

## **Ação antibiótica de metabólitos de *Penicillium citrinum* Thom. sobre *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl.**

Cleber Novais Bastos<sup>1</sup>

### **Resumo**

Foi verificada a presença do fungo *Penicillium citrinum* Thom. como contaminante em culturas de *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl., um dos agentes causais da podridão parda do cacau. Observações preliminares revelaram que a cepa de *P. citrinum* possui uma marcante ação antagônica sobre o *P. palmivora*. Testes realizados com a substância antibiótica parcialmente purificada mostraram que o princípio ativo foi inibidor a *P. palmivora*, tanto ao crescimento micelial *in vitro* como à capacidade de produzir lesões *in vivo*.

*Palavras-chave:* *Theobroma cacao*, *Penicillium citrinum*, *Phytophthora palmivora*, ação antibiótica.

## **Antibiotic action of metabolites from *Penicillium citrinum* Thom. on *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl.**

### **Abstract**

A strain of the fungus *Penicillium citrinum* Thom. was detected as contaminant in cultures of *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl., an agent of the Black Pod disease of cacao. Preliminary observation showed that the strain of *P. citrinum* has a great antagonistic effect on *P. palmivora*. Tests carried out with the partially purified antibiotic showed that the active ingredient was considerably toxic to *P. palmivora* to both mycelial growth *in vitro* and on lesion formation capacity *in vivo*.

*Key words:* *Theobroma cacao*, *Penicillium citrinum*, *Phytophthora palmivora*, antibiotic action.

CEPLAC - Departamento Especial da Amazônia, Divisão de Fitopatologia, Caixa Postal 1801, 66.000, Belém, Pará, Brasil.

## Introdução

A classificação de organismos antagônicos a *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. e caracterização de seus produtos metabólicos são de grande interesse, devido à importância do patógeno no complexo da podridão parda do cacau-eiro.

Em placas de Petri com culturas de *P. palmivora*, foi observada a presença de um fungo contaminante, possuidor de marcante capacidade antagônica ao patógeno. O antagônico foi isolado e determinado como sendo *Penicillium citrinum* Thom., segundo identificação procedida no Commonwealth Mycological Institute, Kew, Inglaterra.

Segundo Waksman (1945), De Bary foi o primeiro a estudar o significado das relações antagônicas entre microrganismos, mostrando que, quando dois microrganismos crescem no mesmo substrato, cedo ou tarde, um ultrapassa o outro e, eventualmente, o destrói. Diversos experimentos têm evidenciado que substâncias secretadas por um dos organismos podem apresentar toxicidade para o outro (Lacaz, 1969).

Os trabalhos sobre antibiose e o seu uso no controle de doenças de plantas não são um campo recente de pesquisa e, na literatura, são encontradas inúmeras citações (Leben e Keitt, 1952; Cercós, 1957; Gottlieb e Pote, 1960; Brian, 1960; Horner, 1963; Howel e Stipanovic, 1979). Entretanto, no Brasil, são raras as pesquisas nesse campo e os trabalhos realizados referem-se, em sua maioria, à inibição *in vitro*.

O presente trabalho teve como objetivo comprovar a capacidade antagônica, determinar uma metodologia para produzir e purificar a substância antibiótica do *P. citrinum* e testar sua ação no controle de *P. palmivora in vitro e in vivo*.

## Material e Métodos

**Teste de antagonismo.** Os testes para determinar a capacidade antagônica foram conduzidos em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo 20 ml de meio BDA (batata-dextrose-agar), sendo o antagônico colocado em três pontos equidistantes. Em intervalos de 0, 24, 48 e 72 horas, foi implantado, no centro de cada placa, um disco de micélio de 5 mm de diâmetro de *P. palmivora*, sendo as placas posteriormente incubadas a  $25 \pm 1$  °C.

**Produção e purificação do líquido metabólico.** Na produção do líquido metabólico, foram utilizados frascos Erlenmeyer com capacidade de 250ml, contendo 50ml de meio batata-dextrose (batata - 200g; dextrose 20g e água destilada - 1.000ml) com o pH ajustado para 5,8 com NaOH a 0,1N. Após a esterilização em autoclave a 120 °C durante 15 minutos, cada frasco foi inoculado com 1 ml de suspensão de esporos em água destilada e esterilizada proveniente de uma cultura de *P. citrinum* em BDA com 8 dias de idade. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente do laboratório (25 - 28 °C), sem agitação, durante 8 dias. Após este período de incubação, foi procedida a filtração a vácuo e a esterilização do filtrado efetuada me-

diante a passagem em filtro Seitz (0,22  $\mu$ ).

O filtrado de cultura em volume correspondente a 200ml foi ajustado para pH 3,0 com HCl a 1N e submetido à extração com igual volume de n-butanol em um funil separador. Depois da separação, a fase aquosa foi descartada e a fase orgânica evaporada a vácuo num evaporador rotatório a 40 °C até secagem total.

**Cromatografia em sílica gel.** A purificação e isolamento da substância antibiótica foi feita por cromatografia de camada fina (2mm) em sílica gel (Merck 60 F254), usando-se o sistema de solventes butanol: ácido acético: água (12:3:5, v/v/v). A visualização do princípio ativo foi feita sob luz ultravioleta e a zona correspondente ao antibiótico foi removida da placa e imediatamente eluída em metanol. Em seguida a este procedimento, o solvente foi filtrado através de papel de filtro Whatman n.º 1 e evaporado até secagem total a 40 °C, sendo o resíduo resultante dissolvido em 5ml de água destilada e esterilizada.

**Ensaio biológico *in vitro*.** Para avaliação do efeito inibidor do líquido metabólico purificado, foi empregado o método de difusão através de cilindro de vidro em placa (Cercós, 1957). Anéis de vidro, previamente esterilizados, de 5mm de diâmetro e 10mm de altura foram colocados no centro de placas de Petri sobre o meio BDA, sendo, posteriormente, depositadas no interior dos anéis alíquotas de 10, 30, 50 e 70  $\mu$ l do líquido metabólico purificado. A seguir, três discos de mi-

célio de 5mm de diâmetro de *P. palmivora* foram implantados em pontos equidistantes, próximo à parede das placas, e estas incubadas a 25 °C sob luz contínua (General Electric 40W - Luz do dia). Para cada concentração, foram usadas três placas de Petri.

**Ensaio biológico *in vivo*.** Frutos verdes de cacau (IMC - 67 x Catongo) de 3 - 4 meses de idade, em número de 5, foram atomizados através de um atomizador De Vilbiss com 25% de solução antibiótica purificada. Após 3 horas de aplicação, procedeu-se a inoculação mediante a deposição de 2 discos de micélio (10mm de diâmetro) de *P. palmivora* sobre a superfície de cada fruto. Os frutos foram, posteriormente, postos em sacos plásticos contendo algodão embebido em água destilada para manter o ambiente saturado de umidade. Procedimento semelhante foi adotado com os frutos testemunhas, os quais foram atomizados apenas com água destilada.

## Resultados e Discussão

O *Penicillium citrinum* desenvolveu atividade antagonista sobre *P. palmivora*, mesmo quando os dois organismos foram colocados simultaneamente na mesma placa (Figura 1). Obedecendo ao intervalo de 72 horas após a implantação do antagonista nas placas de Petri, verificou-se que o crescimento da colônia de *P. palmivora* foi totalmente paralisado (Figura 1). As placas foram mantidas por duas semanas sob condições de laboratório e não mostraram qualquer modificação com relação ao crescimento de *P. palmivora*. Isto sugere que a



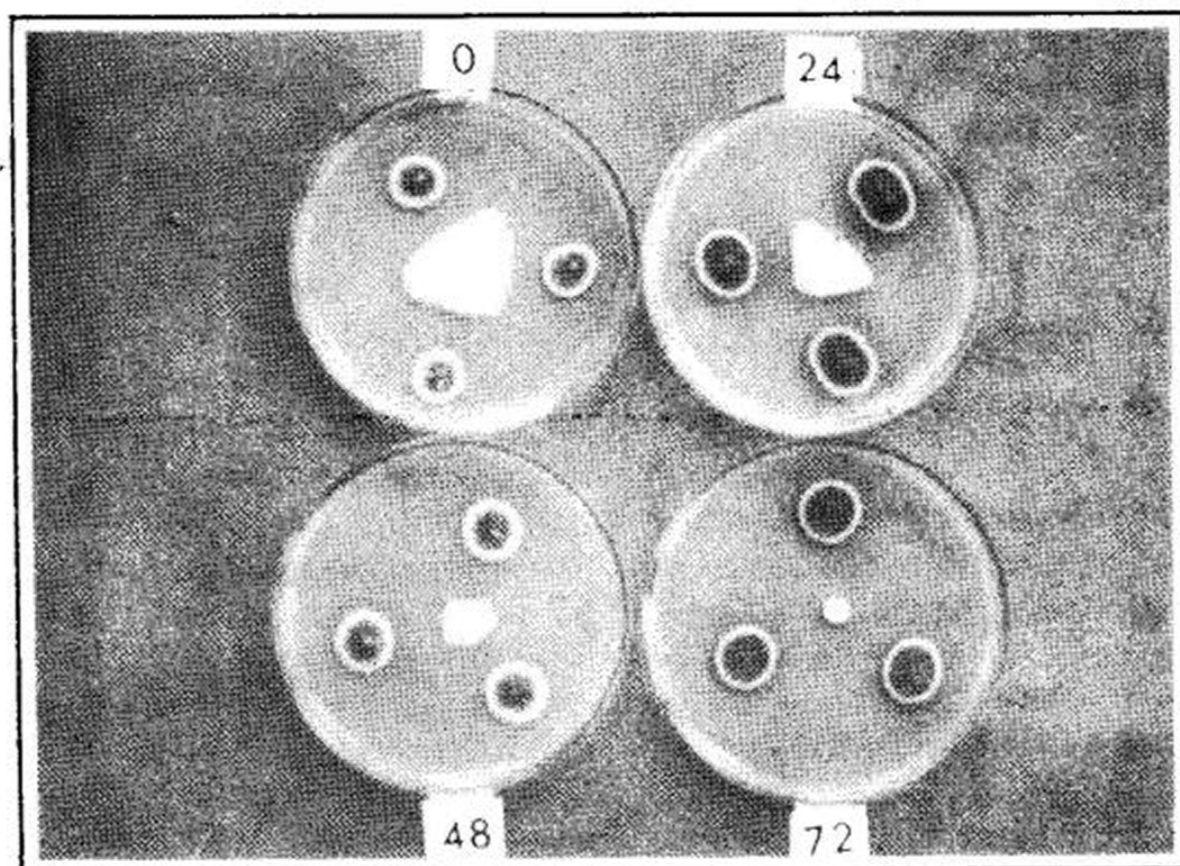


Figura 1 – Antibiose entre colônias de *P. palmivora* e *P. citrinum* após 0, 24, 48 e 72 horas de inoculação com o antagonico. Foto – 8 dias após as inoculações.

zona de inibição produzida entre os dois organismos é decorrente da liberação de substância(s) tóxica(s) pelo antagonico no meio de cultura, impedindo o desenvolvimento do patógeno. Com base nesses resultados, foi realizado o cultivo do antagonico em meio líquido e efetuado o isolamento do princípio ativo inibidor através do tratamento do filtrado de cultura com solvente orgânico.

Preliminarmente, foram empregados vários solventes no processo de purificação do líquido metabólico de *P. citrinum*. Todavia, foi no fracionamento do filtrado de cultura em butanol que se conseguiu maior concentração do princípio ativo inibidor ao *P. palmivora*.

A análise cromatográfica da substância inibitória revelou a presença de uma mancha amarela fluorescente, sob ultravioleta, localizada no Rf 0,83, a qual está associada à atividade antibiótica.

Paralelamente, foi demonstrado que o produto metabólico de *P. citrinum* é termoestável, sendo capaz de ser autoclavado a 120 °C durante 20 minutos sem alterar a sua atividade biológica. Em testes de solubilidade, a substância foi solúvel em metanol, etanol, clorofórmio, éter etílico e acetona. Nas análises qualitativas (Plummer, 1978), apresentou reação positiva nos testes de Antrone, Fehling e Molish e reação negativa nos testes ninidrina, xantoprotéico

e biureto.

Glasby (1979) faz referência a um antibiótico produzido por uma raça de *P. citrinum* SANK (FERM-P 2609), codificado como Antibiótico ML - 236 A. Porém, as características físico-químicas e biológicas diferem daquelas da raça por nós estudada. Segundo Waksman (1959), diferentes raças de uma mesma espécie de organismo podem produzir antibióticos quimicamente diferentes.

A Figura 2 mostra a atividade inibidora do líquido metabólico purificado sobre o desenvolvimento de *P. palmivora*. Pode ser observado que, nas placas onde foi colocada a substância inibidora, o crescimento do fungo foi

retardado acentuadamente e que maiores zonas de inibição ocorreram em função da concentração do princípio ativo que se difundiu no meio de cultura. Por outro lado, nas placas testemunhas, apresentaram um desenvolvimento normal das colônias, as quais cobriram toda a placa após 6 dias de incubação.

Nos ensaios realizados *in vivo*, verificou-se que, nos frutos tratados com antibiótico, *P. palmivora* não causou lesões, enquanto que, nos frutos testemunhas, foram observadas lesões necróticas com aproximadamente 35mm de raio (Figura 3), 72 horas após a inoculação. Observou-se, ainda, que o metabólito não foi fitotóxico à epider-

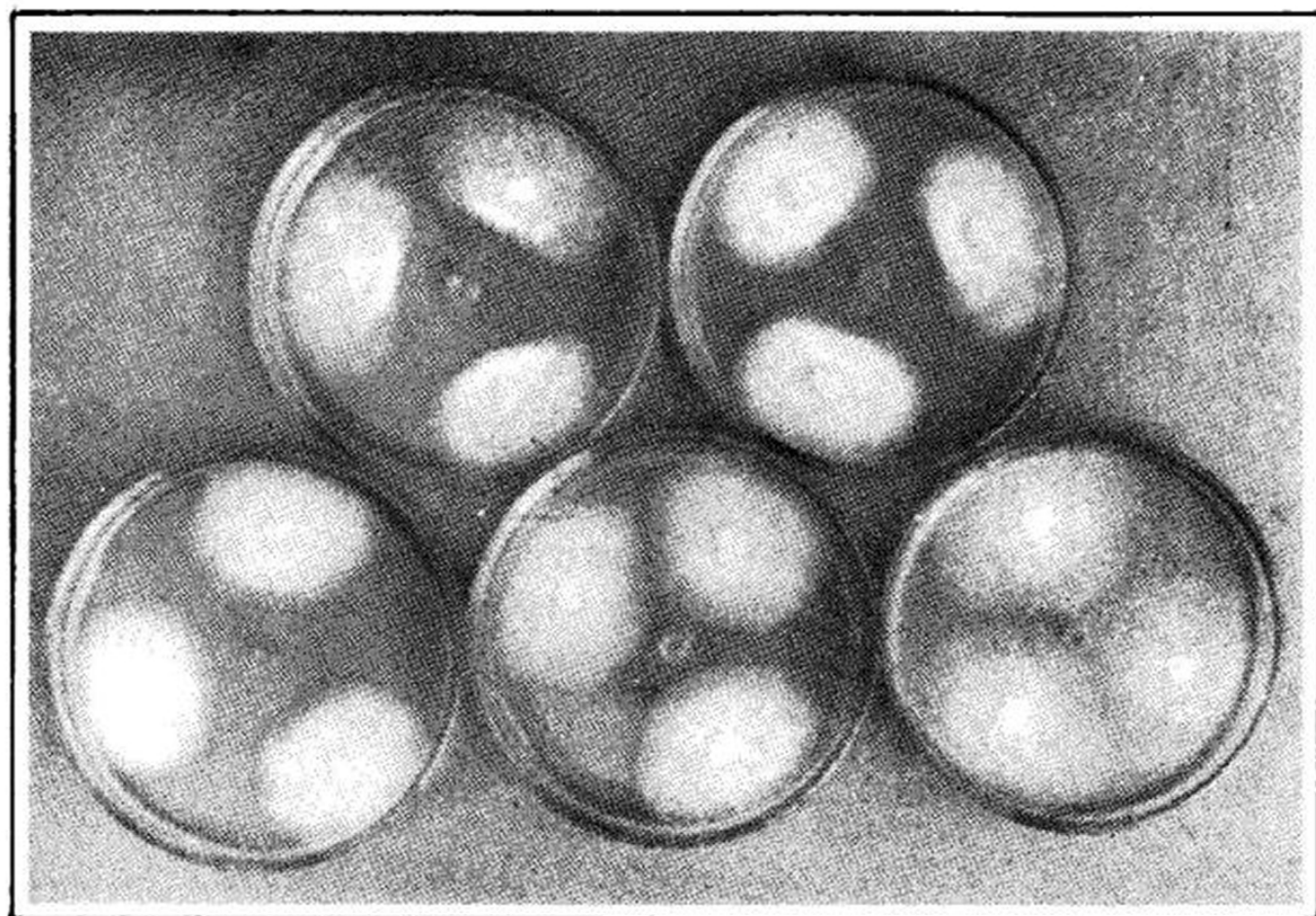


Figura 2 - Ação do metabólito de *P. citrinum* sobre colônias de *P. palmivora*. Da esquerda para a direita: Testemunha, placas com 10, 30, 50 e 70  $\mu$ l do antibiótico purificado nos anéis centrais.

me dos frutos.

Os resultados apresentados no presente trabalho permitem concluir que a substância antibiótica produzida por

*P. citrinum* possui acentuado efeito inibidor sobre *P. palmivora* no desenvolvimento micelial de lesões *in vitro* e *in vivo*.

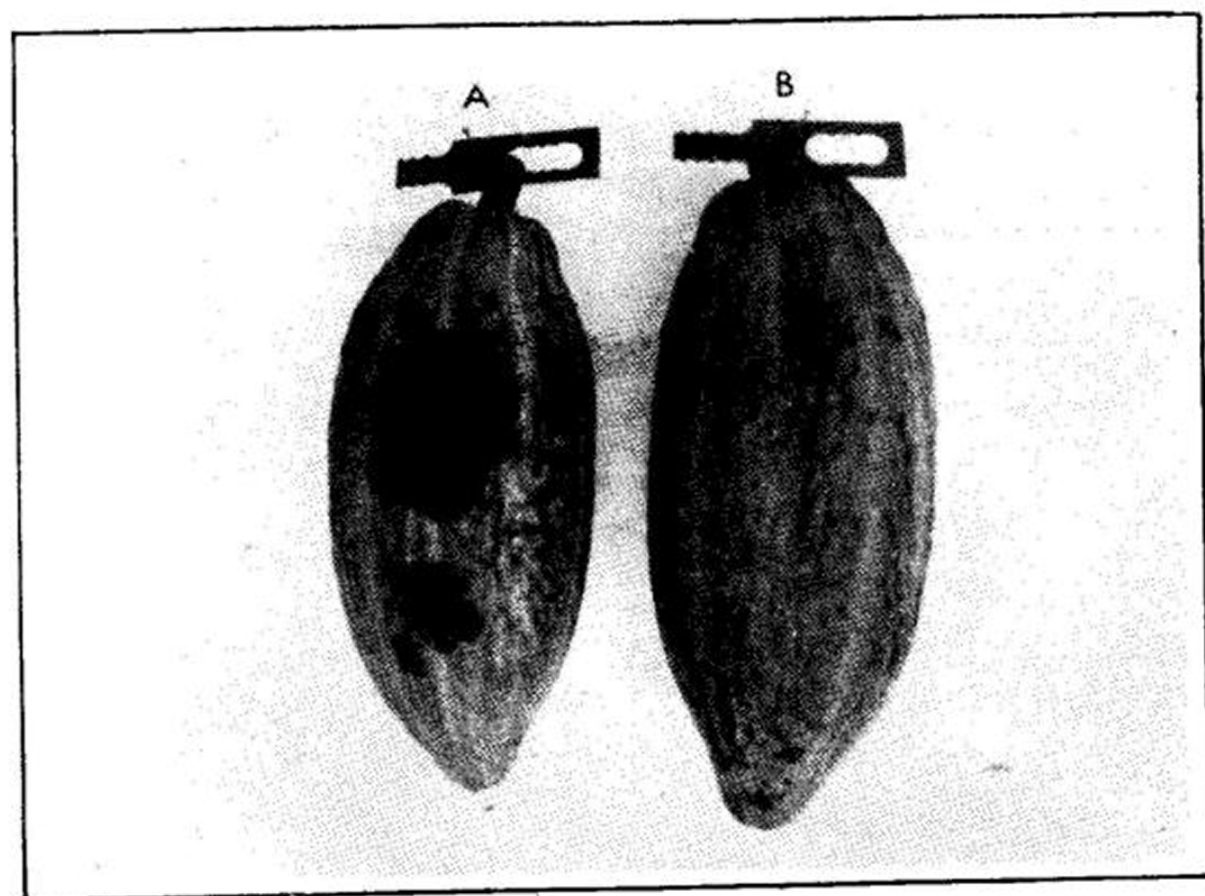


Figura 3 – Ação do líquido metabólico de *P. citrinum* sobre *P. palmivora* *in vivo*. (A) Fruto tratado com a substância antibiótica purificada e inoculado com micélio de *P. palmivora*. (B) Testemunha.

### Literatura Citada

- BRIAN, P.W. 1960. Griseofulvin. Transactions of the British Mycological Society 43:1 – 18.
- CERCÓS, A.P. 1957. Los antibióticos y sus aplicaciones agropecuárias. Barcelona, España, Salvat. 400 p.
- GLASBY, J.S. 1979. Encyclopedia of antibiotics 2 ed. New York, Jonh Wiley & Sons. 467 p.
- GOTTLIEB, D. and POTE, H.L. 1960. Tetrin, an antifungal antibiotic. Phytopathology 50:817–822.
- HORNER, C.E. 1963. Chemotherapeutic effects of streptomycin on establishment and progression of systemic downy mildew infection in hops. Phytopathology 53:472–474.
- HOWELL, C.R. and STIPANOVIC, R.D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. Phytopathology 69:480–482.

- LACAZ, C.S. 1969. Antibióticos, Sao Paulo, Universidade de São Paulo. 609 p.
- LEBEN, C. and KEITT, W.C. 1952. Studies on helexin in relation to plant disease control. *Phytopathology* 42:168-170.
- PLUMMER, D.T. 1978. An introduction to practical biochemistry. 2 ed. London, McGraw-Hill. 362 p.
- WAKSMAN, S.A. 1945. Microbial antagonisms and antibiotic substances. New York, The Commonwealth Fund. 350 p.
- \_\_\_\_\_ . 1959. The actinomycetes. London, Bailliere, Tindall & Cox. v. 1. 327 p.

