

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS FIXOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Hevea*

Yasmin Verçosa Kramer¹; Karyne Kathlen Guedes da Silva²; Katharine Duarte Gonçalves¹; Josiane Celerino de Carvalho³; José Francisco de Carvalho Gonçalves⁴

¹Discente do curso de Ciências Biológicas/UEA; ²Discente do curso de Biotecnologia/UFAM; ³Doutoranda em Ciências de Florestas Tropicais/CFT-INPA; ⁴Coord. Lab. Fisiologia e Bioquímica Vegetal/INPA

Identificação do evento: VII Congresso Brasileiro de Heveicultura - 10 a 12 de novembro de 2021, Piracicaba/SP.

Resumo: As sementes de *H. brasiliensis* contém alta percentagem de lipídeos, tendo como principais constituintes os ácidos graxos oleico, linoleico e linolênico que têm sido utilizados para diferentes fins agroindustriais. No entanto, pouco se sabe sobre as propriedades biotecnológicas dos óleos de *H. brasiliensis*, assim como as características químicas dos óleos de sementes de outras espécies do gênero *Hevea*. O objetivo desse estudo foi investigar as propriedades antifúngicas dos óleos fixos de *H. brasiliensis*, *H. guianensis* e *H. spruceana*. As sementes coletadas em dois sítios florestais de Rio Branco-AC e na Reserva Adolpho Ducke-AM receberam tratamento asséptico para obtenção dos endospermas, material ao qual depois de finalmente pulverizado, foi realizada a extração de lipídeos. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 90 µL de meio YPD e 10 µL de suspensão fúngica para que, após 16 h, fossem adicionados 100 µL de emulsão dos óleos. Os ensaios foram acompanhados com auxílio de leitora de microplacas em intervalos de 12 h, até 72 h. Foi possível verificar a ação inibitória dos óleos sobre os fungos e diferenças quanto às suas atividades: os óleos de *H. spruceana* se mostraram mais eficazes contra o fungo *Aspergillus flavus*, os de *H. guianensis* e *H. brasiliensis* obtiveram resultados semelhantes sobre o fungo *Alternaria alternata* e óleos de *H. brasiliensis* demonstraram melhor desempenho contra *Fusarium oxysporum*.

Palavras-chave: óleos vegetais; potencial antifúngico; seringueira.

Introdução

Os lipídeos são metabólitos primários necessários em diversas atividades como fotossíntese, manutenção estrutural e regulação hormonal vegetal. Dentro da classe dos lipídeos são encontrados os triacilgliceróis, sintetizados a partir da ligação de três ácidos graxos à uma molécula de glicerol, que servem de reserva energética e precursor de outros metabólitos (TAIZ et al., 2017). Os triacilgliceróis são conhecidos como óleos fixos ou óleos vegetais e são encontrados principalmente nas sementes, seja nos cotilédones ou no endosperma, dispostas em estruturas membranosas denominadas corpos lipídicos ou oleossomos. Essas reservas lipídicas, juntamente às proteínas e carboidratos, dão suporte ao processo de germinação e estabelecimento inicial da plântula (BEWLEY et al., 2013; TAIZ et al., 2017).

Além do potencial econômico em função do látex, a semente oleaginosa de *H. brasiliensis* desperta interesse de pesquisadores objetivando o desenvolvimento de produtos para a bioindústria, devido ao alto teor de ácidos graxos insaturados como oleico, linoleico e linolênico, e visando possível substituição de petroquímicos na indústria de cosméticos e siderurgia, barateando o consumo de tais produtos e tornando o processo mais sustentável (KUMAR e SHARNA, 2011; ARAVIND et al., 2018; LOURITH e KANLAYAVATTANAKUL, 2020). Há estudos que comprovam a baixa toxicidade do óleo à pele humana e propriedade antioxidante similar ao ácido ascórbico, todavia, há necessidade de mais investigações e certificações científicas para novas aplicações e desenvolvimento de produtos (KITIGOWITTANA et al., 2013; LOURITH e KANLAYAVATTANAKUL, 2020).

Em relação às demais espécies do gênero *Hevea* é possível verificar que não existem muitos estudos com vista no potencial dos óleos dessas espécies e suas propriedades antifúngicas. Entretanto, é possível encontrar estudos de propriedades antimicrobianas do soro do látex o qual tem sido testado contra fitopatógenos como *Rigidoporus micropus*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., demonstrando atividade inibitória (MUBARAK et al., 2018). Kumar et al. (2020) sugerem que a atividade antimicrobiana de óleos fixos está ligada à composição de ácidos graxos, e que os mesmos possuem propriedades antibiofilme e antivirulência por aderirem à membrana plasmática desses patógenos, mimetizando a sinalização celular.

Considerando as evidências das propriedades antimicrobianas de óleos fixos e o potencial inexplorado das espécies do gênero *Hevea*, justifica-se a prospecção de produtos relacionados à defesa de plantas, especialmente pensando-se em futuras aplicações no mercado biotecnológico em substituição aos produtos agroquímicos. Diante do exposto, o presente estudo objetivou investigar o potencial antifúngico dos óleos de sementes de *H. brasiliensis*, *H. guianensis* e *H. spruceana*.

Material e Métodos

As sementes de *Hevea brasiliensis*, *Hevea guianensis* e *Hevea spruceana* foram coletadas no Parque Zoobotânico e Embrapa Rio Branco, ambos localizados no Acre, e na Reserva Adolpho Ducke, em Manaus/AM. O material vegetal foi armazenado em sacos plásticos pretos e transportado ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (INPA/Campus III).

O beneficiamento das sementes foi realizado pela imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) comercial a 2% e lavagem tripla com água destilada. Após a secagem, foram removidos a testa, tégmen, embriões e cotilédones a fim de se obter o endosperma que, por sua vez, foi submetido a nitrogênio líquido e conservado em pacotes de papel alumínio em freezer a -80 °C. Antes da extração de óleos, o endosperma foi liofilizado (CHRIST Alpha 1-4 LSCbasic) e pesados 50g de cada espécie para que pudesse ser macerado com o auxílio de almofariz.

Para a extração de lipídeos foi utilizada uma razão de massa e solvente de 5:2 (m/v), no qual utilizou-se hexano (P.A.) como extrator. A mistura foi posta em agitação durante 2 horas e deixada em repouso durante 30 minutos para decantação do material sólido (torta) (SOARES et al., 2015). O sobrenadante correspondente à fase hexânica foi armazenado em tubos Falcon e mantidos em estufa (SL-100) durante 24 horas à 30 °C visando a volatilização do solvente e obtenção do óleo fixo.

Os fungos *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium oxysporum* foram cultivados em meio BDA e mantidos em BOD por cerca de 7 dias (em função da colonização do meio e esporulação). Para os ensaios antifúngicos, foi feita uma raspagem no meio de cultura colonizado com o auxílio de uma alça de Drigalski para a coleta de esporos, que foram contabilizados em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico, obtendo suspensões fúngicas na concentração de 2×10^5 , como proposto por Nascimento et al. (2019). Nos poços das microplacas foram adicionados 90 µL de meio de YPD para que fossem inoculados 10 µL das suspensões fúngicas e deixados em descanso durante 16 h. Após o tempo de descanso foram adicionados 100 µL de emulsão dos óleos fixos nas concentrações de 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81 e 3,9 µL.mL⁻¹. Como controles positivo e negativo foram utilizados os reagentes químicos peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e Tween 80 (1%), respectivamente. O monitoramento das inibições foi realizado com o auxílio de leitora de microplacas (Thermo Plate Reader), com o ajuste do comprimento de onda de 630 nm com intervalos de 12 h, totalizando 72h de leitura.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), obedecendo um esquema fatorial de 3 x 7 x 3 (3 espécies de *Hevea* X 7 concentrações de óleos X 3 espécies de fungos) com 10 repetições cada. Os dados obtidos foram submetidos a análises de variância (ANOVA) e comparação de médias realizada por meio do Teste Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do programa Prism 7.0.

Resultados e Discussão

Os óleos das diferentes espécies de *Hevea* apresentaram atividade antifúngica embora não tenha sido vista inibição total do crescimento dos fungos. Os óleos de *Hevea spruceana* foram mais efetivos na inibição do crescimento de *Aspergillus flavus*, mostrando sucesso superior 75% nas duas maiores concentrações (250 e 125 µL.mL⁻¹), seguido pelos óleos de *Hevea brasiliensis* e *Hevea guianensis*. O resultado inverso foi verificado em relação ao fungo *Fusarium oxysporum*, no qual os óleos de *H. brasiliensis* e *H. guianensis* se mostraram mais efetivos em relação a inibição do crescimento fúngico na maior concentração (250 µL.mL⁻¹). As menores percentagens de inibição foram visualizadas em relação ao fungo *Alternaria alternata*, no qual não ultrapassou 75%, tendo como mais efetivo os óleos de *H. brasiliensis* e *H. guianensis* (Figura 1 A, B e C).

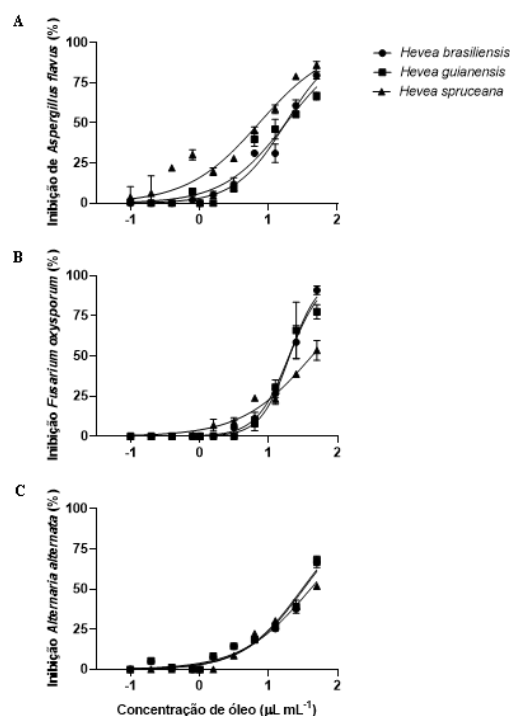


Figura 1: Taxa de inibição da atividade microbiana em função da concentração de óleo fixo. (A) para *Aspergillus flavus*; (B) para *Fusarium oxysporum*; e (C) para *Alternaria alternata*.

Avis e Bélanger (2001) enfatizam que o mecanismo principal de interação entre os ácidos graxos e fungos se dá pela autoinserção das moléculas na membrana plasmática fúngica, gerando uma série de fenômenos desestabilizadores, incluindo o aumento da fluidez membranar. A atividade antifúngica dos óleos de *Hevea* spp. pode estar associada à presença majoritária dos ácidos oleico (C18:1) e linoleico (18:2) que são reconhecidos pela sua capacidade redutora de biofilmes, inibição de enzimas (FabL) relacionadas à produção de lipídeos da membrana microbiana e atividade anti-AI-2, impedindo a adaptação gênica e a resistência microbiana. Além disso, relata-se a capacidade inibitória do ácido linolênico (18:3), embora o mecanismo de ação ainda seja desconhecido (KUMAR et al., 2020).

A atividade antifúngica pode ainda estar associada à ação sinérgica com demais ácidos graxos em menores quantidades, como o ácido mirístico, que interage com a proteína N-miristoiltransferase (NMT) e inibe a miristoilação, que é essencial para o estabelecimento da membrana plasmática (BHATNAGAR et al., 1998; KUMAR et al., 2020; PETROPOULOS et al., 2021).

Esses resultados corroboram com estudos realizados com outras espécies da família Euphorbiaceae como *Ricinus communis*, o qual exibiu atividade contra *Staphylococcus aureus* (SALIH et al., 2019) e *Candida albicans* (AJOSE, 2007), e com óleos fixos de outras espécies, como *Carapa guianensis* e *Carapa vasquezii* que demonstraram atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum* (NASCIMENTO et al., 2019).

Conclusão

Os óleos de sementes de *Hevea brasiliensis*, *Hevea guianensis* e *Hevea spruceana* demonstraram atividade inibitória contra os fungos *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus* e *Alternaria alternata*, confirmando o potencial antifúngico dos óleos fixos proveniente de diferentes espécies do gênero *Hevea*.

Agradecimentos

Agradeço ao INPA e à FAPEAM pela concessão da bolsa e possibilidade de realizar este estudo, assim como os membros da equipe do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV).

Referências Bibliográficas

- AJOSE, F.O.A. Some Nigerian plants of dermatologic importance. **International Journal of Dermatology**, v. 46, n. 1, p.48–55, 2007.
- ARAVIND, A.; NAIR, K.P.; JOY, M.L. Formulation of a novel biolubricant with enhanced properties using esterified rubber seed oil as a base stock. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part J: Journal of Engineering Tribology**, v. 232, p. 1514–1524, 2018.
- AVIS, T.J.; BÉLANGER, R.R. Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 956–960, 2001.
- BHATNAGAR, R.S.; FÜTTERER, K.; FARAZI, T.A.; KOROLEV, S.; MURRAY, C.L.; JACKSON-MACHELSKI, E.; GOKEL, G.W.; GORDON, J.I.; WAKSMAN, G. Structure of N-myristoyltransferase with bound myristoylCoA and peptide substrate analogs. **Nature Structural Biology**, v. 5, n. 12, p. 1091–1097, 1998.
- BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. **Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3 ed. Springer Science+Business Media: Berlin, 392p, 2013.
- KITTIGOWITTANA, K.; WONGSAKUL, S.; KRISDAPHONG, P.; JIMTAISONG, A.; SAEWAN, N. Fatty acid composition and biological activities of seed oil from rubber (*Hevea brasiliensis*) cultivar RRIM 600. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 6, n. 2, p. 1–7, 2013.
- KUMAR, A.; SHARMA, S. Potential non-edible oil resources as biodiesel feedstock: An Indian perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 4, p. 1791–1800, 2011.
- LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Development of Pará rubber seed oil as the efficient makeup remover. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, e18029, 2020.
- MUBARAK, A.; ISMUN, A.; RAZAK, S.B.A.; ARIFFIN, M.M. Antifungal activity of *Hevea brasiliensis* fresh latex and rubber processing effluent in relation to polyphenol composition and polyphenol oxidase activity as a possible protection approach against fungal disease. **Malaysian Applied Biology**, v. 47, n. 4, p. 127–133, 2018.
- NASCIMENTO, G.O.; SOUZA, D.P.; SANTOS, A.S.; BATISTA, J.F.; RATHINASABAPATHI, B.; GAGLIARDI, P.R.; GONÇALVES, F.C. Lipidomic profiles from seed oil of *Carapa guianensis* Aubl. and *Carapa vasquezii* Kenfack and implications for the control of phytopathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 67–73, 2019.
- PETROPOULOS, S.A.; FERNANDES, Â.; CALHELHA, R.C.; ROUPHAEL, Y.; PETROVIĆ, J.; SOKOVIĆ, M.; FERREIRA, I.C.F.R.; BARROS, L. Antimicrobial properties, cytotoxic effects, and fatty acids composition of vegetable oils from purslane, linseed, luffa, and pumpkin seeds. **Applied Sciences**, v. 12, n. 11, p. 5738, 2021.
- SALIH, T.F.M.; ABDULLAH, S.A.; ALI, S.I.; KHDER, D.K. Antibacterial effect of fixed and volatile oils against gram-positive and gram-negative bacteria. **Kurdistan Journal of Applied Research**, p. 74-87, 2019.
- SOARES, A.M.S.; CARVALHO, L.P.; MELO, E.J.T.; COSTA, H.P.S.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A. A protein extract and a cysteine protease inhibitor enriched fraction from *Jatropha curcas* seed cake have in vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity. **Experimental Parasitology**, v. 153, n. 11, p. 1-7, 2015.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6 ed. Artmed: Porto Alegre, 888p, 2017.