



Capacidade antifúngica de biocida produzido à base de lignina e timol

Aline Krolow Soares ¹, Washington Luiz Esteves Magalhães ², Álvaro Figueredo Dos Santos ²,
Darci Alberto Gatto ¹

¹UFPEl – Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), 96010-610 – Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: alinekrolowsoares@yahoo.com.br; darcigatto@yahoo.com

²Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira km 111, 83411-000 – Colombo, Paraná, Brasil. E-mail: washington.magalhaes@embrapa.br

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade antifúngica de material biocida produzido à base de lignina e timol nos fungos fitopatogênicos *Phytophthora palmivora*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum* e *Roselinia bunodes*. Para isso, foram produzidas suspensões com pH=7,0 e proporção de 1:10 (timol:lignina). Este material foi agitado em um ultrassonicador (Sonics – Vibra Cell) juntamente com Tween-20, HCl 5M e água destilada durante 10 minutos. A suspensão foi seca em estufa a vácuo durante 24 horas a 60°C e a fração sólida resultante foi utilizada para análise da atividade antifúngica juntamente com as amostras de controle, lignina e timol, individualmente. Cada um destes três materiais foi misturado ao meio de cultura BDA a uma concentração de 1% e distribuídas em placas de Petri (em triplicata). Após a adição dos fungos, a avaliação da capacidade inibitória de cada amostra foi realizada pela medição do crescimento micelial até atingir a borda da placa de Petri. Os resultados indicam que a formulação da suspensão com timol e lignina foi a que mais inibiu os microorganismos apresentando menor crescimento micelial para três, dos quatro fungos analisados em comparação às demais formulações. O timol inibiu completamente o crescimento micelial dos fungos e, portanto, sua associação com a lignina permitiu avaliar o seu potencial como biocida natural.

Palavras-chave: Fungicidas; Materiais lignocelulósicos; Recursos Naturais.

1. Introdução

A lignina é um recurso de origem florestal ainda pouco explorado, mas que apresenta um diversificado potencial de aplicações. A lignina é um subproduto da indústria de polpação de celulose e produção de papel, utilizada basicamente para gerar energia em caldeiras. De acordo com sua estrutura química, a lignina é um biopolímero formado a partir de unidades de fenil-propano, resultando em uma macromolécula extensa, ramificada, tridimensional e amorfa (NIPELO et al., 2015; SILMORE et al., 2016) (Figura 1a).

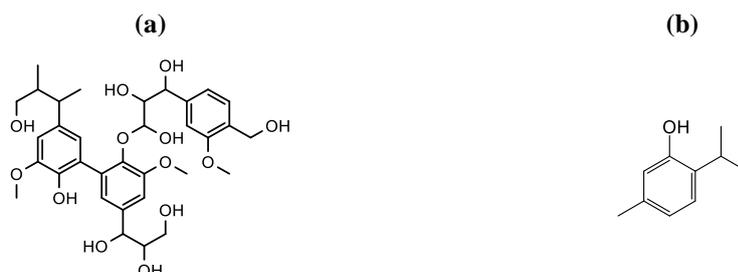


Figura 1 – Molécula de (a) lignina e (b) timol.



A lignina é um dos três principais constituintes da biomassa vegetal terrestre, juntamente com a celulose e a hemicelulose. É o segundo polímero natural mais abundante no planeta e é a mais importante fonte renovável de compostos fenólicos (BOZELL et al., 2007; ABDELAZIZ et al., 2016). A quantidade de lignina produzida anualmente pela natureza foi estimada entre 5 a 36×10^8 toneladas (GELLERSTEDT e HENRIKSSON, 2008). No entanto, um dos maiores desafios da ciência atualmente é a conversão de resíduos ou subprodutos da biomassa florestal em produtos de maior valor comercial com potencial para substituir produtos sintéticos.

A produção de biocidas de origem sustentável é um promissor campo de estudo com vistas a minimizar os custos com a produção de materiais sintéticos caros e com maiores riscos de contaminação de água e solo. A lignina apresenta atividade antifúngica, devido a sua natureza fenólica e, por isso, é de grande interesse o estudo de seu comportamento diante de diferentes espécies de fungos fitopatogênicos. Por outro lado, a combinação com outros materiais que apresentem considerável potencial antifúngico é uma forma de ampliar as suas propriedades.

Compostos como carvacrol, timol, eugenol, mentol e limoneno têm sido utilizados em aplicações que vão desde antissépticos médicos e agentes de cicatrização de feridas até a conservantes de alimentos (KON e RAI, 2012; CONNELL et al., 2016). Dentre estes, o timol (2-isopropil-5-metilfenol) é um monoterpene volátil, cristalino, incolor e o principal componente fenólico de óleos essenciais do tomilho (*Thymus vulgaris*), orégano (*Origanum vulgare*) e alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) (LICATA et al.; MANCINI et al.; SARWAR e LATIF, 2015) (Figura 1b).

O mecanismo de ação do timol contra microrganismos depende do rompimento da membrana citoplasmática, que aumenta sua permeabilidade (DI PASQUA et al., 2006; CONNELL et al., 2013). O timol também é um importante repelente natural contra mosquitos, sendo utilizado em formulações comerciais de inseticidas. De acordo com Park et al. (2005), o timol é capaz de repelir particularmente o *Culex pipiens pallens*, sendo tóxico também para suas larvas. Dessa forma, o timol é útil na busca por novos inseticidas e biocidas naturais (MARCHESE et al., 2016).

O presente trabalho tem como objetivo analisar a atividade antifúngica de materiais biocidas produzidos a partir da lignina e de timol nos seguintes fungos fitopatogênicos: *Phytophthora palmivora*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum* e *Roselinia bunodes*.

2. Material e Métodos

A primeira etapa do trabalho consistiu em preparar soluções de timol e lignina. O timol (Sigma Aldrich 99% de pureza) foi dissolvido em álcool etílico (99% de pureza) a uma concentração de 33%. A lignina (Suzano Papel e Celulose S.A.) foi dissolvida a 5% de concentração em NaOH 1M.

Foi produzida uma suspensão com proporção de 1:10 (timol:lignina), adicionando-se 0,5 mL do surfactante Tween-20 diluído 0,1% em H₂O (para melhorar a miscibilidade), 1 mL de HCl 5M (para ajustar o pH=7,0) e água destilada em quantidade suficiente para completar um volume de 50 mL. Os materiais foram agitados em ultrassonicador com potência líquida de 130 watts e frequência de 20kHz (Sonics – Vibra Cell), utilizando uma amplitude de 80% da frequência máxima, alternando o tempo de 10 segundos de agitação e 2 segundos de pausa durante 10 minutos.

Para a análise antifúngica, a suspensão foi seca em estufa à vácuo durante 24 horas a 60°C para obtenção da fração sólida do material. Os fungos fitopatogênicos *Phytophthora palmivora*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum* e *Roselinia bunodes* foram utilizados para testar a atividade antifúngica da suspensão de timol e lignina (1:10). Para tal, a suspensão produzida e também a lignina e timol, individualmente, foram misturadas ao meio de cultura BDA (batata, dextrose, agar) na concentração de 1% em massa. Posteriormente, o BDA com cada amostra teste e o BDA controle foram distribuídos em placas de Petri, em triplicata. A etapa seguinte consistiu em colocar discos de



meio de cultura com crescimento fúngico ativo (5 mm) no centro da placa de Petri. A avaliação da capacidade inibitória de cada amostra teste foi realizada pela medição diária do crescimento micelial do fungo até atingir a borda da placa de Petri. Com os resultados, foi calculado o percentual de crescimento fúngico.

3. Resultados e Discussão

A suspensão produzida apresentou concentração de 13,0% w/v (Figura 2a) e, após a secagem, o material apresentou umidade de 12,4% (Figura 2b).



Figura 2 – Aspecto inicial da suspensão (1:10) preparada (a) e fração sólida (b).

Após o ensaio fitopatológico com os fungos *Phytophthora palmivora*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum* e *Roselinia bunodes*, foi possível verificar que a suspensão apresentou maior inibição para três fungos avaliados com relação à lignina individualmente (Figura 3), com exceção do *Roselinia bunodes*. Verifica-se ainda que o timol inibiu completamente o crescimento de todos os fungos (Figura 3).

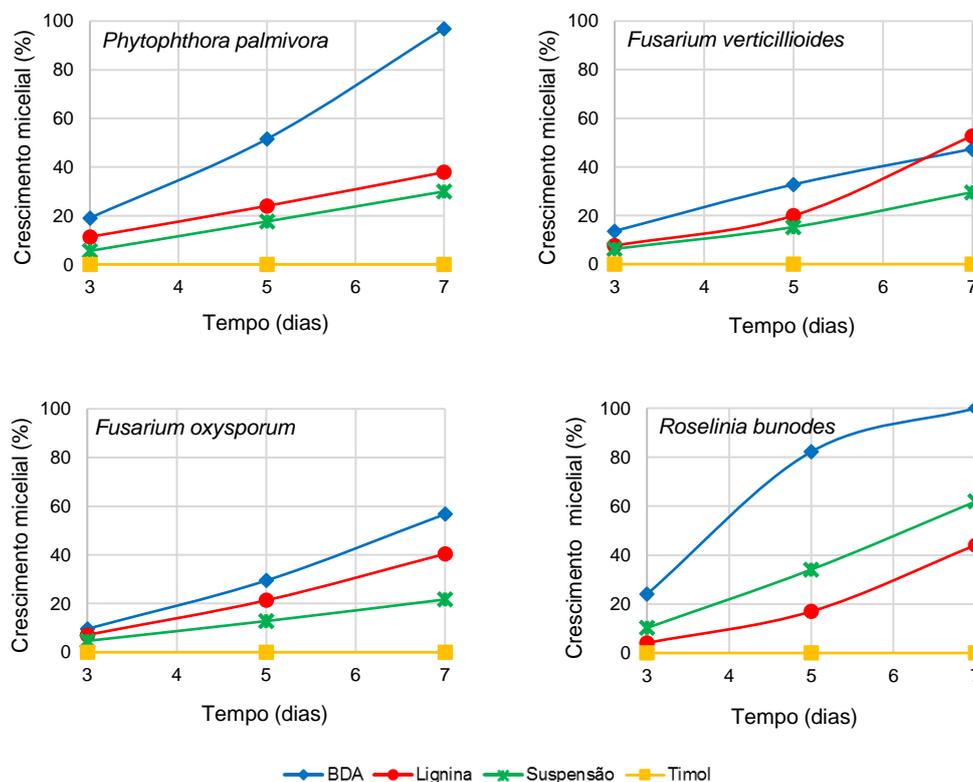


Figura 3 – Crescimento dos fungos ao longo do tempo para o timol, lignina e a suspensão.



Observa-se que ao final de sete dias, enquanto o fungo *Phytophthora palmivora* apresentou crescimento de 97% no meio de cultura BDA, para a lignina o crescimento foi de 37,9% da placa e a suspensão 1:10 apresentou crescimento ainda inferior, de 30%. Já para a espécie *Fusarium verticillioides*, o crescimento micelial apresentou a mesma tendência que o *Phytophthora palmivora* nos primeiros 5 dias de ensaio. Enquanto que no sétimo dia o fungo apresentou crescimento micelial de 52,8% nas placas contendo lignina e um crescimento de 47,4% no meio de cultura BDA; o crescimento micelial nas amostras de suspensão foi também o menor para este fungo, 29,6%. O crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* foi similar ao do *Phytophthora palmivora*, em que no final de sete dias de ensaio, o crescimento foi de 56,7% para o BDA, 40,4% para a lignina e 21,7% para a suspensão 1:10.

O fungo *Roselinia bunodes* foi o que apresentou maior crescimento, já no quinto dia de experimento a placa de Petri contendo BDA teve 82,2% de sua área tomada pelo fungo. No entanto, para este fungo a lignina apresentou maior capacidade inibitória do que para a suspensão ao longo de todo o período de ensaio e, no final dos sete dias, a placa contendo BDA foi tomada pelo fungo (100% de crescimento micelial), enquanto que para lignina foi de 44% e para a suspensão 1:10 foi de 61,9%.

4. Conclusões

A suspensão produzida a partir de timol e lignina apresentou maior inibição contra os fungos *Phytophthora palmivora*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum* com relação à lignina individualmente. O estudo mostrou que o timol inibiu completamente o crescimento micelial dos fungos e, portanto, sua associação com a lignina permitiu avaliar o seu potencial como biocida natural.

5. Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), processo 00.889.834/0001.08, e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Florestas), pelo suporte financeiro e técnico-científico. Agradecemos também ao CNPq pela concessão de bolsa produtividade aos coautores (W. L. E. Magalhães, A. F. Dos Santos e D. A. Gatto).

Referências

ABDELAZIZ, O. Y.; BRINK, D. P.; PROTHMANN, J.; RAVI, K.; SUN, M.; JAVIER GARCÍA-HIDALGO, J.; SANDAHL, M.; HULTEBERG, C. P.; TURNER, C.; LIDÉN, G.; MARIE F. GORWA-GRAUSLUND, M. F. Biological valorization of low molecular weight lignina. *Biotechnology Advances*, v. 34, p. 1318 – 1346, 2016.

BOZELL, J. J.; HOLLADAY, J. E.; JOHNSON, D.; WHITE, J. F. Top Value-Added Chemicals from Biomass -Volume II-Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin. Pacific Northwest National Laboratory (PNNL), Richland, WA (US), 2007.

CONNELL, S.; LI, J.; DURKES, A.; ZAROURA, M.; SHI, R. Non-dermal irritating hyperosmotic nanoemulsions reduce treatment times in a contamination model of wound healing. *Wound Repair Regen*, v. 24, n. 4, p. 669 – 678, 2016.

CONNELL, S.; LI, J.; SHI, R. Synergistic bactericidal activity between hyperosmotic stress and membrane-disrupting nanoemulsions. *Journal of Medical Microbiology*, v. 62 (Pt 1), p. 69 – 77, 2013.



II SEAFLOR - Semana de Aperfeiçoamento em Engenharia Florestal

Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal



DI PASQUA, R.; HOSKINS, N.; BETTS, G.; MAURIELLO, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 54, n. 7, p. 2745 – 2749, 2006.

GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. Chapter 9 - Lignins: Major Sources, Structure and Properties A2 - Belgacem, Mohamed Naceur, in: A. Gandini (Ed.), *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, Elsevier, Amsterdam, 2008, pp. 201 - 224.

KON, K. V.; RAI, M. K. (2012). Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 10, n. 7, p. 775 – 790, 2012.

LICATA, M.; TUTTOLOMONDO, T.; DUGO, G.; RUBERTO, G.; LETO, C.; NAPOLI, E. M.; RANDO, R.; RITA FEDE, M.; VIRGA, G.; LEONE, R. Study of quantitative and qualitative variations in essential oils of Sicilian oregano biotypes. *Journal of Essential Oil Research*, v. 27, n. 4, p. 293 - 306, 2015.

MANCINI, E.; SENATORE, F.; DEL MONTE, D.; DE MARTINO, L.; GRULOVA, D.; SCOGNAMIGLIO, M.; SNOUSSI, M.; DE FEO, V. Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Molecules*, v. 20, n. 7, p. 12016 - 12028, 2015.

MARCHESE, A.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; BARBIERI, R.; DI LORENZO, A.; NABAVI, S. F.; GORTZI, O.; IZADI, M.; NABAVI, S. M. Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature. *Food Chemistry*, v. 210, n. 1, p. 402 – 414, 2016.

NIPELÖ, T. E.; CARRILLO, C. A.; ROJAS, O. J. Lignin supracolloids synthesized from (W/O) microemulsions: use in the interfacial stabilization of Pickering systems and organic carriers for silver metal. *Soft Matter*, v. 11, p. 2046 - 2054, 2015.

PARK, B. S.; CHOI, W. S.; KIM, J. H.; KIM, K. H.; LEE, S. E. Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 21, n. 1, p. 80 - 83, 2005.

SARWAR, A.; LATIF, Z. GC-MS characterisation and antibacterial activity evaluation of *Nigella sativa* oil against diverse strains of *Salmonella*. *Natural Product Research*, v. 29, n. 5, p. 447 - 451, 2015.

SILMORE, K. S.; GUPTA, C.; WASHBURN, N. R. Tunable Pickering emulsions with polymer-grafted lignin nanoparticles (PGLNs). *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 466, p. 91 - 100, 2016.