

AValiação DA ATIVIDADE DO Óleo ESSENCIAL DE *THYMUS VULGARIS* SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *ASPERGILLUS NOMIUS*

Ingrid Beatriz Campanha (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Aline Amenencia de Souza (Coorientador), Simone Aparecida Galerani Missini (Orientador),
e-mail: simonegmossini@yhao.com.br

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

Palavras-chave: *Aspergillus nomius*, ergosterol, óleo essencial de tomilho.

Resumo

Fungos como *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* estão entre os maiores produtores da micotoxina Aflatoxina, sendo compostos capazes de causar efeitos mutagênicos e carcinogênicos em homens e animais. Por conta da alta toxicidade das Aflatoxinas e a habilidade dos fungos em decomporem os alimentos, estes vêm sendo cada vez mais alvos de pesquisas com o intuito de serem inativadas ou terem sua toxicidade diminuída. Pelo fato de apresentarem propriedades antissépticas e antimicrobianas os óleos essenciais (OEs) estão sendo empregados nas pesquisas de contenção de fungos e suas micotoxinas. Os OEs são uma alternativa para substituir produtos mais agressivos como os agrotóxicos. O objetivo deste trabalho foi analisar a resposta do fungo *A. nomius* frente ao OE de Tomilho (OET). A menor concentração em que o OE impediu o crescimento do fungo em teste foi de 500 µg/mL. O tratamento com OET se mostrou eficiente na inibição micelial de *A. nomius* em concentrações acima de 125 µg/mL. Nos tratamentos de 125, 250, 500 e 1000 µg/mL de OET, as hifas, conídios e conidióforos apresentaram deformações de forma dose dependente quando comparadas ao controle. O tratamento foi capaz de minimizar a produção de ergosterol nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL, nas concentrações de 250 e 125 µg/mL essa diminuição não foi significativa. O OET apresentou boa atividade antifúngica contra o desenvolvimento morfológico do fungo *A. nomius*.

Introdução

A contaminação fúngica de produtos agrícolas evidencia um grave problema econômico e de saúde pública, pois além da degradação e perda de produtos comerciais, há grupos de fungos com habilidade de produzir toxinas prejudiciais à saúde, podendo causar efeitos carcinogênicos e citotóxicos. Como principais infectantes e degradadores naturais de alimentos em todo o mundo, pode-se relacionar os fungos do gênero

Aspergillus. Algumas espécies deste gênero, como *Aspergillus flavus* e *A. nomius* produzem as micotoxinas chamados de Aflatoxinas, compostos aptos a induzir efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos em humanos e animais (ARROTÉIA et al., 2013).

Conhecidos por suas qualidades medicinais, antimicrobianas e antissépticas os OEs estão sendo cada vez mais investigados no controle de microrganismos em produtos alimentícios. Além de serem uma boa resposta a crescente busca de métodos naturais com efeitos menos agressivos à saúde humana e ao meio ambiente, são prováveis substituintes dos agrotóxicos e conservantes sintéticos (NAZZARO et al., 2017). Estudos já demonstraram ação antimicrobiana eficaz do OET (*Thymus vulgaris*) contra os microrganismos das espécies *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, e *Mycobacterium smegmatis* e estirpes de fungos (*Candida vaginalis* e *C. albicans*) (LIU et al., 2017).

O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade do OET sobre o fungo *Aspergillus nomius* avaliando a produção de ergosterol pelo mesmo.

Materiais e métodos

O OET foi adquirido no comércio local da cidade de Maringá, Brasil, apresentando a marca Laszlo. A caracterização do OET foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Os compostos presentes foram identificados analisando os tempos de retenção e confirmados através da literatura. *A. nomius* foi obtido do banco de isolados do Laboratório de Toxicologia/UEM, sendo cultivado em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) por 10 dias/25°C. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada seguindo a norma M38-A2 preconizada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standart*, considerando a menor concentração em que o OE impediu o crescimento visível do inóculo do fungo em teste, e para a confirmação foi realizado a Concentração Fungicida Mínima (CFM). O isolado foi cultivado na ausência (controle fúngico) e presença (tratamento) do OET. Os meios testes continham OET nas concentrações de 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg/mL. Foi realizado o cultivo do fungo com nos tratamentos de 125; 250; 500 e 1000 µg/mL, que foram incubados por 10 dias a 25°C, para que posteriormente se observasse e registra-se o desenvolvimento micelial, e em e lâmina, visualizasse o fungo em microscópio óptico.

Também foi inoculado o fungo em Elemeyers com o meio YES (*Yeast Extract Sucrose*) para extração do ergosterol. Pesou-se o micélio em balança analítica e logo após os mesmos foram transferidos para tubos Falcon contendo 5 mL de hidróxido de potássio alcólico a 25% e homogenizou-se em vórtex por 5 minutos e depois levados ao banho-maria a 85°C por 4 horas. Adicionou-se 2 mL de água destilada e 5 mL de n-heptano, desta forma a determinação de ergosterol foi realizada por espectrometria de UV em que se analisa a presença e quantidade de ergosterol em cada concentração estudada conforme descrito.

Resultados e Discussão

Neste trabalho a atividade antifúngica do OET pelo método CIM resultou em um efeito dose dependente para o *A. nomius*. O valor da CIM e da CFM do OE de tomilho foi de 500 µg/mL. A análise da composição do OET está demonstrada na Tabela 1. Foram identificados 3 componentes principais: Orto-cimene (34,3%), Thymol (25,15%) e Carvacrol (15,15%). Os três compostos identificados apresentam propriedades antimicrobiana e antifúngica. Thymol assim como o cravacrol apresenta como sua característica principal a propriedade de ser antioxidante (MIRANDA, 2014).

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de tomilho (*Tymus vulgaris*).

COMPOSTO	TR (min.)	(%)
Orto-cimene	8,63	34,3
Thymol	19,76	25,15
Carvacrol	20,14	15,15
TOTAL (%)		98,82

*TR: Tempo de retenção

Observou-se no desenvolvimento micelial na concentração de 1000 µg/mL de OET o fungo não apresentou nenhum crescimento, resultando em inibição total. Para o tratamento de 500 µg/mL, a inibição foi de 84,5%, em 250 µg/mL de OET a inibição foi de 29,17%. Na concentração de 125 µg/mL do OET a inibição foi de 9,27% e em 62,5 µg/mL não houve inibição do desenvolvimento micelial.

Observou-se em microscopia que os tratamentos de 1000 e de 500 µg/mL resultaram em forte fragmentação de hifas, liberação de líquido intracelular, redução dos conidióforos e uma menor quantidade de conídios. O tratamento de 250 µg/mL apresentou hifas fragmentadas, e menor quantidade de conídios, porém em intensidade inferior as concentrações maiores, mostrando que o OET modifica a morfologia do *A. nomius*, entretanto tem melhor atividade em maiores concentrações. Tratamentos com concentrações inferiores as citadas não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao controle.

A concentração de ergosterol para o controle fúngico cultivado em meio YES foi de 0,008%. Nos tratamentos de 1000 e 500 µg/mL de OET não houve crescimento da cepa *A. nomius*, ou seja, nessas concentrações o OET foi capaz de impedir a produção de ergosterol e conseqüentemente o desenvolvimento do fungo. No tratamento de 250 µg/mL de OET a concentração de ergosterol resultou em 0,0003% e em 125 µg/mL resultou em 0,0001%. Evidenciou-se que o tratamento com OET foi eficaz na redução da concentração de ergosterol de *A. nomius*. O ergosterol presente é um componente da membrana celular dos fungos, e tem papel fundamental na estrutura e função da membrana plasmática, desta forma,

sabe-se que na ausência do ergosterol há a morte do fungo, podendo-se utilizar a presença do mesmo para determinação da inativação e eliminação do fungo (NAZZARO et al., 2017).

Conclusões

Nossos resultados demonstraram que o OET apresenta boa atividade fungicida contra a espécie de fungo *A. nomius*, promovendo a inibição do crescimento, produção de ergosterol, desenvolvimento morfológico do micélio, hifas e conidióforos. Este óleo demonstrou ser uma boa alternativa para a substituição dos fungicidas sintéticos, uma vez que são naturais e considerados mais seguros para os seres humanos e meio ambiente.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq e a fundação araucária pelo apoio financeiro concedido pela bolsa, ao Laboratório de Toxicologia da UEM, a minha orientadora professora Simone Aparecida Galerani Mossini, a mestrandia Aline Amenencia de Souza pelo auxílio nas metodologias realizadas, e a minha colega de trabalho Simone.

Referências

ARROTÉIA, C. C., COSTA, C. L.; FERREIRA, F. D., LEITE, E. S., MACHINSKI, M. M., MOSSINI, S. A. G. et al. Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 789-793, 2013.

LIU, Q. Antibacterial and antifungal activities of spices. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1283, 2017.

MIRANDA, C. A. S. F., DAS GRAÇAS CARDOSO, M., MACHADO, S. M. F., DE SOUZA, M. G., DE ANDRADE, J., TEIXEIRA, M. L. Correlação entre composição química e eficácia antioxidante de óleos essenciais de plantas condimentares por análise de agrupamentos hierárquicos (HCA). **E-xacta**, Belo Horizonte, v. 7 n. 1, p. 65-74. (2014).

NAZZARO, Filomena et al. **Essential oils and antifungal activity**. *Pharmaceuticals*, v. 10, n. 4, p. 86, 2017.