

Inibição de *Aspergillus ochraceus* com óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

Inhibition of *Aspergillus ochraceus* with essential oil of *Melaleuca alternifolia*

Mayumi Heloise Teshima Motosuke¹, Elisabete Hiromi Hashimoto²

RESUMO

O comércio de produtos alimentícios apresenta problemas relacionados com a contaminação de microrganismos, principalmente fungos na questão de armazenamento. *Aspergillus ochraceus* é um fungo filamentosos produtor de ocratoxina A (OTA), uma micotoxina altamente tóxica que contamina os alimentos e pode gerar perigo à saúde humana e animal. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a aplicabilidade do óleo essencial *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) para controle de *A. ochraceus*. A concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de melaleuca para controle de *A. ochraceus* cepa A152 foi determinada através de testes *in vitro* nas concentrações 0, 50, 100, 200, 300 e 400 µL/L. O óleo de Melaleuca apresentou inibição *A. ochraceus*, com uma CIM de 400 µL/L. De acordo com o fornecedor o óleo é composto principalmente de 4-terpineol e α-terpineol, responsáveis então pela inibição do crescimento micelial e na esporulação do fungo. O estudo destaca o potencial dos óleos essenciais, especificamente o óleo de Melaleuca, como uma alternativa para o controle de fungos na agroindústria, oferecendo uma opção mais segura e sustentável em comparação com produtos químicos tradicionais.

PALAVRAS-CHAVE: *Aspergillus ochraceus*; inibição; óleo essencial;

ABSTRACT

The trade of food products faces issues related to microbial contamination, particularly fungi in terms of storage. *Aspergillus ochraceus* is a filamentous fungus that produces ochratoxin A (OTA), a highly toxic mycotoxin that contaminates food and poses a danger to human and animal health. Thus, this study aimed to investigate the applicability of *Melaleuca alternifolia* essential oil (tea tree oil) for controlling *A. ochraceus*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of melaleuca oil for *A. ochraceus* strain A152 control was determined through *in vitro* tests at concentrations of 0, 50, 100, 200, 300, and 400 µL/L. Melaleuca oil exhibited inhibition of *A. ochraceus*, with an MIC of 400 µL/L. According to the supplier, the oil is primarily composed of 4-terpineol and α-terpineol, which are responsible for inhibiting the mycelial growth and spore production of the fungus. The study highlights the potential of essential oils, specifically Melaleuca oil, as an alternative for controlling fungi in the agroindustry, offering a safer and more sustainable option compared to traditional chemicals.

KEYWORDS: *Aspergillus ochraceus*; inhibition; essential oil;

INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas do setor agroindustrial é a questão da contaminação dos produtos agrícolas, tanto durante a cadeia de produção alimentar quanto na vida prateleira de um produto, que podem ser contaminados por fungos antes ou após a colheita (GONZALES *et al*, 2013). *Aspergillus ochraceus* é um fungo filamentosos característico, presente em produtos agrícolas como grãos, cereais, frutas secas, vinho e

¹ Voluntária do PIVIC. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: Mayumiheloise@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 3840897286460885.

² Docente do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia /Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: elisabete@utfpr.edu.br. ID Lattes: 2913931020821513.

café. Também é um dos fungos produtores de ocratoxina A (OTA). A toxina, produtor do metabolismo secundário do fungo apresenta atividade neurotóxica, teratogênica, embriotóxica e genotóxica, imunossupressora e imunotóxica por natureza (HUA e XING, 2014).

Os óleos essenciais (OEs) são uma mistura de compostos químicos produzidos por plantas ou sintéticos, eles geralmente têm a presença de compostos terpenóides, fenólicos e aldeídos que auxiliam na atividade antifúngica. Para Gilles, et al. as propriedades lipofílicas alteram a membrana dos microrganismos e acabam causando vários eventos em sua estrutura (2009 *apud* CONNER, 1993). Os componentes fenólicos presentes nos óleos essenciais deixam sensível a bicamada fosfolipídica da membrana celular, levando ao aumento da permeabilidade e vazamento de constituições intracelulares vitais ou comprometimento dos sistemas enzimáticos bacterianos (Moreira, et al. 2005).

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* é proveniente das folhas de uma pequena árvore da Austrália de uma região do pântano, esse óleo é comumente chamado de tea tree ou óleo da árvore do chá. Esse óleo provou-se ser eficaz no tratamento de doenças, além de combater fungos e bactérias resistentes a medicamentos convencionais (SILVA, 2019). O tea tree é aplicado em aromaterapia, saúde bucal, em produtos cosméticos e com uma aplicabilidade versátil e com campos na saúde e bem-estar humana e animal que procedem muitos estudos com seu principal composto, o 4-terpineol. O trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca (Melaleuca alternifolia)* no controle de *Aspergillus ochraceus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

MICRORGANISMOS E O ÓLEO ESSENCIAL

Aspergillus ochraceus A152 foi cultivado em BDA (ágar batata dextrose) incubado a 25 °C por 7 dias. O óleo essencial de *Melaleuca* utilizado foi um produto comercial da marca Quinarí®.

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Para o preparo da suspensão de *A. ochraceus*, uma colônia do fungo foi transferida com auxílio de uma alça de platina e transferida para um tubo contendo tween 80 (0,01% v/v em água destilada) devidamente esterilizada em autoclave. Em seguida foi realizada a contagem de esporos, utilizando a Câmara de Neubauer, realizando-se diluições para que ao final a concentração atingisse 10⁶ esporos por mL.

Para definição das concentrações do óleo essencial a serem testadas, realizou-se uma busca de referencial bibliográfico como referência. A concentração inibitória mínima

do OE de *Melaleuca alternifolia* foi descrita como 200 µL/L para *Aspergillus ochraceus* (CGMCC 3.4520) (KONG e LU, 2018) Baseado nesse valor utilizou-se concentrações acima (+ 0,5x, 1x) e abaixo (1/2x e ¼ x), sendo x o valor de CIM relatado na literatura, assim foram testadas as concentrações 0, 50, 100, 200, 300 e 400 µL/L.

As concentrações da mistura do óleo essencial de melaleuca e Tween 80 foram realizadas em microtubos separados, está descrita na tabela 1 a quantidade de cada componente para que ao final o volume seja 200 µL para ser retirado 100 µL e adicionar ao microtubo contendo caldo.

Tabela 1 – Pontos de concentração de óleo essencial.

Concentração (µL/L)	Óleo (µL)	Tween 0,1% (µL)	Volume final (µL)
Controle (0)	0	200	200
50	10	190	200
100	20	180	200
200	40	160	200
300	60	140	200
400	100	100	200

Fonte: Autor (2023).

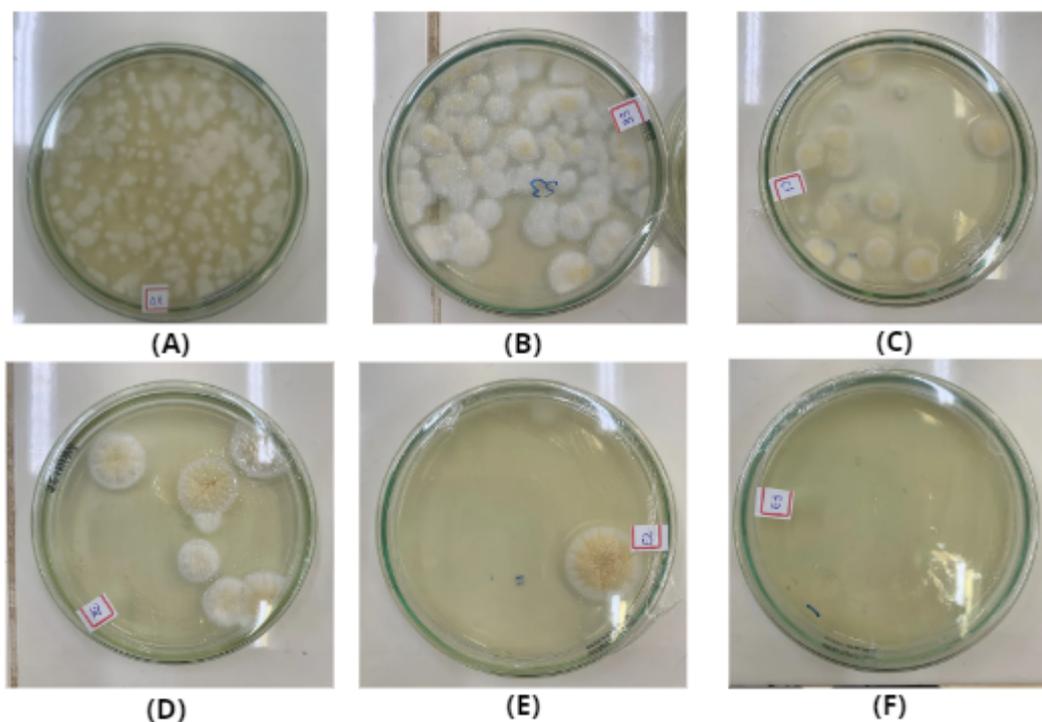
Em microtubos de 1,5 mL do tipo Eppendorf® contendo 800 µL de caldo Sabouraud estéril, foram adicionados 100 µL da suspensão de esporos (~10⁶ esporos/mL). E em seguida, adicionou-se 100 µL de cada concentração de óleo essencial na tabela 1 com Tween 80 (0,1% v/v) de 50, 100, 200, 300 e 400 µL/mL, totalizando 1000 µL em cada microtubo. Os microtubos foram lacrados com Parafilm® evitando a interferência entre os testes, devido a volatilidade do óleo. A incubação foi realizada em um agitador de microtubos a 280 rpm para que não houvesse separação de fases e mantido a 25 °C por 7 dias. Paralelamente, realizou-se o preparo de um microtubo controle, contendo 800 µL de caldo Sabouraud estéril, 100 µL de suspensão de esporos e 100 µL de Tween 80 a 0,1%.

Após 7 dias de incubação em agitação, uma alíquota de 200 µL de cada microtubo foi inoculada *Pour plate* em placa de Petri com BDA (39 g/L). As placas de Petri foram incubadas em estufa a 25 °C por 5 dias para realizar a contagem de colônias.

RESULTADO E DISCUSSÕES

A figura 1 apresenta o crescimento das colônias de *A. ochraceus* nas placas de Petri com cada concentração de óleo testada.

Figura 1 – Colônias de *Aspergillus ochraceus* com óleo essencial.



Concentrações: A) 0 µL/L; B) 50 µL/L; C) 100 µL/L; D) 200 µL/L; E) 300 µL/L; F) 400 µL/L.

Fonte: Autor (2023).

A tabela 2 apresenta a contagem de colônias de *A. ochraceus*, relacionada com a figura 1 onde é possível visualizar a inibição do fungo com o aumento da concentração do óleo essencial.

Tabela 2 - Concentrações de *Melaleuca alternifolia* e contagem de colônias.

Concentração (µL/ L)	Número de colônias
0	Controle
50	53
100	15
200	6
300	2
400	0

Fonte: Autor (2023).

A inibição de *A. ochraceus* foi diretamente relacionada com o aumento da concentração de OEs de *Melaleuca alternifolia*. A germinação de esporos e o crescimento do fungo sofreu influência dos componentes do OE, segundo o fornecedor o óleo apresenta 30% de 4-terpineol e α -terpineol, menos de 15% de 1,8-cineol, entre 10 e 28% de gama-terpineno e 0,5 a 12% de p-cinemo (QUINARÍ, 2015), que apresentaram



atividade inibitória do crescimento micelial e da esporulação do fungo. O α -terpineol aumenta a permeabilidade da membrana do *A. ochraceus* que consecutivamente aumenta a condutividade elétrica relativa e leva a destruição da membrana do fungo associado com outro componente, 3-carene que modifica um pequeno ponto na condutividade elétrica relativa (KONG e LU, 2018).

Em comparação com outros óleos essenciais, o de *Melaleuca alternifolia* mostrou atividade antifúngica com uma das menores concentração e com inibição completa. A cepa de *A. ochraceus* 3.4412 apresenta suspensão de 10^5 (esporos/mL).

Tabela 2 – Concentração de outros óleos essenciais e potencial de inibição

Óleo essencial	Concentração inibitória mínima (μ L/ L)	Inibição completa	Cepa
Melaleuca	400	+	<i>A. ochraceus</i> A152
Aldeído cinâmico	150	+	<i>A. ochraceus</i> 3.4412
Canela	250	+	<i>A. ochraceus</i> 3.4412
Aldeído cinâmico sintético	250	+	<i>A. ochraceus</i> 3.4412
Cítrico	500	+	<i>A. ochraceus</i> 3.4412
Eugenol	500	+	<i>A. ochraceus</i> 3.4412
Menta	1500	+	<i>A. ochraceus</i> 3.4412
Eucalipto	\leq 1500	-	<i>A. ochraceus</i> 3.4412
Anis	\leq 1500	-	<i>A. ochraceus</i> 3.4412
Cânfora	\leq 1500	-	<i>A. ochraceus</i> 3.4412

(+) Não houve crescimento de colônias do fungo.

(-) Há crescimento de colônias do fungo

Fonte: Hua, Xing, Selvaraj, Wang, Zhao, *et al* (2014, p. 7-8).

Dentre os nove óleos analisados (HUA *et al* 2014), apresentaram inibição completa de *A. ochraceus* o óleo de aldeído cinâmico natural, seguido de aldeído cinâmico sintético, canela, cítrico, eugenol e menta. Diante disso, os valores de CIM do óleo de aldeído cinâmico natural e melaleuca estão relativamente próximos, o que difere são seus meios de inibição e a concentração de esporos/mL que é bem menor em relação a suspensão utilizada neste estudo, onde o principal composto da melaleuca é o 4-terpineol. E segundo Hua, o óleo de aldeído cinâmico causa uma redução na produção de ergosterol em *A. ochraceus* e correlacionou-se a redução da produção de OTA e da biomassa fúngica (2014 *apud* YAMAMOTO-RIBEIRO *et al* 2013).

CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados pode-se concluir a atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* no controle *A. ochraceus* a partir da CIM de 400 μ L/L. A utilização de produtos naturais como tratamento de fungicidas é uma alternativa para a não utilização de agrotóxicos pesados em alimentos, ou até mesmo conservantes que são prejudiciais à saúde humana e animal.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

AZAMBUJA, W. Óleo essencial de tea tree (melaleuca). **Óleos essenciais** (org.), 2015. Disponível em: <https://www.oleosessenciais.org/oleo-essencial-de-tea-tree-melaleuca/>. Acesso em: 12 de setembro de 2023.

GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. **Food chemistry**, Wagga wagga, Austrália. V.119, p.731-737, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.021>. Acesso em: 7 de setembro de 2023.

GONÇALEZ E, SILVA JL, REIS TA, NAKAI VK, FELÍCIO JD, CORRÊA B. Produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim. São Paulo: Arquivos do Instituto Biológico; 2013

HUA, H.; XING, F. *et al.* Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth on ochratoxin A production. **PLoS ONE**, Beijing, China, v. 9, n. 9, setembro, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0108285. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0108285>. Acesso em: 5 de setembro de 2023.

KONG, Q.; LU, J. *et al.* Antifungal mechanisms of α -terpineol and terpen-4-ol as the critical components of Melaleuca alternifolia oil in the inhibition of rot disease caused by *Aspergillus ochraceus* in postharvest grapes. **Journal of applied microbiology**, Xi'an, China, v. 126, p. 1161-1174, dezembro, 2019. Disponível em: 10.1111/jam.14193. Acesso em 8 de setembro de 2023;

MOREIRA, M. R.; PONCE, A.G.; DEL VALLE, C. E.; ROURA, S. I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWR – Food Science and Technology**, Provincia de Buenos Aires, Argentina, v.38, p.565-570, agosto, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.07.012>. Acesso em: 5 de setembro de 2023.

SILVA, L.; ALMEIDA, R.; VERÍCIMO, M.; MACEDO, H.; CASTRO, H. Atividades terapêuticas do óleo essencial de melaleuca. **Brazilian journal of health review**, Curitiba, v. 2, n. 6, p. 6011-6021, nov./dez. 2019. DOI:10.34119/bjhrv2n6-094. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/5488/4994>. Acesso em: 8 de setembro de 2023.