

## VIABILIDADE DE *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES* NO PRODUTO “CLADOSPORIN” EM DIFERENTES TEMPERATURAS<sup>1</sup>

Sára Maria Chalfoun<sup>2</sup>, Caroline Lima Angélico<sup>3</sup>, Carlos José Pimenta<sup>4</sup>, Deila Magna dos Santos Botelho<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> Trabalho financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

<sup>2</sup> Pesquisadora, DSc, Epamig (CRSM), Lavras-MG, [chalfoun@ufla.br](mailto:chalfoun@ufla.br)

<sup>3</sup> Engenheira Agrônoma, DSc, Lavras-MG, [carolineoi@oi.com.br](mailto:carolineoi@oi.com.br)

<sup>4</sup> Professor, DSc, UFLA, Lavras-MG, [carlos.pimenta@pq.cnpq.br](mailto:carlos.pimenta@pq.cnpq.br)

<sup>5</sup> Pesquisadora, DSc, UFLA, Lavras-MG, [deilamagna@hotmail.com](mailto:deilamagna@hotmail.com)

**RESUMO** - Este estudo aborda um produto biológico contendo o fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, considerado benéfico para a cultura do café. O ensaio foi conduzido objetivando avaliar a viabilidade do fungo *Cladosporium* no produto “Cladosporin” em diferentes temperaturas de armazenamento. Os resultados apontam que a viabilidade do *Cladosporium* na formulação estudada é afetada pelas três temperaturas estudadas, sendo bastante reduzida aos 60 dias quando o produto é armazenado na temperatura ambiente. Refrigeração e congelamento são as melhores temperaturas para a manutenção da viabilidade do fungo por um período maior de tempo.

**PALAVRAS-CHAVE:** café, formulação pó, produto biológico, micro-organismo GRAS.

## *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES* VIABILITY IN “CLADOSPORIN” PRODUCT AT DIFFERENTS TEMPERATURES

**ABSTRACT** - This study was conducted to evaluate the viability of the fungus *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries in the product “Cladosporin” at different storage temperatures. The results indicated that the viability of *Cladosporium* in the studied formulation is affected by the three storage temperatures studied. In ambient temperature the viability of *Cladosporium* reduced significantly at 60 days of stored. Refrigeration and freeze temperatures are the best for viability of the fungus for a longer time.

**KEY WORDS:** coffee, powder formulation, biological product, GRAS microorganism.

### INTRODUÇÃO

Na cultura do café, a ocorrência de micro-organismos prejudiciais capazes de promover processos fermentativos indesejáveis nos frutos ainda na planta, principalmente em regiões onde a cultura está margeada por água, afeta a qualidade por causar alterações e comprometer a segurança da bebida. Porém, a presença do fungo do gênero *Cladosporium* na lavoura é considerada benéfica, pois foi constatado que sua ocorrência coincidia com cafés classificados com padrões melhores de bebida. Chalfoun et al., 2007 identificaram a espécie fúngica *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries como sendo o agente bioprotetor da qualidade do café. Assim, um produto a base do agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries seria uma alternativa promissora para a aplicação nos frutos ainda na lavoura por se tratar de um produto biológico contendo um micro-organismo com características GRAS (General Regard as Safe) (Chalfoun, 2010) e, ainda, considerado benéfico para a cultura do café. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries em uma formulação pó molhável submetida a diferentes temperaturas de armazenamento. Cabe ressaltar que a formulação é objeto de patente entre a EPAMIG, UFLA e FAPEMIG (PI 0406274).

### MATERIAL E MÉTODOS

O produto “Cladosporin” foi fabricado no Centro de Análises Avançadas e Biotecnologia (CAAB/UFLA), localizado no CEPE-CAFÉ (Centro de Ensino, Pesquisa e Extensão do Agronegócio Café – UFLA). O agente biológico utilizado foi o *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, pertencente à micoteca da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerias (EPAMIG/CRSM). O agente biológico foi reproduzido em grande escala no (CAAB/UFLA), através de repicagens, sendo mantido sob condições controladas. Após o crescimento do fungo no meio de cultura BDA, foram inoculados discos contendo seu micélio em um substrato propício ao seu desenvolvimento. Esse substrato foi previamente autoclavado na temperatura de 120°C por 30 minutos. Depois de um período de aproximadamente 15 dias, ocorreu o desenvolvimento do agente biológico em todo o substrato. Posteriormente, a formulação foi seca em estufa com circulação de ar, triturada e armazenada em embalagem hermeticamente fechada para o início dos testes de viabilidade. Após a fabricação do produto foram realizados testes “*in vitro*”, visando obter o tempo de viabilidade do agente biológico em três diferentes temperaturas de armazenamento: ambiente (entre 18°C e 27°C), refrigeração (entre 4°C e 7°C) e congelamento (entre -3 e -6). As análises foram realizadas no CAAB/UFLA e no Laboratório de

Fitopatologia e Microbiologia do EcoCentro/EPAMIG-CRSM. A viabilidade foi avaliada através da medição do diâmetro micelial (cm) e contagem de esporos em Câmara de Neubauer, 15 dias após cada plaqueamento. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em parcelas subdivididas no tempo, com 9 repetições para a avaliação do crescimento micelial e esporulação. Os tratamentos das parcelas foram as temperaturas de armazenamento: ambiente (entre 18°C e 27°C), refrigeração (entre 4°C e 7°C) e congelamento (entre -3°C e -6°C) e as subparcelas foram os números de avaliações, ou seja, 12 observações. Os dados foram avaliados pelo pacote estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo teste de regressão, para a variável diâmetro das colônias (Figura 1), observou-se que na temperatura ambiente, o crescimento micelial se manteve por um intervalo menor de tempo, sendo constatada uma diminuição drástica nos valores aos 75 dias de armazenamento e ausência de crescimento à partir de 150 dias (Figuras 2 e 3A). Para refrigeração (Figuras 2 e 3B) e congelamento (Figuras 2 e 3C), ocorreu comportamento semelhante com redução gradativa nos valores dos diâmetros miceliais até a última medição realizada. Entre os tratamentos, houve diferença significativa estatisticamente demonstrada através do teste Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 1). Até 60 dias não ocorreram diferenças nos valores do diâmetro micelial do fungo entre as três temperaturas avaliadas. À partir de 75 dias de armazenamento, a temperatura ambiente proporcionou valor de crescimento micelial inferior a refrigeração e congelamento, que não diferiram estatisticamente entre si até o final do período de estocagem avaliado. Aos 150 dias de armazenamento cessou o crescimento fúngico na temperatura ambiente e ainda continuou em menor intensidade nas temperaturas de refrigeração e congelamento. O pico de crescimento micelial para as três temperaturas ocorreu aos 45 dias. Ethur, Nicolini e Blume (2008), avaliando uma formulação em pó à base de *Trichoderma virens* também encontraram maior viabilidade do agente biológico estudado quando o produto foi armazenado na temperatura de refrigeração em relação ao armazenamento no ambiente. Eles também detectaram o não crescimento das colônias de forma repentina, porém somente aos 14 meses de avaliação, um período bem superior ao do presente estudo.

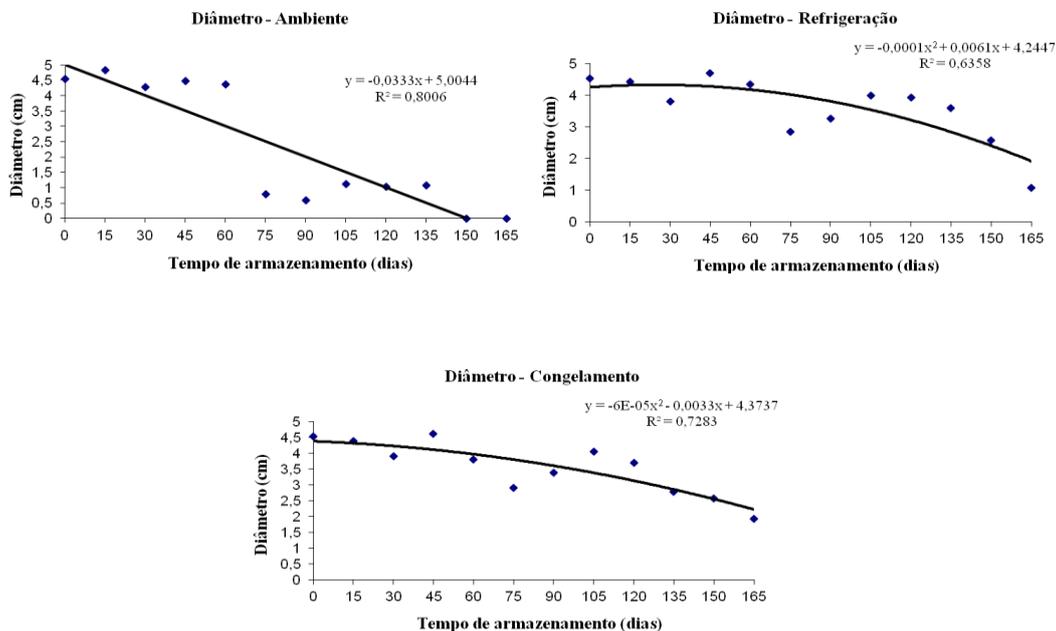


Figura 1 Crescimento micelial “in vitro” do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin” submetido a diferentes temperaturas de armazenamento. Lavras, MG, 2011.

Para a variável esporulação, o teste de regressão (Figura 2), demonstrou que a temperatura ambiente não promoveu condições favoráveis para a esporulação do fungo, pois aos 75 dias de armazenamento não ocorreu mais esporos viáveis no produto. O melhor período para o favorecimento da esporulação foi aos 45 dias com grande diminuição no valor aos 60 dias. Refrigeração e congelamento foram as temperaturas mais eficientes na manutenção dos esporos, sendo os mesmos viáveis até 135 dias na refrigeração e 150 dias no congelamento, porém com diminuições nos valores com o aumento do período de armazenamento. Entre os tratamentos, de acordo com o teste Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 2), até 45 dias de estocagem, não houve variação definida para esporulação nas diferentes

temperaturas. Com 60 dias, a esporulação nas temperaturas ambiente e refrigeração foi bastante reduzida quando comparado ao congelamento. No último tempo analisado cessou a esporulação em todas as temperaturas. De acordo com Nozaki, Camargo e Barreto (2004), nem sempre as condições que favorecem o desenvolvimento fúngico são as mesmas condições para a esporulação, pois, alguns meios de cultura são mais favoráveis para a esporulação de fungos que outros. A necessidade de luz para o crescimento e esporulação de fungos é muito variável, por isso, a necessidade de estudos futuros visando avaliar a influência de diferentes tipos de embalagens no acondicionamento do produto sobre a viabilidade do fungo (Masangkay et al., 2000).

Tabela 1 Crescimento micelial *in vitro* de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin” em diferentes temperaturas de armazenamento. Lavras, MG, 2012.

Tempo de armazenamento (dias)	Temperaturas de Armazenamento		
	Ambiente	Refrigeração	Congelamento
0	4,53 a*	4,53 a	4,53 a
15	4,83 a	4,42 a	4,37 a
30	4,28 a	3,80 a	3,90 a
45	4,48 a	4,70 a	4,60 a
60	4,36 a	4,33 a	3,80 a
75	0,79 b	2,84 a	2,90 a
90	0,58 b	3,26 a	3,38 a
105	1,12 b	3,98 a	4,05 a
120	1,03 b	3,92 a	3,70 a
135	1,08 b	3,20 a	2,78 a
150	0,00 b	2,57 a	2,58 a
165	0,00 b	2,08 a	1,92 a
CV %		29,58	
CV %		27,50	

\* Médias com a mesma letra na linha não diferem entre si de acordo com o teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

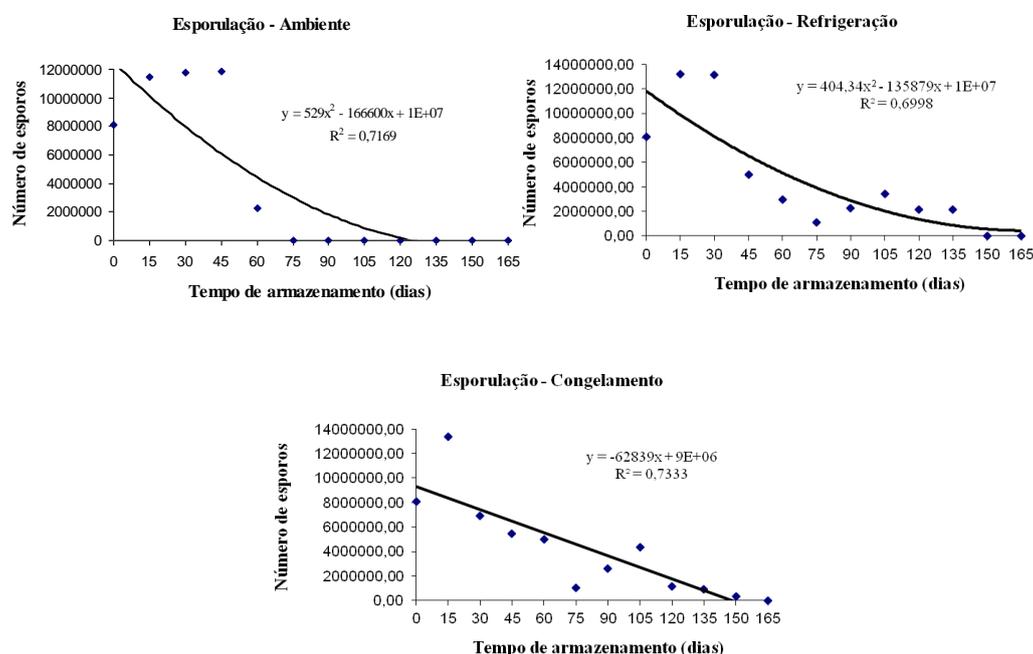


Figura 2 Esporulação “in vitro” do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin” submetido a diferentes temperaturas de armazenamento. Lavras, MG, 2011.

Tabela 2 Esporulação *in vitro* de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin” em diferentes temperaturas de armazenamento. Lavras, MG, 2012.

Tempo de armazenamento (dias)	Temperaturas de Armazenamento		
	Ambiente	Refrigeração	Congelamento
0	8,1 x 10 <sup>6</sup> a*	8,1 x 10 <sup>6</sup> a	8,1 x 10 <sup>6</sup> a
15	1,15 x 10 <sup>7</sup> a	1,32 x 10 <sup>7</sup> a	1,3 x 10 <sup>7</sup> a
30	1,18 x 10 <sup>7</sup> a	1,32 x 10 <sup>7</sup> a	6,9 x 10 <sup>6</sup> b
45	1,18 x 10 <sup>7</sup> a	5,03 x 10 <sup>6</sup> b	5,4 x 10 <sup>6</sup> b
60	2,22 x 10 <sup>6</sup> b	3 x 10 <sup>6</sup> b	5,6 x 10 <sup>6</sup> a
75	0,00 b	1,1 x 10 <sup>6</sup> a	1,03 x 10 <sup>6</sup> a
90	0,00 b	2,3 x 10 <sup>6</sup> a	2,6 x 10 <sup>6</sup> a
105	0,00 b	3,4 x 10 <sup>6</sup> a	4,4 x 10 <sup>6</sup> a
120	0,00 b	2,15 x 10 <sup>6</sup> a	1,2 x 10 <sup>6</sup> a
135	0,00 b	2,14 x 10 <sup>6</sup> a	9,1 x 10 <sup>5</sup> b
150	0,00 a	0,00 a	3,35 x 10 <sup>5</sup> a
165	0,00 a	0,00 a	0,00 a
CV %		26,37	
CV %		37,30	

\* Médias com a mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

A temperatura ambiente foi a que menos favoreceu o crescimento micelial e a esporulação do *Cladosporium* no produto, apesar das condições ideais para o bom funcionamento metabólico serem na temperatura ótima de 22°C (Sautour et al., 2002). A redução na atividade de água, aliado a aplicação de baixas temperaturas torna o metabolismo lento e possibilita a viabilidade das células microbianas por longos períodos (Giroto et al., 2008), justificando os maiores valores das variáveis estudadas nas temperaturas de refrigeração e congelamento, porém, o acondicionamento sob refrigeração ou congelamento pode tornar o processo mais oneroso em se tratando de uma possível produção em larga escala, pois precisaria de locais climatizados para o acondicionamento, além de gasto de energia. Tavares (2011) utilizou dois métodos de secagem para o produto (liofilização e estufa) e testou diversas formulações visando aumentar a vida de prateleira, porém, também encontrou drástica redução na esporulação do *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries à partir de 60 dias de armazenamento. O autor atribuiu o fato ao ganho de umidade ocorrido no produto durante a estocagem em embalagens plásticas. Outra formulação foi testada por Elizei (2009) através da imobilização das células fúngicas em grânulos com alginato de sódio onde também encontrou menor viabilidade na temperatura ambiente em relação a refrigeração e congelamento.

## CONCLUSÃO

O crescimento micelial e a esporulação do *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries no produto “Cladosporin” são afetados pelas três temperaturas de armazenamento, porém, sob refrigeração e congelamento houve maior tempo de manutenção da viabilidade do fungo.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG.  
Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).  
À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (CRSM).  
À Universidade Federal de Lavras (UFLA).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHALFOUN, S. M. Biological control and bioactive microbial metabolites: a coffee quality perspective. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 34, n. 5, p. 1071-1085, set./out. 2010.
- CHALFOUN, S. M. et al. Seletividade de fungicidas cúpricos e sistêmicos sobre o fungo *Cladosporium cladosporioides* em cafeeiro. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 93-95. 2007.
- ELISEI, V.G. Avaliação da viabilidade de fungos encapsulados e armazenados em diferentes temperaturas. 2009. 50p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade federal de Lavras, Lavras, 2009.
- ETHUR, L.Z.; NICOLINI, C.; BLUME, E. Viabilidade de formulação em pó de *Trichoderma virens* em diferentes embalagens e temperaturas. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v.14, n.2, p.391-394, abril-junho. 2008.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

- GIROTTO, M.J.; AQUINA, L.F.B.; PEREZ, R.B.; NAVES, M.F.; SACCO, S.R. O uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematóides parasitas: revisão de literatura. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, Curitiba, v.10, n.6, p.1-7. 2008.
- MASANGKAY, R. F.; PAULITZ, T. C.; HALLET, S. G.; WATSON, A. K. Characterization of sporulation of *Alternaria alternata* f. sp. *sphenocleae*. Biocontrol Science and Technology, Oxford, v. 10, n. 4, p. 385-397. 2000.
- NOZAKI, M. de H.; CAMARGO, M.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.29, n.4, p. 429-432. 2004.
- SAUTOUR, M.; MANSUR, C.S.; BENSOUSSAN, M.; DIVIES, C.; DANTIGNY, P. Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. Journal of Industrial and Microbiology & Biothecnology, Hampshire, v.28, n.10, p.311-315. 2002.
- TAVARES, L.S. Cultivo, encapsulação e estabilidade de um agente bioprotetor da qualidade do café. 2011. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade federal de Lavras, Lavras, 2011.