

Área: Ciência de Alimentos

EFEITO DA LIOFILIZAÇÃO E ENCAPSULAÇÃO DE EXTRATOS FENÓLICOS SOBRE SUA ATIVIDADE ANTIFUNGICA

Paula Filoda, Francine Darley, Priscila Tessmer Scaglioni, Fernanda Arnhold Pagnussatt*, Vânia Lima, Eliana Badiale-Furlong

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

*E-mail: nandapagnu@terra.com.br

RESUMO – Compostos naturais vêm demonstrando potencial antifúngico e a aplicação destes compostos na forma liofilizada ou encapsulada pode maximizar seus efeitos antifúngicos e antimicotoxigênicos, tornando-os mais eficientes para utilização como fungicidas naturais. Este trabalho teve como objetivo verificar a ação do extrato fenólico, proveniente da microalga *Spirulina* sp. LEB-18, liofilizado e incorporado em lipossomos na inibição de isolados do complexo *Fusarium graminearum*. Para isso, o extrato fenólico passou pela liofilização e posteriormente foi encapsulado em lipossomos pelo método de hidratação de vesículas. Sua eficiência foi testada através da inoculação dos discos de micélio das culturas de *F. graminearum* s. str e *F. meridionale* com adição do extrato fenólico. Verificou-se uma inibição total do crescimento quando utilizado o extrato fenólico liofilizado, enquanto que o extrato fenólico liofilizado encapsulado apresentou um potencial de inibição de, no máximo, 50%.

Palavras-chave: Inibição Fúngica. Fenóis. Liofilização. Lipossomos.

1 INTRODUÇÃO

Compostos naturais tem sido alvo de estudo quanto ao seu potencial antifúngico para aplicação em substituição aos métodos tradicionais de conservação, que nem sempre são eficientes, resultam em resíduos tóxicos à matriz de aplicação e ao ambiente e ainda propiciam a seleção de espécies resistentes e toxigênicas. A aplicação de compostos naturais para minimizar o risco de contaminação fúngica é preferencialmente testada em espécies fúngicas, e se o interesse estiver em toxigenicidade, espécies produtoras de micotoxinas devem ser empregadas, em fungos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicilium*, entre outros (PAGNUSSATT, 2013; SOUZA et al., 2011; ZABKA, PAVELA e GABRIELOVA-HELNN, 2011).

As microalgas vêm se destacando como fontes naturais de compostos fenólicos, cujo efeito de inibição fúngica vem se tornando crescente. Estudos demonstraram o efeito inibidor de extratos de *Spirulina platensis*, *Anabaena oryzae*, *Tolypotrix ceytonica*, *Chlorella pyrenoidosa* e *Scenedesmus quadricauda* obtidos por extração

com metanol ou acetona no crescimento de *Fusarium moniliforme*, com resultados promissores para prevenir a contaminação fúngica (ABEDIN & TAHA, 2008). Atribui-se esta propriedade a presença de compostos diversos em suas estruturas, sendo de grande interesse os compostos fenólicos. Entretanto, os compostos fenólicos extraídos de suas fontes ou quando purificados podem ser degradados por processos hidrolíticos ou oxidativos, e ainda precisam de operações de concentração que além de encarecer o produto final, pode torná-los inativos biologicamente (FANG e BANDHARI, 2010).

Desta forma, a liofilização e incorporação dos fenóis em sistemas carreadores encapsulados, tais como lipossomos, podem potencializar e preservar suas propriedades, pelo fato da liofilização concentrar o extrato, e do lipossomo facilitar a penetração dos fenóis pela parede e membrana microbiana, auxiliando sua atuação nos processos metabólicos e evitando a degradação dos fenóis (FANG e BANDHARI, 2010), mantendo a eficiência do efeito biológico dos compostos de interesse, neste caso a inibição do desenvolvimento de fungos do complexo *Fusarium graminearum*.

Neste trabalho estudou-se a liofilização seguida por incorporação dos extratos fenólicos de *Spirulina* sp. LEB-18 em lipossomos sobre a atividade antifúngica deles em isolados do complexo *Fusarium graminearum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A *Spirulina* sp. LEB-18 foi cultivada em uma planta piloto localizada em Santa Vitória do Palmar/RS com água da Lagoa Mangueira suplementada com 20% (v/v) de meio Zarrouk, referido como MLW-S em tanques revestidos com fibras, agitado por pás, localizados no interior de uma estufa de filme de polietileno transparente. Ao ser atingida a concentração de 1 g. L⁻¹, as microalgas foram separadas por filtração. A biomassa foi extrusada, seca em secador de bandejas a 50°C durante 5 h, embalada à vácuo e armazenada sob refrigeração. A partir da biomassa seca de *Spirulina* sp. LEB-18, os compostos fenólicos livres foram extraídos com metanol de acordo com Souza et al (2010). O solvente foi evaporado em rotaevaporador e o extrato foi dissolvido em água e clarificado. Para a etapa de liofilização, primeiramente o extrato fenólico (EF) foi armazenado em ultra-freezer (Indrel Ultra Freezer, modelo 90-D), submetido a uma temperatura de -80°C por 48h em bandejas de aço inox. Em seguida, realizou-se a liofilização do EF utilizando-se um liofilizador (Liotop, modelo L 108) na temperatura de -55°C e submetido a uma pressão de 45 µHg por mais 48h. A quantificação dos extratos em estudo foi realizada de acordo com Souza et al (2010).

Os lipossomos foram obtidos através do método de hidratação de vesículas (DE LIMA et al., 2010; HOPE, 1986), o qual consistiu basicamente em co-solubilizar a fosfatidilcolina em 1 mL de clorofórmio, evaporar o solvente através de rotaevaporação, eliminar os traços de solvente através de dessecação a vácuo e hidratar o filme lipídico em 1 mL de tampão tricina/cloreto de magnésio pH 7,4 através de agitação em vortex, para formação das vesículas, sendo denominados lipossomos controle. A incorporação do extrato fenólico liofilizado ao sistema lipossomal foi realizada no processo de co-solubilização dos lipídios com clorofórmio, na concentração de 8% (p/v) em relação ao encapsulante.

Os fungos utilizados (*Fusarium graminearum* s. str. 08Tr044 e *Fusarium meridionale* 07Tr210) foram obtidos da coleção do complexo *Fusarium graminearum* (Fg) do Laboratório de Epidemiologia de Plantas

(UFRGS), isoladas de grãos de trigo. As culturas fúngicas foram crescidas em *Spezieller Nährstoffarmer Agar* (SNA) a 25°C para induzir a esporulação e mantidas a 4°C em tubo de ensaio inclinado. O crescimento dos fungos foi realizado em Agar batata dextrose (ABD) durante 7 dias para obtenção dos discos de micélio. Utilizando-se o meio de cultura ABD, realizou-se a inibição do crescimento micelial pelo método de ágar diluído, na concentração de fenóis na forma livre, necessária para inibir 50% o crescimento micelial (IC₅₀) (PAGNUSSATT et al., 2012).

O extrato fenólico liofilizado encapsulado (concentração de 8%, v/v) foi adicionado ao meio de cultura em placas de Petri. Após a inoculação dos discos de micélio, as culturas foram incubadas a 25°C, com fotoperíodo de 12 h e as medidas diárias do diâmetro das colônias foram realizadas durante 7 dias, sendo os valores expressos em cm dia⁻¹, em quintuplicata. A porcentagem de inibição do crescimento fúngico foi calculada, comparativamente ao controle, de acordo com Nguiefack *et al.* (2004). A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta o percentual de inibição fúngica em presença do extrato fenólico de *Spirulina*. Nota-se que o extrato fenólico aplicado como antifúngico na forma liofilizada apresentou uma relativa capacidade inibitória para cada micro-organismo estudado, sendo o efeito mais pronunciado verificado no isolado *F. graminearum* s. str 07Tr210, onde não ocorreu o desenvolvimento do micélio, um efeito fungicida para este micro-organismo.

Tabela 1- Inibição (%) ocasionada pela adição do extrato fenólico como antifúngico natural

Isolados do complexo	Inibição (%)	
	EF liofilizado	EF encapsulado
<i>F. graminearum</i>		
07Tr210	100	46
08Tr044	98	48

O desenvolvimento dos halos dos micro-organismos sob os tratamentos ao longo do tempo de experimento estão nas Figuras 1 e 2.

Quando o extrato liofilizado foi incorporado ao lipossomo, o mesmo não inibiu o crescimento micelial do fungo de maneira tão eficiente. Apesar de o encapsulamento permitir um sistema de liberação mais lento, o que propicia a ação do princípio ativo de forma controlada, acredita-se que aliar a técnica de liofilização com o encapsulamento não seja uma alternativa viável para aplicação do extrato fenólico como fungicida natural.

A liofilização permitiu concentrar o fenol, aumentando assim sua eficácia e apresentando a vantagem da redução do volume necessário de amostra para aplicação no teste inibitório. No entanto, a adição do extrato fenólico na fase de hidratação da vesícula também pode ter sido o motivo para a redução do efeito inibidor. Em estudos anteriores, onde o fenol na forma livre foi encapsulado na etapa de co-solubilização, verificou-se inibições superiores a 90% (PAGNUSSATT, 2013).

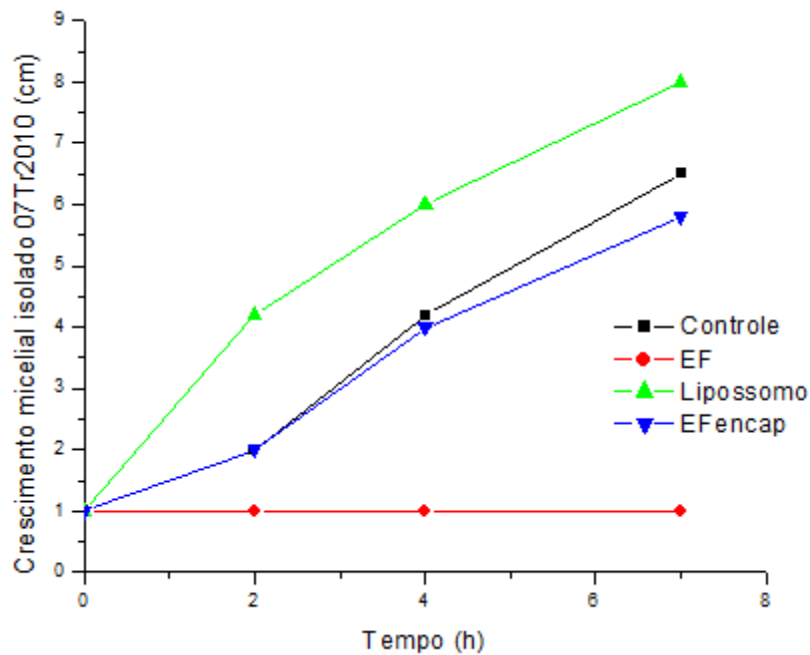


Figura 1- Crescimento micelial (cm) do isolado *Fusarium meridionale* 07Tr210, das placas controle, do extrato fenólico liofilizado (EF), do lipossomo e do extrato fenólico incorporado ao lipossomo (EF encap).

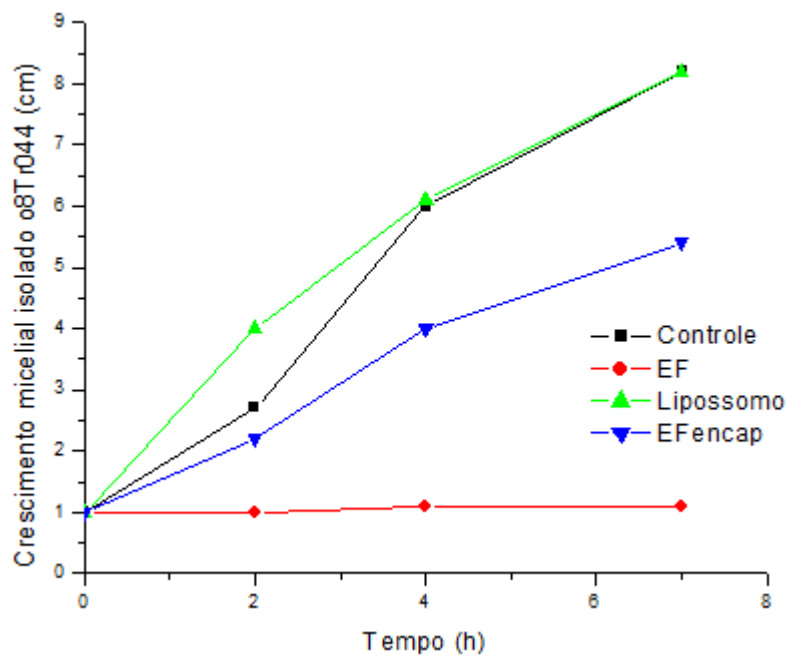


Figura 2 - Crescimento micelial (cm) do isolado *Fusarium graminearum* s. str 08Tr044, das placas controle, do extrato fenólico liofilizado (EF), do lipossomo e do extrato fenólico incorporado ao lipossomo (EF encap).

4 CONCLUSÃO

A aplicação do extrato fenólico na forma liofilizada inibiu totalmente o crescimento das espécies toxigênicas do complexo *Fusarium graminearum* estudadas, evidenciando o uso desta técnica como uma forma viável para emprego de compostos naturais como antifúngicos.

5 AGRADECIMENTOS

FAPERGS, CNPq, FURG, rede Nanofotobiotec e UFRGS.

6 REFERÊNCIAS

- ABEDIN, R. M. A.; TAHA, H. M. Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and Green microalgae. Evaluation of medium components by Plackett-Burman design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. **Global Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 3, n.1, p. 22-31, 2008.
- FANG, Z.; BHANDAR, Z. Encapsulation of polyphenols – a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 1, p. 510-523, 2010.
- NGUEFACK, J.; LETH, V.; ZOLLO, A.; MATHUER, S. B. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 329-334, 2004.
- PAGNUSSATT, F. A. Inibição do crescimento de espécies do complexo *fusarium graminearum* e da síntese de tricotecenos por compostos fenólicos livres e encapsulados. Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, 2013.
- PAGNUSSATT, F. A.; MEZA, S. L. R.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Procedure to determine enzyme inhibitors activity in cereal seeds. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 12, p. 85-92, 2012.
- SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, M.; FURLONG, E. B. Antifungal activity evaluation in phenolic extracts from onion, rice bran, and *Chlorella pyrenoidosa*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 680-685, 2010.
- SOUZA, M. M.; PRIETO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; BADIALE-FURLONG, E. Assesment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1050-1058, 2011.
- ZABKA, M.; PAVELA, R.; GABRIELOVA-SLEZAKOVA, L. Promising antitfungal effect of some Euro-Asiatic plants against dangerous pathogenic and toxigenic fungi. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 91, p. 492-497, 2011.