



# ÓLEOS ESSENCIAIS DE *EUCALYPTUS GLOBULUS* E *EUCALYPTUS CITRIODORA* NO CONTROLE DE *ASPERGILLUS FLAVUS*

A. Carvalho

R. H. Esper; R.M. Silva; E. Gonzalez; J.D. Felício

Instituto Biológico, Centro de Sanidade Animal, Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, nº 1252, Vila Mariana, 04014 - 002, São Paulo, Brasil. Telefone: 55 11 5087 1754/1753 - reesper@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

Os fungos podem causar uma série de danos aos grãos durante o plantio e a colheita, bem como durante o armazenamento. Os impactos econômicos da invasão fúngica incluem a diminuição do poder de germinação, emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, cozimento, mudanças químicas e nutricionais com conseqüente perda da qualidade. Alguns fungos denominados toxigênicos, além de depreciarem produtos destinados à alimentação, têm a capacidade de produzir micotoxinas (Paster & Bullerman, 1988).

Micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas pelo metabolismo secundário de várias espécies de fungos filamentosos que contaminam alimentos no campo, no armazenamento ou após a manufatura (Moss, 1996). A ingestão de micotoxinas pode causar ao animal uma intoxicação (micotoxicose) podendo afetar o crescimento, desenvolver tumores e levar até mesmo a morte. Além dos efeitos citados, a ingestão de alimentos ou rações contaminados com aflatoxinas por animais, em geral, podem desencadear redução no crescimento, na produção de leite, de ovos, queda da fertilidade, anemia e morte dos animais (Maia & Siqueira, 2007). A FAO (2001) estima uma perda mundial de 25% dos grãos produzido, devido à contaminação por micotoxinas.

As aflatoxinas são micotoxinas produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, são conhecidas por serem potentes mutagênicos, cancerígenos, teratogênicos, hepatotóxicos, imunossupressores inibindo também vários sistemas metabólicos (Minto & Townsend, 1997). Dentre todas as aflatoxinas, a aflatoxina B1 (AFB1) é a mais conhecida por apresentar significativos riscos para a saúde animal e humana.

Apesar de várias substâncias químicas possuírem efeito inibidor da produção de micotoxinas e do crescimento de fungo, muitas delas não devem ser utilizadas, tendo em vista os seus efeitos perigosos sobre a saúde humana e animal (Jayashree & Subramanyam, 1999). O desenvolvimento de uma nova estratégia para o controle de *A. flavus* e *A. para-*

*siticus* e da contaminação de aflatoxinas utilizando produtos voláteis como os óleos essenciais, são de grande interesse devido a crescente necessidade que o mundo possui em reduzir o uso de substâncias químicas que podem afetar a saúde. Resultados deste tipo de pesquisa vão ao encontro dos anseios da sociedade que cada vez mais demandam por alimentos seguros (Bluma & Etcheverry, 2008).

As plantas produzem metabólitos secundários sendo que muitos deles apresentam atividade antimicrobiana, quer como parte de sua biossíntese normal ou em resposta ao ataque de patógenos ou estresse. Dentre estes metabólitos, os óleos essenciais são fortes promessas na luta contra a redução e a proliferação de microrganismos e / ou produção de toxinas. Vários trabalhos relatam o efeito de óleos essenciais e suas substâncias isoladas sobre espécies de fungos toxigênicos (Paranagama *et al.*, 2003, Omidbeygi *et al.*, 2007, Rasooli *et al.*, 2008).

Óleo essencial de espécies de *Eucalyptus* e seus constituintes principais possuem atividade tóxica contra um grande número de bactérias e fungos. Há relatos que eles reduzem o crescimento micelial e inibem a produção de esporos e germinação (Fiori *et al.*, 2000). Ramenzani *et al.*, (2002) relataram a inibição do crescimento de 06 espécies de fungos fitopatogênicos por óleo essencial de espécies de *Eucalyptus* e pelo monoterpeno citronelal, principal constituinte do óleo. Su *et al.*, (2006) relataram a atividade fungicida de óleo essencial de *Eucalyptus grandis*, *E. camaldulensis* e *E. citriodora* contra vários fungos dentre eles *Aspergillus clavatus* e *A. Níger*. Vilela *et al.*, (2009) relatam também a atividade inibidora do crescimento de *Aspergillus parasiticus* e da produção de aflatoxinas pelo óleo essencial de *Eucalyptus globulus* e pelo 1,8 - cineol, principal constituinte do óleo.

## OBJETIVOS

Este trabalho descreve o potencial do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora* em inibir o crescimento de *Aspergillus flavus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cepa de *Aspergillus flavus*

A cepa de *Aspergillus flavus* produtora de aflatoxina B1 utilizada foi isolada do solo de plantação de arroz e cedida pela Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia localizada no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)-Campinas - SP.

### Material Vegetal

Folhas de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora* foram coletadas em São Paulo-SP, no Instituto Biológico.

### Extração do óleo essencial

As folhas de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora* foram picotadas e submetidas à extração por hidrodestilação utilizando o aparelho Clevenger. O tempo de extração variou de 120 a 180 min, e o óleo essencial obtido foi seco em sulfato de sódio anidro e transferido para frascos apropriados e mantido em freezer.

### Determinação da sensibilidade fúngica ao óleo essencial

A determinação da sensibilidade fúngica aos óleos essenciais foi realizada através do método de superfície. Repiques de *Aspergillus flavus* foram transferidos para tubos contendo ágar batata dextrose e incubados por 10 dias a 25 °C para esporular. No 11º dia os esporos de *A. flavus* foram inoculados em placa de petri contendo ágar batata dextrose, e adicionou-se discos de papéis estéreis de 6 mm de diâmetro embebidos em óleo essencial e adicionados assepticamente na placa de petri. Como controle positivo foi empregado o fungicida Benlate 50 WP (5,27 mg/mL). As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias, durante este período foram realizadas leituras diárias dos halos de inibição, sendo considerado positivo halos superiores ou iguais a 1,0 cm. O teste foi realizado em triplicata.

## RESULTADOS

Os dados *in vitro* obtidos mostraram que após 5 dias de incubação o controle positivo inibiu o crescimento fúngico, formando um halo de 2,5 cm e o óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* formou um halo de 1,4 cm, mostrando um efeito inibidor do crescimento de *A. flavus* de 56%. Entretanto não foi observada formação de halo para o óleo essencial de *Eucalyptus globulosus* mostrando apenas um retardo na esporulação.

Os resultados obtidos neste trabalho com o óleo essencial de *E. globulus* mostraram apenas uma atividade fungistática e não fungicida como relatado por Vilela *et al.*, (2009), o que pode ser explicado devido às diferenças existentes entre os óleos essenciais que variam de acordo com a natureza dos constituintes, da composição, época do ano, localização, clima, tipo de solo, idade das folhas e método de extração. Outro dado discutível é o tempo de extração, Vilela *et al.*, (2009) extraiu o óleo das folhas por 1:00 hora e o óleo objeto deste estudo foi extraído por volta 2:00 horas, sendo que o tempo maior leva a extração de mais componentes como os sesquiterpenos. Embora a composição do óleo não tenha sido analisada, provavelmente suas constituições químicas são diferentes.

Estes fatos também corroboram com a diferença de atividade entre as duas espécies de *Eucalyptus*, pois apesar de terem sido coletadas na mesma época e localidade, pertencem a espécies diferentes, portanto com seus constituintes químicos também diferentes. Vários autores relatam (Batish, 2008) citronelal como o principal constituinte químico do *E. citriodora* e o 1,8 cineol é o principal componente de *E. globulus*.

Os óleos essenciais de Eucalipto possuem um largo espectro de ação antimicrobiano, sendo que os resultados obtidos comprovam o efeito antifúngico da espécie *E. citriodora*.

## CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que o óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* pode vir a ser uma alternativa ecológica para a proteção de produtos agrícolas contra infestação de *A. flavus*, colaborando assim na resolução de um grande problema para o agronegócio, principalmente no armazenamento de grãos. A utilização deste óleo essencial, não tóxico e constituído de substâncias muito voláteis no controle de fungo poderá dar uma grande colaboração para diminuição de resíduos de fungicida no ambiente e nos produtos agrícolas.

## REFERÊNCIAS

- Batish, D.R., Sing, H.P., Kohli, R.K., Kaur, S. 2008. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide Forest Ecology and Management 256, 2166 - 2174.
- Bluma, R. & Etcheverry, M. 2008. Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section Flavi growth parameters and aflatoxin accumulation Food Microbiology, v. 25, p.324-334.
- FAO, Food and Agriculture Organization. 2001. Manual on the Application of the HACCP System in mycotoxin Prevention and Control. FAO Food and Nutrition Paper 73.
- Fiori A.C.G., Schwan - Estrada, K.R.F., Stangarin, J.R., Scapim, C.A., Cruz, M.E.S., Pascholati, S.F. 2000. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. J. Phytopathol 148, 483 - 487.
- Jayashree, T. & Subramanyam, C. 1999. Antiaflatoxic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. Letters Applied Microbiology, v. 28, p.179 - 183. London.
- Maia, P.P. & Siqueira, M.E.P.B. 2007. Aflatoxinas em rações destinadas a cães, gatos e pássaros-uma revisão. Revista da FZVA, Uruguaiana, v. 14, n.1, p. 235 - 257.
- Moss, M.O. 1996. Mycotoxic fungi. Microbial Food Poisoning, Adrian R. Eley, 2ª edição, London, p.75 - 93.
- Minto, R.E. & Townsend, C.A. 1997. Enzymology and molecular biology of aflatoxin biosynthesis. Chemical Review, v. 97, p.2537-2555.
- Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z., Naghdibadi, H. 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus*

*flavus* in liquid medium and tomato paste. Food control, v. 18, p. 1518 - 1523.

**Paranagama, P.A., Abeysekera, K.H.T., Abeywickrama, K., Nugaliyadde, L. 2003.** Fungicidal and anti - aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice, Letters in Applied Microbiology, v. 37, p. 86 - 90.

**Paster, N. & Bullerman, L.B. 1988.** Mould spoilage and mycotoxins formation in grains as controlled by physical means. International Journal of Food Microbiology, v.7, p. 257 - 265.

**Rasooli, I., Fakoor, M.H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A., Rezaei, M.B. 2008.** Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils, International Journal of Food Microbiology, v. 122, n.1 - 2, p.135 - 139.

**Ramezani, H., Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli,**

**R.K. 2002.** Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. 2002. Fitoterapia, [S.l.], v. 73, p. 261 - 262.

**Su, Y.C. Ho, C.I., Wang, I. C., Chang, S. T. 2006.** Antifungal activities and chemical compositions of essential oils from leaves of four eucalypts. J. For. Sci. 21, 49 - 61.

**Vilela, G.R., Almeida, G.S., D'Árce, M.A.B.R., Moraes, M.H.D., Brito, J.O., Silva, M.F.G.F., Silva, S.C. Piedade, S.M.S, Calori - Domingues, M.A. Gloria, E.M. 2009.** Activity of essential oil its major compounds 1,8 - cineole from *Eucalyptus globules*, against the storage fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* J. of Stored Products Research 45, 108 - 111.

**Viuda - Martos, M., RUIZ, N.J., Fernandez, L., Perez, A.J. 2007.** Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. Food control, v.18, p.45 - 49.