

XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO NO CONTROLE DE *Aspergillus brasiliensis*

Filipe da Silva de Oliveira⁽¹⁾; Carlos Eduardo de Souza Teodoro⁽²⁾; Ana Paula Martinazzo⁽³⁾

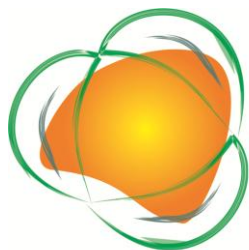
⁽¹⁾ Graduando em Engenharia de Agronegócios; Departamento de Engenharia de Agronegócios; Universidade Federal Fluminense; Volta Redonda – RJ; filipeoliveira@id.uff.br; ⁽²⁾ Professor Associado I; Departamento de Engenharia de Agronegócios; Universidade Federal Fluminense; Volta Redonda – RJ; eduardo@metal.eeimvr.uff.br; ⁽³⁾ Professora Associada I; Departamento de Engenharia de Agronegócios; Universidade Federal Fluminense; Volta Redonda – RJ; anapaulamartinazzo@id.uff.br.

EIXO TEMÁTICO: Conservação Ambiental e Produção Agrícola Sustentável

RESUMO – *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf., conhecido popularmente como capim-limão, vem sendo estudado devido as suas propriedades fungistáticas *in vitro* comprovadas. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo testar a efetividade de diferentes concentrações do óleo essencial da planta contra o *Aspergillus brasiliensis*. Foi verificada a composição do óleo através do processo de cromatografia gasosa (GC-MS), onde geranial (44,36%) e neral (31,83%) foram os elementos principais e suas respectivas concentrações no óleo analisado. O meio de cultura batata Dextrose Ágar (BDA) foi inoculado em placas de Petri contendo o óleo essencial, então deixadas incubadas em BOD por oito dias a 30°C. A inibição de crescimento micelial foi verificada diariamente, usando as concentrações de 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0µL/ml. Verificou-se que dosagens a partir de 0,2µL/ml se diferem estatisticamente do tratamento controle pelo teste de Scott-Knott à 5% a partir do segundo dia de análise. Com isso, pôde ser quantificada a inibição de crescimento *in vitro* do fungo *Aspergillus brasiliensis* sob efeito do óleo essencial de capim-limão, demonstrando sua eficiência como inibidor do crescimento deste fungo.

Palavras-chave: *Cymbopogon citratus*. Grãos Armazenados. Fungicida Natural. Citral.

ABSTRACT – *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., popularly known as lemon grass, has been studied due to its proven fungistatic *in vitro* properties. Thus, this study aims to test the effectiveness of different essential oil concentrations of this plant against *Aspergillus brasiliensis*. The oil composition was verified by the gas chromatography method (GC-MS), where geranial (44.36%) and neral (31.83%) were the main components identified in the essential oil. Potato Dextrose Agar (PDA) was inoculated into Petri dishes containing the essential oil, then incubated until it colonized the whole Petri dish, under 30°C. Inhibition of mycelial growth was daily checked using concentrations of 0; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 and 1.0µL / mL. It was found that doses higher than 0,2µL/ml statistically differed from the control sample by Scott-Knott test at a 5% level of significance beginning on the second day of analysis. Thus, it could be quantified the *in vitro* fungus growth inhibition of *Aspergillus*



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

brasiliensis under the effect of essential oil of lemongrass, demonstrating its efficiency as a growth inhibitor of this fungus.

Key words: *Cymbopogon citratus*. Stored Grains. Natural Fungicide. Citral.

Introdução

A utilização de óleos essenciais de espécies vegetais pode constituir uma forma efetiva de controle de pragas de grãos armazenados, como os fungos, gerando produtos ecologicamente limpos e sem riscos à saúde.

Atualmente, em países em desenvolvimento tem-se a preocupação durante a pós-colheita de grãos em se minimizar as perdas geradas neste intervalo devido a secagens mal processadas, transporte inadequado ou ainda uma armazenagem imprópria (EMBRAPA, 2011).

Inúmeros são os fatores que resultam em armazenagem inapropriada, podendo ser citadas a quantidade de impurezas e matérias estranhas, o teor de água nos grãos, a temperatura na qual a armazenagem será realizada, a disponibilidade de oxigênio e a presença de roedores e insetos (CHRISTENSEN e KAUFMANN, 1965).

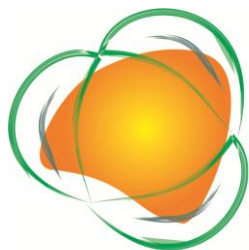
Na agricultura, definem-se dois tipos de fungos que trazem malefícios a produção de grãos: os fungos de campo e os de armazenamento, sendo que estes são comumente encontrados em armazéns e locais de armazenagem de grãos em toda extensão territorial do Brasil (PIMENTEL et al., 2011). Porém, alguns deles são responsáveis por produzir metabólitos secundários, denominados micotoxinas, que causam micotoxicoses, sendo estas responsáveis por diferentes doenças em animais (CAWOOD, 1991).

O gênero *Aspergillus* traz malefícios aos animais através da dispersão de micotoxinas ainda durante o armazenamento, sendo que estes metabólitos persistem ao longo do processamento dos grãos tendo já sido encontrados em rações destinadas a bovinos e frangos de corte, as quais causaram comprovadas perdas de rendimento nos animais (GIACOMINI, 2006; PIEREZAN, 2012).

A aplicação indevida de agroquímicos no Brasil, ainda é largamente utilizada, causando danos ao meio ambiente e aos consumidores, além de causar resistência a fungos fitopatogênicos (SOARES et al., 2000; BOZIKI, 2011).

Devido ao fato de se encontrar, comumente, em grãos armazenados e alimentos, fungos produtores de micotoxinas, as quais trazem danos econômicos e de saúde, a busca por meios antifúngicos é ampla (FANG et al., 1994). Uma das formas de se impedir a ação fúngica em grãos armazenados, que vem demonstrando interesse em pesquisadores de diferentes partes do mundo, é através da aplicação de óleos essenciais (BLUMA e ETCHEVERRY, 2007; ADEGOKE e ODESOLA, 1995; PARANAGAMA et al., 2003; TATSADJIEU et al., 2010).

O *Cymbopogon citratus* conhecido popularmente como capim-limão, erva-cidreira ou capim-santo, é uma espécie produtora de óleo essencial, originária da Índia, que se desenvolve em todo o Brasil (SILVA et al., 2010).



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

Espécies fúngicas já apresentaram comprovada sensibilidade ao óleo essencial de capim-limão, tendo o desenvolvimento comprometido quando submetidos à sua aplicação (GUIMARÃES, et al., 2011; BRUM, 2012). A atividade antimicrobiana do óleo de capim-limão reside, conforme sugerem estudos já realizados, principalmente nas estruturas geranial e neral (ONAWUNMI et al. 1984; ABEGAZ e YOHANNES, 1983).

Portanto, o presente trabalho propõe uma alternativa segura à utilização de produtos químicos para o controle *in vitro* do fungo *Aspergillus brasiliensis* sob efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Escola de Engenharia Industrial Metalúrgica de Volta Redonda, entre Dezembro de 2015 e Janeiro de 2016.

O óleo essencial de capim-limão fora obtido na empresa Argila Indústria & Comércio de Cosméticos. As cepas contendo fungo *A. brasiliensis* com o código de identificação CCCD AA002 foram obtidas na empresa Didática Scientific Eireli.

Na condução do experimento, adicionou-se em placas de Petri, previamente esterilizadas a 121°C por quinze minutos em autoclave, 20mL de meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) as quais continham concentrações de 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0µL/ml de óleo essencial de *C. citratus* e 1% de DMSO (dimetilsulfuróxido).

Então as placas foram encubadas em BOD sob 30°C até que a placa controle fosse completamente preenchida, onde neste caso ocorreu no oitavo dia. Mensurações diárias foram feitas usando-se de paquímetro digital a fim de se verificar o crescimento radial dos fungos.

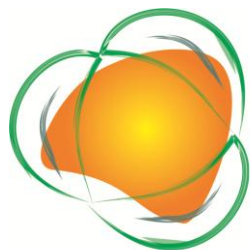
A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada aos tratamentos que não foram acrescentados óleo essencial. Assim como descrito por Tatsadjieu et al. (2009), a verificação da inibição do crescimento micelial (T_c) foi feita utilizando-se a seguinte equação:

$$T_c = \frac{G_c - G_o}{G_c} \cdot 100$$

Onde, G_c representa as medidas referentes à amostra controle enquanto que G_o se refere às amostras tratadas.

A análise do óleo essencial realizou-se por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) no modelo CGMS-QP2010 Plus, da marca SHIMADZU.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições para cada tratamento e as diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste de Scott-Knott a um nível de 5% de significância. As análises de variância foram realizadas com o auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2011).



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

Resultados e Discussões

Na análise cromatográfica do óleo essencial utilizado, verificou-se a presença de 30 componentes; dentre os principais, destaca-se como majoritário o citral, mistura dos isômeros neral, 31,83%, e geranial, 44,36%. Resultados estes que se aproximam com os de Boukhatem et al. (2014), os quais encontraram valores de 42,2% e 31,5% de neral e geranial, respectivamente.

Assim como descrito por Mahanta et al. (2007), foram verificados efeitos inibitórios no crescimento de *Aspergillus* spp. Devido à aplicação do óleo essencial de *C. citratus*. A porcentagem de inibição de crescimento foi significativamente ($P < 0,05$) alterada pela concentração do óleo e pelo tempo de incubação.

A Figura 1 apresenta inibição do crescimento do fungo *Aspergillus brasiliensis* nas diferentes doses testadas.

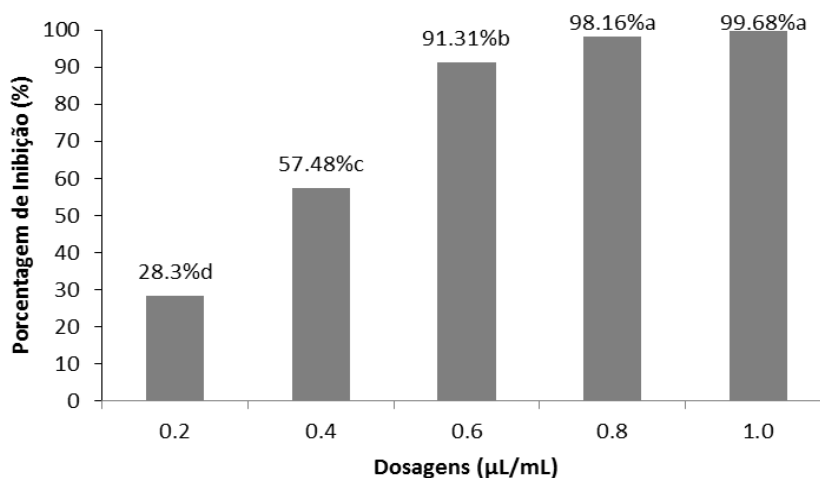
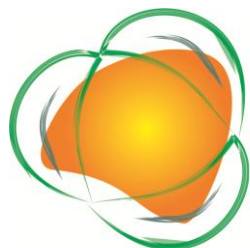


Figura 1: Inibição de crescimento através da aplicação *in vitro* de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sob o crescimento de *Aspergillus brasiliensis*.

As médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Observa-se pela Figura 1 que houve inibição crescente do fungo de acordo com a quantidade de óleo essencial aplicada, ou seja, quanto maior a dose utilizada, maior o controle do microrganismo estudado. Nota-se ainda que não houve diferença estatística significativa entre as maiores doses avaliadas, 0,8 e 1,0µL/mL, para as quais a porcentagem de inibição foi próximo a 100%. Resultados semelhantes foram obtidos por Paranagama et al. (2003) ao avaliarem a atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* no fungo *Aspergillus flavus*.



XIII Congresso Nacional de MEIO AMBIENTE de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

A ação inibitória das diferentes doses do óleo essencial em relação ao tratamento controle pode ser observada na Figura 2, a qual apresenta o crescimento do diâmetro das colônias em função do período de incubação. Assim como visto por Sousa et. al. (2012), o aumento da dosagem utilizada de óleo essencial ao longo dos dias, implica em uma tendência a não aumentar o diâmetro de crescimento. Podendo-se concluir que, ao elevar-se a dosagem, diminui-se a taxa de crescimento do fungo, comprovando então a eficiência da utilização do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* para o controle fúngico de *Aspergillus brasiliensis*.

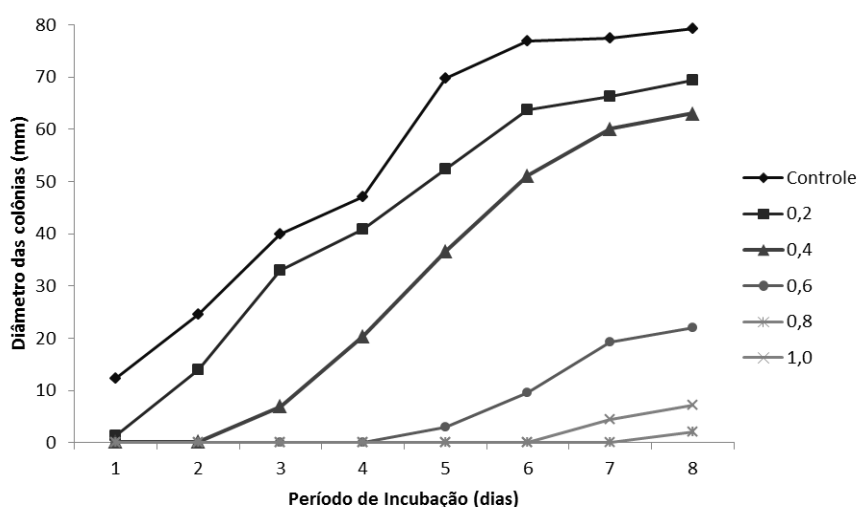


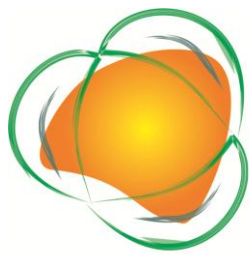
Figura 2: Efeito de diferentes concentrações de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* no crescimento de *Aspergillus brasiliensis*.

A Tabela 1 apresenta a análise estatística da porcentagem média de inibição do fungo em função das dosagens e período de incubação.

Tabela 1: Porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Aspergillus brasiliensis* ao longo dos dias sob diferentes dosagens de óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

Dosagem de óleo essencial ($\mu\text{L/mL}$)	Período de Incubação (dias)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0,2	90 ^{Aa}	43 ^{Bb}	18 ^{Cc}	6 ^{Cc}	25 ^{Cc}	17 ^{Cc}	15 ^{Cc}	12 ^{Cc}
0,4	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	83 ^{Bb}	53 ^{Cb}	48 ^{Cb}	33 ^{Db}	22 ^{Dc}	20 ^{Dc}
0,6	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	96 ^{Aa}	87 ^{Aa}	75 ^{Bb}	72 ^{Bb}
0,8	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	97 ^{Aa}
1,0	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	100 ^{Aa}	94 ^{Aa}	91 ^{Aa}

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

Verifica-se pela Tabela 1 que a dosagem de 0,2 $\mu\text{L/mL}$ foi a menos eficiente, ao longo do período de incubação, com acentuada diminuição na inibição do fungo. A partir do terceiro dia observa-se que demais doses começam a diferir entre si, sendo mantidos valores estatisticamente semelhantes de inibição nas doses de 0,6; 0,8 e 1,0 $\mu\text{L/mL}$. Sendo que ao final do período de oito dias, somente as doses de 0,8 e 1,0 $\mu\text{L/mL}$, mantiveram-se eficientes no controle do microrganismo. Tzortzakis et al. (2007) verificaram que o óleo essencial de capim-limão foi suficiente para impedir o desenvolvimento, *in vitro*, do fungo *A. niger* ao longo de seis dias.

Diversos trabalhos têm mostrado a eficácia de óleos essenciais no controle de fungos do gênero *Aspergillus*, considerados importantes agentes decompositores de alimentos. Como Tatsadjieu et al. (2009), que observaram porcentagem de inibição variando de 10, 31, 74 e 87% para as doses 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 $\mu\text{L/mL}$ do óleo essencial de *Lippia rugosa*. Pereira et al. (2006) que testaram os óleos essenciais de alecrim, cebola, manjerição, menta e orégano, os quais observaram um efeito pronunciado de inibição sobre o fungo a partir da concentração de 1.500 mg/mL. Segundo os autores, os óleos essenciais por se tratarem de misturas complexas de diferentes compostos devem ser identificados e testados separadamente com o intuito de elucidar a ação destes compostos sobre o comportamento dos fungos. Da mesma forma Pawar et al. (2006) testaram 75 diferentes tipos de óleo essencial com as mesmas doses em *Aspergillus niger*, sendo que o capim-limão ficou entre os cinco melhores inibidores de crescimento deste fungo, onde os autores associam tal capacidade de inibição ao componente citral. Por outro lado, de acordo com Saikia et al. (2001), a utilização do óleo essencial do capim-limão teve maior inibição no crescimento de *A. niger* do que o citral separadamente.

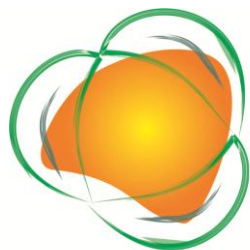
Conclusões

De acordo com os resultados deste trabalho, verificou-se que o óleo essencial de *C. citratus* pode ser considerado um potencial fungicida no controle de *A. brasiliensis*, obtendo 28,30; 57,48; 91,31; 98,16 e 99,68% de inibição *in vitro* nas doses de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 $\mu\text{L/mL}$. A continuidade da pesquisa será relacionada à avaliação do citral, principal componente do óleo essencial de *C. citratus* no controle do *A. brasiliensis*. Além disso, pesquisas posteriores devem ser realizadas a fim de se verificar a segurança da saúde do consumidor e do meio-ambiente, com a utilização do óleo essencial como produto fungicida.

Referências Bibliográficas

ABEGAZ, B. et al., Constituents of the essential oil of Ethiopian *Cymbopogon citratus* stapf. *Journal of Natural Products*, Washington, v. 46, n.3, p. 424-426, 1983.

ADEGOKE, G. O.; ODESOLA, B. A., Microbial powder maize and cowpea and inhibition of agents of biodeterioration using the and essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus*). *International Biodeterioration & Biodegradation*, [S.l.], p. 81-84, 1996.



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

BLUMA, R. V.; ETCHEVERRY, M. G. Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section Flavi growth parameters and aflatoxin accumulation. Food Microbiology, Amsterdam v. 25, p. 324-334, 2007.

BOUKHATEM, M. N., et al. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. Libyan Journal of Medicine, Lund, v. 9, p. 2014.

BOZIKI, D.; SILVA, L. B.; PRINTES, R. C. Situação atual da utilização de agrotóxicos e destinação de embalagens na área de proteção ambiental estadual Rota Sol, Rio Grande de Sul, Brasil. Revista Visões Transdisciplinares Sobre Ambiente e Sociedade, Niterói, v. 1, set. 2011.

BRUM, R. B. C. S. Efeito de óleos essenciais no controle de fungos fitopagênicos. Janeiro, 2012. 1-135. Dissertação – Universidade Federal do Tocantins. Gurupi, Jan. 2012.

CAWOOD, M. J. U., et al. Isolation of the fumonisin mycotoxins: a quantitative approach. Journal of agriculture, Food and Chemistry, [S.I.], v. 39, n. 11, p. 1958-1962, 1991.

CHRISTENSEN C. M.; KAUFMANN H. H., Deterioration of stored grains by fungi. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v. 3, p. 69-84, 1965.

EMBRAPA. Recomendações para o controle de pragas de grãos e de sementes armazenadas, Sete Lagoas, 2011. Acesso em 22 de Agosto de 2016. Online. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/477117/1/Recomendacoescontrole.pdf>>.

FANG, S. W., et al., Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. Journal of Food Protection, Des Moines, v. 56, p. 136-140, 1994.

FERREIRA, D. F., Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

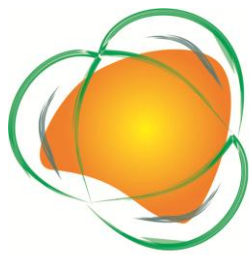
GIACOMINI, L.Z. et al. Desempenho e plumagem de frangos de corte intoxicados por aflatoxinas. Ciência Rural, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 234-239, 2006.

GUIMARÃES, L. G. L., et al. Atividades antioxidante fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. Revista Ciência Agronômica, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 464-472, 2011.

MAHANTA, J. J., et al., *Cymbopogon citratus* L. essential oil as a potential antifungal agent against key weed moulds of *Pleurotus* spp. Spawns. Flavour and Fragrance Journal, [S.I.], v. 22, p. 525-530, 2007.

ONAWUNMI, G. O., et al., Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. Journal of Ethnopharmacology, [S.I.], v. 12, p. 279-286, 1984.

PARANAGAMA, P.A. et al., Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemon grass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. Letters in Applied Microbiology, [Bedford], v. 37, p. 86-90, 2003.



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

PAWAR V. THAKER V. *In vitro* efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. Mycoses: Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases, [S.l.], v. 49, p. 316-23, 2006.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N.; PICOLLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. Revista Ciência agrônômica, Fortaleza, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PIEREZAN, F. et al. Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v. 32, n. 7, p. 607-618, 2012.

SAIKIA, D., KHANUJA, S. P. S., KAHOL, A. P., GURTA, A. P., e KUMAR, S. Comparative antifungal activity of essential oils and constituents from three distinct genotypes of *Cymbopogon* spp. Current Science, Bengaluru, v. 80, p. 1264-1266, 2001.

SILVA, M. A. L. et al., Avaliação da composição química de *Cymbopogon citratus* Stapf cultivado em ambientes com diferentes níveis de poluição e a influência na composição do chá. Acta Scientiarum, Maringá, v. 32, n. 1, p. 67-72, 2010.

SOARES, W. L., et al., Trabalho rural e saúde: intoxicações por agrotóxicos no município de Teresópolis – RJ. Revista de Economia e Sociologia Rural, [S.l.], v. 43, n. 4, p. 685-701, 2005.

Sousa, R.M.S; Serra, I.M.R.S; Melo, T.A. Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, em pimenta. Summa Phytopathologica, Botucatu, v.38, n.1, p.42-47, 2012.

TATSADJIEU, N. L., et al., Comparative study of the simultaneous action of three essential oils on *Aspergillus flavus* and *Sitophilus zeamais* Motsch. Food Control, [S.l.], v. 21, p. 186-190, 2010.

TATSADJIEU, N. L., et al., Investigations on the essential oil of *Lippia rugose* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. Food Control, [S.l.], v. 20, p. 161-166, 2009.

TZORTZAKIS, N. G., ECONOMAKIS, C. D., Antifungal activity of lemon grass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. Innovative Food Science and Emerging Technologies, [S.l.], v. 8, p. 253-258, 2007.