

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM (*ROSMARINUS OFFICINALIS*) SOBRE A PRODUÇÃO DE TRICOTECENOS PELO FUNGO *FUSARIUM GRAMINEARUM*

Erika Xavier dos Santos (PIBIC-AFIS/FA/UEM), Nairana Mithieli de Queiroz Eskuarek, Jéssica Cristina Zoratto Romoli, Giseli Cristina Pante, Miguel Machinski Junior, Simone Aparecida Galerani Mossini (Orientador), e-mail: sagmossini@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea: Ciências da Saúde / Farmácia / Toxicologia

Palavras-chave: tricotecenos, óleo essencial, antifúngico.

Resumo

Fusarium graminearum é produtor de metabólitos secundários, como desoxinivalenol (DON), micotoxina tóxica para seres humanos e animais. Óleos essenciais obtidos de algumas plantas como o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) possuem ação fungicida sobre fungos toxigênicos. Este trabalho propôs avaliar o efeito inibitório do óleo essencial do alecrim, frente à produção de tricotecenos pelo *F. graminearum*. O óleo essencial de alecrim foi avaliado nas concentrações de 1,25 a 150 µg/mL. O fungo foi cultivado na presença e ausência do óleo essencial no meio YES, a 25 °C, durante 15 dias, sob luz negra. O potencial de ação inibitório do óleo essencial de alecrim sobre a produção de DON foi significativo ($p < 0,05$) na concentração de 1,25 µg/mL (87,66% de inibição), alcançando 100% de inibição para as outras concentrações testadas. Conclui-se que o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L., possui, de fato, ação antimicotoxigênica sobre o fungo *F. graminearum*.

Introdução

O fungo filamentosso *Fusarium graminearum* é produtor de metabólitos secundários tóxicos, denominados tricotecenos, moléculas de baixo peso molecular que contaminam grãos na fase agrícola ou durante o armazenamento para o processamento de derivados alimentares. Devido à alta toxicidade, em humanos e animais, essas toxinas acabam por representar um problema de saúde pública. DON, também chamado de vomitoxina, pertence ao tipo B dos tricotecenos, sendo desse grupo o maior contaminante de grãos do mundo. O efeito tóxico gera perda de peso, irritação da pele, desnutrição e distúrbios neurotóxicos em animais e humanos (FERNÁNDEZ-BLANCO et al., 2016). Efeitos biológicos de compostos presentes em óleos essenciais extraídos de plantas tem sido relatado, em especial, o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) que possui atividades antimicrobianas (NASCIMENTO et al., 2007). Dessa

forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito inibitório do óleo essencial do alecrim, frente à produção de tricotecenos produzidos pelo *Fusarium graminearum*.

Materiais e métodos

Para seleção dos fungos produtores de toxina, cepas de *F. graminearum*, obtidas do Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá, foram cultivadas a 25° C por 15 dias, sob luz negra, em meio YES (água composto por extrato de levedura, sacarose e água) e avaliadas quanto à produção de tricotecenos. Para extração das micotoxinas foi utilizada a metodologia descrita por Sorensen e Sondergaard (2014), em que 8 plugs de 8 mm de diâmetro, contendo o fungo e o meio de cultivo, foram transferidos para frascos contendo 2 mL de acetato de etila:diclorometano:metanol (3:2:1, v/v/v) em 1% de ácido fórmico e levados ao ultrassom por 45 minutos. Após, 1mL do extrato foi recolhido e transferido para outros frascos devidamente identificados, os quais permaneceram em banho de água a 40 °C até completa evaporação. Amostras foram armazenadas a -20 °C até o momento da análise, sendo ressuspensas com 1mL de acetonitrila para análise cromatográfica. A determinação de tricotecenos foi conduzida por cromatografia líquida (Aparelho Finnigan Surveyor Plus, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) com bomba quaternária, injetor automático acoplado a detector de fluorescência (Finnigan Surveyor Plus, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) sob fluxo de 1,0 mL/min., fase móvel isocrática composta por água:acetonitrila:metanol (30:40:30, v/v). Para a separação foi utilizada coluna C18 de fase reversa (250 x 4,6mm, 5µm, Zorbax Eclipse Plus, Agilent, Santa Clara, CA, USA), mantida a 25 °C. O volume de injeção foi de 100µL com comprimento de onda de excitação e emissão de 270 e 455nm, respectivamente. Tricotecenos foram identificados com base no tempo de retenção comparado ao padrão e a quantificação foi realizada por padronização externa, a partir das curvas analíticas preparadas e construídas uma para cada dia de análise. Após, a partir da identificação das cepas produtoras de tricotecenos, foram determinadas a CIM (Concentração Inibitória Mínima) e a CFM (Concentração Fungicida Mínima) do óleo essencial de alecrim (OEA). A partir destes resultados, concentrações do OEA foram estabelecidas, sendo utilizadas para a avaliação sobre o desenvolvimento micelial do fungo.

A determinação da CIM foi realizada através da norma M38-A2 preconizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* com adaptações para macrodiluição (tubos) em caldo para fungos filamentosos. Foram adicionados 500µl do meio RPMI- 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) nos tubos, posteriormente foi realizada uma diluição seriada a partir da concentração de 10000 µg/mL do OEA, sendo adicionado ao tubo 500µl de deste em Tween 80 (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) a 0,1%. Adicionou-se 500µl da suspensão de *F. graminearum* a 10⁵ células/mL nos tubos testes e controle fúngico (não tratado com OEA). Os tubos foram incubados em estufa BOD (FPD 411, Ethink technology, Brasil) a 25 °C por 48h, sob luz negra. Após este período foi

verificado o crescimento através da turvação do meio. A CIM foi a menor concentração em que o OEA inibiu visivelmente o crescimento. Para realização da CFM foi retirado 10µl do tubo-teste e semeado em placa de Petri contendo meio Ágar Sabouraud Dextrose, e esta, colocada em BOD a 25 °C por 24h, sob luz negra. A CFM foi determinada de acordo com a ausência do crescimento nas placas. 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

Aligiannis e cols (2001) sugeriram que para uma boa atividade antifúngica, a CIM deve ser $\leq 500 \mu\text{g/mL}$. O OEA apresentou CIM e CFM de $366 \mu\text{g/mL}$, demonstrando forte ação antifúngica sobre *F. graminearum*. A ação inibitória do OEA sobre a produção de DON foi significativa ($p < 0,05$), quando comparado ao controle fúngico. A inibição ocorreu a partir da concentração de $1,25 \mu\text{g/mL}$ (87,66%), alcançando 100% de inibição para as outras concentrações testadas conforme evidencia a Tabela 1.

Tabela 1. Efeito do óleo essencial de alecrim na produção de desoxinivalenol por *Fusarium graminearum*, *in vitro*.

Óleo essencial de alecrim ($\mu\text{g/mL}$)	Desoxinivalenol	
	Concentração ($\mu\text{g/mL}$) ^b	Inibição (%)
CF ^c	28,320 ± 4,841	0
1,25	3,493 ± 0,2950	87,66
2,50	0,0 ± 0,0 ^a	100
5	0,0 ± 0,0 ^a	100
10	0,0 ± 0,0 ^a	100
20	0,0 ± 0,0 ^a	100
40	0,0 ± 0,0 ^a	100
70	0,0 ± 0,0 ^a	100
150	0,0 ± 0,0 ^a	100

^a Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao Controle Fúngico.

^b Valores obtidos por análise em HPLC expressos em média ± desvio padrão.

^c Controle Fúngico (inóculo livre da adição do óleo essencial).

Angioni e cols (2004) investigaram a ação inibitória do OEA, sendo o alecrim obtido da região de Sardenha (Itália), frente a bactérias e fungos, incluindo *F. graminearum*. Estes autores constataram que houve fraca atividade antimicrobiana e fungitóxica, além de um efeito indutor no desenvolvimento do *F. graminearum*. Esse fato não ocorreu neste trabalho, sendo esses resultados distintos possivelmente devido aos compostos majoritários do OEA encontrados por Angioni e cols (2004) serem diferentes, em comparação com este estudo. Os componentes fitoquímicos majoritários do OEA de Angioni e cols. (2004) foram borneol, (-) canfeno, verbenona e

acetato de bornil, e neste estudo encontramos como componentes majoritários, 1,8-cineol, cânfora e α -pineno.

Conclusões

O trabalho realizado demonstrou que o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) possui ação antimicotoxigênica frente à produção de tricotecenos por *Fusarium graminearum*, alcançando 100% de inibição quando 2,50 $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial foram adicionados ao meio de cultivo. Porém mais estudos devem ser realizados para aprimorar a segurança da aplicação do OEA em plantações, armazenamento e no posterior consumo de alimentos.

Agradecimentos

A concessão de bolsa PIBIC- AFIS/FA-UEM.

Referências

- ANGIONI, A. et al. Chemical Composition, Plant Genetic Differences, Antimicrobial and Antifungal Activity Investigation of the Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p.3530-3535, 2004.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils to two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4168–4170, 2001.
- FERNÁNDEZ-BLANCO, C.; FONT, G.; RUIZ, M. J. Interaction effects of enniatin B, deoxinivalenol and alternariol in Caco-2 cells. **Toxicology Letters**, v.241, p.38–48, 2016.
- NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemical on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.
- 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.