

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO NA PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS POR *ASPERGILLUS NOMIUS*

Tatiele Martins (PIBIC/AF/IS/CNPq/UEM), Aline Amenencia de Souza (Coorientador), Simone Aparecida Galerani Mossini (Orientador), e-mail: simonegmossini@yahoo.com.br.

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

Palavras-chave: *Aspergillus nomius*, Aflatoxinas, óleo essencial.

Resumo

O presente estudo tem como objetivo a avaliar o efeito do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) (OET) na produção de micélio e produção de aflatoxinas pelo fungo *Aspergillus nomius*. Para isso e a composição do OET foi determinada e foram avaliados a ação do OET sobre o crescimento fúngico. O valor do CIM (Concentração Inibitória Mínima) e do CFM (Concentração Fungicida Mínima) encontrados foram de 500 µg/ml. O efeito inibitório do OET sobre o crescimento micelial de *A. nomius* apresentou os seguintes valores de peso úmido do micélio em gramas: controle fúngico (sem OE): 6,586g; 1000 µg de OET: nenhum crescimento observado; 500 µg de OET: 4,869g; 250 µg de OET: 4,881g; 125 µg de OET: 6,015g; 62,5 µg de OET: 4,454g. Sendo assim, é possível observar que o óleo essencial de tomilho apresentou atividade antifúngica sobre o fungo.

Introdução

Os fungos estão presentes em todos os ambientes, e apresentam relevância econômica no âmbito da saúde e indústria. Os fungos podem contaminar alimentos, causando sua deterioração, reduzindo seu valor nutricional, alterando suas qualidades organolépticas e tornando-se, em alguns casos, problema de saúde pública (RAVEN et al., 2001).

Alguns gêneros deste grupo de microrganismos, como o *Aspergillus*, fungos comumente contaminantes de uma variedade de alimentos, são responsáveis pela produção de toxinas, nomeadas de micotoxinas, entre as quais, se destaca a aflatoxina. O processo de invasão por fungos e a contaminação por micotoxinas em grãos podem ocorrer no campo e durante os processos de colheita, secagem, transporte e armazenamento do produto. O crescimento de fungos é determinado por vários fatores, entre os quais, destacam-se: o teor de umidade, aeração, dano provocado por insetos e ácaros, temperatura e tempo de armazenamento (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2002). As Aflatoxinas são altamente tóxicas e carcinogênicas para homens e animais, tornando-se assim, um fator preocupante para a indústria alimentícia.

Nesse sentido, a redução da incidência de fungos e micotoxinas em produtos agrícolas necessita de métodos de prevenção e controle eficazes. Entretanto, a utilização de antifúngicos sintéticos pode deixar resíduos no produto final, comprometendo a saúde dos consumidores (CAKIR et al., 2005). O uso de extratos naturais provenientes de plantas, surge como uma alternativa na substituição de agrotóxicos e conservantes, por serem de fácil obtenção e utilização, apresentarem baixo custo financeiro e não apresentam efeitos genotóxicos e mutagênicos a seres humanos (KHAN & AHMAD, 2011). Os óleos essenciais (OE) são produtos obtidos de partes de plantas, sendo misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas geralmente odoríferas e líquidas (ANTUNNES & CAVACOB, 2010).

Assim, a pesquisa tem como objetivo a avaliação do efeito do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) (OET) na produção de aflatoxinas pelo fungo *Aspergillus nomius*.

Materiais e métodos

O fungo *Aspergillus nomius* foi cultivado no meio de cultura BDA (Potato Dextrose Ágar) e incubado por 10 dias a 25°C para realização dos experimentos. Foi utilizado o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*), produto da marca Laszlo adquirido no comércio de produtos naturais de Maringá. 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, porcentagem e confirmados através da literatura.

Foi realizado a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o OET, na qual as placas de cultivo foram submetidas a incubação por 72 horas a 25°C. Foi também realizado a determinação da CFM (Concentração Fungicida Mínima) para a confirmação do CIM.

Quanto a extração de aflatoxinas, foi realizado a primeira etapa para extração de aflatoxinas. Dessa forma, o fungo foi cultivado em meio líquido YES por 10 dias a 25°C e após isso foi pesado a massa micelial para avaliar o peso úmido do micélio. O fluido de meio YES foi agitado manualmente por 1 min com 10 mL de n-hexano em fins de separação, esse procedimento foi realizado duas vezes. Após a separação das fases, a fração orgânica foi descartada. Em seguida, foram adicionados 10 mL de clorofórmio, seguidos de agitação manual por 3 minutos e 8 minutos de descanso, repetindo também esse procedimento por duas vezes. A alíquota foi novamente dividida com clorofórmio. As frações de clorofórmio foram recuperadas, filtradas com sulfato de sódio anidro e secas em banho-maria a 65 ° C. O resíduo obtido foi armazenado a -18 ° C.

Resultados e Discussão

O OET apresentou como compostos majoritários: orto-cimene (34,3%), thymol (25,15%), carvacrol (15,15%) e camphene (8,44%) (Tabela 1). A CIM do OET para o *A. nomius* foi de 500 µg/ml, e o CFM realizado para

a confirmação do CIM, também foi de 500 µg/mL. Kohiyama et al. (2014) testaram o OET para *A. flavus* e a CIM obtida foi 250 µg/mL, uma concentração menor que nosso trabalho.

Quanto ao desenvolvimento micelial do *A. nomius* frente ao tratamento do OET, os resultados apresentam 100 % de inibição para o tratamento na concentração de 1000 µg/mL de OET; 83,12 % de inibição para 500 µg/mL; 25,6% para 250 µg/mL, 7,8% para 125 µg/mL e nenhuma inibição para o tratamento em 62,5 µg/mL do OET.

Foi realizado o processo de extração das Aflatoxinas produzidas por *A. nomius* com e sem tratamentos com OET.

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial *T. vulgaris*

Compostos	<i>Thymus vulgaris</i>		
	RT (min)	%	IKA
α-Pinene	5,74	3,38	906,45
Camphene	6,16	8,44	920
orto-cimene	8,63	34,3	999,68
Terpineol	15,21	5,28	1160,74
Thymol	19,76	25,15	1264,67
Carvacrol	20,14	15,15	1273,41
Total de compostos identificados		96,53%	

O peso úmido do micélio cultivado nas diferentes concentrações de tratamentos resultaram em 6,586g para o controle fúngico (sem OE), nenhum crescimento para 1000 µg/mL de OET; 4,869 g para tratamento com 500 µg/mL de OET, 4,881g para tratamento com 250 µg/mL de OET, 6,015g para 125 µg/mL de OET e 4,454g para tratamento com 62,5 µg/mL de OET.

Tabela 2 – Peso úmido dos micélios em diferentes concentrações de OET

Tratamento	Peso úmido do micélio em gramas
Controle fúngico (sem OE)	6,586
1000 µg de OET	N.C
500 µg de OET	4,869
250 µg de OET	4,881
125 µg de OET	6,015
62,5 µg de OET	4,454

N.C: Nenhum crescimento observado.

Pode-se observar que o OET apresentou atividade antifúngica sobre o crescimento do fungo *A. nomius* e seu micélio, sendo essa atividade dose dependente.

Conclusões

Conclui-se que o OET é eficaz contra o crescimento e desenvolvimento do micélio de *A. nomius*, podendo ser um importante antifúngico natural contra essa espécie de fungo. No entanto devido a problemas técnicos no aparelho de cromatografia do laboratório e a imprevistos causados pela pandemia de COVID-19, não foi possível finalizar as análises da extração de Aflatoxinas. Recomenda-se que seja realizado mais estudos com a ação do OET na produção de Aflatoxinas por *A. nomius*.

Agradecimentos

Agradeço a Fundação Araucária pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto e a minha orientadora Simone Mossini pela oportunidade de realizar este estudo. Agradeço a minha coorientadora Aline Amenecia por me ajudar e auxiliar nos experimentos, e também as minhas colegas de laboratório Simone e Ingrid que me acompanharam e auxiliaram nos experimentos.

Referências

ANTUNES, M. D. C., & CAVACOB, A. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour Fragrance Journal**, 25, 351-366, 2010.

BENTO, L.F.; CANEPPELE, M.A.B.; ALBUQUERQUE, M.C.F.; KOBAYASTI, L.; CANEPPELE, C.; ANDRADE, P.J., Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, 71(1), 44-9, 2012.

CAKIR, A. et al. Antifungal properties of essential oil and crude extract of *Hypericum linarioides* Bosse. **Biochemical systematic and Ecology**, v.33, p.245-256, 2005.

CENTENO.S.; CALVO M.A.; ADELANTADO C.; FIGUEROA S. Pakistan **Journal of Biological Sciences** 13 (9): 452-455, 2010.

KHAN, M. S. A., & AHMAD, I. In vitro antifungal, anti-elastase and anti keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon*-species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Phytomedicine**, 19, 48– 55, 2011.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A., 2001.