

Efeito das moléculas Phenyl se Citronellal e o Phenyl S citral na neutralização de enzimas ligadas a patogenicidade de *Colletotrichum lindemuthianum*

Effect of Phenyl Molecules Citronelal and Phenyl S Citral in the neutralization of enzymes linked to *Colletotrichum lindemuthianum* pathogenicity

DOI:10.34117/bjdv8n10-216

Recebimento dos originais: 20/09/2022

Aceitação para publicação: 19/10/2022

Mario Fernando Pinel-Alvarez

Doutorando em Fitossanidade

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, S/N, Campus Universitário Capão do Leão

E-mail: mariopinel.agro@gmail.com

Cielo Pamela Machaca-Calsin

Mestra em Fitossanidade

Instituição: CITE Agroindustrial

Endereço: Majes, Arequipa - Perú

E-mail: machacacalsinpamela@gmail.com

Alice Beatriz Peña-Medina

Doutoranda em Fitossanidade

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, S/N, Campus Universitário Capão do Leão

E-mail: ecilabeatriz@gmail.com

Cândida Renata Jacobsen de Farias

Doutora em Fitossanidade

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, S/N, Campus Universitário Capão do Leão

E-mail: jacobsencandida@gmail.com

RESUMO

Dentre as doenças mais importantes que afetam a cultura do feijão encontra-se o *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib., agente causal da antracnose, que ocasiona danos econômicos importantes aos produtores em todo o mundo. Acredita-se que enzimas hidrolíticas secretadas por *C. lindemuthianum* durante a patogênese favoreçam a penetração, a colonização, a obtenção de nutrientes e/ou contribuam para interferir nas reações de defesa do hospedeiro. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade enzimática ligadas à patogenicidade *in vitro*, usando meios sólidos específicos tratados com moléculas com potencial antimicrobiano: Phenyl S citral e Phenyl Se Citronelal em três concentrações (g 100 mL⁻¹) 0.25%, 0.0625% e 0.125%. Avaliando a presença de halos de degradação das enzimas amilase, lipase, protease, pectinase, que quando positivos eram mensurados para realização do cálculo de Índice

Enzimático (IE). A produção enzimática, o isolado *C. lindemuthianum*, raça 86, apresentaram performances em quatro das cinco enzimas em estudo, sendo a maior atividade nas enzimas lipase e protease. Concluindo-se que as moléculas testadas são promissoras, já que estão associadas com a redução da atividade de enzimas ligadas a patogenicidade do *Colletotrichum lindemuthianum*.

Palavras-chave: Antracnose, patogênese, atividade enzimática, enzimas hidrolíticas.

ABSTRACT

Among the most important diseases that affect the bean crop is *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib., the causal agent of anthracnose, which causes significant economic damage to producers worldwide. It's believed that hydrolytic enzymes secreted by *C. lindemuthianum* during pathogenesis favor penetration, colonization, obtaining nutrients and/or contribute to interfering with host defense reactions. Thus, this work aimed to evaluate the enzymatic activity linked to pathogenicity in vitro, using specific solid media treated with molecules with antimicrobial potential: Phenyl S citral and Phenyl Se Citronelal in three concentrations (g 100 mL⁻¹) 0.25%, 0.0625% and 0.125%. Evaluating the presence of halos of degradation of amylase, lipase, protease, pectinase enzymes, which when positive were measured to calculate the Enzyme Index (IE). Enzyme production, the isolate *C. lindemuthianum* showed performances in four of the five enzymes under study, with the highest activity in lipase and protease enzymes. In conclusion, the molecules tested are promising, since they are associated with the reduction of the activity of enzymes linked to the pathogenicity of *Colletotrichum lindemuthianum*.

Keywords: Anthracnose, pathogenesis, enzymatic activity, hydrolytic enzymes.

1 INTRODUÇÃO

Entre os fatores que afetam a produtividade da cultura, destacam os causados pelas doenças, em sua maioria provocados por fungos fitopatogênicos, dentro deste grande grupo, destaca-se o *C. lindemuthianum* (Sacc & Magnus) Lams.-Scrib, agente etiológico da antracnose do feijão comum, sendo uma doença de grande importância econômica (PADDER et al., 2016), a principal doença que acomete a cultura (GAVIRIA-HERNÁNDEZ et al., 2020). Em regiões onde as condições climáticas são favoráveis: temperaturas frias 13°C e 26°C, alta umidade relativa; acima de 91% e precipitação, podendo ocasionar até 100% de perdas na cultura (BALARDIM, JAROSZ E KELLY, 1997; FERNÁNDEZ et al., 2000).

A Antracnose é uma doença que pode afetar todos os estádios fenológicos da cultura do feijão e todas as partes da planta. No entanto, a patogenicidade do fungo está relacionada com o mecanismo de ação adotado pelo patógeno, como a produção de toxinas e enzimas. As enzimas produzidas pelos fungos fitopatogênicos cumprem uma

importante função na infecção do hospedeiro (CARDOSO et al., 2009). O processo de infecção dependera da potencialidade do fungo de produzirem enzimas extracelulares capazes de degradar compostos produzidos pela planta, sendo que o perfil enzimático é inter ou intraespecificamente variável, facilitando a disseminação do patógeno nos tecidos dos hospedeiros (KIKOT et al., 2009). Dentre as enzimas que formam parte do arsenal enzimático no processo de patogênese, destacam: pectinases, lipase, cutinases, celulases, amilase, proteases, entre outras (LIMA FILHO et al., 2003; DI PIERO E PASCHOLATI, 2005).

Estas enzimas hidrolíticas extracelulares são conhecidas como degradantes de polímeros estruturais das paredes e membranas celulares “*Enzimas degradadoras da parede celular*” facilitando a disseminação do patógeno nos tecidos dos hospedeiros (KIKOT et al., 2009). Podem ser produzidas em grande quantidade durante a infecção, facilitando a colonização, penetração, extração de nutrientes e ainda afetar as reações de defesa da planta (PASCOLATTI, 1995).

Para o controle ou manejo de doenças em plantas, pesquisas vem sendo realizadas procurando alternativas eficientes que substituam o uso indiscriminado de produtos químicos, pretendendo evitar danos ao ambiente, problemas de saúde humana, e beneficiar na variabilidade do patógeno levando ao surgimento de raças que apresentaram resistência aos produtos utilizados (KUHN, 2007).

Produtos derivados de vegetais, são intensivamente estudados quanto à eficácia no controle alternativo de doenças de plantas, para uso em sistemas de produção pretendendo a redução do uso de agrotóxicos (CARNEIRO, 2005; FIORI et al., 2000).

Dentre as plantas medicinais e aromáticas amplamente utilizadas, encontra-se a citronela (*Cymbopogon sp*), planta originada do Ceilão e da Índia. O gênero *Cymbopogon* pertence à família Poaceae, constituído de oitenta e cinco espécies. A citronela possui na sua composição alto teor de citronelal, geraniol e citronelal, destacando entre eles citronelal. Apresentando atividade anti-séptica, inibindo o crescimento de fungos fitopatogênicos e bactérias. A citronela é utilizada como material básico para a síntese de importantes compostos bioativos (CRAVEIRO et al., 1981; CASTRO et al., 2010). E também o capim limão (*Cymbopogon citratus (DC.) Stapf*) gramínea perene de origem asiática (Índia), o qual tem sido amplamente estudado, pois apresenta atividade antifúngica, antibacteriana, anti-helmíntica, inseticida, diurética e anticarcinogênica (CASTRO et al., 2010).

Compostos do metabolismo secundário presentes em extrato de citronela e citral podem desempenhar funções importantes no controle de fitopatógenos por meio da ação antimicrobiana direta ou por meio da inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos (OLANDA, 2014). É com base nesses entraves, técnicas para a síntese e modificação química de compostos naturais vêm sendo aplicados para obtenção de substâncias com propriedades benéficas em diversas áreas, onde estudos relatam no uso e controle contra microrganismos. A modificação destes componentes pode permitir a melhoria das atividades biológicas apresentadas pelas moléculas naturais e não modificadas (CHAKRAVORTY, 2012). Estes compostos podem ser usados contra um amplo espectro de espécies de microrganismos (ANTUNES e CAVACOB, 2010).

Além disso, a adição de um elemento químico sintético à estrutura do componente majoritário de um óleo essencial pode aumentar seu desempenho. Neste caso o selênio (Se), utilizado como elemento adicionado a estes compostos, não é considerado um nutriente essencial para as plantas superiores, mas desempenha um papel benéfico, especialmente em reduzir estresses abióticos e retardar o processo de senescência nas plantas, entre outros a mais (OLIVEIRA et al., 2016; MONDO et al., 2016; RUFINO et al., 2017) e o (S) enxofre, elemento que se sabe apresenta importantes qualidades para a biossíntese de compostos antimicrobianos responsáveis pela proteção das plantas ao ataque de patógenos e se atribui pode brindar uma maior resistência a diferentes doenças (FORNEY et al., 2010; BAYOUMI et al., 2018).

Este trabalho teve como objetivos avaliar a produção de atividade enzimática extracelulares produzidas pelo agente causal da antracnose *C. lindemuthianum* *C. lindemuthianum* raça 86, quanto à patogenicidade, mediante o uso de meios específico tratados com moléculas que possuem propriedades antimicrobianas Phenyl S citral e Phenyl Se Citronelal.

2 METODOLOGIA E MATERIAIS

Para avaliação da atividade enzimática foram utilizadas as seguintes doses das moléculas (0,0625%, 0,125%, 0,25%). Para isso, uma alíquota de 100µL das diferentes moléculas e concentrações foi misturada junto ao meio BDA fundido e homogeneizado, em seguida vertidos 10 mL em placas de Petri, sendo utilizado cinco repetição por tratamento. Como testemunha foi utilizado o fungo crescido em meio sem adição de molécula e Dimetilsulfóxido (DMSO). Para isso discos (5mm de diâmetro) do isolado de

C. lindemuthianum foram repicados para placas de Petri contendo cada um dos meios descritos para cada enzima, nos itens a continuação.

Para a avaliação da atividade da enzima amilase *in vitro* foi utilizado (6 g de NaNO₃; 1,5 g de KH₂PO₄; 0,5 g de KCl; 0,5 g de MgSO₄. 7H₂O; 0,01 g de FeSO₄; 0,01 g de ZnSO₄ e 15 g de Agar, 10 g de amido, 1 L de água destilada, pH: 6,8). Após o período de incubação, foi adicionado a cada placa de Petri 2 mL de solução lugol sobre a superfície do meio de cultura. Após 10 minutos, foi descartada a solução lugol, e no caso de atividade amilolítica, foi observado a formação de um halo ao redor da colônia em contraste ao meio escurecido.

Para a atividade da enzima celulase *in vitro* os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio ágar carboximetilcelulose 1% (1,0 g de KH₂PO₄; 0,5 g de (NH₄)₂SO₄; 0,5 g de asparagina, 0,5 g de KCl; 0,2 g de MgSO₄. 7H₂O; 0,1 g de CaCl₂; 0,5 g de extrato de levedura; 10 g de carboximetilcelulose, 20 g de agar-agar, 1 L de água estilada), conforme metodologia descrita por Pereira (2009). As placas com as colônias foram incubadas em BOD a 25 C, e após 5 dias, as placas com os isolados foram submetidas a choque térmico por 16 horas a 50°C.

Posteriormente, foi adicionado 10 mL de solução vermelho de congo (2,5 g/L) em tampão Tris HCl 0,1M, pH 8 por 30 minutos. Passado o tempo, a solução foi descartada e as colônias forma lavadas com 5 mL de solução NaCl 0,5 M no mesmo tampão. A atividade da celulase foi feita pela observação de um halo claro ao redor da colônia, referente à degradação da celulose ao redor da colônia (Mullings, 1985).

Para determinação da atividade lipolítica foi adaptada de Hankin e Anagnoskis (1975). Os isolados do fungo foram repicados em meio ágar contendo 10 g de peptona; 5 g de NaCl; 0,1 g de CaCl₂.2H₂O; 20 g ágar; 0,01g rodamina; 10 mL Tween 20 e 1 L de água destilada, pH 6,0. O fungo será incubado por 8 dias 25°C com fotoperíodo 12h luz e posteriormente foi colocado a 4°C por 48 horas. Após esse período, a atividade enzimática foi observada mediante a presença do halo ao redor da colônia, formado por cristais de sais de cálcio decorrentes da liberação da enzima lipolítica.

Para detectar a atividade proteolítica, os isolados foram cultivados em meio nutriente ágar, contendo gelatina como substrato (5g de peptona; 3g de extrato de carne; 15g de ágar; 40g de gelatina; 1000 mL de água destilada; pH 6,0) (CRUZ 1985). Os quais permaneceram 25 °C sob fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Decorridos o período de cultivo dos isolados no meio, a revelação do halo de degradação ocorrera por meio da

adição de 2 mL de solução saturada de sulfato de amônio (77g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 100 mL de água destilada).

Para avaliar a atividade de pectinases foi utilizado o meio 500 mL de solução mineral (2,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 4,0 g de KH_2PO_4 ; 6,0 g de Na_2HPO_4 ; 0,2 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g de CaCl_2 ; 0,0001 g de H_3BO_3 ; 0,0001 g de MnSO_4 ; 0,0007 g de ZnSO_4 ; 0,0005 g de CuSO_4 ; 0,0001 g de MoO_3) + 500 mL de solução pectina (1 g de extrato de levedura; 15 g de ágar; 5 g de pectina cítrica). O meio teve pH ajustado para 7,0. Conforme metodologia de Hankin e Anagnostakis (1975), com modificações. As colônias foram incubadas em BOD por cinco dias a 25 °C, no escuro. Após esta etapa, foi aplicado 5 mL de vermelho de metila 2% (0,2 g de vermelho de metila; 60 mL de etanol 95% e; 40 mL de água destilada), com dez minutos a solução foi descartada e a avaliação foi feita pela observação de um halo formado por uma região translúcida ao redor da colônia.

As placas foram mantidas em BOD. Logo foram realizadas as medições dos diâmetros perpendiculares da colônia e da colônia mais o halo de degradação do substrato. Sendo avaliado o índice enzimático de amilase, celulase, lipase, protease e pectinase.

Para todas as enzimas mencionadas anteriormente foi quantificada por meio da análise da relação H/C, obtida pela divisão da média do diâmetro do halo (H) nas quatro repetições pela média do diâmetro da colônia (C).

Delineamento experimental:

No estudo o delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema bifatorial (2×3), constituído de duas moléculas semissintéticas Phenyl S Citral, Phenyl Se Citronellal e três concentrações ($\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$): 0,25%, 0,125%, 0,0625%, e cinco repetições. Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homoscedasticidade pelo teste de Hartley. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas no programa INFOSTAT e SISVAR (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

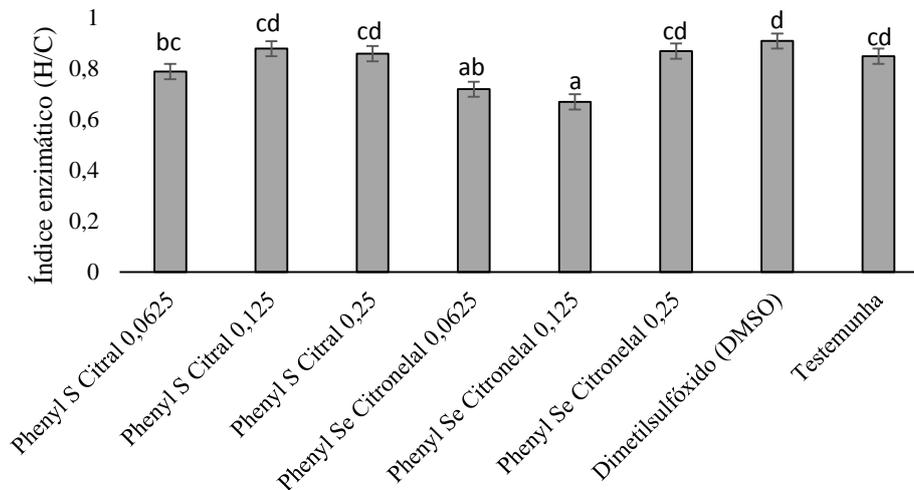
Os fungos patogênicos possuem diversos fatores de virulência para causar doenças, os quais permitem que o fungo adira, penetre e interfira nas funções celulares de seu hospedeiro. Dentre seus inúmeros e variados fatores de virulência, destaca-se o papel das enzimas, que permitem ao fungo degradar constituintes importantes das

barreiras externas de proteção dos hospedeiros, pelas quais pode penetrar e colonizar os tecidos (ORTONEDA et al., 2004).

Os fungos para a obtenção dos nutrientes requeridos para seu desenvolvimento precisam da síntese e secreção de enzimas para tornar substratos insolúveis em metabolitos solúveis, e assim serem absorvidos enzimaticamente. Isolados fúngicos também podem ser diferenciados por meio da produção enzimática, pois alguns fungos produzem determinadas enzimas em quantidades distintas e essas ainda podem ser inibidas pela ação de algum agente externo.

No presente estudo, o fungo *C. lindemuthianum*, raça 86, apresentou atividade enzimática amilolítica, evidenciada pela presença do halo claro em torno da colônia (Figura 1), sendo este, relativamente baixo, apenas observável nos diferentes tratamentos, porém, apresentando diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Sendo percebido maior atividade nos tratamentos com Phenyl S Citral nas concentrações 0,125% e 0,25%, com índices enzimáticos de 0,86 e 0,88 mm e no controle com DMSO com H/C de 0,91 mm. Logo, a menor atividade foi observada nos tratamentos Phenyl Se Citronelal, na concentração 0,125% com um índice enzimático de 0,67 mm apresentando diferença significativa aos demais tratamentos, com exceção da concentração 0,625% pela mesma molécula Phenyl Se Citronelal onde o H/C foi de 0,72 mm, conforme apresentado no (Gráfico.1). Dessa forma, é possível observar que a molécula Phenyl Se Citronelal pode levar a uma redução na atividade amilolítica do patógeno. Cabe ressaltar que os índices enzimáticos para todos os tratamentos foram inferiores a 2,0, o que é considerado como baixo.

Gráfico 1 - Atividade enzimática Amilase de *Colletotrichum lindemuthianum* por difusão em substratos sólidos específicos (Phenyl S Citral), (Phenyl Se Citronelal).



Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ao 5% de probabilidade.
Fonte: Pinel (2021).

Figura 1. Halo de degradação de atividade amilolítica. Evidenciado com lugol e caracterizado como atividade da amilase do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*.

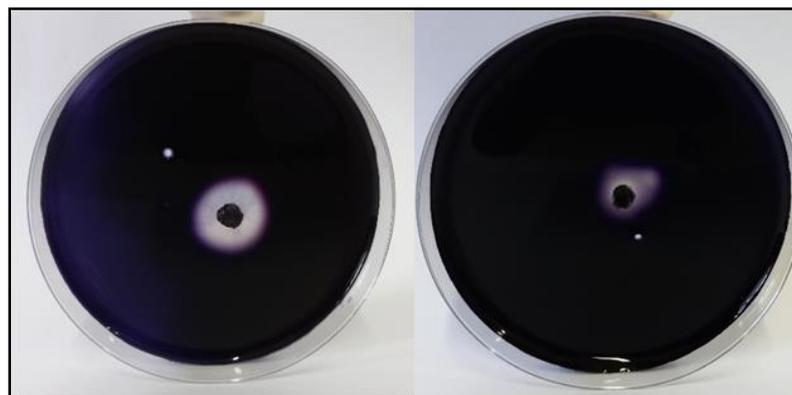


Foto: Mario F. Pinel, 2021

As amilases são enzimas com capacidade de degradar moléculas de amido, principal fonte de reserva nas células vegetais, degradando este polissacarídeo em molécula de glicose, que são utilizadas no metabolismo vegetal (PASCHOLATI, 2011).

Conforme os dados mostrados (Gráfico. 1), percebe-se que todos os tratamentos apresentaram baixa atividade amilolítica com halos de degradação entre os 0,12 mm 0,18 mm. Na figura 1, é possível visualizar essa degradação semitranslúcida no entorno da colônia, indicando que o substrato composto por carboximetilcelulose (CMC) foi degradado. Assim, os resultados chamam a atenção ao fato de que o patógeno faz uso do amido como fonte de energia para seu desenvolvimento, e que submetido a determinadas concentrações dos compostos semissintéticos, o patógeno pode apresentar menor

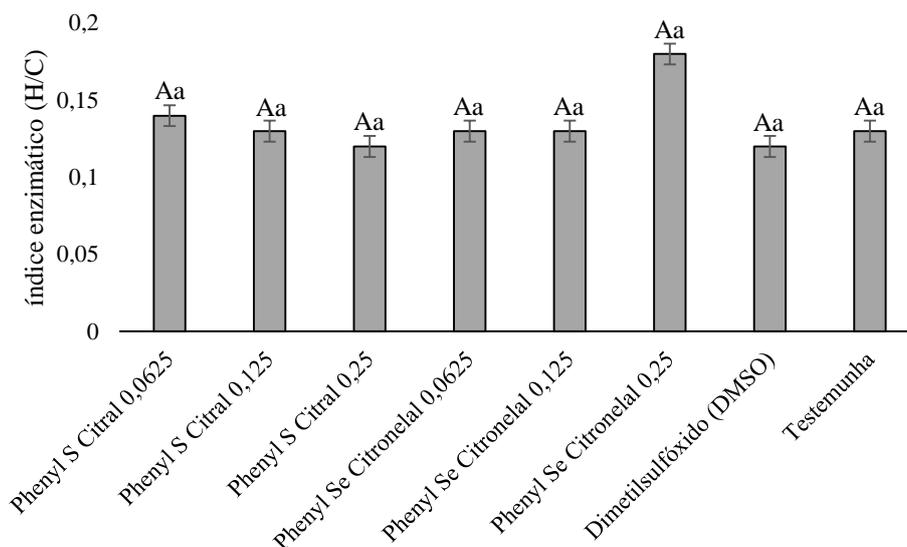
atividade amilolítica. Porém, é possível que a uma maior concentração do produto iniba a produção em maior grão desta enzima.

São poucos os estudos onde foi testada a atividade enzimática *in vitro* em fungos fitopatógenos quando adicionados a produtos com capacidade antimicrobiana. No entanto, resultados com relação ao índice na atividade amilolítica obtidos por BEZERRA, (2017) tem relatado variação por parte de isolados fitopatogênicos de *Colletotrichum* spp. alguns não apresentando, e outros com baixa atividade deste em meio sólido específico. Resultados semelhantes também foram obtidos por Assis *et al.* (2010), onde demonstraram uma baixa produção de amilase em *Colletotrichum. gleosporoides*. Assim como, os estudos feitos pelo Tozze Júnior (2012), avaliando isolados de *Colletotrichum* spp. em maracujazeiro, pessegueiro mangueira e abacateiro, não detectaram a presença de atividade amilolítica. No entanto, tem sido descrita a capacidade da produção de enzimas amilase secretadas por isolado do gênero *Colletotrichum* spp., no qual identificam que mediante estas são capazes de destruir componentes estruturais de tecidos da planta, e em alguns casos, culminar com a morte celular. Cabe mencionar que a enzima amilases, tem sido descrita na literatura para gêneros fúngicos que atacam os órgãos de armazenamento de amido nas plantas, destacando-se patógenos que infectam sementes de espécies de importância agrícola como é no caso do *C. lindemuthianum* (MARCHI *et al.*, 2009).

Os compostos semissintéticos Phenyl Se Citronelal e Phenyl S Citral aplicados ao meio mínimo não promoveram nenhum efeito na produção da atividade celulase por parte do patógeno, já que a maioria dos valores foram iguais nos diferentes tratamentos e concentrações, mesmo na testemunha e controle (Gráfico. 2). Porém, os índices enzimáticos celulase para o *Colletotrichum Lindemuthianum*. Foram muito inferiores a 2,0, o que seria considerado por muitos autores como baixa atividade.

Com relação a produção de celulase, Lima (2003) e Da Silva (2016) detectaram baixa atividade celulolítica em diferentes isolados de *Colletotrichum graminicola* e *Colletotrichum* spp.

Gráfico 2 - Atividade enzimática Celulase de *Colletotrichum lindemuthianum* por difusão em substratos sólidos específicos.



Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ao 5% de probabilidade.
Fonte: Pinel (2021).

Figura 2. Halo de degradação da atividade celulolítica, evidenciado com vermelho de congo e caracterizado como atividade da celulolítica do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*.

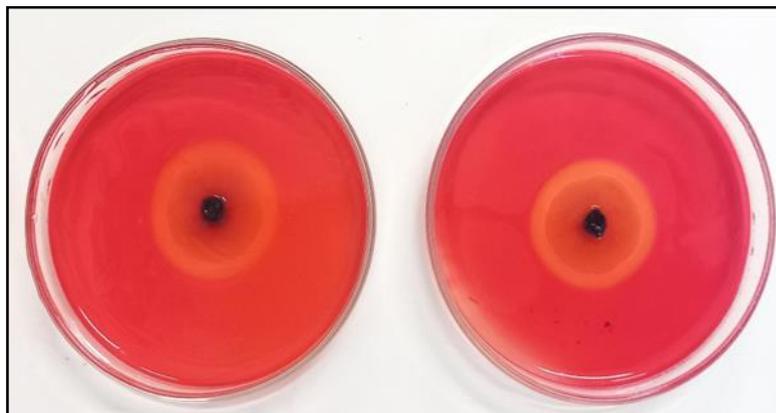


Foto: Mario F. Pinel 2021

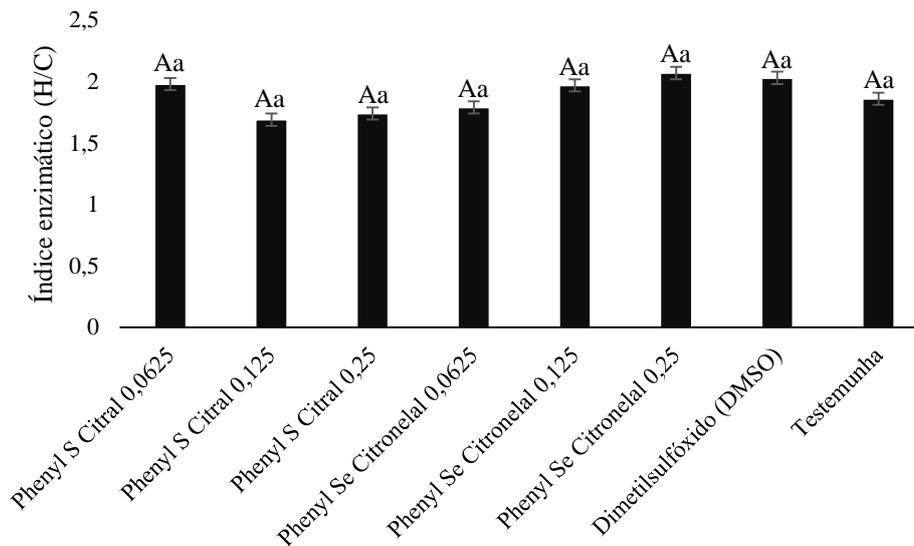
Conforme mostrado na (Figura. 2), tratamentos apresentaram halos de degradação no substrato. No entanto, considerando-se a atividade celulolítica baixa, sem nenhum efeito aparente por parte das moléculas Phenyl S Citral e Phenyl Se Citronelal. Dentro os fitopatógenos, o papel das celulases já foi comprovado em diversos patossistemas vegetais, e estudos indicam que a secreção dessas enzimas pode ser determinante para a ocorrência de alguns sintomas nas plantas (BENHAMOU, 1991) já que a produção da enzima celulose permite o estabelecimento do patógeno na superfície da planta, no qual produz amolecimento, devido à desintegração dos componentes da parede celular, e permite a penetração e propagação do patógeno nos tecidos de sua hospedeiro, o que leva

ao colapso e desintegração de sua estrutura celular. Sabe-se que a produção da enzima celulase favorece aos fitopatógenos na degradação da celulase e fosfolipídios da parede celular e membrana plasmática do hospedeiro, por exemplo. É importante também mencionar a ação dessas enzimas na desintoxicação de compostos antifúngicos e tanino que podem estar presentes no hospedeiro.

A atividade lipolítica também foi produzida pelo patógeno nos diferentes tratamentos avaliados, o halo de degradação característico pelo acúmulo de sais de cálcio em torno da colônia do fungo foi claramente observado (Figura. 3). No entanto, não houve diferença estatística entre os tratamentos nem em comparação com a testemunha e controle (DMSO). Mas os índices de atividade enzimática foram considerados altos (Gráfico. 3), entre 1,65 mm e 2,05 mm. O maior halo produzido foi observado na concentração 0,25% da molécula Phenyl Se Citronela, seguido pelo controle (DMSO) com 2,03 mm, o menor foi na concentração 0,125% pela molécula Phenyl S Citral de 1,69 mm (Gráfico. 3). Embora sem diferença estatística, os resultados obtidos neste estudo, apontam o composto Phenyl S Citral, nas concentrações 0,125% e 0,25%, como um candidato a reduzir a atividade lipolítica.

Estudo feito por Maria *et al.* (2005), em que avaliaram a produção de enzima lipolítica em fungos como: *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp utilizando meio solido especifico, a produção de lipase foi observada em todos os fungos testados. A produção de enzimas para espécies do gênero *Colletotrichum* tem sido pouco descrita na literatura, mas de igual forma resultados têm sido obtidos por alguns autores, Luz *et al.* (2006) avaliando a produção de lipase em diversos gêneros de fungo (*Colletotrichum*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Nigrospora* e *Phomopsis*) caracterizando-se como produtores de lipase. Com tudo, não foram encontrados estudos que tem avaliado a produção lipolítica de fungos fitopatógenos *in vitro* quando tratado o meio com produtos de ação antimicrobiana.

Gráfico 3- Atividade enzimática lipases de *Colletotrichum lindemuthianum* por difusão em substratos sólidos específicos.



Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ao 5% de probabilidade.
Fonte: Pinel (2021).

Figura 3. Halo de degradação da atividade lipolítica com formação de cristais de sais de cálcio e caracterizado como atividade da proteolítica do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*.

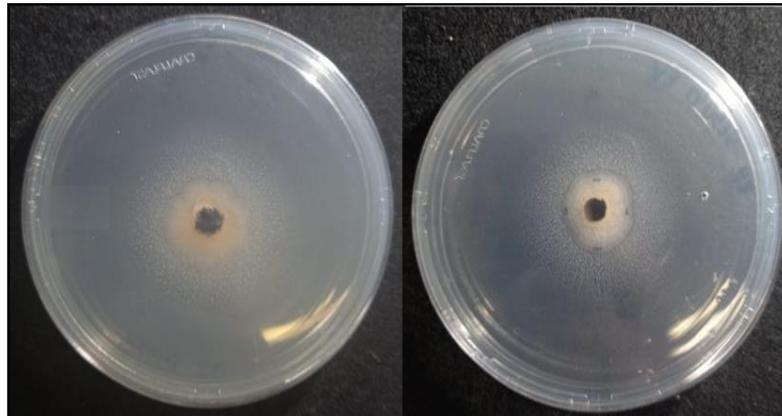
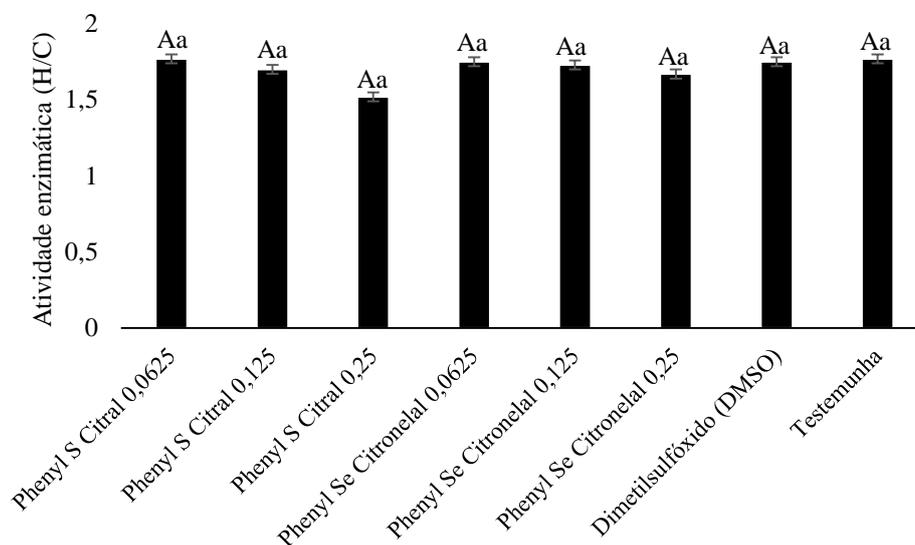


Foto: Mario F. Pinel 2021

Nos últimos anos, tem havido muitas evidências de que diferentes espécies de *Colletotrichum* podem usar enzimas lipolíticas como fatores de patogenicidade. As lipases pertencem ao grupo das enzimas produzidas por microrganismos fitopatogênicos que atuam na membrana plasmática e no protoplasto das células vegetais, nas quais podem ser encontrados diferentes tipos de lipídios que serão degradados por meio das enzimas lipolíticas e que podem ser secretados pelos fungos (PASCHOLATI, 2011). A ação das lipases é definida como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, sua função biológica é hidrolisar triacilgliceróis para formar ácidos graxos livres e glicerol (MARTINS *et al.*, 2008).

Nos testes feitos com substrato para a produção de potresse, a atividade proteolítica também foi detectada em todos os tratamentos, no qual foi caracterizada por um halo de degradação transparente (Figura. 4), observou-se os maiores índices enzimáticos, 1,50 mm a 1,70 mm, porém, não ocorreu diferença estatística entre os tratamentos (Gráfico. 4). O menor índice foi obtido na concentração de 0,25%, independente do composto utilizado. Poderia se dizer que a maior concentração do produto existe uma tendência a diminuir o índice enzimático. Havendo um melhor resultado na molécula Phenyl S citral.

Gráfico 4 - Atividade enzimática protease de *Colletotrichum lindemuthianum* por difusão em substratos sólidos específicos.



Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ao 5% de probabilidade.

Fonte: Pinel (2021).

Figura 4. Halo de degradação da atividade proteolítica, evidenciado com solução de sulfato de amônio e caracterizado como atividade da proteolítica do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*.

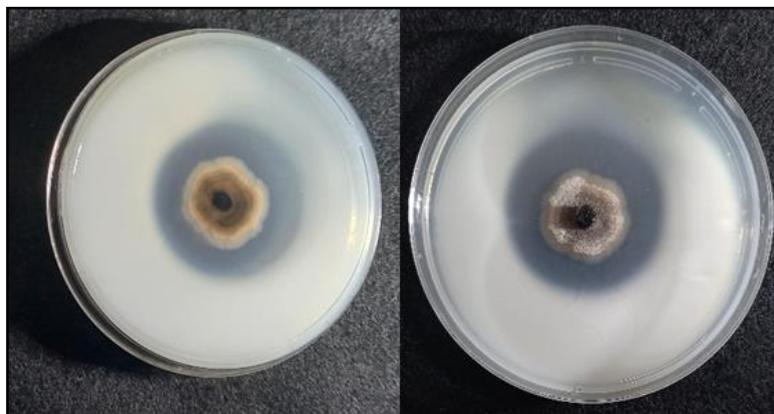
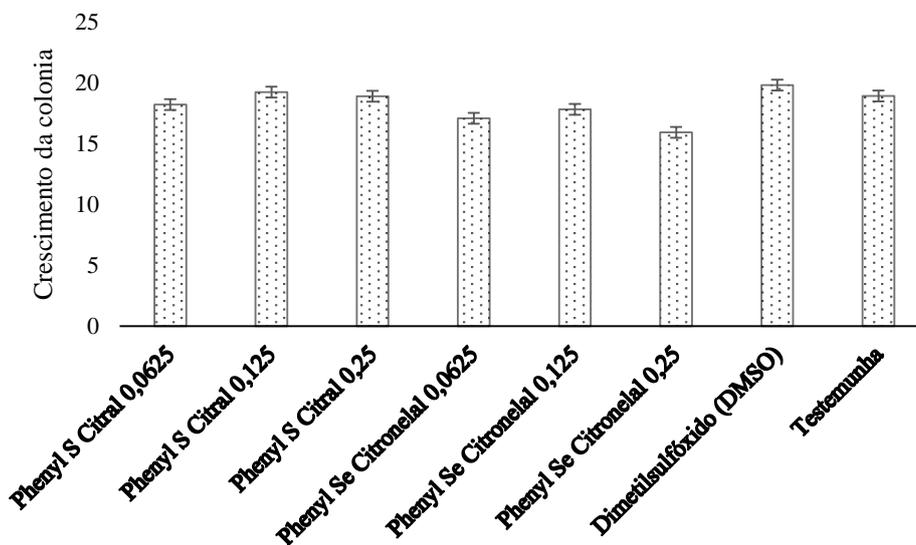


Foto: Mario Pinel 2021

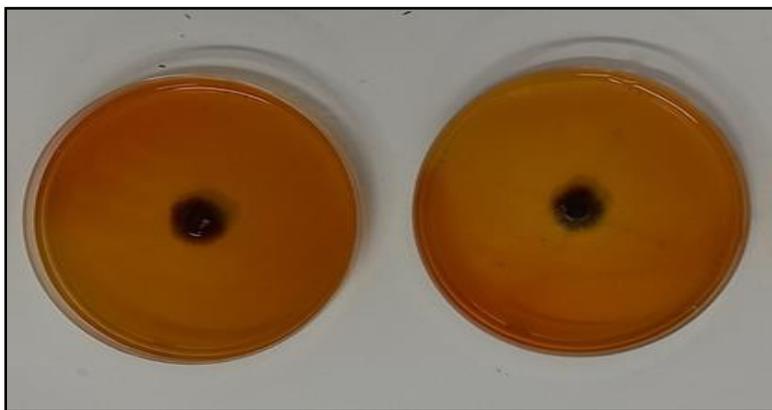
As proteases são enzimas que influenciam no metabolismo de todos os organismos, clivam ligações peptídicas nas proteínas, que podem atuar na hidrólise de proteínas da membrana e da parede celular de plantas hospedeiras, facilitando a penetração e a infecção pelo microrganismo (TREMACOLDI, 2009) cujo objetivo será degradar proteínas que serviram como fonte de carbono e nitrogênio nos processos celulares (VERMELHO, 2008). Segundo o Redman e Rodriguez (2002), sugerem que atividade protease extracelular pode ser considerada essencial no processo de patogenicidade de fungos do gênero *Colletotrichum*. Porém, no presente trabalho foi das enzimas que maior atividade apresento. Para os propósitos deste estudo, esses resultados são de grande relevância, pois podem indicar a capacidade do isolados em causar doenças.

Gráfico 5 – Atividade enzimática pectinase de *Colletotrichum lindemuthianum* por difusão em substratos sólidos específicos.



Fonte: Pinel (2021).

Figura 5. Ausência de halos de degradação da atividade pectinolítica.



No teste enzimático pectinase, não houve formação de halo de degradação em nenhum dos tratamentos nem controles, entretanto, sim houve crescimento da colônia (Figura. 5), apresentando valores (mm) semelhantes da colônia do fungo em todos nos tratamentos no meio sólido específico (Gráfico. 5), sendo apenas menores nos tratamentos com a molécula Phenyl Se Citronelal. Para a produção de pectinase foram testados dois tipos de substratos, o fungo apresentou atividade na área da colônia, porém em nenhum apresentou halo de degradação, o que permitiria pensar em que a cepa 86 do fungo *C. Lindemuthianum* não produz enzima pectinase.

Geralmente se sabe que as enzimas pectinolíticas são as primeiras enzimas produzidas por fungos fitopatogênicos para quebrar e atacar os polímeros da parede da planta e da lamela média.

Durante a infecção e colonização, as pectinases compõem um grupo muito diversificado de enzimas que realizam a quebra de substâncias pécicas através de processos de despolimerização (hidrolases e liases) e desesterificação (esterases) (SILVA, 2005; SILVA *et al.*, 2009). As enzimas pectinolíticas produzidas pelos fitopatógenos têm a capacidade de consumir os tecidos do hospedeiro e matar suas células (ANNIS; GOODWIN, 2004), degradando a pectina, principal componente das paredes primária e a lamela média, assim, facilitando o processo de colonização por parte do patógeno (CRUZ, 2014).

A atividade patogênica dos fungos está diretamente relacionada com a capacidade de produzir enzimas extracelulares. Resultados deste trabalho demonstram que *C. lindemuthianum* raça 86, causador de antracnose em feijão tem a capacidade de produzir enzimas extracelulares inclusive tratados os meios específicos utilizados adicionando moléculas com potencial antimicrobiano, porém as doses utilizadas foram concentrações que em trabalho prévio, Zabotti (2019), inibiram 50% do crescimento do fungo, para permitir o desenvolvimento do mesmo, em questão de análises da atividade enzimática ligada a patogênese. Contudo, conforme os resultados, as enzimas avaliadas e que foram produzidas pelo *C. lindemuthianum* podem desempenhar funções fundamentais em sua interação patogênica já que podem estar diretamente envolvidas na infecção e colonização do hospedeiro. A produção destas diferentes classes de enzimas pode permitir que o patógeno se adapte eficientemente a diferentes ambientes. Mesmo o que permite sugerir a capacidade por parte do isolado, de degradar barreiras de proteção e compostos intracelulares do hospedeiro.

4 CONCLUSÕES

As moléculas Phenyl Se Citral e Phenyl Se Citronelal não apresentaram um efeito significativo na produção de enzimas ligadas a patogenicidade no fungo *C. lindemuthianum.*, porém, em doses mais elevadas apresentaram-se promissoras.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, M. D. C.; CAVACOB, A.; The use of essential oils for postharvest decay control. A review **Flavour Fragrance Journal**, v. 25, p. 351-366, 2010.
- ASSIS, T.C., MENEZES, M.; ANDRADE, D.E.G.T.; COELHO R.S.B. 2010. Differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using total proteins and esterase electrophoretic patterns and extracellular enzyme production. **Summa Phytopathol**, 27:208-212.
- BALARDIN, R. S.; JAROSZ, A. M.; KELLY, J. D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South Central, and North America. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 87, n. 12, p. 1184-1191, 1997.
- BAYOUMI, Y.; TAHA, N.; SHALABYA, T.; ALSHAALD, T.; EL-RAMADYD, H. Sulfur promotes biocontrol of purple blotch disease via *Trichoderma* spp. and enhances the growth, yield and quality of onion. **Applied Soil Ecology**, p. 10, 2018.
- BENHAMOU, N.; MAZAU, D.; GRENIER, J. y ESQUERRETUGAYE, M. T., 1991: Time-course of the accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in root cells susceptible and resistant tomato plant infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radieis lycopersici*. *Planta*. 184: 196-202.
- BEZERRA, CAROLINE DE SOUZA Caracterização enzimática de *Colletotrichum* spp. isolados de *Paullinia cupana* Kunth. var. *sorbilis* (Mart.) Manaus: [s.n.], 2017.
- CARDOSO, C.L.; MORAES, M.C.; CASS, Q.B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, 32: p. 175-187. 2009.
- CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p.333-349. 2005.
- CASTRO, H. G. de; PERINI, V. B. de M.; LEAL, A. B.; SANTOS, G. R. dos; CASTRO, T. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 308-314, 2010.
- CHAKRAVORTY, S.; RAYNERA, M. K.; KONINGA, C. B.; VUUREN, S. FOTTERLO, W. A.L. Synthesis and Antimicrobial Activity of the Essential Oil Compounds (E)- and (Z)-3-Hexenyl Nonanoate and Two Analogues. *Short Communication*, v.65, p.202-205, 2012.
- CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. Óleos essenciais de plantas do nordeste. UFC, 210p. 1981.

CRUZ, A.A. Características morfo-culturais e moleculares de *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque. Procedentes do Estado do Amazonas. Tese de Doutorado, Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo, p. 105, 2014.

DI PIERO, R.M.; GARCIA JÚNIOR, D.; TONUCCI, N.M. Indutores bióticos. In: Cavalcanti, L.S.; Di Piero, R.M.; Cia, P.; Pascholati, S.F.; Resende, M.L.V.; Romero, R.S. 2005. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ, p.29-50. 2005.

FERNÁNDEZ, M. T. et al. Bean germplasm evaluation for anthracnose resistance and characterization of agronomic traits: a new physiological strain of *Colletotrichum lindemuthianum* infecting *Phaseolus vulgaris* L. in Spain. *Euphytica*, Wageningen, v. 114, p. 143-149, 2000.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria, 45., 2000, São Carlos. Anais... São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255- 258.

FIORI, A. C. G; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; VIDA, J. B.; SCAPIM, C. A.; CRUZ, M. E. S; PASCHOLATI, S. F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, n. 7-8, p. 483-487, 2000.

FORNEY, C.F.; JORDAN, M.A.; CAMPBELL-PALMER, L.; FILLMORE, S.; McRAE, K.; BEST, K. Sulfur fertilization affects onion quality and flavor chemistry during storage. **Acta Horticulture**, v.877, p.163-168, 2010.

GAVIRIA HERNÁNDEZ; ZABOT; PINEL ALVAREZ; ALVES; ANTUNES, JACOBSEN DE FARIAS. Pathogenic variability of multispóric and monospóric isolates of *C. lindemuthianum* common bean seedlings (*Phaseolus vulgaris*). *Braz. J. of Develop.*, Curitiba, v.6, n.11, p. 88300-88315, 2020.

GRIFFIN, D.H. FUNGAL PHYSIOLOGY, 2A EDIÇÃO. JOHN WILEY & SONS, INC.PUBLICATIONS, NEW YORK, 1994.

KIKOT, G. E.; HOURS, R. A.; ALCONADA, T. M. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: A review. **Journal Basic Microbiology**, v. 49 p. 231–241, 2009.

KUHN, O. J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspecto fisiológico, bioquímico e parâmetros de crescimento e produção. Piracicaba. Tese de doutorado. Escola superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo. p. 140, 2007.

LIMA, FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia brasileira. Brasília**, v. 28, n. 6, p. 620-625, 2003.

MARTINS, S. C. V.; CAVATTE, P. C.; DAMATTA, F. M. Alterations on Rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. **Australian Plant Pathology**, v.40, p.360-365, 2011.

MONDO, V.H.V.; NASCENTE, A.S.; CARDOSO NETO, M.O. Common bean seed vigor affecting crop grain yield. *Journal of Seed Science*, v.38, n.4, p.365-370, 2016.

OLANDA, G. B. de. Uso de plantas bioativas no controle da antracnose na cultura do feijão. Dissertação (mestrado em agronomia). Universidade Federal de Pelotas, 2014, 52p.

ORTONEDA M, GUARRO J, MADRID MP, CARACUEL Z, RONCERO MI, MAYAYO E, DI PIETRO A. *Fusarium oxysporum* as a Multihost Model for the Genetic Dissection of Fungal Virulence in Plants and Mammals. **Infection and Immunity**. 2004; 72: 1760-66.

OLIVEIRA, S.; BRUNES, A.P.; LEMES, E.S.; TAVARES, L.C.; MENEGHELLO, G.E.; LEITZKE, I.D.; MENDONÇA, A.O. Tratamento de sementes de arroz com silício e qualidade fisiológica das sementes. **Revista de Ciências Agrárias**, v.39, n. 2, p.202-209, 2016.

PADDER, B.A. et al. Transcriptome profiling of the *Phaseolus vulgaris*-*Colletotrichum lindemuthianum* pathosystem. *PloS one*, v. 11, n. 11, 2016.

PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. *Scientia Agraria Paranaensis*, v.10, n.1, p. 18-46, 2011.

RUFINO, C.A.; TAVARES, E.C.; RAMOS, P.M.; VIEIRA, J.F.; ABREU JUNIOR, J.S.; SILVA, F.J.A.; CORREA, M.F.; GIL, J.M. Performance of soybean seedlings upon nutrient application by seed coating. *Brazilian Archives of Biology And Technology*, v.60, p.1-11, 2017.

SILVA, W. P.; JACOB, R.G.; MAIA, D.S.V.; GOLBECK, C.J.; FONSECA, S. F. Semi-synthetic compounds as antimicrobial agents in food preservation. *Formatex*, p. 576-583, 2015.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S.K.; MUNIZ, E.C.; RUBIRA, A.F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. *Quím. Nova*. vol.32. no.3. São Paulo. 2009.

SILVA, R.; LAGO, E.S.; MERHEB, C.W.; MACCHIONE, M.M.; PARK, Y.K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.36, p.235 - 241, 2005.

TOZZE JÚNIOR, H.J.; FIRMINO, A.C.; FISCHER, I.H.; FURTADO, E.L.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. associados às frutíferas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.41, n.4, p.270-280, 2015.

VERMELHO, A.B.; MELO, A.C.N.; SÁ, M.H.B.; SANTOS, A.L.S.; LEVY, C.M.A.; COURI, S.; BON, E.P. 2008. IN: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. Enzimas em 105 biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Interciência, 1ra edição: 273-286.