

## EFEITO DAS MOLÉCULAS PHENYL SE CITRONELLAL E O PHENYL S CITRAL NA NEUTRALIZAÇÃO DE ENZIMAS LIGADAS A PATOGENICIDADE DE *COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM*.

MARIO FERNANDO PINEL ALVAREZ<sup>1</sup>; CIELO PAMELA MACHACA CALCIN<sup>2</sup>; ALICE  
BEATRIZ PEÑA MEDINA<sup>2</sup>; LUIZ GUILHERME LIDOINO DE CARVALHO<sup>2</sup>  
CÂNDIDA JACOBSEN DE FARIAS<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – maritopinel9@yahoo.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – machacacalsinpamela@gmail.com;  
ecilabeatriz@gmail.com; guilhermelidoino2000@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – jacobsencandida@gmail.com

### 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., 2017).

A patogenicidade do fungo da antracnose está relacionada com o mecanismo de ação adotado pelo patógeno, como a produção de toxinas e enzimas (CARDOSO 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).

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).

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). Estes compostos podem ser usados contra um amplo espectro de espécies de microrganismos (ANTUNES e CAVACOB, 2010).

Assim, este trabalho teve como objetivos avaliar *C. lindemuthianum* do feijão, quanto à patogenicidade através de médio específico tratados com moléculas que possuem propriedades antimicrobianas; avaliando a atividade de enzimas extracelulares produzidas pelo agente causal da antracnose *C. lindemuthianum*.

### 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 NaNO<sub>3</sub>; 1,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g de KCl; 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O; 0,01 g de FeSO<sub>4</sub>; 0,01 g de ZnSO<sub>4</sub> 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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,5 g de asparagina, 0,5 g de KCl; 0,2 g de MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O; 0,1 g de CaCl<sub>2</sub>; 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).

### 3. RESULTADO E DISCUSSÃO

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, 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 na (Tabela. 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.

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

Tratamento	Índice enzimático (H/C)
Phenyl S Citral 0,0625	0,79 BC
Phenyl S Citral 0,125	0,88 CD
Phenyl S Citral 0,25	0,86 CD
Phenyl Se Citronelal 0,0625	0,72 AB
Phenyl Se Citronelal 0,125	0,67 A
Phenyl Se Citronelal 0,25	0,87 CD
Dimetilsulfóxido (DMSO)	0,91 D
Testemunha	0,85 CD

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

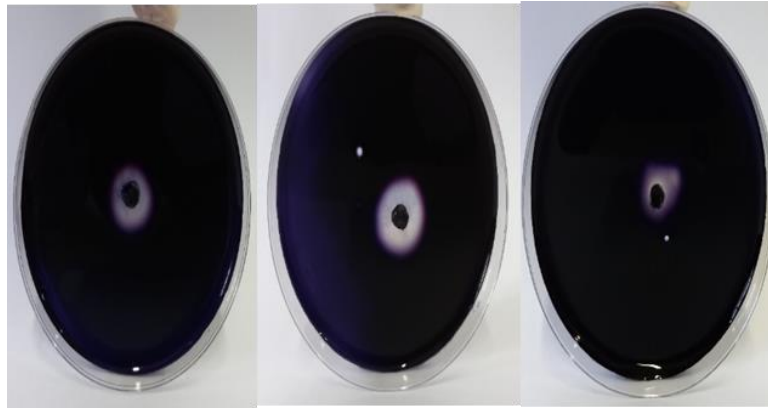


Figura 1. Halo de degradação de atividade amilolítica.

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 (Tabela. 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 carboximetilcelulase (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 grau desta enzima.

Resultados semelhantes também foram obtidos por Assis *et al.* (2010), onde demonstraram uma baixa produção de amilase em *Colletotrichum gleosporoides*. 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 (Tabela. 4). 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.

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

Tratamento	Índice enzimático (H/C)
Phenyl S Citral 0,0625	0,14 Aa
Phenyl S Citral 0,125	0,13 Aa
Phenyl S Citral 0,25	0,12 Aa
Phenyl Se Citronelal 0,0625	0,13 Aa
Phenyl Se Citronelal 0,125	0,13 Aa
Phenyl Se Citronelal 0,25	0,18 Aa
Dimetilsulfóxido (DMSO)	0,12 Aa
Testemunha	0,13 Aa

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

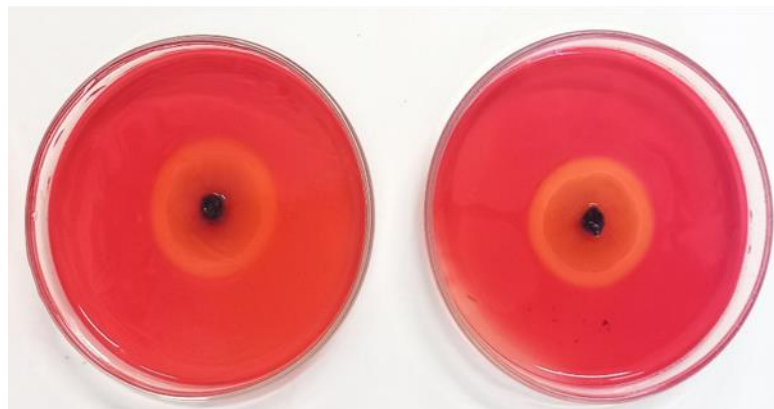


Figura 2. Halos de degradação da atividade celulolítica.

Conforme mostrado na (Tabela 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.

#### 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, as doses mais elevadas apresentaram-se promissoras.

#### 5. 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
- 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.
- 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.
- KUHN, O. J. Inducao de resistencia em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspecto fisiológico, bioquímico e parâmetros de crescimento e producao. 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.
- 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.
- 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.