

## VALORIZAÇÃO POR LOGÍSTICA REVERSA DO CALDO RESIDUAL DO CACAU COMO BIOFUNGICIDA CONTRA A DOENÇA DE VASSOURA DE BRUXA

### **Christelle Anne Nicole Paule Herman** <sup>(1)</sup>

Engenheira Química, Mestre e Doutora em Ciência da Engenharia pela *Université Libre de Bruxelles* (ULB, Bélgica); Especialista em Gestão Empreendedora pelo SENAC; Professora Adjunto da Universidade Federal do Pará (UFPA).

### **Evelyn Mayumi Hanawa Konagano** <sup>(2)</sup>

Graduada em Bacharelado em Biotecnologia e Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal do Pará (UFPA).

### **Susan Pinheiro de Almeida** <sup>(3)</sup>

Graduada em Tecnólogo em Química e Licenciatura em Biologia pelo Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia (IFPA); Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA); Especialista em Agricultura Familiar e Desenvolvimento Agroambiental da Amazônia e Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal do Pará (UFPA).

**Endereço**<sup>(1)</sup>: Rua Augusto Corrêa, 127-483 – Guamá - Belém – PA - CEP: 66075-110- Brasil - Tel: +55 (091) 98736-7240 - e-mail: [christelle@ufpa.br](mailto:christelle@ufpa.br)

### **RESUMO**

Nas últimas décadas, a agroindústria cacauera brasileira sofreu com os impactos negativos causados pela vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*. Atualmente, medidas ecologicamente corretas são desenvolvidas para controlar a disseminação desse fitopatógeno. O principal objetivo deste trabalho é contribuir para a logística reversa e valorização do caldo residual de cacau como biofungicida natural em plantas de *Theobroma cacao* contra a vassoura-de-bruxa. Mais especificamente, este trabalho explora o potencial do caldo residual de cacau (Tomé-Açu/PA, Brasil) para inibir a germinação e o crescimento de *M. perniciosa* (isolado cac-257, CEPLAC/PA, Brasil) por meio de ensaios in-vitro e in-vivo (utilizando mudas do genótipo PA-195 de *T. cacao*) em comparação com controle negativo. Os ensaios in-vitro foram realizados com dez soluções diluídas do caldo residual de cacau com três repetições. Observou-se uma redução gradativa da germinação e do crescimento com doses crescentes do caldo residual de cacau. Em particular, o caldo residual de cacau promoveu 100% de inibição na concentração mínima inibitória de 2,5%. Os ensaios in-vivo foram realizados com dez mudas com quatro repetições. Quatro dias após a pulverização do caldo residual de cacau na concentração de 5%, as mudas foram submetidas à inoculação com o fungo. Os resultados avaliados 45 dias após a inoculação mostraram uma influência negativa significativa do caldo residual de cacau na porcentagem e número de vassouras axilares das mudas. O caldo residual de cacau tem se mostrado um biofungicida sustentável, de baixo custo e eficiente contra *M. perniciosa* em plantas de *T. cacao*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Economia Circular, Gestão de Resíduos, Logística reversa, Cacau, Vassoura-de-Bruxa.

### **INTRODUÇÃO**

Os frutos de *Theobroma cacao* são de grande importância socioeconômica no Brasil, cujo principal uso é a produção de chocolate e produtos derivados. Um dos principais fatores que limitam sua produção são as doenças invasivas e endêmicas causadas por infecções fúngicas, entre elas a vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo patogênico do gênero *Moniliophthora perniciosa* [1,2].

Desde o primeiro registro da doença, diferentes estratégias de controle da disseminação e erradicação têm sido tentadas, incluindo a poda fitossanitária, o controle químico, a seleção e o melhoramento genético. Atualmente, medidas ecologicamente corretas vêm sendo implementadas para controlar a disseminação do fitopatógeno, com a vantagem de serem controles de manejo integrados, mais econômicos e menos prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente. Tais estratégias incluem principalmente o controle biológico, o qual propicia de forma direta na redução do

inóculo ou da atividade deletéria do fitopatógeno, e de forma indireta, na indução de mecanismo de resistência induzida do vegetal. Dentre os principais produtos de origem biológicas utilizados, destacam-se os microrganismos, e os produtos naturais, principalmente à base de óleos essenciais e extratos vegetais. Em particular, os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides, merecem destaque pois são bem conhecidos por terem propriedades antimicrobianas, incluindo antifúngicas. Por outro lado, em plantas infectadas, os compostos fenólicos servem de substratos para a síntese de compostos envolvidos na resistência a doenças assim como para a produção de polímeros bioresistentes no sítio de infecção ou próximo dele.

Entre outras etapas de pré-processamento da cadeia, as sementes de cacau são submetidas à fermentação, secagem e torrefação, as quais geram quantidades significativas de subprodutos. Em particular, destaca-se o líquido obtido naturalmente da polpa que envolve as sementes de cacau durante a fermentação anaeróbia [3,4]. A quantidade desse resíduo é significativa, pois representa em torno de 8% do peso inicial das sementes de cacau. Sendo o segundo maior produtor de sementes de cacau do Brasil, o Estado do Pará gera e descarta grande quantidade de caldo residual do cacau. Hoje em dia, este resíduo é meramente descartado ou serve de ingrediente na indústria alimentícia para a preparação de bebidas ou geleias. Resultados de trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, referentes a composição físico-química básica do caldo residual do cacau, indicaram que o resíduo é uma excelente fonte de matéria orgânica (solúvel ou não), compostos fenólicos e substâncias minerais, sugerindo que este resíduo possui potencial de ser reaproveitado no setor agrícola como biofungicida e/ou biofertilizante.

## OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho é contribuir para a logística reversa e valorização do caldo residual de cacau como biofungicida natural em plantas *Theobroma cacao* contra a vassoura-de-bruxa. Mais especificamente, este trabalho explora o potencial efeito protetor indutivo do caldo residual de cacau para inibir a germinação e o crescimento de *M. perniciosa* por meio de ensaios laboratoriais in-vitro e in-vivo, além de observações experimentais em campo.

## MATERIAIS BIOLÓGICOS

As amostras de caldo residual de cacau (CRC), obtidas em Tome-Açu/PA, consistem no acúmulo de CRC coletado diretamente do cocho de fermentação durante os 4 primeiros dias de fermentação. As coletas foram realizadas com o auxílio de um aparato simples desenvolvido especificamente para este propósito. As caixas de fermentação foram levemente inclinadas e revestidas internamente com plástico, possibilitando, assim, a coleta por gravidade de quase a totalidade do caldo produzido em condições semi-asepticas (Ver Figura 1). Após a coleta, o CRC foi deixado fermentar naturalmente por 4 anos.



**Figura 1:** a) Caixas de fermentação levemente inclinadas e b) revestidas internamente com plástico, possibilitando, assim, a coleta por gravidade de quase a totalidade do caldo produzido em condições semi-asepticas.

O inóculo do fungo *Monilophthora perniciosa*, isolado cac-257, foi obtido de vassouras infectadas da biblioteca da Comissão Executiva do Plano de Plantação de Cacau (CEPLAC), em Marituba/PA.

As mudas do genótipo PA 195 de *Theobroma cacao*, selecionadas por ser suscetível à vassoura-de-bruxa, foram obtidas na CEPLAC, a partir da protrusão da raiz primária.

## METODOLOGIA UTILIZADA

Os **ensaios in-vitro** tiveram como objetivo avaliar o efeito inibitório do CRC na germinação e crescimento de *M. perniciosa*. Foram testadas dez soluções diluídas (em água destilada estéril) de CRC, nas concentrações de 0,00, 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,50, 2,00, 2,50, 3,00 e 5,00%. Os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

Os **ensaios de germinação** foram realizados utilizando lâminas escavadas em papéis de filtro umedecidos (com água destilada) dentro de placas de Petri. Em cada lâmina foi depositado um pequeno bloco de ágar-água 1,5% contendo esporos de *M. perniciosa* e 100 µL das soluções diluídas do CRC. O controle negativo foi realizado com 100 µL de água destilada. A observação da germinação foi avaliada após 4 horas e 24 horas de incubação a  $25 \pm 1$  °C em incubadora tipo BOD sob microscópio (40x). Todos os esporos que apresentaram tubo de germinação foram considerados germinados. Os resultados foram expressos na taxa de germinação (em %) em comparação com o controle negativo.

Os **ensaios de crescimento** foram realizados utilizando-se placas de Petri de 9 centímetros de diâmetro contendo as soluções diluídas do CRC incorporadas ao meio de cultura BDA. Para o controle negativo, nenhuma amostra foi incorporada ao meio de cultura BDA. Discos de 7 milímetros de diâmetro contendo o fungo *M. perniciosa* ativo foram depositados no meio das placas de Petri. As placas de Petri foram seladas com parafilme e mantidas em incubadora tipo BOD a  $25 \pm 1$  °C. A avaliação do crescimento iniciou após 2 dias e foi acompanhada até 12 dias. Os resultados foram expressos em diâmetro das colônias do fungo (em mm), medido com paquímetro, em função do tempo.

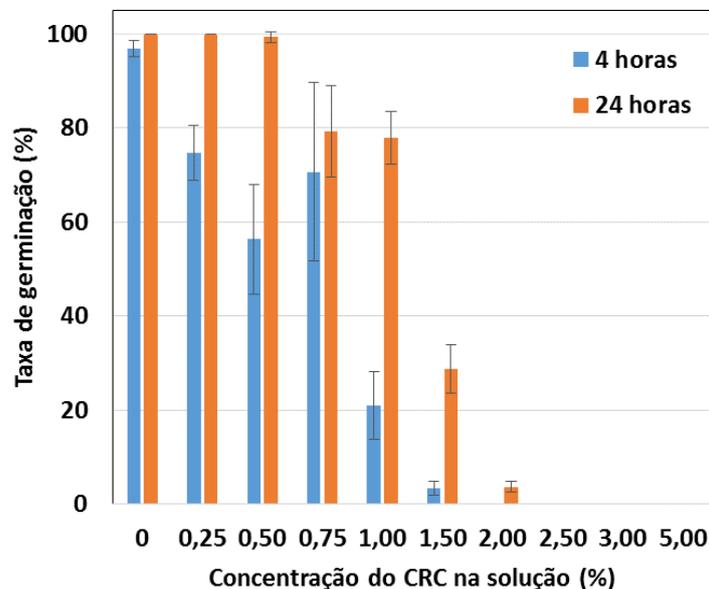
Os **ensaios in-vivo** foram realizados em delineamento em blocos ao acaso, com quatro repetições utilizando a solução diluída do CRC na concentração de 5%, resultando em 4 parcelas com 10 mudas cada. As soluções diluídas do CRC foram aplicadas nas faces do meristema apical e nas folhas por meio de pulverização manual, aplicando-se cerca de 20 mL por muda até o ponto de drenagem. Quatro dias após a pulverização das soluções diluídas do CRC, as mudas foram inoculadas com uma suspensão de  $2 \times 10^5$  basidiósporos viáveis por mL do fungo *M. perniciosa*, depositando 30 µL no meristema apical. As mudas inoculadas foram transferidas para casa de vegetação. Os sintomas apresentados pelas mudas individualmente foram avaliados 45 dias após a inoculação. Observou-se: o tipo e a porcentagem de vassoura formada (VT, vassoura terminal ou VA, vassouras axilares), o comprimento da vassoura terminal (CVT), o número de vassouras axilares (NVA), e a variável SINT para a porcentagem de plantas apresentando algum sintoma da doença, ou seja, vassouras secas, inchaço do caule, hipocótilo, pecíolos e pulvinos, câncer, supercrescimento ou hipertrofia.

## ANÁLISE DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS

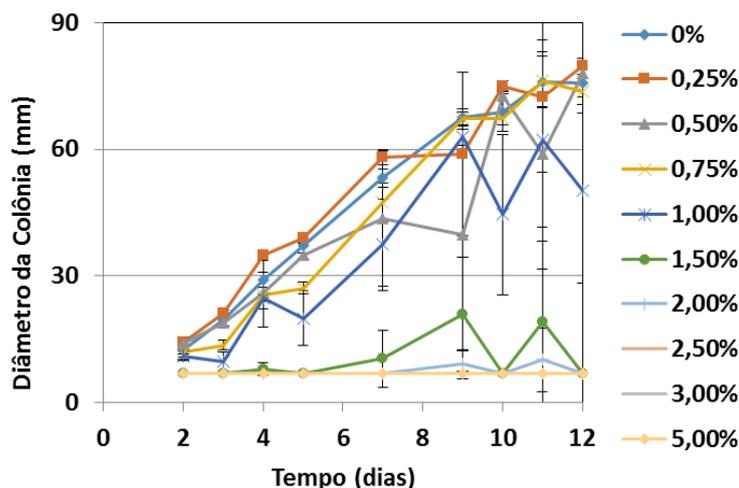
Os resultados dos **ensaios in-vitro**, sobre a avaliação do potencial efeito inibitório de dez soluções diluídas (em água destilada estéril) do CRC sobre a germinação e crescimento de *M. perniciosa* estão apresentados nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

Em relação a **germinação** (ver Figura 2), vale ressaltar que foi possível observar tamanhos discretos de tubos germinativos de emissão de esporos de *M. perniciosa* após 2 horas, sob condições ideais, principalmente umidade relativa do ar ( $> 80\%$ ). Exceto para as soluções diluídas do CRC nas concentrações de 0 e 0,75%, os resultados mostram que há uma diferença estatística na taxa de germinação entre os tempos de 4 e 24 horas. Após 24 horas, os tubos germinativos também apresentam um tamanho maior em relação aqueles após 4 horas. Os resultados também mostram que há uma redução gradativa da taxa de germinação com o aumento da concentração das soluções diluídas do CRC (0 a 5%) independentemente do tempo de observação. Em particular, após 24 horas de observação, as soluções diluídas do CRC nas concentrações inferiores ou igual a 0,5% não reduzem significativamente a taxa de germinação em relação ao controle negativo, realizado sem aplicação de CRC. As soluções diluídas do CRC nas concentrações de 0,75 e 1% permitem reduzir significativamente a taxa de germinação em aproximadamente 20% em

relação aos ensaios anteriores. As soluções diluídas do CRC nas concentrações de 1,5 e 2% demonstram limitar significativamente a taxa de germinação em relação a todas as concentrações inferiores com taxas de germinação de 28,7 e 3,7%, respectivamente. Por fim, os resultados mostram que o CRC promove 100% de inibição da germinação na concentração mínima inibitória (CMI) de 2,5%.



**Figura 2:** Efeito da concentração das soluções diluídas do CRC (0-5%) na germinação de esporos de *M. perniciosus*, expresso pela taxa de germinação em %, após 4 ou 24 horas. Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  o desvio padrão das três repetições.



**Figura 3:** Efeito das soluções diluídas do CRC (0-5%) no crescimento do fungo *M. perniciosus*, expresso pelo diâmetro da colônia em mm, em função do tempo (em dias). Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  o desvio padrão das três repetições.

Em relação ao **crescimento** (ver Figura 3), observa-se um aumento quase linear do tamanho das colônias em função do tempo, independentemente da concentração das soluções diluídas do CRC. Os resultados também mostram que há uma redução gradativa do diâmetro das colônias com o aumento da concentração do CRC (0 a 5%). As soluções diluídas do CRC nas concentrações inferiores a 1% não afetam significativamente a cinética de crescimento. As soluções do CRC nas concentrações de 1,5 e 2% permitem limitar significativamente a cinética de crescimento em

relação a todas as concentrações inferiores, além de mostrar um início de crescimento micelial após 7 e 9 dias, respectivamente. Em particular, os resultados mostram que o CRC promove 100% de inibição do crescimento na concentração mínima inibitória (CMI) de 2,5%.

No intuito de trabalhar com uma margem de segurança, os **ensaios in-vivo** foram realizados com a solução diluída do CRC na concentração de 5%. Os resultados dos sintomas apresentados nas mudas 45 dias após a inoculação com o fitopatógeno estão apresentados na Tabela 1. De forma geral, observa-se que a solução diluída do CRC apresenta menor gravidade da doença quando comparado ao controle negativo, exceto para a porcentagem de vassoura terminal. As variáveis SINT, VT e CVT, relativas a porcentagem de plantas apresentando algum sintoma da doença, a porcentagem de vassoura terminal, e ao comprimento da vassoura terminal, respectivamente, não apresentam diferenças significativas entre ambos os ensaios. Por outro lado, a porcentagem de vassouras axilares (VA) e o número de vassouras axilares (NVA) são significativamente menores para o ensaio realizado com a aplicação do CRC em relação ao controle negativo. Este dois parâmetros são muito importantes para avaliação da gravidade e incidência da doença.

**Tabela 1: Sintomas apresentados pelas mudas após 45 dias da inoculação do fungo *M. perniciosa*. SINT; porcentagem de plantas apresentando algum sintoma da doença; VT, vassoura terminal; CVT, comprimento da vassoura terminal; VA, vassoura axilar; NVA, número de vassouras axilares. Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  o desvio padrão das quatro repetições.**

| Ensaio            | SINT<br>%       | VT<br>%        | CVT<br>(cm)   | VA             | NVA<br>média  |
|-------------------|-----------------|----------------|---------------|----------------|---------------|
| Controle Negativo | 65,0 $\pm$ 12,9 | 30,0 $\pm$ 0,0 | 8,0 $\pm$ 1,9 | 27,5 $\pm$ 5,0 | 3,8 $\pm$ 0,7 |
| CRC á 5%          | 62,5 $\pm$ 9,6  | 32,5 $\pm$ 5,0 | 6,4 $\pm$ 1,0 | 15,0 $\pm$ 5,8 | 2,6 $\pm$ 1,1 |

## DISCUSSÃO DOS RESULTADOS FRENTE A LITERATURA CIENTÍFICA

Em relação aos **ensaios in-vitro**, o efeito de redução da taxa de germinação e da cinética de crescimento do fungo *M. perniciosa* usando as soluções diluídas do CRC em relação ao controle negativo pode estar associado ao teor de compostos fenólicos, que são comprovadamente importantes substâncias antimicrobianas. Vários outros estudos [5, 6, 7, 8] avaliaram o efeito de diferentes produtos naturais, principalmente óleos essenciais, na inibição da germinação e/ou crescimento do fungo *M. perniciosa* através de ensaios in-vitro, e obtiveram CMI muito abaixo das obtidas em nosso estudo (Ver Tabela 2). Vale ressaltar que o CRC possui concentrações de nutrientes essenciais, tais como matéria orgânica (solúvel ou não), compostos fenólicos e substâncias minerais, menos elevadas que os óleos essenciais.

**Tabela 2: Comparação das Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) de produtos naturais na inibição da germinação e/ou crescimento do fungo *M. perniciosa* obtidas na literatura.**

| Referência | Produto        | Concentração                        |  | CMI         |            |
|------------|----------------|-------------------------------------|--|-------------|------------|
|            |                | ppm or $\mu$ L/L                    |  | Crescimento | Germinação |
| [5]        | óleo essencial | 0, 100, 250, 500 e 1000             |  | 100 a 500   | 100 a 500  |
| [6]        | óleo essencial | 0, 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 |  | 750         | 750 a 1000 |
| [7]        | óleo essencial | 0, 100, 250, 500 e 1000             |  | 750         |            |
| [8]        | óleo essencial | 125, 250, 500, e 1,000              |  | 250 a 500   | 1000       |

Em relação aos **ensaios in-vivo**, os resultados preliminares indicam que o CRC tem um efeito protetor indutivo, sugerindo um possível mecanismo de resistência. No entanto vale ressaltar que, neste estudo, a solução diluída do CRC foi aplicada apenas uma vez a uma concentração de 5%, sendo possível que com o uso de mais aplicações, antes e/ou após a inoculação do fungo, e uma maior concentração, haja uma maior redução dos sintomas apresentados e outros parâmetros avaliados em relação ao controle negativo. Vários estudos foram realizados na tentativa de controlar a doença com o uso de fungicidas protetores sistêmicos convencionais, como o uso de ácido salicílico, acibenzolar-S-metil (ASM) ou benzotiadiazol (BHT), ou produtos naturais, como óleos essenciais [5] ou extratos vegetais [9]. Em particular, [9] investigou a eficácia da pulverização foliar de mudas de cacau com vários extratos vegetais e observaram que os extratos de lobeira forneceram proteção semelhante ao tratamento padrão com

ASM, com aproximadamente 10% de incidência da doença após 60 dias em comparação com 40% aproximadamente para o controle negativo.

## CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

O principal objetivo deste trabalho foi obter provas científicas de uma possível valorização do caldo residual do cacau como biofungicida natural em plantas de *Theobroma cacao* contra a vassoura-de-bruxa. Mais especificamente, por meio de ensaios in-vitro, este trabalho permitiu identificar que o caldo residual de cacau promoveu 100% de inibição tanto da germinação quanto do crescimento de *M. perniciosa* na concentração mínima inibitória de 2,5%. Os ensaios in-vivo preliminares indicaram para um possível efeito protetor indutivo do caldo residual de cacau na porcentagem e número de vassouras axilares das mudas.

Em posse destes resultados preliminares, há perspectivas para o uso experimental do caldo residual do cacau no controle biológico integrado da vassoura-de-bruxa. Sua bioconversão, de rejeito a biofungicida sustentável, é uma alternativa promissora contribuindo para a eliminação do uso de agrotóxicos, o desenvolvimento sustentável e a dinâmica da bioeconomia rural.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MARELLI, J.-P.; GUEST, D.I.; BAILEY, B.A.; EVANS, H.C.; BROWN, J.K.; JUNAID, M.; BARRETO, R.W.; LISBOA, D.O.; PUIG, A.S. *Chocolate under threat from old and new cacao diseases*. *Phytopathology*, v.109, n.8, p. 1331-1343, 2019. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-18-0477-RVW>
2. LISBOA, D.O.; EVANS, H.C.; ARAÚJO, J.P.M.; ELIAS, S.G.; BARRETO, R.W. *Moniliophthora perniciosa, the mushroom causing witches' broom disease of cacao: Insights into its taxonomy, ecology and host range in Brazil*. *Fungal Biology*, v.124, n.12, p. 983-1003, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.09.001>
3. SILVA, E.N.; RAMOS, D.; MENEZES, L.M.; SOUZA, A.O.; LANNES, S.C.S.; SILVA, M.V. *Nutritional value and antioxidant capacity of "cocoa honey" (Theobroma cacao L.)*. *Food Science and Technology (Campinas)*, v.34, n.4, p. 755-759, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.6447>
4. LEITE, P.B.; MACHADO, W.M.; GUIMARÃES, A.G.; CARVALHO, G.B.M.; MAGALHÃES-GUEDES, K.T.; DRUZIAN, J.I. *Cocoa's Residual Honey: Physicochemical Characterization and Potential as a Fermentative Substrate by Saccharomyces cerevisiae AWRI726*. *Scientific World Journal*, 5698089, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5698089>
5. BASTOS, C.N. *Fungitoxicidade in vitro e ação protetora e curativa de óleos essenciais contra Crinipellis perniciosa*, *Revista Ciência Agronômica*, v.47, p.137-148, 2007
6. CHAUSSÊ, T.C.C.; DIAS, D.B.S.; SILVA, S.D.V.M.; COSTA, J.C.B.; COSTA, L.C.B. *Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre a vassoura de bruxa do cacauero*, *Revista Brasileira de Biociências*, v.9, n.4, p.492-496, 2011
7. SILVA, D.M.M.H.; BASTOS, C.N. *Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais de Espécies de Piper Sobre Crinipellis perniciosa, Phytophthora palmivora e Phytophthora capsici*, *Fitopatologia Brasileira*, v.32, n.2, p.143-145, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000200008>
8. COSTA, L.C.B.; COSTA, J.C.B.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V. ; ALVES, P.B., NICOLAU, E.S. *In vitro activity of essential oil of Ocimum selloi and its major chemical compound against moniliophthora perniciosa, causal agent of witches' broom disease in cacao*. *Acta Horticulturae*, v.1125, p. 137-143, 2016. Doi: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1125.17>
9. RESENDE, M.L.V.; COSTA, J.C.B.; Cavalcanti, F.R.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; CAMILO, F.R. *Seleção de Extratos Vegetais para Indução de Resistência e Ativação de Respostas de Defesa em Cacauero contra a Vassoura-de-bruxa*. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, p.213-221, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000300005>