

Área: Ciência de Alimentos

ACÇÃO ANTIFÚNGICA DO EXTRATO DE *Physalis peruviana* Linnaeus FRENTE AO FUNGO *Botrytis cinerea*

Débora Filippi*, Maria Tereza Friedrich, Rayanne Beulk Flores

Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia e Medicina

Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS

**E-mail: dfilippi17@hotmail.com*

RESUMO – *Botrytis cinerea* é o principal fungo patogênico da cultura do morango, responsável pela doença denominada de mofo cinzento, que acomete principalmente os frutos, no período pós-colheita. O controle do mesmo é realizado majoritariamente por fungicidas sintéticos. O teor de resíduos de fungicidas acima do permitido identificado em alimentos e contaminação ambiental resultante do uso incorreto e excessivo de fungicidas sintéticos e a alta resistência fúngica apresentada pelo *Botrytis cinerea* tem demonstrado a necessidade de desenvolver novos métodos de controle. Extratos obtidos de plantas apresentam ação antimicrobiana sobre diferentes fitopatógenos devido à presença de metabólitos secundários. A presença de ácidos fenólicos e flavonoides presentes nas diferentes partes dos frutos, como os da espécie *Physalis peruviana*, conferem a espécie capacidade antimicrobiana natural. Avaliar a ação preventiva do extrato de *Physalis peruviana* sobre o *Botrytis cinerea*, aplicado através de suspensão de conídios na concentração de 10^5 conídios por mL de suspensão, em morangos da variedade Albion foi o objetivo deste trabalho. A melhor ação antifúngica foi demonstrada pelo extrato, aplicado de forma preventiva, em morangos verdes armazenados a 25 °C, evidenciando que a composição química dos morangos demonstrou estar relacionada à intensidade da ação exercida pelo extrato. Os compostos ácido clorogênico ($148,8 \mu\text{g mL}^{-1}$), ácido cafeico ($14,42 \mu\text{g mL}^{-1}$), ácido ferúlico ($2,44 \mu\text{g mL}^{-1}$) e quercetina ($190 \mu\text{g mL}^{-1}$) identificados no extrato, exercem ação antifúngica sobre o fungo *Botrytis cinerea* e possivelmente de forma sinérgica.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, ação antifúngica, *Botrytis cinerea*.

1 INTRODUÇÃO

A composição química do morango (*Fragaria x ananassa* Duch) o torna um substrato ideal para o crescimento de microorganismos (ANTUNES; CARVALHO; SANTOS, 2011). A principal doença fúngica que acomete os frutos é o mofo cinzento, causada pelo fungo *Botrytis cinerea*, que pode permanecer nos frutos verdes e se manifestar somente no período pós-colheita, resultando em consideráveis perdas econômicas pelo setor produtivo (CANTILLANO; SILVA, 2010; HUSAINI; NERI, 2016).

Os morangos comercializados no Brasil provem em sua maioria do sistema convencional, sendo aproximadamente 70% destinados ao consumo *in natura* e 30% ao processamento (REVISTA CAMPO E NEGÓCIO, 2015). Somente nos Estados Unidos, as perdas causadas por *Botrytis cinerea* podem corresponder a 50% do total de morangos plantados (GIANESSI; REIGNER, 2005). Para controle do mofo cinzento em morangos o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) vinculado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) tem registrado 12 fungicidas sintéticos destinados à aplicação pré-colheita (BRASIL, 2018). Entretanto, o *Botrytis cinerea* tem se mostrado resistente frente a alguns fungicidas (GRABKE, 2014; FRAC, 2018). É necessário oferecer métodos alternativos para controle do *Botrytis cinerea* em morangos produzidos pelos diferentes sistemas de cultivo (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010;

ANVISA, 2013; GYAWALI; IBRAHIM, 2014). O desafio da fruticultura é produzir alimentos de qualidade e saudáveis, que atendam aos requisitos de segurança alimentar, sustentabilidade ambiental e agrícola e que sejam viáveis economicamente para o setor produtivo e para os consumidores (BRASIL, 2012).

Os extratos de plantas possuem propriedades antimicrobianas devido à diversidade de substâncias formadas pelo metabolismo secundário e que há muito tempo tem sido descritas na literatura por conferirem proteção natural às mesmas frente ao ataque de microrganismos fitopatogênicos e pragas. Os frutos da espécie *Physalis peruviana* são fontes de ácidos fenólicos e flavonoides (RAMADAN 2011), sua ação antifúngica tem sido demonstrada frente a diferentes espécies de fungos (CORRÊA, 2015). Nesse sentido, avaliar a ação preventiva do extrato de *Physalis peruviana* sobre o fungo *Botrytis cinerea* aplicado em morangos (*Fragaria x ananassa* Duch) foi o objetivo geral deste trabalho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DO *Botrytis Cinerea*

As etapas de identificação e isolamento do *Botrytis cinerea* foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia da UPF com base na metodologia utilizada por Cuzzi (2013). O fungo foi identificado e isolado de morangos da variedade Albion adquiridos em comércio local do município de Getúlio Vargas - RS. As bandejas foram mantidas em câmara com temperatura controlada ($25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) e fotoperíodo de 12 horas ao dia, até o aparecimento do fungo.

2.2 MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DO EXTRATO

Frutos da espécie *Physalis peruviana* foram adquiridos da empresa ItalBraz®, localizada no município de Vacaria-RS. Após a colheita manual, os frutos foram acondicionados e transportados em caixas isotérmicas, para a Universidade de Passo Fundo (UPF). Os frutos foram classificados posteriormente quanto ao seu grau de maturação, através da coloração do cálice e em seguida, acondicionados em embalagens plásticas e congelados com o cálice até o momento dos experimentos.

2.3 PREPARO DO EXTRATO

O extrato foi preparado no Laboratório Núcleo de Experimentação e Estudos Analíticos do IFRS - Campus Sertão. Os frutos *in natura* previamente macerados em almofariz foram adicionados à solução extratora água:etanol (50% v/v) e transferidos para banho de ultrassom, sem aquecimento, por 2 horas. O extrato foi filtrado com peneira, papel de filtro quantitativo e filtro hidrofílico de 0,22 μm . O filtrado transferido para um evaporador rotativo na temperatura de 50 °C, por aproximadamente 2 horas. O teor alcóolico do mesmo foi determinado através de densímetro (Rudolph Analytical Research), conforme metodologia descrita por Martin (2018) para etanol. O filtrado foi armazenado em frasco âmbar e mantido sobre refrigeração. Foi verificado o pH

em pHgâmetro modelo Q 40A da Quimis, previamente calibrado com soluções tampão 4,0 e 7,0.

2.3.1 DETERMINAÇÃO DOS FLAVONOIDES E ÁCIDOS FENÓLICOS PRESENTES

A determinação dos flavonoides e ácidos fenólicos do extrato de *Physalis peruviana* foi realizada por HPLC-UV em fase reversa, com vazão da fase móvel de 1 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. Para determinação de ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido clorogênico se utilizou fase móvel de acetonitrila:água, acidificada em pH 3,0 (10:90 v/v), com pH ajustado com ácido fosfórico e comprimento de onda: 280 nm. Para determinação de quercetina a fase móvel foi solução de água 0,3% ácido fórmico e solução de metanol 0,3% ácido fórmico em comprimento de onda de 360 nm.

2.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DO EXTRATO

A avaliação da ação antifúngica exercida pelo extrato de *Physalis peruviana* se realizou através de testes *in vitro* e com morangos. O repique do fungo foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da UPF. As placas foram mantidas em câmara com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas ao dia até crescimento do fungo. Posteriormente armazenadas sobre refrigeração. O meio de cultura utilizado foi PDA (do inglês *Potato Dextrose Agar*). O repique do fungo foi realizado com 10 dias de antecedência a realização de cada teste.

2.4.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A menor concentração de extrato de *Physalis peruviana* capaz de inibir o crescimento (efeito preventivo) micelial do *Botrytis cinerea*, foi determinada pelo método de difusão em ágar *Poisoned Food* (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). A inoculação do fungo foi realizada através da adição de um disco de micélio de 7 mm no centro de cada placa. Após o período de incubação a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, os diâmetros dos crescimentos fúngicos observados foram mensurados com auxílio de paquímetro. O efeito antifúngico apresentado pelos diferentes tratamentos foi estimado através da equação relatada por Balouiri, Sadiki e Ibsouda (2016).

2.4.2 TESTES COM MORANGOS

Os morangos orgânicos utilizados foram adquiridos de produtora certificada residente no município de Barão de Cotegipe-RS. Os frutos foram avaliados quanto ao valor de pH, sólidos solúveis totais (°Brix), umidade (%) e atividade de água (*A_w*) de acordo com Adolfo Lutz (2005).

Para o experimento o extrato, fungicida Mythos e água Milli-Q estéril foram aplicados por aspersão com base na metodologia utilizada por Aqueveque et al (2016). A aplicação do *Botrytis cinerea* foi realizada 24 horas após a aplicação dos tratamentos. A suspensão de conídios foi preparada na concentração de 10⁵ conídios

por mL de suspensão e aplicado pela técnica de aspersão, totalizando 3 borrifadas por fruto. Os testes foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da UPF e utilizaram 5 frutos por tratamento cada. A ação antifúngica do extrato, fungicida Mythos e água Milli-Q estéril foi avaliada em morangos maduros e verdes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados os compostos ácido clorogênico ($148,8 \mu\text{g mL}^{-1}$), ácido cafeico ($14,42 \mu\text{g mL}^{-1}$), ácido ferúlico ($2,44 \mu\text{g mL}^{-1}$) e quercetina ($190 \mu\text{g mL}^{-1}$). A produção do extrato a partir dos frutos inteiros, casca, polpa e sementes, contribuíram para a presença destes compostos. As diferentes partes da planta podem conter diversos compostos fenólicos e teores distintos de um mesmo composto (ERTURK et al., 2017). O avanço da maturação pode influenciar na concentração dos diferentes compostos fenólicos (LA ROSA; ALVAREZ-PARRILLA; GONZALEZ-AGUILAR, 2010; LICODIEDOFF; KOSLOWSKI; RIBANI, 2013). Os frutos utilizados neste trabalho apresentavam grau de coloração 5 (frutos maduros) de acordo com a classificação pela Icontec (1998).

O crescimento micelial do fungo foi inibido em 100% quando o volume de 5 mL do extrato foi incorporado ao meio de cultura PDA resultando em uma concentração final de 20% (v/v). O percentual de inibição apresentado pelo volume de 5 mL de extrato foi superior ao percentual de inibição de 68,81% apresentado pelo fungicida Mythos.

A evaporação do extrato em evaporador rotativo a $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e a determinação do teor alcóolico garantiram que não houve interferência da temperatura utilizada no evaporador rotativo e do etanol na ação antifúngica do extrato (OLIVARES-TENORIO et al., 2017). A filtragem em filtro de $0,22 \mu\text{m}$ evitou a possível interferência de microrganismos antagonistas ao *Botrytis cinerea* (KUMAR, 2012). A ação fungicida apresentada pelo extrato se deve a presença dos compostos fenólicos e a ação sinérgica destes. Na maioria das vezes, a concentração dos diferentes compostos presentes em um extrato não é suficiente para que um composto isoladamente exerça ação antifúngica (PIRES; OLIVEIRA, 2011; RAZZAGHI-ABYANEH; RAI, 2013).

Os resultados obtidos nos testes com morangos evidenciaram que o grau de maturação dos morangos mostrou efeito sobre a ação do extrato, fungicida e controle. Todos os tratamentos foram mais eficazes no controle do *Botrytis cinerea* quando aplicados por aspersão nos frutos verdes em relação aos maduros.

A ação antifúngica observada foi com base no efeito resultante da ação dos compostos fenólicos do extrato juntamente com a composição química dos morangos. Valores da composição química dos frutos verdes foram inferiores aos observados nos frutos maduros, demonstrando menor disponibilidade de nutrientes para o desenvolvimento do fungo. A aplicação do extrato nos frutos verdes atua como uma camada protetora, reduzindo a capacidade do fungo em metabolizar os nutrientes dos morangos mesmo com o avanço da maturação, situação relatada por Ornelas-Paz et al (2013). O teor de sólidos solúveis de $6 \text{ }^{\circ}\text{Brix}$ também pode ter contribuído para este resultado. A influência exercida pelo teor de solutos no crescimento de *Botrytis cinerea* é mencionada por Lahlali et al (2007).

4 CONCLUSÃO

Quando avaliados *in vitro* ou *in vivo* a ação antifúngica exercida pelos metabólitos secundários de plantas, após extração da matriz vegetal, pode ser influenciada por diferentes fatores. A aplicação do extrato de forma preventiva frente ao *Botrytis cinerea* demonstrou melhor ação antifúngica quando aplicado em morangos verdes armazenados a 25 °C. A aspersão do extrato de *Physalis peruviana* demonstrou um efeito protetor para o morango na prevenção do desenvolvimento de *Botrytis cinerea*.

O uso do extrato inibiu o crescimento do fungo demonstrando que o extrato de *Physalis peruviana* representa uma alternativa para controle preventivo de mofo cinzento em morangos da variedade Albion.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade de Passo Fundo (UPF), ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – IFRS Campus Sertão e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

6 REFERÊNCIAS

- ANTUNES, L.E.C.; CARVALHO, G.L.; SANTOS A.M. **A cultura do morango**. 2. ed. Brasília - DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011, 58 p.
- ANVISA, Agência Nacional da Vigilância Sanitária - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): **Relatório de Atividades de 2011 e 2012**. Gerência Geral de Toxicologia. Brasília: 2013.
- AQUEVEQUE, P. et al. Antifungal activities of extracts produced by liquid fermentations of Chilean *Stereum* species against *Botrytis cinerea* (grey mould agent). **Crop Protection**. Chillan, Chile, p. 95-100. jul. 2016.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. Morocco, p. 71-79. abr. 2016.
- BRASIL, **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT)**. Consulta de Praga: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2018. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 11 janeiro 2018.
- BRASIL. Decreto nº 7.794, de 20 de agosto de 2012. **Instituiu A Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica (PNAPO)**. Brasília, GO, Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/decreto/d7794.htm>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- CANTILLANO, R.F.F.; SILVA, M.M. da. **Manuseio Pós-colheita de Morangos**. Pelotas - RS: Embrapa Clima Temperado, 2010.
- CORRÊA, J.A.M. **Estudo químico de extratos de plantas da família Solanaceae com atividade a fungos fitopatogênicos**. Tese (Curso de Doutorado em Ciências. Área de Concentração: Microbiologia Agrícola), Universidade de São Paulo, Piracicaba - SP, 2015, 165 f.
- CUZZI, C. **Extratos de canola no controle do Botrytis cinerea in vitro e do mofo cinzento em pós-colheita de morangos**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco - PR, 2013. 64 f. Disponível em: <<http://bdt.ibict.br/vufind/Search/Results?lookfor=mofo+cinzento&type=AllFields&limit=20&sort=year>>. Acesso em: 3 jan. 2018.
- ERTÜRK, Ö. et al. Antioxidant, Antimicrobial Activities and Phenolic and Chemical Contents of *Physalis peruviana* L. from Trabzon, Turkey. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**. Ordu, Turkey, p. 213-216. set. 2017.
- FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (Switzerland). **Pathogen risk list**. 2014. Disponível em: <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/pathogen-risk-list.pdf?sfvrsn=669d419a_8>. Acesso em: 02 jan. 2018.
- GIANESSI, L.P.; REIGNER, N. **The Value of Fungicides In U.S. Crop Production**. Washington, Dc: Crop life Foundation, 2005. 243 p.

- GRABKE, A. **Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* from Strawberry - Molecular Mechanisms and Management**. Tese (Ciências Agrônômicas e de Cultivos comuns, Biologia comum e Patologias Farmacêuticas), Universidade de Clemson, Carolina do Sul, 2014. 106 f.
- GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**. North Carolina, p. 412-429. jun. 2014.
- HUSAINI, A.M; NERI, D. (Ed.). **Strawberry: Growth, Development and Diseases**. Boston - EUA: Cab International, 2016.
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS E CERTIFICAÇÃO. NTC 4580: **Frutas frescas. Uchuva. Especificaciones**. ICONTEC. Colombiana, 1998.
- KUMAR, Surinder. **Textbook of Microbiology**. New Delhi - India: Jaupee Brothers Medical Publishers (p) LTDA, 2012. 759 p.
- LAHLALI, R. et al. Predictive modelling of temperature and water activity (solute) on the *in vitro* radial growth of *Botrytis cinerea* Pers. **International Journal of Food Microbiology**. Gembloux, Belgium, p. 1-9. fev. 2007.
- LAROSA, L.A. de; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZALEZ-AGUILAR, G.A. **Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability**. New Delhi, India: Wiley-blackwell, 2010.
- LICODIEDOFF, S; KOSLOWSKI, L.A.D.; RIBANI, R.H. Flavonols and antioxidant activity of *Physalis peruviana* fruit at two maturity stages. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 35, n. 2, p.393-399, jun. 2013.
- LUTZ, Instituto Adolfo. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglia IV. ed. 1º ed. digital. São Paulo - SP: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1000 p.
- OLIVARES-TENORIO, M. et al. Thermal stability of phytochemicals, HMF and antioxidant activity in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). **Journal of Functional Foods**. The Netherlands, p. 46-57. fev. 2017.
- ORNELAS-PAZ, J.J. et al. Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. **Food Chemistry**. Chihuahua, Mexico, p. 372-381. maio 2013.
- PIRES, N.M.; OLIVEIRA, V.R. Alelopatia. In: OLIVEIRA JUNIOR, R.S.de; CONSTANTIN, Jamil; INOUE, Miriam Hiroko (Ed.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba - PR: Omnipax, 2011. Cap. 5. p. 95-124.
- RAMADAN, Mohamed Fawzy. Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. **Food Research International**. Zagazig, Egypt, p. 1830-1836. out. 2011.
- RAZZAGHI-ABYANEH, M.; RAI, M. (Ed.). **Antifungal Metabolites from Plants**. Tehran - Iran: Springer, 2013.
- REVISTA CAMPO E NEGÓCIO: **Anuário HF 2015**. Uberlândia - MG: Agrocomunicação, dez. 2015.