

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO (*Thymus vulgaris* L.) SOBRE A PRODUÇÃO DE TOXINA PELO FUNGO *Fusarium graminearum*

Nairana Mithieli de Queiroz Eskuarek (PIBIC/FA-Uem), Natana Souza Zampieri (PIBIC/FA-Uem), Jéssica Cristina Zoratto Romoli, Giseli Cristina Pante, Miguel Machinski Junior, Simone Aparecida Galerani Mossini (Orientadora), e-mail: simonegmossini@gmail.com
Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Ciências Básicas da Saúde / Maringá, PR.

Área e subárea: Ciências da Saúde / Farmácia / Toxicologia

Palavras-chave: micotoxina, óleo essencial, ação fungicida.

Resumo

Fusarium graminearum é produtor de metabólitos secundários, como zearalenona (ZEA) e desoxinivalenol (DON), micotoxinas tóxicas para seres humanos e animais. Óleos essenciais obtidos de algumas plantas como o tomilho (*Thymus vulgaris* L.), possuem ação fungicida sobre fungos toxigênicos. Este trabalho propôs avaliar o potencial de ação fungicida do óleo essencial de tomilho (OET) sobre o fungo *F. graminearum*. O OET foi avaliado nas concentrações de 0,038 a 4,8 µg/mL. O fungo foi cultivado na presença e ausência (controle fúngico) do OET no meio YES, em BOD a 25 °C, durante 15 dias, sob luz negra. O potencial de ação inibitório do OET sobre a produção de ZEA e DON foi significativo ($p < 0,05$) na concentração de 0,30 µg/mL (51,62% de inibição) e 0,038 µg/mL (80,47% de inibição), respectivamente, alcançando 100% de inibição para as outras concentrações testadas. Conclui-se que o óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. possui, de fato, ação antimicotoxigênica sobre o *F. graminearum*.

Introdução

Micotoxinas são metabólitos secundários, produzidos por fungos filamentosos, prejudiciais aos seres humanos e animais (SEBAEI et al., 2012). O fungo *Fusarium graminearum* é capaz de produzir as micotoxinas desoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA). DON pertence ao grupo dos tricotecenos, uma classe com mais de sessenta metabólitos (BENNETT & KLICH, 2003). A ingestão de alimentos contaminados pode causar intoxicação aguda em animais, como vômitos, náuseas, diarreia, redução no ganho de peso e na absorção de nutrientes pelas células intestinais, além de apresentar atividade teratogênica, neurotóxica e imunossupressora (TURNER et al., 2012). ZEA é descrita como uma lactona do ácido fenólico resorcílico e apresenta atividade estrogênica por apresentar estrutura semelhante ao 17-β-estradiol, hormônio produzido pelo ovário humano (SIROT; FREMY; LEBLANC, 2013).

O tomilho (*Thymus vulgaris* L.) pertence à família Lamiaceae que compreende 150 gêneros com cerca de 2800 espécies distribuídas em todo o mundo (PORTE; GODOY, 2001). Seu óleo essencial possui atividades antimicrobianas, atribuídas aos componentes fenólicos do óleo.

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial de ação fungicida do OET sobre o fungo toxigênico *F. graminearum*.

Materiais e métodos

O OET foi extraído de folhas secas de tomilho pelo processo de hidrodestilação, utilizando o aparelho Clevenger. A caracterização da composição química do OET foi obtida por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

O fungo *F. graminearum* (cepa 8D) foi obtido do banco de isolados do Laboratório de Toxicologia/UEM. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OET foi determinada segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* M38-A (CLSI, 2002), com modificações. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi obtida em placa com meio Sabouraud, incubada a 25 °C/24h, com luz negra. O isolado foi cultivado na presença e ausência (controle fúngico) do OET em meio YES. Os meios testes foram preparados de modo a conter OET em 2 concentrações abaixo da CFM, na CFM e 2 acima da CFM, variando de 0,038 a 4,8 µg/mL, em quadruplicata.

Para a extração das micotoxinas foi utilizada a metodologia de Sorensen e Sondergaard (2014). A determinação de ZEA foi obtida por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência, utilizando um comprimento de onda de excitação e emissão de 270 e 455 nm, respectivamente. Na determinação de DON foi utilizado o mesmo cromatógrafo líquido, porém acoplado ao detector de UV/Vis, com comprimento de onda de 220 nm. O tempo de corrida foi o mesmo para as duas micotoxinas (15 minutos). A identificação foi efetuada com base no tempo de retenção comparado ao padrão e a quantificação foi realizada por padronização externa.

Os resultados obtidos foram expressos como média ± desvio padrão e analisados utilizando análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey para múltiplas comparações, com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.

Resultados e Discussão

Os principais componentes do OET identificados foram: borneol (40,6%), α -terpinol (19,9%) e canfeno (12,3%) (KOHYAMA et al., 2013). O potencial de ação inibitório do OET sobre a produção de ZEA e DON foi significativo ($p < 0,05$), quando comparado ao controle fúngico. Para ZEA a inibição ocorreu a partir da concentração de 0,30 µg/mL (51,62% de inibição) e para DON 0,038 µg/mL (80,47% de inibição), respectivamente, alcançando 100% de inibição para DON nas demais concentrações testadas, conforme evidencia a Tabela 1.

Tabela 1. Efeito do OET na produção de ZEA e DON, *in vitro*.

OET ($\mu\text{g/mL}$)	Zearalenona		Desoxinivalenol	
	Concentração ($\mu\text{g/mL}$) ^c	Inibição (%)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$) ^c	Inibição (%)
CF ^d	2,950 \pm 0,5977	0	28,320 \pm 4,841	0
0,038	NR		5,530 \pm 0,050 ^a	80,47
0,075	NR		0,0 \pm 0,0 ^a	100
0,15	NR		0,0 \pm 0,0 ^a	100
0,30	1,427 \pm 0,01528 ^{a,b}	51,62	0,0 \pm 0,0 ^a	100
0,60	1,663 \pm 0,01528 ^{a,b}	43,62	0,0 \pm 0,0 ^a	100
1,20	1,820 \pm 0,01000 ^{a,b}	38,30	0,0 \pm 0,0 ^a	100
2,40	1,620 \pm 0,02000 ^{a,b}	45,08	0,0 \pm 0,0 ^a	100
4,80	1,307 \pm 0,01528 ^{a,b}	55,69	0,0 \pm 0,0 ^a	100

^a Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao Controle Fúngico. ^b Sem diferença estatística significativa ($p < 0,05$). ^c Valores obtidos por análise em HPLC expressos em média \pm desvio padrão. ^d Controle Fúngico (inóculo livre da adição do óleo essencial). NR (Não Realizado).

Nas Figuras 1 e 2, observa-se os cromatogramas dos testes para as micotoxinas DON e ZEA, que comprovam os resultados da Tabela 1.

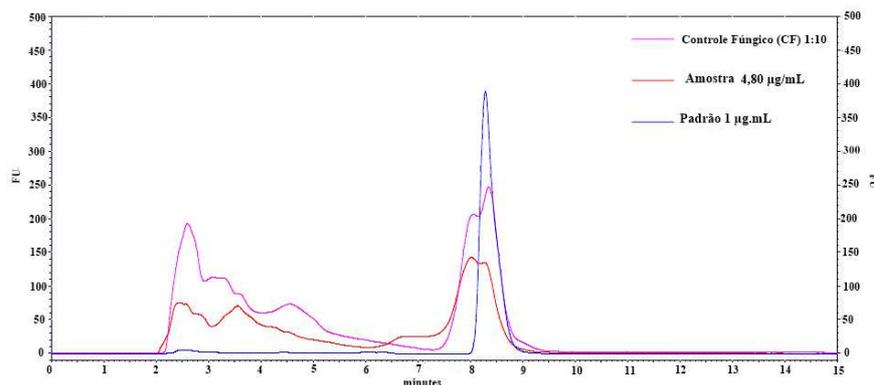


Figura 1: Cromatograma do controle fúngico, amostra com OET na concentração de 4,80 $\mu\text{g/mL}$ e padrão na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ para a micotoxina ZEA

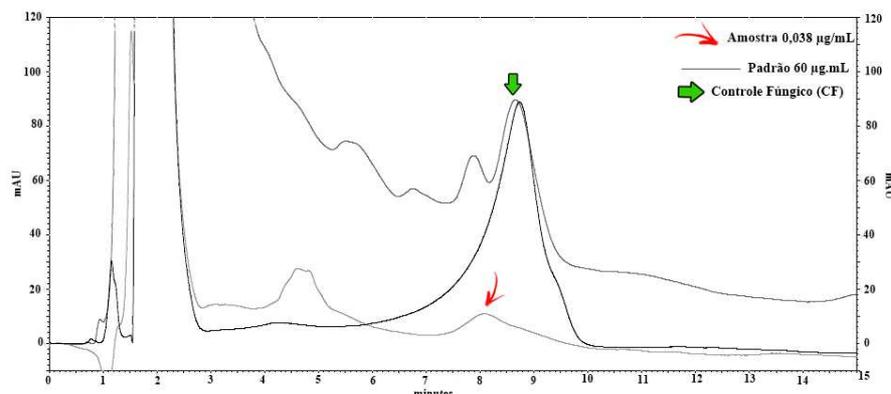


Figura 2: Cromatograma do controle fúngico, amostra com OET na concentração de 0,038 $\mu\text{g/mL}$ e padrão na concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$ para a micotoxina DON

Conclusões

O trabalho realizado demonstrou que o óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. possui ação fungicida sobre o fungo toxigênico *F. graminearum*, *in vitro*, promovendo inibição da produção das micotoxinas ZEA e DON.

Agradecimentos

PIBIC/CNPq-FA-UEM

Referências

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2002. **Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi**. NCCLS document M38-A. Wayne, PA, USA.

TURNER, P. C. *et al.* The role of biomarkers in evaluating human health concerns from fungal contaminants in food. **Nutrition Research Reviews**, v. 25, p. 162-179, 2012.

KOHIYAMA, C. Y. *et al.* Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1006-1010, 2013.

PORTE, A., GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades Antimicrobiana e Química do Óleo Essencial. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 193-210, jul./dez., 2001.

SEBAEI, A. S. *et al.* Simple validated method for determination of deoxynivalenol and zearalenone in some cereals using high performance liquid chromatography. **American Journal of Food Technology**, v. 7, n. 11, p. 668-678, 2012.

SIROT, V.; FREMY, J. M.; LEBLANC, J. C. Dietary exposure to mycotoxins and health risk assessment in the second French total diet study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 1-11, 2013.

SORENSEN, J. L.; SONDERGAARD, T. E. The effects of different yeast extracts on secondary metabolite production in *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 170, p. 55-60, 2014.