

Capacidade antifúngica de suspensões estáveis de lignina e timol contra o fungo *Ganoderma applanatum*

Aline Krolow Soares¹, Washington Luiz Esteves Magalhães^{1,2}, Paula Zanatta³, Darci Alberto Gatto⁴

¹Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais (PIPE) – 81530-000, Curitiba, Paraná, Brasil.

²Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira km 111, 83411-000 – Colombo, Paraná, Brasil.

³Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Engenharia Florestal – 88520-000, Lages, Santa Catarina, Brasil.

⁴Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), 96010-610 – Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Resumo

O presente estudo propôs a avaliação da atividade antifúngica de um sistema biocida elaborado a partir de uma suspensão de timol estabilizada em lignina kraft contra o fungo *Ganoderma applanatum*. Para isso, foram produzidas suspensões com pH=7,0 em proporções de 1:1, 1:0,5 e 1:0,1 (lignina:timol) que foram diluídas a 0,1, 0,5 e 1 g.l⁻¹ em meio de cultura ágar malte dextrose para análise da capacidade mínima inibitória (MIC) frente ao fungo *Ganoderma applanatum*. Os resultados indicaram que uma pequena concentração de timol (1:0,1) foi eficiente em retardar o crescimento micelial do fungo nas diluições de 0,5 e 1 g.l⁻¹ testadas, onde houve crescimento micelial do fungo de 80,66% e 17,52%, respectivamente no sexto dia de exposição. As suspensões 1:1 e 1:0,5 foram mais eficientes e apresentaram capacidade fungicida, ou seja, inibiram completamente o crescimento micelial desde o primeiro dia de exposição. O timol comercial também apresentou poder fungicida enquanto que a lignina comercial apresentou característica semelhante às amostras que não continham o biocida (branco), indicando que o fungo *Ganoderma applanatum* não teve dificuldade de crescer quando em contato com a lignina. Isso ocorre porque este é um fungo xilófago causador da podridão-branca e ao atacar madeiras, por exemplo, degrada lignina e carboidratos na mesma proporção. Dessa maneira, foi possível concluir que a inclusão de lignina na elaboração do biocida foi eficiente não somente para reduzir a concentração de timol necessária como também para reduzir o custo do biocida, uma vez que a lignina é obtida a partir de um subproduto da indústria de polpa e papel, e o timol apresenta alto custo de mercado.

Palavras-chave. Biomassa, material lignocelulósico, óleos essenciais, biocida sustentável.

Introdução

Os esforços para desenvolver alternativas mais amigáveis ambientalmente nos dias de hoje vêm apontando para o uso do timol quando se trata de biocidas (NURUZZAMAN et al., 2016). O timol é um monoterpeneo de baixo peso molecular e constitui o óleo essencial do tomilho (*Thymus vulgaris*), orégano (*Origanum vulgare*) e alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) (LICATA et al., 2015). O uso do timol ainda é limitado devido a sua baixa miscibilidade em água, sendo necessário o uso de surfactantes que controlem essa característica. Contudo, os surfactantes mais empregados apresentam alta toxicidade e prejudicam organismos aquáticos, como é o caso dos polissorbatos (REBELLO et al., 2013), e são em sua maioria derivados do petróleo.

Visando materiais mais sustentáveis, deve-se, portanto, buscar substituintes naturais para esses surfactantes. Um recurso proveniente da biomassa pode ser a solução para esse problema: a lignina. A lignina é um biopolímero de natureza aromática com alto peso molecular, constituída por unidades fenilpropanóides (NIPELÖ et al., 2015). A possibilidade de uso da lignina como estabilizante é devido à sua natureza anfifílica, pois ela possui tanto domínios hidrofóbicos (-CH₃) como hidrofílicos (-OH), o que permite a estabilização de interfaces água-óleo, sendo uma alternativa aos surfactantes sintéticos (LAM et al., 2014).

Nesse sentido, o presente estudo traz uma abordagem nova para a produção de um biocida sustentável, baseado em lignina e timol. Como objetivo central do estudo, buscou-se avaliar a capacidade antifúngica de uma suspensão produzida com timol e estabilizada com lignina contra o fungo *Ganoderma applanatum*.

Material e Métodos

Inicialmente, foi preparada solução contendo 33% de timol utilizando álcool etílico como solvente, esta solução foi adicionada à solução com 5% de lignina diluída em NaOH 1M para obter as seguintes proporções: 1:1, 1:0,5 e 1:0,1 (L:T). Foi adicionado nesta mistura 0,5 mL do surfactante Tween-20 diluído 0,1% em H₂O a fim de obter melhor miscibilidade, 1 mL de HCl 5M foi adicionado para equilíbrio do pH=7,0 e água destilada foi adicionada para completar o volume de 50 mL em cada suspensão. 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, com tempo 10 segundos de agitação e 2 segundos de pausa durante 10 minutos. As amostras foram secas em estufa à vácuo durante 24 horas a 60°C (Quimis) para análise da capacidade mínima de inibição do crescimento micelial do fungo xilófago *Ganoderma applanatum*.

Para tal, as três suspensões produzidas, além da lignina e do timol individualmente foram misturadas ao meio de cultura BDA (batata, dextrose, agar) em diferentes concentrações (0,1, 0,5 e 1% em massa) para avaliar a concentração mínima inibitória para o desenvolvimento de cada fungo. A quantidade de BDA utilizada foi constante, de acordo com especificações do fabricante. Posteriormente, o BDA com cada amostra mais BDA controle foram distribuídos

em placas de petri, em triplicata. A etapa seguinte foi a distribuição dos fungos com diâmetro de 5mm para cada placa.

As culturas de fungos foram repicadas no mesmo dia e distribuídas a partir do mesmo BDA. Além disso, os discos foram retirados no período de crescimento ativo (micélio sem encostar nas bordas da placa), com coloração típica, e acondicionados a uma temperatura adequada (23°C). Após a adição dos fungos, a avaliação da capacidade inibitória das amostras foi realizada pela medição do crescimento micelial, através de medições diárias até preencher toda placa de petri.

Resultados e discussão

Ao avaliar a concentração mínima de inibição do crescimento micelial do fungo *Ganoderma appanatum* nas amostras de suspensões produzidas com timol e lignina foi possível observar que mesmo as amostras produzidas com a menor quantidade de timol já apresentaram resultados positivos nos testes. Em todas as concentrações, o crescimento micelial em timol comercial foi de 0%, ou seja, o timol é um fungicida bastante eficiente. Observa-se que após 6 dias de ensaio, todas as placas de petri contendo BDA foram preenchidas pelo fungo e o ensaio foi finalizado. No entanto, as características do crescimento micelial do fungo nas amostras contendo lignina e nas suspensões foram distintas. Além disso, observou-se que a capacidade antifúngica das suspensões está relacionada com a concentração desta no meio de cultura (Tabela 1).

No terceiro dia, o crescimento micelial do fungo na presença das amostras com concentração de 0,1% apresentou tendência similar. A placa contendo lignina teve 47,56% de sua área tomada pelo fungo e a amostra 1:0,1 apresentou 41,98% da área tomada pelo fungo, valores superiores ao crescimento micelial na presença de BDA (41,56%). Porém, já no quinto dia de experimento o crescimento micelial do fungo no meio de cultura BDA foi maior. Ao finalizar o experimento, no sexto dia, enquanto o crescimento micelial do fungo no BDA atingiu as bordas da placa de petri (100% de crescimento), nas amostras de lignina e suspensão 1:0,1, o crescimento micelial atingiu 90,84% e 90,40% da placa de petri, respectivamente. Por outro lado, nas amostras 1:0,5 e 1:1 o crescimento micelial foi menor que nas demais durante todos os dias de experimento, apresentando 87,12% e 74,28% da área total das placas de petri tomadas pelo fungo, respectivamente, no final do experimento (sexto dia).

Já com uma concentração de 0,5%, as amostras 1:1 e 1:0,5 inibiram completamente o crescimento do fungo *Ganoderma appanatum*. O crescimento micelial na placa de petri contendo lignina (46,88%) foi superior ao BDA (35,43%) desde o primeiro dia de ensaio e até o quinto dia, porém, no sexto dia de teste ambos apresentaram preenchimento total da placa de petri. A amostra 1:0,1, no terceiro dia de ensaio apresentou mais da metade do crescimento micelial que a lignina, e no final do experimento, o fungo apresentou apenas 80,66% de preenchimento da placa de petri nessa amostra.

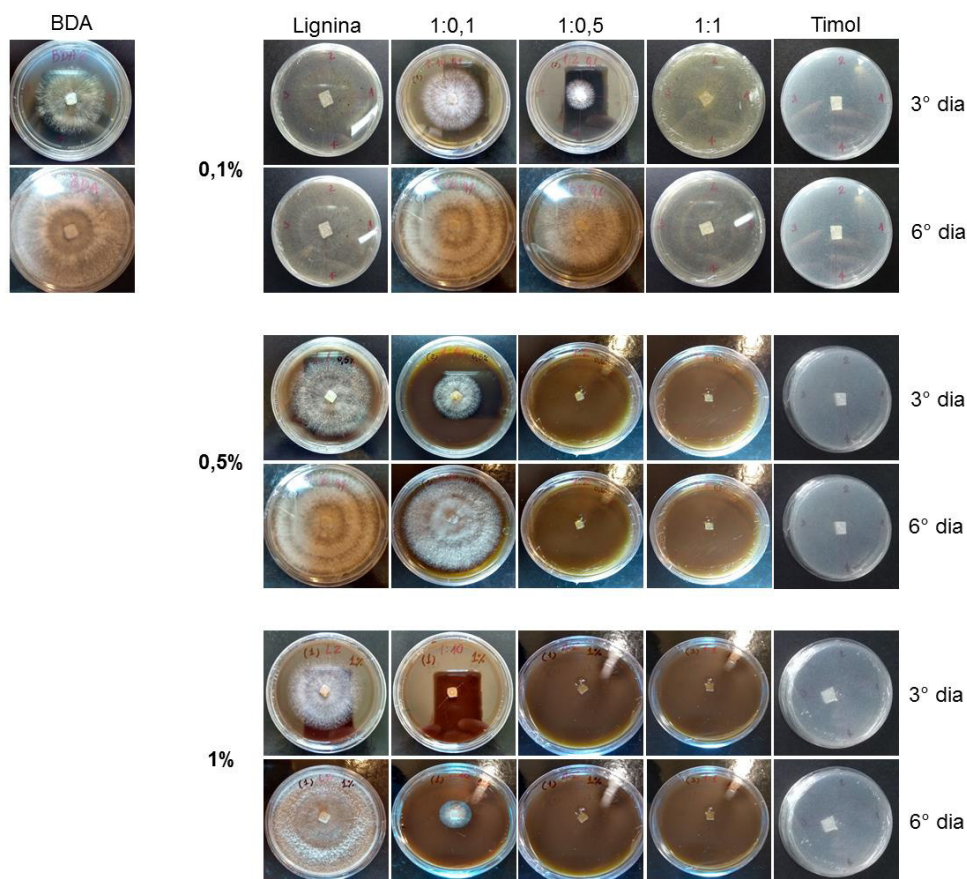
Tabela 1. Concentração mínima inibitória da lignina, timol e das suspensões produzidas com timol e lignina.

Concentração	Amostra	Tempo (dias)			
		3	4	5	6
0,1%	Timol	0,00	0,00	0,00	0,00
	1:1	30,07	45,38	59,78	74,28
	1:0,5	30,85	49,71	65,26	87,12
	1:0,1	41,98	65,94	83,47	90,40
	Lignina	47,23	67,69	81,49	90,84
	BDA	41,56	65,27	84,80	100
0,5%	Timol	0,00	0,00	0,00	0,00
	1:1	0,00	0,00	0,00	0,00
	1:0,5	0,00	0,00	0,00	0,00
	1:0,1	20,10	38,81	58,65	80,66
	Lignina	46,88	67,52	94,36	100
	BDA	35,43	56,86	84,80	100
1%	Timol	0,00	0,00	0,00	0,00
	1:1	0,00	0,00	0,00	0,00
	1:0,5	0,00	0,00	0,00	0,00
	1:0,1	0,00	0,00	5,07	17,52
	Lignina	35,84	58,37	83,20	100
	BDA	35,43	60,95	88,69	100

Em que: 1:1= amostras com proporção de 1:1 (lignina:timol); 1:0,5= amostra com proporção de 1:0,5 (lignina:timol); 1:0,1= amostra com proporção de 1:0,1 (lignina:timol).

Também na concentração de 1% as amostras 1:1 e 1:0,5 inibiram totalmente o crescimento do fungo, o que era esperado já que as mesmas amostras em concentração de 0,5% já foram capazes de impedir o crescimento do fungo *Ganoderma applanatum*. Já a amostra 1:0,1 teve um efeito de retardar o início do crescimento micelial, apenas no quinto dia de andamento do experimento o fungo apresentou crescimento, de 5,07%. No último dia do teste apenas 17,52% da placa foi tomada pelo fungo. As placas de petri contendo a amostra 1:0,1 na concentração de 1% continuaram sendo medidas até o preenchimento total pelo fungo, que ocorreu no décimo terceiro dia após o início dos ensaios. O crescimento micelial do fungo na presença da amostra de lignina na concentração de 1% foi similar ao BDA. Maiores detalhes sobre o aspecto dos micélios do fungo *Ganoderma applanatum* para cada amostra pode ser visualizado na Figura 1.

Figura 1. Crescimento micelial do fungo *Ganoderma applanatum* no terceiro e sexto dia de análise em meio de cultura BDA e nas amostras de lignina, suspensão (1:0,1, 1:0,5 e 1:1) e timol. Em que: 0,1%, 0,5% e 1% são as concentrações de amostra em meio de cultura utilizadas; 1:1= amostras com proporção de 1:1 (lignina:timol); 1:0,5= amostra com proporção de 1:0,5 (lignina:timol); 1:0,1= amostra com proporção de 1:0,1 (lignina:timol).



Fonte: Autores, 2019.

A partir da análise dos resultados, é possível observar que a atividade antifúngica das amostras teve forte relação com a quantidade de timol, tanto a quantidade de timol na amostra como a concentração da amostra no meio de cultura. Nesse sentido, Klaric et al. (2007) atribuíram a atividade fungicida e fungistática do óleo essencial de *Thymus vulgaris* em mofo de parede ao timol. O mecanismo de ação do timol ainda é pouco conhecido, no entanto, especula-se que suas propriedades estão relacionadas com sua estrutura fenólica. De acordo com Chavan e Tupe (2014), o timol é responsável por causar danos na membrana e vazamento de conteúdo citoplasmático nos microorganismos. O timol já foi comprovado ter capacidade fungicida e fungistática in vitro contra diversos fungos e leveduras (KLARIC et al., 2007; ZUZARTE et al., 2013; CHAVAN e TUPE, 2014) e aqui neste estudo, comprovamos que apresenta também atividade antifúngica contra o fungo xilófago de podridão branca *Ganoderma applanatum*.

Por outro lado, a lignina individualmente não apresentou inibição do crescimento micelial em nenhuma concentração. Embora a lignina seja referida na literatura como uma molécula com propriedades fungicidas (AGO et al., 2017), o crescimento micelial nas amostras contendo lignina foi igual e, em alguns casos superior, que as amostras controle contendo apenas BDA.

Conclusões

As três formulações de suspensões apresentaram resistência in vitro contra o fungo de podridão branca *Ganoderma applanatum* a partir da concentração 0,5%, apresentando inibição total do crescimento micelial nas amostras com maior quantidade de timol (1:1 e 1:0,5). O timol individualmente inibiu completamente o crescimento micelial e a lignina não apresentou resistência contra esses fungos, indicando que essas suspensões têm potencial para aplicação na preservação da madeira.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de pesquisa, ao CNPq pelas bolsas produtividade e à Embrapa Florestas pelo suporte técnico-científico.

Referências Bibliográficas

- AGO, M.; TARDY, B. L.; WANG, L.; GUO, J.; KHAKALO, A.; ROJAS, O. J. Supramolecular assemblies of lignina into nano- and microparticles. *Materials Research Society Bulletin*, v.42, p.371-378, 2017.
- CHAVAN, P. S.; TUPE, S. G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. *Food Control*, 2014.
- KLARIC, M. S.; KOSALEC, I.; MASTELIC, J.; PIECKOVA, E.; PEPELJNAK, S. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in Applied Microbiology*, v.44, p.36-42, 2007.
- LAM, S.; VELIKOV, K. P.; VELEV, O. D. Pickering stabilization of foams and emulsions with particles of biological origin. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v.19, p.490-500, 2014.
- 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, p.293-306, 2015.
- 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.
- NURUZZAMAN, M.; RAHMAN, M. M.; LIU, Y.; NAIDU, R. Nanoencapsulation, NanoGuard for Pesticides: A New Window for Safe Application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.64, p.1447-1483, 2016.
- REBELLO, S.; ASOK, A. K.; MUNDAYOOR, S.; JISHA, M. S. Surfactants: Chemistry, Toxicity and Remediation. Cap. 5. p.278-305, 2013.
- ZUZARTE, M.; GONÇALVES, M. J.; CAVALEIRO, C.; CRUZ, M. T.; BENZARTI, A.; MARONGIU, B.; MAXIA, A.; PIRAS, B. A.; SALGUEIRO, L. Antifungal and antiinflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils. *Industrial Crops and Products*, v.44, p.97-103, 2013.