

Atividade antifúngica do extrato de *Stevia rebaudiana bertonii*

Antifungal activity of *Stevia rebaudiana bertonii* extract

RESUMO

Andressa Caroline Ferreira de Souza

andressa_caroline14.a@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini

mperdoncini@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Pollyana Silva Garcia

pollygarcia321@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Rebeca Ribeiro Rufo Corona

rebeca_cyclus@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Maysa Ariane Formiconi Fasolin

mayformigoni@live.com

Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020

Aprovado: 01 out. 2020.

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



Stevia rebaudiana bertonii é uma planta com alto poder edulcorante, nativa da América do Sul. Ela é rica em compostos fenólicos que exibem atividade antioxidante e antimicrobiana. *Penicillium citrinum* é um fungo filamentosos de ocorrência mais comum em cereais (grãos estocados), matérias orgânicas em decomposição, especiarias tropicais, alimentos (como frutas e pães), rações, solos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de inibição do crescimento de uma espécie fúngica na presença do extrato de *Stevia rebaudiana bertonii*. Foi realizada a extração do caule de estêvia moído utilizando o solvente metanol. Também, foram analisadas algumas características da colônia e estrutura morfológica do fungo *Penicillium citrinum* como o diâmetro micelial da colônia, coloração, fiálides, esporulação. As análises foram realizadas em triplicata, testando somente uma concentração de extrato de *Stevia rebaudiana bertonii*. A análise do fungo *Penicillium citrinum* apresentou algumas mudanças em suas colônias e estrutura morfológica na presença do extrato, sendo esta uma inibição sutil mesmo sob concentração mais elevada.

PALAVRAS-CHAVE: *Penicillium*. Estêvia. Metanol.

ABSTRACT

Stevia rebaudiana bertonii is a plant with high sweetening power, native to South America. It is rich in phenolic compounds that exhibit antioxidant and antimicrobial activity. *Penicillium citrinum* is a filamentous fungus most commonly found in cereals (stored grains), decomposing organic materials, tropical spices, foods (such as fruits and breads), feed, soil. The objective of this work was to evaluate the potential to inhibit the growth of a fungal species in the presence of *Stevia rebaudiana bertonii* extract. The stevia stalk was extracted using the solvent methanol. Also, some characteristics of the colony and morphological structure of the fungus *Penicillium citrinum* were analyzed, such as the mycelial diameter of the colony, color, phialides, sporulation. The analyzes were performed in triplicate, testing only a concentration of *Stevia rebaudiana bertonii* extract. The analysis of the fungus *Penicillium citrinum* showed some changes in its colonies and morphological structure in the presence of the extract, this being a subtle inhibition even under higher concentration.

KEYWORDS: *Penicillium*. Stevia. Methanol.

INTRODUÇÃO

Penicillium citrinum é um fungo filamentosos com aspectos de crescimento com uma fisionomia de couro, de coloração verde azul, e verso normalmente amarelo para laranja, com produção de conídios globosos a subglobosos de hialino a esverdeado (THOM e RAPER, 1949).

São mais frequentes em regiões nas quais a temperatura é baixa, sendo essas psicotróficas, capazes de deteriorar alimentos em temperaturas de refrigeração atacando os que precisam ser armazenados e por um longo período de tempo, e também caracterizados por serem xerófitas, ou seja, suportam ambientes como de clima árido. Tem ocorrência mais comum em cereais (grãos estocados), matérias orgânicas em decomposição, especiarias tropicais, alimentos (como frutas e pães), rações, solos (PITT e HOCKING, 1997; PITT, 2000; POSADA et al., 2007).

Em 1931, descobriu-se uma micotoxina chamada citrinina produzida por várias espécies de *Penicillium*, sendo o fungo *P. citrinum* o principal produtor da mesma, passando a ser inicialmente estudada com o propósito de ser empregada como antibiótico. Contudo, em 1955, esse propósito ficou frustrado após haver demonstração de atividade nefrotóxica nela (BETINA, 1984; VIVIAN, 2002; VITORINO, 2011).

Micotoxinas são consideradas metabólitos secundários de fungos filamentosos, produzidas por alguns deles podendo contaminar grande variedade de alimentos, tanto da alimentação humana, quanto do animal. Podendo causar um impacto significativo na economia, pelas perdas formadas na criação de animais e produção de alimentos, em razão de seus vários efeitos tóxicos e à sua alta resistência a tratamentos térmicos, levando a ser potencialmente perigosa para a saúde humana e animal (BETINA, 1984; LINO et al., 2004).

A *Stevia rebaudiana bertonii* é uma planta nativa da América do Sul. Por apresentar em suas folhas substâncias não calóricas de alto poder edulcorante se torna um potencial dulcificante, sendo muito cultivada comercialmente para fabricação de adoçantes naturais (GOYAL et al., 2010; LEMUS-MONDACA et al., 2012).

Além do seu alto poder edulcorante, ela também apresenta componentes químicos, como proteínas, ácidos graxos, minerais, ácidos fenólicos e flavonoides, como kaempferol, quercetina, catequinas; vitaminas como ácido ascórbico, riboflavina e tiamina. (GOYAL et al., 2010; GAWEŁ-BĘBEN et al. 2015). Por esses componentes importantes, estudos vem sendo realizados em cima dela, como o artigo de Henz em (2018) que avaliou a atividade antimicrobiana in vitro da planta *Stevia rebaudiana Bertoni* e de adoçantes não calóricos sobre o crescimento de *Streptococcus mutans* *Lactobacillus casei*, micro-organismos cariogênicos presentes na cavidade bucal, onde os resultados demonstraram que a solução de *Stevia rebaudiana Bertoni* (SSR) e eritritol (ER) apresentam efeito inibidor no crescimento das cepas testadas de *S. mutans* e *L. casei*.

Tendo em vista esse potencial, e verificando que *Stevia rebaudiana Bertoni* apresentam atividades antimicrobianas, o presente trabalho tem como objetivo avaliar seu potencial antifúngico frente a cepas de *Penicillium citrinum*, verificando sua ação no desenvolvimento físico e estrutural do fungo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para reativação e isolamento do fungo, esporos de *Penicillium citrinum* CCT 4940 foram inoculados em um Eppendorf contendo 1mL de Agar-ágar fluido. Com uma agulha esterilizada por flambagem, esporos repicados para Agar extrato de malte (MEA). Todo o procedimento foi realizado em ambiente estéril. O processo foi realizado em triplicata utilizando meio MEA (Ágar extrato de malte) para o isolamento do fungo, incubando-o em uma temperatura de 25°C por sete dias.

Paralelamente, obteve-se o extrato do caule moído da *Stevia rebaudiana bertonii*, por meio do fracionamento com o solvente metanol. Primeiramente dividiu-se 1000 gramas de caule moído de estevia em quatro Erlenmeyers, onde realizou a pesagem de 250 gramas em cada um. Após adicionou-se 75mL de metanol com uma pipeta graduada em cada Erlenmeyer utilizando a capela, em seguida, vedou os Erlenmeyers com plástico filme e colocou eles em uma Câmara Incubadora com Agitação Orbital (*Shaker*) por uma hora com 250 rpm (rotação por minuto), em uma temperatura de 45°C, após 1 hora retirou-se o extrato líquido com cuidado e colocando em um dos dois béquers nomeados de A e B, esse processo foi realizado em triplicata.

Escolheu-se o béquer A para o experimento, utilizando um Rotavapor, onde, realizou-se a secagem do extrato líquido em balão específico e esterilizado. Para remover o extrato seco de dentro do balão, utilizou-se inicialmente 100mL do meio de cultura ágar malte, adicionado de 0,5mL de tween 80 a 0,1 %, medidos em proveta esterilizada, com auxílio de espátula e bastão de vidro foi removida grande parte do extrato seco. O meio com extrato foi vertido em outro balão esterilizado. O processo foi repetido, diferenciando-se somente na adição do meio de cultura, onde adicionou-se 180mL do mesmo, finalizando-se a remoção do extrato.

Verteu-se meio de cultura concentrado em 9 placas de petri e para o controle o meio de cultura puro foi vertido em 9 placas de petri, todas devidamente esterilizadas em uma autoclave vertical. Para a realização da inoculação utilizou-se a melhor placa entre as três que estavam incubadas para isolamento do fungo *Penicillium citrinum*, com uma alça esterilizada, foi retirada uma pequena quantidade de esporos, adicionando-o em um Eppendorf contendo 1mL de Ágar-Ágar.

Com uma micropipeta em uma câmara de fluxo, pipetou-se 10 microlitros do Eppendorf e inoculou-se no centro da placa de petri contendo o meio de cultura concentrado, realizou-se o mesmo processo para as demais placas com meio de cultura tanto puro, quanto com o extrato. As placas foram armazenadas em uma incubadora na temperatura de 25°C por sete dias. Após esse período, foi escolhida a melhor placa de controle e a melhor com o extrato, onde lâminas com os fungos das placas escolhidas foram preparadas com água destilada esterilizada para contagem de esporos e corante azul de algodão para avaliação dos resultados, utilizando-se um microscópio ligado em um computador com o programa *Scoop photo*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o processo de extração do caule moído da *Stevia rebaudiana bertonii*, calculou-se utilizando o peso do balão do rotavapor vazio subtraindo com o peso

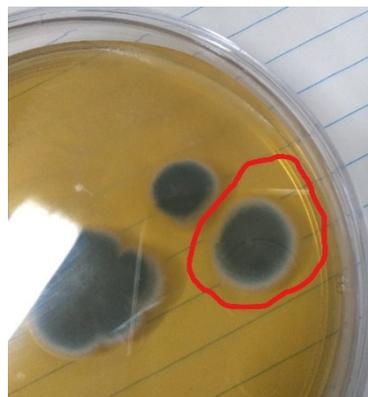
do balão após a extração, sendo obtido 10,382g de extrato seco. Dissolveu-se este extrato no meio de cultura obtendo uma concentração de 14%. O meio com esta concentração foi utilizado para o crescimento do fungo (Figura 1), comparando-se com o crescimento do fungo no meio de cultura controle (Figura 2). Observando-se a olho nu após sete dias de cultivo, os dois acabaram tendo mais que uma colônia do fungo durante a inoculação, por isso isolou-se uma colônia (circundada em vermelho na figura 1 e 2) para a verificação em microscópio. Observou-se que a colônia com o meio de cultura controle obteve diâmetro médio de 17mm, com uma coloração verde azulada e levemente sulcada, sendo que a borda do micélio apresentou coloração branca. Já em meio concentrado, a colônia isolada de *Penicillium citrinum*, apresentou diâmetro médio de 12mm, perdendo a coloração verde e apresentando micélio de cor branco-acinzentado.

Figura 1 – Fungo em meio de cultura com extrato



Fonte: Autoria própria (2019).

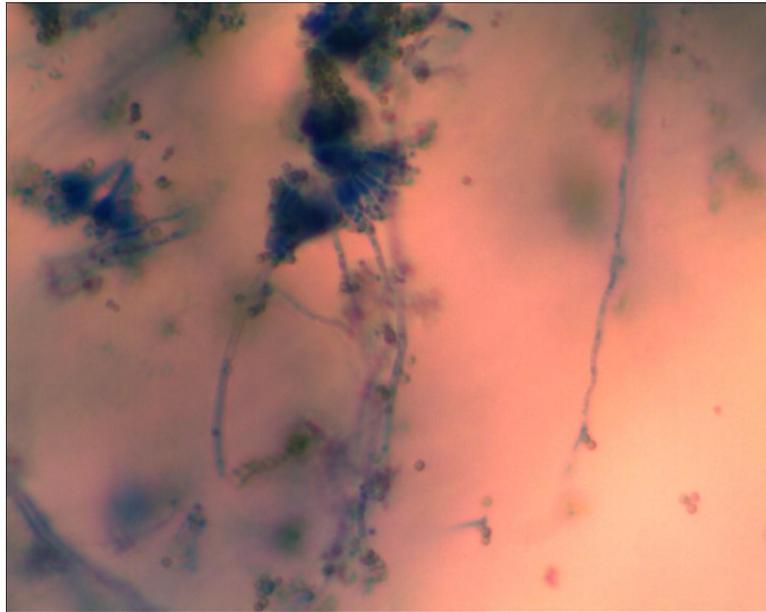
Figura 2 – Fungo em meio de cultura puro



Fonte: Autoria própria (2019).

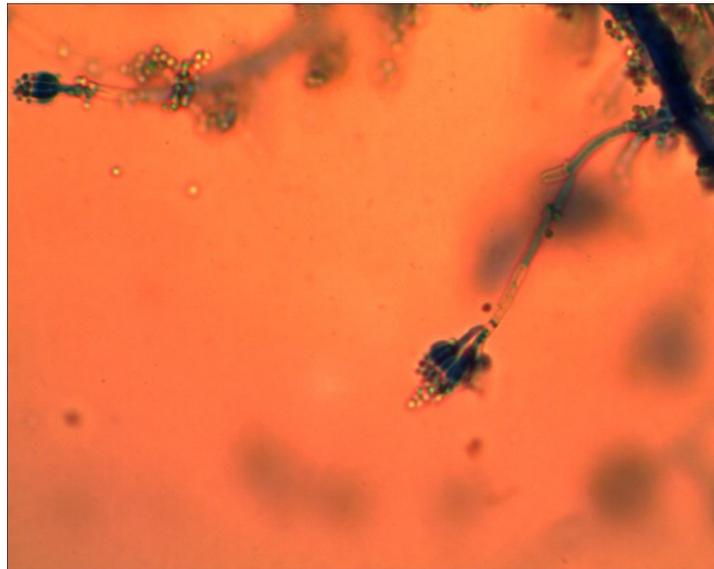
Analisando a estrutura do fungo no meio de cultura concentrado em um microscópio na lente 400x, pode se observar algumas mudanças na estrutura, como fiálides mais espessas, esporulação reduzida, diminuição das cadeias de esporos, poucas aglomerações de esporos e formação de vacúolos. Essas observações podem ser notadas comparando a controle (Figura 3), com o meio com extrato (Figura 4).

Figura 3 – Visão microscópica do fungo inoculado em meio puro



Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 4 – Visão microscópica do fungo inoculado em meio com extrato



Fonte: Autoria própria (2019).

CONCLUSÃO

O fungo *Penicillium citrinum* apresentou algumas mudanças em suas colônias e estrutura morfológica na presença do extrato de *Stevia rebaudiana*, sendo esta uma inibição sutil mesmo sob concentração mais elevada. Estudos posteriores poderão ser realizados a partir de extratos obtidos com outros solventes para a verificação de efeitos sobre esses microrganismos.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, S. P. Mycotoxins and indoor moulds. **Indoor Environment Connections**, v.3, n.4, p. 14-24, 2002.

BETINA, V. Citrinin and related substances. V. Betina (ed). Mycotoxins, production, isolation, separation and purification. **Elsevier, Sci. Publ. Co. Inc.**, New York, p. 3-236. 1984.

GAWEŁ-BĘBEN, K. et al. *Stevia rebaudiana bert.* leaf extracts as a multifunctional source of natural antioxidants. **Molecules**, p. 5468-5486, 2015.

GOYAL, S., SAMSHER, G.R., GOYAL, R., *Stevia (Stevia rebaudiana)* a biosweetener: a review. **Int J Food Sci Nutr**, p. 1-10, 2010.

HENZ, S.L. et al. Atividade antimicrobiana de *Stevia rebaudiana Bertoni* e de adoçantes não calóricos sobre bactérias cariogênicas: estudo in vitro. **RFO**, Passo Fundo, v.23, n.1, p. 37-41, jan./abr. 2018.

LEMUS-MONDACA, R., VEGA-GÁLVEZ, A., ZURA-BRAVO, L., AH-HEN, K., *Stevia rebaudiana bertonii*, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, p. 1121-1132, 2012.

LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. **Rev. Portuguesa Ciênc. Vet.**, v. 99, n. 552, p. 181-192, 2004.

PITT, J. I., A laboratory guide to common *Penicillium* species. Australia: **Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC**, p.197, 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage, **Blackie Academic & Professional**. Australia, 1997.

POSADA, F.M. et al. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). **Mycological research**. v.111, p.748-757, 2007.

SILVA, A. E. B. **Resíduo de estévia (*Stevia rebaudiana bertonii*) e cálices de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) na alimentação de frangos de corte**. Dissertação (mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, 2019. Disponível

em: <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/handle/1/5586>. Acesso em: 03 ago. 2020.

THOM, C.; RAPER, K.B. Manual of the *Penicillium*. **Williams & Wilkins**, Baltimore, 1949.

VITORINO, O. C. L. **Micotoxinas na alimentação e na saúde animal e humana**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica) - Universidade de Açores, 2011. Disponível em:
<https://repositorio.uac.pt/bitstream/10400.3/1522/1/DissertMestradoOrlandaCristinaLeonardoVitorino2012.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2020.

VIVIAN, J. **Produção da micotoxina citrinina por *Penicillium* spp.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade federal de Viçosa, 2002. Disponível em:
<https://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/11395/texto%20completo.PDF?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 fev. 2020.