

EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* (CAPIM-LIMÃO) NA PRODUÇÃO DE MICOTOXINA EM *Fusarium graminearum*

Júlia Garbin Navarro (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Cristeli Marques Ribeiro (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Jéssica Cristina Zoratto Romoli, Giseli Cristina Pante, Aline Amenencia de Souza, Miguel Machinski Junior (Orientador), e-mail: mmjunior@uem.br

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

Farmácia (40300005) e Análise Toxicológica (40303004)

Palavras-chave: fitopatógeno, zearalenona, compostos naturais

Resumo:

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do óleo essencial de capim-limão (OECP) sobre a produção da micotoxina zearalenona (ZEA) pelo fitopatógeno *Fusarium graminearum*. Os componentes majoritários do OECP foram geranial (40,5%), α -citral (35,7%) e neral (6,3%) identificados por CG/EM. A concentração inibitória mínima (CIM) obtida foi de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de OECP. O microcultivo do fungo nos tratamentos de 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$ de OECP demonstraram alterações morfológicas nas estruturas fúngicas, estas foram observadas em microscopia óptica. Para avaliar a inibição na produção da micotoxina, o fungo foi cultivado na presença do OECP nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. A porcentagem de inibição foi crescente, conforme o aumento da concentração de OECP, sendo que a partir da concentração de 750 $\mu\text{g/mL}$ houve inibição total da produção de ZEA.

Introdução

Fusarium graminearum é um fungo de importância econômica, tendo em vista sua capacidade de causar perdas de plantio, uma vez que está associado a doenças de grãos e produção de micotoxinas, entre elas, a zearalenona (ZEA) e os tricotecenos. A ZEA representa uma ameaça para a saúde humana e animal, pois trata-se de uma substância estrogênica não esteróide, que atua ligando-se ao receptor do estrogênio, ocasionando assim, distúrbios de reprodução e alterações nos genitais.

Para evitar a contaminação dos grãos são aplicados fungicidas sintéticos, porém, isso encarece a produção, promove risco ao trabalhador e, ainda, há uma preocupação quanto aos resíduos deixados nos alimentos e no meio ambiente. Dessa forma, há uma crescente busca por alternativas mais seguras que substituam os produtos sintéticos. Os compostos extraídos de plantas têm se tornado uma opção relevante para esta finalidade, por apresentarem baixa toxicidade aos mamíferos, menor impacto ambiental e ampla aceitação pública. Neste contexto, o óleo essencial de capim-limão (OECP) tem sido estudado e apresentou capacidade de inibição de crescimento de várias espécies de fungos (TZORTZAKIS et al., 2007).

Assim, este trabalho visou avaliar o efeito do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) na produção de zearalenona por *Fusarium graminearum*.

Materiais e métodos

O OECP utilizado foi fornecido pela empresa BioEssência® e o isolado do fungo *F. graminearum* foi obtido do banco de isolados do Laboratório de Toxicologia da UEM. A caracterização do OECP se deu utilizando-se cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM). Os compostos presentes foram identificados analisando os tempos de retenção dos picos e confirmados através de uma mistura padrão de n-alcanos (C₈-C₂₀, Sigma-Aldrich). Em seguida, foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do OECP, por meio do teste de microdiluição em caldo (CLSI, 2008), em que se utilizou uma solução contendo $24,5 \times 10^5$ conídios/mL.

Para realização do microcultivo, foram transferidas para uma lâmina uma porção de cerca de 1cm² do meio YES (*Yeast Extract Sucrose*) ágar contendo as concentrações de 500, 1000 e 2000 µg/mL de OECP. Em seguida, o fungo foi inoculado nas quatro laterais do meio e coberto com uma lamínula. A lâmina foi então colocada em uma placa de vidro contendo filtro umedecido com água estéril, sendo incubada em BOD por 7 dias a 25°C em luz negra. Após esse período, procedeu-se a coloração com azul de lactofenol e leitura em microscopia óptica.

O isolado foi cultivado na ausência (controle fúngico) e presença (teste) do OECP no meio de cultura YES ágar. Os meios testes continham OECP nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL. O fungo foi inoculado com um plug central, e então, as placas foram incubadas na BOD por 15 dias a 25°C em luz negra. Para extração de ZEA foram retirados plugs de 8 mm de cada placa, os quais foram transferidos para frascos contendo acetato de etila-diclorometano-metanol (3:2:1, v/v/v) e 1 % de ácido fórmico. Os recipientes foram então levados para o banho de ultrassom por 45 minutos. Após, 1 mL do extrato de cada frasco foi transferido para outros recipientes, os quais foram colocados em banho maria a 40°C até evaporação dos solventes. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20°C para análise posterior.

A determinação de ZEA procedeu-se por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo que a identificação da micotoxina foi efetuada com base no tempo de retenção comparado ao padrão e, a quantificação, por padronização externa, a partir de curvas analíticas. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão e analisados utilizando a análise de variância (ANOVA), e para múltiplas comparações o teste de Tukey, com o auxílio do programa GraphPad Prism 5®.

Resultados e Discussão

A análise cromatográfica revelou que os componentes majoritários do OECP foram o geranial (40,5%), α-citral (35,7%) e neral (6,3%) de um total de 94,6% de compostos identificados por CG/EM. A CIM obtida foi 1000 µg/mL de OECP em *F. graminearum*. Além disso, conforme exibido pela figura 1, a leitura do microcultivo

revelou que desde a menor concentração do OECP, foi possível observar diferenças na estrutura das hifas e macroconídios do fungo, em relação ao controle fúngico.

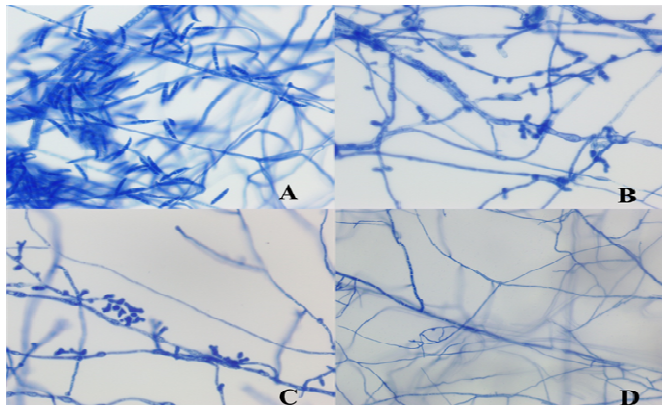


Figura 1. Microscopia óptica da morfologia de *Fusarium graminearum* frente às diferentes concentrações do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). **A.** Controle Fúngico; **B.** 500 µg/mL; **C.** 1000 µg/mL e **D.** 2000 µg/mL.

Na figura 1A (controle fúngico) estão destacados vários macroconídios e hifas com morfologia características do *F. graminearum*. Nas figuras 1B, 1C e 1D, o fungo está exposto as concentrações de 500, 1000 e 2000 µg/mL de OECP, observa-se que os macroconídios estão deformados e as hifas, delgadas. Além disso, essas alterações tornam-se mais evidentes conforme há o aumento das concentrações do OECP. Kumar et al. (2016) ao exporem *F. graminearum* ao óleo essencial de açafrão também observaram mudanças significativas no micélio do fungo. Por microscopia eletrônica de varredura, os autores constataram que houve perda da integridade da membrana das células, ocasionando redução do conteúdo citoplasmático das hifas. O mesmo pode ter ocorrido no presente trabalho, levando as alterações morfológicas observadas por microscopia óptica. Por fim, a atividade antimicotoxigênica do OECP, em relação à ZEA, está apresentada na tabela 1. Como pode ser observado, a porcentagem de inibição é maior à medida que se aumenta a concentração de OECP utilizado, apresentando diferença estatística significativa, quando comparada ao controle fúngico. Além disso, nas maiores concentrações avaliadas (750 e 1000 µg/mL) houve inibição total na produção de ZEA pelo *F. graminearum*.

Tabela 1. Efeito inibitório do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) na produção de zearalenona por *Fusarium graminearum*, *in vitro*.

Óleo essencial (µg/mL)	Zearalenona	
	Concentração (µg/mL) ^b	Inibição (%)
CF ^c	33,420 ± 0,001527	0
250	25,810 ± 0,002082 ^a	22,77
500	8,533 ± 0,002646 ^a	74,46
750	-	100
1000	-	100

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

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

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

A produção de ZEA por *F. graminearum* também foi estudada por Kalagatur et al. (2015) ao exporem o fungo ao óleo essencial de manjerição sagrado. Neste estudo, a síntese da micotoxina foi avaliada em grãos de milho artificialmente contaminados (*in situ*) e observou-se a diminuição da síntese de ZEA conforme aumento da concentração de óleo essencial utilizado. Esses resultados corroboram com este trabalho, mesmo sendo realizado *in vitro* e com outro óleo essencial.

Conclusões

Os resultados demonstraram que o OECP foi efetivo para inibição da produção de ZEA em *F. graminearum* a partir da concentração de 250 µg/mL, com inibição total em 750 µg/mL. Além disso, foi possível evidenciar alterações morfológicas significativas nas estruturas fúngicas causadas pelo OECP a partir de 500 µg/mL de OECP. Apesar dos resultados promissores, se faz necessário estudos complementares *in situ* e *in vivo*, para assegurar a aplicabilidade do OECP como fonte alternativa aos fungicidas e/ou conservantes de alimentos sintéticos.

Agradecimentos

PIBIC/CNPq-FA-UEM.

Referências

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. **NCCLS document M38-A2**. Wayne, PA, USA, 2008.

KALAGATUR, N. K.; MUDILI, V.; SIDDAIAH, C.; GUPTA, V. K.; NATARAJAN, G.; SREEPATHI, M. H.; VARDHAN, B. H.; PUTCHA, L.R.V. Antagonistic activity of *Ocimum sanctum* L. essential oil on growth and zearalenone production by *Fusarium graminearum* in maize grains. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 892, p. 1-11, 2015.

KUMAR, K. N.; VENKATARAMANA, M.; ALLEN, J. A.; CHANDRANAYAKA, S.; MURALI, H. S.; BATRA, H. V. Role of *Curcuma longa* L. essential oil in controlling the growth and zearalenone production of *Fusarium graminearum*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 69, p. 522-528, 2016.

TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 2, p. 253-258, 2007.