ANALISE ANTIFÚNGICA *IN VIVO*: BUSCA DE PROTOCOLO ADEQUADO PARA MINI TOMATE COM COBERTURA COMESTÍVEL ATIVA

Cláudia Moreira Santa Catharina WEIS[1], Emerson Wendes Santos PARAGUASSÚ[2], Jaqueline PASTRO[2], Felipe Guilherme Brunetto BRETSCHNEIDER[2], Franciélly STADLER[3], Edilaine Mauricia Gelinski GRABICOSKI[2], Alessandra MACHADO-LUNKES[3]

[1] Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos
Universidade Estadual de Londrina
Londrina – Paraná – Brasil

[2] Departamento Acadêmico de Ciências Agrárias
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Francisco Beltrão
Francisco Beltrão – Paraná – Brasil

[3] Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Francisco Beltrão e Londrina
Paraná – Brasil

E-mails: engalimclaudiaweis@gmail.com, emersonp@alunos.utfpr.edu.br, jaquelinepastro@alunos.utfpr.edu.br, felipebretschneider@gmail.com, stadler.alipr@gmail.com, edilainem@utfpr.edu.br, amachado@utfpr.edu.br

Resumo: *Frente à necessidade de tecnologias para conservação pós-colheita de frutos, o uso de antimicrobianos naturais, como o carvacrol, em coberturas comestíveis para reduzir doenças fúngicas é uma alternativa. Assim, a potencialidade destas coberturas ativas em promover inibição do crescimento fúngico precisa ser confronta em análises antifúngicas in vitro ou in vivo frente ao fungo deteriorante de interesse. O estudo concentrou-se em mini tomates e teve como objetivo determinar o melhor protocolo de inoculação de Alternaria alternata em mini tomates com cobertura comestível ativa. Os ensaios antifúngicos in vivo tomaram como base protocolos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa para morango e maçã. Para ambos os vegetais foram feitas análises in vivo e in vitro avaliando os microrganismos que os acometem no período de pós colheita com maior frequência. Evidenciou a incidência de doenças fúngicas nos tomates após 96 horas, independentemente dos danos causados propositalmente nos frutos. Conclui-se que adequar o método de inoculação para as características específicas de cada fruto é fundamental para garantir uma análise precisa, com resultados reprodutíveis, bem como aprimorar as estratégias de aplicação de revestimentos ativos na conservação pós-colheita de frutos.*

Palavras-chave: *Frutas; Pós colheita; Revestimento ativo; Análise microbiológica.*

INTRODUÇÃO

A necessidade de aumento na qualidade pós-colheita dos alimentos frescos, em especial frutas, verduras e legumes demanda novas tecnologias para conservação e aumento da vida útil dos mesmos (OLIVAS, BARBOSA-CÁNOVAS, 2014). Estima-se que um terço das frutas e hortaliças são danificadas e descartadas durante o transporte e armazenagem (DUTOT; NELSON; TYSON, 2013; KOBLITZ, 2018; SEBRAE, 2015). O percentual expressivo de desperdício desses alimentos, mostra a demanda crescente por maneiras de mitigar as perdas pós-colheita e garantir a manutenção da qualidade dos frutos, além de aumentar a vida útil destes produtos (VAN LONG, JOLY, DANTIGNY, 2016).

Uma forma de reduzir ou controlar o desenvolvimento de doenças fúngicas é o uso de antimicrobianos naturais, como o carvacrol (ABBASZADEH *et al*., 2014). A elaboração de coberturas comestíveis passou a ser uma alternativa para a conservação de frutos póscolheita, assim que reduzem a perda de massa e a contaminação por agentes externos (SOUZA *et al*., 2012; RESENDE, 2015). No entanto, as análises antifúngicas dependem tanto da natureza do agente microbiano adicionado à cobertura, quanto do fruto utilizado.

Entre as variedades de tomate com grande potencial para ser recoberto com solução polimérica contendo carvacrol estão os mini tomates, apreciados pelo sabor adocicado (GUILHERME *et al.*, 2008), mas com alto valor agregado e baixa vida útil. A curta vida útil deve-se às suas características fisiológicas (fruto climatérico, composição química) e também a susceptibilidade à insetos e microrganismos (KOBLITZ, 2018). Concatenando o cenário de desafios para ampliação da vida útil média dos mini tomates (10 dias) (FARIA *et al.*, 2006) e as novas tecnologias para embalagens comestíveis com antimicrobianos naturais (CHIUMARELLI, FERREIRA, 2006; ESPITIA *et al.*, 2012; OLIVEIRA, CONEGLIAN, CARMO, 2015), torna-se de grande relevância o estudo para a melhoria da conservação póscolheita deste fruto.

Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo determinar qual o melhor protocolo para realizar as análises antifúngicas *in vivo* de acordo com a forma de inoculação dos microrganismos em mini tomates e presença ou não de dano físico no fruto.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Para aumentar qualidade pós-colheita de frutas e hortaliças e consequentemente ampliar a vida útil destes produtos torna-se necessário a aplicação de tecnologia e inovação a fim de minimizar a evolução dos efeitos fisiológicos e microbiológicos durante o armazenamento (BRACKMAN *et al.*, 2007, MOHAMMAD *et al.*, 2016). As coberturas comestíveis adicionadas de antimicrobianos naturais são alternativas que controlam aspectos fisiológicos e atuam como inibidor do crescimento de microrganismos (VAN LONG, JOLY, DANTIGNY, 2016).

O tomate é um fruto climatérico, ou seja, ele mantém o processo de amadurecimento mesmo quando retirado da planta (colhido imaturo) (CHITARRA, CHITARRA, 2005). Entre as variedades promissoras comercializadas está o cereja (*Lycopersicon esculentum var. cerasiforme)* que é originário da América do Sul. Seus frutos apresentam dimensões de 1,5-3 cm (DELIZA *et al*., 2007) e sua demanda vem crescendo no ambiente comercial, pois além de suas características de sabor, apresentam alto valor nutricional e aparência atrativa (GUILHERME *et al.*, 2008). Porém, a variedade apresenta baixa vida útil, sendo considerado altamente perecível (HOU *et al.*, 2015).

As perdas atribuídas a frutos por ação de microrganismos estão associadas ao pH e fisiologia da casca, antes ou após a colheita. Os fungos são os principais agentes deteriorantes dos frutos (ACOSTA *et al*., 2016). Este processo se inicia antes ou após da colheita. Os principais fungos deteriorantes de frutos são *Botrytis cinerea* (bolores cinza), *Colletotrichum* ssp. (responsável pela antracnose). Embora os fungos ataquem frutos machucados e danificados, a grande parte da deterioração ocorre na pós-colheita (JAY, 2005).

No tomate cereja, a *Alternaria alternata* causa grandes perdas pós-colheita associadas à podridão negra (YAN *et al*., 2016; SHEMESH *et al.*, 2016). Para confirmar os resultados das análises *in vitro*, se torna necessário a realização de ensaios antifúngicos *in vivo*, e também a incidência de doenças ao longo da estocagem. De fato, o estudo realizado por Catharina *et al*. (2019) com tomates revestidos, demonstrou que o carvacrol teve ação contra o fungo *Alternaria alternata*, principalmente nas concentrações de 0,6 e 0,3 mg de carvacrol.g^{-1} de solução filmogênica em análises antifúngicas *in vitro*.

METODOLOGIA

A solução filmogênica para revestimento dos mini tomates seguiu o protocolo descrito por Romio *et al*. (2017). Na preparação de 0 mg carvacrol.g^{-1} solução de revestimento foi utilizado fécula de mandioca (ACS) (Pinduca Alimentos, Brasil), gelatina tipo A (GEL) (Gelita, Brasil), glicerol (Synth, Brasil), Miglyol 812 (Sasol, Alemanha) e lecitina (Alfa Aesar, Estados Unidos). Neste revestimento não foi adicionado carvacrol (CA) e a mesma foi nomeada de 0.0CA-ACS/GEL. O revestimento dos mini tomates aconteceu de acordo com o relatado por Bretschneider *et al*. (2019).

Resumidamente, os mini tomates (Sweet Grape ®) foram adquiridos no comércio local, selecionados com base em tamanho homogêneo, maturidade, cor e ausência de danos. Em seguida, para o ensaio antifúngico *in vivo*, os tomates uva foram superficialmente desinfetados mergulhando-os em solução de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 3 min, enxaguando com água destilada estéril e secando-os à temperatura ambiente. Para a definição do protocolo de análise antifúngica *in vivo* 22 tomates previamente sanitizados foram usados.

Eles foram divididos em dois grupos, cada um contendo 11tomates. Um grupo de forma asséptica foi submetido a um dano no corpo e outro na região onde havia o pedúnculo, esse dano consistiu em um furo de 2 mm de largura por 3 mm de profundidade. O segundo grupo era constituídos de frutos nos quais não foram realizados danos, ou seja, um grupo controle. Os frutos, de ambos os grupos, foram imersos em solução de revestimento por 2 minutos e drenados para que a solução secasse sobre a superfície dos mesmos.

Em seguida, foram testados dois diferentes protocolos de inoculação de microrganismo: aspersão e injeção. Quando realizada a aspersão, o procedimento foi feito com borrifador esterilizado contendo uma solução com o fungo *Alternaria alternata* (CCT 2816) (1×10^5 esporos mL^{-1}), cerca de 2,5 mL eram aspergidos por fruto. No caso da injeção, foi feita a inoculação através de um furo de 3 mm de profundidade, produzido com a ponta da ponteira da micropipeta de 100 µL por fruto, sendo injetado, aos poucos, volume equivalente a 20 µL por fruto (10 µL em cada um dos danos). Os tomates foram colocados em embalagens plásticas de polipropileno previamente desinfetadas e incubados a 25 ºC.

Posteriormente, todo o experimento foi repetido, em triplicata, desta vez com as seguintes formas de inoculação, cada uma delas representando um tipo de tratamento: (i) por imersão, os tomates forma postos eu um béquer de 250 mL, contendo a solução de inoculo padronizada por um período de três minutos, foram precisos cerca de 10 mL de solução de inoculo por fruto; (ii) por aspersão, através do uso de borrifador esterilizado contendo a solução de inoculo padronizada, estima-se que foi preciso 2,5 mL por fruto; (iii) por injeção de 10 uL por dano, cada dano continha 3 mm de profundidade. Nesta repetição, os experimentos foram realizados com 11 frutos por tratamento e cada um deles sofreu um dano na região central do corpo e um dano onde se encontrava o pedúnculo.

Em ambos ensaios, foi avaliado o efeito do revestimento comestível na incidência da doença durante quatro dias, em que os frutos foram avaliados a cada 24 horas. Os dados de incidência de doença (mancha preta de *Alternaria*) foram expressos como a porcentagem de frutos que apresentaram sintomas de podridão fora do número total de frutos em cada tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro ensaio antifúngico *in vivo*, em que foi avaliado a incidência das doenças nos tomates recobertos pela solução 0.0CA-ACS/GEL em 96 horas todos os frutos já apresentavam doença (Tabela 1). As manifestações eram caracterizadas pela presença de manchas pretas, mofo branco ou acinzentado (CHIUMARELLI; FERREIRA, 2006; DELIZA *et al*., 2007). No entanto, notou-se que a doença não iniciou necessariamente no dano, para o caso dos tomates que sofreram injúria proposital.

Em um estudo realizado com maçãs, o método de inoculação para realização do ensaio antifúngico *in vivo* consistiu na injeção do inóculo diretamente em feridas realizadas no fruto, para que fosse possível observar o desenvolvimento da doença a partir da zona de podridão (VIEIRA *et al.*, 2013). Por outro lado, o trabalho realizado com morangos por Bretschneider *et al*. (2019), fez uso do método de inoculação por aspersão, e em função da sensibilidade do fruto não foi feito dano proposital. De fato, nos ensaios onde o dano proposital foi realizado em 24 horas de ensaio todas as unidades amostrais apresentavam

doença. Já em outro ensaio *in vivo* realizado com morangos, foi utilizado a injeção dos microrganismos no dano proposital feito na superfície do fruto (WIGATI *et al*., 2023).

Nota-se que o protocolo de inoculação para os ensaios *in vivo* não segue um padrão, dependendo não só do tipo de fruto, mas da viabilidade da execução.

Tabela 1 – Manifestação da doença fúngicas, em porcentagem, para os tomates com e sem danos

Tempo (h)	**Aspersão (% de frutos doentes)**	
	Sem dano	**Sem dano**
24	36,39	36,39
48	54,54	36,39
72	81,81	90,90
96	100	100

Fonte: Autoria própria (2023)

Para o segundo ensaio *in vivo* verificou-se que as manifestações de doença tanto para o método de inoculação por imersão, quanto injeção, foram abruptas. Por outro lado, para o método de inoculação por aspersão, as manifestações de doença foram graduais. Na tabela 2 fica claro que para imersão e injeção, em 48 horas as manifestações fúngicas já abrangiam a totalidade da amostra.

Tabela 2 - Manifestação de doença fúngicas, em porcentagem, para os tomates com diferentes métodos de inoculação

Tempo(h)	**Método de inoculação (% de frutos doentes)**		
	Imersão	**Aspersão**	**Injeção**
24	0	0	0
48	72,72	36,36	90,90
72	90,90	63,63	90,90
96	90,90	90,90	90,90

Fonte: Autoria própria (2023)

Ao levar em conta o tipo de fruto utilizado e a viabilidade do método de inoculação do microrganismo para o ensaio *in vivo*, entende-se que o melhor protocolo de inoculação de microrganismos para os mini tomates é a injeção. Assim que, a quantidade de solução com o inóculo é menor quando comparada aos demais métodos e que a doença progride de maneira localizada, o que permite melhor observação e controle do desenvolvimento da mesma.

O método de inoculação por aspersão, apesar de apresentar um desenvolvimento gradual, não direciona o fungo de forma específica, o que posteriormente dificulta a visualização clara da doença. Além disso, tanto para imersão quanto para aspersão, é necessária uma quantidade maior de inóculo.

O protocolo de inoculação por injeção é semelhante ao método utilizado por outros trabalhos que realizaram ensaio *in vivo* com tomates cereja, onde danos foram feitos na superfície do tomate e posteriormente foi realizada a inoculação (GUO *et al.*, 2023; ZHENG *et al.*, 2023; WU *et al.*, 2022). Em um trabalho mais antigo com tomate cereja, o método de inoculação empregado foi a imersão (ÁLVAREZ *et al.*, 2021).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos, observou-se que a inoculação por injeção foi o método mais adequado em comparação com a aspersão e a imersão para trabalhos com mini tomates. De outro modo, a aspersão pode ser uma opção mais adequada para frutos mais sensíveis, os quais podem ser danificados pela injeção, a exemplo o morango, e ainda oferecendo uma proteção antifúngica eficiente. Portanto, a escolha do método de inoculação dependerá das características específicas dos frutos em questão.

REFERÊNCIAS

ABBASZADEH, S. *et al*. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal of Mycologie Médicale*, v. 24, n. 2, p.51-56, 2014.

ACOSTA, S.; CHIRALT, A.; SANTAMARINA, P.; ROSELLO, J.; GONZÁLEZ–MARTÍNEZ, C.; CHÁFER, M. Antifungal films based on starch-gelatin blend, containing essential oils. *Food Hydrocolloids*. v. 61, p. 233-240, 2016.

ÁLVAREZ, A. *et al*. Use of an exopolysaccharide-based edible coating and lactic acid bacteria with antifungal activity to preserve the postharvest quality of cherry tomato. LWT, v. 151, p. 112225, 2021. *Elsevier BV*. http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112225.

BRACKMAN, A. *et al*. Armazenamento de tomate cultivar “Cronus” em função do estádio de maturação e da temperatura. *Ciência Rural*, v. 37, n. 5, p. 1295-1300, 2007.

BRETSCHNEIDER, F. G. B., *et al*. Atividade antifúngica in vitro e in vivo de revestimento comestível ativo contra *Colletotrichum* sp. *Higiene Alimentar*, v.33, p.2687- 2691, 2019.

CATHARINA, C. M. S.; BRETSCHNEIDER, F. G. B.; PIVA, B.; WEBER, CLEUSA, I.; STADLER, F; ROMIO, A. P. Edible coating containing carvacrol for postharvest microbiological conservation of tomatoes. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v. 6, n. 1, p. 4786-4794, 2019.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: FAEPE, 2° Edição, 2005.

CHIUMARELLI, M.; FERREIRA, M. D. Qualidade pós – colheita de tomates "Débora" com utilização de diferentes coberturas comestíveis e temperaturas de armazenamento. *Horticultura Brasileira*, v. 24, n.3, p. 381 – 385, 2006.

DELIZA, R.; ROCHA, M.C.; CARMO, M. G. F.; ABBOUD, A. C. S; Comunicado técnico: perfil sensorial de tomate tipo cereja *in natura*. *Embrapa*, 2007.

DUTOT, M.; NELSON, L.M.; TYSON, R.C. Predicting the spread of postharvest disease in stored fruit, with application to apples. *Postharvest Biology and Technology*, v. 85, n. 1, p. 45–56, 2013.

ESPITIA, P. J. P.; SOARES, N. F. F.; BOTTI, L. C. M. MELO, N. R.; PEREIRA, O. L.; SILVA, W. A. Assessment of the efficiency of essential oil in the preservation of postharvest papaya in an antimicrobial packaging system. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 15, n. 4, p. 307-316, 2012.

FARIA, T. J.; FERREIRA, R. S.; YASSUMOTO, Lidiane, SOUZA, J. R. P.; ISHIKAWA, N. K.; BARBOSA, A. M. Antifungal actibity of essential oil isolated from *Ocimungratissimum L*. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 49, n. 6, p. 867-871, 2006.

GUILHERME, D. O.; PINHO, L.; COSTA, C. A.; ALMEIDA, C.; PAES, M. C. D.; RODRIGUES, R. J. A.; CAVALCANTI, T. F. M.; TELES FILHO, S. C.; ENEZES, J. B.; SALES, S. S. Análise sensorial e físico – química em frutos de tomate orgânico. *Horticultura brasileira*, v.26, n.2, p.171 – 175, 2008.

GUO, Jianheng *et al*. Antifungal activity of volatile compounds from Bacillus tequilensis XK29 against Botrytis cinerea causing gray mold on cherry tomatoes. Postharvest Biology and Technology, [S.L.], v. 198, p. 112239, abr. 2023. *Elsevier BV*. http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112239.

HOU, Y.; GAO, J.; GU, li; WANG, S.; ZENG, R. Effects of agaro-oligosaccharide treatment on postharvest quality of cherry tomatoes during cold storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, n.39, p. 949-955, 2015.

JAY, J. M. Microbiologia de alimentos, 6ª Ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.

KOBLITZ, M. G. B. Matérias - primas alimentícias: composição e controle da qualidade. *Guanabara Koogan*, 2018.

MOHAMMAD, G.; JAFARI, S. M.; DUSTI, A.; DEHRAD, D.; AMANJANI, M.; GHANBARI, V. Modeling quality changes in tomato paste containing microencapsulated olive leaf extract by accelerate shelf life testing, *Food and Bioproducts Processing*, v. 97, p.12-19, 2016.

OLIVAS, G. I.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; Edible coatings for fresh-cut fruits, *Critical reviews in Food Science and nutrition*, v. 45, p. 657-670, 2014.

OLIVEIRA, C. M.; CONEGLIAN, R. C. C.; CARMO, M. G. F. Conservação pós-colheita de tomate cereja revestidos com película de fécula de mandioca, *Horticultura Brasileira*, v. 33, n.4, p. 471-479, 2015.

RESENDE, N. S. Elaboração de bionanocompósito quitosana/nanofibra de celulose e seu efeito sobre a qualidade de morangos. 2015. 102 f. Dissertação – Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 2015, p.102.

ROMIO, A. P.; MACHADO-LUNKES, A.; BRUSAMARELLO, C. Z.; BERTAN, L. C.; OLIVEIRA, L.; ASSIS, O. B.; TEO. Encapsulação do carvacrol em filmes comestíveis de amido de mandioca e gelatina. Anais do IX Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio. Embrapa Instrumentação, p. 213-216, 2017.

SISTEMA DE APOIO A MICRO E PEQUENA EMPRESA – SEBRAE. Agronegócio Fruticultura. Brasília: *SEBRAE*, 2015. 5 p. (Boletim Técnico).

SHEMESH, R.; KREPKER, M.; NITZAN, N.; VAXMAN, A.; SEGAL, E. Active packaging containing encapsulated carvacrol for control of postharvest decay. *Postharvest Biology and Technology*, v. 118, p. 175-182, 2016.

SOUZA, R. M. S.; SERRA, I.M. R.; MELO, T. A. Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de Colletotrichum gloeosporioides, em pimenta. *Summa Phytopathologica*, v.38, n.1, p.42-47, 2012.

VAN LONG, N. N.; JOLY, C.; DANTIGNY, P. Active packaging with antifungal activities. *International Journal of Food Microbiology*, v. 220, p. 73 – 90, 2016.

WIGATI, L. P. *et al*. Strawberry preservation using combination of yam bean starch, agarwood Aetoxylon bouya essential oil, and calcium propionate edible coating during cold storage evaluated by TOPSIS-Shannon entropy. Progress In Organic Coatings, [S.L.], v. 175, p. 107347, fev. 2023. *Elsevier BV*. http://dx.doi.org/10.1016/j.porgcoat.2022.107347.

WU, X. *et al*. Fabrication of colloidal stable gliadin-casein nanoparticles for the encapsulation of natamycin: molecular interactions and antifungal application on cherry

tomato. *Food Chemistry*, [S.L.], v. 391, p. 133288, out. 2022. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133288.

YAN, F.; HU, H.; LU, L.; ZHENG, X. Rhamnolipids induce oxidative stress responses in cherry tomato fruit to *Alternaria alternata*. *Manager Science*, n.72, p. 1500-1507, 2016.

ZHENG, L. *et al*. Antifungal activity of Bacillus mojavensis D50 against Botrytis cinerea causing postharvest gray mold of tomato. *Scientia Horticulturae*, [S.L.], v. 312, p. 111841, mar. 2023. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2023.111841.