

## ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE MICRORGANISMOS EFICIENTES (ME) CONTRA *Alternaria alternata*

Ana Laura Castilho Franco (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Natália Santos Pretes, Juliana Cristina Castro (Co-orientador), Miguel Machinski Junior (Orientador).  
E-mail: mmjunior@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

### Farmácia (40300005) e Análise Toxicológica (40303004)

**Palavras-chave:** Microrganismos Eficientes; *Alternaria alternata*; biofungicida.

### RESUMO

A solução de Microrganismos Eficientes (ME), preparada por agricultores de forma artesanal, tem sido uma alternativa orgânica em substituição ao uso de produtos agrícolas sintéticos nas lavouras familiares. Dentre as vantagens da solução destaca-se o auxílio no crescimento e produção de plantas, a biorremediação do solo com a diminuição e/ou eliminação de microrganismos indesejáveis e resíduos químicos. A espécie fúngica, *Alternaria alternata*, tem relevância na produção e qualidade de uvas de mesa, podendo levar a contaminação das frutas por micotoxinas e, conseqüente intoxicação e perdas econômicas. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização química da solução de ME fabricada por agricultores da região de Marialva-PR para identificação de metabólitos secundários por UHPLC-MS/MS e investigar a ação antifúngica dos ME contra *A. alternata*. As micotoxinas, aflatoxina G<sub>2</sub> e patulina, foram encontradas na solução de ME produzida por agricultores de Marialva, sendo a primeira diretamente relacionada com contaminação na indústria alimentícia e a segunda relacionada com efeitos mutagênicos e genotóxicos. Frente à concentração inibitória mínima (CIM), a solução mostrou eficiente atividade antifúngica nas concentrações de 50 e 25% contra *A. alternata*. Contudo, na avaliação por disco de difusão, a solução não demonstrou ação antifúngica nas concentrações testadas. O estudo demonstrou micotoxinas de risco alimentar na solução de ME avaliada e divergência da ação antifúngica entre os testes realizados, fazendo-se necessário outros estudos mais complexos e específicos para avaliar sua segurança. Este estudo enfatiza a importância da caracterização química dos ME e segurança dos mesmos frente a aplicação agrícola.

## INTRODUÇÃO

A presença de fungos filamentosos produtores de micotoxinas é um fator preocupante entre os agricultores do Brasil, pois é um indicativo de perdas econômicas significativas e também de contaminação de alimentos com riscos a humanos e animais. *Alternaria alternata* é um importante fungo filamentoso, considerado patogênico, que afeta diretamente a respiração celular vegetal, conseqüentemente, diminui a produção agrícola, pois acelera o processo de morte celular da planta (CASTRO et al., 2018).

Os fungicidas são produtos sintéticos utilizados na agricultura para controle de doenças pré e pós-colheita, entretanto, o seu uso aumenta a cada ano e a presença de resíduos nos alimentos, conseqüências irreversíveis na saúde dos consumidores, além de aumento de resíduos químicos no solo impedem o crescimento saudável de plantas e frutos (SILVA, CORDEIRO e ROCHA, 2022).

Uma das alternativas crescentes e viáveis para utilização agrícola e na pecuária, são os microrganismos eficientes (ME), um bioinsumo que é usualmente utilizado na substituição dos agroquímicos. Os ME são definidos como uma comunidade de microrganismo que são naturalmente encontrados em solo fértil, e é composto por quatro grupos conhecidos: leveduras, actinomicetos, bactérias produtoras de ácido láctico e bactérias fotossintetizantes (SILVA, CORDEIRO e ROCHA, 2022). Diante disso, é necessário caracterizar quimicamente e avaliar a atividade antifúngica da solução de ME, contra *A. alternata*, produzida por agricultores da região de Marialva-PR.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Reagentes*

Para a extração dos compostos, os reagentes foram todos de grau analítico e para os ensaios cromatográficos de grau HPLC. A água ultrapura foi obtida pelo sistema Milli-Q® em 18,2 MΩ/cm (Millipore®, Billerica, MA, EUA) para extração e análise cromatográfica de metabólitos secundários.

### *Coleta de amostras*

As amostras de ME foram obtidas em locais da agricultura familiar de Marialva, Brasil. Estas amostras foram coletadas por técnicos do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR-Paraná, Marialva, Brasil).

### *Caracterização química do ME*

A caracterização química dos metabólitos do ME foi realizada segundo Castro et al. (2018).

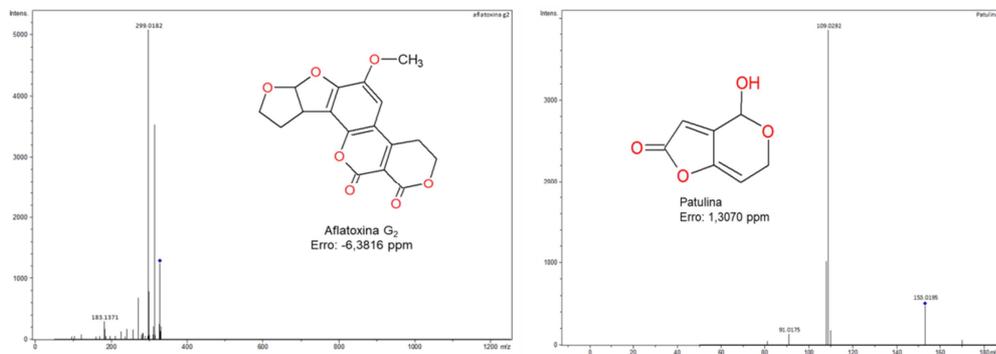
### Avaliação da atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi determinada através do método de microdiluição - Concentração Inibitória Mínima-CIM (CLSI, 2008) e o método de disco difusão descrito por Prasad et al. (2001).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na caracterização química dos metabólitos secundários por UHPLC/MS nas soluções de ME foram identificados a aflatoxina G<sub>2</sub> (HMDB, ID: HMDB0030475, WISHART et al., 2013), em modo positivo e negativo de ionização, a qual está diretamente relacionada com contaminação na indústria alimentícia, causando infecções agudas ou crônicas por sua exposição; e a patulina (HMDB, ID: HMDB0034299, WISHART et al., 2013), em modo negativo, esta tendo potencial mutagênico e genotóxico (Figura 1). Uma vez que o ME é disseminado nas plantações, é de suma importância que não apresente fungos toxigênicos em sua composição, de forma que não seja um perigo em potencial aos agricultores e consumidores dos produtos.

**Figura 1.** Espectro de fragmentação UHPLC-ESI(-)-Qtof-MS/MS das micotoxinas (a) aflatoxina G<sub>2</sub> e (b) patulina.



A CIM encontrada foi de 50 e 25% dos ME para *A. alternata* pelo método CLSI. No entanto, na técnica de disco difusão, não se obteve inibição do crescimento fúngico de hifas da *A. alternata* pelos ME testados. O método CLSI utilizado é um método ouro para avaliar a atividade antifúngica do ME frente a *A. alternata*, contudo outros métodos padronizados e otimizados podem ser feitos para confirmar os resultados, além da concentração fungicida mínima (CFM).

## CONCLUSÕES

A presença dos metabólitos secundários, aflatoxina G<sub>2</sub> e patulina, leva a preocupações voltadas ao uso contínuo e desorientado desta solução de ME na agricultura familiar, uma vez que estas micotoxinas poderão estar presentes no produto agrícola final. Os resultados da atividade antifúngica do ME foram divergentes e inconsistentes nas análises pelo método CLSI e disco-difusão, se faz necessário um estudo mais específico e complexo para avaliar a utilização de ME como biofungicida, além de garantir sua segurança toxicológica.

## AGRADECIMENTOS

Ao PIBIC/CNPq-**Fundação Araucária**-UEM e CNPq (Processo nº 313035/2022-9) pelo apoio e financiamento.

Ao Laboratório de Toxicologia e ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa – Comcap (Ministério da Ciência e Tecnologia - Finep) da Universidade Estadual de Maringá, pela infraestrutura e espaço disponibilizado para a realização desta pesquisa.

## REFERÊNCIAS

CASTRO, J. C.; AVINCOLA, A. S.; ENDO, E. H.; SILVA, M. V.; DIAS FILHO, B. P.; MACHINSKI JR, M.; ... & ABREU FILHO, B. A. Mycotoxigenic potential of *Alternaria alternata* isolated from dragon fruit (*Hylocereus undatus* Haw.) using UHPLC-Qtof-MS. **Postharvest Biology and Technology**, v.141, p.71-76, 2018.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. **NCCLS document M38-A2**. Wayne, PA, USA, 2008.

PRASAD, N.R.; ANANDI, C.; BALASUBRAMANIAN, S.; PEGALENDI, K.V. Antidermatophyte activity of extracts from *Psoralea coryfolia* (Fabaceae) correlated with the presence of a flavonoid compound. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p.21-24, 2001.

SILVA, A. L.; CORDEIRO, R. S. S.; ROCHA, H. C. R.. Aplicabilidade de Microrganismos Eficientes (ME) na Agricultura: uma revisão bibliográfica. **Research, Society and Development**; v. 11, n. 1, p. e32311125054-e32311125054, 2022.

WISHART, D.S.; JEWISON, T.; GUO, A.C.; WILSON, M.; KNOX, C.; LIU Y.; et al. Scalbert HMDB 3.0-the human metabolome database in 2013. **Nucleic Acids Research**, 41, pp. D801-D807, 2013