paredes celulares aumentando a resistência à patógenos.

Segundo Taiz e Zeiger (2006) o peróxido de hidrogênio promove a ligação cruzadas entre proteínas, o que torna a parede celular mais rígida e resistente. Mazaro (2007) observou que a atividade das peroxidases foram estimuladas pelo uso da quitosana em morangos, apresentando expressão após 120 horas da aplicação, já Felipini; Di Piero (2008) citam que a imersão de maçãs em quitosana não afetou significativamente a atividade de peroxidases.

A quitosana ativou as proteínas-RPs, sendo as quitinases pronunciada a partir de 72 horas da após a aplicação do indutor, com sua atividade acrescida em 366%, 278% nas avaliações de 72 e 96 horas, respectivamente, em comparação com a testemunha. Para a  $\beta$ -

1,3-glucanases sua ação ocorreu posteriormente com 96 horas após a aplicação dos tratamentos, com acréscimo de 314% em relação à testemunha.

Esses resultados demonstram que o indutor quitosana possui ação na indução de resistência em frutos de morango. Estas enzimas estão relacionadas com a degradação da parede celular dos fungos sendo esta parede formada por polissacarídeos quitina e  $\beta$ -1,3-glucano os principais substratos para as quitinases e a  $\beta$ -1,3-glucanase.

Outros trabalhos já demonstraram a ação de quitosana sobre a indução dessas enzimas hidrolíticas em morangos, como os descritos por Mazaro et al. (2008; 2012) onde a quitosana em diferentes concentrações ativou as quitinases e glucanases. Ainda, outros autores relatam que o indutor ativou as proteínas PRs em frutos de pêra (XIANGHONG et al., 2010), e de mangas (PONGPHEN et al., 2007) e em uvas observado por Aziz et al (2006).

Já El Ghaouth et al. (1992) citam que o recobrimento de quitosana em frutos de morango, teve efeito na diminuição das podridões, no entanto, não estimulou a atividade enzimática de quitinases e glucanases.

Em relação aos dados obtidos no experimento de crescimento micelial, observou-se que as diferentes concentrações de quitosana adicionadas ao meio BDA, inibiram o crescimento micelial de *B. cinerea* após 72 horas (Figura 02). Esses resultados indicam que a quitosana apresenta atividade fungistática e fungitóxica, impedindo o crescimento normal do fungo.

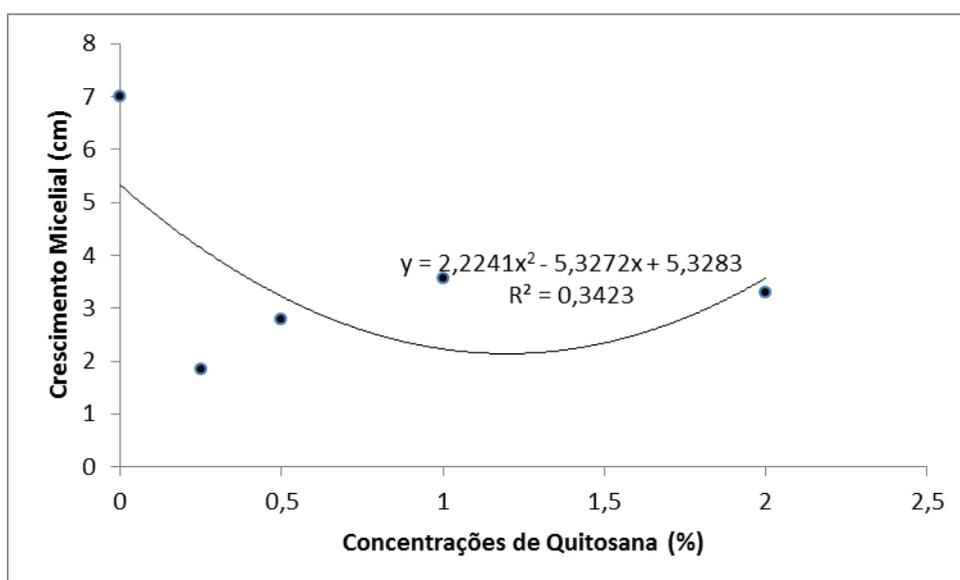


Figura 2: Crescimento micelial do fungo *B. cinerea* em meio de cultura com a adição de diferentes concentrações de quitosana (0, 0,25, 0,5, 1 e 2%) após 72 em B.O.D. com temperatura de 24°C, UTFPR. Dois Vizinhos – PR, 2014.

Esse efeito pode estar relacionado com as características catiônicas que a molécula de quitosana apresenta, o que possibilita a ligação da mesma com as macromoléculas com cargas negativas que estão presentes na parede celular e na membrana dos fungos. Essa ligação por sua vez pode promover a desorganização estrutural do fungo promovendo o rompimento da parede celular e da membrana acarretando a morte das células dos fungos.

Resultados semelhantes são relatados por El Ghaouth et al. (1992) em morangos onde o crescimento micelial de *B. cinerea* e *Rhizopus stolonifer*, foi inibido pela concentração de quitosana (10 e 15 mg/ml), já Di Piero; Garda (2008) relatam o efeito fungistático da quitosana sob *Colletotrichum lindemuthianum*, causador da antracnose em feijoeiro-comum e Meng et al., (2010) verificaram essa ação em *Pyrus pyrifolia* e *Alternaria kikuchiana*, com 0,40 e 0,35 g/L e 1,72; 1,46 g/L, respectivamente.

Uma avaliação conjunta dos dados, permite afirmar que o emprego de quitosana em pós-colheita, reduz a podridão de frutos, e que tal resultado, está relacionado ao processo de indução de resistência ativando as enzimas PRPs e também ação direta da quitosana sobre *B. cinerea*.

### 3.6 CONCLUSÕES

Quitosana atua no controle da incidência do mofo cinzento em pós-colheita de morangos cv. Camarosa, ativando as proteínas-RPs quitinases e  $\beta$ -1-3 glucanases. Mantém a firmeza de polpa em níveis mais elevados, interfere no metabolismo dos açúcares totais e redutores e dos flavonoides.

*In vitro* possui ação fungistática no controle de *B. cinerea* diminuindo crescimento micelial em relação ao controle.

### REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, E. M. B; OLIVEIRA, E. N. A; SANTOS, D. C; ALMEIDA, F. A. C; GOME, J. P. **Comportamento dos açúcares redutores em manga in natura armazenada em atmosfera modificada.** Tecnol. Ciên. Agropec., João Pessoa, v.4, n.3, p.27-31, set. 2010

ANTUNES LEC; REISSER JÚNIOR C.. Fragole, i produttori brasiliani mirano all'exportazione in **Europa.Frutticoltura** 69: p.60-65. 2007.

ASSIS, A. S. **Produção e aracterização do biofilme de quitosana como envoltório protetor em morangos.** Tese f. 88, (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2009.

AZEVEDO, V. V. C; CHAVES, A. S; BEZERRA, D. C; LIA FOOK, M. V, M. COSTA, A. C. F. *REMAP*, 23, 27 (2007). Franco LO, Stamford TCM, Stamford NP, Campos-Takaki GM. *Rev Analytic*, 4(14), 40 (2005)

AZIZ, A; TROTEL-AZIZ, P; DHUICQ, L; JEANDET, P; COUDERCHET, M; VERNET, G. Chitosan Oligomers and Copper Sulfate Induce Grapevine Defense Reactions and Resistance to Gray Mold and Downy Mildew. The American **Phytopathol Society**.Vol. 96, No. 11, 2006.

BADAWY MEI, RABEA EI, Postharvest **Biol. Technol**.doi:10.1016/ j.postharvbio. 2008. 05.018. 2008.

BASSETTO E. **Quantificação de danos ao longo da cadeia produtiva de pêssegos e avaliação de métodos alternativos de controle de doenças pós-colheita.** Tese de Doutorado. Piracicaba, São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, ESALQ, USP, 2006.

BAUTISTA-BAÑOS S, HERNÁNDEZ-LAUZARDO AN, VELÁZQUEZ-DEL Valle MG, Hernández-López M, Ait Barka E, Bosquez-Molina E, Wilson CL, **Crop Prot.**, 25, p.108 2006.

BHASKARA-REDDY, B.M.V.; AIT BARKA, E.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Biocontrol Sci Tech**, New York, v.8, p.33-43, 1998.

BOTELHO, R.V.; MAIA, A.J.; RICKLI, E.H.; LEITE, C.D.; FARIA, C.M.D.R. Quitosana no controle de *Penicillium* sp.na pós-colheita de maçãs. **Rev Bras Agroecol**, v.5, n.2, p. 200-206, 2010.

BORSATTI, F. C.; **Ácido salicílico na qualidade pós-colheita de frutos, hortaliças folhosas e flores.** 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2014.

BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, Orlando, v.72, p.248 - 254, 1976.

CAMILI, E.C.; BENATO, E.A.; PASCHOLATI, S.F.; CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*. **Summa Phytopatol**, v.33, n.3, p. 215-221, 2007.

CAMPOS R. P; KWIATKOWSKI, A; CLEMENTE, E. Post-harvest conservation of organic strawberries coated with cassava starch and chitosan. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 58, n.5, p. 554-560, set/out, 2011

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/FAEFE, 320 p. 1990.

CHIEN, Z.; SILVA, H.; KLESSIG, D.F. Coating citrus (*Murcott tangor*) fruit with low molecular weight chitosan increases post-harvest quality and shelflife. **Food Chem**, v.100, p. 1160-1164, 2006.

CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; BENATO, E.A. Indução de resistência no manejo de doenças pós-colheita. P. 245-280. In: RODRIGUES, F.Á.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Editora UFV, p.339.2007,

CIA, P; BENATO, E. A; PASCHOLATI, S. F; GARCIA, E. L. Quitosana no controle pós-colheita da podridão mole em caqui 'rama forte'. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p745-752, 2010

DA SILVA DB, BOBATO TR, BETTONI MM, FABBRIN EG dos, MÓGOR AF. Uso de quitosana na produção de morangueiro orgânico. **Hort Bras** 30: 2012.

DE CAPDEVILLE, G.; WILSON, C.L.; BEER, S.V.; AIST, J.R. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvest 'Red Delicious' apple fruit. **Phytopathol**, v.92, p. 900-908, 2002.

DI PIERO, R. M; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesq. Agropecu. Bras**, Brasília, v.43, n.9, p.1121-1128, set. 2008.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal Biochem**, Orlando, v.28, p.350-356, 1956.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathol**, Durham, v.42, p.185-209, 2004.

EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathol**, v.82, n.4, p. 398-402, 1992.

EL HADRAMI A, ADAM LR, EL HADRAMI I, DAAYF F, **Mar. Drugs**, 8, 968 (2010)

FELIPINI, R.B.; DI PIERO, R.M. Redução da severidade da podridão-amarga de maçã em pós-colheita pela imersão de frutos em quitosana. **Pesq Agropecu Bras**, v.44, n.12, p. 1591-1597, 2008.

GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **J Phytopathol**, Berlin, v.144, p.449-454, 1996.

HERNANDÉZ-LAUZARDO AN, BAUTISTA-BAÑOS MG, Velázquez-del V, Méndez-Montealvo MG, Sánchez-Rivera MM, Bello-Pérez LA, **Carbohydr Polym**, 73, p.541, 2008

HONGYE LI; TING YU. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological Attributes of postharvest peach fruit. **J Sci Food Agric** 81 p.269-274, 2000.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus***: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção. 2007. 140p. Tese (Doutorado) - ESALQ, Piracicaba.

KHAN W, PRITHIVIRAJ B, SMITH DL, **J. Plant Physiol.**, 160, 859 (2003)

LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. Piracicaba, 2002, 107p. Dissertação de mestrado. ESALQ, USP.

BHASKARA-REDDY, M.V. KHALED BELKACEMI, RONAN Corcuff; Francis Castaigne, Joseph Arul . Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Posth Biol Tech** 20 p.39–51, 2000.

MARATREE P; SARANYA, L; NATTAPONG, W. Effect of Chitosan on the Quality of Rose Apples (*Syzygium agueum* Alston) cv. Tabtim Chan Stored at an Ambient Temperature. APCBEE Procedia 8 ( 2014 ) 317 – 322. 2013 **4th International Conference on Agriculture and Animal Science** (CAAS 2013) 2013 3rd International Conference on Asia Agriculture and Animal (ICAAA 2013).

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant and Cell Physiol**, Tokio, v.23, p.1091-1101, 1972.

MAZARO, S. M; DESCHAMPS, C; GOUVEA, A; CITADIN, I; JUNIOR, A.. W. Indução de resistência a doenças foliares e de flores em morangueiro por quitosana e acibenzolar-s-metil. **Rev. Bras. Agrociência**, Pelotas, v.18 n. 2-4, p.143-150, abr-jun, 2012.

MAZARO, S. M; GOUVEA, A; JUNIOR, A. W; CITADIN, I. Enzimas Associadas à Indução de Resistência em Morangueiro pelo Uso de Quitosana e Acibenzolar-S-Metil. **Rev Ciências Exatas e Naturais**, Vol.14, nº 1, Jan/Jun 2012

MAZARO, S. M; CITADIN, I; GOUVÊA, A.; LUCKMANN, D; GUIMARÃES, S. S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de Pitangueira, **Ciêñ Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1824-1829, 2008.

MAZARO, S.M.; DESCHAMPS, C.; DE MIO, L.L.M.; BIASI, L.A.; GOUVEA, A.; SAUTTER, C.K. Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-S-metil. **Rev Bras Fruticul**, v.30, n.1, p. 185-190, 2008.

MAZARO, S.M. **Indução de resistência a doenças em morangueiro pelo uso de elicitores**. 2007. 87p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MENG, X; YANG, L;KENNEDY, J. F; TIAN, S. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. **Carbohydr Polym** 81, p. 70–75, 2010.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem**, Washington, v.31, p.426-428, 1959.

MORANDI, M. A. B.; MAFFIA, L. A. Manejo integrado do mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea*. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, p. 37, 2005.

PONGPHEN JITAREERAT A, SUDKANUENG PAUMCHAI B , SIRICHAIRANLAYANARAT B; SOMSIRI SANGCHOTE. Effect of chitosan on ripening, enzymatic activity, and disease development in mango (*mangifera indica*) fruit. New Zealand **J Crop and Horticult Sci**, 2007, Vol. 35.

RABEA, EI, BADAWY, MET, STEVENS CV, SMAGGHE G, STEURBAUT W, Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. **Biomacromolecules**, 4(6), 1457 (2003)

BERGER, L. R. R; Stamford, T. C. M; Stamford, N. P.. PERSPECTIVAS PARA O USO DA QUITOSANA NA AGRICULTURA. **Rev Iberoamericana de Polímeros**. Vol 12(4), Agost de 2011.

RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.81-124. 2005.

RODRIGUES, A. A. C; NETO, E. B; COELHO, R. S. B. Indução de Resistência a *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* em Caupi: Eficiência de Indutores Abióticos e Atividade Enzimática Elicitada. **Fitopatol Bras**, v. 31, n.5, p. 492-499, 2006.

ROMANAZZI, G.; FELIZIANI, E.; SANTINI, M.; LANDI, L. Effective ness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. **Posth Biol Techn**, v.75, n.1, p. 24-27, 2013.

SILVA RC, ANDRADE JR. MAS, CESTARI, AR. **Quim. Nova**, 33(4), 880 (2010)

SILVA, R.A.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. EMBRAPA Agrobiologia, **Documentos 250**, Seropédica, 2008, 49p.

STAMFORD T. C. M; STAMFORD, T. L. M; FRANCO LO. Produção, propriedades e aplicações da quitosana na agricultura e no ambiente. En: Figueiredo MVB, Burity HA, Stamford, NP, Santos CERS (editores). *Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. 1a edição, Guaíba: **Agrolivros**, 2008, p. 568

TAIZ, L; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal, 3° ed. Porto Alegre, Artmed. 2006.

TANAKA, M.A.S.; BETTI, J.A.; KIMATI, H. Doenças do morangueiro. P. 489-499. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia 2: Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 4 ed., 2005, 651p.

TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in posharvest horticultural crops: a brief review. **Posth BiolTech**, Amsterdam, v.32, p.1-13. 2004.

VELICKOVA, E.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S.; ALVES, V.D.; MOLDÃO-MARTINS, M. Impact of chitosan-bees waxedible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv. Camarosa) under commercial storage conditions. **Food Sci Tech**, v.52, n.1, p. 80-92, 2013.

WANG, S.Y.; GAO, H.; Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants, antioxidant enzyme system, and postharvest fruit quality of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Food Sci Tech**, v.52, n.1, p. 71-79, 2013.

XIANGHONG MENG A,B, LINGYU YANG A,1, JOHN F. KENNEDY C, SHIPING TIAN. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. **Carbohydr Polym** 81 p. 70–75, 2010

ZHANG, D.; QUANTICK, P.C. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. **J Horticult Sci Biotech**, Ashford, v.73, p.763-767, 1998.

ZHANG, D.; QUANTIK, P.C. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. **Posth Biol Tech**, v.12, p. 195-202, 1

## 4 QUITOSANA NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PODRIDÃO PARDA EM PÓS-COLHEITA DE PÊSSEGO E NO CONTROLE DE *MONILINIA FRUCTICOLA* IN *VITRO*.

### 4.1 RESUMO

A podridão parda causada por *Monilinia fructicola* é uma doença de grande importância na pós-colheita de pêssegos, pois acarretada perdas significativas ao longo da cadeia produtiva e principalmente na pós-colheita. Desta forma o trabalho teve como objetivo verificar a interferência de diferentes concentrações de quitosana na indução de resistência a podridão parda na pós-colheita de pêssegos e no controle *in vitro* do fungo *Monilinia fructicola*. Os frutos de pêssago foram submetidos ao tratamento por imersão, por 1 minutos, nas diferentes concentrações de quitosana (0,25; 0,5; 1 e 2%), tendo como testemunha a água destilada. Após os tratamentos frutos foram inoculados com uma suspensão de esporos de *M. fructicola* ( $5 \cdot 10^3$  esporos  $\text{ml}^{-1}$ ). O delineamento foi inteiramente casualizado, com 4 repetições de 20 frutos. Após 48 horas de armazenamento, na temperatura de  $26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ , avaliou-se a perda de massa, firmeza de polpa, incidência da podridão e retirou-se amostras dos frutos para a quantificação de açúcares totais e redutores, proteínas totais, fenóis e atividade das enzimas relacionadas a patogenicidade (proteínas -RPs), sendo as peroxidases, fenilalanina amônia-liase, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanase. No experimento *in vitro*, a unidade experimental foi uma placa de Petri®, em 4 repetições, sendo a quitosana incorporado ao meio BDA (Batata-dextrose e Agar). O objetivo foi avaliar o crescimento micelial de *M. fructicola* com 24 e 48 horas. Os resultados possibilitam concluir que a Quitosana atua na manutenção da qualidade dos frutos, na indução de resistência e no controle da incidência da podridão parda em pós-colheita de pêssegos, ativando as PRPs e quinases e B-1-3 Glucanase.e no controle de *M. fructicola in vitro* com ação fungistática.

Palavras-chave: *Prunus persica*; peroxidases, fenilalanina amônia-liase, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanase.

### 4.2 ABSTRACT

The brown rot caused by *Monilinia fructicola* is a disease of great importance in post-harvest of peaches, as it causes significant losses along the supply chain and especially in post-harvest. Therefore, this study was to verify the interference of different chitosan concentrations in the induction of resistance to brown rot in postharvest peaches and in vitro control of the fungus *Monilinia fructicola*. Peach fruits were subjected to treatment by immersion for 1 minute in different chitosan concentrations (0.25, 0.5, 1 and 2%) and distilled water was used as control. Afterwards, the fruits were inoculated with a suspension of *M. fructicola* spores ( $5 \cdot 10^3$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ). The design was completely randomized with four

replications of 20 fruits. After 48 hours of storage and temperature of  $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ , were evaluated the mass loss, firmness, and incidence of rot. Fruit samples were removed for determination of total and reducing sugars, proteins, phenols and activity of enzymes related to pathogenicity (RPS proteins), those being the peroxidases, phenylalanine ammonia lyase, chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. In the In vitro experiment, the experimental unit was one Petri® plate in 4 replications, with the chitosan incorporated into the PDA (potato dextrose agar and) and evaluated the mycelial growth of *M. fructicola* with 24 and 48 hours. Chitosan acts in maintaining fruit quality, resistance induction and controls the incidence of brown rot in post-harvest of peaches, activating the PRPs, kinases, B-1-3 Glucanase, and to control in vitro *M. fructicola* with fungistatic action.

Keywords: *Prunus persica*; peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase, chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase.

### 4.3 INTRODUÇÃO

A cultura do pêssego (*Prunus persica*) tornou-se nas últimas décadas uma importante cultura frutífera principalmente a partir dos melhoramentos realizados na cultura, o que permitiu que esta passasse a produzir por períodos maiores e gerando frutos de qualidade, melhorando a aceitação pelo mercado consumidor.

O Brasil ocupa 13<sup>o</sup> posição na produção deste fruto, o que projeta um possível crescimento e um grande mercado a ser explorado no futuro. Os principais estados produtores são o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e atualmente Minas Gerais. No Paraná o cultivo do pêssego, ocupa 1,4 mil hectares, sendo colhidas próximo de 17,8 mil toneladas em 2012 (SEAB, 2012).

Porém para atender a demanda de um mercado crescente, o Brasil necessita vencer alguns obstáculos, sendo o principal as perdas que ocorrem na pós-colheita. Segundo Martins et al. (2006), dois anos de levantamentos, constataram índices de injúrias pós-colheita em pêssegos de 4,9 a 44,5%, podendo chegar 87% principalmente pelo o amassamento durante o transporte e o armazenamento, o que se agrava por se tratar de um de fruto climatérico com grande perecibilidade.

As grandes perdas naturais são ainda aumentadas pela ação de fungos fitopatogênicos, organismos responsáveis pelas podridões e pela rápida deterioração dos pêssegos diminuindo o tempo para a comercialização gerando grandes prejuízos. Entre as podridões que acometem a cultura do pêssego no Brasil, a podridão parda, ocasionada pelo fungo *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey, é a mais importante doença das frutas de caroço como os pessegueiros e as

nectarineiras, sendo responsável pela destruição considerável de frutos maduros, tanto no pomar quanto durante a comercialização (ANDRADE, 1995; CAMPOS et al., 2005).

A doença aparece inicialmente causando lesões pequenas pardacentas que evoluem para manchas marrons com a colonização dos tecidos vizinhos pelo fungo. Com o passar do tempo os frutos infectados tornam-se completamente cobertos de esporos, (GARRIDO; SÔNEGO, 2003).

Esta doença está presente praticamente em todos os países onde o pessegueiro é cultivado, pois está adaptada ao clima quente e úmido a sua disseminação e manutenção nos pomares ocorre muitas vezes devido a existência de frutos mumificados em ramos da planta e no solo nos pomares (CAMPOS et al., 2005).

Em frutos maduros infectados pelo patógeno 48hs são suficientes para a podridão tornar-se visível. As ocorrências de chuvas e temperatura ótima de 25°C a aumentam a incidência da doença (GARRIDO; SÔNEGO, 2003).

O manejo adequado ao longo da cadeia produtiva e principalmente na pós-colheita é um ponto importantíssimo, no entanto não são suficientes para o controle da doença. Portanto verifica-se a necessidade do emprego de métodos de controle de patógenos eficientes, o que normalmente é conseguido com a utilização de agroquímicos, o que representa um risco ao ambiente e aos consumidores.

Como alternativa para diminuir a utilização de agroquímicos, a indução de resistência apresenta-se como um método promissor que vem sendo amplamente estudado.

Produtos de origem biótica ou abiótica podem ser utilizados como moléculas indutoras da defesa nas plantas, ativando genes responsáveis por diversas respostas que tornam os tecidos vegetais resistentes aos patógenos, estimulando a síntese de enzimas relacionadas a patogenicidade (CIA et al., 2007).

Entre os indutores a quitosana obtida a partir da desacetilação da quitina encontrada na carapaça dos crustáceos, desperta atenção pelo baixo custo e por resultados positivos já descritos por vários autores indicando o potencial indutor em pós-colheita de frutos e no controle de podridões fúngicas. A quitosana quando ligada a membrana celular das plantas, induz uma resposta como se a planta estivesse sendo atacada por um patógeno (LABANCA, 2002), induzindo as defesas da planta, inibindo a síntese de proteinases, promovendo a lignificação (TERRY; JOYCE, 2004), alterando o metabolismo das fitoalexinas (MAZARO et al., 2008), induzir a formação de compostos fenólicos (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006), peroxidase (ZHANG; QUANTICK, 1998), fenilalanina amônia-liase (FAL) (ROMANAZZI

et al., 2002; RODRIGUES et al., 2006) e a ativação das enzimas quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases (ZHANG; QUANTICK, 1998; RODRIGUES et al., 2006; ZENGXIN et al., 2013).

Diversos autores descrevem a utilização da quitosana em pêssego na pós-colheita para controle o controle de fungos fitopatogênicos, como o causador da podridão parda o *M. fructicola*.

Segundo Mazaró et al. (2005) a quitosana aplicada em concentrações acima de 0,25 à 1% reduzem as podridões em pêssego. O que foi confirmado pelos resultados de Santos et al. (2008) cultivar Douradão em temperatura de refrigeração e por Hongye; Ting (2000); Bassetto, (2006) ambos no controle da podridão parda em pêssego. Em experimento utilizando quitosana a 1% e temperatura de armazenamento de 20 °C, Casals et al. (2012) obtiveram a redução da incidência a 10% em comparação a testemunha (73%). Já El-Badawy (2012); Ghasemnezhad et al. (2010) demonstraram que a quitosana na concentração de 1% diminui a perda de massa. Ainda El-Badawy (2012) obtiveram o retardo da senescência, aumento nos níveis de sólidos e solúveis totais e acidez, e ainda obtiveram a maior manutenção da firmeza de polpa em pêssegos Florida príncipe, com o avançar do tempo de armazenamento, quando tratados com 1% e quitosana.

Como relatado por Zengxin et al. (2013) a quitosana impediu a evolução da podridão causada por *M. fructicola* ativando enzimas relacionadas a patogenicidade como as peroxidases, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanase.

Como diversos trabalhos vêm demonstrando o potencial de quitosana no controle de podridões pós-colheita de pêssegos. Como diferencial esse trabalho buscou avaliar condições de armazenamento similares as empregadas no processo de comercialização, ou seja a temperatura de exposição nos mercados, ou seja, 26°C, enquanto que na grande maioria dos trabalhos consideraram temperaturas de armazenamento refrigerado.

O objetivo do trabalho foi avaliar diferentes concentrações de quitosana na indução de resistência a podridão parda em pós-colheita de pêssegos cv. 'Delicioso' e no controle de *Monilinia fructicola in vitro*.

#### 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Dois Vizinhos, no ano de 2013, sendo que o Experimento I buscou avaliar a interferência das diferentes concentrações de quitosana na

indução de resistência a podridão parda em pós-colheita de pêssegos cv. Delicioso. Já o experimento II, verificou o efeito da quitosana sobre o patógeno, avaliando o controle de *Monilinia fructicola* em condições *in vitro*. O isolado foi obtido da micoteca do laboratório de sementes e fungos fitopatogênicos da Universidade Federal de Pelotas.

#### 4.4.1 Experimento I – Indução de Resistência a podridão parda:

Os frutos de pêssegos cv. Delicioso, foram colhidos quando apresentavam-se em estágio de maturação para consumo (Firmeza de Polpa entre 11 e 8 Lbs sólidos solúveis totais de 14 a 15,5 °Brix e acidez de 4 a 6 cmol/L) (GIRARDI; LOMBRADI, 2003) Fez-se no laboratório uma seleção dos frutos, quanto ao tamanho, grau de maturação e ausência de injúrias. As unidades experimentais foram constituídas de uma bandeja de polipropileno com dimensões de 20 cm de comprimento por 10 cm de largura, contendo vinte frutos.

As soluções de quitosana para a aplicação dos tratamentos foram preparadas com material obtido em farmácia de manipulação, com 98% de pureza do produto, a qual foi diluída em solução contendo ácido acético a 1%, e então, ajustadas as concentrações com água destilada (0,25; 0,5; 1 e 2%), sendo para testemunha somente água destilada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições.

Os tratamentos foram aplicados logo após o preparo da quitosana, sendo os pêssegos imersos em solução de quitosana por 1 minuto, nas concentrações referentes aos tratamentos. Em seguida os frutos foram colocados nas bandejas e estas envolvidas com filme tipo PVC esticável e armazenadas em câmara de crescimento, por 48 horas, a  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , sem fotoperíodo.

Após 24 horas da aplicação dos tratamentos, inoculou-se *M. fructicola* ( $5.10^{-3}$  conídios/mL<sup>-1</sup>), na quantidade aproximada de 20 µml por pêssego, diretamente em lesões de 2 mm provocadas com o auxílio de uma ponteira, na região equatorial do fruto em posições opostas, sendo em seguida novamente armazenados na câmara.

Após 48 horas de armazenamento avaliou-se a perda de massa, firmeza de polpa, sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável (AT), incidência e diâmetro da lesão da podridão parda (severidade) e esporulação de *M. fructicola*. Ao término das 48 horas retirou-se amostras de frutos, dos diferentes tratamentos, para determinação de análises bioquímicas de açúcares totais e redutores, proteínas totais, fenóis e atividade das enzimas relacionadas a patogenicidade (proteínas-RPs), sendo a peroxidase, fenilalanina amônia-liase, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanase.

A perda de massa dos pêssegos foi obtida pela diferença de massa do dia da instalação do experimento e do valor encontrado na pesagem após 48 horas de armazenamento, expresso em percentual. A firmeza da polpa foi realizada com auxílio de penetrômetro TR, modelo RT – 327, ponteira de 8 mm de diâmetro. Os resultados foram expressos em libras/cm<sup>2</sup> e transformados para Newton. O teor de SST foi analisado do suco extraído dos frutos, com o auxílio de um extrator manual, e mensurado com auxílio de um refratômetro digital, sendo os valores foram expressos em °Brix. A acidez total titulável (ATT) foi determinada de 10 mL de suco dos frutos diluído em 90 mL de água destilada, seguido por titulação com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N até pH 8,1, sendo expresso em meq.100 mL<sup>-1</sup>. A avaliação da incidência de podridões foi realizada com auxílio de um estereomicroscópio binocular, sendo confirmados os sintomas de doenças e se as lesões estavam com esporulação.

Nas análises bioquímicas a quantificação de proteínas totais, foi realizada com amostras da polpa dos pêssegos maceradas em almofariz com 5ml de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5). Em seguida, o material foi centrifugado (14.000g / 10 min a 4°C) e o sobrenadante coletado. Para quantificação do conteúdo total de proteínas das amostras, foi empregado o teste de Bradford (1976). A leitura de proteínas totais foi realizada em espectrofotômetro a 630 nm, utilizando soro albumina bovina como padrão.

As concentrações de açúcares solúveis totais foram determinadas pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956). As amostras foram maceradas em almofariz contendo 5 mL de tampão fosfato 0,2M – pH 7,5, centrifugadas por 5 minutos a 10.000 g. Utilizando-se 2 uL do extrato e adicionando-se 0,5mL de fenol a 5,0% + 2,5 mL ácido sulfúrico concentrado. A leitura das amostras foram realizadas a 490 nm. A concentração de açúcares totais foi determinada através de curva padrão de glicose.

Açúcares redutores foram determinados pelo método do dinitrosalicilato (DNS) (MILLER, 1959). As amostras foram maceradas em almofariz contendo 5mL de tampão fosfato 0,2M – pH 7,5, centrifugadas por 10 minutos a 14.000 g a 4°C. Utilizando-se 0,5 µL do extrato e adicionando-se 1,0 mL de água destilada + 1,0 mL reagente DNS. A leitura das amostras foram realizadas a 540 nm. As concentrações de açúcares redutores foram calculadas em função de curva padrão de glicose.

A quantificação dos Fenóis totais foi obtida a partir do método de Bielecki; Turner (1966) e Jennings (1981). As amostras de 1 g foram maceradas em almofariz juntamente com 4 mL da solução MCA (metanol, clorofórmio, água 6/2,5/1,5) ou seja 600ml,250ml e 150ml quando para 1 litro; colocadas no ependorfe e centrifugar a 6.000 rpm a 20 °C por 20 minutos. Em seguida foi retirado o sobrenadante total, sendo o resíduo sólido restante utilizado para

realizar nova extração, adicionando mais 4 mL de MCA, agitando no vortex e centrifugando novamente a 6.000 rpm, 20 °C por 20 minutos, o mesmo foi coletado e adicionado ao primeiro sobrenadante. Posteriormente adicionou-se mais 1,5 mL de água ao extrato MCA sendo então centrifugar a 6.000 rpm, 20 °C por 15 minutos.

A partir deste extrato MCA foi utilizado 0,5 mL da parte superior do sobrenadante, onde adicionou-se 0,5 mL de água + 0,5 mL do reagente de Folin – Ciocalteau diluído 1:10, misturando em seguida em vortex e após 15 minutos, adicionou-se 5 mL do reagente alcalino (preparado de carbonato de sódio 2% em solução de hidróxido de sódio 0,1 N, novamente agitou-se em vortex e após 50 minutos foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 760 nm. Sendo o resultado expresso em mg g de tecido vegetal.

As peroxidases foram determinadas pelo método preconizado por Matsuno; Uritani (1972), a partir de uma amostra dos frutos de cada unidade experimental, colocada em um recipiente de porcelana que encontrava-se refrigerado, pois esta análise deve-se processar a temperatura inferior a 4 °C. As amostras foram maceradas com 3,0 ml tampão fosfato 0,05 M (pH 7) com mais 0,005g polivinilpirrolidona. O extrato foi acondicionado em tubos ependorfe devidamente identificados que foram levados para a centrífuga por 20 minutos, a 4 °C e a 5000 rpm. Após centrifugação, foi retirado 2,0 mL do sobrenadante e colocado em tubos de ensaios identificados, aonde encontrava-se o preparado de 3,0 mL do tampão citrato (pH 5,0) mais 0,5 ml água oxigenada a 3 % e mais 0,5 ml guaiacol 0,5 %. A solução foi agitada e colocada por 15 minutos em banho-maria 30°C e após 10 minutos em gelo para pararem as reações. Finalmente foi adicionado 0,5 mL de bisulfito de sódio, agitado e feita a leitura a 450 nm em espectrofotômetro, obtendo-se assim os valores de absorbância.

A fenilalanina amônia-liase foi quantificada através do método colorimétrico do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina, conforme metodologia descrita por Kuhn (2007), aonde se utilizou 0,5 mL do suco das frutas com mais 3,0 mL do tampão TRIS – HCl pH 8,0. Este extrato foi acondicionado em tubos ependorfe devidamente marcados que foram levados para a centrífuga por 10 minutos, a 4 °C e a 6000 rpm. Após, foi transferido uma alíquota de 200 µL para tubo de ensaio identificado, acrescentando-se mais 3,0 mL do tampão de extração. A solução foi agitada, obtendo-se assim, o extrato enzimático. Deste extrato, 1,5 mL foi transferido para outro tubo de ensaio, com mais 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina. Novamente, esta solução foi agitada para homogeneização. E após, os tubos foram incubados em banho-maria por 45 minutos a 40°C. Depois de retirados do banho-maria, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos para interromper a reação e assim em seguida realizar as leituras em espectrofotômetro a 290 nm.

Para dosagem das atividades de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase foram realizadas com adaptações da metodologia proposta por Wirth; Wolf (1992). As amostras foram maceradas em 2,0 mL de tampão acetato 100 mM (pH 5,0), com posterior centrifugação (20.000 g por 25 min, a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). O sobrenadante foi coletado e utilizado para a avaliação da atividade das enzimas. A atividade enzimática da quitinase foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (Sigma). Para determinação espectrofotométrica das atividades de  $\beta$ -1,3-glucanase nos extratos foi utilizado como substrato solução de Curdlan (Sigma).

#### 4.4.2 Experimento II - Efeito da quitosana sobre *M. fructicola* *in vitro*

O isolado do fungo *M. fructicola* foi obtido no Laboratório de Fitossanidade da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos/PR. O fungo foi repicado em placas de Petri<sup>®</sup>, contendo meio BDA, e mantidas em B.O.D. a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas.

Os tratamentos foram concentrações de quitosana, sendo em mesmas avaliadas no experimento I (0,25; 0,5; 1 e 2%). A unidade experimental foi constituída por uma placas de Petri<sup>®</sup> de vidro com 9 cm de diâmetro, em quatro repetições.

Os meios de cultura BDA (batata-dextrose- Agar) receberam a adição de quitosana nas diferentes concentrações, conforme preparação descrita no experimento I, sendo somente como diferencial que antes de serem inseridas ao meio foram esterilizada em banho-maria a  $60^{\circ}\text{C}$  por 6 horas. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, os preparados foram vertidos na quantidade de 18 mL por placa de Petri<sup>®</sup>.

Após a solidificação do meio, os discos com 10 mm de diâmetro contendo o micélio do fungo *M. fructicola* foram dispostos no centro da placa. Então, estas foram tampadas, lacradas com papel filme e acondicionadas em B.O.D. à temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação do experimento foi realizada com 24 e 48 horas, com a utilização de medição, com auxílio de um paquímetro, perpendicularmente em dois diâmetros (A e B) pré-definidos antes do crescimento micelial do fungo. O experimento foi finalizado quando o fungo *M. fructicola* atingiu a borda de uma das placas.

Os dados dos experimentos foram submetidos aos testes de Normalidade e posteriormente à análise de variância. As médias comparadas pelo teste de regressão ( $p=0,05$ ), com auxílio do *software* Assistat.

#### 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A ocorrência de podridões nos frutos de pêsego cv. Delicioso' diminuíram em função dos tratamentos com quitosana com destaque para a concentração de 0,25% de quitosana. Resultado semelhante ao obtido por Santos et al. (2008) em pêsego cv. Douradão aplicando 1% de quitosana, onde reduziu em 10% a incidência de podridão parda e nos trabalhos realizados por Li; Yu (2000) com 5,0 e 10,0 mg ml<sup>-1</sup> de quitosana, Bassetto (2006) utilização uma solução de quitosana a 1%; e Zengxin et al. (2013) obteve controle efetivo com o aumento das concentração de 0,5 a 5g L<sup>-1</sup> de quitosana.

A atividade da quitosana é conhecida também em outros frutos, como descreve Botelho et al. (2010) em maçãs 'Castel Gala' e Camili et al. (2007) em uvas 'Ítália' no controle do mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea*, utilizando 1,5 e 2% de concentração. Bem como o trabalho realizado com caqui cv. Rama Forte, por Cia et al. (2010) onde o polímero reduziu a severidade e a incidência da podridão mole, com a aplicação da solução de 1,5%, de quitosana.

Diante destes resultados é possível inferir que a quitosana apresenta potencial no controle da podridão parda em frutos de pêsego. Segundo BEGER et al. (2011). A quitosana apresenta a capacidade de desorganizar a parede celular e a membrana citoplasmática do fungo provocando o rompimento da célula, portanto a sua morte.

Com relação à firmeza de polpa, com o aumento da concentração de quitosana aplicada, promoveu a manutenção da firmeza da polpa dos frutos de pêsego (Figura 1), inversamente proporcional à incidência de podridões.

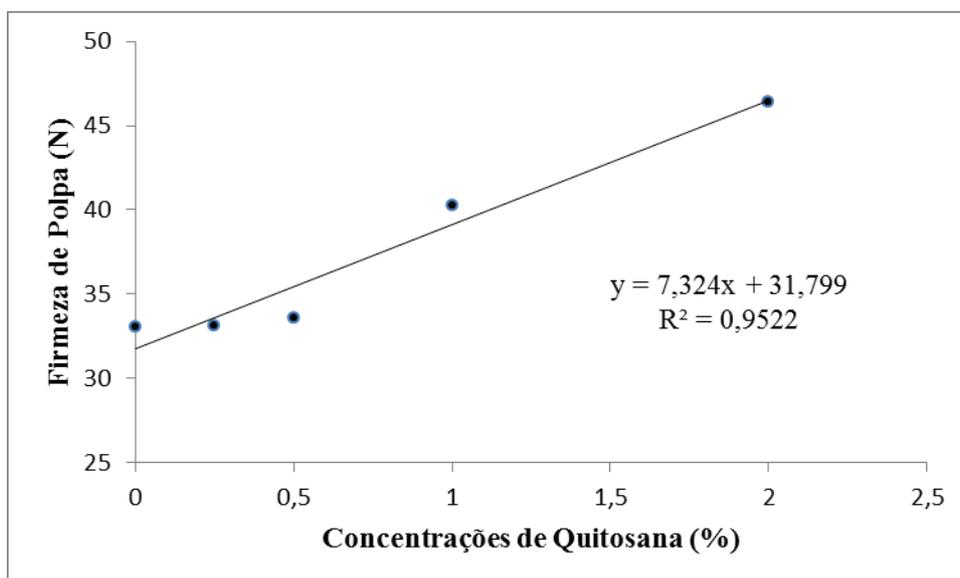


Figura 1: Firmeza de polpa de frutos de pêsego cv Delicioso', após aplicação de diferentes concentrações de quitosana em pós-colheita, e armazenados em câmara de crescimento a 26°C por 48 horas, UTFPR. Dois Vizinhos – PR, 2014.

A diminuição da firmeza está intimamente relacionada com o processo de maturação dos frutos, portanto com as transformações de substâncias que compõem a parede celular como as substâncias pécticas (CHITARRA; CHITARRA 2005).

O que possibilita inferir que a quitosana atuou diminuindo a velocidade de maturação e da respiração dos frutos. Segundo relatam Bhaskara-Reddy et al. (1998) a quitosana, possivelmente diminuiu a atividade de enzimas de desestruturação da parede, mantendo os frutos com maior firmeza de polpa.

Dados confirmados por Hongye; Ting (2000); Li; Yu (2000); Ma et al. (2013) onde os tratamentos com quitosana (5,0 e 10,0 mg ml<sup>-1</sup>) promoveram a diminuição na velocidade de maturação e na perda de firmeza em frutos de pêsego. Já El-Badawy (2012) obtiveram os mesmos resultados com a concentração de 1%.

Outro dado relevante é a correlação da manutenção da firmeza com a diminuição da incidência da podridão parda, pois conforme ocorreu o aumento das concentrações de quitosana, a incidência diminuiu e a firmeza foi mantida. Desta forma acredita-se que o fungo *M. fructicola* encontrou dificuldades para infectar e colonizar os frutos de pêsego.

Quanto ao parâmetro perda de massa os tratamentos promoveram a diminuição das perdas com o aumento das concentrações de quitosana (figura 2)

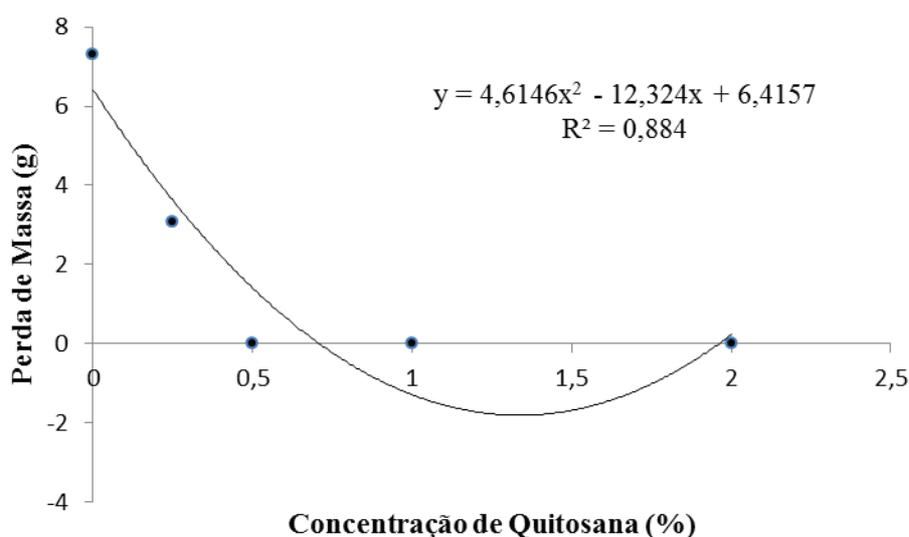


Figura 2: Perda de Massa de frutos de pêsego cv Delicioso', após aplicação de diferentes concentrações de quitosana em pós-colheita, e armazenados em câmara de crescimento a 26°C por 48 horas, UTFPR. Dois Vizinhos – PR, 2014.

A perda de massa é causada principalmente pela perda de água do fruto através da transpiração e da respiração, portanto intimamente ligada à maturação, estrutura física e química cuticular.

A diminuição da perda de massa pode ter ocorrido pela capacidade que a quitosana apresenta de formar uma camada filmogênica quando o tratamento é realizado por imersão dos frutos em solução de quitosana (Assis, 2009).

A formação do biofilme diminui as trocas gasosas por transpiração e pela respiração dos frutos. Esse resultado é de extrema relevância, pois, com a manutenção da turgescência dos frutos, os mesmos teriam tempo e qualidade maiores para a sua comercialização.

Resultados semelhantes são descritos por El-Badawy (2012) utilizando quitosana a 1% e por Ghasemnezhad et al. (2010) como as concentrações de 0,25; 0,5 e 0,75% em frutos de pêssegos.

El Hadrami (2010) relata que a quitosana além de inibir diretamente o crescimento micelial, mantém a firmeza e evita a perda de massa, e pode atuar como um indutor de defesas nos frutos estimulando a produção de compostos fenólicos e ativando genes que quando traduzidos formam proteínas RPs (ligadas a patogênese) como as peroxidases, quitinases e a  $\beta$ -1,3 glucanase (Rabeas et al., 2003; Khan et al., 2003; Bassetto, 2006).

As variáveis bioquímicas como açúcares totais; açúcares redutores, fenóis e a enzima peroxidase dos frutos de pêssego, não foram afetadas pelas diferentes concentrações de quitosana testadas no experimento (Tabela 1).

Tabela 1: **Açúcares Redutores** (UAbs min<sup>-1</sup>/mg proteína), **Açúcares Totais** (UAbs min<sup>-1</sup>/mg proteína), **Fenóis**, e **Peroxidase**, 96 horas após a aplicação de concentrações de quitosana em pós-colheita de pêssego e armazenados a 26°C por 48 horas, UTFPR. Dois Vizinhos – PR, 2014.

<b>Concentração de quitosana (%)</b>	<b>Açúcares Redutores</b> UAbs min <sup>-1</sup> /mg proteína	<b>Açúcares Totais</b> UAbs min <sup>-1</sup> /mg proteína	<b>Fenóis</b> (UAbs min <sup>-1</sup> /mg proteína),	<b>Peroxidase</b> (unidade enzimática.minuto <sup>-1</sup> ),
0,00	0.00362 <sup>ns</sup>	91.25682 <sup>ns</sup>	0,465543 <sup>ns</sup>	2,290278 <sup>ns</sup>
0,25	0.00490	104.37340	0,4618	2,6252
0,50	0.00324	97.09581	0,470553	2,095932
1,00	0.00366	100.04270	0,492439	1,895237
2,00	0.00438	76.09888	0,543239	2,137323

<sup>ns</sup> – não significativo pelo teste de análise de variância ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Há não observação de diferenças entre os tratamentos pode estar relacionado a alta atividade metabólica dos frutos e curto período de armazenamento.

Os açúcares totais (glicose, frutose, maltose e sacarose) e os redutores (glicose, frutose, maltose) são biomoléculas diretamente envolvidas no metabolismo primário vegetal, constituindo uma importante fonte de energia, que pode sustentar a produção de compostos fenólicos através da rota de dos fenilpropanóides. Esta rota esta relacionada com a produção de ligninas, responsável pela formação de estruturas nas paredes celulares que dificultam a penetração do fungo.

Da mesma forma que os açúcares totais e os redutores os níveis de fenóis e peroxidases não foram alterados significativamente com as concentrações de quitosana quando aplicada em pêssego por imersão. Segundo Silva et al. (2008) os compostos fenólicos são moléculas relacionadas com diversas funções, no entanto uma das principais funções é a defesa do vegetal frente a patógenos e insetos, pois são compostos com característica tóxicas. As peroxidases são enzimas que desempenham diversas funções, como a síntese de ligninas, morte celular e ação direta sobre o patógeno.

Segundo Taiz; Zeiger (2006) o peróxido de hidrogênio promove a ligação cruzadas entre proteínas, o que torna a parede celular mais rígida e resistente. Porém autores descrevem dados conflitantes relacionados com as peroxidases, Mazaro (2007); Zengxin et al. (2013) observaram que a atividade das peroxidases foram estimuladas pelo uso da quitosana, já Felipini; Di Piero (2008) citam que a imersão de maçãs em quitosana não afetou significativamente a atividade de peroxidases. O que demonstra a dificuldade de relacionar a peroxidase com as defesas vegetal, principalmente pela multi função que esta enzima apresenta.

No entanto as defesas dos vegetais também estão ligadas com a ativação de outras rotas e genes relacionados com a produção de enzimas hidrolíticas. Segundo Zengxin et al. (2013) a incidência de podridão parda foi diminuída e a atividade das enzimas quitinases e glucanases foram aumentadas 24 e 48 horas após o tratamento com quitosana ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ). Já El Ghaouth et al. (1992) citam que em frutos de morango, a quitosana teve efeito na diminuição das podridões, no entanto, não estimulou a atividade enzimática de quitinases e glucanases.

No referido trabalho os teores de proteínas, atividade da FAL, quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanase foram alteradas pelos tratamentos com quitosana, sendo pronunciada após 48 horas (tabela 02).

Tabela 2 Concentração de proteínas (mg.g tecido<sup>-1</sup>), FAL (UAbs.µg prot.mL<sup>-1</sup>), quitinase (Unid.enz./min./mg.proteína) β-1,3 Glucanase (Unid.enz./min./mg.proteína) presentes nos extratos de pêssegos tratados com quatro concentrações de quitosana e avaliada no término de 48 hs. UTFPR. Dois Vizinhos – PR, 2014.

Tratamentos	Avaliações bioquímicas enzimáticas				
	48 horas				Média
<b>Proteínas</b>	UAbs min <sup>-1</sup> /mg proteína				
Testemunha	2,3	2,2	2,2	2,5	2,3b
Quitosana (0,25 mM)	2,8	2,8	2,3	2,6	2,6a
Quitosana (0,5 mM)	2,0	2,2	2,1	2,1	2,1bc
Quitosana (1,0 mM)	1,9	1,9	1,9	1,8	1,9c
Quitosana (2,0 mM)	2,1	2,0	2,2	2,2	2,1bc
<b>FAL</b>	UAbs min <sup>-1</sup> /mg proteína				
Testemunha	0,0002	0,00018	0,00019	0,00015	0,00024c
Quitosana (0,25 mM)	0,00012	0,00026	0,00033	0,00018	0,0003c
Quitosana (0,5 mM)	0,001	0,00021	0,00023	0,0003	0,00031b
Quitosana (1,0 mM)	0,00032	0,0005	0,00033	0,00042	0,00038b
Quitosana (2,0 mM)	0,0005	0,0006	0,00043	0,0004	0,00051a
<b>Quitinase</b>	Unid.enz./min./mg.proteína				
Testemunha	0,0012	0,0003	0,00015	0,0004	0,0003b
Quitosana (0,25 mM)	0,002	0,00007	0,0008	0,0006	0,0003b
Quitosana (0,5 mM)	0,0003	0,00008	0,0004	0,00008	0,0003b
Quitosana (1,0 mM)	0,0002	0,0001	0,00014	0,0002	0,0003a
Quitosana (2,0 mM)	0,001	0,0001	0,0005	0,00015	0,0004a
<b>β-1,3 Glucanase</b>	Unid.enz./min./mg.proteína				

Testemunha	0,0022	0,0022	0,0032	0,0012	0,0020c
Quitosana (0,25 mM)	0,0013	0,0024	0,0015	0,0023	0,0024c
Quitosana (0,5 mM)	0,0018	0,0016	0,0024	0,0020	0,0029c
Quitosana (1,0 mM)	0,0051	0,0031	0,0040	0,011	0,0038b
Quitosana (2,0 mM)	0,0077	0,0034	0,0050	0,0038	0,0056a

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). ns=não significativo.

Os níveis de proteínas foram alterados significativamente pelos tratamentos, apresentando uma elevação com o aumento da concentração da quitosana. O que sugere uma relação com a ativação dos genes de defesas, responsáveis pela síntese das enzimas FAL e das RPs, quitinases e  $\beta$ -1,3 Glucanase, pois sendo enzimas apresentam estrutura molecular proteica.

Segundo Freddo (2012) maiores teores protéicos podem indicar que houve um maior níveis proteicos pela ação da quitosana. Bem como o observado por Kuhn (2007) tratando feijoeiro com acibenzolar-S-metil (ASM), onde o indutor promoveu o aumento dos níveis de proteínas, indicando a ativação dos genes de defesa e outras proteínas vegetais.

A hipótese de indução de resistência é descrita por vários autores em diferentes frutos. De acordo Pascholatti (2011), as proteínas-RP (proteínas relacionadas à patogênese), podem ser produzidas por tecidos em respostas a ação de agentes indutores endógenos e exógenos.

O aumento observado nos níveis da FAL em todas as concentrações indica que a quitosana atua na rota dos fenilpropanóides, e essa resposta pode ser relacionada com a síntese de compostos fenólicos como as ligninas que estão intimamente relacionadas com o fortalecimento das paredes celulares em resposta a infecção do fungo *M. fructicola* causador da podridão parda.

A rota do ácido chiquímico, ou também denominada dos fenilpropanóides é a principal via de formação de compostos fenólicos, sendo que a FAL é a enzima chave na síntese destes compostos. A FAL atua na desaminação da L-fenilalanina, formando ácido trans-cinâmico e amônia. O ácido trans-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico), os quais estão

presentes na formação de ésteres, cumarinas, flavonóides e ligninas (CAVALCANTI et al., 2005).

Neste trabalho os tratamentos com quitosana, promoveram o aumento na atividade das quitinases e da  $\beta$ -1,3 glucanase, indicando que essa molécula atua na indução de resistência ativando as proteínas relacionadas a patogenicidade.

Resultados semelhantes são relatados por Zengxin et al. (2013) em frutos de pêsego, onde a quitosana atuou como molécula indutora, ativando as respostas de defesa nos frutos expressando aumento dos níveis de quitinases e da  $\beta$ -1,3 glucanase. Outros trabalhos já demonstraram a ação de quitosana sobre a indução dessas enzimas hidrolíticas em morangos, como os descrito por Mazaro et al. (2008; 2012) onde a quitosana em diferentes concentrações ativou as quitinases e glucanases. Ainda, outros autores relatam que o indutor ativou a proteínas PRs em frutos de pêra (XIANGHONG et al., 2010), de mangas (PONGPHEN et al., 2007) e em uvas observado por Aziz et al, (2006).

Esse aumento pode ser relacionado com o controle da podridão já que a parede celular de muitos fungos são formadas por polissacarídeos quitina e  $\beta$ -1,3-glucano, que são substratos para a quitinase e a  $\beta$ -1,3-glucanase, respectivamente (WESSELS e SIETSMA, 1981) sendo, portanto *M. fructicola* causador da podridão parda controlado através da degradação da parede celular provocado a sua morte.

Em relação aos dados obtidos no experimento *in vitro*, observou-se que, a solução de quitosana, nas maiores concentrações (1 e 2%), suprimiu o crescimento micelial *M. fructicola*, sendo o tratamento testemunha o que apresentou o maior crescimento micelial (Figura 2).

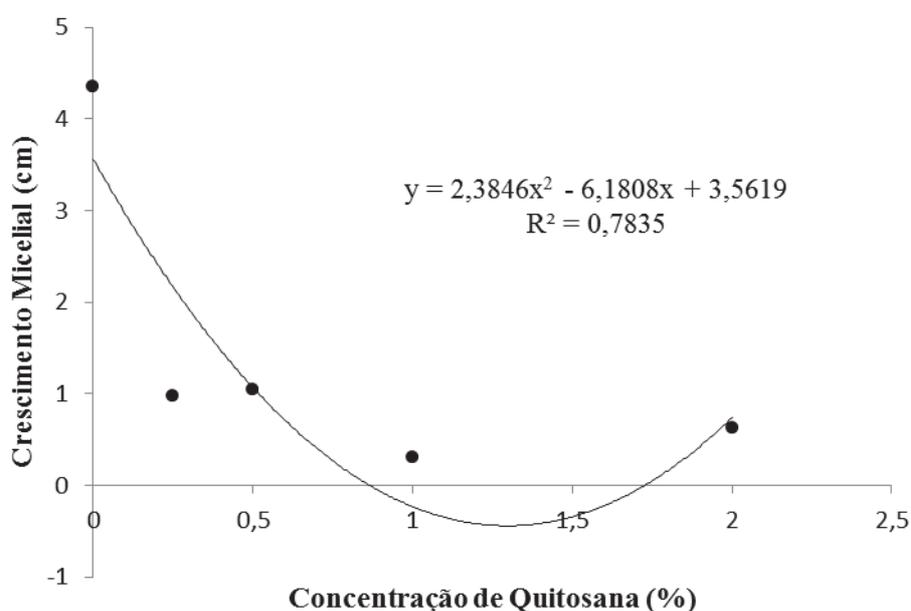


Figura 3: Crescimento micelial (cm) do fungo *Monilinia fructicola* em meio de cultura com adição de diferentes concentrações de quitosana (0, 0,25, 0,5, 1, 2%) armazenados em câmara de crescimento a 26°C por 48 horas, UTFPR. Dois Vizinhos – PR, 2014.

Esses resultados confirmam a atividade fungistática ou fungicida que outros autores relatam quando utilizada a quitosana em experimentos *in vitro*. Maia (2009) observou que a quitosana inibiu o crescimento em 37 % e 56 % o crescimento micelial de *Botryosphaeria* sp. e *Glomerella cingulata*, e Bautista-Baños et al. (2003) sob o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* utilizando soluções com 2 e 3 % e o controle da doença antracnose em mamão com 1,5% de quitosana.

Cia et al. (2010) relatam que a quitosana inibe completamente o crescimento micelial de *R. stolonifer*, em concentração tão baixa quanto 0,5%. Ainda é relatado por Sattolo et al. (2010) o controle do fungo de madeira em *Pinus* sp tratadas com quitosana.

Em uma avaliação conjunta dos dados, permite afirmar que o emprego de quitosana quando aplicado em pós-colheita, reduz a podridão de frutos, e que tal resultado, está relacionado ao processo de indução de resistência ativando as proteínas-RPs e também ação direta da quitosana sobre *M. fructicola*.

#### 4.6 CONCLUSÕES

Quitosana atua na indução de resistência a podridão parda em pós-colheita de pêssegos cv. “delicioso” ativando as enzimas FAL, quitinase e  $\beta$  1,3-glucanses.,

A quitosana atua no controle de *M. fructicola* *in vitro* com ação fungistática.

#### REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, E. M. B; OLIVEIRA, E. N. A; SANTOS, D. C; ALMEIDA, F. A. C; GOME, J. P. Comportamento dos açúcares redutores em manga in natura armazenada em atmosfera modificada. **Tecnol. & Ciên. Agropec.** João Pessoa, v.4, n.3, p.27-31, set. 2010

ANDRADE, E. R. Doenças do pessegueiro e da ameixeira e seu controle no Estado de Santa Catarina. Florianópolis: **Epagri**, 52p, 1995. (EPAGRI. Boletim técnico, 71).

ASSIS, A. S. **Produção e aracterização do biofilme de quitosana como envoltório protetor em morangos**. Tese f. 88, Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2009.

BASSETTO E. **Quantificação de danos ao longo da cadeia produtiva de pêssegos e avaliação de métodos alternativos de controle de doenças pós-colheita**. Tese de Doutorado. Piracicaba, ESALQ, USP, 2006

BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C.L. Effects of chitosan and extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protec**, London, v.22, n. 9, p. 1087-1092, 2003.

BERGER, L. R. R; Stamford, T. C. M; Stamford, N. P.. PERSPECTIVAS PARA O USO DA QUITOSANA NA AGRICULTURA. **Rev Iberoamericana de Polím** Vol. 12(4), Agosto de 2011.

BHASKARA-REDDY, B.M.V.; AIT BARKA, E.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Biocontrol Sci Tech**, New York, v.8, p.33-43, 1998.

BIELESKI, R.L; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extratcts by thin-layer electrophoresis and chomatograghy. **Anal Biochem**, Orlando, v.17, p.278-293, 1966.

BOTELHO, R.V.; MAIA, A.J.; RICKLI, E.H.; LEITE, C.D.; FARIA, C.M.D.R. Quitosana no controle de *Penicillium* sp.na pós-colheita de maçãs. **Rev Bras Agroecol**, v.5, n.2, p. 200-206, 2010.

CAMILI, E.C.; BENATO, E.A.; PASCHOLATI, S.F.; CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*. **Summa Phytopatol**, v.33, n.3, p. 215-221, 2007.

CAMPOS, R. P; KWIATKOWSKI, A; CLEMENTE, E. Post-harvest conservation of organic strawberries coated with cassava starch and chitosan. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 58, n.5, p. 554-560, set/out, 2011

CASALS A, P.A.G. ELMER B, I. VINAS ~ C, N. TEIXIDÓA, M. SISQUELLAA, J. Usall. The combination of curing with either chitosan or *Bacillus subtilis* CPA-8 tocontrol brown rot infections caused by *Monilinia fructicola*. Postharvest **Biol Tech** 64 (2012) 126–132 0925-

5214/\$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.doi:10.1016/j.postharvbio.2011.06.004

CAVALCANTI, L.S.; PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOALATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ. 263 p. 2005.**

CHIEN, Z.; SILVA, H.; KLESSIG, D.F. Coating citrus (Murcott tangor) fruit with low molecular weight chitosan increases post harvest quality and shelflife. **Food Chemistry**, v.100, p. 1160-1164, 2006.

CHITARRA M. I., CHITARRA A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; BENATO, E.A. Indução de resistência no manejo de doenças pós-colheita. P. 245-280. In: RODRIGUES, F.Á.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Editora UFV, 2007, 339p.

CIA, P; BENATO, E. A; PASCHOLATI, S. F; GARCIA, E. L. Quitosana no controle pós-colheita da podridão mole em caqui ‘rama forte. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p745-752, 2010

DA SILVA DB, BOBATO TR, BETTONI MM, FABBRIN EG dos, MÓGOR AF. 2012. Uso de quitosana na produção de morangueiro orgânico. **Hort Bras** 30: S2811-S2815.

DE CAPDEVILLE, G.; WILSON, C.L.; BEER, S.V.; AIST, J.R. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvest ‘Red Delicious’ apple fruit. **Phytopathol**, v.92, p. 900-908, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal Biochem**, Orlando, v.28, p.350-356, 1956.

EL HADRAMI, A; ADAM, L. R; EL HADRAMI, I; DAAYF, F. Chitosan in plant protection (review). **Mar Drugs** 8:968-987. Everest Biotech. Indian Patent 2938/ CHE / 2010.

EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathol**, v.82, n.4, p. 398-402, 1992.

EL-BADAWY, H. E. M. Effect of Chitosan and Calcium Chloride Spraying on Fruits Quality of Florida Prince Peach Under Cold Storage. *Research J Agricul Biol Sci*; Mar/Apr2012, Vol. 8 Issue 2, p272

FELIPINI, R.B.; DI PIERO, R.M. Redução da severidade da podridão-amarga de maçã em pós-colheita pela imersão de frutos em quitosana. *Pesqu Agropecu Bras*, v.44, n.12, p. 1591-1597, 2008.

FREDDO, A. R. **Quitosana in vitro e no tratamento de sementes de eucalipto e acácia-negra no controle de *Rhizoctonia solani* e no desenvolvimento inicial das plântulas.** Dissertação, 78 f. – 2012.

GARRIDO, L. R; SÔNEGO, O. R. Sistema de Produção de Pêssego de Mesa na Região da Serra Gaúcha. Doenças fúngicas e bacterianas do pessegueiro. **Embrapa Uva e Vinho Sistemas de Produção**, 3 ISSN 1678-8761 Versão Eletrônica Jan./2003. <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/PessegodeMesaRegiaoSerraGaucha/doenca.htm>. 23/02/14.

GHASEMNEZHAD, M; M. A. SHIRI, AND M. SANAVI. Effect of chitosan coatings on some quality indices of apricot (*Prunus armeniaca* L.) during cold storage Caspian J. **Env. Sci.** 2010, Vol. 8 No.1 pp. 25~33.

GIRARDI, C. L; ROMBALDI, C. V. Sistema de Produção de Pêssego de Mesa na Região da Serra Gaúcha. **Embrapa Uva e Vinho Sistema de Produção**, 3 ISSN 1678-8761 Versão Eletrônica Jan/2003. <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pessego/PessegodeMesaRegiaoSerraGaucha/manejo.htm>. acesso: 07/10/14.

GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **J. Phytopathol**, Berlin, v.144, p.449-454, 1996.

HONGYE LI; TING YU. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. **J Sci Food Agricul** p. 81(2):269 – 274, 2000.

JENNINGS, A.C. The determination al dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. **Anal Biochem**, Orlando, v.118, p.396-398, 1991.

KHAN W, PRITHIVIRAJ B, SMITH DL, J. **Plant Physiol.**, 160, 859

KLUGE, R. A., NACHTIGAL, J.C.; FACHINELLO, J.C.; BILHALVA, A.B. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado**. Pelotas: UFPel, 2002. 214 p.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007. 140p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de glicolinas em soja (*Glycine max*)**. Piracicaba, 2002, 107p. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

MA, Z; YANG, L;YAN, H; KENNEDY, J. F; MENG, X. Chitosan and oligochitosan enhance the resistance of peach fruit to brown rot. **Carbohydr Polym**. Apr 15;94(1):272-7. 2013.

MAIA, A. J. **Efeito da quitosana no controle de doenças e no desenvolvimento de plântulas de videira (*Vitis vinifera*)**. Dissertação de mestrado apresentado a Universidade Estadual do Centro-Oeste, do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Produção Vegetal, 2009.

MARTINS, M.C.; LOURENÇO, S.A.; GUTIERREZ, A.S.D.; JACOMINO, A.P.; AMORIM, L. Quantificação de danos pós-colheita em pêssegos no mercado atacadista de São Paulo. **Fitopatol Bras**, Lavras, v.31, n.1, p.5-10, 2006.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant Cell Physiol**, Tokio, v.23, p.1091-1101, 1972.

MAZARO, S. M; DESCHAMPS, C; GOUVEA, A; CITADIN, I; JUNIOR, A.. W. Indução de resistência a doenças foliares e de flores em morangueiro por quitosana e acibenzolar-s-metil. **R. Bras. Agrociência**, Pelotas, v.18 n. 2-4, p.143-150, abr-jun, 2012.

MAZARO, S.M.; CITADIN, I.; GOUVÊA, A.; LUCKMANN, D.; GUIMARÃES, S.S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de Pitangueira, **Ciêñ Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1824-1829, 2008.

MAZARO, S.M.; DESCHAMPS, C.; DE MIO, L.L.M.; BIASI, L.A.; GOUVEA, A.; SAUTTER, C.K. Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-S-metil. **Rev Bras Fruticul**, v.30, n.1, p. 185-190, 2008.

MAZARO, S. M; GOUVEA, A; JUNIOR, A. W; CITADIN, I. Enzimas Associadas à Indução de Resistência em Morangueiro pelo Uso de Quitosana e Acibenzolar-S-Metil. **Rev Ciên Exat Nat**, Vol.14, nº 1, Jan/Jun 2012

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem**, Washington, v.31, p.426-428, 1959.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do Parasitismo: Como as Plantas se Defendem dos Patógenos. In: Manual de Fitopatologia I: Princípios e Conceitos. Cap. 35. São Paulo: **Agronômica Ceres**, p. 593-636, 2011.

PONGPHEN JITAREERAT A, SUDKANUENG PAUMCHAI B , SIRICHAI KANLAYANARAT B; SOMSIRI SANGCHOTE. Effect of chitosan on ripening, enzymatic activity, and disease development in mango (*mangifera indica*) fruit. New Zealand **J Crop Horticult Sci**, 2007, Vol. 35.

RABEA, EI, BADAWY, MET, STEVENS CV, SMAGGHE G, STEURBAUT W, Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. **Biomacromolecules**, 4(6), 1457 (2003)

RODRIGUES, A.A.C. ; NETO, E.B.; COELHO, R.S.B. Indução de Resistência a *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* em Caupi: Eficiência de Indutores Abióticos e Atividade Enzimática Elicitada. **Fitopatol Bras**, v. 31, n.5, p. 492-499, 2006.

ROMANAZZI, G.; FELIZIANI, E.; SANTINI, M.; LANDI, L. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, v.75, n.1, p. 24-27, 2013.

SANTOS, C. A. A; JOSALBA VIDIGAL DE CASTRO, ANDRESSA ARAUJO PICOLI, GLAUCO DE SOUZA ROLIM. Uso de quitosana e embalagem plástica na conservação pós-colheita de pêssegos ‘douradão’. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 1, p. 088-093, Março 2008.

SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. DERAL - Departamento de Economia Rural Fruticultura - **Análise da Conjuntura Agropecuária**, Dezembro de 2012.

SILVA, R.A.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. **EMBRAPA Agrobiologia**, Documentos 250, Seropédica, 2008, 49p.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3° ed. Porto Alegre, Artmed. 2006.

TANAKA, M.A.S.; BETTI, J.A.; KIMATI, H. Doenças do morangueiro. P. 489-499. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. Manual de Fitopatologia 2: **Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 4 ed., 2005, 651p.

TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in posharvest horticultural crops: a brief review. **Posth Biol Tech**, Amsterdam, v.32, p.1-13. 2004.

VELICKOVA, E.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S.; ALVES, V.D.; MOLDÃO-MARTINS, M. Impact of chitosan-bees waxedible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv. Camarosa) under commercial storage conditions. **Food SciTech**, v.52, n.1, p. 80-92, 2013.

WANG, S.Y.; GAO, H.; Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants, antioxidant enzyme system, and postharvest fruit quality of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Food Sci Tech**, v.52, n.1, p. 71-79, 2013.

WESSELS, J.G.H.; SIETSMA, J.H. Fungal cell walls: a survey. In: TANNER, W.; FA LOEWUS, F.A. (Eds.). **EncyclPlant Physiol: Plant Carbohyd**, v.138. Berlin: Springer, 1981. P.352-394.

XIANGHONG MENG A,B, LINGYU YANG A,1, JOHN F. KENNEDY C, SHIPING TIAN.Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. **Carbohyd Polym** 81 (2010) 70–75

ZENGXIN,M; YANG L, YAN H, KENNEDY JF, MENG X. Chitosan and oligochitosan enhance the resistance of peach fruit to brown rot. **Carbohydr Polym**. 2013 Apr 15;94(1):272-7. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.01.012. Epub 2013 Jan 16.

ZHANG, D.; QUANTICK, P.C. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. **J Horticul Sci Biotech**, Ashford, v.73, p.763-767, 1998.

ZHANG, D.; QUANTIK, P.C. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. Postharvest **Biol Tech**, v.12, p. 195-202, 1



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos realizados com a quitosana na indução de resistência a podridão amarga nas maçãs, ao mofo cinzento em morangos e a podridão parda em pêssegos permite afirmar que esta molécula atua como um indutor das defesas dos frutos. Apresentando resultados na atividade de síntese de proteínas RPs, como as peroxidases, quitinases e  $\beta$  1,3-glucanase, além da enzima chave do metabolismo dos fenilpropanóides a FAL. No entanto diante dos resultados foi possível verificar que diferentes espécies de plantas, respondem de forma também diferente aos estímulos promovidos pela quitosana, podendo ativar certos tipos de proteína RP em uma espécie e em outras, porém pode outras respostas, como a ativação da síntese de compostos fenólicos.

Além da ativação das defesas, o indutor apresentou efeitos diretos *in vitro* sobre os patógenos causadores das podridões.

Contudo, novos trabalhos devem ser organizados considerando o tempo de tratamento, o momento da coleta de material para as análises bioquímicas e outras variáveis, a fim de verificar o comportamento fisiológico (enzimático) do material ao longo do experimento, bem com o avanço para a identificação dos genes responsáveis pelas respostas defensivas dos frutos.