

BIOENSAIOS PARA DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE COMPONENTES FUNGITÓXICOS

PELA TÉCNICA DE BIOAUTOGRAFIA, BIOELETROFORESE E DIFUSÃO EM CAMADA FINA¹

LAÉRCIO ZAMBOLIM², NILTON TADEU V. JUNQUEIRA³, GERALDO MARTINS CHAVES²,
REGINALDO DA SILVA ROMEIRO² e JOÃO SABINO DE OLIVEIRA⁴

RESUMO - Comparou-se a técnica de bioautografia em camada fina com bioeletroforese e difusão em camada fina na detecção de resíduos de fungicidas, tendo como fungo-teste, o *Thielaviopsis paradoxa*. O método de bioeletroforese e a técnica de difusão em camada fina modificada são descritos e utilizados pela primeira vez. Os métodos foram comparados em bioensaios empregando-se os fungicidas mancozeb, captafol, benomil e triadimefon em diferentes concentrações. As concentrações mínimas detectadas não variaram com as técnicas utilizadas, mas sim com os fungicidas. Obtiveram-se concentrações mínimas de 0,04, 0,06, 1,25 e 1,90 ppm para benomil, captafol, triadimefon e mancozeb, respectivamente. A técnica de bioeletroforese proporcionou maior zona de inibição do fungo-teste quando se empregou alta concentração de fungicidas. A técnica de difusão em camada fina, por não demandar aparelhagem sofisticada, foi tão eficiente como a bioautografia, constituindo-se em método simples e rápido para a detecção e avaliação de resíduos de compostos fungitóxicos.

Termos para indexação: fungicidas, inibição do fungo, *Thielaviopsis paradoxa*, bioensaios.

BIOASSAYS FOR DETECTING RESIDUES OF FUNGITOXIC COMPOUNDS THROUGH BIOAUTOGRAPHY, BIOELECTROPHORESIS AND THIN-LAYER DIFFUSION

ABSTRACT - The bioautographic technique on thin-layer chromatograms was compared to bioelectrophoresis and thin-layer diffusion for detecting fungitoxic compound by using *Thielaviopsis paradoxa* as test fungus. The bioelectrophoresis and thin-layer diffusion methods were described and employed for the first time. The methods were illustrated by bioassaying the fungicides mancozeb, captafol, benomyl and triadimefon in different concentrations. The minimum concentration of fungitoxic compounds detected was the same for three techniques employed, but it did vary with the fungicides. The minimum concentrations detected of benomyl, captafol, triadimefon and mancozeb were 0.04, 0.06, 1.25 and 1.90 ppm, respectively. The bioelectrophoresis technique gave the highest inhibition zone of the test fungus by using higher concentrations of the fungicides. The thin-layer diffusion technique may be of great value, because it is a simple, rapid, sensitive as the bioautographic technique on the detection of fungitoxic compounds.

Index terms: fungicides, fungus inhibition, *Thielaviopsis paradoxa*.

INTRODUÇÃO

A técnica de bioautografia pelo emprego da cromatografia em camada fina vem sendo utilizada, para avaliação de fungicidas e para detecção de resíduos de substâncias fungitóxicas e de fitoalexinas, por vários pesquisadores (Cid 1980, Dekhuijzen 1964, Homans & Fuchs 1970, Jun-

queira 1982, Junqueira et al. 1982, Kirpatrick & Sinclair 1973, Lazarovitis et al. 1982, Peterson & Edgington 1969). Esta técnica foi comparada com o método de difusão em camada fina e com o de bioeletroforese, visando avaliar a sensibilidade destes métodos na detecção de resíduos de produtos químicos.

As técnicas foram comparadas utilizando-se fungicidas orgânicos protetores e sistêmicos, em várias dosagens, através da área de inibição do fungo-teste *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Hoehn, cultura n^o 158, obtida da micoteca do departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

O fungo *Thielaviopsis paradoxa* caracteriza-se por formar hifas produzindo dois tipos de esporos: aleuriosporos e fialosporos.

¹ Aceito para publicação em 3 de janeiro de 1983.

Trabalho parcialmente financiado pela FINEP.

² Eng^o - Agr^o, M.Sc., Ph.D., Prof. do Dep. de Fitopatol. da Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570 - Viçosa, MG.

³ Eng^o - Agr^o, M.Sc., estudante de doutorado em Fitopatologia do Dep. de Fitopatol. da UFV, Viçosa, MG. (Funcionário do CNPQ/Manaus).

⁴ Farmacêutico Bioquímico, M.Sc., Ph.D., Prof. do Dep. de Química, UFV, Viçosa, MG.

Este trabalho descreve pela primeira vez a técnica de bioeletroforese e relata um método simples e rápido de difusão de produtos químicos no meio de cultura (difusão em camada fina), utilizados rotineiramente para avaliação "in vitro", e na detecção de resíduos de produtos químicos em tecidos vegetais em nosso laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

O fungo-teste utilizado em todos os ensaios foi o *T. paradoxa*, por mostrar grande sensibilidade aos fungicidas utilizados, rápido crescimento e esporulação abundante em BDA. As culturas foram mantidas em meio de BDA, a 25°C, e utilizadas sete dias após a repicagem.

Os fungicidas empregados foram veiculados em acetona 50% + metanol 50% (V/V), nas seguintes dosagens: benomil 50% (metil benzimidazole carbamato) de 0,02 a 50,0 ppm de p.a., triadimefon 25% (1-(4-cloro-feno-xi)-3,3-dimetil-1-(1-H-1,2,4-triazol-1-il)-2-butanon) de 0,62 a 50,0 ppm de p.a., mancozeb 80% (etileno bisditiocarbamato de manganês e zinco) de 0,45 a 62,5 ppm de p.a., e captafol 80% N-(1,1,2,2-tetracloroetil)-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida) de 0,025 a 7,5 ppm de p.a.. Como testemunha, empregou-se uma solução de acetona 50% + metanol 50% (V/V).

Esporos de *T. paradoxa* com sete dias de idade foram misturados com 25 ml de meio de cultura contendo BDA (batata 200 g + dextrose 10 g + água destilada 1 litro), e adicionados em 75 ml de meio contendo BDA (batata 400 g + dextrose 20 g + ágar 10 g + água destilada 1 litro) a $50 \pm 2^\circ\text{C}$, proporcionando uma concentração final de 10^6 esporos/ml.

Método de difusão

Vinte e cinco mililitros de esporos de *T. paradoxa* cultivado em BDA por sete dias na concentração 2×10^6 esporos/ml, veiculado em BDA (batata 200 g + dextrose 10 g + água destilada 1 litro), foram misturados em 75 ml de meio de cultura a $50 \pm 2^\circ\text{C}$, contendo BDA (batata 400 g + dextrose 10 g + água destilada 1 litro) e distribuídos uniformemente em camada de 0,5-1 mm de espessura sobre placas de vidro de (20 x 20 x 0,4 cm), utilizando-se um espalhador de camada. Para facilitar a difusão dos compostos fungitóxicos no meio de cultura foram feitos orifícios de 5 mm de diâmetro sobre o meio de cultura, com o auxílio de um furador de rolha. Em cada orifício foram depositados 50 microlitros de cada concentração de fungicidas, com o auxílio de micropipeta. A avaliação foi feita 36 horas após, determinando-se a área da zona de inibição de *T. paradoxa* nas placas.

Método de bioautografia em camada fina

Os cromatogramas foram preparados utilizando-se 15 g de sílica gel GF 254 em 40 ml de água destilada. Após agitação por 1 min., a pasta formada foi distribuída em placas de vidro de (20 x 20 x 0,4 cm) dispostas num espalha-

dor de camada de 200 mm. Decorridos 5 min., as placas foram colocadas em estufa a 105°C por 30 min., para ativação química da sílica gel. Cinquenta microlitros de cada concentração de fungicidas foram depositados, em pontos espaçados de 4 cm, sobre uma linha traçada na extremidade inferior do cromatograma. A separação cromatográfica foi feita permitindo que o solvente percorresse 13 cm sobre os cromatogramas, dispostos verticalmente em uma cuba de vidro contendo uma camada de 1 cm de acetona. Após a retirada da cuba, as placas eram secadas à temperatura ambiente e em seguida dispostas em espessor de camada de 1 mm, onde foram cobertas com uma camada de meio de cultura contendo esporos de *T. paradoxa*, conforme descrito anteriormente. A avaliação foi feita 36 horas após a deposição do meio com esporos do fungo-teste nos cromatogramas, determinando-se a área de inibição do crescimento de *T. paradoxa* e os respectivos Rf.

Método de bioeletroforese

As placas de vidro de (20 x 20 x 0,4 cm) foram cobertas com meio de cultura e esporos de *T. paradoxa*, como descrito para o método de difusão, com pH ajustado para 7,0. Os orifícios, de 5 mm de diâmetro, foram espaçados em 4 cm numa das extremidades da placa.

Cinquenta microlitros das diferentes concentrações de fungicidas foram depositados nos orifícios sobre o meio de cultura.

As placas foram levadas para um aparelho de eletroforese modelo SAE-2761 (Shandon Southern) contendo tampão fosfato, pH 7,0, 0,1 M, com os orifícios contendo os fungicidas voltados para o polo positivo. Após a passagem de uma corrente elétrica de 80 volts e 18-20 mA por 10-12 horas, os fungicidas com carga elétrica positiva migraram em direção ao polo negativo. A avaliação foi feita 36 horas após a deposição do meio de cultura, medindo-se as áreas de inibição com formato de picos de crescimento de *T. paradoxa* nas placas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As zonas de inibição do crescimento de *T. paradoxa* obtidas pelos diferentes bioensaios acham-se exemplificados com o benomil nas Fig. 1, 2 e 3. Observa-se que a inibição do crescimento de *T. paradoxa* aparece como manchas ou picos claros, contra um fundo escuro do próprio crescimento micelial do fungo.

Os resultados mostram que houve uma relação linear entre a zona de inibição do crescimento do fungo-teste e o logaritmo da concentração dos produtos químicos (Fig. 4, 5, 6 e 7), como encontrado por outros pesquisadores (Lazarovitis et al. 1982, Peterson & Edgington 1969). A concentra-

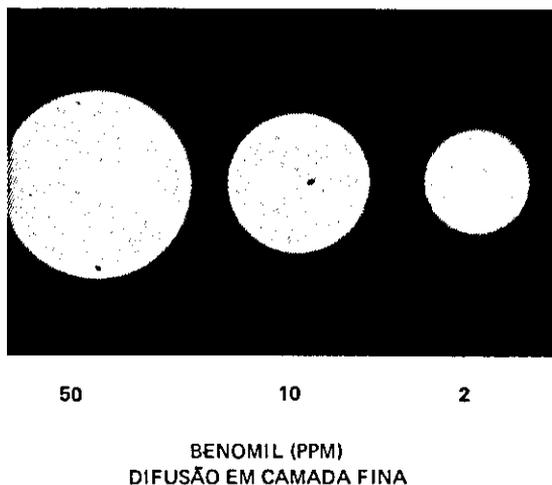


FIG. 1. Difusão em camada fina de concentrações crescentes de benomil com *Thielaviopsis paradoxa* como organismo-teste.

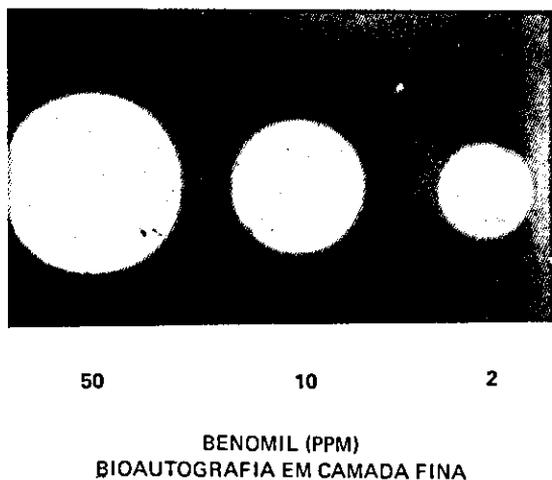


FIG. 2. Bioautografia em camada fina de concentrações crescentes de benomil com *Thielaviopsis paradoxa* como organismo-teste.

ção mínima de benomil detectado nos três bioensaios foi 0,04 ppm de p.a. embora na concentração de 0,02 ppm já houvesse ocorrido o início de formação da zona de inibição do crescimento do fungo-teste. Peterson & Edgington (1969) também detectaram concentrações de benomil menor que 0,05 μ g utilizando o método de bioautografia.

Para triadimefon, mancozeb e captafol, a con-

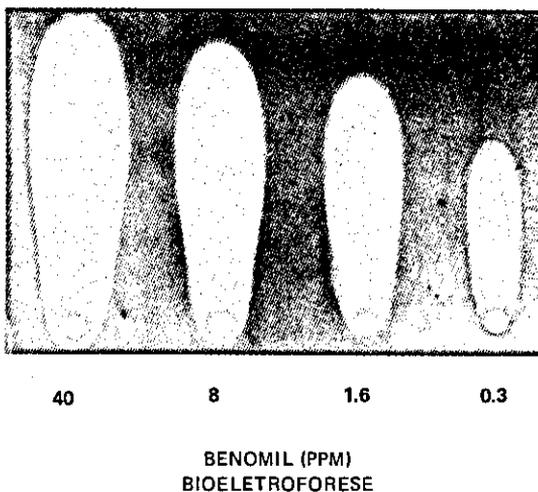


FIG. 3. Bioeletroforese de concentrações crescentes de benomil com *Thielaviopsis paradoxa* como organismo-teste.

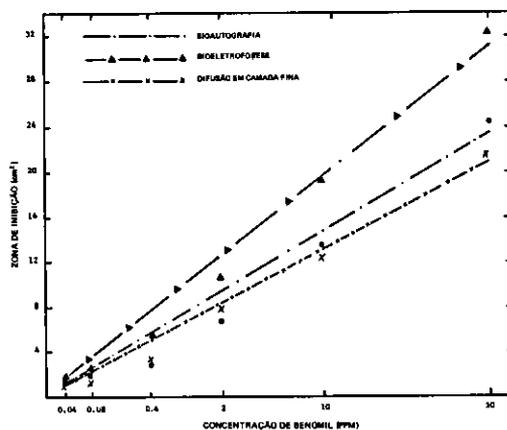


FIG. 4. Relação semilogarítmica entre a área da zona de inibição do crescimento de *Thielaviopsis paradoxa* e a concentração de benomil aplicada.

centração mínima detectada nos três métodos foi de 1,25, 1,90 e 0,06 ppm, respectivamente, embora uma ligeira inibição do crescimento do fungo-teste tenha sido obtida na concentração de 0,95 ppm de mancozeb.

O método de bioeletroforese produziu maior área de inibição do fungo-teste em altas concentrações dos fungicidas, seguido pelo método de

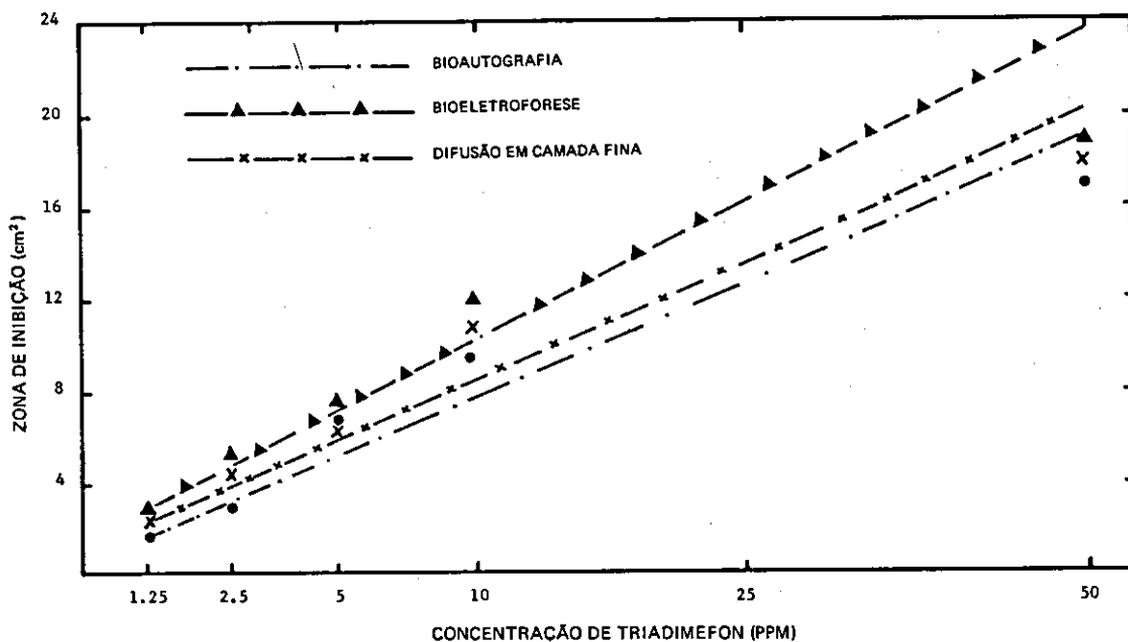


FIG. 5. Relação semilogarítmica entre a área da zona de inibição do crescimento de *Thielaviopsis paradoxa* e a concentração de triadimefon aplicada.

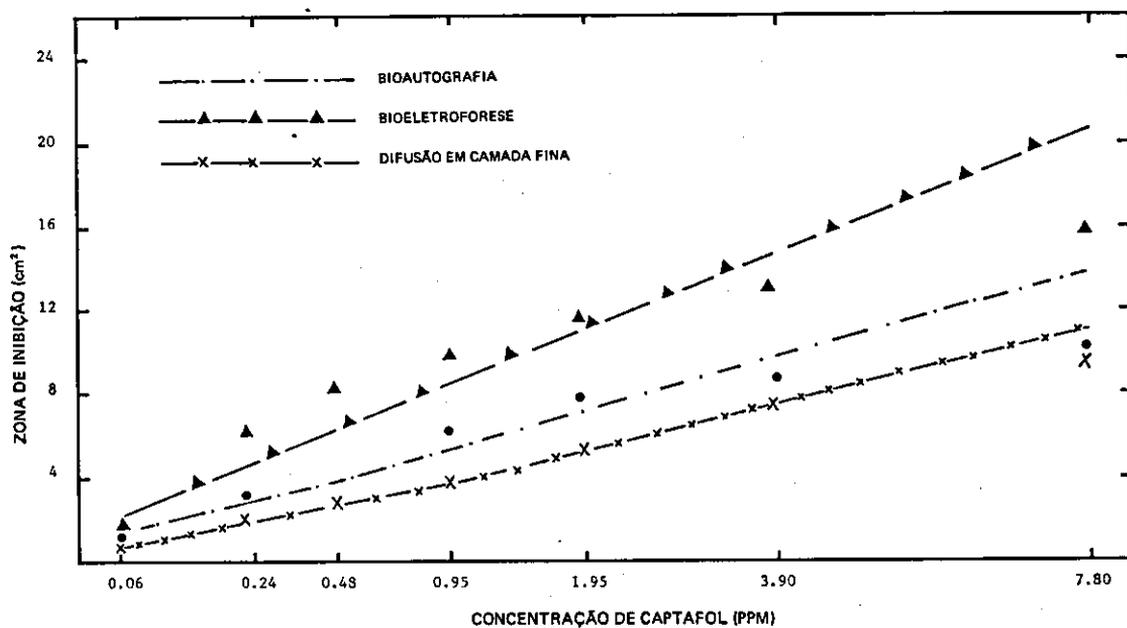


FIG. 6. Relação semilogarítmica entre a área da zona de inibição do crescimento de *Thielaviopsis paradoxa* e a concentração de captafol aplicada.

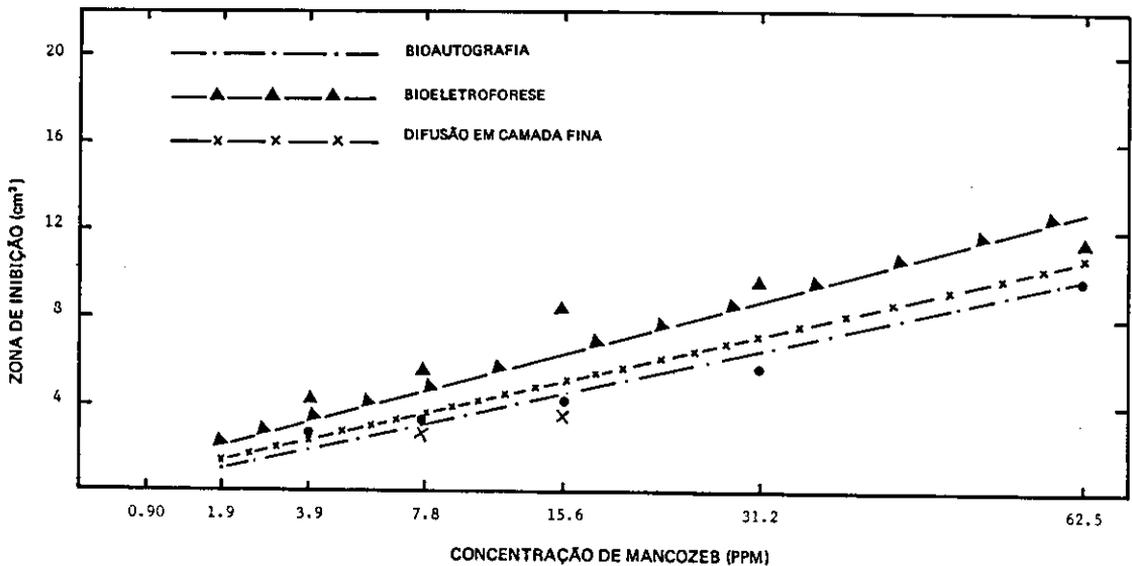


FIG. 7. Relação semilogarítmica entre a área da zona de inibição do crescimento de *Thialaviopsis paradoxa* e a concentração da mancozeb aplicada.

bioautografia e de difusão em camada fina. Isto talvez possa ser explicado pelo fato de o fungicida, ao ser arrastado pela corrente elétrica na bioeletroforese, inibir a germinação do fungo-teste no percurso. No método de bioautografia o fungo-teste é semeado após a deposição do fungicida nos cromatogramas.

Estas técnicas podem ser utilizadas para estudo de absorção, translocação e degradação de fungicidas sistêmicos, e também para detecção de resíduos de fungicidas sistêmicos e protetores em tecidos de plantas (Cid 1980, Junqueira 1982, Junqueira et al. 1982, Kirpatrick & Sinclair 1973). Poderão também ser utilizados para avaliar a sensibilidade de microrganismos a fungicidas "in vitro" com vistas a uma seleção preliminar antes de serem ensaiados em condições de campo.

Estes bioensaios poderão ser de grande valia para detecção de fitoalexinas e toxinas em tecidos vegetais (Lazarovits et al. 1982).

Os bioensaios descritos podem ser adaptados também para detecções quantitativas de resíduos de produtos químicos, desde que se ajuste uma curva-padrão em que os dados sejam consistentes

nas diversas repetições do ensaio, com fungicida conhecido.

Todos os testes realizados foram repetidos no mínimo cinco vezes, obtendo-se resultados semelhantes.

Nos testes de bioautografia, observaram-se diferentes valores de R_f nos cromatogramas para os fungicidas utilizados. Obteve-se apenas uma mancha de inibição do crescimento do fungo-teste para cada produto químico, o que demonstra não ter havido degradação dos fungicidas.

As técnicas descritas permitem o uso de qualquer organismo, desde que seja sensível aos produtos químicos empregados.

CONCLUSÕES

1. A concentração mínima do produto químico detectada não variou com as diferentes técnicas empregadas.
2. A concentração mínima detectada pelos diferentes bioensaios variou com os fungicidas empregados.
3. As maiores zonas de inibição foram obtidas

empregando-se a técnica de bioeletroforese, nas concentrações mais altas do fungicida.

4. Não se observou degradação dos fungicidas.

5. As concentrações mínimas detectadas de benomil, captafol, triadimefon e mancozeb foram de 0,04, 0,06, 1,25, 1,90 ppm, respectivamente.

6. A técnica de difusão em camada fina constitui um método simples e rápido, não necessitando de equipamentos caros, podendo ser utilizado com grande eficiência na detecção e avaliação de produtos químicos em tecidos vegetais.

REFERÊNCIAS

- CID, L.P.B. Detecção dos fungicidas metil-tiofanato, benomyl e triadimefon em extratos de folhas de seringueira. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 15(4): 441-6, 1980.
- DEKHUIJZEN, H.M. The systemic action of dimethyldithiocarbamates on cucumber scab caused by *Cladosporium cucumerinum* and the conversion of these compounds by plants. *Neth. J. Plant Pathol.*, 70: 75, 1964. Suppl. 2.
- HOMANS, A.L. & FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatogr.*, 51:327-9, 1970.
- JUNQUEIRA, N.T.V. Controle químico da ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi* Sid.) da soja. Viçosa, MG, UFV, 1982. 69p. Tese Mestrado.
- JUNQUEIRA, N.T.V.; CHAVES, G.M.; ZAMBOLIM, L. & CARVALHO, M.G. Detecção de resíduos de fungicidas sistêmicos em tecidos de soja por meio de bioautografia e mediante bioensaio com *Phakopsora pachyrhizi*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 15, São Paulo, 1982. Resumos . . . São Paulo, Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1982. p.103.
- KIRPATRICK, B.L. & SINCLAIR, J.B. Uptake of two systemic fungicides and their breakdown products by soybean seeds. *Phytopathology*, 63:1532-5, 1973.
- LAZAROVITS, G.; BRAMMALL, R.A. & WARD, E.W. B. Bioassay of fungitoxic compounds on thin-layer chromatograms with *Pythium* and *Phytophthora* species. *Phytopathology*, 72:61-3, 1982.
- PETERSON, C.A. & EDGINGTON, L.V. Quantitative estimation of the benomyl using a bioautograph technique. *J. Agr. Food Chem.*, 17: 898-9, 1969.