

Fungitoxidade e composição química do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) sobre o *Aspergillus flavus*

Fungitoxity and chemical composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) on *Aspergillus flavus*

Fungitoxidad y composición química del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) en *Aspergillus flavus*

Recebido: 14/06/2020 | Revisado: 15/06/2020 | Aceito: 17/06/2020 | Publicado: 29/06/2020

Lundoi Tobias Lee

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6055-3972>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: lundoilee@id.uff.br

Sabrina Aires Garcia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4389-7420>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: sabrina_aires@id.uff.br

Ana Paula Martinazzo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0704-2986>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: anapaulamartinazzo@id.uff.br

Carlos Eduardo de Souza Teodoro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8591-0502>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: carlosteodoro@id.uff.br

Resumo

Os fungos estão entre os principais responsáveis por danos e perdas em diversos alimentos. Possuem a capacidade de produzir metabólitos secundários quando submetidos a condições ideais, conhecidos como micotoxinas, substâncias altamente tóxicas que podem contaminar os produtos destinados à alimentação tanto humana como animal causando danos para a saúde. O controle destes fungos tem sido feito por meio de substâncias sintéticas, que são prejudiciais ao homem e ao meio ambiente. Desta forma faz-se necessária a busca por métodos alternativos do controle desses microrganismos. Neste contexto, os óleos essenciais

mostram-se como possível opção. O objetivo deste estudo foi identificar os principais componentes e avaliar a eficácia do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) para controle do fungo *Aspergillus flavus*. Inicialmente verificou-se o efeito dos óleos essenciais sobre o crescimento micelial do fungo em testes *in vitro* nas doses de: 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8; 15; 17,5; 20; 22,5 e 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, sendo esta a dose de maior controle fúngico. Baseando-se nos resultados dos testes *in vitro*, foi realizada a microdiluição seriada em microplacas para encontrar concentração mínima inibitória, a qual foi de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Os resultados demonstraram que o óleo essencial apresentou potencial fungicida sobre o *A. flavus*. Os principais componentes do óleo essencial, identificados por cromatografia gasosa, em ordem de concentração, foram: 1,8-cineol, cânfora e o β -pineno.

Palavras-chave: Fungo; Planta aromática; Controle.

Abstract

Fungi are among the main responsible for damage and loss in various foods. They have the ability to produce secondary metabolites when subjected to ideal conditions, known as mycotoxins, highly toxic substances that can contaminate products intended for both human and animal food causing damage to health. The control of these fungi has been done through synthetic substances, which are harmful to man and the environment. Thus, it is necessary to search for alternative methods of controlling these microorganisms. In this context, essential oils are a possible option. The objective of this study was to identify the main components and evaluate the effectiveness of the essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) for controlling the fungus *Aspergillus flavus*. Initially, the effect of essential oils on mycelial growth of the fungus was verified in *in vitro* tests at doses of: 0.8; 1.6; 3.2; 6.4; 12.8; 15; 17.5; 20; 22.5 and 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, this being the dose with the greatest fungal control. Based on the results of the *in vitro* tests, serial microdilution was performed in microplates to find the minimum inhibitory concentration, which was 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$. The results showed that the essential oil showed fungicidal potential on *A. flavus*. The main components of the essential oil, identified by gas chromatography, in order of concentration, were: 1,8-cineol, camphor and β -pinene.

Keywords: Fungus; Aromatic plant; Control.

Resumen

Los hongos se encuentran entre los principales responsables de daños y pérdidas en varios alimentos. Tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios cuando se someten a

condiciones ideales, conocidas como micotoxinas, sustancias altamente tóxicas que pueden contaminar productos destinados a la alimentación humana y animal, causando daños a la salud. El control de estos hongos se ha realizado a través de sustancias sintéticas, que son perjudiciales para el hombre y el medio ambiente. Por lo tanto, es necesario buscar métodos alternativos para controlar estos microorganismos. En este contexto, los aceites esenciales son una posible opción. El objetivo de este estudio fue identificar los componentes principales y evaluar la efectividad del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) para controlar el hongo *Aspergillus flavus*. Inicialmente, el efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento micelial del hongo se verificó en pruebas in vitro a dosis de: 0.8; 1,6; 3.2; 6.4; 12,8; 15; 17,5; 20; 22.5 y 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, siendo esta la dosis con el mayor control fúngico. Con base en los resultados de las pruebas in vitro, se realizó una microdilución en serie en microplacas para encontrar la concentración inhibitoria mínima, que fue de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Los resultados mostraron que el aceite esencial mostró potencial fungicida en *A. flavus*. Los principales componentes del aceite esencial, identificados por cromatografía de gases, en orden de concentración, fueron: 1,8-cineol, alcanfor y β -pineno.

Palabras clave: Hongo; Planta aromática; Control.

1. Introdução

Os fungos estão distribuídos de maneira abundante na natureza e apresentam importância econômica, são utilizados na produção de alimentos, medicamentos, enzimas e ácidos orgânicos (Yu et al., 2010). Algumas espécies de fungos provocam deterioração em alimentos e se tornam motivo de preocupação para a indústria alimentícia e para a saúde pública, pois além de reduzirem o valor nutricional dos alimentos também podem produzir micotoxinas, substâncias tóxicas produzidas através dos metabólitos secundários e podem provocar intoxicação em humanos e animais (Prakash et al., 2015).

Fungos da espécie *Aspergillus flavus* são conhecidos por serem os principais produtores da micotoxina Aflatoxina, podem contaminar de forma direta uma grande variedade de alimentos (Alves et al., 2014). O controle de pragas é um dos maiores problemas que os produtores agrícolas enfrentam e para realizar esse monitoramento utiliza-se de compostos químicos sintéticos, a utilização destes acarreta em algumas consequências como a poluição ambiental, descaracterização da produção orgânica que a cada dia conquista mais adeptos, e o fato que esses organismos adquirem resistência a esses produtos tornando-os ineficientes no controle de pragas (Hillen et al., 2012; Anžlovar et al., 2017). Neste contexto

tem se buscado alternativas naturais, que não provoque a contaminação ambiental e os produtos de bases naturais, como os óleos essenciais vem ganhando destaque como medidas alternativas.

A espécie *Rosmarinus officinalis*, pertencente a família *Lamiaceae*, é conhecida popularmente como alecrim, alecrim de cheiro, alecrim verdadeiro, rosmarinho. é uma planta de pequeno porte, muito aromática, nativa da região do Mediterrâneo, utilizada mundialmente como condimento além de possuir indicações farmacêuticas. Seu óleo essencial é constituído por uma mistura de componentes voláteis o que caracteriza o odor típico, entre eles estão principalmente o cineol, α -pineno e a cânfora, entre os não voláteis estão o ácido caféico, diterpenos amargos, flavonóides e triterpenóides (Araújo et al., 2013; Faeq et al., 2017).

Estudos como de Chao et al. (2000); Rasooli et al. (2008); Moghtader et al. (2011); Ribeiro-Santos et al. (2017); Prakash et al. (2018); Martinazzo et al. (2019), atestaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais sobre alguns microrganismos e apresentaram resultados diversificados.

O objetivo desse estudo foi identificar os principais componentes e avaliar o potencial fungicida do óleo essencial de alecrim (*R. officinalis*), sobre o fungo *A. flavus*, testando diferentes dosagens e determinando a concentração mínima inibitória.

2. Metodologia

O presente trabalho caracteriza-se de natureza aplicada, desenvolvido em laboratório, de forma experimental, com abordagem mista - qualitativa e quantitativa (Creswell & Plano Clark, 2011; Pereira et al., 2018). Os fungos utilizados, *Aspergillus flavus* (IOC 4102) foram fornecidos da Coleção de Cultura de Fungos Filamentosos pela FIOCRUZ.

O crescimento dos fungos foi realizado em meio BDA (batata, dextrose e ágar) em placas de Petri a 30°C durante 7 dias. Para realizar a coleta dos esporos foram adicionados 15 mL de água destilada estéril sobre placa de Petri que continha meio BDA e a colônia do fungo crescido. Os conídios foram coletados com auxílio de pipeta. A suspensão de esporos foi ajustada com água destilada estéril, para se obter a concentração final de $4,5 \times 10^6$ esporos. mL⁻¹ com o uso da câmara de Neubauer. A suspensão foi armazenada a 4°C até ser utilizada (Martinazzo et al., 2019).

O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), foi adquirido da empresa Ferquima® (Ind. e Com. Ltda.). A análise dos constituintes do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/EM). A coluna cromatográfica

utilizada foi do tipo capilar de sílica fundida com fase estacionária DB-5 (0,25 µm de espessura, 30 m comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno). Utilizado hélio como gás carreador a um fluxo de 1,0 mL/minuto. A temperatura de 220°C no injetor e 240°C no detector. A temperatura inicial do forno mantida a 60°C por dois minutos, sendo programada para ter acréscimos de 3°C a cada minuto até atingir a temperatura máxima de 240°C, na qual foi mantida por mais 30 minutos fornecendo um tempo de análise de 91 minutos. A razão de split utilizada foi de 1:20 e o tempo de corte do solvente de 5 minutos. O volume da amostra injetado 1 µL, na concentração de 10.000 ppm, utilizando como solvente o hexano. A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massas obtidos com os do banco de dados do aparelho e pelo Índice de Retenção de Kovats (IK) de cada componente (Lanças, 1993). A análise quantitativa dos principais componentes do óleo essencial, expressa em porcentagem, foi realizada pelo método de normalização de integração de área dos picos, conforme descrito por Zhang et al. (2006).

No ensaio antifúngico *in vitro* foram testadas as seguintes doses do óleo essencial de alecrim: 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8; 15; 17,5; 20; 22,5 e 25 µL/mL. Para facilitar a dispersão do óleo essencial através do meio de cultura, utilizou-se o surfactante DMSO (dimetilsulfóxido) a 1%, para adição das doses ao meio BDA fundido (45°C). Após homogeneização, o meio foi vertido para placas de Petri e estas incubadas com um disco micelial de 7 mm. As placas de controle, sem óleo essencial, foram inoculadas seguindo o mesmo procedimento. As placas foram incubadas a 30°C até a data em que o fungo tomasse toda a placa do controle, ou seja, entre 7 a 10 dias, sendo então finalizado o período de incubação. O diâmetro das colônias foi registrado diariamente por meio de um paquímetro digital. Os resultados foram expressos em termos de tamanho do diâmetro do halo do crescimento microbiano. A porcentagem de inibição do número de colônias (PI) foi calculada conforme Equação 01 (Billerbeck et al., 2001; Tatsadjieu et al., 2010).

$$PI = \frac{\varnothing_0 - \varnothing_T}{\varnothing_0} 100$$

(Equação 01)

Sendo:

\varnothing_0 = diâmetro médio do micélio no controle;

\varnothing_T = diâmetro médio do micélio no tratamento.

A concentração mínima inibitória (CIM), do óleo essencial sobre os fungos em estudo, foi realizada através da microdiluição seriada em microplaca de 96 poços, as doses testadas foram definidas a partir dos resultados do teste *in vitro*, sendo avaliadas as seguintes doses de óleo essencial: 50; 40; 36; 30; 25; 20; 18; 15; 12,5; 12; 10; 9; 7,5; 6,25; 6, 5, 4,5; 3,75 e 3 $\mu\text{L/mL}$.

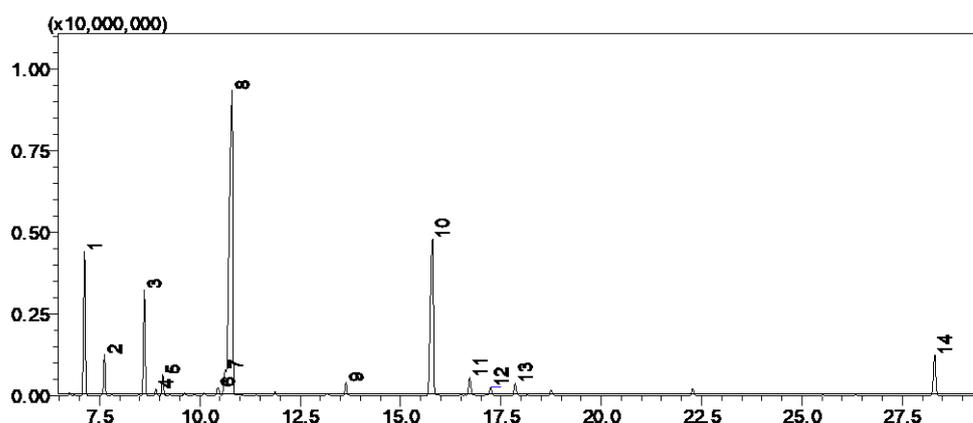
Para cada dose testada foram realizadas quatro repetições em meio BD (batata e dextrose) com a solução contendo óleo essencial, DMSO e suspensão de esporos (10^7) e como controle o tratamento sem o óleo essencial, mantidos em câmara B.O.D. à temperatura de 35°C por 72h. Após o período de incubação a interpretação dos resultados foi realizada por análise visual. A concentração mínima inibitória (CIM) foi definida como a menor concentração de óleo essencial em que não ocorreu crescimento fúngico (Pandey et al., 2003;

As variáveis obtidas nos testes foram analisadas por meio do programa estatístico SISVAR[®], com análise de variância e comparação de médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância, em delineamento experimental inteiramente casualizado (Ferreira, 2014).

3. Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta o cromatograma, com os picos numerados, correspondentes aos componentes químicos do óleo essencial de alecrim utilizado no experimento.

Figura 1: Cromatograma do óleo essencial de alecrim.



Fonte: Autores.

A Tabela 1 apresenta o tempo médio de retenção e o índice de Kovats dos componentes identificados pelo cromatograma apresentado na Figura 1.

Tabela 1: Principais componentes do óleo essencial de alecrim, determinados por CG-EM.

Pico Cromatograma	Componente	Tempo de Retenção (min)	Índice de Kovats*	Adams* (1995)	Outros Autores*
01	α -pineno ⁽¹⁾	7,127	963	-	-
03	β -pineno	8,616	989	980	990 ⁽²⁾ /981 ⁽³⁾
05	Mirceno	9,073	996	991	994 ⁽²⁾
08	1,8 Cineol	10,806	1036	1033	1039 ⁽²⁾
09	Linalol	13,638	1093	1098	-
10	Cânfora	15,796	1143	1143	-
11	Borneol	16,719	1164	1165	-
12	Terpinen-4-ol	17,236	1175	1177	1178 ⁽³⁾

*Coluna DB-5. ⁽¹⁾Comparação com padrão. Fonte: Autores, Adams (1995), ⁽²⁾Högnadottir e Rouseff (2003). ⁽³⁾Choi (2003).

A composição dos óleos essenciais pode variar segundo a sua localização de cultivo, assim como de acordo com a época de coleta da planta, estágio de desenvolvimento, condições climáticas e do solo (Simões & Spitzer, 2003).

A Tabela 2 apresenta a identificação dos principais componentes do óleo essencial de alecrim utilizado neste trabalho em comparação com outros publicados, verificando-se a similaridade dos principais componentes identificados. Os componentes majoritários são: β -pineno 8%, 1,8-cineol 48% e cânfora 12%.

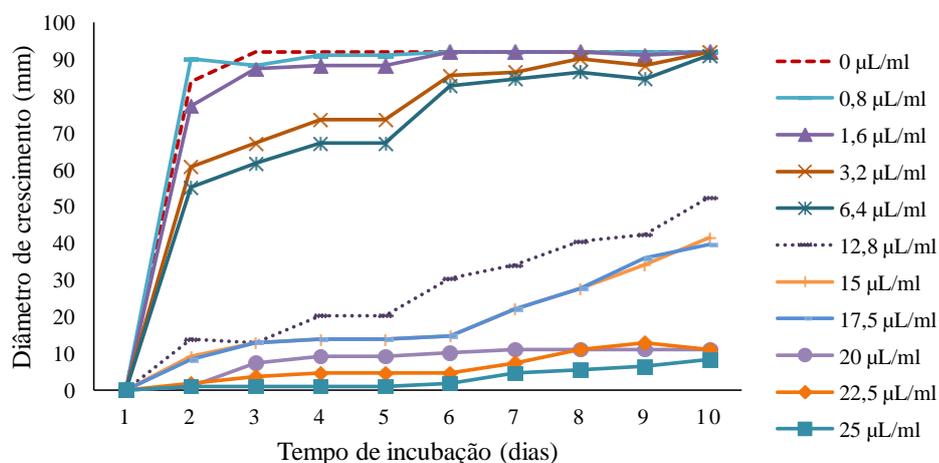
Tabela 2: Comparação dos principais componentes do óleo essencial de alecrim, identificados no presente trabalho, em relação a artigos publicados.

Componente	Óleo essencial de alecrim utilizado	May et al. (2012)	Moghtader et al. (2011)	Ribeiro et al. (2012)
α -pineno	x	x	x	x
β -pineno	x	x	x	x
Mirceno	x	x	-	x
1,8 Cineol	x	x	x	x
Linalol	x	-	x	x
Cânfora	x	x	x	x
Borneol	x	-	-	-
Terpinen-4-ol	x	-	-	x

Fonte: Autores.

A Figura 2 apresenta o efeito inibitório obtido com o óleo essencial de alecrim no crescimento micelial do fungo *A. flavus*, nas diferentes doses testadas durante o período de incubação.

Figura 2: Efeito do óleo essencial de alecrim no desenvolvimento do *Aspergillus flavus*.



Fonte: Autores.

A Figura 2 representa o diâmetro do halo de crescimento em (mm) do fungo *A. flavus* durante o período analisado sob efeito do óleo essencial de alecrim, observa-se que a ação inibitória foi mais acentuada a partir da dose de 12,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (51 mm), as doses acima tiveram crescimento próximo a dose zero (testemunha), para as doses entre 15; 22,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ o diâmetro de crescimento do fungo ficou entre 41 e 11 mm, a dose de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ apresentou menor diâmetro de crescimento (inferior a 8,3 mm) durante todo o período analisado.

Os resultados obtidos estão próximos, porém acima, aos publicados por Pereira et al. (2006) que ao testaram o efeito fungicida do óleo essencial de alecrim nas doses de 5; 10; 15 e 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$, sobre o *A. flavus* e obtiveram crescimento micelial em torno de 69 mm para a dose de 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ao final de 7 dias, diferenças obtidas podem estar relacionadas a composição dos óleos essenciais utilizados, a exemplo do trabalho desenvolvido por Moghtader et al. (2011), cujos principais constituintes do óleo de alecrim utilizado eram: α -pineno 15,52%, cânfora 11,66%, verbenona 11,10% e 1, 8-cineol 10,6% para a dosagem de 17,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, após 10 dias de observação, tiveram média de crescimento de 38 mm.

A comparação com a composição do óleo essencial utilizado neste trabalho (β -pineno 8%, 1,8-cineol 48%, cânfora 12%) mostra que a complexidade da mistura de componentes dos óleos essenciais pode resultar em diferente intensidade de controle de microrganismos, de forma que estudos são necessários tanto com os óleos como com seus componentes individuais, para que se possa chegar ao desenvolvimento de um produto com composição fixa.

A análise de variância do efeito do óleo essencial de *R. officinalis* e do tempo de incubação no crescimento micelial do fungo *A. flavus* mostrou que houve efeito significativo das diferentes doses de óleo essencial de alecrim, para o tempo de incubação, assim como para a interação (D x t), indicando que a inibição do crescimento do fungo *A. flavus*, com o óleo essencial de alecrim, depende da interação entre a dose do óleo e o tempo de incubação. Desta forma, procedeu-se o desdobramento da interação para estudar o comportamento do controle do fungo dentro de cada fator, conforme descrito a seguir.

Ressalta-se que o valor do Coeficiente de Variação (CV) obtido da análise de variância dos ensaios experimentais, foi de 21,95%, o qual fornece uma medida da variabilidade relativa, ou seja, uma informação sobre a precisão do experimento (BAI et al., 2011), considerou-se o valor obtido satisfatório para a natureza das variáveis em estudo.

A atividade fungitóxica do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), sobre a inibição do crescimento micelial do *A. flavus* está demonstrada na Tabela 3.

Foi evidenciada diferença significativa do crescimento micelial do fungo em cada tratamento, quando comparado com as dosagens testadas.

Tabela 3: Porcentagem média de inibição, *in vitro*, do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* para diferentes dosagens ($\mu\text{L}/\text{mL}$) do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) durante o período de incubação.

Dose de óleo essencial ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Inibição do crescimento micelial* em dias (%)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,8	4dD	1dD	4dD	1dD	1dD	0dD	0cD	0cD	0dD	0dD
1,6	13dD	4dD	6dD	4dD	4dD	0dD	0cD	0cD	0dD	0dD
3,2	41cA	32cB	27cB	21cB	21cB	10cC	10cC	7cC	6dC	6dC
6,4	49cA	37cB	32cB	26cB	26cB	10cC	10cC	10cC	10dC	10dC
12,8	76bA	81bA	82bA	74bA	74bA	61bB	57bB	50bB	49cB	38cC
15	86aA	81bA	76bA	75bA	74bA	74bA	65bA	59bB	49cB	45cB
17,5	95aA	90aA	87aA	86aA	84aA	84aA	77aA	69bB	59cB	51cB
20	95aA	97aA	90aA	88aA	86aA	86aA	82aA	77aB	73bB	65bB
22,5	99aA	99aA	95aA	94aA	94aA	94aA	89aA	83aB	80bB	75bB
25	99aA	97aA	98aA	98aA	97aA	97aA	94aA	93aA	92aA	90aA

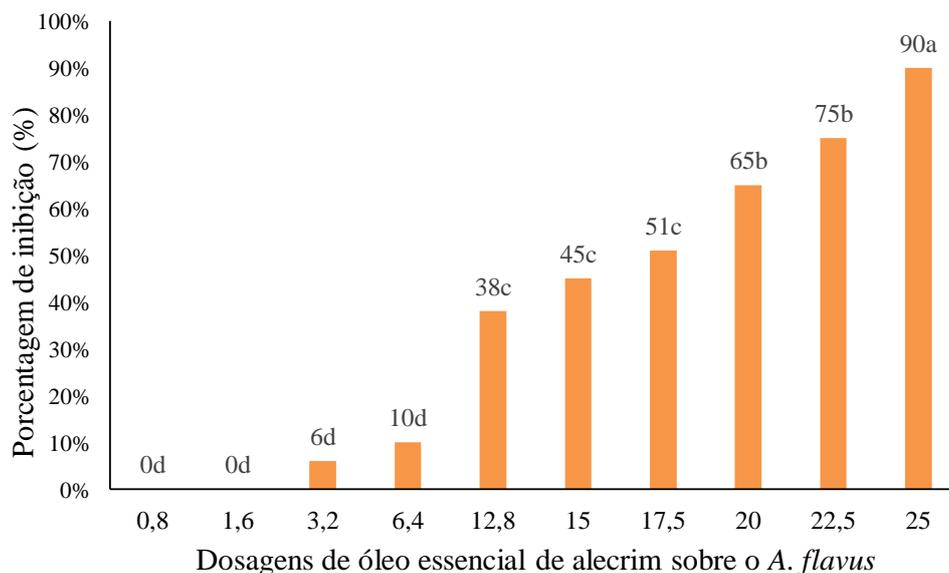
*Letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não se diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott com nível de significância de 5%.

Fonte: Autores.

Nas dosagens inferiores a 3,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ a porcentagem de inibição no decorrer dos dias observados foi de 6%, para a dose de 6,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ foi de 10%, as dosagens entre 12,8 e 17,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ apresentaram inibição abaixo de 51%, as doses 20 e 22,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ apresentaram inibição acima de 65%, e a dose 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ apresentou o maior potencial de inibição dentre as doses testadas com 90% no período analisado. Pela Tabela 3 observa-se que o óleo essencial de alecrim se apresentou mais efetivo no controle do fungo *A. flavus* na dose de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

A porcentagem de inibição do óleo essencial de alecrim sobre o fungo *A. flavus*, analisada por um período de 10 dias, nas diferentes doses testadas, está destacada na Figura 3.

Figura 3: Porcentagem de inibição do efeito do óleo essencial de alecrim no desenvolvimento do *A. flavus*.



*Letras iguais, minúsculas nas colunas, não se diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott com nível de significância de 5%.

Fonte: Autores.

De acordo com a Figura 3, a porcentagem de inibição para as doses inferiores a 6,4 µL/mL foi abaixo de 10%, a dose de 12,8; 15 e 17,5 µL/mL apresentaram-se estatisticamente iguais, assim como as doses de 20 e 22,5 µL/mL não diferiram entre si, sendo a dose de 25 µL/mL a que apresentou maior potencial de inibição com 90% se diferenciando estatisticamente das demais.

A microdiluição seriada em microplaca foi realizada com o intuito de identificar a menor dose inibitória do crescimento fúngico, as doses testadas variaram entre 50 a 3 µL/mL, conforme apresentado na Tabela 4, dentre as doses testadas a menor concentração onde não ocorreu o crescimento fúngico foi a partir da dose de 25 µL/mL, concentração esta na qual se obteve maior controle no teste *in vitro*.

Tabela 4: Indicação de crescimento fúngico* em microdiluição seriada de *Aspergillus flavus* para diferentes dosagens ($\mu\text{L}/\text{mL}$) do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*).

Dose ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	<i>Aspergillus flavus</i>	Dose ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	<i>Aspergillus flavus</i>
50	-	12	+
40	-	10	+
36	-	9	+
30	-	7,5	+
25	-	6,25	+
24	+	6	+
20	+	5	+
18	+	4,5	+
15	+	3,75	+
12,5	+	3	+

*Sinal + indica crescimento fúngico e – não crescimento.

Fonte: Autores.

A concentração mínima inibitória encontrada por Shin (2003), do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, que apresentou como componentes majoritários 1,8-cineol (19,44%), cânfora (12,75%) e l-borneol (9,11%), sobre o *A. flavus* foi de 12,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Foram testadas as doses entre 0,39 e 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$, suspensão de esporos 10^5 UFC em microplacas. Da mesma forma, no estudo de Rasooli et al. (2008), o qual testaram a ação fungicida do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* sobre o *Aspergillus parasiticus*, foram identificaram como componentes majoritários o α -pineno (14,94%), limoneno (14,89%) e pepiretone (23,65%), a CIM obtida foi de 17,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ determinada através do método de diluição em caldo, a concentração da suspensão de esporos usada foi de 10^6 esporos/mL.

As concentrações encontradas pelos referidos autores foi mais baixa que a obtida no presente trabalho (25 $\mu\text{L}/\text{mL}$), essas diferenças podem ser justificadas pela diferença dos componentes majoritários de cada óleo essencial, como também pela concentração da suspensão de esporos, que para esse estudo foi de 10^7 UFC.

4. Considerações Finais

O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* apresentou efeito fungicida sobre o fungo *Aspergillus flavus* no teste *in vitro*, apresentando maior inibição (90%) na dose 25 µL/mL, a qual apresentou-se também como concentração inibitória mínima (CIM).

O componente majoritário do óleo essencial em estudo foi o 1,8-cineol totalizando 48% da sua composição química, seguido pela cânfora 12% e o do β-pineno 8%.

Diante do exposto, torna-se evidente que a utilização de produtos naturais pode representar uma alternativa para o controle do gênero *Aspergillus*. Pesquisas adicionais podem ser desenvolvidas com outras espécies e avaliando-se individualmente os principais componentes do óleo essencial de alecrim.

Referências

Alves, V.C., Cardoso Filho, F. C., Pereira, M. M. G., Costa, A. P. R., & Muratori, M. C. S. (2014). Identificação de espécies de *Aspergillus* e potencial toxígeno de *Aspergillus flavus* isolados de rações comerciais. *Rev. Científica Produção Anim.*, 16(2), 131–136.

Anžlovar, S., Likar, M., & Koce, J. D. (2017). Antifungal potential of thyme essential oil as a preservative for storage of wheat seeds. *Acta Bot. Croat.*, 76(1), 64–71.

Araújo, S. G., Pinto, M. E. A., Silva, N. L., Santos, F. J. L., Castro, A. H. F., & Lima, L. A. R. D. S. (2013). Atividades antioxidante e alelopática do extrato e frações obtidos de *Rosmarinus officinalis*. *Biochem. Biotechnol. Reports*. 2(1), 35–43.

Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Bessière, J. M., Fonvieille, J. L., & Dargent, R. (2001). Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.* 47, 9–17.

Chao, S. C., Young, D. G., & Oberg, C. J. (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *J. Essent. Oil Res.* 12(5), 639–649.

Creswell, J. W., & Plano Clark, V. L. (2011). *Designing and conducting mixed methods research*. 2 ed. Los Angeles: SAGE Publications.

Dellavalle, P. D., Cabrera, A., Alem, D., Larrañaga, P., Ferreira, F., & Rizza, M. D. (2011). Antifungal activity of medicinal plants extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria spp.* *Chil. J. Agric. Res.* 71, 231–239. <https://doi.org/10.1007/s11418-007-0216-x>

Faeq, T., Salih, M., Mohammed, L. M., & Qader, K. O. (2017). Chemical analysis and growth inhibitory effect of rosemary plant on *Aspergillus niger*. *Kurdistan J. Appl. Res.* 2(2), 2–5.

Ferreira, D. F. (2014). Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, 38(2), 109-112.

Hillen, T., Schwan-Estrada, K. R. F., Mesquini, R. M., Cruz, M. E. S., Stangarlin, J. R., & Nozaki, M. (2012). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos in vitro e no tratamento de sementes. *Rev. Bras. Plantas Med.* 14(3), 439–445.

Lanças, F. *Cromatografia em fase gasosa*. São Carlos: Editora Acta. 1993.

May, A., Bovi, O. A., Maia, N. B., Moraes, A. R., Pinheiro, M. Q., & Mario, M. de. (2008). Influência do intervalo entre cortes sobre a produção de biomassa de duas espécies de capim limão. *Hortic. Bras.* 26(3), 379–382.

Martinazzo, A., Oliveira, F., & Teodoro, C. (2019). Antifungal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil against *Aspergillus flavus*. *Ciência e Natura*, 41, e20.

Moghtader, M., Salari, H., & Farahmand, A. (2011). Evaluation of the antifungal effects of rosemary oil and comparison with synthetic borneol and fungicide on the growth of *Aspergillus flavus*. *Journal of Ecology and the Natural Environment*, 3(6), 210–214.

Pandey, A. K., Rai, M. K., & Acharya, D. (2003). Chemical composition and antimycotic activity of the essential oils of corn mint (*Mentha arvensis*) and lemon grass (*Cymbopogon flexuosus*) Against human pathogenic fungi. *Pharm. Biol.*, 41(6), 421–425.

Pawar, V. C., & Thaker, V. S. (2006). In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses*, 49, 316–323.

Pereira, A.S., et al. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1.

Pereira, P. S., Maia, A. J., Tintino, S. R., Oliveira-Tintino, C. D. de M., Raulino, I. S. de S., Vega, M. C., Rolón, M., Coronel, C., Barros, L. M., Duarte, A. E., Menezes, I. R. A. de; Coutinho, H. D. M., & Silva, T. G. da. (2017). Trypanocide, antileishmania and cytotoxic activities of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* L in vitro. *Ind. Crops Prod.*, 109(15), 724–729.

Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2015). Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. *Food Control*, 47, 381–391.

Prakash, B., Kujur, A., Yadav, A., Kumar, A., Pratap Singh, P., Dubey, N., Pratap, P., & Dubey, N. K. (2018). Nanoencapsulation: an efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. *Food Control*.

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. *Int. J. Food Microbiol.* 122(1-2), 135–139.

Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Melo, N. R., Santos, F. R., Neves, I. de A., Carvalho, M. G., & Sanches-Silva, A. (2017). Biological activities and major components determination in essential oils intended for a biodegradable food packaging. *Ind. Crops Prod.* 97, 201–210.

Shin, S. (2003). Anti-*Aspergillus* activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin B. *Arch. Pharm. Res.*, 26, 389–393.

Simões, C. M., & Spitzer, V. (2003). Óleos voláteis. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da

UFSC.

Tatsadijieu, N. I., Yaouba, A., Nukenine, E. N., Ngassoum, M. B., & Mbofung, C.M.F. (2010). Comparative study of the simultaneous action of three essential oils on *Aspergillus flavus* and *Sitophilus zeamais* Motsh. *Food Control*, 21, 186-190.

Yu, J. -H., Kwon, N. -J., Shin, K. -S., Gao, N., & Ni, M. (2010). Regulation of *Aspergillus* conidiation. In: *Cellular and molecular biology of filamentous fungi*. Washington: American Society of Microbiology.

Zhang, H., Chen, F., Wang, X., & Yao, H. Y. (2006). Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. *Food Res. Int.*, 39(8), 833–839.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Lundoi Tobias Lee – 35%

Sabrinna Aires Garcia – 15%

Ana Paula Martinazzo – 25%

Carlos Eduardo de Souza Teodoro – 25%