



ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE EUCALIPTO NO CONTROLE DE *ASPERGILLUS FLAVUS*: ESTUDO PILOTO ¹

**Laira Dutra², Andressa Jungbeck³, Simony Costa Beber⁴, Dara Monize Pазze⁵, Isabella
Stivanin Lacerda⁶, Christiane De Fátima Colet ⁷**

¹ Trabalho realizado para o Projeto de pesquisa em uso de medicamentos e plantas medicinais - PLAMEDIC/Unijuí

² Estudante do curso de Medicina da UNIJUÍ. Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Tecnológica financiado pela Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - PIBITI/UNIJUÍ.

³ Estudante do curso de Medicina da UNIJUÍ. Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - PIBIC/CNPq.

⁴ Farmacêutica - formada na unijuí, mestranda no programa de pós graduação stricto sensu em sistemas ambientais e sustentabilidade/UNIJUÍ. Bolsista FAPERGS

⁵ Bióloga - formada na unijuí, mestranda no programa de sistemas ambientais e sustentabilidade/UNIJUÍ. Bolsista CAPES/Unijuí

⁶ Estudante do curso de Medicina da UNIJUÍ. Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - PIBIC/CNPq.

⁷ Farmacêutica - Professora da UNIJUÍ e dos Mestrados em Sistemas Ambientais e Sustentabilidade e em Atenção Integral à Saúde. E-mail: christiane.colet@unijui.edu.br.

INTRODUÇÃO

Aspergillus flavus é um fungo saprofítico que se destaca por sua capacidade de produzir aflatoxinas e causar doenças como a aspergilose, principalmente em pessoas imunocomprometidas. A infecção em humanos surge geralmente devido a inalação de esporos ou alimentos contaminados que após repetidas exposições desenvolvem uma resposta alérgica resultando em asma, alveolite extrínseca ou aspergilose broncopulmonar alérgica (AMAIKE; KELLER, 2011).

Para o controle dessas doenças tanto em humanos como em alimentos, utilizam-se os antifúngicos sintéticos. Entretanto, o uso desenfreado desses trouxe muitos problemas ao longo do tempo, entre os quais o surgimento de cepas resistentes. (CIPRIANO, 2022).

Diante de tais impactos negativos, métodos de controle de doenças que sejam menos agressivos vêm sendo estudados, entre eles, o uso de óleos essenciais (OEs). Estes apresentam compostos químicos que podem causar toxicidade direta, ou gerar um fortalecimento nas estruturas da planta, incrementando assim sua resistência à penetração dos micélios dos fungos (ORDOÑEZ LOZADA, 2016).

Os OEs são compostos voláteis, de baixa massa molecular, derivados do metabolismo secundário de plantas (CIPRIANO, 2022). Entre as ações farmacológicas desses compostos,



destacam-se, as fungistáticas e/ou fungicidas. Entre as plantas que possuem na sua composição OEs com estas funções destacam-se o *Eucalyptus globulus* Labill e a *Eucalyptus dunnii* Maiden (Myrtaceae).

Em vista disso, o objetivo do estudo é determinar a atividade fungistática dos OEs de *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus globulus* para o fungo *Aspergillus flavus*.

METODOLOGIA

O fungo fitopatogênico *Aspergillus flavus* foi cultivado e analisado no Laboratório de Microbiologia da UNIJUÍ, a partir de cepa liofilizada padrão de cultura pura.

Para o cultivo do fungos na fase de testes foram preparadas placas de Petri descartáveis estéreis, de 90 x 15 mm com meio de cultura batata-dextrose ágar (BDA), adquirido sob a forma desidratada (Kasvi®), o qual foi preparado e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Após atingir a temperatura de 50°C, foram vertidos 20 mL de meio de cultura por placa de Petri. Posteriormente à solidificação do BDA, as cepas padrão ATCC de *Aspergillus flavus* foram semeadas em movimento de estrias (zig-zag) com auxílio de um swab estéril, em bancada, próximo à chama. Em seguida as placas foram vedadas com filme plástico (Policloreto de Vinila – PVC), identificadas e incubadas invertidas em estufa bacteriológica à temperatura de 27°C ±2°C, no escuro, por um período de 7 dias.

Para avaliação *in vitro* da atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos foram distribuídos individualmente 50µL das diluições do óleo essencial na superfície do meio de cultura BDA nas placas de Petri estéreis, com auxílio de uma alça estéril descartável tipo Drigalsky. Após a distribuição, no centro de cada placa foram repicados individualmente os materiais fúngicos ATCC de *A. flavus*, com 7 a 12 dias de crescimento. Para os repiques, foi coletada uma pequena porção de micélio, a partir da borda da colônia, com o auxílio de palitos de madeira esterilizados em autoclave, conforme técnicas adaptadas de Sarmiento-Brum et al. (2013), e do teste de estabilidade mitótica utilizada por Tamietti (2018).

Para o controle negativo repetiu-se o processo anterior, contudo com o uso de água destilada estéril acrescida de Tween® 80 a 2%. Para o controle do crescimento dos micélios fúngicos foi utilizado apenas o meio de cultura BDA em placas estéreis, nas quais os fungos foram repicados.

As placas foram vedadas com filme plástico PVC, identificadas e incubadas invertidas em estufa bacteriológica à temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12h. Estas foram distribuídas inteiramente ao acaso com três repetições para cada tratamento e com três ensaios independentes, para a certificação do teste.

A avaliação do crescimento micelial das colônias fúngicas foi realizada com auxílio de régua milimetrada, realizando-se medições em duas direções perpendiculares do diâmetro do crescimento destas colônias. As leituras foram realizadas a cada 24h, perdurando até o momento em que as colônias atingiram $3/4$ da superfície do meio de cultura, sendo calculada posteriormente a média geral do crescimento fúngico (VENTUROSOS et al., 2011). Determinou-se com base no crescimento linear dos fungos como melhor tempo experimental o período de 48 horas de incubação das placas, momento em que se avaliou estatisticamente, o comportamento das diferentes concentrações dos óleos essenciais frente ao crescimento fúngico, comparando-o ao controle negativo.

A taxa de crescimento dos fitopatógenos foi mensurada e os dados foram plotados para obtenção de uma equação de regressão linear simples ($y = a + bx$), sendo (x) as horas de incubação, (y) o diâmetro final do micélio fúngico, (a) o diâmetro inicial do micélio fúngico e (b) a taxa de crescimento micelial, determinada pelo coeficiente de regressão.

A partir das medidas do diâmetro do micélio fúngico, calculou-se o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) utilizando a fórmula descrita por Oliveira (1991):

$$IVCM = \sum \frac{(D - Da)}{N}$$

Sendo: **IVCM**= índice de velocidade de crescimento micelial. **D**= diâmetro médio atual da colônia. **Da**= diâmetro médio da colônia do dia anterior. **N**= número de horas após a inoculação.

Os testes foram realizados em triplicatas, e a média dos mesmos foi apresentada na tabela dos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os índices de velocidade de crescimento micelial de cada óleo essencial foram

compilados na Tabela 1.

Os resultados indicam uma redução na velocidade do crescimento dos fungos, com o aumento na concentração dos óleos essenciais aplicados.

Tabela 1: Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus dunnii* frente ao fungo *Aspergillus flavus*.

Concentração	E. globulus	E. dunnii	Controle positivo	Controle negativo
24 h				
10%	0,20 mm/h	0,20 mm/h	0,08 mm/h	0,16 mm/h
70%	0,12 mm/h	0,12 mm/h	-	-
48 h				
10%	0,20 mm/h	0,12 mm/h	0,08 mm/h	0,25 mm/h
70%	0,20 mm/h	0,16 mm/h	-	-

Legenda: mm: milímetros; h: horas. Fonte: O autor (2023)

Os valores variaram de 0,12 mm/h até 0,20 mm/h. Na maior concentração testada (700 $\mu\text{L mL}^{-1}$) constataram-se índices de velocidade de crescimento micelial (IVCM) semelhantes em ambos os óleos essenciais, nas primeiras 24 horas de experimento. *E. globulus*, com IVCM de 0,20 mm/h (100 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e 0,12 mm/h (700 $\mu\text{L mL}^{-1}$), e para *E. dunnii*, com IVCM de 0,20 mm/h (100 $\mu\text{L mL}^{-1}$), e 0,12 mm/h (700 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Após 48 horas, *E. globulus*, obteve a mesmo IVCM em ambas as concentrações. Já o *E. dunnii*, com IVCM de 0,12 mm/h (100 $\mu\text{L mL}^{-1}$), e 0,16 mm/h (700 $\mu\text{L mL}^{-1}$). evidenciou melhor efeito.

Conforme o esperado, na concentração de 700 $\mu\text{L mL}^{-1}$, houve um melhor efeito antifúngico dos óleos essenciais, quando comparado a concentração de 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$. O controle negativo cresceu rapidamente, 0,16 mm/h nas primeiras 24h e 0,25 mm após 48h, quando comparado aos demais tratamentos e ao controle positivo (fungicida comercial), 0,08 mm/h, demonstrando um efeito superior aos OEs, embora o óleo essencial de *E. globulus* apresentou resultados semelhantes na concentração de 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e 700 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Com os resultados pode-se constatar que os óleos essenciais utilizados, reduziram, mas não satisfatoriamente, o índice de velocidade do crescimento do fungo *Aspergillus*



flavus. Os inóculos de *Aspergillus flavus* foram preparados em solução salina estéril a partir de colônias jovens do fungo filamentososo com 7 dias de crescimento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial de eucalipto apresentou atividade antifúngica para *Aspergillus flavus* no teste realizado neste estudo, demonstrando que é possível utilizá-lo como método alternativo para o tratamento de doenças causadas por este fungo, entretanto são necessários mais estudos a fim de confirmar tais resultados, bem como identificar quais compostos químicos possuem esse efeito, ou se o mesmo se dá pela sinergia de todos os compostos presentes em tal óleo essencial. Além disso, também é importante avaliar sua eficácia e segurança por meio de testes toxicológicos e utilização em outros modelos.

Palavras-chave: Óleo essencial. *Aspergillus flavus*. Controle alternativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAIKE, S.; KELLER, N. P. *Aspergillus flavus*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 107–133, 2011.

CIPRIANO, Lavínia. Dissertação. Universidade federal de são carlos centro de ciências biológicas e saúde departamento de morfologia e patologia. 2022.

ORDOÑEZ LOZADA, Maria Isabel. **Eficiência de óleos essenciais para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. cepae em sementes de cebola e seu efeito na qualidade fisiológica**. Master, Universidade de Brasília, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.unb.br/handle/10482/21300>>. Acesso em: 26 fev. 2023.

VENTUROSOS, L. R., Bacchi, L. M. A., Gavassoni, W. L., Conus, L. A., Pontim, B. C. A., & Bergamin, A. C. (2011). **Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos**. *Summa Phytopathologica*, 37, 18–23. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052011000100003>