

Efeito antifúngico do óleo essencial de *Pogostemon cablin* sobre *Aspergillus flavus*

Antifungal effect of the *Pogostemon cablin* essential oil on *Aspergillus flavus*

RESUMO

Maria Eduarda Cordeiro Silva
dudoacordeiro@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil

Flávio Dias Ferreira
flavioferreira@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil

Vanessa Moura Batista Vieira
vanessavieira@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil

O uso de fungicidas sintéticos utilizados na cadeia produtiva de alimentos podem desencadear diversas doenças em humanos e animais, além resistência microbiana e danos ao meio ambiente. Tendo isto em vista, diversas pesquisas têm citados extratos naturais como os óleos essenciais, como uma alternativa para substituir estes compostos sintéticos, pois, não geram resíduos ao ambiente e efeitos adversos a humanos e animais. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de Patchouli (*Pogostemon cablin*) frente ao *Aspergillus flavus* através da concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição em caldo. Os resultados indicam que o óleo essencial avaliado não apresenta atividade antifúngica nas concentrações testadas (3,90 a 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), corroborando com resultados encontrados por outros autores, onde descreveram que a atividade antifúngica deste óleo essencial frente a outros microrganismos fora observada em concentrações superiores ao testado no presente estudo.

PALAVRAS-CHAVE: Essências e óleos essenciais. Fungicida. Patchouli.

ABSTRACT

The use of synthetic fungicides used in the food productivity chain can initiate several diseases in humans and in animals, in addition to causing microbial resistance and environmental problems. With this in mind, several studies have showed that natural extracts such as essential oils can be an alternative to replace these synthetic compounds, since they do not generate waste for the environment or provoke adverse effects in humans and animals. In this context, the aim of this study is to evaluate the antifungal activity of the Patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil, against *Aspergillus flavus* through the minimal inhibitory concentration by the broth microdilution technique. The results indicate that the essential oil analysed does not present antifungal activity in the tested concentrations (3,90 to 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), corroborating with the results of other authors, where they describe that the antifungal activity of this essential oil in front of several other microorganisms was observed in higher concentrations then the ones tested in this study.

KEYWORDS: Essences and essential oils. Fungicides. Patchouli.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos eucarióticos, multicelulares e filamentosos, que podem alterar o sabor e qualidade dos alimentos, causar transformações indesejáveis devido a deterioração ou ainda trazer riscos à saúde pela produção de micotoxinas (OLIVEIRA et al., 2013).

As micotoxinas são metabólitos secundários provenientes de fungos filamentosos, tais como *Aspergillus* sp., que contaminam os alimentos conforme entram em contato em alguma etapa da produção, desde a colheita até o armazenamento (GONÇALES et al., 2013).

O gênero *Aspergillus* representa os fungos mais recorrentes no meio ambiente, solo e especialmente em alimentos (ALVES et al. 2014). *Aspergillus* sp. se reproduzem por esporulação assexuada, sendo estreitamente correlacionada com a produção de determinadas micotoxinas (NI et al., 2010). Os fungos da espécie *Aspergillus flavus* são os principais produtores da aflatoxina, uma micotoxina carcinogênica, que contaminam uma variedade extensa de alimentos (ALVES et al. 2014).

O controle deste e outros fungos são de extrema importância na área de alimentos, diversas pesquisas vêm sendo realizadas na tentativa de reduzir o crescimento fúngico sem danificar o meio ambiente ou gerar danos à saúde do consumidor. Óleos essenciais, elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais e responsáveis por diversas funções necessárias para a sobrevivência da planta (LIMA et al., 2006), e apresentam diversas atividades biológicas incluindo efeito antifúngico (SOUZA et al., 2005)

Patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.) é uma espécie aromática pertencente à família Lamiaceae com atividades antifúngicas, anti-helmíntica e anti-tripanosoma (SOUZA & LORENZI, 2005). Ainda, este óleo essencial é amplamente utilizado em indústrias de perfume devido as propriedades fixadoras e fragrância (SUGIMURA et al., 2005). Neste sentido, objetivamos avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Pogostemon cablin* sobre o *Aspergillus flavus*.

MATERIAL E MÉTODOS

O óleo essencial das folhas e galhos de *Pogostemon cablin*, conhecido popularmente como Patchouli, foi adquirido da BioEssência[®], São Paulo, Brasil com extração por hidrodestilação.

Para a preparação da solução do óleo essencial de *P. cablin*, foi pesado 0,004 g do óleo essencial, dissolvido em 1000µL de uma solução de Tween 80 a 1% e agitado por 3 minutos no vórtex, no intuito de atingir a concentração de 4000 µg/mL.

O inóculo de *Aspergillus flavus* foi obtido do Laboratório de Toxicologia lotado no Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá. As amostras do fungo foram cobertas por 10 mL de solução salina 0,9%. A mistura de hifas, conídios e esporos foi filtrada e transferida para tubos cônicos esterilizados e deixada em repouso por 20 minutos para sedimentação. O

sobrenadante foi coletado, e a contagem do inóculo foi realizada em câmara de Neubauer obtendo uma concentração final de 10^5 UFC mL⁻¹.

A atividade antifúngica do óleo essencial foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo de acordo com o recomendado pelo *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), documento M38-A (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2002). O meio de cultura utilizado foi RPMI-1640 com L-glutamina, sem bicarbonato, tamponado com 0.165 M de ácido 3-[N-morfolino]- Propanosulfônico (MOPS) da Sigma-Aldrich®.

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram colocados 100 µL do meio em todos os poços das 3 primeiras linhas (para fazer em triplicata) em uma placa de 96 poços, logo em seguida foi colocado 100 µL da solução de óleo essencial nos poços da primeira coluna (somente as 3 primeiras linhas) e feito diluições seriadas até a coluna 10. Em todos os poços das 3 primeiras linhas foram adicionados 5 µL da solução de inóculo com exceção da coluna 11. As duas últimas colunas foram (11 e 12) foram controle negativo e controle fúngico, respectivamente, onde continha apenas meio na coluna 11 e meio de cultura e inóculo na linha 12. A placa foi colocada em estufa a 28 °C por 72 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliada a CIM do óleo essencial de *Pogostemon cablin* sobre o *Aspergillus flavus* utilizando a técnica de microdiluição em caldo nas concentrações entre 2000 µg.mL⁻¹ a 3,90 µg.mL⁻¹, nestas concentrações utilizadas não foram possíveis observar a atividade antifúngica do óleo essencial. Outros autores realizaram a determinação da atividade antifúngica do óleo essencial de patchouli, WANG et. al. (2002) testaram a atividade frente à *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, e *Candida krusei*, onde apresentaram uma CIM de 0.032 mg.mL⁻¹, 0.064 mg.mL⁻¹ e 0.257 mg.mL⁻¹, respectivamente, concentrações maiores às utilizadas em nesse trabalho.

Dechayont et al. (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana de soluções alcoólicas e aquosas de *Pogostemon cablin* frente à *C. albicans*, os resultados de CIM encontrados em ambas as soluções foram superiores a 5 mg.mL⁻¹.

Os estudos supracitados sugerem a necessidade de altas concentrações para a atividade inibidora do *P. cablin*, entretanto, os autores acreditam não ser viável a utilização de altas concentrações, pois conforme Aligiannis et al. (2001) o poder da atividade antimicrobiana para materiais vegetais, relacionada aos resultados da CIM, sendo considerado forte inibição para CIM até 500 µg/mL, inibição moderada CIM entre 600 e 1000 µg.mL⁻¹ e fraca inibição para CIM acima de 1000 µg.mL⁻¹.

Além disso, para certificar que o meio de cultura utilizado nos ensaios não apresentava contaminação foi incubado o controle negativo junto com as amostras, o qual não apresentou nenhum crescimento microbiano. Ainda, de acordo com OSTROSKY et. al. (2008) a técnica de microdiluição utilizada neste estudo tem reprodutibilidade e é altamente sensível quando comparado com outros métodos usados na literatura.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que o óleo essencial de *Pogostemon cablin* não apresentam atividade antifúngica frente ao *Aspergillus flavus* nas concentrações testadas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela bolsa concedida. Além disso, gostaria de agradecer ao Câmpus Medianeira e em especial ao Departamento Acadêmico de Alimentos por autorizar a utilização de laboratórios e equipamentos.

REFERÊNCIAS

ALIGIANNIS, N., KALPOUTZAKIS, E., MITAKU, S., CHINO, B. **Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 49, n. 9, p.4168-4170, 2001. Disponível em: <https://naturalingredient.org/wp/wp-content/uploads/Composition-and-Antimicrobial-Activity-of-the-Essential-Oils-of-Two-Origanum-Species.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2020.

ALVES, V.C., FILHO, F.C.C., PEREIRA, M.M.G., COSTA, A.P.R., MURATORI, M.C.S. **Identificação de espécies de *Aspergillus* e potencial toxigênico de *Aspergillus flavus* isolados de rações comerciais.** Revista Científica de Produção Animal, v. 16, n.2, p.131-136, 2014. Disponível em: <https://periodicos.ufpb.br/ojs/index.php/rcpa/article/view/42801/21345>. Acesso em: 12 ago. 2020.

DECHAYONT, B., RUAMDEE, P., POONNAIMUANG, S., MOKMUED, K., e CHUNTHORNG-ORN, J. (2017). **Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.** Journal of Botany, v, 2017, p. 1-6, 2017. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jb/2017/8310275/>. Acesso em: 12 ago. 2020.

GONÇALEZ E, SILVA JL, REIS TA, NAKAI VK, FELÍCIO JD, CORRÊA B. **Produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim.** Arquivos do Instituto Biológico, v, 80, n. 3, p. 1-6, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/aib/v80n3/08.pdf>. Acesso em: 23 ago. 2020.

LIMA, I.O., OLIVEIRA, R.A.G., LIMA, E.O., FARIAS, N.M.P., SOUZA, E.L. **Atividade antifúngica e óleos essenciais sobre espécies de *Candida*.** Revista Brasileira Farmacognosia, v.16, n.2, p.197-201, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbfar/v16n2/v16n2a11.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2020.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard M38-A.** National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2002.

NI, M., GAO, N., KWON, N.J., SHIN, K.S., YU, J.H. **Regulation of *Aspergillus* Conidiation** In: BORKOVICH, K., EBBOLE, D.J. (Eds.). **Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi.** Washington DC: American Society for Microbiology Press. 2010. 802 p.

OLIVEIRA JN, OLIVEIRA AV, MENEGHELLO ER. **Análise Molecular de espécies de *Aspergillus* contaminantes de uvas vendidas no comércio de Maringá PR.** Iniciação Científica CESUMAR, v. 15, n. 2, p. 157-163, 2013. Disponível em: <https://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/iccesumar/article/view/3193/2045>. Acesso em: 15 ago. 2020.

OSTROSKY, E., MIZUMOTO, M.K., LIMA, M.E.L., KANEKO, T.M., NISHIKAWA, S.O., FREITAS, B.R. **Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbfar/v18n2/26.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2020.

SOUZA, V.C; LORENZI, H. Botânica sistemática: **Guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII.** Sistemática Botânica. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2005. 639 p.

SUGIMURA, Y., KADOTANI, N., UEDA, Y., SHIMA, K., KITAJIMA, S., FURUSAWA, T., IKEGAMI, M. **Transgenic patchouli plants produced by Agrobacterium-mediated Transformation.** Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 82, n.3, p.251-257, 2005. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11240-005-1039-7>. Acesso em: 01 set. 2020.

WANG, G., DENG, J., MA, Y., SHI, M., & LI, B. **Mechanisms, clinically curative effects, and antifungal activities of cinnamon oil and pogostemon oil complex against three species of *Candida*.** Journal of Traditional Chinese Medicine, v. 32, n. 1, p.19-24, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254627212600260>. Acesso em: 12 ago. 2020.