

## AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DIFERENTES ÓLEOS ESSENCIAIS COMERCIAIS NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DO *Aspergillus parasiticus*

Simone Arisa Hokasono (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Aline Amenencia de Souza (Co-orientadora), Juliana Cristina Castro (participante), Miguel Machinski Junior (Orientador). E-mail: [mmjunior@uem.br](mailto:mmjunior@uem.br)

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde /  
Departamento de Ciências Básicas da Saúde / Maringá, PR.

**Área e subárea:** Farmácia e Análise Toxicológica.

**Palavras-chave:** *Aspergillus parasiticus*, micotoxinas, óleos essenciais.

### Resumo:

O fungo *Aspergillus parasiticus* produz micotoxinas que contaminam alimentos e rações, sendo consideradas prejudiciais à saúde da população humana e animal. A principal classe de micotoxinas produzidas pelo *A. parasiticus* é das aflatoxinas, responsáveis por efeitos de mutagenicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade. Este trabalho teve por objetivo investigar a atividade antifúngica de óleos essenciais (OEs) comerciais de *Eugenia caryophyllus* (OEC), *Cymbopogon martini* (OEP), *Litsea cubeba* (OEL), *Pimpinella anisum* (OED) e *Cymbopogon nardus* (OECN) em *A. parasiticus*. Dos OEs avaliados, apenas o óleo essencial de cravo (OEC) apresentou Concentração Inibitória Mínima (CIM) inferior a 1000 µg/mL que apresentaria vantagens na ação fungicida. O OEC foi caracterizado por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, tendo como principal componente o eugenol (81,98%). A atividade antifúngica do óleo foi determinada através da CIM e da Concentração Fungicida Mínima (CFM), sendo 500 µg/mL para ambas. O OEC reduziu o desenvolvimento micelial de *A. parasiticus* em todas as concentrações, e a inibição nos tratamentos com 500 e 1000 µg/mL foi de 100%, em 250 µg/mL foi de 55%, em 125 µg/mL foi de 34% e na concentração de 62,5 µg/mL foi de 17,5%. A redução da biomassa pelo OEC foi avaliada pela determinação de ergosterol espectrofotometricamente, onde o controle fúngico apresentou 0,002% de teor de ergosterol, e os tratamentos nas concentrações de 125 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente, 0,0001% e 0,0002% de ergosterol. Os resultados obtidos demonstraram que o OEC apresentou potencial fungicida em *A. parasiticus*.

### Introdução

A contaminação fúngica é um fator preocupante para a agricultura e indústria de alimentos, devido à contaminação por micotoxinas que comprometem a segurança alimentar e, por conseguinte, é um problema de

saúde pública. As principais micotoxinas produzidas por espécies do gênero *Aspergillus* sp. são as Aflatoxinas, sendo que as três principais espécies produtoras são *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Dependendo da duração e nível de exposição, proporciona uma diversidade de efeitos tóxicos, incluindo hepatotoxicidade, mutagenicidade e teratogenicidade. Atualmente são exploradas substâncias e compostos capazes de substituir os fungicidas sintéticos por antifúngicos naturais e menos tóxicos. Os Óleos Essenciais (OEs) são produtos do metabolismo secundário de plantas, que apresentam papel na proteção contra microrganismos patogênicos que ameaçam a saúde e integridade vegetal (NOGUEIRA et al., 2010).

Assim sendo, o estudo teve como objetivo avaliar a atividade de diferentes óleos essenciais comerciais no crescimento e desenvolvimento do *A. parasiticus*.

### **Materiais e métodos**

Os óleos essenciais (OEs) de *Eugenia caryophyllus* (OEC), *Cymbopogon martini* (OEP), *Litsea cubeba* (OEL), *Pimpinella anisum* (OED) e *Cymbopogon nardus* (OECN) foram adquiridos no comércio local da cidade de Maringá, Brasil. *A. parasiticus* foi obtido do banco de isolados do Laboratório de Toxicologia/UEM, sendo cultivado em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) por 7 dias/25°C. Apenas o OEC apresentou resultados promissores para uso como fungicida, portanto sua caracterização foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Os compostos presentes foram identificados analisando os tempos de retenção e confirmados através de uma mistura padrão de n-alcenos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>, Sigma-Aldrich). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada seguindo a norma M38-A2 preconizada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standart*, e para a confirmação foi realizado a Concentração Fungicida Mínima (CFM). Para o desenvolvimento micelial o isolado foi cultivado na ausência (controle fúngico) e presença (testes) do OEC no meio de cultura ágar YES (*Yeast Extract Sucrose*). Os meios testes continham OEC nas concentrações de 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg/mL. O fungo foi inoculado com um *plug* central, e então, as placas foram incubadas em incubadora BOD por 15 dias a 25°C no escuro. Foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento radial utilizando a fórmula de Tian et al. (2011). O microcultivo foi realizado de acordo com Canela (2013). Suspensões de *A. parasiticus* foram inoculadas com auxílio de alça em pequenos blocos de meio BDA, em câmara de microcultivo e incubadas a 25°C durante 10 dias. O meio BDA, por sua vez, continha o OEC nas concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL. Após a incubação foi realizado a coloração das lâminas com lactofenol azul de algodão e foi examinada no microscópio óptico com câmara acoplada. A biomassa fúngica foi calculada pela determinação de ergosterol no controle e testes pelo método de Tian et al. (2012). A suspensão de 1x10<sup>5</sup> µg/mL conídios de *A. parasiticus* foi inoculada em meio YES contendo concentrações de 125, 250, 500 e 1000 µg/mL de OEC. A porcentagem de ergosterol para avaliar o efeito na

biomassa pelo OEC foi determinada por espectrofotometria entre 230 e 300 nm (Tian et al., 2012).

## Resultados e Discussão

A CIM dos OEs de *Cymbopogon martini* (OEP), *Litsea cubeba* (OEL), *Pimpinella anisum* (OED) e *Cymbopogon nardus* (OECN) foram acima de 1000 µg/mL, apenas o de *Eugenia caryophyllus* (OEC) apresentou o valor da CIM e da CFM do OEC de 500 µg/mL.

A atividade antifúngica do OEC em *A. parasiticus* apresentou um efeito dose dependente. O OEC reduziu o desenvolvimento micelial de *A. parasiticus* em todas as concentrações avaliadas. A inibição do desenvolvimento micelial foi de 17,5% em 62,5 µg/mL de OEC, em 125 µg/mL foi de 34% e de 55% em 250 µg/mL. Houve inibição total do *A. parasiticus* nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL do OEC.

A caracterização química dos componentes do OEC está demonstrada na Tabela 1, o eugenol foi o composto majoritário (81,98%). O eugenol apresenta propriedades antimicrobiana e antifúngica (PINTO et al., 2019). Além disso, o cariofileno e o óxido de cariofileno exibem atividade antimicrobiana (ALVES et al., 2018).

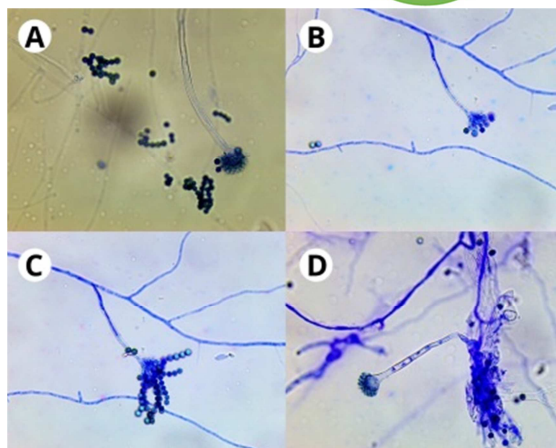
**Tabela 1.** Composição química do óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllus*) determinado por CG/MS.

COMPOSTO	TR (min.)	(%)
Óxido de cariofileno	31,54	1,28
α-humulene	26,42	2,95
Cariofileno	25,05	11,73
Eugenol	22,68	81,98
<b>TOTAL (%)</b>		<b>91,22</b>

\*TR: Tempo de retenção

Na microscopia, o controle fúngico (figura 1A) apresentou formação de conidióforos completos, com hifas de superfície lisa e septadas. Na figura 1C e 1D, as hifas estavam enrugadas e murchas devido a ação nas concentrações de 500 e 250 µg/mL. O tratamento na concentração de 1000 µg/mL apresentou hifas envergadas, com rugas na superfície celular, esvaziamento do conteúdo citoplasmático e poucos septos, quando comparada ao controle fúngico.

Observamos que no conteúdo da membrana plasmática do fungo, o controle fúngico apresentou 0,002% de ergosterol. Já nos tratamentos com OEC, nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL não houve produção de ergosterol, ou seja, o OEC inibiu completamente a formação da biomassa fúngica. Já na concentração de 125 e 250 µg/mL de OEC apresentaram respectivamente, 0,0002% e 0,0001% de ergosterol, ocorrendo uma grande redução no desenvolvimento da biomassa do *A. parasiticus*, indicando ação dos componentes do OEC na biossíntese do ergosterol.



**Figura 1.** Microscopia óptica através de um sistema de captura de imagens dos micélios de *A. parasiticus*. (A) controle fúngico, (B) tratamento com 250 µg/mL de OEC, (C) tratamento com 500 µg/mL de OEC e (D) tratamento com 1000 µg/mL de OEC no aumento de 40x.

## Conclusões

Nossos resultados evidenciaram que o OEC apresenta propriedades antifúngicas para o controle do *A. parasiticus*, uma espécie contaminante de alimentos, principalmente do amendoim e da castanha do Pará. Além disso, *A. parasiticus* são produtores de aflatoxinas, causando problemas de Saúde Pública na população brasileira.

## Agradecimentos

Ao PIBIC/CNPq-FA-UEM pela bolsa concedida ao primeiro autor, ao Laboratório de Toxicologia da UEM, ao meu orientador Miguel Machinski Junior, a minha co-orientadora Aline Amenencia de Souza e a professora Juliana Cristina de Castro por me auxiliarem nas metodologias realizadas.

## Referências

ALVES, F. A. R.; MORAIS, S. M.; SOBRINHO, A. C. N.; SILVA, I. N. G.; MARTINS, C. G.; SILVA, A. A. S.; FONTENELLE, R. O. S. Chemical composition, antioxidant and antifungal activities of essential oils and extracts from *Plectranthus* spp. against dermatophytes fungi. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 19, n. 1, p. 105-115, 2018.

CANELA, H. M. S. **Análise molecular da anidrase carbônica no fungo patogênico humano *Aspergillus fumigatus***. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

NOGUEIRA, J. H. C.; GONÇALEZ, E.; GALLETI, S. R.; FACANALI, R.; MARQUES, M. O. M.; FELÍCIO, J. D. Ageratum conyzoides essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 1, p. 55-60, 2010.

PINTO, S. M. L.; SANDOVAL, L. V. H.; VARGAS, L. Y. In vitro susceptibility of *Microsporium* spp. and mammalian cells to *Eugenia caryophyllus* essential oil, eugenol and semisynthetic derivatives. **Mycoses**, v. 62, n. 1, p. 41-50, 2019.

TIAN, J.; HUANG, B.; LUO, X.; ZENG, H.; BAN, X.; HE, J.; WANG, Y. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. **Food Chemistry**, v. 130, n. 3, p. 520-527, 2012.

TIAN, J.; BAN, X.; ZENG, H.; HE, J.; HUANG, B.; WANG, Y. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 2-3, p. 464-470, 2011.