

## **Ação antifúngica de inibidores de $\alpha$ amilase extraídos de trigo (*Triticum aestivum* L.)**

**Gabriela R. Lemos Mendes<sup>1</sup>, Chiara Leal Alves<sup>2</sup>, Paola Cavalheiro<sup>2</sup> e Eliana Badiale-Furlong<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – Departamento de Biotecnologia  
Caixa Postal 354 – CEP 96001-970 Pelotas – RS - E-mail: (gabriellamosmendes@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande – Departamento de Química e Alimentos  
Caixa Postal 474 – 96200-970 Rio Grande – RS

### **RESUMO**

*Neste trabalho foram extraídos inibidores enzimáticos de diferentes variedades de trigo os quais foram aplicados em cultivo "in vitro" para verificar sua ação sobre o *Fusarium verticillioides*. Os testes consistiram na adição dos extratos proteicos do trigo em placas de Petri, contendo ágar batata dextrose, e sobre o qual foi colocado um disco de micélio do patógeno. Após sete dias de cultivo foram determinados o crescimento micelial do patógeno, teor de glicosamina e atividade da  $\alpha$  amilase. Os extratos proteicos das variedades de trigo inibiram o desenvolvimento do *F. verticillioides*, com destaque para as variedades Fundacep Raízes, que inibiram em aproximadamente 50% o crescimento micelial e a Quartzzo que diminuiu em 66% a produção de glicosamina e 84% da atividade da  $\alpha$  amilase. Os dados obtidos neste trabalho são importantes, no sentido de identificar anti-fúngicos naturalmente presentes nas próprias plantas, os quais podem contribuir para resistência de variedades vegetais a patógenos.*

**Palavras-chave:** inibidores de  $\alpha$  amilase; trigo; *Fusarium verticillioides*.

### **INTRODUÇÃO**

Os fungos do gênero *Fusarium* são encontrados em plantas e em resíduos de culturas por todo o mundo, sendo responsáveis pela infecção e destruição de culturas economicamente relevantes como o milho, trigo e outros pequenos grãos. Dentre estes fungos encontram-se espécies toxigênicas, como o *Fusarium verticillioides*<sup>1</sup>, o qual tem recebido atenção de agências regulatórias, como a ANVISA, por ser um potencial produtor de Fumonisina B<sub>1</sub>.

As medidas químicas e agrônômicas para o controle de *F. verticillioides* não são muito eficazes, pois a espécie por ser endofítica, coloniza as plantas sem demonstrar qualquer sinal da infecção. O uso de fungicidas sintéticos é a tecnologia mais comum para proteger as colheitas da deterioração fúngica e da contaminação por micotoxinas. No entanto, a maioria dos fungicidas sintéticos possui toxicidade residual e contribui para a seleção de espécies fúngicas resistentes<sup>2</sup>.

As plantas, por sua vez, possuem uma série de compostos que estão associados com a resistência à fatores bióticos e abióticos, como insetos e fungos. A tecnologia do uso de inibidores de enzimas digestivas como fator de resistência, tem chamado a atenção de vários pesquisadores<sup>3,4,5</sup>, pois as  $\alpha$  amilases são enzimas essenciais para o crescimento e

## Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

desenvolvimento de insetos e fungos. Grãos de trigo são particularmente ricos em inibidores de  $\alpha$  amilases, assim como arroz e aveia<sup>3,5</sup>.

Neste contexto, o estudo sobre a ocorrência de inibidores de  $\alpha$  amilases é relevante a fim de buscar o entendimento e alternativa para o controle de fitopatógenos, com ênfase nos fungos toxigênicos, especialmente naquelas culturas de maior impacto econômico e de consumo mais frequente. O objetivo deste trabalho é verificar a ação antifúngica de inibidores de  $\alpha$  amilases, extraídos de diferentes variedades de trigo, sobre o desenvolvimento do *F. verticillioides*.

### MATERIAL E MÉTODOS

Grãos de trigo das variedades Quartzo, OR Marfim, Fundacep Raízes, BRS Tarumã, Abalone foram usados como fonte de extratos proteicos obtidos com etanol 70% na proporção 1:5 p/v sob agitação em mesa orbital por 12 h a 25 °C. A mistura foi centrifugada a 3220 x g a 4 °C por 20 minutos<sup>5</sup> para obtenção de extrato bruto. Para aplicação no cultivo *in vitro* foi inicialmente estabelecido o IC<sub>50</sub> dos extratos para inibição da  $\alpha$  amilase fúngica, ou seja, volume de extrato que inibi 50% da atividade da enzima. O isolado de *F. verticillioides* foi mantido sob refrigeração, em meio contendo Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA). Para a obtenção dos discos de micélios, o isolado foi transferido para Agar Batata Dextrose (PDA), por 7 dias a 25°C e fotoperíodo de 12h. Após a incubação, o ágar foi recortado, obtendo-se os discos de micélios com 1 cm de diâmetro. O efeito antifúngico dos extratos inibidores foi evidenciado em cultivo *in vitro* em meio PDA contendo o extrato inibidor e o disco de micélio do patógeno no centro da placa, por 7 dias a 25 °C.

A inibição do crescimento micelial do patógeno foi avaliada durante os 7 dias, medindo o diâmetro da colônia do fungo, com 3 medições em sentidos perpendicularmente opostos, nos experimentos com extratos inibidor e nos controles. O conteúdo de glicosamina<sup>6</sup> e a inibição da atividade da enzima  $\alpha$  amilase também foram determinados para avaliar a ação dos extratos<sup>7</sup>. As inibições foram calculadas através da diferença entre os cultivos tratados e os controles. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%, empregando o software Statistica 7.0.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos dos tratamentos foram demonstrados na inibição do crescimento micelial, conteúdo de glicosamina e atividade da  $\alpha$  amilase estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Inibições do crescimento fúngico causada pelas aplicações dos extratos inibidores.

Cultivar	IM (%)	IG (%)	IA $\alpha$ amilase (%)
OR Marfim	8,9 ± 1,6 <sup>c</sup>	24,5 ± 0,4 <sup>d</sup>	1,5 ± 0,5 <sup>d</sup>
Quartzo	5,7 ± 0,1 <sup>d</sup>	65,9 ± 5,6 <sup>a</sup>	84,0 ± 6,6 <sup>a</sup>
Fundacep Raízes	50,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	27,6 ± 7,2 <sup>c,d</sup>	42,1 ± 6,6 <sup>b</sup>
Abalone	10,3 ± 0,7 <sup>c</sup>	41,3 ± 0,3 <sup>b</sup>	5,8 ± 1,3 <sup>c</sup>
BRS Tarumã	30,3 ± 0,9 <sup>b</sup>	36,1 ± 0,9 <sup>b,c</sup>	29,9 ± 8,1 <sup>b</sup>

## **Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia** **Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER**

IM = Inibição micelial; IG = Inibição conteúdo de glicosamina; IA  $\alpha$  amilase= Inibição da atividade enzimática da  $\alpha$  amilase.

Todos os extratos apresentaram capacidade de inibir o crescimento fúngico mesmo em uma condição ideal para o desenvolvimento fúngico, seja pela temperatura ótima (25 °C), alta umidade ou pelo excesso de inóculo. Destaca-se o extrato obtido da variedade Fundacep Raízes pela alta capacidade de inibir o micélio do patógeno (50%).

O extrato da variedade Quartzo se destacou pela inibição de 66% da produção de glicosamina e da atividade da  $\alpha$  amilase (84%). Este extrato possibilitou uma inibição mais eficaz para o desenvolvimento do patógeno, pois apresentou efeito fungistático.

Os extratos obtidos das variedades Fundacep Raízes e Quartzo afetaram o desenvolvimento do patógeno de formas diferentes sobre as rotas metabólicas para proteger as plantas contra os patógenos.

### **CONCLUSÕES**

Extratos inibidores de  $\alpha$  amilases representam papéis importantes como agentes antifúngicos na planta. Os resultados obtidos neste trabalho são bastante promissores, pois fornecem subsídios para a compreensão do mecanismo de defesa natural de plantas que pode ser compreendido através de técnicas moleculares.

### **REFERÊNCIAS**

- (1) DAMBOLENA, J. S.; ZYGADLO, J. A.; RUBISTEINS, H. R. Antifumonisin activity of natural phenolic compounds a structure-property-activity relationship study. **International journal of food microbiology**, v. 145, p. 140-146, 2011.
- (2) CHEN, Y.; HUANG, T.-T.; CHEN, C.-J.; HOU, Y. P.; ZHANG, A. F.; WANG, W. X.; GAO, T. C.; ZHOU, M. G. Sensitivity of *Fusarium verticillioides* isolates from rice to a novel cyanoacrylate fungicide. **Crop Protection**, v. 39, p. 106-109, 2012.
- (3) FENG, G. H.; RICHARDSON, M.; CHEN, M. S.; KRAMER, K. J.; MORGAN, T.; REECK, G. R.  $\alpha$  Amylase Inhibitors from Wheat: Amino Acid Sequences and Patterns of Inhibition of Insect and Human  $\alpha$  Amylase. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 26, n. 5, p. 419-426, 1996.
- (4) FIGUEIRA, E.L.Z.; BLANCO-LABRA, A.; GERAGE, A.C.; ONO, E.Y.S.; MENDIOLA-OLAYA, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. New Amylase Inhibitor Present in Corn Seeds Active In Vitro Against Amylase from *Fusarium verticillioides*. **Plant Disease**, v. 87, n. 3, p. 233-240, 2003
- (5) PAGNUSSATT, F. A.; MEZA, S. L. R.; GARDA-BUFFON, J.; BADIÁLE-FURLONG, E. Procedure to determine enzyme inhibitors activity in Cereal Seeds. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 12, 2012.
- (6) SOUZA, M. M.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, N.A. C.; SOUZA, T. D.; BADIÁLE-FURLONG, E. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência agrotécnica**, v. 35, n. 6, p. 1050-1058, 2011.
- (7) GARDA-BUFFON, J.; BARAJ, E.; BADIÁLE-FURLONG, E. Effect of deoxynivalenol and T-2 toxin in malt amylase activity. **Brazilian arch. boil. technol.**, v. 53, n. 3, 2010.