

Área: Ciência de Alimentos

APLICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Bipolaris oryzae*

**Ramiro Suárez Esteves^{*}, Bianca Trevisan dos Santos, Luana Schmidt, Eliana Badiale
Furlong, Fernanda Arnhold Pagnussatt**

*Escola de Química e Alimentos, Cursos de Engenharia Agroindustrial – Agroquímica e Engenharia
Agroindustrial – Indústrias Alimentícias, Universidade Federal Do Rio Grande, câmpus Santo Antônio da
Patrulha, RS*

^{*}E-mail: ramiro.suarez22@hotmail.com

RESUMO – O fungo *Bipolaris oryzae* é responsável por atacar a cultura do arroz, causando a doença conhecidas como mancha parda. Em função disso, existe a necessidade de encontrar alternativas para reduzir as perdas durante a produção de cereais e aumentar a segurança alimentar, através da aplicação de compostos bioativos com atividade antifúngica, reduzindo o intenso uso de fungicidas sintéticos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial inibitório de compostos fenólicos extraídos de *Spirulina sp. LEB-18* e alho contra o crescimento de *Bipolaris oryzae*. Os compostos fenólicos, extraídos com metanol e quantificados por espectrofometria, foram aplicados como antifúngico natural em diferentes concentrações, através do método bioanalítico *in vitro*. O crescimento micelial foi acompanhado diariamente, através de medições do diâmetro das colônias, com auxílio de paquímetro. A porcentagem de inibição verificada em todas as condições estudadas foi superior a 87%. Nas placas controle, o crescimento micelial foi de 6,44 cm; enquanto que nas placas com os antifúngicos naturais, esse valor reduziu para 0,44 cm, em média, para os dois extratos estudados. Esses resultados indicam a possibilidade de aplicação de compostos fenólicos extraídos de fontes vegetais ou microbianas na inibição do fungo em estudo durante as etapas de cultivo de arroz.

Palavras-chave: fungo; arroz; compostos bioativos; fenóis.

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das principais fontes nutritivas da população mundial e para suprir essa demanda é necessário um aumento constante na produção deste cereal. No entanto, o ataque de patógenos prejudica o desenvolvimento da cultura e ocasiona quedas de produtividade, com perdas que variam de 20% a 50% nas lavouras do Rio Grande do Sul (FAO, 2015; BALARDIN, BORIN, 2001).

As condições úmidas do cultivo do arroz e as suas características físico-químicas fazem da cultura um meio propício para a proliferação microbiana, especialmente de fungos. As principais doenças que atacam o

arroz durante o cultivo são a brusone e mancha parda, causada pelos fungos *Pyricularia grisea* e *Bipolaris oryzae*, respectivamente (EMBRAPA, 2006).

Para o controle desta contaminação, técnicas de manejo ao longo do desenvolvimento da cultura são utilizadas, com destaque para a aplicação de defensivos agrícolas de origem sintética ao longo do ciclo de crescimento do arroz. Porém, estudos tem demonstrado que o uso de produtos químicos está associado com a contaminação da água e do solo e com problemas toxicológicos em humanos e animais. Além disso, a resistência dos fungos em função da aplicação não controlada dos agrotóxicos nas culturas está aumentando, fazendo com que as empresas desenvolvam novas formulações ou indiquem maiores dosagens de uso como uma tentativa de garantir o efeito desejado do princípio ativo contra o crescimento fúngico (HEIDTMANN-BEMVENUTTI *et al.*, 2012; DORS *et al.*, 2011).

Métodos alternativos para o controle de pragas, como a aplicação de compostos extraídos de fonte vegetal ou microbiana tem sido alvo de estudos. Entre os compostos com comprovado efeito antifúngico, destaca-se o alho (*Allium sativum L.*) no controle de *Aspergillus niger* (SOUZA *et al.*, 2010) e *Spirulina* sp. LEB-18 no controle de *Fusarium graminearum* (PAGNUSSATT *et al.*, 2014).

Nesse sentido, torna-se interessante o estudo de compostos bioativos capazes de controlar os patógenos presentes em grãos, com o intuito de reduzir o intenso uso de agrotóxicos e contribuir com a segurança na cadeia produtiva de alimentos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial inibitório de compostos fenólicos extraídos de *Spirulina* sp. LEB-18 e alho (*Allium sativum L.*) contra o crescimento de *Bipolaris oryzae*, o que permitirá desenvolver novos processos para a aplicação desses biofungicidas durante o cultivo de arroz.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A *Spirulina* sp. LEB-18 foi cultivada pela equipe do Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG, em planta piloto localizada em Santa Vitória do Palmar/ RS com água da Lagoa Mangueira suplementada com 20% (v/v) de meio Zarrouk, referido como meio MLW-S, em tanques revestidos com fibras, agitado por pás, localizados no interior de uma estufa de filme de polietileno transparente (MORAIS e COSTA, 2007). Ao atingirem a concentração de 1 g. L⁻¹, as cianobactérias foram separadas por filtração e a biomassa seca foi moída, no laboratório da FURG em Santo Antônio da Patrulha, até a granulometria de 32 mesh. Os bulbos de alho (*Allium sativum L.*) foram comprados em comércio local, e secos na temperatura de 60 °C até a umidade de 13%. Após a obtenção da biomassa seca, 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. A quantificação foi realizada por espectrofometria, através do método de Folin- Ciocalteau, e os resultados obtidos através de uma curva padrão de ácido gálico.

O fungo *Bipolaris oryzae* utilizado neste estudo foi cedido pelo Instituto Riograndense do Arroz (IRGA), isolado de grãos de arroz. As culturas foram mantidas em ágar batata dextrose (BDA) a 24°C até a completa esporulação e mantidas em tubos de ensaio inclinado a 4.°C. O crescimento do fungo foi realizado em

agar batata dextrose (ABD) durante 7 dias para obtenção dos discos de micélio. O extrato fenólico foi filtrado em membrana estéril e vertido em placas de Petri contendo o meio de cultura, nas concentrações de 7,5%; 5% e 3% para o extrato de alho e 22%, 14% e 8% para o extrato de *Spirulina*, em relação ao volume final adicionado na placa, que foi de 20 mL. Nas placas controle, os extratos foram substituídos pela mesma quantidade de água estéril. Após a solidificação, um disco de micélio foi adicionado ao centro de cada placa, seguindo-se a incubação em câmara de crescimento, a 24 °C por 9 dias. Durante o crescimento do fungo, foram efetuadas diariamente medições ortogonais dos diâmetros das colônias, com auxílio de um paquímetro. A inibição foi avaliada pela observação visual do crescimento do micélio, comparada com placas controle, em quintuplicata (SOUZA; ARAUJO e NASCIMENTO, 2007). A porcentagem de inibição do crescimento fúngico foi calculada, comparativamente ao controle, de acordo com Nguefack *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

O teor de compostos fenólicos totais encontrado nas amostras de alho e *Spirulina* foi de 113,14 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 325,71 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, respectivamente. Para uma avaliação inicial do comportamento desses extratos como inibidor do crescimento de *Bipolaris oryzae*, optou-se por testar 3 volumes diferentes de extrato fenólico no meio de cultura selecionado, com base em trabalhos anteriores já desenvolvidos com *Spirulina* (Pagnussatt *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2012). Em função disso, diferentes concentrações dos extratos foram avaliadas para alho e *Spirulina*.

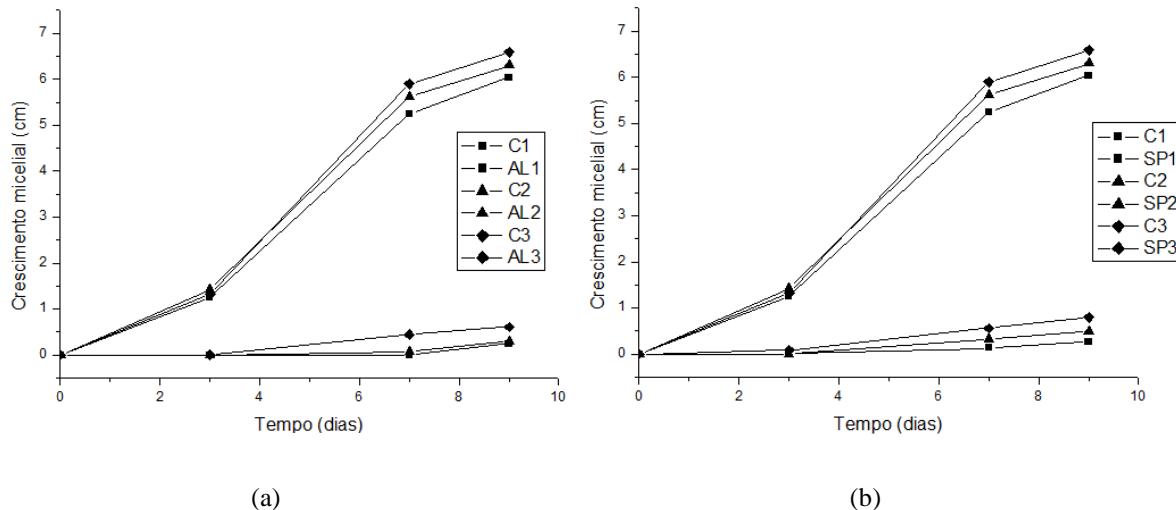
Tabela 1- Crescimento micelial (cm) das placas controle, com adição de extrato fenólico de alho e *Spirulina*, em diferentes concentrações, no 9º dia de avaliação

Experimento	Crescimento micelial (cm)		
	[] 1	[] 2	[] 3
Controle	6,19 ^b	6,44 ^{ab}	6,70 ^a
Extrato fenólico alho	0,03 ^e	0,26 ^{de}	0,68 ^{cd}
Extrato fenólico <i>Spirulina</i>	0,25 ^{de}	0,45 ^{cde}	0,84 ^c

[] 1: maior concentração de extrato; [] 2: concentração intermediária de extrato; [] 3: menor concentração de extrato. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($p < 0,05$).

O percentual de inibição fúngica em presença dos compostos fenólicos resultou em inibição superior a 87%, em todas as condições estudadas. Foi observado um comportamento diretamente proporcional entre o volume de extrato fenólico adicionado como antifúngico e a porcentagem de inibição. A adição da maior concentração de extrato no meio de cultura (v/v) inibiu 97% o crescimento fúngico, indicando o efeito fungicida dos compostos fenólicos extraídos de diferentes fontes. Esses resultados estão de acordo com Zanandrea *et al.* (2004), que verificaram inibição máxima de 81% contra o crescimento de *B. oryzae* ao utilizar a maior concentração de óleo essencial de orégano.

Figura 1- Crescimento micelial (cm) de *Bipolaris oryzae*, nas placas controle, com extrato fenólico de alho (1a) e com extrato fenólico de *Spirulina* (1b) em diferentes concentrações



C: placa controle; AL: extrato de alho; SP: extrato de *Spirulina*; 1: maior concentração de extrato; 2: concentração intermediária de extrato; 3: menor concentração de extrato.

O fungo *B. oryzae*, causador da mancha parda em grãos de arroz, apresentou uma crescimento micelial de 6,44 cm nos experimentos controle, em média. O crescimento micelial nos experimentos em presença de diferentes concentrações de extrato fenólico de *Spirulina* e de alho foi, em média, de 0,51 cm e 0,36 cm, respectivamente. Apesar do extrato de alho apresentar um teor de compostos fenólicos totais inferior ao extrato fenólico de *Spirulina*, sua ação antifúngica não diferiu estatisticamente, nas diferentes condições experimentais avaliadas. Em função disso, o estudo do perfil de compostos fenólicos presentes no extrato de alho será realizado, na tentativa de relacionar a presença de diferentes classes de fenóis com a sua atividade antifúngica. Sabe-se que o extrato de *Spirulina* possui ácidos fenólicos como constituintes majoritários, com destaque para os ácidos gálico, caféico, salicílico e trans-cinâmico e que o efeito sinergístico desses compostos de baixa massa molecular é o indicativo da sua atividade antifúngica (PAGNUSSATT et al., 2014).

A avaliação do crescimento micelial (Figura 1a e 1b) ao longo do tempo demonstrou que o micro-organismo não foi totalmente inibido nas menores concentrações de extrato fenólico de alho aplicado nos ensaios *in vitro*. Para o extrato de *Spirulina*, um pequeno crescimento micelial já foi observado a partir do 2º dia de medição do crescimento das colônias.

De uma maneira geral, as maiores concentrações de extrato foram mais eficientes na inibição do crescimento fúngico. Os dois extratos estudados precisam ser novamente avaliados, na tentativa de encontrar a concentração inibitória mínima para *Bipolaris oryzae*, o que permitiria uma redução dos custos para a aplicação dos compostos de interesse.

4 CONCLUSÃO

O uso de extrato fenólico de alho e *Spirulina* foi eficiente para inibir o crescimento micelial de *Bipolaris oryzae*, em todas as concentrações avaliadas, com inibição média de 93%.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Rio-Grandense do Arroz, ao Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG, ao CNPq e ao Programa de Desenvolvimento Estudantil da FURG (PDE-EPEC edital nº1/2015).

6 REFERÊNCIAS

- BALARDIN, R. S.; BORIN, R. C. **Doenças na cultura do arroz irrigado**. Santa Maria: UFSM. p. 48, 2001.
- 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.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivo do Arroz de Terras Altas no Estado de Mato Grosso**. Embrapa Arroz e Feijão Set, 2006.
- FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. **Produção mundial de grãos e arroz**. Disponível em <http://<http://fao.org>>. Acesso em 13 mai 2015.
- HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; DORS, G. C.; FAGUNDES, C. A.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de deoxionivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando QuEChERS e HPLC/UV-FL. **Química Nova**, v. 35 , p.1-6, 2012.
- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. **Energy Conversion and Management**, v. 48, p. 2169-2173, 2007.
- 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. *et al.* Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* sp. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 108, p. 21-26, 2014.
- SOUZA, A. F. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 6, p.465, 2007.
- SOUZA, M. M. *et al.* Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1050-1058, 2011.
- 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 phrenoidosa*. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, 2010.
- ZANANDREA, I.; JULIANO, D.S.; ANDRÉA, B.M.; JULIANE, L.; VERIDIANA, K.B. Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimento micelial em placas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 14-16, 2004.