

Actividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Lavandula luisieri* sobre *Botrytis cinerea* e *Rhizopus* sp. isolado de morango

Susana Filipa Nunes Graça

Relatório de estágio apresentado ao Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciatura em Nutrição Humana e Qualidade Alimentar, realizado sob a orientação científica da Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, Professor do Departamento de Microbiologia do Instituto Politécnico de Castelo Branco e da Doutora Maria Adélia da Silva Santos Ferreira, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

À memória de meu Pai

Agradecimentos

Começo por agradecer à Doutora Cristina Pintado, docente da Escola Superior Agrária, pela oportunidade de realizar este estágio sob a sua orientação, por todo o conhecimento científico transmitido ao longo do curso e do estágio, pela disponibilidade, dedicação e amizade demonstrada durante este período.

À Doutora Maria Adélia da Silva Santos Ferreira, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, por toda a colaboração no decorrer deste trabalho.

À Doutora Fernanda Delgado, docente da Escola Superior Agrária, pela fundamental colaboração neste trabalho, na cedência dos óleos essenciais de *Lavandula luisieri*, pelos conhecimentos transmitidos e toda a disponibilidade em ajudar.

A todas as pessoas do Laboratório de Microbiologia da ESA, por toda ajuda, disponibilidade e amizade ao longo de todo o curso e do estágio.

A todos os docentes, técnicos superiores e funcionários da ESA que directa ou indirectamente contribuíram para que o curso e o estágio fossem realizados.

À minha colega de turma e amiga Lena agradeço, do fundo do coração, por todos os conhecimentos, quer a nível profissional, quer a nível pessoal, pelo companheirismo e pela grande amizade.

À Marta, pela amizade, aos meus colegas de turma sempre disponíveis para ajudar, sem eles seria muito mais difícil acabar o curso.

Ao Tiago e aos meus amigos, sempre presentes, pela paciência, pelo carinho e por todo o apoio demonstrado ao longo deste tempo.

Às minhas antigas e actuais colegas de trabalho, pela paciência, disponibilidade e amizade sempre que necessário.

Ao amigo Fernando Queirós, pela grande motivação académica, pela dedicação, pelos conhecimentos transmitidos e amizade.

Finalmente, à minha família, principalmente à minha mãe e aos meus avós, agradeço pelo grande apoio em todos os aspectos, sem eles seria impossível realizar este curso.

Muito Obrigada!

Resumo

A contaminação microbiológica no morango, causada por fungos filamentosos, dá origem a elevadas perdas de stock durante o transporte e o período de armazenamento do fruto.

A *Lavandula luisieri* é uma planta endémica na região da Beira Baixa, tendo sido comprovada a sua utilidade para vários fins. Com o objectivo de testar a actividade antifúngica de óleos essenciais desta planta e do cineol para com os bolores *Rhizopus sp.* e *Botrytis cinerea*, foi determinada a concentração mínima inibitória (MIC) dos OE através do método de microdiluição em caldo e a concentração mínima fungicida (MFC) pelo método da gota em placa com meio sólido.

As MIC situaram-se entre os valores 0,19% (v/v) e 0,38% (v/v) para *Rhizopus sp.* e 0,38% (v/v) e 1,5% (v/v) para *Botrytis cinerea*. Relativamente às MFC verificaram-se valores entre os 0,16% (v/v) e os 2% (v/v) para *Rhizopus sp.* e entre os 1,25% (v/v) e 3% (v/v) para *Botrytis cinerea*. O cineol foi menos eficaz na inibição dos bolores, por comparação com os óleos essenciais.

Os resultados obtidos indicam que não houve diferença entre os valores dos OE testados, considerando assim que a quantidade de cineol presente na planta na altura da colheita não influencia directamente a actividade antifúngica dos OE de *Lavandula luisieri*.

Palavras-chave: morango, antifúngico, óleos essenciais, bolores, *Lavandula luisieri*.

Abstract

The microbiological contamination of strawberry, caused by filamentous fungi, leads to high fruit stock losses during his transport and storage period.

Lavandula Luisieri is an endemic plant in the region of Beira Baixa, which proof its useful for various purposes. In order to test the antifungal activity of essential oils of this plant and cineol with the *Rhizopus* sp. and *Botrytis cinerea* molds was determined minimum inhibitory concentration (MIC) of the OE through the broth microdilution method and minimum fungicidal concentration (MFC) by the drop plate method with solid medium.

The MIC values were between 0,19% (v/v) and 0,38% (v/v) to *Rhizopus* sp. and 0,38% (v/v) and 1,5% (v/v) to *Botrytis cinerea*. For the MFC, were found values between 0,16% (v/v) and 2% (v/v) to *Rhizopus* sp. and between 1,25% (v/v) and 3% (v/v) to *Botrytis cinerea*. Cineol was less effective against molds, than essential oils.

The obtained results indicate that there was no difference between the values of OE tested, leading to the conclusion that cineol present in the plant at harvest did not directly influence the antifungal activity of *Lavandula luisieri* OE.

Keywords: strawberry, antifungal, essential oils, molds, *Lavandula luisieri*.

Índice Geral

I Introdução	1
II Revisão bibliográfica	2
1 - Morango	2
1.1 – O morango no mercado	2
1.2 – Qualidade organoléptica	3
1.3 – Qualidade nutricional	3
1.4 – Deterioração após colheita	4
2 – Bolores contaminantes do morango	4
2.1 – <i>Rhizopus</i> spp.	5
2.2 – <i>Botrytis cinerea</i>	6
3 - Óleos essenciais de plantas aromáticas	6
3.1 - Toxicidade para o Homem	7
3.2 – Mecanismos de acção contra microrganismos	7
3.3 - <i>Lavandula luisieri</i>	8
4 – Revestimentos edíveis	10
III Material e métodos	11
1 – Avaliação e contagem da flora fúngica no morango	11
1.1 – Purificação dos bolores	11
1.2 – Preparação para microscópio	12
2 – Suspensão de esporos de <i>Rhizopus</i> sp. e <i>Botrytis cinerea</i>	12
2.1 - Preparação da suspensão de esporos de <i>Rhizopus</i> sp. e <i>Botrytis cinerea</i>	12
2.2 – Rectas de calibração	13
3 – Método de microdiluição em caldo	13
3.1 – Preparação de SDB acidificado e indicador	14
3.2 – Origem e descrição dos óleos essenciais	14
3.3 – Preparação do inóculo	15
3.4 – Ensaio de microdiluição em caldo	15
4 – Confirmação em placa	17
IV Resultados e discussão	18
1 – Flora fúngica do morango	18
1.1 - Avaliação e contagem da flora fúngica no morango	18
1.2– Purificação e observação ao microscópio	19
2 – Suspensão de esporos de <i>Rhizopus</i> sp. e <i>Botrytis cinerea</i>	20

2.2 – Rectas de calibração	22
3 – Ensaio de microdiluição – MIC	23
3.1 – Concentração dos inóculos utilizados nos ensaios	23
3.2 – <i>Rhizopus</i> sp.	24
3.3 – <i>Botrytis cinerea</i>	24
4 – Confirmação em placa - MFC	25
4.1 – <i>Rhizopus</i> sp.	25
4.2 – <i>Botrytis cinerea</i>	28
V Considerações finais	30
VI Referências bibliográficas	31

Anexos

Índice de figuras

Figura 1 Produção mundial de morangos em 2009	2
Figura 2 Amostra de morangos contaminados	4
Figura 3 Efeito de óleos essenciais na estrutura das hifas de <i>Botrytis cinerea</i>	7
Figura 4 <i>Lavandula luisieri</i>	8
Figura 5 Estrutura química de 1,8-cineol	9
Figura 6 Efeito antifúngico do quitosano com diferentes pesos moleculares em <i>Botrytis cinerea</i>	10
Figura 7 Amostra de morangos utilizada na análise da flora fúngica	11
Figura 8 Material para a realização da suspensão de esporos	13
Figura 9 Óleos essenciais de <i>Lavandula luisieri</i> e cineol utilizados no trabalho	14
Figura 10 Ensaio de microdiluição em caldo e micropipeta de repetição	16
Figura 11 Microplaca antes da incubação	17
Figura 12 Flora fúngica resultante da análise das amostras de morangos	18
Figura 13 Fotografia macroscópica de <i>Rhizopus</i> sp.	19
Figura 14 Imagem microscópica de <i>Rhizopus</i> sp.	19
Figura 15 Esporângios de <i>Rhizopus</i> sp.	19
Figura 16 - Fotografia macroscópica de <i>Botrytis cinerea</i>	20
Figura 17 Fotografia microscópica de <i>Botrytis cinerea</i>	20
Figura 18 Suspensão de esporos de <i>Rhizopus</i> sp.	20
Figura 19 Suspensão de esporos de <i>Botrytis cinerea</i> com absorvância de 0,154	21
Figura 20 Suspensão de esporos de <i>Botrytis cinerea</i> com absorvância de 0,125	21
Figura 21 Contagem de colónias de <i>Rhizopus</i> sp. com cerca de 24 horas de incubação	21
Figura 22 Recta de calibração da absorvância em função da concentração de esporos de <i>Rhizopus</i> sp.	22
Figura 23 Recta de calibração da absorvância em função da concentração de esporos de <i>Botrytis cinerea</i>	23
Figura 24 Microplaca inoculada com <i>Rhizopus</i> sp. após incubação com a concentração máxima de 3% (v/v) de OE	24
Figura 25 Microplaca inoculada com <i>Botrytis cinerea</i> após incubação com a concentração máxima de 3% (v/v) de OE	25

Índice de tabelas

Tabela 1	Produção nacional de morangos	3
Tabela 2	Valores nutricionais por 100g de morango	3
Tabela 3	Bolores contaminantes do morango	5
Tabela 4	Classificação taxonômica do gênero <i>Rhizopus</i>	5
Tabela 5	Classificação taxonômica da espécie <i>Botrytis cinerea</i>	6
Tabela 6	Concentração mínima inibitória (MIC) de vários óleos essenciais para <i>Rhizopus</i> sp. (% v/v)	8
Tabela 7	Proveniência dos óleos essenciais utilizados no trabalho	15
Tabela 8	Contagem de fungos (UFC/g) da análise às amostras de morango	18
Tabela 9	Concentração de esporos (UFC/mL) e absorvâncias da suspensão de esporos ajustada de cada ensaio	22
Tabela 10	Concentrações dos inóculos utilizados nos ensaios	23
Tabela 11	Concentração mínima fungicida (MFC) de óleos essenciais de <i>Lavandula luisieri</i> a uma concentração máxima de 2% (v/v) para <i>Rhizopus</i> sp. (1º ensaio)	26
Tabela 12	Concentração mínima fungicida (MFC) de óleos essenciais de <i>Lavandula luisieri</i> a uma concentração máxima de 2,5% (v/v) para <i>Rhizopus</i> sp. (2º ensaio)	26
Tabela 13	Concentração mínima fungicida (MFC) de óleos essenciais de <i>Lavandula luisieri</i> a uma concentração máxima de 3% (v/v) para <i>Rhizopus</i> sp. (3º, 4º e 5º ensaios)	27
Tabela 14	Concentração mínima fungicida (MFC) de óleos essenciais de <i>Lavandula luisieri</i> a uma concentração máxima de 2,5% (v/v) para <i>Botrytis cinerea</i> (1º ensaio)	28
Tabela 15	Concentração mínima fungicida (MFC) de óleos essenciais de <i>Lavandula luisieri</i> a uma concentração máxima de 3% (v/v) para <i>Botrytis cinerea</i> (2º, 3º e 4º ensaios)	29

