

Área: Ciência de Alimentos

INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DA BIOMASSA DE *Fusarium meridionale* E DE NIVALENOL POR COMPOSTOS FENÓLICOS LIVRES E ENCAPSULADOS

Cristiana Costa Bretanha*, Vania Lima, Fernanda Arnold Pagnussatt, Larine Kupski, Priscila Tessmer Scaglioni, Jaqueline Garda-Bufferon, Eliana Badiale-Furlong

Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos, Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS

**E-mail: crisbretanha@hotmail.com*

RESUMO – A necessidade de aumentar a segurança alimentar norteia a busca por substâncias naturais como, alternativa ao uso de fungicidas químicos. Compostos fenólicos têm demonstrado propriedades antifúngicas e antimicotoxigênicas e a incorporação dessas substâncias em sistemas carreadores, tais como lipossomos, pode preservar ou mesmo potencializar este efeito. Neste trabalho foi estudada a atividade antifúngica e antimicotoxigênica de extratos fenólicos de *Spirulina* sp. *LEB-18* na forma livre e encapsulada, sobre isolados de *F. meridionale*. A glicosamina, indicativo de inibição da biomassa fúngica, foi reduzida de 10,5 mg. g⁻¹ para 3,8 mg. g⁻¹ no meio controle e tratado, respectivamente. O encapsulamento do extrato fenólico aumentou 15 vezes a inibição da produção da micotoxina NIV pelo isolado de *Fusarium meridionale* 07Cv022.

Palavras-chave: *Spirulina* sp. *LEB-18*, fungo toxigênico, lipossomo, tricoteceno.

1 INTRODUÇÃO

A contaminação fúngica em alimentos, além de alterar a qualidade da matriz, pode causar danos à saúde do consumidor especialmente quando fungos toxigênicos estiverem presentes (KUMAR et al., 2010). A presença do fungo no alimento não implica, obrigatoriamente, em produção de micotoxina, assim como, a toxina pode estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo. Isto ocorre porque a maioria das micotoxinas são estáveis e resistindo a tratamentos térmicos ou processos de desidratação que são suficientes para destruir o micélio vegetativo dos fungos que as produziram (MOLIN e VALENTINI, 1999; DINIZ, 2002).

A preocupação com a toxicidade de fungos iniciou com a verificação de que alguns fungos filamentosos seriam capazes de produzir compostos químicos como metabólitos secundários, as micotoxinas dentre elas são produzidas por fungos do gênero *Fusarium* destacam-se os tricotecenos, fumonisinas, zearalenonas e seus derivados que causam depressão do sistema imunológico, neurológico e hemorragias (ARMANDO et al., 2013, BRYDEN, 2012, DEL PONTE, GARDA-BUFFON e BADIALE-FURLONG, 2012).

Em função disso, justifica-se a necessidade de detectar, quantificar e identificar estes fungos toxigênicos e as micotoxinas produzidas, além de buscar alternativas que minimizem a contaminação para garantir a qualidade do produto final e diminuir o risco de deterioração ou de produção destas toxinas (ZAO et al., 2010).

Com o intuito de melhorar a resistência das culturas agrícolas ao *Fusarium* e suas micotoxinas, vários programas de melhoramento genético estão desenvolvendo variedades cultiváveis resistentes ao ataque fungico (COSTA et al., 2003). Também são propostos o emprego de extratos naturais como alternativas para substituir o uso de antifúngicos sintéticos. Dentre as possíveis fontes de compostos antimicrobianos está o micro-organismo GRAS (“Generally Recognized As Safe”) *Spirulina platensis* dada pela presença de compostos fenólicos (PAGNUSSATT et al., 2013, SOUZA et al., 2011).

Os compostos fenólicos presentes em extratos aquosos e alcoólicos de microalgas têm se mostrado capazes de inibir o crescimento da biomassa fúngica, reduzindo reações do metabolismo primário, vinculadas à obtenção de nutrientes, produção de membranas ou paredes celulares, atividade respiratória e diferenciação celular (CASTRO et al., 2004). No entanto, ao serem extraídos do meio, estes compostos tornam-se susceptíveis a processos de degradação. Para garantir a eficiência os compostos fenólicos podem ser submetidos a processos de encapsulação em vesículas lipídicas ou lipossomos constituídos por fosfolipídios (BATISTA, CARVALHO e MAGALHÃES, 2007). Os lipossomos estão entre os carreadores de fármacos utilizados mais versáteis, pois suas propriedades físico-químicas os tornam muito similares a membranas e organelas celulares, facilitando a transferência de princípios ativos para seus locais de atuação, além de proteger o composto de interesse dos efeitos degradativos (DE LIMA et al. 2010). Sendo assim a encapsulação pode melhorar o efeito inibidor de compostos fenólicos naturais sobre a toxigenicidade de fungos do complexo *Fusarium meridionale*, um contaminante do trigo e outros cereais, produtor de um dos tricotecenos mais tóxicos, o nivalenol.

Em função disso, este trabalho abordou o estudo da atividade antifúngica e antimicotoxigênica de extratos fenólicos de *Spirulina* sp. *LEB-18* na forma livre e encapsulada sobre diferentes isolados de *Fusarium meridionale*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de *Spirulina* sp. *LEB-18*, proveniente do cultivo em planta piloto localizada em Santa Vitória do Palmar – RS. A biomassa da microalga seca foi moída na granulometria de 32 mesh, seus compostos fenólicos foram extraídos utilizando-se metanol, de acordo com Souza et al. (2010) e quantificados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como padrão.

Os lipossomos foram obtidos através do método de hidratação de vesículas (DE LIMA et al., 2010; HOPE, 1986), utilizando lecitina de soja purificada e solubilizada com clorofórmio. Para incorporação dos ácidos fenólicos foi utilizado o processo de co-solubilização, resultando em concentrações de 3% e 8% (PAGNUSSATT, et al., 2013).

Os isolados avaliados foram *Fusarium meridionale* 07Cv022 e *Fusarium meridionale* 07Tr210 obtidos da coleção de culturas do Laboratório de Epidemiologia de Plantas (UFRGS). Os micro-organismos utilizados foram classificados através de técnicas moleculares como genótipo NIV (ASTOLFI et al., 2010). As culturas

foram inoculadas utilizando *Spezieller Nährstoffarmer Agar* (SNA) a 25°C e mantidas a 4°C em tubo de ensaio inclinado até o momento do preparo do micro-organismo para os experimentos. Os cultivos dos fungos foram realizados em ágar batata dextrose (ABD) a 25°C com fotoperíodo de 12 h durante 7 dias para a obtenção dos discos de micélio.

Para avaliar a atividade antifúngica, os compostos fenólicos em meio ABD (nas concentrações de 3 e 8%) na forma livre e após incorporação ao lipossomo foram vertidos em placas de Petri com 10 cm de diâmetro. A inoculação foi realizada após a solidificação do meio, através da transferência de disco de micélio com 1,0 cm de diâmetro no centro de cada placa de Petri. A cultura foi incubada a 25°C e ao final do 7º dia as placas foram congeladas para posterior determinação do conteúdo de glicosamina e produção de NIV.

Para determinar o conteúdo de glicosamina, foi realizada hidrólise da parede celular do fungo com HCl 6M e a quantificação empregando o reagente de Erlich (2,67 g DAB – p-dimetilaminobenzaldeído dissolvido em 15 mL de etanol e 15 mL de ácido clorídrico) com absorvância medida em 530 nm (SOUZA et al., 2011).

A extração do NIV foi realizada pelo método QuEChERS, conforme descrito por Zachariasova et al. (2010). A quantificação da micotoxina foi realizada usando padronização externa. A amostra foi injetada em HPLC equipado com detector UV-Visível e de fluorescência 10AXL e coluna C18 (Supelco). O comprimento de onda utilizada no detector UV foi de 219 nm. A fase móvel foi uma mistura de água (A): metanol (B), no modo gradiente, durante 20 min. O fluxo foi de 1 mL min⁻¹, com volume de injeção de 20 µL.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliando a atividade antifúngica dos compostos fenólicos com base na produção de glicosamina (Tabela 1), o extrato fenólico aplicado como antifúngico na forma livre apresentou capacidade inibitória para os micro-organismos estudados, sendo o efeito mais pronunciado verificado no isolado *F. meridionale* 07Tr210, com valor máximo de inibição de 64% na maior concentração aplicada (8%, v/v).

Tabela 1. Produção de glicosamina (mg g⁻¹) no meio controle, tratado com extrato fenólico livre e encapsulado.

Amostra	Isolado fúngico	
	07Tr210	07Cv022
Controle	10,5 (±0,36) ^b	19,2 (±0,05) ^A
EF 8%	3,8 (±0,07) ^d	19,8 (±1,76) ^A
EF 3%	4,4 (±0,10) ^{cd}	17,8 (±0,20) ^B
Lipossomo	5,6 (±0,25) ^c	14,9 (±0,31) ^C
EF 8% encapsulado	14,8 (±1,15) ^a	13,1 (±0,09) ^C
EF 3% encapsulado	8,9 (±0,48) ^{bc}	9,1 (±0,19) ^D

Valores médios de ensaios realizados em triplicata ± desvio padrão. Letras iguais indicam que não há diferenças estatisticamente significativas (p>0,05).

O isolado *F. meridionale* 07Cv022 foi inibido pela menor concentração de extrato fenólico encapsulado (3%, v/v), em média 38%. Sendo assim, a inibição da produção de glicosamina pela biomassa fúngica demonstra que a aplicação dos extratos fenólicos na forma encapsulada potencializou o efeito antifúngico dos extratos fenólicos, sugerindo a possibilidade de aplicação em cultivos com efeito sistêmico otimizado.

Tendo em vista que, apesar de proporcionar um controle efetivo do crescimento fúngico, o uso de fungicidas sintéticos também pode favorecer a formação de metabólitos secundários tóxicos (DORS et al., 2011), foi verificada a produção de NIV pelo isolado fúngico nos diferentes tratamentos deste estudo (Tabela 2).

Tabela 2. Produção de nivalenol (NIV) pelos isolados *F. meridionale* 07Cv022 e 07Tr210 no controle e tratados com extratos fenólicos na forma livre e encapsulada.

Amostra	NIV ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	07Tr210	07Cv022
Controle	30,21 ($\pm 3,02$) ^a	59,75 ($\pm 14,24$) ^A
EF 8%	0,60 ($\pm 0,29$) ^d	14,57 ($\pm 3,54$) ^{BC}
EF 3%	1,00 ($\pm 0,45$) ^d	7,62 ($\pm 0,25$) ^D
Lipossomo	10,06 ($\pm 2,42$) ^b	19,26 ($\pm 4,29$) ^B
EF 8% encapsulado	2,74 ($\pm 0,23$) ^c	0,10 ($\pm 0,00$) ^E
EF 3% encapsulado	3,96 ($\pm 0,29$) ^c	8,55 ($\pm 2,60$) ^{CD}

EF = extrato fenólico. Valores médios de ensaios realizados em triplicata \pm desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

O isolado *F. meridionale* 07Tr210 foi inibido pelo extrato fenólico livre aplicado no teste antifúngico. *F. meridionale* 07Cv022 também teve a produção de NIV inibida, neste caso, cabe salientar que não foi detectada esta micotoxina em presença do extrato fenólico 8% encapsulado (v/v), o que indica a inibição a níveis abaixo do limite de detecção deste tricoteceno.

Os resultados demonstraram que mesmo havendo respostas diferentes de fungos da mesma espécie ao efeito antifúngico dos extratos (Tabela 1) há vantagem na aplicação de substâncias naturais em comparação com os fungicidas químicos, pois aqueles apresentam efeito antitoxigênico, possivelmente porque os extratos fenólicos não causam estresse ao fungo.

4 CONCLUSÃO

O extrato fenólico pode ser utilizado como antifúngico natural, em espécies de *Fusarium meridionale* cabendo melhor avaliação dos teores aplicáveis. A produção de NIV pelos isolados fúngicos foi reduzida em até 89%, com o uso do extrato fenólico livre e a níveis não detectáveis quando aplicados encapsulados.

5 REFERÊNCIAS

- ARMANDO, M. R.; DOGI, C. A.; POLONI, V.; ROSA, C. A. R.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L. R. In vitro study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. **International Journal of Food Microbiology**, v.161, p. 182–188, 2013.
- ASTOLFI, P.; SANTOS, J.; SPOLTI, P.; TESSMANN, D. J.; DEL PONTE, E. M. Complexo *Fusarium graminearum*: Taxonomia, potencial toxigênico e genética populacional na era molecular. **Revista Anual de Patologia de Plantas**. v. 18, p. 78-119, 2010.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estudo da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 167-179, 2007.
- BRYDEN, W. L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, p. 134– 158, 2012.
- CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais. Metabólitos secundários**. 2ª. Edição. Viçosa: Visconde do Rio Branco, 2004.
- COSTA, R. S.; MÔRO, F. V.; MÔRO, J. R.; SILVA, H. P.; PANIZZIM, R. C. Relação entre características morfológicas da cariopse e fusariose em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 27-33, 2003.
- DE LIMA, V. R.; CARO, M. S. B.; TAVARES, M. I. B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Melatonin location in egg phosphatidylcholine liposomes: possible relation to its antioxidant mechanisms. **Journal of Pineal Research**, v. 43, p. 276-282, 2010.
- DEL PONTE, E.M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to *Fusarium* head blight epidemics. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1087-1091, 2012.
- DINIZ, S.P.S.S. **Micotoxinas**. Ed. Rural, p. 181, 2002.
- DORS, G. C.PRIMEL, E. G.; FAGUNDES C. A.; MARIOT, C. H. P.; BADIALE-FURLONG E. Distribution of pesticides in rice grain and rice bran. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1921-1930, 2011.
- HOPE, M. J.; BALLY, M. B.; MAYER, L. D.; JANOFF, A. S.; CULLIS, P. R. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. **Chemical and Physical Lipids**, 40: 89-107, 1986.
- KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; DUBEY, N. K. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxic activities of *Ocimum sanctum L.* essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 539–543, 2010.
- MOLIN, R.; VALENTINI, M.L. Simpósio sobre micotoxinas em grãos. Fundação Cargil. **Anais...** p. 208, 1999.
- PAGNUSSATT, F. A.; BRETANHA, C. C.; KUPSKI, L.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Promising antifungal effect of rice (*Oryza Sativa L.*), Oat (*Avena Sativa L.*) and wheat (*Triticum aestivum. L*) extracts. **Journal of Applied Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 37-44, 2013.
- SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, M.; BADIALE-FURLONG, E. Avaliação da atividade antifúngica de extratos fenólicos de cebola, farelo de arroz e microalga *Chlorella pyrenoidosa*. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, 2010.

SOUZA, M. M.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1050-1058, 2011.

ZACHARIASOVA, M.; LACINA, O.; MALACHOVA, A.; KOSTELANSKA, M.; POUSTKA, P.; GODULA, M.; HAJŠLOVA, J. Novel approaches in analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, p. 51–61, 2010.

ZAO, Z.; WANG, Q.; WANG, K.; BRIAN, K.; LIU, C.; GU, Y. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, v.101, p. 292–297, 2010.