

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

ATIVIDADE DE QUITOSANAS COM DIFERENTES PESOS MOLECULARES SOBRE *ALTERNARIA SOLANI*

D.S.O. Coqueiro; R.M. Di Piero

Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil. E-mail: danilasoc@yahoo.com.br

RESUMO

A quitosana tem demonstrado potencial antifúngico e de proteção das plantas contra fitopatógenos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antifúngico de quitosanas sobre *Alternaria solani*, agente causal da pinta preta em tomateiros. Foram utilizadas três quitosanas: uma comercial (Qcom), encontrada em lojas de suplementos alimentares; uma de baixo peso molecular (Qbpm; 50-190 KDa) e outra de médio peso molecular (Qmpm; 190-310 KDa), ambas obtidas da Sigma Aldrich. As quitosanas foram depositadas sobre lâminas escavadas, para avaliar a germinação de conídios e alongamento do tubo germinativo, ou incorporadas ao meio BDA, para avaliar o crescimento micelial de *A. solani*. Evidenciou-se atividade antifúngica desses polissacarídeos sobre *A. solani*, com inibição da germinação de conídios e do crescimento micelial de 85% e 50%, respectivamente, quando utilizados em concentrações de 0,125 mg/mL e 0,5 mg/mL. O peso molecular da quitosana não influenciou a atividade antibiótica *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: Germinação de conídios, crescimento micelial, *Lycopersicon esculentum*.

ABSTRACT

ACTIVITY OF CHITOSAN WITH DIFFERENT MOLECULAR WEIGHTS ON *ALTERNARIA SOLANI*. Chitosan has shown significant antifungal activity against several plant pathogens. The aim of this study was to evaluate the antifungal effect of chitosans on *Alternaria solani*, the causal agent of early blight in tomato. Three chitosans were used: a commercial one (Qcom), found in food supplement stores; one of low molecular weight (Qbpm; 50 - 190 KDa) and one of medium molecular weight (Qmpm; 190 - 310 KDa), the latter two obtained from Sigma Aldrich. The chitosan were deposited on slides, to assess the conidial germination and germ tube elongation, or incorporated into the BDA medium, to evaluate the mycelial growth of *A. solani*. The results showed an antifungal activity of these polysaccharides on *A. solani*, with inhibition of spore germination and mycelial growth of 85% and 50%, respectively, when used at concentrations of 0.125 mg/mL and 0.5 mg/mL. The molecular weight has not influenced the *in vitro* activity of chitosan.

KEY WORDS: Conidial germination, mycelial growth, *Lycopersicon esculentum*.

O interesse na busca por substâncias bioativas para o controle de doenças em plantas aumentou consideravelmente (ARAÚJO; MENEZES, 2009; LUO *et al.*, 2010; MARCUCCI *et al.*, 2010; LOBATO *et al.*, 2011). Dentre os compostos pesquisados nessa perspectiva encontra-se a quitosana, polissacarídeo que pode ser extraído do exoesqueleto de crustáceos pela desacetilação alcalina da quitina ou da parede celular de alguns fungos. A quitosana é uma alternativa promissora por possuir atividade antimicrobiana e atuar na indução de mecanismos de defesa nos tecidos das plantas (EL GHAOUTH *et al.*, 1992; HERNÁNDEZ-LAUZARDO *et al.*, 2008; IRITI; FAORO, 2009; REGLINSKI *et al.*, 2010).

O efeito antifúngico da quitosana sobre *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium* spp., afetando o crescimento micelial, germinação de conídios,

além de causar alterações morfológicas nas hifas, foi relatado por HADWIGER; BECKMAN (1980), EL GHAOUTH *et al.* (1992), BEN-SHALOM *et al.* (2003), LIU *et al.* (2007) e AL-HETAR *et al.* (2011). Diferentes características podem interferir na atividade biológica da quitosana, dentre elas o peso molecular. BADAWY; RABEA (2008) observaram que quanto menor o seu peso molecular, maior a atividade antifúngica sobre *B. cinerea*. De forma similar, HERNÁNDEZ-LAUZARDO *et al.* (2008) verificaram que a de baixo peso molecular foi mais eficiente na inibição do crescimento micelial de *R. stolonifer*. Entretanto, são poucos os relatos mostrando o efeito inibitório da quitosana contra patógenos fúngicos do tomateiro ou na proteção de plantas (AMINI, 2009; BADAWY; RABEA, 2008; LIU *et al.*, 2007; BENHAMOU *et al.*, 1998). Esse trabalho teve como

objetivo avaliar o efeito de quitosanas com diferentes pesos moleculares quanto à atividade antifúngica sobre *A. solani* do tomateiro.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC. Um isolado de *A. solani*, obtido de folhas sintomáticas de tomateiro, foi cultivado em meio batata-dextrose-água (BDA) e incubado em câmara tipo BOD a 25° C sob fotoperíodo de 12h. Após cinco dias de cultivo, uma suspensão concentrada de esporos foi obtida em 10 mL de água destilada e ajustada para as concentrações desejadas com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico. Foram utilizados três tipos de quitosana em pó: quitosana de baixo (Qbpm; 50-190 KDa) e médio peso molecular (Qmpm; 190-310 KDa), ambas adquiridas a partir da Sigma Aldrich Chemicals, SP, Brasil, com 75-85% de desacetilação; e uma quitosana comercializada (Qcom) pela empresa de suplementos alimentares Phytomare, SC, Brasil, com 85% de desacetilação. As suspensões de quitosana foram preparadas conforme BENHAMOU *et al.* (1998), utilizando-se HCl 0,05 N como solvente e ajustando-se o pH final de cada solução para 5,6.

O efeito das quitosanas sobre a germinação de conídios foi avaliado pela deposição de alíquotas de 30 µL das suspensões de Qcom, Qbpm ou Qmpm, nas concentrações de 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 mg/mL, sobre 30 µL da suspensão de conídios de *A. solani* (10⁵ conídios/mL) previamente depositados nas cavidades de lâminas escavadas. Na testemunha,

utilizaram-se 30 µL de HCl 0,05 N (pH 5,6) sobre 30 µL de conídios. Após 24h de incubação a 25° C, sob fotoperíodo de 12h, foi avaliada a porcentagem de germinação de conídios. O conídio foi considerado germinado quando o comprimento de seu tubo germinativo foi maior ou igual ao menor diâmetro do conídio. Foram contados 400 conídios por tratamento e o comprimento do tubo germinativo foi mensurado em 120 esporos por tratamento com auxílio de uma ocular micrométrica e microscópio óptico.

Para verificar o efeito das quitosanas Qbpm, Qmpm e Qcom sobre o crescimento micelial, os polissacarídeos foram incorporados ao meio BDA de tal forma que as concentrações no meio fossem de 0,125; 0,25 e 0,5 mg/mL. Na testemunha, incorporou-se HCl 0,05 N (pH 5,6) em meio BDA. Após a solidificação do meio, um disco de micélio de 7 mm de diâmetro do *A. solani* foi repicado para o centro de cada placa de Petri as quais foram vedadas com filme plástico e incubadas a 25° C, com 12 horas diárias de luz. O crescimento micelial foi verificado diariamente por medições do diâmetro das colônias em dois eixos perpendiculares. A avaliação foi feita até que o micélio de um dos tratamentos atingisse a borda da placa. Posteriormente, foi calculado o índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) (OLIVEIRA, 1991): $IVCM = S(D-Da)/N$, em que: IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial, D = diâmetro médio atual, Da = diâmetro médio anterior e N = número de dias após a repicagem.

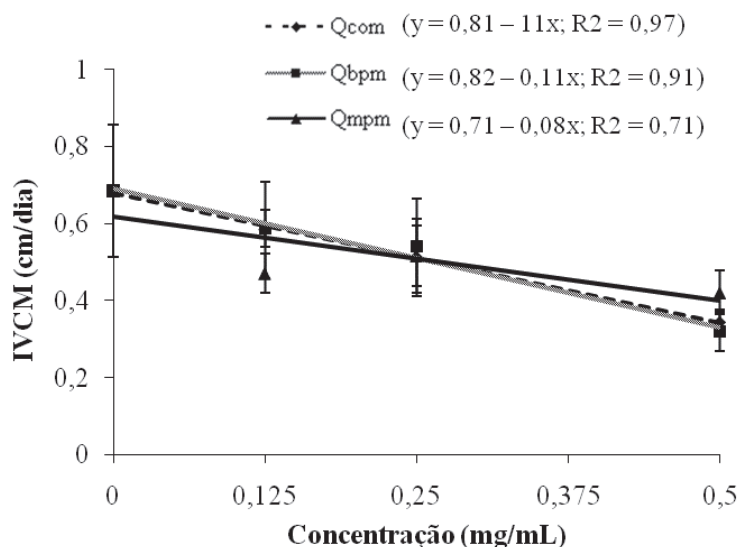


Fig. 1 - Efeito de concentrações das quitosanas comercial (Qcom), de baixo (Qbpm; 50-190 KDa) e médio peso molecular (Qmpm; 190-310 KDa) sobre o crescimento micelial de *Alternaria solani*. Linhas verticais no gráfico representam o desvio-padrão. Houve efeito de concentração das quitosanas sobre o crescimento micelial do fungo pelo teste F a 5%.

Tabela 1 – Efeito *in vitro* das quitosanas comercial (Qcom), de baixo (Qbpm; 50-190 KDa) e de médio peso molecular (Qmpm; 190-310 KDa) sobre a germinação de conídios e o comprimento do tubo germinativo de *Alternaria solani*.

Tratamento	Germinação de conídios (%)	Comprimento do tubo (μm)
HCl 0,05 N	93,8 \pm 3,3 a ^[1]	145 \pm 38,5 a ^[2]
<i>Qcom</i> (mg/mL)		
0,125	14,5 \pm 4,6 b	41,9 \pm 8,1 b
0,25	11,3 \pm 0,7 b	42,8 \pm 4,6 b
0,50	13,0 \pm 3,6 b	47,6 \pm 9,8 b
1,00	11,5 \pm 2,1 b	41,3 \pm 7,8 b
<i>Qbpm</i> (mg/mL)		
0,125	13,8 \pm 2,7 b	40,5 \pm 7,4 b
0,25	14,5 \pm 5,8 b	43,2 \pm 4,4 b
0,50	14,5 \pm 8,1 b	38,6 \pm 5,6 b
1,00	11,0 \pm 4,6 b	38,5 \pm 6,7 b
<i>Qmpm</i> (mg/mL)		
0,125	10,5 \pm 1,6 b	43,7 \pm 13,5 b
0,25	14,0 \pm 1,7 b	46,8 \pm 6,2 b
0,50	10,0 \pm 2,4 b	47,5 \pm 9,3 b
1,00	14,5 \pm 5,8 b	43,3 \pm 8,1 b

^[1,2]Resultados representam a média \pm intervalo de confiança. Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem entre si pelo teste DMS a 5% de significância.

Para todos os ensaios foi adotado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, com os tipos de quitosana e as suas concentrações representando os fatores analisados. Realizaram-se quatro repetições por tratamento, com uma repetição representada por uma placa ou lâmina. A análise de variância (ANOVA *one way* ou fatorial) e o teste de DMS (comparações múltiplas) foram realizados para verificar a diferença entre as médias das variáveis analisadas nos experimentos. As análises foram conduzidas utilizando o software estatístico Statística 8.0 (STATSOFT, 2008). Os experimentos foram realizados em duplicata e, como os resultados obtidos foram semelhantes, apenas um deles está apresentado.

As quitosanas Qcom, Qbpm e Qmpm mostraram efeito antifúngico similar. A concentração de 0,125 mg/mL propiciou uma redução de 85% sobre a germinação de conídios e de 70% sobre o comprimento do tubo germinativo de *A. solani*, comparadas ao controle HCl 0,05 N (Tabela 1). Concentrações maiores das quitosanas não resultaram em aumento da atividade antifúngica. Quanto ao crescimento micelial, a ANOVA fatorial mostrou que não houve uma diferença significativa entre as quitosanas, mas sim entre as concentrações. A incorporação dos polissacarídeos ao meio BDA reduziu significativamente o IVCm de *A. solani* de forma linear, pois quanto maior a concentração, menor foi o crescimento micelial. Houve uma inibição máxima de aproximadamente 50% do crescimento micelial quando as quitosanas

foram utilizadas a 0,5 mg/mL, sendo que todas apresentaram efeitos similares, independente do peso molecular (Fig. 1).

Pelos estudos *in vitro*, observou-se que as quitosanas inibiram significativamente a germinação de conídios e o crescimento micelial de *A. solani*. Entretanto, não foi observada uma inibição completa do desenvolvimento do fungo, indicando um efeito fungistático ao invés de fungicida. Esses resultados estão em consonância com os relatados por EL GHAOUTH *et al.* (1992) e BEN-SHALOM *et al.* (2003), que também não observaram inibições completas no desenvolvimento de *R. stolonifer* e *B. cinerea* quando a quitosana foi utilizada numa concentração máxima de 6 mg/mL e 0,1 mg/mL, respectivamente. A atividade antimicrobiana da quitosana e seus derivados já havia sido relatada sobre *A. solani*, e também sobre *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Valsa mali* (GUO *et al.*, 2006). Entretanto, os autores avaliaram uma quitosana apresentando maior grau de desacetilação (97%) em relação às avaliadas no presente estudo.

A Qcom, mais acessível no mercado e de menor preço, exibiu atividade antifúngica similar às outras duas obtidas a partir da Sigma Aldrich. Não houve efeito do peso molecular da quitosana sobre a germinação de conídios e o crescimento micelial de *A. solani*, já que não foram observadas diferenças entre as quitosanas utilizadas. Entretanto, estudos têm demonstrado que esta é uma característica que pode interferir na atividade do polissacarídeo. HERNÁNDEZ-LAUZARDO *et al.* (2008) observaram que houve um

efeito inibitório sobre o crescimento micelial de *R. stolonifer* utilizando-se uma quitosana de baixo peso molecular (Qbpm) a qual também provocou alterações na morfologia dos esporos. De maneira similar, LIU *et al.* (2007) verificaram marcante efeito de uma Qbpm sobre o crescimento micelial de *B. cinerea* e *Penicillium expansum*. Embora estes trabalhos tenham demonstrado o efeito do peso molecular na atividade polissacarídica, o exato mecanismo de atuação sobre o patógeno ainda não está totalmente esclarecido.

Acredita-se que a natureza catiônica colabore para a atuação da quitosana, uma vez que suas cargas positivas podem interagir com os resíduos carregados negativamente das macromoléculas expostas na superfície da célula de patógenos, causando alteração na permeabilidade da membrana celular (BENHAMOU, 1996). As quitosanas utilizadas nesse estudo foram similares entre si quanto ao grau de desacetilação da molécula, o que pode ter contribuído para uma resposta similar sobre o fitopatógeno.

Portanto, as quitosanas com diferentes pesos moleculares apresentaram um efeito antifúngico similar sobre *A. solani*.

REFERÊNCIAS

- AL-HETAR, M. Y.; ZAINAL ABIDIN, M. A.; SARIAH, M.; WONG, M. Y. Antifungal activity of chitosan against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. *Journal of Applied Polymer Science*, v.120, n.4, p.2434-2439, 2011.
- AMINI, J. Induced Resistance in Tomato Plants Against Fusarium Wilt Invoked by Nonpathogenic Fusarium, Chitosan and Bion. *The Plant Pathology Journal*, v.25, n.3, p.256-262, 2009.
- ARAÚJO, F.F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e Abiótico (Acibenzolar-S-Metil). *Summa Phytopathologica*, v.35, n.3, p.169-172, 2009.
- BADAWY, M.E.I.; RABEA, E.I. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v.51, n1, p.110-117, 2008.
- BENHAMOU, N. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science*, v.1, n.7, p.233-240, 1996.
- BENHAMOU, N.; KLOPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta*, v.204, p.153-168, 1998.
- BEN-SHALOM, N.; ARDI, R.; PINTO, R.; AKI, C.; FALLIK, E. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection*, v.22, p.285-290, 2003.
- EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology*, v.82, p.398-402, 1992.
- FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. FAO. 2007. Statistical – database. Disponível em: <<http://Faostat.fao.org>>. Acesso em: 9 set. de 2009.
- GUO, Z.; CHEN, R.; XING, R.; LIU, S.; YU, H.; WANG, P.; LI, C.; LI, P. Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities in vitro. *Carbohydrate Research*, v.341, p.351-354, 2006.
- HADWIGER, L.A.; BACKMAN, J.M. Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions. *Plant Physiology*, v.66, p.205-211, 1980.
- HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M.G.; MÉNDEZ-MONTEALVO, M.G.; SÁNCHEZ-RIVERA, M.M.; BELLO-PÉREZ, L.A. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*, v.73, p.541-547, 2008.
- IRITI, M.; FAORO, F. Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. *Plant Signal Behavior*, v.4, p.66-68, 2009.
- LIU, J.; TIAN, S.; MENG, X.; XU, Y. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v.44, p.300-306, 2007.
- LOBATO, M.C.; MACHINANDIARENA, M.F.; TAM-BASCIO, C.; DOSIO, G.A.A.; CALDIZ, D.O.; DALEO, G.R.; ANDREU, A.B.; OLIVIERI, F.P. Effect of foliar applications of phosphate on post-harvest potato tubers. *European Journal of Plant Pathology*. DOI: 10.1007/s10658-011-9741-2.
- LUO, Y.; ZHANG, D.; DONG, X.; ZHAO, P.; CHEN, L.; SONG, X.; WANG, X.; CHEN, X.; SHI, M.; ZHANG, Y. Antimicrobial peptaibols induce defense responses and systemic resistance in tobacco against tobaccomosaic virus. *FEMS Microbiology Letters*, v.313, p.120-126, 2010.
- MARCUCCI, E.; ALEANDRI, M.P.; CHILOSI, G.; MAGRO, P. Induced Resistance by β -Aminobutyric Acid in Artichoke against White Mould Caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Phytopathology*, v.158, p.659-667, 2010.
- OLIVEIRA, J.A. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.). 1991. 111p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 1991.

RAO, E.S.; MUNSHI, A.D.; SINHA, P.; RAJKUMAR.
Genetics of rate limiting disease reaction to *Alternaria solani* in tomato. *Euphytica*, v.159, p.123-134, 2008.

STATSOFT. *Electronic Statistics Textbook*. Tulsa. Disponível em: <<http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>>. Acesso em: 5 ago. 2008.

REGLINSKI, T.; ELMER, P.A.G.; TAYLOR, J.T.; WOOD, P.N.; HOYTE, S.M. Inhibition of *Botrytis cinerea* growth and suppression of botrytis bunch rot in grapes using chitosan. *Plant Pathology*, v.59, p.882-890, 2010.

Recebido em 16/6/10
Aceito em 2/5/11