

A utilização de extractos de origem vegetal na inibição do crescimento fúngico

Magro, A.¹; Rodrigues Júnior, C.² & Mexia, A.¹

¹Instituto de Investigação Científica Tropical - Centro de Estudos de Fitossanidade do Armazenamento, Trav. Conde da Ribeira, 9, 1300-142 Lisboa, ana.magro@netcabo.pt

²Instituto de Investigação Científica Tropical - Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Quinta do Marquês, Oeiras.

Resumo

Assiste-se actualmente a uma preocupação crescente por parte da opinião pública relativamente à utilização de pesticidas e à presença dos seus resíduos nos alimentos. Este facto encoraja os investigadores a procurarem meios alternativos para a protecção dos alimentos contra os microrganismos. Os compostos activos, biologicamente produzidos por plantas são um exemplo de substâncias consideradas seguras. Estes extractos de plantas são melhor aceites pela opinião pública e menos prejudiciais à saúde do que os compostos sintéticos.

Neste trabalho procedeu-se à selecção de extractos aquosos de canela (*Cinnamomum verum* J. Presl), de coentros (*Coriandrum sativum* L.), de hortelã (*Mentha piperita* L.), de macela (*Anthemis nobilis* L.), de malva (*Malva sylvestris* L.) e de salsa (*Petroselinum crispum* Mill.) com o objectivo de estudar a inibição do crescimento fúngico e o efeito fungistático desses mesmos extractos. Deste modo, pretendeu-se contribuir para a descoberta de novas substâncias activas com capacidades fungistáticas, de forma a poderem ser utilizadas como meio de luta alternativo à luta química.

Palavras-chave: extractos de plantas, fungos, pesticidas, fungicidas.

Abstract

We are seeing actually a growing concern and awareness by the public opinion related to the utilization of pesticides and to the presence of their residues in foodstuff. These facts lead the scientific organisations to search for new forms of foodstuff protection against the microorganism's contamination. The active compounds, biologically produced by plants are an example of substances considered safe. These plant extracts have a better acceptance by the public opinion and are less harmful to health than the synthetic ones.

In this work, we have selected aqueous extracts of cinnamon (*Cinnamomum verum* J. Presl), coriander (*Coriandrum sativum* L.), peppermint (*Mentha piperita* L.), chamomile (*Anthemis nobilis* L.), malva (*Malva sylvestris* L.) and parsley (*Petroselinum crispum* Mill.) with the objective of study their inhibitory effect and fungistatic power on fungi development. We hope to make a contribution to the overall work that has been done in the field of investigation of new active substances with fungistatic capabilities, that can be used as a substitute of pesticides.

Keywords: plant extracts, fungi, pesticides, fungicides.

1. Introdução

Assiste-se actualmente a uma preocupação crescente por parte da opinião pública relativamente à utilização de pesticidas e à presença dos seus resíduos nos alimentos. Este facto encoraja os investigadores a procurarem meios alternativos para a protecção dos alimentos contra os microrganismos.

Os compostos activos, biologicamente produzidos por plantas são um exemplo de substâncias consideradas seguras, recebendo a designação internacional de “GRAS-Generally Regarded as Safe”. Estes extractos de plantas são melhor aceites pela opinião pública e menos prejudiciais à saúde do que os compostos sintéticos (Jobling, 2000).

Nestes últimos anos foram feitos diversos ensaios utilizando plantas como tomilho, salvia, orégão, coentro (Pruthi, 1980), cravinho (Hitokoto *et al.*, 1980; Mabrouk & El-Shayeb, 1980), canela, alecrim, rosmaninho (Dadvison, 1997), cominho, pimenta, alcaravia (Beuchat & Golden, 1989), alho, cebola (Abdou *et al.*, 1972; Gandhi & Ghodekar, 1988), manjeriço, açafraão da Índia, manjerona e anis (Hitokoto *et al.*, 1980) no estudo da sua influência na inibição do crescimento fúngico e consequente produção de micotoxinas.

Neste trabalho procedeu-se à selecção de extractos aquosos de canela (*Cinnamomum verum* J. Presl), de coentros (*Coriandrum sativum* L.), de hortelã (*Mentha piperita* L.), de macela (*Anthemis nobilis* L.), de malva (*Malva sylvestris* L.) e de salsa (*Petroselinum crispum* Mill.) com o objectivo de estudar a inibição do crescimento fúngico e o efeito fungistático desses mesmos extractos. Deste modo, pretendeu-se contribuir para a descoberta de novas substâncias activas com capacidades fungistáticas, de forma a poderem ser utilizadas como meio de luta alternativo à luta química.

2. Material e Métodos

2.1. Material biológico

Para a obtenção dos extractos aquosos utilizou-se canela sob a forma de pó comercial e folhas de coentros, hortelã, macela, malva e salsa. O efeito fungistático destes extractos foi testado em estirpes dos fungos *Aspergillus* sp., *A. niger*, *Penicillium* sp. e *Fusarium culmorum* isoladas a partir de cereais provenientes de São Tomé e Príncipe.

2.2. Métodos

Extractos aquosos

Folhas de coentro, hortelã, macela, malva e salsa, nas quantidades indicadas no Quadro 1, foram colocadas num homogenizador (Braun) com água destilada esterilizada de forma a obter-se um macerado. Este foi em seguida filtrado por várias compressas esterilizadas de forma a obter-se a parte aquosa do extracto. No caso da canela, esta foi adquirida sob a forma de pó comercial e, neste caso, o pó foi colocado num Erlenmeyer contendo água destilada esterilizada (100mL). Em seguida colocou-se este Erlenmeyer num agitador orbital a 160 rpm durante dois dias.

Os extractos aquosos resultantes foram posteriormente centrifugados a 8000 rpm durante 20 minutos de modo a retirar todas as partículas que ainda restavam em suspensão. No caso da canela, foi feita nova centrifugação a 8000 rpm durante 30 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados utilizando para o efeito um filtro com 0,45 µm de porosidade.

Pré-inóculo

O procedimento de preparação do pré-inóculo foi idêntico em todos os ensaios executados. O pré-inóculo foi constituído por culturas de *Aspergillus sp.*, *A. niger*, *Penicillium sp.* e *Fusarium culmorum* crescidas, durante oito dias à temperatura de 28°C, em caixas de Petri (90mm de diâmetro) contendo 20 mL de PDA (Potato Dextrose Agar).

Inoculação dos fungos do meio de PDA suplementado com o extracto aquoso a testar

Após a esterilização do meio de cultura, em autoclave a 121°C durante 15 minutos, juntou-se, a cada 20 mL de meio de cultura, os volumes referenciados no Quadro 1, preparando-se, em seguida, com cada uma destas misturas várias placas de Petri.

Quadro 1 - Quantidade de planta ou especiaria utilizada para obtenção do extracto aquoso e volume de extracto que foi adicionado ao meio de PDA.

| Planta ou especiaria | Quantidade (g/100mL) | Volume (mL) |
|----------------------|----------------------|-------------------|
| Canela | 20 | 2 e 3 |
| Coentros | 90 | 1; 1,9 e 2 |
| Hortelã | 50 | 2 e 3 |
| Macela | 23 | 2; 3 e 4 |
| Malva | 30 | 1 e 2 |
| Salsa | 94 | 2 e 3 |

Cada placa foi inoculada no centro com um disco de micélio de 0,5 cm de diâmetro (inóculo sólido padronizado), retirado da periferia da colónia do fungo em estudo. Este inóculo foi colocado em posição invertida sobre o meio de cultura. Para cada fungo foram feitas três placas de Petri (réplicas).

Foram preparadas placas testemunhas sem os extractos vegetais aquosos para avaliação do padrão de crescimento dos fungos em estudo.

Todas as placas de Petri foram incubadas a 28°C, durante oito dias, ao fim dos quais foi medido, em centímetros, o diâmetro da colónia.

Os valores dos diâmetros das colónias obtidos nos diversos ensaios foram analisados pelo método ANOVA, neste caso particular, a um factor.

3. Resultados e discussão

Na Figura 1 apresentam-se graficamente os resultados obtidos a partir das medições dos diâmetros das colónias de *Aspergillus sp.*, *A. niger*, *Penicillium sp.* e *Fusarium culmorum*, inoculados em meio de PDA não suplementado e em meio de

PDA suplementado com extractos aquosos de canela, coentros, hortelã, macela, salsa e malva.

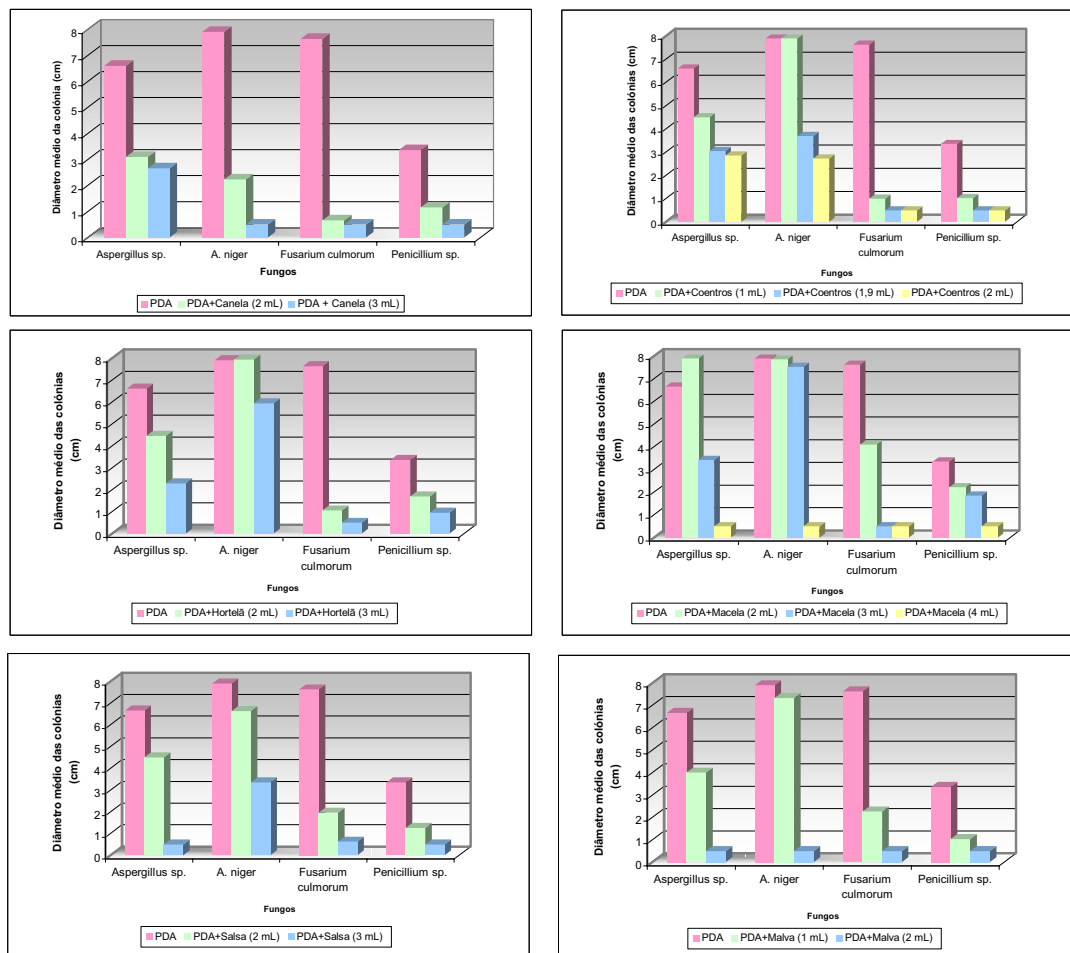


Fig. 1 - Diâmetro médio das colónias de quatro fungos, ao fim de 8 dias de crescimento, em meio de PDA suplementado com diferentes doses de extracto aquoso de canela, coentros, hortelã, macela, salsa e malva e em PDA não suplementado.

Os extractos aquosos de canela, coentros, hortelã, macela, malva e salsa demonstraram ser eficazes contra todos os fungos testados ($p < 0,05$).

O meio de PDA suplementado com 3 mL de extracto aquoso de canela demonstrou maior eficácia, inibindo completamente o crescimento de *A. niger*, *F. culmorum* e *Penicillium sp.* e diminuindo o crescimento de *Aspergillus sp.*.

No caso dos coentros, o meio de PDA suplementado com 1,9 mL do extracto foi o mais eficaz no caso de *F. culmorum* e *Penicillium sp.* inibindo por completo o crescimento deles. Para *Aspergillus sp.* e *A. niger* o meio de PDA suplementado com 2 mL demonstrou maior eficácia.

O meio de PDA suplementado com 3 mL de extracto de hortelã foi o mais eficaz, diminuindo o crescimento de *Aspergillus sp.* e *A. niger* e *Penicillium sp.* e inibindo por completo o crescimento de *F. culmorum*.

Verificou-se que o meio de PDA suplementado com 4 mL de extracto de macela foi o mais eficaz inibindo na totalidade o crescimento de todos os fungos testados.

O meio de PDA suplementado com 3 mL de extracto aquoso de salsa demonstrou ser o mais eficaz, reduzindo o crescimento de *A. niger* e inibindo na totalidade o crescimento de *Aspergillus* sp., *F. culmorum* e *Penicillium* sp..

O meio de PDA suplementado com 2 mL de extracto aquoso de malva demonstrou maior eficácia, inibindo na totalidade o crescimento de todos os fungos testados.

No quadro 2 estão referenciados os resultados obtidos após transformação dos resultados iniciais.

Quadro 2 – Efeito inibitório dos extractos aquosos testados.

| Planta | [] g/mL | <i>Aspergillus</i> sp. | <i>A. niger</i> | <i>Penicillium</i> sp. | <i>Fusarium culmorum</i> |
|----------|----------|------------------------|-----------------|------------------------|--------------------------|
| Canela | 0,4 | ++ | ++ | ++ | ++ |
| | 0,6 | ++ | +++ | +++ | +++ |
| Coentros | 0,9 | + | - | ++ | ++ |
| | 1,71 | ++ | ++ | +++ | +++ |
| | 1,8 | ++ | ++ | +++ | +++ |
| Hortelã | 1,0 | + | - | ++ | ++ |
| | 1,5 | ++ | + | ++ | +++ |
| Macela | 0,46 | - | - | + | ++ |
| | 0,69 | ++ | + | ++ | +++ |
| | 0,92 | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Malva | 0,3 | + | + | ++ | ++ |
| | 0,6 | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Salsa | 1,88 | + | + | ++ | ++ |
| | 2,82 | +++ | ++ | +++ | +++ |

Nota: (+++) 100% de inibição do crescimento fúngico; (++) superior a 50% de inibição do crescimento fúngico; (+) inferior a 50% de inibição do crescimento fúngico e (-) 0% de inibição do crescimento fúngico.

4. Conclusões

Neste trabalho foi testado o efeito fungistático de seis extractos aquosos. Perante os resultados obtidos, salienta-se o facto dos extractos aquosos de macela e malva conduzirem à inibição total de crescimento dos 4 fungos testados, sendo este último o mais eficaz pois com uma concentração menor obtem-se o mesmo resultado. No entanto não foi possível encontrar quaisquer referências bibliográficas de forma a refutar estes mesmos resultados.

Em relação aos outros extractos obtiveram-se diferentes graus de inibição conforme o fungo a ser testado.

As estirpes dos fungos *Fusarium culmorum* e *Penicillium* sp. mostraram elevada susceptibilidade na maioria dos extractos testados, sobretudo nas concentrações mais elevadas destes, apresentando o primeiro maior susceptibilidade.

Referências bibliográficas

- Abdou, I. A., Abou-Zeid, A. A., El-Sherbeeney, M. R. & Abou-el-Gheat, Z. H. (1972). Antimicrobiol activities of *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Raphanus sativus*, *Capsicum frutescens*, *Eruca sativa*, *Allium kurrat* on bacteria. *Qual. Plan. Mater. Veg.*, **22**: 29-35.
- Beuchat, L. R. & Golden, D. A. (1989). Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.*, **1**:134-142.
- Davidson, P. M. (1997). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds, **29**: 520-556. In: Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T. J. (eds), *Food Microbiology fundamentals and frontiers*, 768pp.
- Gandhi, D. N. & Ghodekar, D. R. (1988). Antibacterial activity of garlic extract against lactic acid bacteria and contaminantes of fermented milks. *Indian J. Dairy Sci.*, **41**: 511-512.
- Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., Sakai, S. & Kurata, H. (1980). Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**: 818-822.
- Jobling, J. (2000). Essential oils: A new idea for post-harvest disease control. *Good Fruit and Veget. Mag.*, **11** (3): 50.
- Mabrouk, S. S. & El-Shayeb, N. M. A. (1980). Inhibition of aflatoxin formation by some spices. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **171**: 344-347. In: Golob, P., Moss, C., Dales, M., Fidgen, A., Evans, J. & Gudrups, I. (eds.). The use of spices and medicinals as bioactive protectants for grains. *FAO Agric. Serv. Bull.*, 137pp.
- Pruthi, J. S. (1980). Spices and condiments: chemistry, microbiology, technology. *Advances in food research*, suppl. 4, Academic Press, New York, 463pp.