

## Atividade Antifúngica de extratos naturais

### Antifungal activity of natural extracts

#### RESUMO

**Brenda Dall Molin**  
[brenda\\_dallmolin@hotmail.com](mailto:brenda_dallmolin@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

**Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini**  
[mperdoncini@gmail.com](mailto:mperdoncini@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

**Maysa A. Formigoni Fasolin**  
[mayformigoni@live.com](mailto:mayformigoni@live.com)  
Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

**Leticia Cabrera Parra Bortoluzzi**  
[leticia\\_cabrera@outlook.com](mailto:leticia_cabrera@outlook.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

O fungo *Botrytis cinerea* produz o mofo cinzento, responsável por infectar mais de 200 plantas hospedeiras. Possui a capacidade de decompor complexos polissacarídeos da parede celular de plantas, que é característica marcante dos patógenos fúngicos. As folhas da *Stevia rebaudiana*, além de possuírem compostos com alto poder edulcorante, também contam em sua composição com substâncias que possuem capacidade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória. Através do fracionamento com os solventes hexano, metanol, clorofórmio, acetato de etila e isobutanol, foram obtidos extratos do caule moído da *Stevia* para então determinar suas concentrações inibitórias e fungicidas mínimas. O extrato a base de hexano alcançou o melhor resultado em ambos os testes, sendo necessárias 22 mg/mL para ambas as funções. Com este estudo pode-se avaliar a atividade antifúngica do extrato do caule da *S. rebaudiana* e ressaltar o potencial destes subprodutos para obtenção de extratos de origem natural com potencial para aplicação em alimentos ou produtos diversos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Botrytis cinerea*. *Stevia rebaudiana*. Fungicida.

**Recebido:** 19 ago. 2019.

**Aprovado:** 01 out. 2019.

**Direito autorial:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



#### ABSTRACT

The fungus *B. cinerea* produces gray mold, responsible for infecting more than 200 hosts plants. It has a decomposition capacity of plant cell wall polysaccharides, which is characteristic of fungal pathogens. The leaves of *Stevia rebaudiana*, besides having compounds with high sweetening power, also have in their composition substances that have antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory capacity. By fractionation with hexane, methanol, chloroform, ethyl acetate and isobutanol solvents, *Stevia* ground extracts were obtained to determine their minimum inhibitory and fungicidal concentrations. The hexane extract achieved the best result in both tests, requiring 22 mg/mL for both functions. With this study we can evaluate the antifungal activity of *S. rebaudiana* stem extract and highlight the potential of these byproducts to obtain extracts of natural origin with potential for application in different foods or products.

**KEYWORDS:** *Botrytis cinerea*. *Stevia rebaudiana*. Fungicidal.

## INTRODUÇÃO

*Botrytis cinerea* é o responsável pela produção do mofo cinzento, capaz de infectar mais de 200 plantas hospedeiras e causar graves danos à economia em todo o mundo (WILLIAMSON et al., 2007; DEAN et al., 2012). Graças a um arsenal de enzimas degradantes, *B. cinerea* é então capaz de se alimentar de diferentes tecidos vegetais (CHOQUER et al., 2007). A capacidade de decompor complexos polissacarídeos da parede celular de plantas é um aspecto importante do estilo de vida dos patógenos fúngicos (ZHANG et al., 2016).

Este ascomiceto necrotrófico exibe a capacidade de matar células hospedeiras através da produção de toxinas, espécies que reagem ao oxigênio e a indução de um surto oxidativo produzido pela planta (CHOQUER et al., 2007). A infestação pode ocorrer desde o estágio de plântula até o amadurecimento do produto. Danos sérios podem ocorrer após a colheita de plantios aparentemente saudáveis (DEAN et al., 2012). No entanto, *B. cinerea* também causa perdas maciças em algumas culturas hortícolas em campo e em estufa antes da colheita, ou mesmo no estágio de sementeira em alguns hospedeiros (WILLIAMSON et al., 2007).

*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii é um arbusto nativo do Vale do Amambay, formado por uma região de interseção entre o Paraguai, Brasil e Argentina (MARTINS et al., 2016). Sua utilização remete aos costumes indígenas por ser fonte de glicosídeos diterpênicos derivados de esteviol que possuem alto poder adoçante (FERRAZ, 2015). Diferentes espécies de *Stevia* contêm compostos com potencial adoçante, sendo a *S. rebaudiana* a com maior poder edulcorante (GOYAL et al., 2010).

As folhas de *Stevia* contêm compostos fenólicos com propriedades antimicrobianas e antioxidantes, vitamina C, carotenóides e clorofila em quantidades elevadas além de glicosídeos de esteviol (KARAGÖZ & DEMIRDÖVEN, 2019). BARBA et al. (2014) afirma que a *Stevia* “age como um adoçante de baixa caloria e como antioxidante e antimicrobiano ao mesmo tempo”. Oferece benefícios terapêuticos, com efeitos anti-hiperglicêmico, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, antitumoral, antidiarreico, diurético e imunomoduladores (LEMUS-MONDACA et al., 2012).

Este estudo teve como objetivo testar a atividade antifúngica do extrato do caule da *S. rebaudiana* obtido por diferentes solventes, como hexano, metanol, clorofórmio, acetato de etila e isobutanol, sobre o fungo *B. cinerea*. Através da obtenção da concentração inibitória mínima e da concentração fungicida mínima.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O fungo *Botrytis cinerea* CCT 1251 da coleção André Toselo. Os diferentes extratos do caule moído da *Stevia rebaudiana*, foram obtidos através do fracionamento com metanol, hexano, clorofórmio, acetato de etila e isobutanol.

Para o teste da concentração inibitória mínima, foi utilizado o meio sintético RPMI-1640, que é adequado para testes de sensibilidade com fungos filamentosos. O procedimento de preparo seguido foi o indicado pela norma M38-A (NCCLS, 2002). O meio de cultura ágar batata dextrose (BDA), utilizado para o crescimento

dos esporos, e o ágar sabouraud dextrose (ASD), utilizado para o teste da concentração fungicida mínima, foram preparados conforme instruções do fabricante.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada de acordo com o Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos (M38-A), norma desenvolvida pela National Committee for Clinical Laboratory Standart (NCCLS).

Os fungos foram inoculados em ágar ASD por sete dias á 25°C para o desenvolvimento dos esporos. Posteriormente, foi vertida sobre o micélio uma solução estéril de tween 80 a 0,1%, para então realizar a raspagem da colônia para a coleta dos esporos, que foram contados em Câmara de Neubauer. O inóculo foi diluído para uma concentração final de  $10^4$  esporos/mL e utilizado para a determinação da CIM.

O ensaio da CIM ocorreu em duplicata, foram utilizadas placas de 96 poços, 10 desses como tubos testes contendo o meio RPMI e a suspensão de cada extrato, e os demais como controle positivo, isto é, apenas com o meio e o inóculo (poço 11) e controle negativo contendo apenas o meio (poço 12). Nos tubos 1 e 2 foi adicionado 100 µl de cada extrato a 1 g.mL<sup>-1</sup>. A partir do tubo 2 foi realizada a diluição seriada dos extratos até o tubo 10, transferindo-se 100 µl para cada tubo teste e ao final desprezando 100 µl do tubo 10. Em seguida, adicionou-se 100 µl da suspensão à  $10^4$  esporos/mL do fungo *B. cinerea* nos poços testes (1 ao 10) e no controle positivo 11, reduzindo a concentração dos extratos em cada poço pela metade. As placas foram levemente agitadas para a homogeneização do conteúdo e incubadas em estufa a 25 °C por 48 horas. Após este período foi verificado o crescimento do fungo através da turvação do meio e confirmação em microscópio estereoscópio. Foi considerada a CIM, a menor concentração em que o extrato impediu o crescimento do inóculo.

A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada através da inoculação de 20 µL de cada poço negativo em CIM no meio de cultura BDA, que foi então incubada á 25 °C por 48 horas. Assim, a CFM foi a menor concentração onde não ocorreu o crescimento do fungo.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Passado o tempo de incubação, foi realizada a leitura de cada poço da placa de 96 poços e de cada placa de Petri, e foram obtidos os resultados descritos na Tabela 1. Desta forma, observa-se que o extrato de hexano atingiu o melhor resultado para a concentração inibitória mínima (CIM) e para concentração fungicida mínima (CFM).

Tabela 1 – Resultados de CIM e CFM dos extratos de *Stevia rebaudiana*

	CIM	CFM
Metanol	25 mg/mL	25 mg/mL
Hexano	22 mg/mL	22 mg/mL
Clorofórmio	25,63 mg/mL	51,55 mg/mL
Acetato de Etila	97 mg/mL	97 mg/mL

	CIM	CFM
Isobutanol	90,85 mg/mL	90,85 mg/mL

Fonte: Autoria própria (2019).

Os compostos da *S. rebaudiana* são adoçantes de baixa caloria, não-tóxicos, intensificadores de sabor e após testados em humanos e animais, se mostraram não mutagênicos, não teratogênicos e não carcinogênicos (LEMUS-MONDACA et al., 2012).

Os solventes participam das reações que determinam a seletividade e a conversão para um novo produto (MORALES-GONZALEZ et al., 2019). Além do rendimento, há grande variação na composição do extrato em função do sistema solvente utilizado (MOURE et al., 2001).

O hexano é um solvente apolar que possui alta estabilidade, baixas perdas na evaporação, gera baixa corrosão de equipamentos, baixos resíduos graxos e melhores sabor e aroma nos produtos (CUSTÓDIO, 2003). Muito utilizado em separações cromatográficas em fase normal e na purificação de extratos vegetais para extração de compostos lipofílicos como lipídios, ceras epicuticulares, esteroides e ácidos graxos (EMBRAPA, 2014). Ao longo dos anos, vários solventes têm sido testados para substituir o hexano, mas nenhum conseguiu até o momento, reunir qualidades que superassem as suas (CUSTÓDIO, 2003).

## CONCLUSÕES

Os extratos de *Stevia rebaudiana* obtidos com diferentes solventes apresentaram efeitos inibitórios e fungicidas satisfatórios contra o fungo *B. cinerea*, sendo que o extrato de hexano demonstrou maior eficiência inibitória e também fungicida. Assim, pode-se ressaltar o potencial destes subprodutos para obtenção de extratos de origem natural com potencial para aplicação em alimentos. São necessários estudos futuros sobre a aplicação direta nos alimentos.

## REFERÊNCIAS

- BARBA, F. J. et al. *Stevia rebaudiana* Bertonni as a natural antioxidant/antimicrobial for high pressure processed fruit extract: Processing parameter optimization. **Food Chemistry**, v. 148, p. 261–267. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613014829?via%3DIhub>. Acesso em: 13 ago. 2019.
- CHOQUER, M. et al. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, n. 1, p. 1-10. 2007. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/277/1/1/566574>. Acesso em: 13 ago. 2019.

CUSTÓDIO, A. F. **Modelagem e simulação do processo de separação de óleo de soja-hexano por evaporação**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, 2003. Disponível em: [http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/266512/1/Custodio\\_AlineFerrao\\_M.pdf](http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/266512/1/Custodio_AlineFerrao_M.pdf). Acesso em: 17 set. 2019.

DEAN, R. et al. **The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology**. *Molecular Plant Pathology*, v. 13, n. 4, p. 414–430. 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>. Acesso em: 13 ago. 2019.

EMBRAPA. Purificação do n-Hexano comercial para aplicação em investigações fitoquímicas. Comunicado Técnico, n. 104. 2001. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/997564/1/FL0324.pdf>. Acesso em: 17 set. 2019.

FERRAZ, E. de O. **Composição química e atividade biológica de espécies de nectandra e stevia rebaudiana**. Tese (doutorado) - Unidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2015. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/127899>. Acesso em: 13 ago. 2019.

GOYAL, S. K.; SAMSHER; GOYAL, R. K. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a biosweetener: A review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 61, n. 1, p. 1–10. 2010. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/40448347\\_Stevia\\_Stevia\\_rebaudiana\\_a\\_bio-sweetener\\_A\\_review](https://www.researchgate.net/publication/40448347_Stevia_Stevia_rebaudiana_a_bio-sweetener_A_review). Acesso em: 13 ago. 2019.

KARAGÖZ, S.; DEMIRDÖVEN, A. Effect of chitosan coatings with and without *Stevia rebaudiana* and modified atmosphere packaging on quality of cold stored fresh-cut apples. **LWT - Food Science and Technology**, v. 108, p. 332–337. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381930235X?via%3Dihub>. Acesso em: 13 ago. 2019.

LEMUS-MONDACA, R. et al. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1121-1132. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611017559?via%3Dihub#s0075>. Acesso em: 13 ago. 2019.

MARTINS, P. M. et al. **Green extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bert.) with low solvent consumption: A desirability approach**.

Resource-Efficient Technologies, v. 2, n. 4, p. 247-253. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405653716301671>. Acesso em: 13 ago. 2019.

MORALES-GONZALEZ, O.M. et al. Solvent impact assessment for the “One-Flow Functional Solvent Factory”. **Chemical Engineering Science: X**, v. 3. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cesx.2019.100024>. Acesso em: 17 set. 19.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00223-5). Acesso em: 17 set. 19.

**NCCLS**. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada. M38-A, v. 22, n. 16, 2002. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi\\_OPAS1M38-A.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPAS1M38-A.pdf). Acesso em: 13 ago. 2019.

WILLIAMSON, B. et al. **Botrytis cinerea: the cause of grey mould diseases**. *Molecular Plant Pathology*, v. 8, n. 5, p. 561-580. 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>. Acesso em: 13 ago. 2019.

ZHANG, L. et al. **A novel Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> transcription factor BcGaaR regulates D-galacturonic acid utilization in Botrytis cinerea**. *Molecular Microbiology*, v. 100, n. 2, p. 247-262. 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mmi.13314>. Acesso em: 13 ago. 2019.