



POTENCIAL DE AÇÃO FUNGICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus vulgaris* L. (TOMILHO) SOBRE O FUNGO *Fusarium graminearum*

Jéssica Cristina Zoratto Romoli (PIBIC/CNPq-UEM), Isis Nunes Amalfi (PIBIC/CNPq-UEM), Alessandra Cardoso Celestino (PIBIC/CNPq/UEM), Cássia Yumie Kohiyama, Lydiana Pollis Nakasugi, Simone Aparecida Galerani Mossini, Miguel Machinski Junior(Orientador), e-mail: mmjunior@uem.br

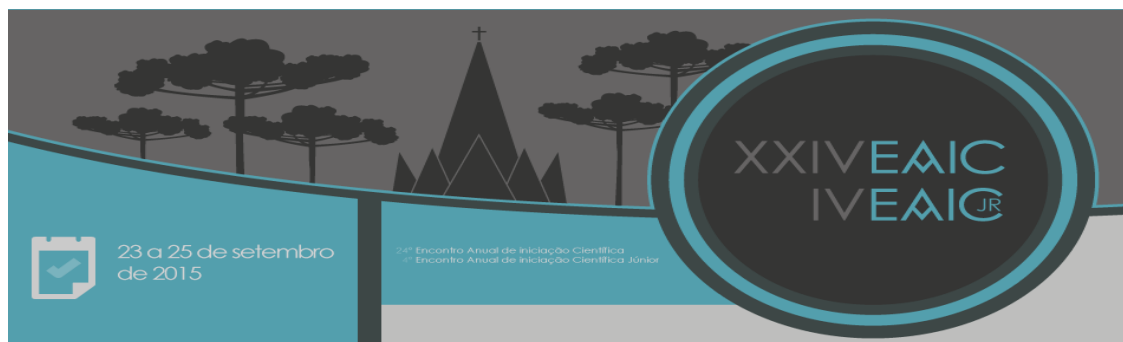
Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Ciências Básicas da Saúde.

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

Palavras-chave: fungicida natural, desenvolvimento micelial, fungo toxigênico

Resumo:

O fitopatógeno *Fusarium graminearum* apresenta relevante importância nas culturas do milho, trigo, cevada, por causar doenças diversas: podridão radicular de espiga e de colmo, levando a reduções na qualidade desses grãos. O complexo *Fusarium graminearum* é produtor de metabólitos secundários, como os tricotecenos e a zearalenona. O desoxinivalenol (DON), um tricoteceno, apresenta um efeito citotóxico, com inibição da síntese de proteínas, irritação da pele, hemorragia, diarreia, náuseas e vômitos; sendo de grande preocupação para saúde humana e animal. Óleos essenciais obtidos por destilação das partes que compõem as plantas podem ser uma possibilidade para inativação de fungos contaminantes de alimentos e também, ser uma forma sustentável de combate aos mesmos. Com base no exposto, o presente estudo propôs avaliar o potencial de ação fungicida do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. sobre o fungo *Fusarium graminearum*. O fungo foi cultivado em meio BDA ácido com concentrações do óleo essencial de tomilho de 10 a 150 µg/ml e as placas incubadas em estufa BOD a 25°C por 15 dias, sendo os halos de inibição medidos em centímetros. O potencial de ação inibitório do OET frente ao desenvolvimento micelial das cepas 5D e 9D foi significativo ($p < 0,05$), pois com o aumento da concentração do óleo essencial, houve uma maior inibição do crescimento fúngico. Conclui-se que o óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. possui, de fato, ação antifúngica sobre o *Fusarium graminearum*.



Introdução

O *Fusarium graminearum* apresenta relevante importância nas culturas de grãos (milho, trigo) por causar doenças como a giberela, que leva a redução da produtividade desses grãos em todo o mundo. As principais micotoxinas produzidas pelo *F. graminearum* são os tricotecenos, entre eles o mais estudado é o desoxinivalenol (DON), e a zearalenona (ZEN). O DON apresenta um efeito citotóxico e causa inibição da síntese de proteínas, irritação da pele, hemorragia, diarreia, náuseas e vômitos, sendo de grande preocupação para saúde humana e animal.

Óleos essenciais obtidos por destilação contêm uma mistura de compostos como: terpenos, alcoóis, fenóis, aldeídos e ésteres. No óleo essencial de tomilho são encontrados: monoterpenos, sesquiterpenos, alcoóis alifáticos, aldeídos alifáticos e flavonóides, que agem normalmente na membrana citoplasmática dos micro-organismos. O presente estudo visou avaliar o potencial de ação fungicida do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. (OET) sobre o *Fusarium graminearum* “in vitro”.

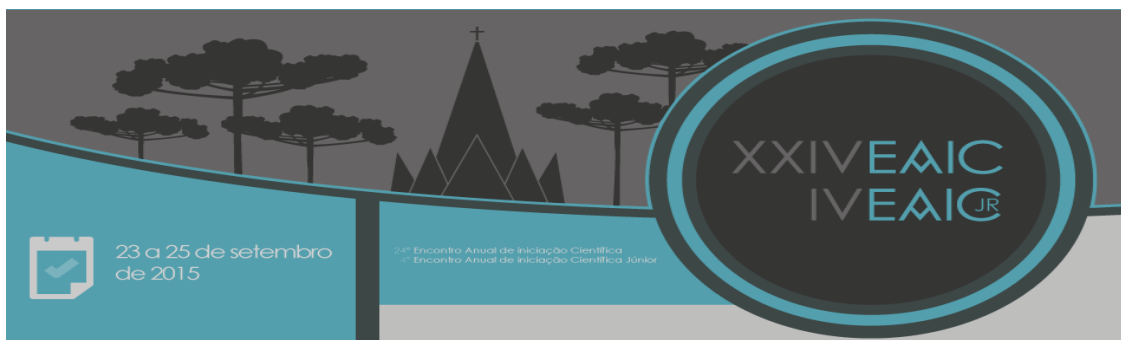
Materiais e métodos

O OET foi obtido de folhas secas pelo método de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger. A avaliação dos componentes do OET foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS).

As cepas do fungo *Fusarium graminearum* (5D e 9D) foram obtidas do banco de isolados do Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Para a produção de conídios, os fungos foram cultivados em meio de cultura SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar ou meio nutritivo sintético agarizado) por 15 dias, a 25°C, com luz negra em estufa BOD (FANEM Modelo 347G) (SAMPIETRO et al. 2013).

A concentração inibitória mínima (CIM) do OET foi avaliada 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, sendo a menor concentração de OET que inibiu o crescimento fúngico.

Os fungos foram cultivados na presença (testes) e ausência (controle) do óleo de tomilho. Os meios-testes foram preparados de modo a conter as concentrações de 10 a 150 µg/ml de óleo essencial de tomilho (abaixo e acima da CIM) e inóculos do *F. graminearum* foram adicionados a esses meios (testes e controle).



As placas foram incubadas em estufa BOD a 25°C por 15 dias, sendo os halos de inibição medidos em centímetros. A porcentagem de inibição foi obtida através da fórmula de Albuquerque et al. (2006) modificada por Tian et al. (2011):

$$\frac{(Dc - Dt)}{Dc} \times 100$$
, em que: **Dc** = diâmetro do controle e **Dt** = diâmetro do tratamento.

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e foram analisados utilizando teste T de Student quando duas médias forem comparadas; ou análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.

Resultados e Discussão

Os principais componentes do OET analisado foram: borneol (40,6%), α -terpinol (19,9%) e canfeno (12,3%). Além disso, realizou-se a CIM, obtendo-se o resultado de 40 μ g/ml. O mesmo foi confirmado na realização da CFM. O potencial de ação inibitório do OET frente ao desenvolvimento micelial das cepas 5D e 9D foi demonstrado nas figuras 1 e 2, em que é possível observar uma crescente porcentagem de inibição à medida em que se aumenta as concentrações do óleo essencial.

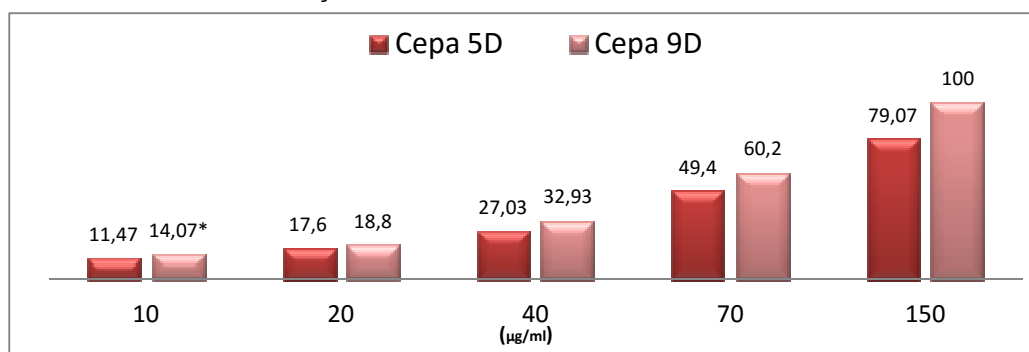


Figura 1. Efeito inibitório (% de inibição) no desenvolvimento micelial do *Fusarium graminearum* pela ação do óleo essencial de tomilho nas concentrações de 10 a 150 μ g/ml. *sem diferença significativa quando comparada ao controle positivo.

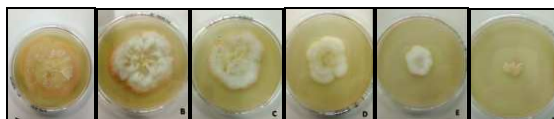
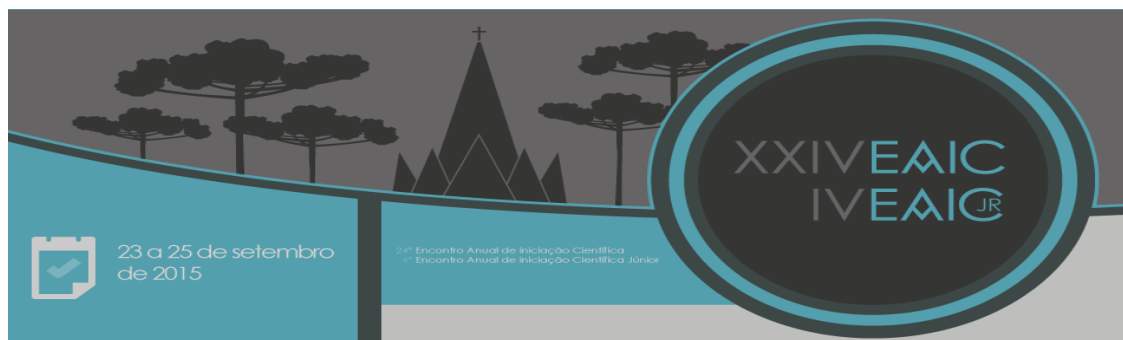


Figura 2. Efeito inibitório (% de inibição) no desenvolvimento micelial do *Fusarium graminearum* (cepa 5D) pela ação do óleo essencial de tomilho nas concentrações de 10 a 150 μ g/ml (em ordem crescente de concentrações, segundo a primeira foto, o C+).



Conforme observado na figura 1, a cepa 9D foi mais susceptível à ação inibitória do OET, devido as maiores porcentagens de inibição quando comparada com a cepa 5D. No entanto, na concentração de 10 µg/ml de OET não houve diferença significativa na ação inibitória quando comparada com o controle positivo, sendo este livre da adição do OET.

Zabka et al. (2009) elucidou o efeito inibitório do óleo essencial de tomilho na concentração de 1 µl/ml, porém com o *F. verticillioides*, em que houve inibição de 98,2% de desenvolvimento micelial, comprovando também o que foi visto durante esse experimento.

Conclusões

O presente estudo demonstrou que o óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. possui, de fato, ação fungicida sobre o fungo toxigênico *Fusarium graminearum* “in vitro”.

Nesse sentido, ressalta-se que pesquisas futuras deverão ser realizadas “in vivo” para que a utilização do OET torne uma alternativa viável, sustentável e segura, no controle de fungos toxigênicos que destroem plantações de grãos, prejudicando produtores e consumidores. Além disso, estudos para elucidar o comportamento dessas espécies de fungos mediante fungicidas naturais tornam-se, cada vez mais necessárias, contribuindo dessa forma com a segurança alimentar.

Referências

ALBUQUERQUE, C.C.; CAMARA, T.R.; MARIANO, R.L.R.; WILLADINO, L.; MARCELINO, C.; ULISSES C. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 49, p. 527-535, 2006.

SAMPIETRO, D.A.; APUD, G.R.; BELIZÁN, M.M.E.; VATTUONE, M.A.; CATALÁN, C.A.N. Toxigenic potential of *Fusarium graminearum* isolated from maize of northwest Argentina. **Braz. J. Microbiol.**, v. 2, p. 417-422, 2013.

TIAN, J.; BAN, X.; ZENG, H.; HUANG, B.; HE, J.; WANG, Y. *In vitro* and *in vivo* activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. **Food Control**, v. 22, p. 1992-1999, 2011.

ZABKA M., PAVELA R., SLEZAKOVA L. Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. **Ind. Crop. Products**, v. 30, p. 250–253, 2009.