



## **AÇÃO ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. (ALECRIM) EM *Fusarium graminearum***

Alessandra Cardoso Celestino (PIBIC/CNPq-UEM), Isis Nunes Amalfi (PIBIC/CNPq-UEM), Jéssica Cristina Zoratto Romoli (PIBIC/CNPq-UEM), Natália da Silva Bomfim, Simone Aparecida Galerani Mossini, Miguel Machinski Junior (Orientador), email: mmjunior@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Ciências Básicas da Saúde

### **Farmácia (4.03.00.00-5) e Análise Toxicológica (4.03.03.00-4)**

**Palavras-chave:** ação antifúngica, óleo essencial, *Fusarium graminearum*.

### **Resumo**

Os fungos toxigênicos, produtores de micotoxinas, são grandes contaminantes de produtos alimentícios, causam significativa perda econômica e danos a saúde humana e animal. O presente trabalho propôs avaliar a ação antifúngica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) em *Fusarium graminearum*. O efeito do óleo essencial de alecrim (OEA) sobre a inibição do desenvolvimento micelial do *F. graminearum* foi avaliado nas concentrações de 70 a 1250 µg/ml para a cepa 5D e 40 a 600 µg/ml para cepa 9D, ambas em meio BDA pH 4 e incubadas em estufa BOD a 25°C por 15 dias. A inibição micelial foi significativa ( $p < 0,05$ ) desde as menores concentrações de óleo essencial para a cepa 5D, já para cepa 9D a inibição micelial foi significativa ( $p < 0,05$ ) apenas em 600 µg/ml do OEA. A Microscopia Eletrônica de Varredura revelou que com o aumento da concentração do OEA houve redução na quantidade de macro e microconídios, que se apresentaram finos e enrugados, devido a redução de conteúdo citoplasmático. Os resultados mostraram que o OEA foi capaz de inibir o desenvolvimento micelial do *F. graminearum* por lesar a parede celular e causar o extravasamento do conteúdo citoplasmático.

### **Introdução**

O óleo essencial de alecrim (OEA) é constituído por hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres terpênicos, linalol, 1,8-cineol, cânfora, terpineol, 3-octanona e acetato de isobornila (ALONSO JR, 1998), dentre outros compostos que agem normalmente na membrana citoplasmática dos micro-



organismos. Sendo o OEA um fungicida natural, este tem apresentado atividade inibitória no crescimento micelial de muitas espécies de fungos.

As micotoxinas são metabólitos secundários que ocorrem naturalmente, sendo produzidas principalmente por fungos filamentosos, tais como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (IQBAL et al., 2014). Do gênero *Fusarium* destaca-se o complexo *Fusarium graminearum*, este é produtor de micotoxinas, tais como: a zearalenona, encontrada no milho (HAUSCHILD et al., 2007) e possui atividade estrogênica; o Nivalenol (NIV) e o desoxinivalenol (DON), que possuem atividade citotóxica. Essas micotoxinas apresentam também atividade teratogênica, neurotóxica e imunossupressora. Este trabalho avaliou a ação do OEA em duas cepas de *F. graminearum*.

## Materiais e métodos

O OEA foi obtido das folhas secas de *R. officinalis* pelo método de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger.

As cepas (5D e 9D) do fungo *F. graminearium* foram obtidas do banco de isolados do Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá. As cepas foram mantidas em estoque de sílica, acondicionadas em refrigerador a 4°C. Foram feitos cultivos das cepas em meio SNA (Spezieller Nährstoffarmer Ágar). Os tubos foram incubados em estufa BOD (FANEM Modelo 347G) a 27 °C, na presença de luz negra, por 15 dias. Foi realizada a contagem de conídios através de microscópio óptico para a diluição.

A concentração inibitória mínima (CIM) do OEA foi realizada pelo método de microdiluição em caldo conforme a NCCLS-M38-A. Para determinação da concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial, foram retiradas amostras dos poços que não apresentaram crescimento fúngico visível, e estas, reinoculadas em placas contendo Ágar Sabouraud e incubadas a 25°C por 24 h.

Para avaliar o poder inibitório do OEA foram usadas placas de Petri contendo meio BDA pH 4 (acidificado com HCl), juntamente com o OEA nas concentrações de 70 a 1250 µg/ml e de 40 a 600 µg/ml para as cepas 5D e 9D, respectivamente. Foi adicionado o inóculo e incubado em estufa BOD (FANEM Modelo 347G) a 25°C por 15 dias. Posteriormente, os halos de inibição foram medidos em centímetros tomando-se a média dos diâmetros (n=4) e obteve-se a porcentagem de inibição através da fórmula:  $Dc - Dt/Dc \times 100$ .

Para análise morfológica do fungo foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando o meio SNA, com concentrações do OEA de 150 a 600 µg/ml para a cepa 5D e 10 a 300 µg/ml para a 9D. As amostras foram pré-fixadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (EM Sciences, Philadelphia, PA, EUA) e glutaraldeído 2,5% (Sigma Chemical, St Louis, MO,



EUA) (9:1, v/v.) e preparadas de acordo com a técnica descrita por Endo et al. (2010). Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.), através da análise de variância (ANOVA). Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, e as diferenças foram consideradas significativas em valores de  $p < 0,05$ .

## Resultados e Discussão

O efeito do OEA produziu valores médios de inibições no desenvolvimento micelial de *F. graminearum* que variaram de 12,66 a 65,15% para a cepa 5D e 2,3 a 36,9 % para a cepa 9D, conforme a Figura 1. A eficácia do tratamento foi linear conforme o aumento da concentração. Estes resultados condizem com as alterações observadas por Daferera et al. (2003), estes verificaram inibição de 72 % do crescimento radial de *Fusarium* sp, ao tratá-lo com 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

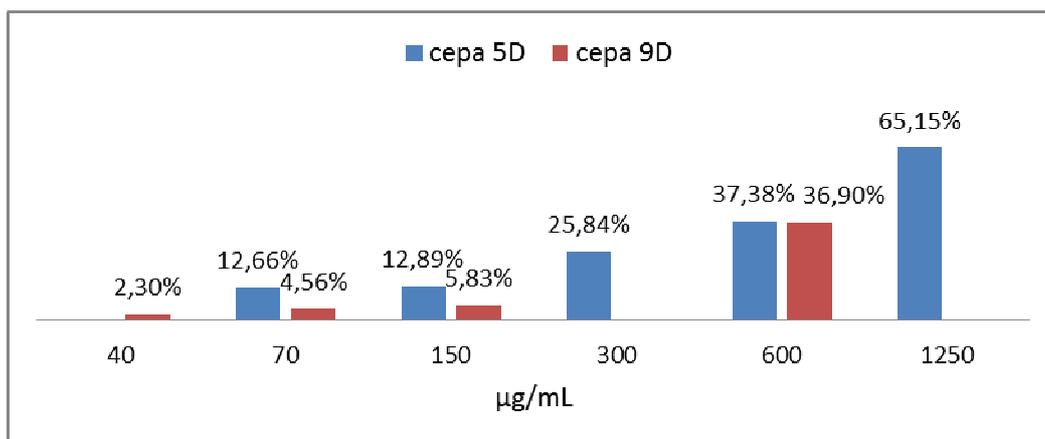


Figura 1. Efeito inibitório (% de inibição) em *F. graminearum* pela ação do óleo essencial de alecrim nas concentrações de 40 a 600  $\mu\text{g/ml}$  para cepa 9D e 70 a 1250  $\mu\text{g/ml}$  para cepa 5D.

A ação do OEA sobre a cepa 5D apresentou diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) em todas as concentrações testadas. Já sobre a cepa 9D o OEA apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas em 600  $\mu\text{g/mL}$ .

Na análise morfológica o OEA promoveu redução na quantidade de macroconídios e microconídios para ambas as cepas. Os macros, microconídios e hifas apresentaram-se finos e enrugados, devido à redução de conteúdo citoplasmático pela ruptura da estrutura da parede celular pelos componentes do OEA.



## Conclusões

O estudo em questão demonstrou que o OEA foi capaz de inibir o fungo *F. graminearum* “in vitro”. Diante do exposto, conclui-se que o óleo essencial de alecrim pode ser utilizado para o controle alternativo de fungos na colheita e/ou no armazenamento de grãos. No entanto, estudos futuros são requeridos para a avaliação de uma possível fungitoxicidade “in vivo”.

## Agradecimentos

Agradeço a fundação Araucária, por ter possibilitado e financiado esta pesquisa.

## Referências

ALONSO JUNIOR, R. Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: **Isis Ediciones. SRL**, p. 1039, 1998

DAFERERA, D. J., ZIOGAS, B. N., POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, p. 39–44, 2003

ENDO, E. H., CORTEZ, D. A. G., UEDA-NAKAMURA, T., NAKAMURA, C. V., & DIAS-FILHO, B. P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 534-540, 2010.

HAUSCHILD, L.; LOVATTO, P. A.; LEHNEN, C. L.; CARVALHO, A. A.; GARCIA, G. G.; MALLMANN. Digestibilidade e metabolismo de dietas de suínos contendo zearalenona com adição de organoaluminossilicato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 219-224, 2007.

IQBAL, S. Z.; RABBANI, T.; ASI, M. R.; JINAPI, S. Assessment of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals. **Food Chemistry**, v. 157, p. 257–262, 2014.