

## ATIVIDADE FUNGICIDA DE ROSMARINUS OFFICINALIS

Fungicidal activity of *Rosmarinus officinalis*

Julia Sant'Ana<sup>1</sup>, Rubens Candido Zimmermann<sup>1</sup>, Matheus Beger<sup>1</sup>, Edson José Mazarrotto<sup>2</sup>,  
Carolina Gracia Poitevin<sup>3</sup>, Milena Ielen<sup>4</sup>, Sofia Bin Macedo<sup>4</sup>, Roger Raupp Cipriano<sup>1</sup>,  
Henrique da Silva Silveira Duarte<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Saúde, Centro de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

<sup>4</sup> Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

## RESUMO

A contaminação por fungos durante o armazenamento ocasiona grandes prejuízos econômicos na cadeia produtiva de grãos. As espécies do gênero *Aspergillus* são os principais grupos de microrganismos que causam danos quantitativos e qualitativos. O controle químico é a principal estratégia utilizada, porém o uso intensivo e indiscriminado de fungicidas sintéticos tem ocasionado a seleção de linhagens resistentes. Uma alternativa promissora é a utilização de produtos derivados de plantas bioativas, que são substâncias químicas com propriedades fungicidas. Nesse contexto, a presente pesquisa objetivou avaliar a composição química e o potencial efeito fungicida do óleo essencial (OE) de *Rosmarinus officinalis* e do seu hidrolato contra isolados de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus nomius*. Os isolados de fúngicos foram obtidos a partir do isolamento de grãos de trigo. O hidrolato e OE foram extraídos por arraste a vapor em dorna, e a análise da composição química do OE foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. A atividade fungicida foi avaliada pelo método de volatilização e contato. Foram identificados 25 compostos no OE que representam 93,11% da composição química total. Ambos os produtos tiveram efeito fungicida para todas as espécies de *Aspergillus*, porém método de contato foi mais eficaz com inibição superior a 88% para o OE e 46,44% para o hidrolato. O OE de *R. officinalis* tem elevada atividade fungicida pelo método de contato, sendo um produto alternativo eficaz no controle de *Aspergillus*.

**Palavras-chave:** biopesticidas; fungicidas botânicos; *Aspergillus*, Alecrim

## INTRODUÇÃO

A infestação por fungos é um dos principais motivos que ocasionam a redução da produtividade no armazenamento de grãos, podendo ocorrer ainda em fase de colheita, ou dentro da unidade de armazenamento (Zimmermann et al., 2022; 2023). Entre os patógenos de grãos armazenados com maior importância econômica destacam-se espécies do gênero *Aspergillus* por causarem danos quantitativos e qualitativos, além de produzirem micotoxinas, as quais são substâncias tóxicas para mamíferos (Božik et al., 2017).

A aplicação de fungicidas sintéticos constitui como o principal método de controle para esses patógenos. Entretanto, a utilização excessiva e sem a rotação de moléculas ocasiona a resistência a esses produtos, além de aumentar o nível de resíduos em grãos (Císarová et al, 2016). Nesse contexto, as substâncias obtidas a partir de plantas medicinais demonstram ser uma alternativa promissora no controle de patógenos de armazenamento (Zimmermann et al., 2022; 2023).

Entre os produtos promissores, destacam-se as substâncias naturais como os óleos essenciais (OEs) (Božik et al., 2017) e os hidrolatos (Aćimović et al., 2020; Tavares et al., 2022), que são obtidos a partir do metabolismo secundários das plantas e que podem apresentar ação fungicida. Estudos demonstram o potencial fungicida do OEs de espécies da família Lamiaceae no controle de diferentes microrganismos (Karpiński, 2020). Entretanto, há poucos estudos com atividade fungicida de hidrolatos para o controle de fitopatógenos. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a composição química do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) e o potencial efeito fungicida do OE e hidrolato contra as espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus nomius*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Isolados fúngicos

Os isolados fúngicos de *A. flavus*, *A. niger* e *A. nomius*, foram provenientes da Coleção Microbiológica da Rede Paranaense Taxonline, da Universidade Federal do Paraná, e mantidos em placas de Petri (9 cm de diâmetro), utilizando o meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar). Todos os isolados foram acondicionados em câmara incubadora a  $28 \pm 1^\circ \text{C}$  e 12 h de fotofase, por 7 dias.

### Extração e análise da composição química do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*

Em 2021, foi realizada coleta do material vegetal de *R. officinalis* no município de Araucária ( $25^\circ 31' 00.81'' \text{S}$  e  $49^\circ 26' 18.24'' \text{W}$ ), Paraná, Brasil. O hidrolato e o OE foram extraídos da parte área útil, definida como ramos, flores e folhas, pelo método de arraste a vapor em dorna por 2 horas. Posteriormente, o hidrolato e o OE foram separadas da amostra, e ambos foram acondicionados em frasco âmbar e mantidos em refrigeração até o momento das análises e bioensaios.

As análises da composição química foram realizadas por cromatografia gasosa, com uso dos cromatógrafos GC/FID (Agilent 7890A) e GC/MS (Shimadzu-2010 Plus), ambos equipados com coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ). Como gás de arraste foi utilizado o hidrogênio para GC/FID (fluxo de  $2,4 \text{ mL min}^{-1}$ ) e hélio para GC/MS (fluxo de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ). A temperatura inicial do forno foi de  $60^\circ \text{C}$ , elevando-se a  $240^\circ \text{C}$  na razão de  $3^\circ \text{C/minuto}$ . A identificação dos compostos químicos foi realizada através do cálculo da retenção linear pela cadeia de alcanos: C7 – C30 (Van Den Dool e Dec. KRATZ, 1963). A identificação dos constituintes do OE foi realizada através de pesquisa na espectroteca, comparando-se os índices de retenção calculados com dados da literatura (Adams, 2017).

### Atividade fungicida do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 métodos de aplicação x 3 fungos), com 3 repetições para cada produto. Os tratamentos foram o OE e o hidrolato de *R. officinalis*, ambos na concentração de 100% pelo método de volatilização, e 1,5% para o OE e 50% para o hidrolato no método de contato. Água destilada e o meio de cultura RPMI 1640 foram utilizados como controle negativos, respectivamente. Os experimentos foram realizados 3 vezes ao longo do tempo.

A atividade fungicida por volatilização seguiu a metodologia proposta por Zimmermann et al. (2022). Placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio BDA foram invertidas, em seguida discos de 7 mm foram retirados dos inóculos e colocadas no centro da placa de Petri. Posteriormente, foi colocado papel filtro com 8 mm de diâmetro contendo 10 µL de cada tratamento na tampa de cada placa, para cada isolado de fungo, de maneira que não entrasse em contato direto com o fungo. Após esse procedimento, as placas foram vedadas com filme de polietileno, para evitar o escape de voláteis, e mantidas em câmara incubadora a  $28 \pm 1^\circ \text{C}$  e 12 h de fotofase. A avaliação do crescimento micelial foi realizada após 7 dias, através da média de duas medições perpendiculares do diâmetro da colônia em mm.

Para o efeito fungicida por contato, foi adotada a metodologia proposta por Zimmermann et al. (2022). Os conídios foram coletados das placas de Petri e transferidos para frascos de vidro esterilizados contendo meio RPMI 1640. Em seguida, a suspensão de conídios foi ajustada até a concentração de  $2 \times 10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . O OE foi diluído em meio RPMI 1640 até a concentração de 3%, enquanto que para o hidrolato foram pipetados 100 µL do produto por poço. Foram utilizadas placas de microtitulação com 96 poços. A suspensão de conídios e do OE foram inoculados de forma a obter concentração final de  $10^4$  conídios/mL e 1,5% respectivamente, totalizando 200 µL por poço. Os poços brancos continham apenas meio RPMI e OE, sem adição da suspensão de esporos. As placas foram mantidas em câmara incubadora a  $28 \pm 1^\circ \text{C}$  e 12 h de fotofase, por 48 h. O crescimento dos fungos foi determinado pela absorvância a 600 nm utilizando o espectrofotômetro de microplacas EPOCH (Biotek Instrument Inc, Winooski, EUA).

Os dados obtidos foram transformados em porcentagem de inibição utilizando a fórmula proposta por Vilela et al. (2009):

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{(C - T)}{C} \times 100$$

Onde:

C = Absorbância ou crescimento do controle negativo

T = Absorbância ou crescimento do tratamento

## **Análise estatística**

Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA), e posteriormente foram submetidos ao teste de Tukey a 5% pelo *software* Graphpad Prism 9.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados 25 compostos na amostra do OE de *R. officinalis* que correspondem a 93,11% da composição química total. Os compostos majoritários (> 5%) identificados compõem 59,02% da composição química, e a maior proporção foi identificada no composto o  $\alpha$ -pineno com 39,76% (Tabela 1).

**Tabela 1.** Composição química do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*.

Compostos	Rical	Rlit	%
$\alpha$ -pineno	931	932	39,76
canfeno	946	945	5,25
thuja-2,4(10)-dieno	953	951	0,67
$\beta$ -pineno	974	974	2,78
mirceno	989	988	1,71
$\alpha$ -terpineno	1015	1014	0,67
o-cimeno	1022	1022	0,64
limoneno	1026	1024	3,57
1.8-cineol	1029	1026	14,01
$\gamma$ -terpineno	1054	1055	1,46
terpinoleno	1086	1086	1,29
linalool	1099	1095	1,78
crisantenona	1124	1122	0,78
canfora	1140	1141	1,83
borneol	1163	1165	1,44
cis-pinocanfona	1172	1169	0,59
terpinen-4-ol	1174	1174	1,38
$\alpha$ -terpineol	1187	1186	1,07
verbenona	1204	1205	3,1
geraniol	1249	1253	2,88
acetato de bornila	1284	1284	1,64
(E)-cariofileno	1413	1417	3,15

aromadendreno	1439	1431	0,6
$\alpha$ -humuleno	1452	1446	0,52
$\beta$ -selineno	1489	1488	0,54
Total identificado (%)			93,11

<sup>a</sup> IRLit: Índice de retenção da literatura.

<sup>b</sup> IRcal: Índice de retenção calculado.

Os OE são formados por um conjunto complexo de diferentes moléculas químicas pertencentes ao grupo dos monoterpenos, que são responsáveis pela atividade fungicida (Marei e Abdelgaleil, 2018). Nossos resultados demonstram que houve a predominância de monoterpenos, sendo  $\alpha$ -pineno, canfeno, 1.8-cineol os compostos majoritários da nossa amostra. Entretanto, estudos demonstram que há variações na composição química quali e quantitativamente nos compostos para o OE de *R. officinalis* (Jahanian et al., 2022). Essa variação pode estar associada com fatores como a época de colheita, localização geográfica, método e tempo de extração, órgão do vegetal utilizado, além da interação no ambiente com agentes bióticos e abióticos (Zimmermann et al., 2022; 2023).

O OE de *R. officinalis* apresentou maior atividade fungicida apenas pelo método de contato para todas isolados de *Aspergillus*, porém a espécie *A. flavus* demonstrou menor sensibilidade, com inibição em 88%. A inibição pelo método por volatilização foi inferior para todos os fungos, com menor valor para *A. niger*, com 2,1% (Figura 1).

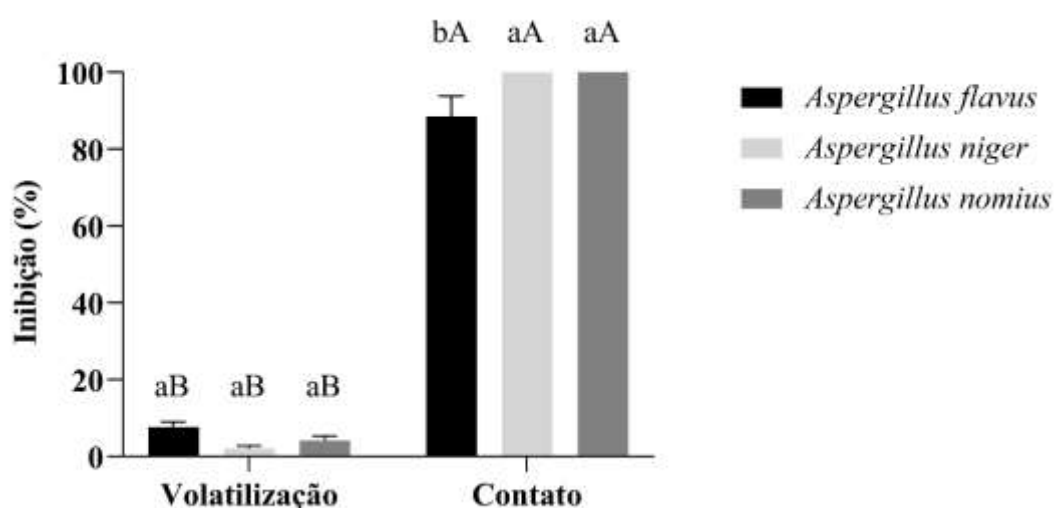


Figura 1. Inibição (%) (média  $\pm$  desvio padrão) dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, e *Aspergillus nomius* expostos ao OE de *Rosmarinus officinalis* pelo método de volatilização e contato, nas concentrações 100% e 1,5%, respectivamente. Letras maiúsculas comparam o mesmo isolado entre os métodos de aplicação, e letras minúsculas comparam os dois isolados no mesmo método de aplicação, pelo teste de Tukey.

Para o hidrolato de *R. officinalis* houve atividade fungicida apenas pelo método de contato para todos os isolados de *Aspergillus*, porém a espécie *A. niger* demonstrou menor sensibilidade, com inibição em 88%. Não houve inibição pelo método de volatilização para nenhum isolado (Figura 2).

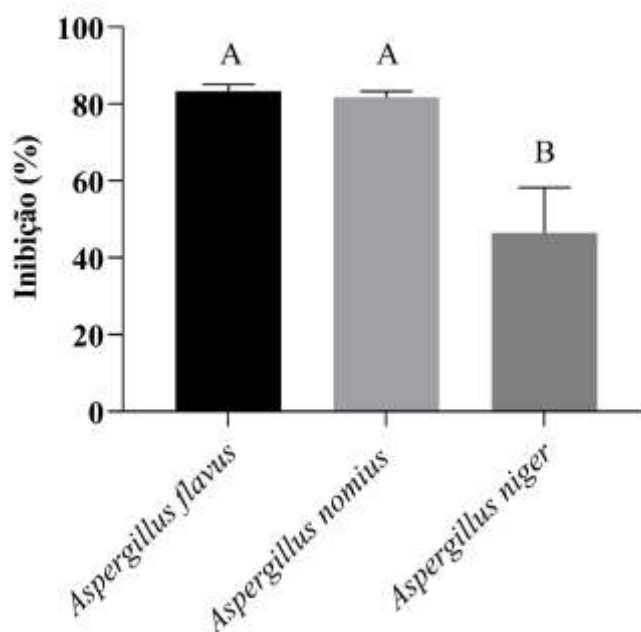


Figura 2. Inibição (%) (média  $\pm$  desvio padrão) dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, e *Aspergillus nomius* expostos ao hidrolato de *Rosmarinus officinalis* pelo método de volatilização e contato, nas concentrações 100% e 50%, respectivamente. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey.

Por serem constituídos por diferentes compostos químicos com baixo peso molecular, os OEs e que podem ser aplicados enquanto fungicidas por contato ou por volatilização (Dammak et al., 2019), enquanto que os hidrolatos são substâncias aquosas que contêm alguns compostos presentes no OE dissolvidos (Sainz et al., 2019). No método por volatilização, os compostos com baixo peso molecular volatilizam e são absorvidos pelos fitopatógenos, ocasionando danos e lesões na parede das hifas (Bomfim et al., 2020). Entretanto, nossos resultados demonstraram que não houve efeito fungicida por volatilização para o OE e o hidrolato de *R. officinalis* para os isolados de *Aspergillus*.

A atividade fungicida do OE e do hidrolato de *R. officinalis* foi mais eficaz pelo método de contato, indicando que a atividade fungicida desses produtos não está associada somente aos compostos majoritários, mas ao efeito sinérgico desses componentes com os compostos minoritários (Hyldgaard et al., 2012). Outros resultados corroboram com os observados na presente pesquisa, demonstrando que os OEs apresentam maior efeito fungicida por contato em comparação ao método de volatilização para espécies de *Aspergillus* (Zimmermann et al., 2022; 2023) e para



outros fitopatógenos de pós-colheita de produtos agrícolas (Pedrotti et al., 2019; Yakhlef et al., 2020; Oliveira Filho et al., 2021)

Ademais, nossos resultados indicam que entre os produtos testados, o OE apresentou maior ação fungicida para todas as espécies de *Aspergillus*, e resultados similares foram relatados ao avaliaram a atividade fungicida do OE e hidrolato de outras espécies botânicas para o controle de diferentes fitopatógenos (Mattos et al. 2019; Pérez-Izquierdo et al., 2022). Estudos comprovam a efetividade do OE de *R. officinalis* contra diferentes espécies fúngicas (Barkaoui et al., 2022), incluindo outras espécies do gênero *Aspergillus* (Gameda et al., 2015). Por conter diferentes moléculas químicas os OEs podem atuar em diferentes modos de ação simultaneamente, acentuando a sua toxicidade contra fungos de armazenamento (Mutlu-Ingok et al., 2020). Entretanto, o potencial fungicida de produtos naturais pode ser afetado por diferentes fatores como a composição química, concentração testada, método de aplicação e o organismo alvo (Božik et al., 2017).

## CONCLUSÃO

O OE de *R. officinalis* apresentou atividade fungicida contra as espécies de *Aspergillus* pelo método de contato, demonstrando ser um produto promissor para o controle desses patógenos.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, RP Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, 4th ed. Carol Stream, Illinois, USA. 2017.

AĆIMOVIĆ, M.; TEŠEVIĆ, V.; SMILJANIĆ, K.; et al. Hydrolates: By-products of essential oil distillation: Chemical composition, biological activity and potential uses. **Advanced Technologies**, v. 9, n. 2, p. 54–70, 2020.

BARKAOUI, H.; CHAFIK, Z.; BENABBAS, R.; et al. Antifungal activity of the essential oils of *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Lavandula dentata* and *Cymbopogon citratus* against the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f.sp.*Albedinis*. **Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants**, v. 8, n. 1, p. 108–133, 2022.

BOMFIM, N. DA S.; KOHIYAMA, C. Y.; NAKASUGI, L. P.; et al. Antifungal and antiaflatoxic activity of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) against *Aspergillus flavus*. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 37, n. 1, p. 153–161, 2020. Taylor & Francis. Disponível em:



<<https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1678771>>. .

BOŽIK, M.; CÍSAROVÁ, M.; TANČINOVÁ, D.; et al. Selected essential oil vapours inhibit growth of *Aspergillus* spp. in oats with improved consumer acceptability. **Industrial Crops and Products**, v. 98, p. 146–152, 2017.

CÍSAROVÁ, M.; TANČINOVÁ, D.; MEDO, J.; KAČÁNIOVÁ, M. The in vitro effect of selected essential oils on the growth and mycotoxin production of *Aspergillus* species. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 51, n. 10, p. 668–674, 2016.

DAMMAK, I.; HAMDI, Z.; KAMMOUN EL EUCH, S.; et al. Evaluation of antifungal and anti-ochratoxigenic activities of *Salvia officinalis*, *Lavandula dentata* and *Laurus nobilis* essential oils and a major monoterpene constituent 1,8-cineole against *Aspergillus carbonarius*. **Industrial Crops and Products**, v. 128, n. October 2018, p. 85–93, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.006>>. .

VAN DEN DOOL, H.; DEC. KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, n. 3, p. 463–471, 1963. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730180947X>>. .

GEMEDA, N.; WOLDEAMANUEL, Y.; ASRAT, D.; DEBELLA, A.; BELETE, Y. Assessment of *Lippia adoensis* Hochst. var. koseret, *Rosmarinus officinalis* L. and *Ruta chalepensis* L. essential oils as a potential source of fungitoxic and mycosporicidal activity against toxigenic *Aspergillus* species. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 85–94, 2015.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. JAN, p. 1–24, 2012.

JAHANIAN, H.; KAHKESHANI, N.; SANEI-DEHKORDI, A.; et al. *Rosmarinus officinalis* as a natural insecticide: a review. **International Journal of Pest Management**, v. 0, n. 0, p. 1–46, 2022. Taylor & Francis. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09670874.2022.2046889>>. .

KARPIŃSKI, T. M. Essential Oils of Lamiaceae Family Plants as Antifungals. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 103, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-273X/10/1/103>>. .

MAREI, G. I. K.; ABDELGALEIL, S. A. M. Antifungal potential and biochemical effects of monoterpenes and phenylpropenes on plant pathogenic fungi. **Plant Protection Science**, v. 54, n. 1, p. 9–16, 2018.

MATTOS, A. P.; POVH, F. P.; RISSATO, B. B.; SCHWAN, V. V.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. In vitro Antifungal Activity of Plant Extracts, Hydrolates and Essential Oils of Some Medicinal Plants and Control of Cucumber Anthracnose. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 28, n. 4, p. 1–9, 2019. Disponível em: <<https://journalejmp.com/index.php/EJMP/article/view/774>>. .

MUTLU-INGOK, A.; DEVECIOGLU, D.; DIKMETAS, D. N.; KARBANCIOGLU-GULER, F.; CAPANOGLU, E. Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: an updated review. **Molecules**, v. 25, n. 20, 2020.

OLIVEIRA FILHO, J. G. DE; DA CRUZ SILVA, G.; DE AGUIAR, A. C.; et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oils and their combinations against *Botrytis cinerea* in strawberries. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, n. 2, p. 1815–1825, 2021. Springer US. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11694-020-00765-x>>. .

PÉREZ-IZQUIERDO, C.; SERRANO-PÉREZ, P.; RODRÍGUEZ-MOLINA, M. DEL C. Chemical composition, antifungal and phytotoxic activities of *Cistus ladanifer* L. essential oil and hydrolate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Volume 45, 2022, 102527, ISSN 1878-8181, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102527>.

PEDROTTI, C.; SILVA RIBEIRO, R. T. DA; SCHWAMBACH, J. Control of postharvest fungal rots in grapes through the use of *Baccharis trimera* and *Baccharis dracunculifolia* essential oils. **Crop Protection**, v. 125, n. August, p. 1–7, 2019.

SAINZ; ANDRÉS; MARTÍNEZ-DÍAZ; et al. Chemical Composition and Biological Activities of *Artemisia pedemontana* subsp. assoana Essential Oils and Hydrolate. **Biomolecules**, v. 9, n. 10, p. 558, 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-273X/9/10/558>>. .

TAVARES, C. S.; GAMEIRO, J. A.; ROSEIRO, L. B.; FIGUEIREDO, A. C. **Hydrolates: a review on their volatiles composition, biological properties and potential uses**. 2022.

VILELA, G. R.; ALMEIDA, G. S.; D'ARCE, M. A. B. R.; et al. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. **Journal of Stored Products Research**, v. 45, n. 2, p. 108–111, 2009.

YAKHLEF, G.; HAMBABA, L.; PINTO, D. C. G. A.; SILVA, A. M. S. Chemical composition and insecticidal, repellent and antifungal activities of essential oil of *Mentha rotundifolia* (L.) from Algeria. **Industrial Crops and Products**, v. 158, n. October, p. 112988, 2020. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112988>>. .

ZIMMERMANN, R. C.; POITEVIN, C. G.; BISCHOFF, A. M.; et al. Insecticidal and antifungal

activities of *Melaleuca raphiophylla* essential oil against insects and seed-borne pathogens in stored products. **Industrial Crops and Products**, v. 182, n. January, p. 114871, 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669022003545>>. .

ZIMMERMANN, R. C.; POITEVIN, C. G.; DA LUZ, T. S.; et al. Antifungal activity of essential oils and their combinations against storage fungi. **Environmental Science and Pollution Research**, , n. 0123456789, 2023. Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-023-25772-5>>. .