

Ação de Óleos Essenciais na Inibição da Germinação de Esporos de *Aspergillus* sp. E *Fusarium* sp.

37

Luiz Henrique Neves dos Santos¹, Bruna M. de Oliveira¹, Giorgia F. Lucini¹, Adriana Sbardelotto Di Domenico²

RESUMO

Como o milho é um dos principais cereais utilizados na alimentação humana e animal, e por ser este grão muito suscetível ao desenvolvimento de fungos, e devido aos malefícios que estes microrganismos podem causar a saúde dos consumidores deste grão, tem-se a necessidade de fazer uso de medidas que possam reduzir a incidência e o desenvolvimento dos mesmos. Visando contribuir com esta problemática o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antifúngico in vitro dos óleos essenciais de Cravo botão, Palmarosa, Tomilho branco, Orégano, Eucalyptus stangeriana, Eucalyptus citriodora, Eucalyptus globulus, Canfora Branca, Alecrim, Lavanda francesa, Cravo folha e Canela, sobre a germinação de esporos dos gêneros fúngicos *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp.. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos. Através da metodologia de screening avaliou-se os efeitos dos óleos essenciais sobre o raio de inibição da germinação de esporos. Obtendo-se que os óleos essenciais de Lavanda francesa, Alecrim, Canfora Branca, E. globulus, E. citriodora, E. strangeriana foram os mais eficientes na ação inibitória da germinação de esporos de ambos os gêneros fúngicos.

Palavras-chave: fungos toxigênicos, biofungicidas, pós-colheita de grãos, antifúngico.

¹Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Acadêmicos do curso de Agronomia – Caixa Postal 157 – CEP 86660-000, Dois Vizinhos – Paraná – E-mail: luizneves512@gmail.com

²Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Dois Vizinhos – Doutora em Engenharia Agrícola, Professora da Coordenação de Zootecnia.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays L*) é um dos grãos com maior importância comercial no mundo, utilizado tanto na alimentação humana quanto animal. Além de ser matéria prima para a produção de biocombustível e outros produtos sintéticos. A estimativa da safra brasileira 2017/18 de milho é de 87.279,0 milhões de toneladas, apresentando uma queda em relação à safra passada. O Brasil está atualmente entre os maiores produtores e exportadores do grão no mundo, estocando cerca em 18,7 milhões de toneladas para o mercado interno (CONAB, 2018).

Em razão da grande demanda do produto durante todo o ano, e poucas safras anuais, uma ou duas dependendo da região, o grão precisa ficar armazenado (DI DOMENICO et al., 2014). Ficando susceptível a contaminação por fungos, principalmente dos gêneros *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp., fungos decompositores, que causam deterioração nos grãos, afetando a qualidade física, alterando as propriedades sensoriais, gerando perda de matéria seca e nutricional, e ainda podem contaminar este alimento com micotoxinas (SCHUH et al., 2011, PARAGINSKI, et al., 2015; MAIA et al., 2015).

As micotoxinas que podem ser produzidas por *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp., aflatoxinas e fumonisinas respectivamente, são altamente prejudiciais à saúde de humanos e animais, e contaminação nos grãos pode ocorrer durante o cultivo no campo, na colheita, no transporte ou ainda no armazenamento (BENTO et al., 2012).

Buscando o controle desses fungos tanto na lavoura, quanto na armazenagem, aplicam-se fungicidas, que elevam o custo de produção, além de contaminar o ambiente e até mesmo a saúde dos aplicadores (FREDDO et al., 2016, FARIA et al., 2010). Diante disso, tem aumentado a procura por alternativas de controle que não causem tantos danos, como uso de óleos essenciais (OE) (ZACARONI et al., 2009, MITCHELL et al., 2010). Muitos óleos essenciais têm apresentado significativa atividade antifúngica (DOMENE et al., 2016, MAIA, T.F.; DONATO, A.D.; FRAGA, M.E., 2015).

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito antifúngico in vitro dos óleos essenciais de Cravo botão, Palmarosa, Tomilho branco, Orégano, Eucalyptus stangeriana, Eucalyptus citriodora, Eucalyptus globulus, Canfora Branca, Alecrim, Lavanda francesa, Cravo folha, Canela, sobre os fungos *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp.

MATÉRIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos. Os gêneros fúngicos *Aspergillus* e *Fusarium* utilizados foram obtidos de amostras de grãos de milho, colhidos em lavouras do município de Dois Vizinhos PR, safra 2017/2018. A identificação destes gêneros

fúngicos foi realizada de acordo com Fisher e Cook (2001). Estes patógenos foram cultivados em meio ágar sabouroud, incubado em câmara $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sendo repicados até obtenção de colônias puras. As placas de vidro, o meio de cultura ágar sabouroud e os demais materiais foram previamente esterilizados, em autoclave a 121°C por 15 minutos, e os ensaios foram realizados dentro da cabine de fluxo laminar.

Os óleos essenciais de Cravo botão, Palmarosa, Tomilho branco, Orégano, *E. stangeriana*, *E. citriodora*, *E. globulus*, Canfora Branca, Alecrim, Lavanda francesa, Cravo folha, Canela, foram obtidos por doação da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda, situada na Vargem Grande Paulista, São Paulo – Brasil. Estes óleos foram armazenados em geladeira, a uma temperatura de 7°C , até o momento da realização das análises.

A análise de screening foi realizada segundo Mitchell (2010) com algumas adaptações. Esta ocorreu em placas de petri, onde inseriu-se 1 ml do inoculo do fungo 1×10^6 UFC.g⁻¹. Após adicionou-se cerca de 20 ml de ágar sabouraud ($\pm 40^\circ\text{C}$) e em seguida, homogeneizou-se o meio e o inoculo. Depois de solidificado adicionou-se 1 disco de papel filtro (5mm) no centro de cada placa, e 20 μL de óleo essencial, em três repetições por tratamento. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (BOD) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 9 dias. Após esse período, foi aferido o raio de inibição em 3 direções diferentes, e utilizou-se a média destas medições. Considera-se como atividade antifúngica positiva um halo de inibição com diâmetro superior a 5 mm.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os resultados obtidos para a porcentagem de inibição da germinação de esporos, foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knot a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico Gene (CRUZ., 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos (Tabela 1) é possível verificar que os óleos essenciais Lavanda francesa, Alecrim, Canfora Branca, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus strangeriana* obtiveram os melhores resultados na ação inibitória dos dois gêneros fúngicos, na qual estes óleos inibiram totalmente a germinação dos esporos. Enquanto que o óleo essencial de tomilho branco teve grande efeito inibitório sobre o *Aspergillus* sp., mas foi um pouco menos eficiente para o *Fusarium* sp. Resultados semelhantes foram observados por Pereira et al. (2006) e Hillen et al. (2012) em relação ao óleo essencial de Alecrim na inibição do crescimento de *Aspergillus ochraceus*, e redução do crescimento micelial de *Fusarium* sp. e *Aspergillus flavus*.

Os óleos essenciais de Canela e Palmarosa (Tabela 1) foram os menos eficientes na inibição da germinação de *Aspergillus* sp. Resultado semelhante se verifica para a Palmarosa na inibição de *Fusarium* sp.

TABELA 1. Porcentagem de inibição do crescimento fúngico de *Aspergillus sp.* e *Fusarium sp.*, obtido pela análise de screening para alguns óleos essenciais.

Óleos Essenciais	Porcentagem de inibição	
	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
Lavanda francesa	100 a	100 a
Alecrim	100 a	100 a
Canfora branca	100 a	100 a
E. globulus	100 a	100 a
E. citriodora	100 a	100 a
E. strangeriana	100 a	100 a
Tomilho branco	70 b	86 a
Cravo folha	56 c	36 b
Orégano	49 c	45 b
Cravo botão	46 c	49 b
Canela	36 d	22 c
Palmarosa	21 e	20 c

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Skott-Knott.

Embora os óleos essenciais de Cravo Botão, Cravo Folha, Orégano e Canela não tenham tido os resultados mais eficientes na ação inibitória da germinação de esporos, para ambos os gêneros fúngicos (Tabela 1). Gasperini (2014) avaliando 13 tipos de óleos essenciais, dentre estes o óleo essencial de canela, tomilho cravo e orégano, verificou que estes eram eficientes no controle do crescimento de *A. flavus*. Também, Mitchell (2010) verificou efeito inibitório do óleo essencial de orégano no crescimento de espécies de *Aspergillus sp.*

Dentre os doze óleos essenciais testados observou-se (Tabela 1) que metade deles apresentaram resultados excelentes e que os outros embora tenham apresentado resultados menos eficientes, também mostraram ter ação positiva sobre a inibição da germinação de esporos de *Aspergillus sp.* e *Fusarium sp.* Logo se sugere, que não se descarte a ideia de utilização destes óleos como biofungicidas, antes de serem realizadas mais análises para verificar o real potencial antifúngico dos mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira

de grãos. Sexto levantamento safra 2017/2018. Brasília: Conab, v.2, n.5, 117p. 2018.

CRUZ, C. D. Programa Genes –Versão windows. Aplicativo computacional em Genética e Estatística. 1 ed Viçosa, MG: Editora UFV, 2001. V.1 648 P.

DI DOMENICO, A. S.; DANNER, M. A.; BUSO, C.; CHRIST, D.; COELHO, S. R. M.; Análise de trilha da contaminação por aflatoxinas em grãos de milho armazenados. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.50, n.6, p.441-449, jun. 2015.

DOMENE, M. P.; GLÓRIA, E.M.; BIAGI, J.D; BENEDETTI, B.C.; MARTINS, L. Efeito do tratamento com óleos essenciais sobre a qualidade fisiológica e sanitária das sementes de milho (*Zea mays*). *PLANT PATHOLOGY*, Arq. inst. Biol., v.83, 1-6, e0072014, 2016.

FISHER, F. & COOK, N.B. *Micologia: Fundamentos e Diagnóstico*. Rio de Janeiro RJ. Revinter. 2001.

FARIA, C. M. D. R.; CAVALLIN, I. C.; MARCONDE, M. M.; FARIA, M. V.; RESENDE, J. T. V.; Atividade antifúngica de canela sobre *Fusarium oxysporum*, agente causal de podridão de raízes em diversas culturas olerícolas. *Hortic. bras.*, v. 28, n. 2 (Suplemento - CD Rom), julho 2010.

FREDDO, A.R.; MAZARO, S.M.; BORIN, M.S.; BUSO, C.; CECHIN, F.E.; ZORZZI, I.C.; DALACOSTA, N.L.; LEWANDOWSKI, A. Potencial do Óleo essencial de erva-luísa (*Aloysia citriodora* Palau) no Controle de *Fusarium* sp. *in vitro*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.18, n.2, 2016.

GASPERINI, A. M., Efeito de óleos essenciais sobre o crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

HILLEN, T.1; et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.14, n.3, p.439-445, 2012.

MAIA, T. F.; DONATO, A. D.; FRAGA. M. E.; ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE OLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.17, n.1, p.105-116, 2015.

MITCHEL, T. C.; STAMFORD, T. L. M.; SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; CARMO, E. S.; Efetividade do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae) como inibidor do crescimento de espécies de *Aspergillus* potencialmente toxigênicas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 30(3): 755-760, jul.-set. 2010.

PARAGINSKI, R. T.; ROCKENBACH, B. A.; SANTOS, R. F.; MOACIR, E. C.; OLIVEIRA, M.; Qualidade de grãos de milho armazenados em diferentes temperaturas. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental, v.19, n.4, p.358–363, 2015.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. L.; COSTA, R. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N.; PICCOLI, R. H.; Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimento. Ciênc. agrotec.; Lavras, v.30, n.4, p.731-738, jul./ago., 2006.

SCHUH, G.; GOTTARDI, R.; FERRARI FILHO, E.; ANTUNES, L.E.G.; DIONELLO, R.G. Efeitos de dois métodos de secagem sobre a qualidade físico-química de grãos de milho safrinha-RS, armazenados por 6 meses. Semina: Ciências Agrárias, v.32, p.235-244, 2011.

ZACARONI, L.M.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; GUIMARÃES, L.G; SALGADO, A.P.S. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Acta amazônica, vol., 39(1) p.,193 – 198, 2009.