

## Área: Tecnologia de Alimentos

# INCORPORAÇÃO DE COMPOSTOS SINTÉTICOS E FENÓLICOS EM COBERTURAS COMESTÍVEIS E SEU EFEITO NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *A. alternata* EM TOMATES

Guilherme de Almeida Pinto, Mirian Michelle Rosa da Rosa, Fernanda Arnhold Pagnussatt, Kessiane Silva de Moraes\*

Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Curso de Engenharia Agroindustrial, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Santo Antônio da Patrulha, RS

\*E-mail: kessianemoraes@furg.br

**RESUMO** - A aplicação de coberturas comestíveis para armazenamento de frutas e vegetais visa assegurar a qualidade pós-colheita destes produtos. Esta pode ser obtida de materiais de diferentes fontes e permitem a incorporação de compostos com propriedades antifúngicas em suas formulações, visando prolongar o tempo de vida útil dos produtos e reduzindo a incidência de doenças provocadas pelo crescimento de fungos. O presente estudo teve como objetivo, avaliar o uso de cobertura comestível adicionada de compostos sintéticos e fenólicos no desenvolvimento de doenças causadas por *Alternaria alternata* em tomates. O crescimento *in vitro* foi avaliado em placas contendo BDA com diferentes concentrações dos compostos antifúngicos. Foram testados: benzoato de sódio, sorbato de potássio, extrato fenólico de farelo de arroz, extrato fenólico de *Spirulina platensis*. O crescimento *in vivo* foi avaliado por inoculação dos tomates com *A. alternata* e aplicação das coberturas comestíveis por imersão dos produtos nas soluções filmogênicas. A incidência e severidade da doença provocada pelo fungo foram avaliadas em 5, 10 e 15 dias de incubação dos tomates a 20 °C. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os antifúngicos sintéticos apresentaram maiores percentuais de inibição de crescimento *in vitro* de *A. alternata*. Nos testes *in vivo*, o conservante químico, assim como o natural, não apresentou efeito na redução de doenças de origem fúngica causadas por *A. alternata* em tomates nas condições estudadas.

**Palavras-chave:** aditivo químico, extrato fenólico, fungo.

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças pós-colheita mais importantes economicamente, que comprometem a qualidade de produtos vegetais são causadas pela ação de fungos. O desenvolvimento de fungos como *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata* são comuns em tomates, caquis, melões, espécies como *Penicillium italicum* e *Aspergillus spp.* se desenvolvem em frutas cítricas, *Rhizopus sp.* aparecem em frutas como morangos, abacates e *Fusarium*

*semitectum* em melões e abacaxis. Vários métodos e técnicas têm sido desenvolvidas para prolongar o tempo de conservação de frutas e vegetais danificados pela ação de fungos (FAGUNDES et al., 2013).

Para assegurar a estabilidade, qualidade nutricional e sensorial de frutas e vegetais é necessário controlar os fatores que podem influenciar direta ou indiretamente sobre a qualidade desses produtos. O uso de coberturas comestíveis pode reduzir a perda de umidade, evitar danos físicos e melhorar a aparência das amostras tratadas. Segundo Rojas-Graü et al. (2007), a funcionalidade de coberturas comestíveis pode ser ampliada pela adição de antimicrobianos, pois estes podem proteger os produtos alimentares de deterioração microbiana e estender sua vida útil. Considerando que na maioria dos alimentos frescos, a contaminação microbiana ocorre com maior intensidade na superfície dos produtos, o uso de coberturas comestíveis com antimicrobianos pode ser mais eficiente do que a adição de agentes antimicrobianos diretamente no produto alimentício.

Os agentes antimicrobianos mais comumente utilizados em coberturas comestíveis são: ácido sórbico, ácido propiônico, sorbato de potássio, ácido benzóico, benzoato de sódio e ácido cítrico. A preocupação com a segurança alimentar vem norteando a busca por conservantes naturais. Desta forma, agentes antifúngicos presentes em vegetais representam uma alternativa para substituir os aditivos químicos atualmente empregados em alimentos. Como exemplo de antifúngicos naturais pode-se mencionar os compostos fenólicos (SOUZA et al., 2012). Dentre os vegetais considerados fontes de compostos fenólicos, encontram-se o arroz e seus derivados de beneficiamento, que são ricos em ácido ferúlico e cumárico, bem como a cianobactéria *Spirulina platensis* que apresenta os ácidos caféico, clorogênico, salicílico entre outros compostos fenólicos (SOUZA et al., 2011).

Diante do exposto, o estudo teve como objetivo estudar a atividade inibitória de compostos sintéticos e fenólicos no crescimento *in vitro* de *Alternaria alternata* e avaliar o uso de cobertura comestível adicionada de destes compostos no desenvolvimento de doenças causadas por *Alternaria alternata* em tomates.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Produtos vegetais

Os produtos vegetais foram adquiridos do comércio local de Santo Antônio da Patrulha - RS. Os tomates (*Lycopersicon esculentum*) foram selecionados pelo tamanho, grau de maturação e integridade física. As amostras selecionadas foram higienizadas e mantidas sob temperatura ambiente (25 °C) até secagem completa.

### 2.2 Avaliação do crescimento *in vitro*

O percentual de inibição do crescimento micelial de *A. alternata* foi avaliado em placas contendo BDA com diferentes concentrações dos compostos antifúngicos, esterilizados por filtração. Placas com BDA sem antifúngicos foram utilizadas como controle. O centro de cada placa foi inoculado com um disco de 0,7 cm de diâmetro de *A. alternata* previamente incubada em estufa por 7 dias a 25°C. O crescimento micelial radial foi determinado em cada placa depois de 3 e 5 dias de incubação a 25°C, calculando-se a média de dois diâmetros (cm) perpendiculares da colônia, medidos com paquímetro. Para cada antifúngico e concentração testada foram

usadas 5 placas. Os conservantes sintéticos testados foram o sorbato de potássio (SP) e o benzoato de sódio (BS). Dentro das classes de antifúngicos naturais foram estudados os compostos fenólicos extraídos do farelo de arroz (EFA), com concentração de  $1521 \mu\text{g}_{\text{fenol total}}\cdot\text{mL}^{-1}$  e da cianobactéria *Spirulina platensis* (EFS), com concentração de  $1630 \mu\text{g}_{\text{fenol total}}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Ambos os extratos foram obtidos através da utilização de solventes polares para a extração do composto de interesse (SOUZA et al., 2011; SOUZA et al. 2012).

### 2.3 Preparo das soluções filmogênicas

As coberturas comestíveis a base de gelatina e fécula de mandioca foram elaboradas conforme metodologia proposta por Fakhouri et al. (2007) com modificações. Após o preparo das soluções filmogênicas, os compostos antifúngicos foram adicionados nas formulações em concentrações previamente testadas e suficientes para promover a inibição do crescimento *in vitro* da espécie *A. alternata*.

### 2.4 Avaliação do crescimento *in vivo*

Os tomates foram inoculados com  $10 \mu\text{L}$  de suspensão contendo  $1 \times 10^6$  esporos/mL de *A. alternata* e incubados a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h. Após este período, os produtos inoculados foram revestidos por imersão nas soluções filmogênicas por 30 s, drenados, e mantidos a temperatura ambiente ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) para secagem da película formada sobre a superfície do produto. Os produtos inoculados, mas não recobertos foram utilizados como controle. Todas as amostras foram colocadas em bandejas plásticas e incubadas por 15 dias a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  e 85-90% de umidade relativa. Para cada tratamento foram analisadas 12 amostras, conforme descrito por Fagundes et al. (2013). A incidência da doença provocada pelo fungo foi calculada como o percentual de produtos deteriorados. A severidade da doença foi determinada pelo diâmetro da lesão (cm), calculando-se a média de dois diâmetros perpendiculares da colônia, e os resultados foram expressos como percentual de redução da severidade em relação ao controle. A incidência e a severidade foram avaliadas em 5, 10 e 15 dias de incubação a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de SP avaliadas não alteraram significativamente ( $p \geq 0,05$ ) o crescimento das colônias de *A. alternata* (Figura 1). Quanto ao BS, os resultados indicaram que o menor crescimento micelial do fungo foi obtido com concentrações 0,2% e 1,0%, não havendo diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre estes tratamentos. Os resultados obtidos entre os conservantes testados mostraram que as placas contendo BS apresentam menor diâmetro das colônias na menor concentração avaliada (Figura 1a). Este resultado corrobora com o maior percentual de inibição do fungo que foi de 67,8% para o BS a 0,2%. Valor muito semelhante ao obtido para as placas com SP a 2% (68,7% de inibição). Este resultado pode estar associado a diferenças no peso molecular dos antifúngicos testados, pois quanto maior o peso molecular, menor será a difusão do mesmo. Isto justificaria o

fato de que na menor concentração estudada (0,2%), o sorbato de potássio ( $150,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) apresentou percentual de inibição do crescimento do fungo (64,8%) significativamente menor ( $p \leq 0,05$ ) do que o benzoato de sódio ( $144,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Por não haver diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre os tratamentos *in vitro* com 0,2% e 1,0% de BS, para os testes *in vivo*, optou-se por avaliar a concentração de 1% de BS como forma de evitar a contaminação por outros patógenos que pudessem interferir na avaliação do crescimento de *A. alternata* nas amostras de tomate, visto que características intrínsecas do produto poderiam dificultar a identificação isolada da espécie estudada.

Figura 1 - Diâmetro das colônias *in vitro* de *A. alternata* inoculadas em placas com ágar BDA contendo sorbato de potássio (SP) e benzoato de sódio (BS): (a) 0,2%; (b) 1,0%; (c) 2,0% e incubadas a 25 °C por 5 dias.

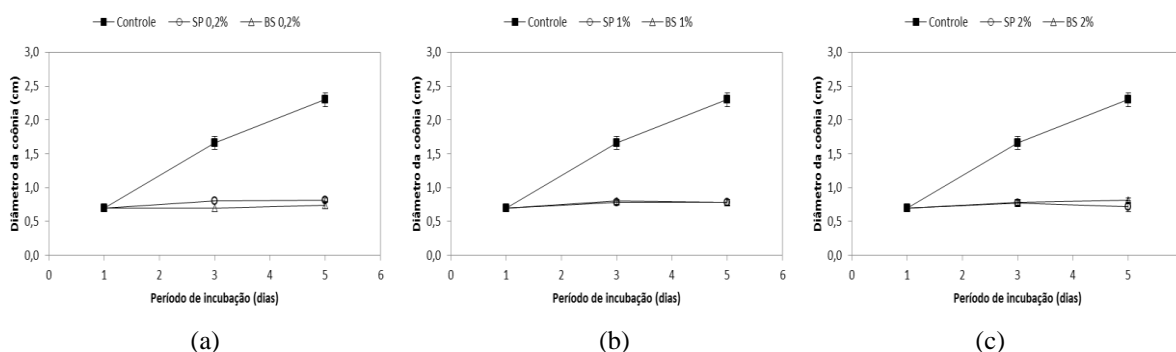
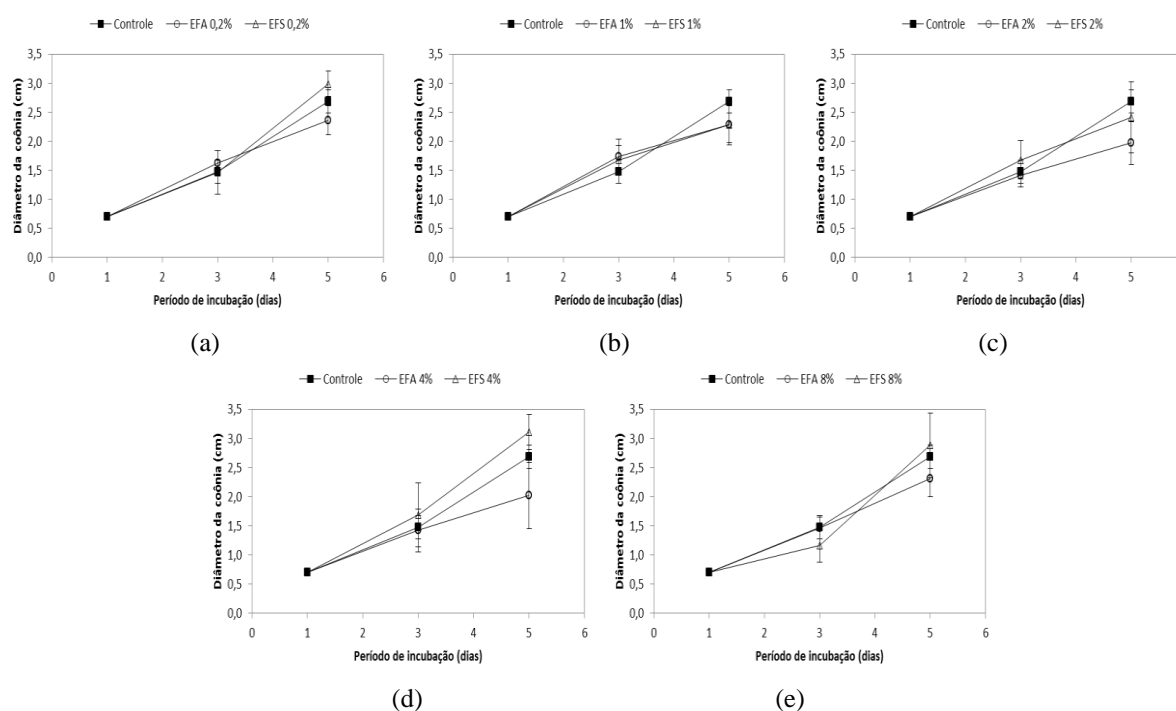


Figura 2 - Diâmetro das colônias *in vitro* de *A. alternata* inoculadas em placas com ágar BDA contendo extratos fenólicos de arroz (EFA) e *Spirulina platensis* (EFS): (a) 0,2%; (b) 1,0%; (c) 2,0%; (d) 4,0%; (e) 8,0% e incubadas a 25 °C por 5 dias.



De acordo com a Figura 2, o diâmetro das colônias *in vitro* de *A. alternata* nas placas com EFA e EFS foram significativamente iguais ( $p \geq 0,05$ ), não apresentando diferenças em relação ao tratamento controle. Além disso, o aumento da concentração de cada um dos compostos não correspondeu, necessariamente, a uma diminuição do diâmetro médio das colônias de *A. alternata*, para ambos os extratos avaliados. Os dados obtidos mostram que a variação (desvio) encontrada para cada tratamento dificultou a avaliação do efeito de cada um dos extratos sobre o crescimento fúngico. Porém, uma observação geral da Figura 2 indica que os diâmetros médios das colônias foram menores para o tratamento com EFA ao final dos 5 dias de incubação para a maior parte das concentrações avaliadas. Este resultado justifica o interesse em avaliar o comportamento deste extrato (EFA) no crescimento *in vivo* de *A. alternata*, mesmo considerando-se necessária a realização de novos experimentos com extratos fenólicos para inibição da espécie avaliada.

Tabela 1 - Incidência e severidade da doença causada por *A. alternata* em tomates inoculados artificialmente, recobertos com cobertura comestível contendo benzoato de sódio e extrato fenólico de arroz e incubados por 15 dias a 20 °C.

Tratamento	Incidência da doença (%)		
	5 dias	10 dias	15 dias
Controle	100	100	100
Benzoato de sódio (1%)	100	100	100
Extrato fenólico de farelo de arroz (2%)	100	100	100

Tratamento	Severidade da doença (cm)		
	5 dias	10 dias	15 dias
Controle	0,80 ± 0,13	0,93 ± 0,14	1,50 ± 0,68
Benzoato de sódio (1%)	0,91 ± 0,15	0,94 ± 0,16	1,82 ± 0,51
Extrato fenólico de farelo de arroz (2%)	1,00 ± 0,17	1,43 ± 0,27	1,97 ± 0,52

Quanto aos testes *in vivo*, para análise de incidência da doença, em todos os tratamentos avaliados, inclusive o controle, os frutos apresentaram deterioração provocada pelo desenvolvimento de *A. alternata*. Os dados de severidade da doença não foram apresentados em percentual de redução em relação ao controle, pois os resultados indicaram que o crescimento do fungo foi maior nas amostras com BS e EFA do que na amostra controle (frutos inoculados, mas sem cobertura). Este resultado sugere que o conservante químico, assim como o natural, não apresentou efeito na redução de doenças de origem fúngica causadas por *A. alternata* em tomates nas condições estudadas. Este efeito pode estar associado ao uso da cobertura à base de gelatina e fécula de mandioca. Há evidências de que esta cobertura tenha favorecido o desenvolvimento do fungo, impossibilitando a análise do efeito dos antifúngicos testados. Desta forma, a cobertura comestível aplicada aos frutos não se mostrou adequada para o armazenamento de tomates, sendo necessária a investigação de materiais que promovam um aumento do período pós-colheita destes produtos e que permitam a difusão dos compostos antimicrobianos quando adicionados à formulação dos recobrimentos.

## 4 CONCLUSÃO

Os antifúngicos sintéticos apresentaram maiores percentuais de inibição de crescimento *in vitro* de *A. alternata* nas condições estudadas. Para os testes *in vivo*, todos os tratamentos apresentaram 100% de incidência da doença causada pelo fungo em tomates. A análise de severidade da doença indicou que crescimento do fungo nas amostras com BS e EFA superou o crescimento fúngico da amostra controle. Este resultado sugere que o conservante sintético, assim como o natural, não apresentou efeito na redução de doenças de origem fúngica causadas por *A. alternata*, havendo a possibilidade de interferência da cobertura aplicada ao produto.

## 5 AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande pela estrutura disponibilizada para a realização da pesquisa, ao Laboratório de Engenharia Bioquímica (FURG) por fornecer a *Spirulina platensis* utilizada para elaboração dos extratos e ao CNPQ pela concessão da bolsa de iniciação tecnológica (PIBIT/CNPQ).

## 6 REFERÊNCIAS

- FAGUNDES, C. et al. Antifungal activity of food additives *in vitro* and as ingredients of hydroxypropyl methylcellulose-lipid edible coatings against *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 166, p. 391-398, 2013.
- FAKHOURI, F. M. et al. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 2, p. 369-375, 2007.
- ROJAS-GRAÜ, M. A. et al. Apple puree-alginate coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf life of fresh-cut apples. **Postharvest Biol. Technol.**, v. 45, n. 2, p. 254-264, 2007.
- SOUZA, M. M. et al. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciênc. Agrotec.**, v. 35, n. 6, p. 1050-1058, 2011.
- SOUZA, M. M. et al. Avaliação das atividades antifúngica e antimicotóxica de extratos fenólicos de farelo de arroz. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 437-441, 2012.