

Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de algas no controle de *Penicillium expansum* Link (Trichocomaceae, Ascomycota)

Argus Cezar da Rocha Neto^{1*}

Luana dos Santos de Souza²

Elisangela Angelo³

Rafaela Gordo⁴

Eduardo Bastos²

Maria Cecília Miotto²

José Bonomi Barufi²

Marcelo Maraschin⁵

Roberto Derner⁴

Leonardo Rörig²

¹ Laboratório de Fitopatologia, Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciência Agrárias
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Trindade, CEP 88040-960, Florianópolis – SC, Brasil

² Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Santa Catarina

³ Companhia Paranaense de Energia
Coordenadoria de Análise Multidisciplinar, Curitiba – PR, Brasil

⁴ Laboratório de Cultivo de Algas, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciência Agrárias
Universidade Federal de Santa Catarina

⁵ Laboratório Morfologia e Bioquímica Vegetal, Departamento de Fitotecnia
Centro de Ciência Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina

* Autor para correspondência
neto.acrn@gmail.com

Submetido em 27/04/2015
Aceito para publicação em 04/08/2015

Resumo

Penicillium expansum destaca-se como fitopatógeno cosmopolita e altamente agressivo, responsável pelo bolor azul, doença que proporciona a perda de qualidade e quantidade pós colheita de frutos. Aplicações de produtos químicos é tradicionalmente o método de controle mais utilizado. No entanto, a bioprospecção de algas tem-se revelado uma fonte para uma grande quantidade de compostos antifúngicos. Desta maneira, o presente trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos dos extratos etanólicos de sete microalgas e cinco macroalgas contra *P. expansum*. O potencial antifúngico foi avaliado analisando-se a porcentagem de germinação, o tamanho do tubo germinativo, a concentração mínima inibitória e a concentração efetiva mediana (CE_{50}). O perfil espectrofotométrico foi realizado nos extratos que apresentaram efeito inibitório. Dentre as algas estudadas, os extratos de *Chlorella* sp. e *H. pluvialis*, nas concentrações finais de 18,8 e 125,95 mg.mL⁻¹, foram capazes de

inibir 100 e 91% da germinação, respectivamente. A CE_{50} foi de 2,93 e 61,20 $mg.mL^{-1}$, para *Chlorella* sp. e *H. pluvialis*, respectivamente. *Chlorella* sp. apresentou picos de absorção na faixa da clorofila-a, já *H. pluvialis* apresentou um pico correspondente a faixa dos compostos fenólicos. Embora sejam necessários mais estudos para caracterizar os extratos, *Chlorella* sp. e *H. pluvialis* apresentaram efeito antifúngico promissor no controle de *P. expansum*.

Palavras-chave: Antifúngicos; Bioprospecção; *Penicillium expansum*

Abstract

Antimicrobial activity of ethanolic extracts from algae against *Penicillium expansum* Link (Trichocomaceae, Ascomycota). *Penicillium expansum* is a cosmopolitan, highly aggressive pathogen that causes blue mold, a disease of great importance that leads to losses in quality and quantity of harvested fruits. The application of chemicals is traditionally used as a control method. However, algae bioprospecting has revealed many antifungal compounds that can be used to control pathogens. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of ethanolic extracts from seven microalgae and five macroalgae against *P. expansum*. The antifungal potential was evaluated by analyzing germination percentage, the size of the germ tube, minimum inhibitory concentration (MIC), and the median effective concentration (EC50). The spectrophotometric profile was determined for extracts that showed an inhibitory effect. Among the investigated algae, the *Chlorella* sp. and *H. pluvialis* extracts, which had final concentrations of 18.8 and 125.95 $mg.mL^{-1}$, inhibited 100% and 91% germination, respectively. The EC50 was 2.93 and 61.20 $mg.mL^{-1}$ for *Chlorella* sp. and *H. pluvialis*, respectively. *Chlorella* sp. showed absorption peaks in the range of chlorophyll-a and *H. pluvialis* presented a peak in the range of phenolic compounds. Although further studies are required to characterize the extracts, *Chlorella* sp. and *H. pluvialis* showed promising antifungal effects on the control of *P. expansum*.

Key words: Antifungal; Bioprospecting; *Penicillium expansum*

Introdução

As doenças fúngicas que acometem os frutos de clima temperado, como maçãs, pêras e pêssegos causam grandes prejuízos à cadeia produtiva, exigindo investimentos crescentes na defesa fitossanitária e, por outro lado, comprometendo a segurança alimentar em função dos efeitos adversos à saúde humana dos fungicidas utilizados. Dentre essas doenças, o bolor azul causado por *Penicillium expansum* Link (Trichocomaceae, Ascomycota) se destaca, uma vez que não há materiais vegetais resistentes ao seu ataque, sendo altamente agressivo, cosmopolita e resistente às condições adversas do ambiente, tal qual as baixas temperaturas (QUAGLIA et al., 2011).

Grande parte dos prejuízos causados pelo fitopatógeno decorre da incorreta manipulação dos frutos no pós-colheita que, caso bem executados, diminuiriam significativamente as perdas, uma vez que para a doença se estabelecer, o fitopatógeno necessita de pequenos ferimentos na epiderme dos frutos (FILONOW, 2005).

Em decorrência disso, métodos de controle químico têm sido extensivamente utilizados e pesquisados para o controle da doença em pós-colheita de frutos (CALVO et al., 2007). No Brasil, por exemplo, formulações comerciais contendo os grupamentos químicos imidazóis e dicarboximidas estão disponíveis no mercado, tendo seu uso regulamentado e recomendados para o tratamento de maçãs no pós-colheita (MAPA, 2014).

No entanto, há atualmente uma crescente preocupação social acerca do uso indiscriminado de produtos químicos nos alimentos, acarretando em problemas de ordem clínica, na saúde dos cidadãos, além de contribuir para a degradação ambiental. Tal cenário tem impulsionado a busca por formas de proteção dos frutos em pós-colheita contra agentes fitopatogênicos que estejam em consonância a este escopo (QUAGLIA et al., 2011).

A prospecção de produtos naturais com atividade antimicrobiana já revelou muitas biomoléculas efetivas e com baixa ecotoxicidade. Bactérias, fungos e plantas terrestres foram por muito tempo o alvo principal dessas

pesquisas de bioprospecção. Apenas nos últimos 40 anos e mais recentemente nas duas últimas décadas é que as pesquisas com organismos marinhos como bactérias, animais sésseis, cianobactérias, microalgas e macroalgas se intensificaram, onde estes organismos passaram a ser vistos como candidatos promissores à bioprospecção de metabólitos (DONIA; HAMANN, 2003; PULZ; GROSS, 2004).

Uma das razões que elevaram o interesse por tais organismos é a de que, por serem liberados na água, os produtos naturais sintetizados devem ser fortes o bastante para apresentar efetividade (HAEFNER, 2003), somando-se a isto, a imensa diversidade biológica encontrada nos oceanos, isso se traduz em uma grande diversidade química com potencial atividade biológica (PERES et al., 2012).

Produtos a base de extratos de algas vêm tendo destaque na associação com produtos químicos tradicionais, visando controle de fitopatógenos, promoção de crescimento e indução de resistência em plantas (KOYAMA et al., 2010). As algas podem ser usadas na agricultura na forma seca ou como extratos, fertilizantes, bioestimulantes e/ou fitoprotetores (PERES et al., 2012).

Segundo Kulik (1995), muitas algas produzem uma grande quantidade de compostos antibacterianos e antifúngicos e podem ser cultivadas em larga escala. No entanto, embora haja muitos dados gerados há longa data sobre tais atividades dos extratos algais, poucos estudos sistemáticos de bioprospecção têm sido realizados nesse sentido com algas ocorrentes ou cultivadas no Brasil.

No intuito de contribuir com o conhecimento das atividades biológicas de extratos algais no Brasil, o presente trabalho avaliou os efeitos *in vitro* dos extratos etanólicos de doze algas (sete microalgas e cinco macroalgas) contra o fitopatógeno *Penicillium expansum*, sendo tais algas espécies comuns na costa de Santa Catarina e facilmente coletadas ou constituindo o acervo de espécies cultivadas em laboratório na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Material e Métodos

Local dos ensaios

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Ficologia (LAFIC) e no laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do de Santa Catarina (UFSC) entre os meses de Novembro e Dezembro de 2014.

Manutenção, cultivo e coleta de algas

Foram utilizadas sete microalgas e cinco macroalgas, sendo duas espécies de Cyanobacteria: *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subbaraju e *Limnothrix* sp., três espécies de Rhodophyta: *Chondracanthus teedei* (Mertens ex Roth) Kützing, *Palisada* sp. e *Porphyridium cruentum* (S.F. Gray) Nägeli (cultivada no Laboratório de Cultivo de Algas – LCA/UFSC), duas espécies de Heterokontophyta, classe Phaeophyceae: *Padina gymnospora* (Kützing) Sonder e *Sargassum filipendula* C. Agardh e cinco espécies de Chlorophyta: *Chlorella* sp. (Cultivada no LAFIC), duas cepas de *Haematococcus pluvialis* Flotow (cultivadas no LCA/UFSC, HP1 e HP2) e *Haematococcus pluvialis* Flotow (proveniente de biomassa comercial, sem ou com pré-tratamento com nitrogênio gasoso, HP3 e HP4) e *Ulva lactuca* Linnaeus (Tabela 1).

TABELA 1: Filo, espécies e sigla das algas utilizadas.

Filo	Espécie	Sigla
Cyanobacteria	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	LP1
	<i>Limnothrix</i> sp.	LIM
Rhodophyta	<i>Chondracanthus teedei</i>	CHO
	<i>Palisada</i> sp.	PAL
	<i>Porphyridium cruentum</i>	PCR
Heterokontophyta	<i>Padina gymnospora</i>	PAD
	<i>Sargassum filipendula</i>	SAR
Chlorophyta	<i>Chlorella</i> sp.	CHL
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	HP1
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	HP2
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	HP3
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	HP4
	<i>Ulva lactuca</i>	ULV

As microalgas foram cultivadas em laboratório e mantidas em ambiente controlado (temperatura 23°C e fotoperíodo de 12 h). Na fase estacionária, as microalgas foram centrifugadas e liofilizadas. As macroalgas foram coletadas no costão rochoso do lado norte da Praia Grande, no município de Governador Celso Ramos, Santa Catarina, Brasil (27°21'26.43"S e 48°32'11.25"O) em novembro de 2014. No laboratório, as macroalgas foram lavadas com água do mar para a retirada de areia e organismos contaminantes, secas em estufa a 40°C e trituradas em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido.

Fitopatógeno

O fitopatógeno foi obtido a partir do isolamento proveniente de fruto de maçã apresentando sintomas característicos do bolor azul pela Dra. Rosa Maria Sanhuenza, cedido e armazenado na micoteca do laboratório de fitopatologia da UFSC sob o código MANE 138.

Antes da sua utilização nos experimentos, o fungo *Penicillium expansum* foi mantido e crescido em meio BDA (batata dextrose ágar) por duas semanas, desenvolvendo colônias características do fungo no meio.

Preparo dos extratos de algas

A biomassa seca das algas foi submetida à extração com etanol (p.a) na proporção de 1/20 (peso/volume) durante três dias. O extrato etanólico foi filtrado em papel filtro Whatman (nº 4) e evaporado em capela a temperatura ambiente. Após a evaporação do solvente os extratos foram pesados para realização do cálculo do rendimento e congelados a -20 °C para posterior uso nos testes biológicos.

Potencial antifúngico dos precipitados algais

De modo a se avaliar o potencial antifúngico dos precipitados algais obtidos por meio da extração etanólica, alíquotas de 25 µL de uma suspensão de

conídios do fitopatógeno *P. expansum* previamente preparada em suco de maçã (8%) foram depositadas em lâminas escavadas, a uma concentração final de 10⁵ conídios.mL⁻¹. A estas, alíquotas de 25 µL de cada um dos tratamentos foram acrescidas. Uma vez que os precipitados resultantes dos extratos etanólicos algais utilizados como tratamentos agregaram-se à parede dos tubos Eppendorff utilizados, os mesmos foram re-suspensos nos próprios tubos pela adição de 2 mL de água destilada estéril, seguindo pela agitação em vórtex durante 2 minutos, obtendo-se diferentes concentrações dos extratos algais. Em todos os experimentos utilizou-se água destilada estéril como controle.

Em seguida, as lâminas escavadas contendo a suspensão de conídios de *P. expansum* com os tratamentos foram dispostas no interior de placas de Petri e incubadas por 20 h, sob fotoperíodo de 12 h de luz e temperatura de 25°C ± 1 °C e alta umidade relativa (≥90%). Foram feitas quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por uma cavidade da lâmina escavada. Em cada repetição foram avaliados 100 conídios quanto à percentagem de germinação em microscópio óptico (DM500, Leica Microsystems). Além disso, o comprimento do tubo germinativo também foi avaliado, atribuindo-se uma nota de 0 a 2, onde 0 corresponde ao conídio sem tubo germinativo desenvolvido, 1 ao conídio com tubo germinativo pouco desenvolvido e 2 ao conídio com tubo germinativo completamente desenvolvido.

Concentração mínima inibitória dos precipitados algais

A concentração mínima inibitória (CMI) dos diferentes precipitados algais foi determinada em ensaio similar ao proposto no item 2.1, com modificações. Para tanto, alíquotas de 25 µL de uma suspensão de conídios do fitopatógeno preparada em suco de maçã (8%) foram depositadas em lâminas escavadas. A estas foram acrescentadas alíquotas de 25 µL de cada um dos tratamentos, chegando-se à concentração final de 10⁵ conídios.mL⁻¹.

Dos tratamentos brutos obtidos pela adição de 2 mL de água destilada estéril e agitação em vórtex por

2 minutos (aqui denominados 100% concentrados) foram realizadas diluições seriadas para obtenção das concentrações 75%; 50%; 25%; 12,5% e 0%, sendo este realizado apenas para os extratos que apresentaram inibição significativa do fungo. Destas diluições, 25 μ L foram retirados e depositados nas lâminas escavadas, que por sua vez foram dispostas no interior de placas de petri e incubadas por 20 hs, com fotoperíodo de 12 h de luz e temperatura de 25 °C \pm 1 °C, sob alta umidade relativa (\geq 90%). Foram realizadas quatro repetições por tratamento onde, em cada repetição representada por uma cavidade da lâmina escavada, foram avaliados 100 conídios quanto à percentagem de germinação em microscópio óptico (DM500, Leica Microsystems). O comprimento do tubo germinativo também foi avaliado, conforme explicado anteriormente. Além disso, calculou-se também a concentração efetiva mediana (CE_{50}), através do método *Trimmed Spearman Karber*, utilizando o software TSK 1.5.

Perfil espectrofotométrico dos precipitados de extratos algais obtidos

O perfil espectrofotométrico dos precipitados obtidos dos extratos algais que resultaram em efeito inibitório significativo foram determinados a partir da metodologia proposta por Coqueiro et al. (2011) com modificações. Para tanto, 300 μ L de cada tratamento foi depositado em uma cavidade de uma microplaca de 96 poços e, em seguida, submetido à varredura em leitor de microplacas (Spectramax Paradigm, Molecular Devices) no intervalo de ondas de 300-1.000 nm. O escaneamento foi realizado por amostra e os resultados expressos a partir dos valores de absorbância média encontrada na amostra para o intervalo.

Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos sob delineamento completamente casualizado, com quatro repetições por tratamento. Com o auxílio do software Statistica 10.0, os dados foram submetidos a análise de homogeneidade de variâncias e respectivo F-teste (5%), sendo realizado o teste de separação de médias por Tukey sob nível de 5% de significância ou pelo método *Trimmed Spearman Karber* a 5%.

Resultados e Discussão

Entre as diferentes algas utilizadas nos ensaios antimicrobianos, diferenças na extração alcoólica dos compostos foram encontradas, observando-se rendimentos abaixo de 1% em seis das 13 espécies, à saber: CHO (0,02%), HP1 (0,16%), PAL (0,19%), SAR (0,33%), ULV (0,86%) e PAD (0,92%), refletindo nas concentrações finais utilizadas (Tabela 2), sendo observada uma correlação entre seu rendimento final, concentração final utilizada e o efeito antimicrobiano contra o fitopatógeno *P. expansum* (Figura 1).

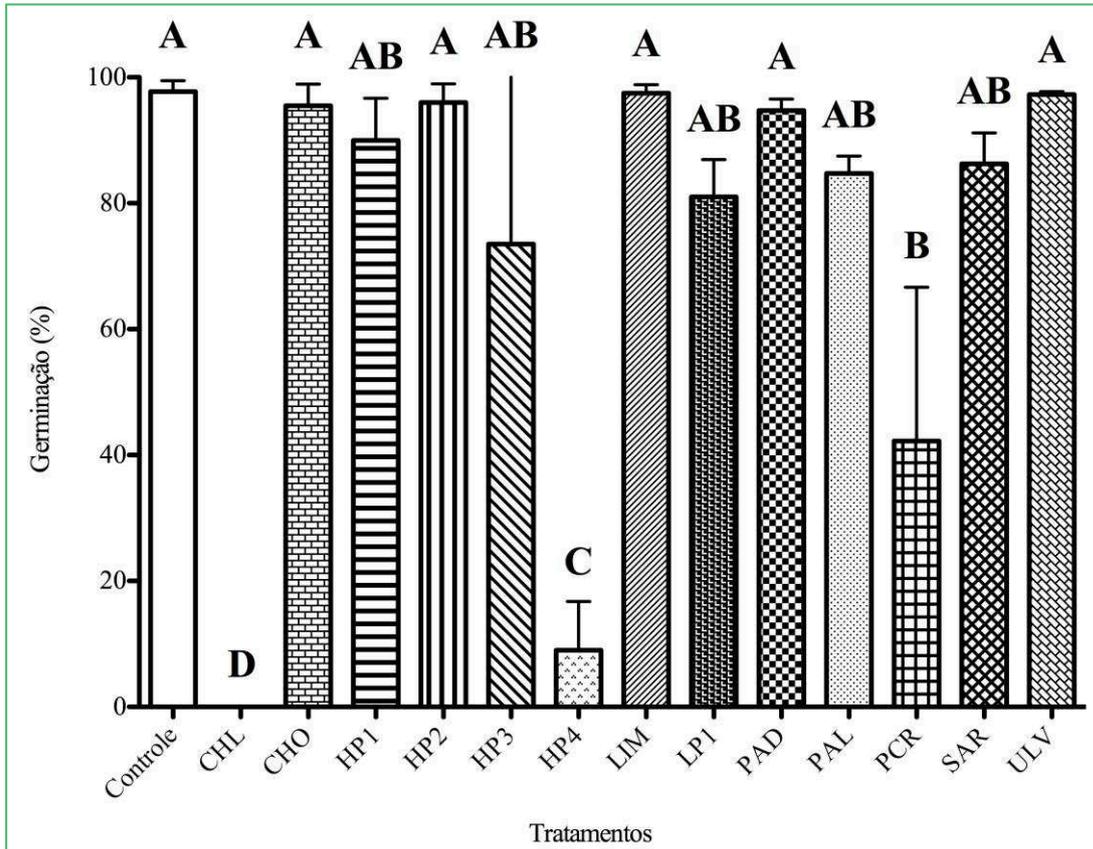
TABELA 2: Espécies de micro e macroalgas selecionadas (siglas), rendimento (%) e concentração final ($mg.mL^{-1}$) obtida dos extratos etanólicos.

Espécies (siglas)	Rendimento (%)	Concentração final ($mg.mL^{-1}$)
CHL	5,08	18,8
CHO	0,02	0,1
HP1	0,16	0,8
HP2	1,52	7,65
HP3	3,35	16,75
HP4	25,18	125,95
LIM	3,15	2,8
LP1	4,53	22,65
PAD	0,92	4,6
PAL	0,19	0,95
PCR	1,43	7,15
SAR	0,33	1,65
ULV	0,86	4,3

Dentre as espécies de micro e macroalgas estudadas no presente trabalho, somente as espécies CHL e HP4 nas concentrações finais de 18,8 $mg.mL^{-1}$ e de 125,95 $mg.mL^{-1}$ foram capazes de inibir a germinação dos conídios de *P. expansum* em 100% e 91%, respectivamente (Figura 1), para os extratos demais espécies, não foi observada diferença significativa entre o controle e o tratamento após 24 h de contato.

Por outro lado, mesmo não apresentando efeito antimicrobiano direto, inibindo completamente a germinação do bolor azul, os extratos provenientes das algas HP1, HP2, LIM, PCR e SAR foram capazes de diminuir o comprimento do tubo germinativo dos

FIGURA 1: Porcentagem de germinação de conídios do fungo *P. expansum* submetidos a diferentes extratos etanólicos de algas. O controle utilizado se refere ao tratamento com água destilada estéril. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. CHL – extrato de *Chlorella* sp.; CHO – extrato de *Chodracanthus teedei*; HP1, HP2, HP3 e HP4 – extrato de *Haematococcus pluvialis* cultivados sob diferentes condições; LIM – extrato de *Limnothrix* sp.; LP1 – extrato de *Cylindrospermopsis raciborskii*; PAD – extrato de *Padina gymnospora*; PAL – extrato de *Palisada* sp.; PCR – extrato de *Porphyridium cruentum*; SAR – extrato de *Sargassum filipendula* e ULV – extrato de *Ulva lactuca*.



conídios em comparação ao controle realizado com água destilada estéril (Tabela 3).

Provavelmente, a maior atividade do extrato de *Haematococcus pluvialis* (HP4), pode estar relacionada com a ruptura da parede do cisto durante maceração com o nitrogênio líquido, uma vez que todas as cepas estavam na fase encistada (sem flagelo).

As espécies LIM e SAR já tiveram sua atividade antimicrobiana descrita, todavia no presente estudo, não foram observados níveis de inibição da germinação de *P. expansum*. Tal fato pode ser decorrente da metodologia de obtenção do extrato utilizada, refletindo-se na baixa concentração de moléculas com atividade biológica antimicrobiana e, por sua vez, a não diferenciação dos níveis de controle entre LIM, SAR

do tratamento controle. Por outro lado, mesmo diferindo estatisticamente do controle, a PCR não demonstrou um forte efeito antimicrobiano, observando-se um nível de inibição de apenas 50% (Figura 1).

Em um trabalho realizado por Mundt et al. (2001), foi observado que o extrato em n-hexano de *Limnothrix* sp. apresentou apenas atividade antibacteriana, não sendo observada atividade antifúngica. De modo semelhante, segundo dados de Najdenski et al. (2013), o extrato de *Porphyridium cruentum* também apresentou atividade antifúngica pouco expressiva.

Espécies do gênero *Sargassum* são conhecidas por apresentarem atividade biológica frente a diferentes microrganismos (FEBLES et al., 1995; ZHENG et al., 2000; PLOUGUERNÉ et al., 2008), porém, são

poucos os trabalhos que abordam esta atividade frente aos fungos fitopatogênicos. Dentre esses trabalhos, pode-se citar o desenvolvido por Peres et al. (2012) que utilizaram os extratos etanólicos de *Sargassum muticum*, constituído por compostos fenólicos e terpenos, para inibir o crescimento do fungo *Colletotrichum lagenarium*, responsável pela antracnose em diversos frutos em pós-colheita.

TABELA 3: Comprimento do tubo germinativo de conídios (score) de *P. expansum* submetidos aos extratos etanólicos de micro e macro algas. Score: 0 – conídio sem tubo germinativo desenvolvido; 1 – conídio com tubo germinativo pouco desenvolvido; 2 – conídio com tubo germinativo completamente desenvolvido

Tratamentos (siglas)	Comprimento do tubo germinativo
Controle	2
CHL	0
CHO	2
HP1	1
HP2	1
HP3	2
HP4	2
LIM	1
LP1	2
PAD	2
PAL	2
PCR	1
SAR	1
ULV	2

Os índices de inibição do desenvolvimento dos conídios foram proporcionais ao aumento das concentrações dos extratos de testados (Tabela 4).

O extrato alcoólico obtido a partir da espécie *Haematococcus pluvialis* (HP4), apresentou diferença estatística em relação ao controle a partir da diluição de 25%. A maior porcentagem de inibição dos conídios foi de aproximadamente 91% a 125,95 mg.mL⁻¹ (extrato bruto a 100%), a diluição do extrato bruto em 50%, reduziu o potencial antimicrobiano em até 50% a uma concentração de 62,96 mg.mL⁻¹.

A espécie *Chlorella* sp. (CHL) em relação aos tratamentos apresentou diferença significativa a partir do extrato bruto diluído a 12,5%, concentração 2,35 mg.mL⁻¹, inibindo a germinação de 30% dos conídios do fungo. Todas as diluições apresentaram diferença estatística, ressaltando que a partir da diluição de 50%, concentração de 9,4 mg.mL⁻¹, ocorreu a completa inibição da germinação dos conídios de *P. expansum*.

A atividade antimicrobiana dos cistos da microalga *Haematococcus pluvialis*, testados a partir da obtenção de extratos etanólicos pelo método de extração em líquidos pressurizados, tem sido relacionada à presença de ácidos graxos de cadeia curta, os ácidos propanoico e butanoico (SANTOYO et al., 2009; 2012; RODRIGUEZ-MEIZOSO et al., 2010).

O estudo realizado por Santoyo et al. (2009), avaliando o extrato de *Haematococcus pluvialis* na inibição das espécies *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*, obteve ação antimicrobiana efetiva.

TABELA 4: Porcentagem de germinação dos conídios do fungo *P. expansum* submetidos às diferentes concentrações dos extratos de CHL e HP4. Letras maiúsculas referem-se às diferenças significativas em relação aos tratamentos e letras minúsculas referem-se às diferenças significativas em relação às concentrações pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamentos	Concentração (%)					
	0	12,5	25	50	75	100
Germinação (%)						
Água	97,5±1,73 Aa	97,5±1,73 Aa	98,5±1,29 Aa	98,5±0,58 Aa	98±0,82 Aa	98±1,41 Aa
CHL	97,5±1,73 Aa	69,75±4,92Bb	7,5 ± 2,08 Cc	0 Cd	0 Cd	0 Cd
HP4	97,5±1,73 Aa	92,25±3,30 Aa	72,25±4,79 Bb	63±7,75 Bb	38,75±10,0 Bc	7,75±1,71 Bd

O potencial antimicrobiano do extrato etanólico da microalga *Chlorella* tem sido difundido na comunidade científica, principalmente, relacionado às bactérias (PRATT et al., 1944; KATIRCIOGLU et al., 2005; UMA et al., 2011; NAJDENSKI et al., 2013; VISHNU; SUMATHI, 2014).

Em relação a fungos, Abedin e Taha (2008), utilizando extrato etanólico da microalga *Chlorella pyrenoidosa* obtiveram resultados mais efetivos na inibição de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria brassicae*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, quando comparado aos produtos comerciais itraconazol e polinoxilina, efeito atribuído à presença de peptídeos cíclicos, alcaloides e lipopolissacarídeos.

Os valores calculados de CE_{50} para HP4 e CHL foram 48.61% e 15.58%, respectivamente, indicando que as concentrações de 61.20 mg.mL⁻¹ e 2.93 mg.mL⁻¹ seriam suficientes para inibir 50% da germinação dos conídios do bolor azul, em relação ao controle com água destilada estéril (Tabela 5).

A CE_{50} dos extratos das microalgas *H. pluvialis* e *Chlorella* foi relatada para o vírus do herpes, no qual 0,1 mg.mL⁻¹ e 0,08 mg.mL⁻¹, respectivamente, são necessários para reduzir a efetividade de 50% do vírus (SANTOYO et al., 2010; 2012), evidenciando o

potencial dos extratos destas espécies, do mesmo modo aos resultados obtidos com o presente estudo.

TABELA 5: CE_{50} dos extratos de CHL e HP4 à inibição de conídios do fungo *P. expansum* *in vitro*.

Tratamentos	CE_{50} (%)	CE_{50} 95% (Acima)	CE_{50} 95% (Abaixo)
Água	-	-	-
CHL	15,58	14,51	16,72
HP4	48,61	43,63	54,16

Observou-se no perfil espectrofotométrico dos extratos que, devido às diluições utilizadas, a amplitude da absorbância diminuiu em função da concentração. Em HP4 (Figura 2), ocorreu apenas um pico de absorbância a 300 nm. Já os extratos de CHL (Figura 3) apresentam um pico bem definido de absorbância em torno de 670 nm. Observa-se ainda que esta microalga apresenta alta absorbância na faixa entre 400 e 500 nm, com um leve pico próximo a 500 nm.

Embora não sejam possíveis conclusões detalhadas em relação à caracterização qualitativa e quantitativa, a análise do perfil espectrofotométrico permite a identificação inicial dos grupos de compostos presentes nos extratos. Ressalta-se que a análise dos resultados foi feita considerando-se as limitações do processo de

FIGURA 2: Perfil espectrofotométrico do extrato da alga HP4 em diferentes concentrações (%), onde: □— 100%; ○— 75%; ●— 50%; △— 25%; ■— 12,5%; ▲— 0%. Varredura do extrato algal realizada nos comprimentos de onda de 300 a 1000 nm com intervalos de 10 nm.

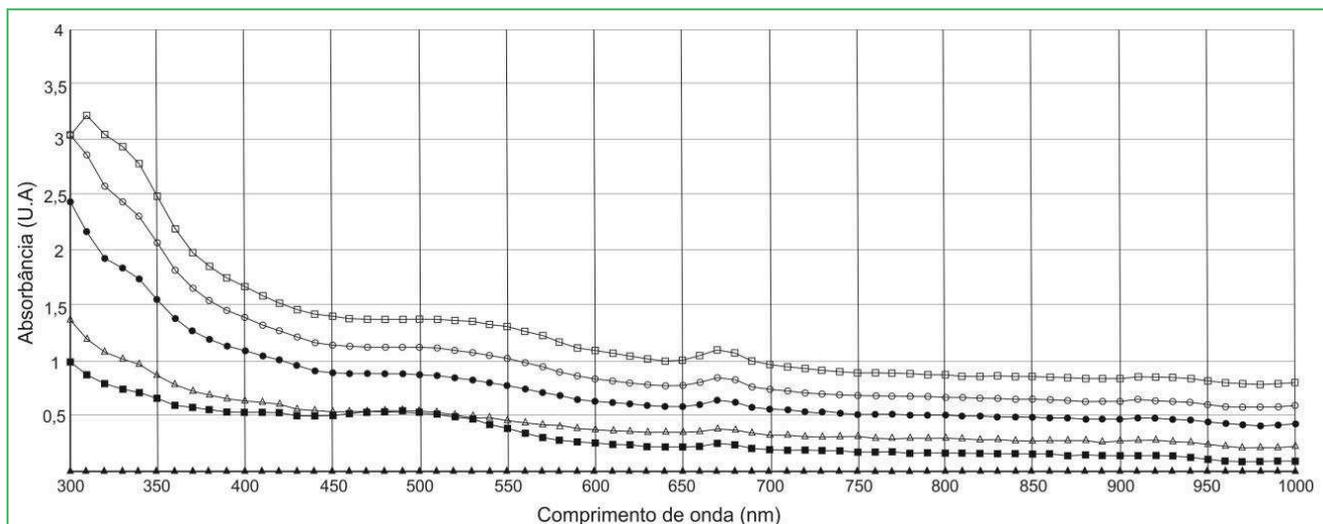
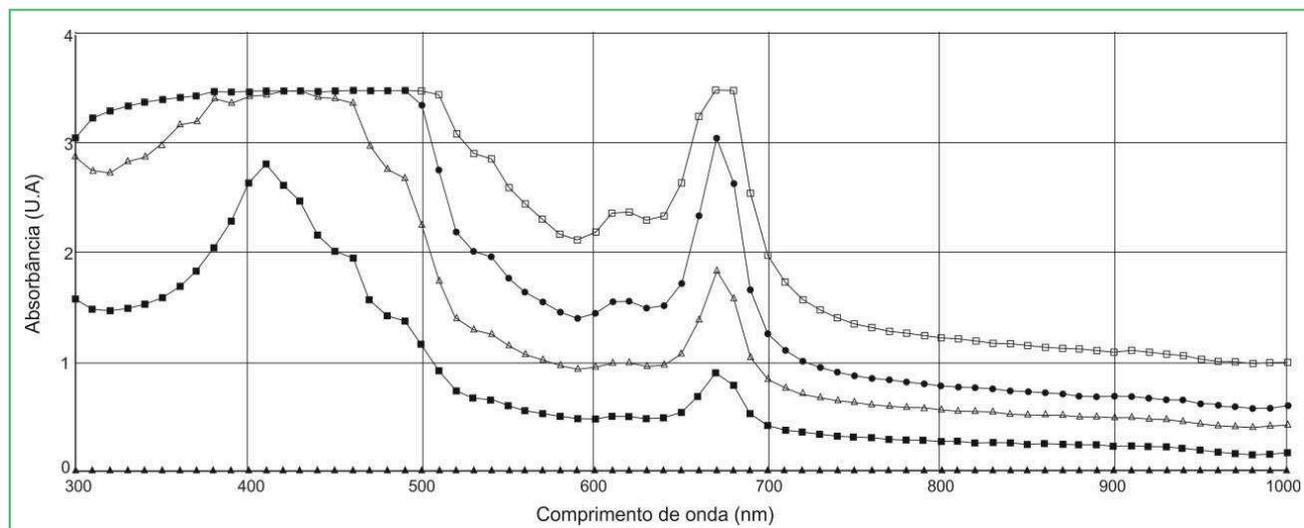


FIGURA 3: Perfil espectrofotométrico do extrato da alga CHL em diferentes concentrações (%), onde: □ – 100%; ● – 50%; △ – 25%; ■ – 12,5%; ▲ – 0%. Varredura do extrato algal realizada nos comprimentos de onda de 300 a 1000 nm com intervalos de 10 nm.



extração, o qual favoreceu a extração de determinados grupos de compostos, o que não significa que as espécies estudadas não possuam outros compostos com potencial antifúngico. De acordo com Plaza et al. (2010), as algas apresentam vários compostos com potencial atividade antimicrobiana, destacando-se: indóis, terpenos, fenóis, ácidos graxos, hidrocarbonetos halogenados, entre outros.

Os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, apresentam pico de absorbância entre 230 e 300 nm, portanto, o pico apresentado na Figura 2, provavelmente, corresponde a este grupo de compostos. Embora HP4 seja rica em carotenoides, a metodologia utilizada não favoreceu sua extração, pois não se observa pico de absorbância na faixa correspondente a estes compostos, entre 400-500 nm (GRAHAM; WILCOX, 2000; BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

Plaza et al. (2010) demonstraram a atividade antifúngica de extratos ricos em compostos fenólicos, provenientes da microalga *Synechocystis* sp. e da macroalga *Himanthalia elongata*, o que demonstra o potencial antifúngico deste grupo de compostos. Segundo Cowan (1999), compostos fenólicos simples apresentam atividade microbiana por provocarem privação de substrato e ruptura de membrana.

A clorofila *a* apresenta dois picos principais de absorção, próximo a 450 nm e outro a 670 nm, já a clorofila-B apresenta um pico de absorção próximo a 480 nm e outro menor em torno de 650 nm (GRAHAM; WILCOX, 2000). Além destes pigmentos, *Chlorella* sp. também apresenta carotenoides, um grupo amplo de compostos, com picos de absorção variável na faixa entre 400 e 500 nm (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

Analisando-se os resultados obtidos com os extratos de CHL (Figura 3), percebe-se que há semelhança com o espectro de absorção das clorofilas *a*, *b* e dos carotenoides (GRAHAM; WILCOX, 2000), portanto, o pico de absorção em 670 nm provavelmente corresponde à clorofila *a*. Já a alta absorção entre 400 e 500 nm, tende a ser decorrente da absorção tanto das clorofilas *a* e *b*, quanto dos carotenoides.

Mantovani (1993) estudou o espectro de absorção de *Chlorella vulgaris*, tendo obtido picos de absorção semelhantes ao encontrado no presente estudo. De acordo com este autor, *C. vulgaris* apresentou um pico de absorção em torno de 668 nm, o qual correspondeu ao pico de absorção da clorofila *a*, e outro pico em torno de 490 nm, correspondente à absorção das clorofilas *a* e dos carotenoides. Destaca-se que o etanol tem se mostrado eficiente na extração de clorofilas, a partir de microalgas do gênero *Chlorella* (LÓPEZ; LAZO, 1998).

Outros estudos têm demonstrado que compostos resultantes do metabolismo da clorofila apresentam propriedades como atividade antioxidante, sinalizadora e antimicrobiana (MA; DOLPHIN, 1999). Um destes foi o estudo de Bhagavathya et al. (2011), que testou o efeito antimicrobiano de carotenoides e clorofilas extraídos da microalga *Chlorococcum humicola*, contra diversas espécies de bactérias, leveduras e de fungos, como *Arpergillus niger* e *A. flavus*, obtendo resultados satisfatórios de inibição.

A partir dos resultados observados neste trabalho, podemos concluir que as cepas de *Chorella* sp. (CHL) e *Haematococcus pluvialis* (HP4) apresentam compostos antimicrobianos promissores contra o fungo fitopatogênico *Penicillium expansum*, sendo, portanto, uma alternativa no controle de doenças pós-colheita. Sugere-se um maior aprofundamento nos estudos, a fim de se avaliar a eficiência de diferentes solventes, além da elucidação dos compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana.

Agradecimentos

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de estudos concedidas.

Referências

- ABEDIN, R. M. A.; TAHA, H. M. Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and Green microalgae. Evaluation of medium components by Plackett-Burman design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. **Global Journal of Biotechnology and Biochemistry**, Dubai, v. 3, n. 1, p. 22-23, 2008.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. New York: Taylor e Francis, 2006. 361 p.
- BHAGAVATHYA, S.; SUMATHIB, P.; BELL, I. J. S. Green algae *Chlorococcum humicola* – a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, v. 1, p. S1-S7, 2011.
- CALVO, J.; CALVENTE, V.; ORELLANO, M. E.; BENUZZI, D.; TOSSETI, M. I. S. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rhizobium aquatilis*. **International Journal of Food Microbiology**, Summit-Argo, v. 113, p. 251-257, 2007.
- COQUEIRO, D. S. O.; MARASCHIN, M.; DI PIERO, R. M. Chitosan reduces bacterial spot severity and acts in phenylpropanoid metabolism in tomato plants. **Journal of Phytopathology**, Göttingen, v. 159, p. 488-494, 2011.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, p. 564-582, 1999.
- DONIA, M.; HAMMAN, M. T. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. **Lancet Infectious Diseases**, Solna, v. 3, p. 338-348, 2003.
- FEBLES, C. I.; ARIAS, A.; HARDISSON, A.; SIERRA-LOPEZ, A.; GIL-RODRÍGUEZ, M. C. Antimicrobial activity of extracts from some Canary species of *Phaeophyta* and *Chlorophyta*. **Phytotherapy Research**, London, v. 9, p. 385-387, 1995.
- FILONOW, A. B. Wound type in apple fruits affects wound resistance to decay-causing fungi. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 87, p. 233-238, 2005.
- GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. **Algae**. New Jersey: Prentice-Hall. 2000. 700 p.
- HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 8, p. 536-544, 2003.
- KATIRCIOGLU, H.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B.; YÜKSEKDAG, Z.; ATICI, T. Screening for antimicrobial agent production of some microalgae in freshwater. **The Internet Journal of Microbiology**, New York, v. 2, n. 2, 2005.
- KOYAMA, R.; BETTONI, M. M.; MUDRY, C. S.; POSSAMAI, J. C.; MÓGOR, A. F. Associação de extrato de algas, molibdênio e magnésio reduzindo danos de *Cercospora beticola*. **Horticultura Brasileira**, Brasília v. 28, p. S2873-S2879, 2010.
- KULIK, M. M. The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 101, p. 585-599, 1995.
- LOPÉZ, T. J. L.; LAZO, H. E. Concentración de clorofila total en el extracto etanólico procedente de *Chlorella* sp. cultivada en efluentes de la industria pesquera. **Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas**, Maracaibo, v. 32, p. 179-193, 1998.
- MA, L.; DOLPHIN, D. The metabolites of dietary chlorophylls. **Phytochemistry**, Oxford, v. 50, p. 195-202, 1999.
- MANTOVANI, J. E. Comportamento espectral do fitoplâncton. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, VII, 1993, Curitiba. **Anais...** Curitiba: SBSR, 1993. p. 60-69.
- MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Agrofit**. 2014. Disponível em: <www.agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 15 dez. de 2014.
- MUNDT, S.; KREITLOW, S.; NOWOTNY, A.; EFFMERT, U. Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Bochum, v. 203, p. 327-334, 2001.
- NAJDENSKI, H. M.; GIGOVA, L. G.; ILIEV, I. I.; PILARSKI, P. S.; LUKAVSKÝ, J.; TSVETKOVA, I. V.; NINOVA, M. S.; KUSSOVSKI, V. K. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. **International Journal of Food Science & Technology**, Mysore, v. 48, p. 1533-1540, 2013.
- PERES, J. C. F.; CARVALHO, L. R.; GONÇALEZ, E.; BERIAN, L. O. S.; FELÍCIO, J. D. Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, p. 294-299, 2012.

- PLAZA, M.; SANTOYO, S.; JAIME, L.; REINA, G. G. B.; HERRERO, M.; SEÑORÁNS, F. J.; IBÁÑEZ, E. Screening for bioactive compounds from algae. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Arlington, v. 51, p. 450-455, 2010.
- PLOUGUERNÉ, E.; HELLIO, C.; DESLANDES, E.; VÉRON, B.; STIGER-POUVREAU, V. Anti-microfouling activities in extracts of two invasive algae: *Grateloupia turuturu* and *Sargassum muticum*. **Botanica Marina**, Berlin, v. 51, p. 202-208, 2008.
- PRATT, R.; DANIELS, T. C.; EILER, J. B.; GUNNISON, J. B.; KUMLER, W. D. Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella*. **Science**, New York, v. 99, p. 351-352, 1944.
- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 65, p. 635-648, 2004.
- QUAGLIA, M.; EDERLI, L.; PASQUALINI, S.; ZAZZERINI, A. Biological control agents and chemical inducers of resistance for postharvest control of *Penicillium expansum* Link. on apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 59, p. 307-315, 2011.
- RODRIGUEZ-MEIZOSO, I.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; SEÑORÁNS, F. J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalgae. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Arlington, v. 51, n. 2, p. 456-463, 2010.
- SANTOYO, S.; JAIME, L.; PLAZA, M.; HERRERO, M.; RODRIGUEZ-MEIZOSO, I.; IBÁÑEZ, E.; REGLERO, G. Antiviral compounds obtained from microalgae commonly used as carotenoid sources. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 24, n. 4, p. 731-741, 2012.
- SANTOYO, S.; PLAZA, M.; JAIME, L.; IBÁÑEZ, E.; REGLERO, G.; SEÑORÁNS, F. J. Pressurized liquid extraction as an alternative process to obtain antiviral agents from the edible microalga *Chlorella vulgaris*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, München, v. 58, n. 15, p. 8522-8527, 2010.
- SANTOYO, S.; RODRIGUEZ-MEIZOSO, I.; CIFUENTES, A.; JAIME, L.; REINA, G. G-B.; SEÑORÁNS, F. J.; IBÁÑEZ, E. Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. **LWT – Food Science and Technology**, Zurich, v. 42, n. 7, p. 1213-1218, 2009.
- UMA, R.; SIVASUBRAMANIAN, V.; DEVARAJ, S. N. Preliminary phycochemical analysis and in vitro antibacterial screening of green micro algae, *Desmococcus olivaceous*, *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*. **Journal of Algal Biomass Utilization**, Chennai, v. 2, n. 3, p. 74-81, 2011.
- VISHNU, N.; SUMATHI, R. Isolation of fresh water microalgae *Chlorella sp* and its antimicrobial activity on selected pathogens. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, Tamil Nadu, v. 1, n. 3, p. 36-43, 2014.
- WELKEL, J. E.; HOELTZI, M.; DOTTORI, H. A.; NOLLI, I. B. Ocorrência, aspectos toxicológicos, métodos analíticos e controle da patulina em alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 300-308, 2009.
- ZHENG, Y.; YIN-SHAN, C.; HAI-SHENG, L. Screening for antibacterial and antifungal activities in some marine algae from the Fujian coast of China with three different solvents. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, Qingdao, v. 19, p. 327-331, 2000.