

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE – UFCG
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE – CES
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE – UAS
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA

JADE CARDOSO LIMA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS FITOCONSTITUINTES
CARVACROL E TIMOL CONTRA CEPAS DE *Aspergillus* spp.: APLICABILIDADE
EM GRÃOS DE MILHO**

CUITÉ - PB
2017

JADE CARDOSO LIMA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS FITOCONSTITUINTES
CARVACROL E TIMOL CONTRA CEPAS DE *Aspergillus* spp.: APLICABILIDADE
EM GRÃOS DE MILHO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Bacharelado em Farmácia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Igara Oliveira Lima.

CUITÉ - PB

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

L732e Lima, Jade Cardôso.

Estudo da atividade antifúngica dos fitoconstituintes carvacrol e timol contra cepas de aspergillus spp.: aplicabilidade em grãos de milho. / Jade Cardôso Lima. – Cuité: CES, 2017.

52 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2017.

Orientadora: Igara Oliveira Lima.

1. Antifúngico. 2. Carvacrol. 3. Milho. I. Título.

JADE CARDOSO LIMA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS FITOCONSTITUINTES
CARVACROL E TIMOL CONTRA CEPAS DE *Aspergillus* spp.: APLICABILIDADE
EM GRÃOS DE MILHO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Bacharelado em Farmácia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel.

APROVADO EM: 19 / 12 / 2017

BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dr^ª. Igara Oliveira Lima
(Orientadora/UAS/CES/UFCG)



Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira
(Examinador/UAS/CES/UFCG)



Prof^ª. Dr^ª. Francinalva Dantas de Medeiros
(Examinadora/UAS/CES/UFCG)

*Dedico este trabalho à minha irmã, Natália
Cardoso, que sempre foi minha bússola.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Criador do universo, sem Você nada seria possível.

Agradeço à toda minha família, irmã, primas, tias, avó e especialmente aos meus pais Rosejane Maria Cardoso Lima e Rubem Gomes de Lima, com todo o meu coração, vocês me deram o suporte necessário para seguir nessa jornada, por isso serei sempre grata.

Aos velhos amigos, mesmo estando um pouco distantes em quilômetros, vocês sempre estiveram próximos a mim, me ouvindo, acalmando e torcendo pelo meu sucesso, assim como torço pelo de todos vocês, muito obrigada, Eva Lira, Andrea Suane, Erickson Galindo e Brayne Moraes!

Aos novos amigos, minhas lindas, Amanda Fernandes, Raqueline Cavalcanti, Ana Clara Rocha e Nayana Oliveira, sem vocês eu não teria conseguido, nossos laços são irrefutáveis, obrigada por estarem presentes nos momentos de maior angústia assim como nos de maior alegria.

À minha turma querida, aprender a conviver com vocês me fez crescer, levarei muitas lembranças comigo!

Àquelas com quem tive o prazer de criar o que seria o mais próximo de um lar longe de casa, vocês foram a minha força, minha alegria e minha família nas horas mais difíceis, muito obrigada Isabele Oliveira, Glaucianne Miranda, Raqueline Cavalcanti, Paula Mariane e Paula Gabriela, família é para sempre.

Ao grupo de pesquisa em microbiologia, em especial à Raqueline Cavalcanti, Sávio Gomes e Júnior Andrade, pelas infinitas horas de companheirismo no laboratório, vocês estiveram lá quando mais precisei.

Aos professores que encontrei por toda graduação, minha formação nunca seria possível sem a contribuição de cada um de vocês!

Aos professores Dr. Fillipe de Oliveira Pereira e Dr^a. Francinalva Dantas Medeiros, que aceitaram fazer parte da minha banca avaliadora contribuindo para a realização desse trabalho.

À minha querida orientadora Prof^a. Dr^a Igara Oliveira Lima, por todas as horas de ensinamento, por acreditar em mim desde o início e por todo o carinho durante essa jornada, não posso agradecer o suficiente!

*“However bad life may seem, there is always something you can do,
and succeed at. While there's life, there is hope.”*

(Stephen Hawking)

RESUMO

LIMA, J. C. **ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS FITOCONSTITUINTES CARVACROL E TIMOL CONTRA CEPAS DE *Aspergillus* spp.: APLICABILIDADE EM GRÃOS DE MILHO**. 2017. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2017.

Os fungos são organismos que desempenham importante papel ecológico e econômico, participando também de processos de decomposição de alimentos. O gênero *Aspergillus* é um dos principais responsáveis pela contaminação de alimentos, como o milho, podendo reduzir a qualidade e o valor nutricional dos grãos e ainda produzir micotoxinas prejudiciais à saúde. Dessa forma, buscam-se novas estratégias para controlar esses microrganismos, principalmente através do uso de produtos naturais, como os fitoconstituintes carvacrol e timol. O presente estudo investigou o potencial antifúngico do carvacrol e timol contra cepas de *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. niger*. Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição e a concentração fungicida mínima (CFM). Ainda se avaliou o efeito dos constituintes sobre o crescimento micelial fúngico e sua possível atividade conservante no modelo de contaminação de grãos de milho. O carvacrol inibiu o crescimento de todas as cepas do ensaio, com CIMs variando entre 64-256 µg/mL, já o timol, nas concentrações testadas, apenas não apresentou CIM para a cepa de *A. flavus*. A concentração fungicida mínima determinada para a cepa de *A. niger* foi equivalente ao valor de sua CIM para ambos os fitoconstituintes, enquanto que para as cepas de *A. flavus* e *A. fumigatus* a CFM determinada para o carvacrol foi equivalente a quatro vezes o valor de sua CIM. Os fitoconstituintes foram capazes de retardar o crescimento micelial fúngico nas concentrações testadas. O carvacrol se mostrou mais eficaz do que o timol no modelo de contaminação dos grãos de milho, não havendo crescimento fúngico visível nos tubos com concentrações de CIM e 2xCIM para as cepas de *A. flavus* e *A. fumigatus*, tornando-o uma boa opção de escolha para futuros estudos em conservação de alimentos.

Palavras-chave: *Aspergillus*, milho, fitoconstituintes, carvacrol e timol.

ABSTRACT

LIMA, J. C. **STUDY OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CARVACROL AND THYMOL PHYTOCONSTITUTIONS AGAINST *Aspergillus spp.*: APPLICABILITY IN MAIZE GRAINS**. 2017. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2017.

Fungi are organisms that play an important ecological and economic role, also participating in processes of food decomposition. The genus *Aspergillus* is one of the main responsible for contamination of foods, such as maize, being able to reduce the quality and nutritional value of the grains and to produce mycotoxins harmful to health. Thus, new strategies are sought to control these microorganisms, mainly by the use of natural products, such as carvacrol and thymol phytoconstituents. The present study investigated the antifungal potential of carvacrol and thymol against strains of *A. flavus*, *A. fumigatus* and *A. niger*. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution technique and the minimum fungicidal concentration (MFC) was also performed. The effect of the constituents on fungal mycelial growth was also evaluated as its possible preservative activity on the maize grain contamination model. Carvacrol inhibited the growth of all strains of the assay, with MICs ranging from 64-256 µg/mL, whereas thymol, at the concentrations tested, only did not present MIC for the *A. flavus* strain. The minimum fungicidal concentration determined for the *A. niger* strain was equivalent to the value of its MIC for both phytochemicals, whereas for *A. flavus* and *A. fumigatus* strains the MFC determined for carvacrol was equivalent to four times the value of its CIM. The phytochemicals were able to slow the fungal mycelial growth at the concentrations tested. Carvacrol showed to be more effective than thymol in the maize grain contamination model, presenting no fungal growth in the tubes with MIC and 2xMIC concentrations for strains of *A. flavus* and *A. fumigatus*, making it a good choice for future studies over food conservation.

Keywords: *Aspergillus*, maize, phytoconstituents, carvacrol and thymol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: <i>Aspergillus fumigatus</i> semeado em meio de cultura ágar saboraud dextrose em tubo de ensaio.....	16
Figura 2: <i>Aspergillus flavus</i> semeado em meio de cultura ágar saboraud dextrose, verso da placa.....	17
Figura 3: <i>Aspergillus niger</i> semeado em meio de cultura ágar saboraud dextrose, verso da placa.....	17
Figura 4: Espiga e grãos de milho apresentando sinais de infecção por fungos.....	19
Figura 5: Estruturas químicas dos monoterpenos fenólicos carvacrol e timol.....	22
Figura 6: Grãos de milho possivelmente infectados com <i>Aspergillus fumigatus</i> e <i>Aspergillus flavus</i>	35
Tabela 1: Ausência ou presença de crescimento fúngico nas concentrações testadas dos fitoconstituintes carvacrol e timol frente às cepas de <i>Aspergillus</i> spp.....	28
Tabela 2: Concentração fungicida mínima (CFM) dos fitoconstituintes carvacrol e timol frente às cepas de <i>Aspergillus</i> spp.....	30
Gráfico 1: Crescimento micelial radial (mm) de <i>Aspergillus fumigatus</i> na presença e ausência de carvacrol.....	31
Gráfico 2: Crescimento micelial radial (mm) de <i>Aspergillus flavus</i> na presença e ausência de carvacrol.....	31
Gráfico 3: Crescimento micelial radial (mm) de <i>Aspergillus niger</i> na presença e ausência de carvacrol (A) e timol (B).....	32
Gráfico 4: Efeitos das concentrações de carvacrol no crescimento de <i>Aspergillus fumigatus</i> (A) e <i>Aspergillus flavus</i> (B) em grãos de milho experimentalmente infectados.....	34

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABD – Ágar Batata Dextrose

ASD – Ágar Saboraud Dextrose

ATCC – American Type Culture Collection

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

pH – Potencial Hidrogeniônico

OE – Óleo Essencial

UFC – Unidade Formadora de Colônia

% – Percentual

°C – Graus Celsius

µg/mL – Micrograma por mililitro

µL – Microlitros

h – Hora

kg – Quilograma

mg – Miligrama

mL – Mililitro

SUMÁRIO

	1. INTRODUÇÃO	12
	2. OBJETIVOS	14
	2.1 Objetivo Geral	14
	2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....		15
3.1 Fungos filamentosos (<i>Aspergillus</i> spp.).....		15
3.2 Milho, manifestações e tratamentos para infecções por <i>Aspergillus</i> spp.		18
3.3 Produtos naturais (carvacrol e timol).....		21
4. METODOLOGIA.....		24
4.1 Local de Trabalho.....		24
	4.2 Cepas Fúngicas	24
	4.3 Drogas-teste	24
4.4 Meios de Cultura.....		24
	4.5 Inóculo	24
4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....		25
4.7 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....		26
4.8 Efeitos Sobre o Crescimento Micelial Fúngico.....		26
4.9 Efeitos Sobre a Conservação de Grãos de Milho.....		26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		28
	6. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS.....		40

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são seres vivos eucarióticos que podem dividir-se em leveduras e filamentosos, são organismos de extrema importância e podem ser encontrados por toda parte no planeta, podendo ser utilizados em indústrias de alimentos, bebidas ou ainda nas indústrias farmacêuticas, dessa forma desempenhando papel ecológico e econômico (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015).

Dentre os fungos filamentosos, o gênero *Aspergillus* é um dos principais responsáveis por contaminações de alimentos, a exemplo dos cereais, causando sua deterioração, reduzindo seu valor nutricional e alterando suas qualidades sensoriais (ex. odor, sabor, textura, cor), podendo tornar-se uma questão de saúde pública devido a produção de micotoxinas por algumas espécies (VECCHIA; CASTILHOS-FORTES, 2007; ZULKIFLI; ZAKARIA, 2017).

O milho (*Zea mays L.*) é um dos principais cereais produzidos no mundo, sendo utilizado tanto na alimentação animal quanto humana. Em algumas regiões este cereal é considerado a base alimentar da população (PAES, 2006). O Brasil ocupa lugar de destaque na produção mundial de milho, no entanto, sua produção ainda sofre grandes perdas por diversas causas, dentre elas estão as infecções causadas por microrganismos como os fungos do gênero *Aspergillus* spp. (SMIDERLE; GIANLUPPI; JUNIOR, 2003).

Dessa forma, se faz necessária a adoção de estratégias para controlar essas infecções. Produtos naturais, seus compostos puros ou extratos de plantas padronizados, têm sido cada vez mais estudados e utilizados como produtos alternativos para controle desses agentes microbiológicos (OOTANI et al., 2013).

Dentre esses produtos naturais estão os terpenos, considerados a classe de substâncias mais encontrada nas plantas, sendo os fitoconstituintes carvacrol e timol exemplos de monoterpenos fenólicos reconhecidos como os componentes ativos isolados de óleos essenciais, compostos químicos complexos que apresentam, entre outras propriedades, atividade antimicrobiana (VIEGAS JÚNIOR, 2003; BAKKALI et al., 2008; ABBASZADEH et al., 2014).

Considerando a importância do milho na alimentação humana e que o número de doenças e efeitos danosos à saúde, seja a longo ou curto prazo, são relativamente altos quando se pensa que as micotoxinas produzidas podem acompanhar a cadeia em que o alimento está inserido, é necessário que este assunto seja amplamente

discutido e que pesquisas sejam realizadas para que estejamos menos expostos aos danos causados por essas toxinas (PEREIRA; CARVALHO; PRADO, 2002; SILVA et al., 2015).

Esse trabalho trata-se de uma pesquisa laboratorial que busca investigar o potencial antifúngico dos fitoconstituintes carvacrol e timol frente as cepas do gênero *Aspergillus* spp.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Investigar o potencial antifúngico dos fitoconstituintes carvacrol e timol contra cepas do gênero *Aspergillus* spp.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos fitoconstituintes frente às cepas de *Aspergillus* ensaiadas;
- ✓ Avaliar o efeito dos fitoconstituintes sobre o crescimento micelial fúngico;
- ✓ Estudo de possível atividade conservante dos fitoconstituintes no modelo de contaminação de grãos de milho.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Fungos filamentosos (*Aspergillus* spp.)

Os fungos são seres vivos eucarióticos que podem apresentar um só núcleo, como no caso das leveduras, ou ser multinucleados como os filamentosos. Além disso, podem ser encontrados dispersos por toda parte como no ar, solo, águas, alimentos e até mesmo nos seres humanos, desenvolvendo-se ao encontrarem meios favoráveis com nutrientes adequados (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; MORAES; PAES; HOLANDA, 2009).

São seres quimio-heterotróficos (não produzem seu próprio alimento), portanto para sua nutrição necessitam consumir materiais orgânicos já formados. Por possuírem parede celular rígida absorvem nutrientes solúveis simples que servirão como fonte de energia e constituintes de sua composição celular. Sua reserva energética é sob a forma de glicogênio. A maioria dos fungos são aeróbicos e realizam respiração celular para obtenção de energia, normalmente crescendo melhor em ambientes com pH próximo a 5 e baixa umidade (TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L, 2002; MORAES; PAES; HOLANDA, 2009).

Os fungos filamentosos possuem como elemento básico estruturas multicelulares em forma de tubos, as hifas, que podem apresentar-se como septadas ou não septadas (cenocíticas). Os esporos, também chamados de conídios, formam-se a partir das hifas nascendo diretamente delas ou sobre estruturas ligadas a elas, são os principais responsáveis pela dispersão e propagação das espécies pela natureza. Quando em conjunto, as hifas são denominadas de micélio, este pode desenvolver estruturas reprodutivas, responsáveis pela formação dos esporos, ou vegetativas, cumprindo papel na absorção de nutrientes (ANVISA, 2004; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O gênero *Aspergillus*, pertencente ao grupo dos fungos filamentosos, é constituído por mais de 300 espécies que se destacam por apresentarem uma grande quantidade de pequenos conídios (2-3 μm) ao crescerem em matérias orgânicas. Devido a sua fácil dispersão representam fontes frequentes de contaminações em laboratórios e apesar da grande quantidade de espécies, apenas 20 têm sido implicadas como patógenos potenciais nos seres humanos, sendo a via respiratória a principal via de penetração dos *Aspergillus*. Os principais quadros clínicos que são

capazes de provocar são os de aspergiloses pulmonares e cutâneas, assim como onicomicoses (SIDRIM; ROCHA, 2010).

Ainda que sejam potencialmente prejudiciais, esses fungos filamentosos também desempenham importantes funções no estilo de vida humano ao participarem da produção de alimentos, produtos para a saúde e na reciclagem de compostos como petróleo e plástico. São amplamente empregados em diversos processos industriais, podendo algumas espécies serem comercializadas ou consideradas valiosas para a biotecnologia devido a produção de importantes enzimas, vitaminas, polissacarídeos, pigmentos, lipídeos e glicolipídios (SCHUSTER et al., 2002; ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015).

Em relação ao aspecto macroscópico, as colônias do gênero *Aspergillus* apresentam inicialmente uma superfície de aspecto algodonoso e de cor branca, dependendo das espécies a cor pode evoluir com a maturação para verde, amarelo castanho ou preto, facilitando a identificação de espécies. Com a produção de conídios a textura torna-se mais pulverulenta (MURRAY et al., 2006).

As colônias de *A. fumigatus* apresentam-se tipicamente com aparência veludosa (Figura 1, p. 16), com uma coloração variando entre cinza, azul e verde, as cabeças conidias são uniseriadas e têm rápido crescimento em meio fúngico e ágar sangue de ovelha (MCCLENNY, 2005).

Figura 1: *Aspergillus fumigatus* semeado em meio de cultura ágar saboraud dextrose em tubo de ensaio.



Fonte: Autor.

Capaz de resistir em situações adversas o *A. flavus* (Figura 2, p. 17) é um dos mais abundantes na terra ganhando grande destaque econômico por sua produção de metabólitos secundários. Todavia, existem muitos metabólitos secundários das

espécies de *Aspergillus* que não são benéficos, as chamadas micotoxinas que são tóxicas e/ou cancerígenas, o que torna esses fungos patógenos vegetais oportunistas capazes de danificar muitas culturas agrícolas (BARONIO; MIOTTO, 2016).

Figura 2: *Aspergillus flavus* semeado em meio de cultura ágar saboraud dextrose, verso da placa.



Fonte: Autor.

O *A. niger* (Figura 3, p. 17) cresce aerobicamente sobre matéria orgânica podendo ser encontrado na natureza em solos, lixo, em compostos e materiais vegetais em decomposição. Pode crescer em uma ampla faixa de temperatura e tornou-se fonte de uma variedade de enzimas bem estabelecidas como técnicas auxiliares no processamento de frutas, cozimento e nas indústrias de amido e alimentos (SCHUSTER et al., 2002).

Figura 3: *Aspergillus niger* semeado em meio de cultura ágar saboraud dextrose, verso da placa.



Fonte: Autor.

3.2 Milho, manifestações e tratamentos para infecções por *Aspergillus* spp.

O milho (*Zea mays* L.) é produzido em quase todos os continentes, sendo um dos principais cereais cultivados e consumidos no mundo, pode ser utilizado de diversas formas desde a alimentação animal até indústrias de alta tecnologia, o que justifica sua importância econômica. Apenas 15% de sua produção total é destinada ao consumo humano, de forma direta ou indireta. Dados da EMBRAPA confirmam o milho como uma das mais importantes fontes alimentares do brasileiro, atuando como componente básico na dieta alimentar das camadas mais pobres da população, sendo a região Nordeste a maior consumidora. Em todas as regiões brasileiras suas principais formas de aquisição são: o milho em grão, o milho em espiga ou enlatado, o creme de milho, os flocos de milho, fubá (farinha de milho) e o pão de milho (PAES, 2006; PEREIRA FILHO; BORGHI, 2016).

Quanto a sua composição nutricional, as principais substâncias armazenadas em grãos de milho são carboidratos, lipídeos e proteínas, sendo o amido o principal carboidrato de reserva. Ainda pode-se encontrar em pequenas quantidades minerais, vitaminas e outras substâncias. A presença desses componentes, principalmente o alto teor de amido, tornam o milho um importante produto comercial, todavia quando se encontram em condições de armazenamento inadequadas podem sofrer perda de valores decorrente da infestação de pragas e contaminação por fungos (TRAVAGLIA, 2011).

A incidência e a gravidade de doenças na cultura do milho têm aumentado muito nos últimos anos principalmente devido a mudanças climáticas globais e mudanças nos sistemas de cultivo, da época de plantio, de plantios consecutivos (ausência da rotação de culturas) e da expansão da área cultivada. Essas mudanças acarretam em condições favoráveis contribuindo para a preservação e multiplicação de diversos patógenos, dentre eles os fungos (PINTO; SANTOS; WRUCK, 2006; BATTILANI et al., 2016; OLIVEIRA, et al., 2017).

Embora não sejam considerados como a principal causa de doenças em plantas, as espécies de *Aspergillus* são responsáveis por vários distúrbios em diversos produtos vegetais e plantas, podendo contaminar produtos agrícolas em diferentes estágios, incluindo a pré-colheita, colheita, secagem, processamento, manuseio, transporte e armazenamento do produto (PERRONE et al., 2007; DI DOMENICO et al., 2014).

Em geral os fungos que invadem sementes e grãos são divididos em dois grupos: fungos do campo, que infectam o produto ainda no campo e fungos de armazenamento, que invadem o milho pouco antes e durante o armazenamento. Os fungos do gênero *Aspergillus* são considerados de armazenamento, podendo ser encontrados em armazéns, moinhos, silos, moegas, elevadores, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados produtos agrícolas. São capazes de causar danos aos produtos (Figura 4, p. 19) quando estes são submetidos a condições de armazenamento impróprias e podem atuar como indicadores de deterioração em sementes e grãos (MARCIA; LAZZARI, 1998).

Figura 4: Espiga e grãos de milho apresentando sinais de infecção por fungos.



Fonte: (SILVA et al., 2015).

O crescimento de fungos em grãos é determinado por vários fatores, entre os quais destacam-se: o teor de umidade, grau de oxigenação, insetos e ácaros (que podem agravar a contaminação), temperatura, tempo, armazenamento anterior, condições físicas e higiene e limpeza dos grãos (VECCHIA; CASTILHOS-FORTES, 2007).

A contaminação fúngica em grãos de milho por *Aspergillus* spp. é considerada um problema mundial, podendo reduzir a qualidade e o valor nutricional dos grãos, além de levar à contaminação por micotoxinas. Geralmente, essa contaminação por micotoxinas produzidas por *Aspergillus* spp. toxigênicos ocorre devido ao alto teor de umidade durante o armazenamento e presença de insetos e ácaros. As micotoxinas podem afetar a saúde humana e animal, uma vez que produzidas podem persistir na cadeia alimentar (ZULKIFLI; ZAKARIA, 2017).

As principais micotoxinas encontradas nos grãos de milho são as aflatoxinas B1 e B2. Embora os riscos a curto ou longo prazo para os humanos sejam ainda pouco conhecidos, as doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados são denominadas micotoxicoses e há fortes evidências de que essas aflatoxinas contribuem para a suscetibilidade à algumas patologias como hepatite B, imunossupressão, câncer no fígado, cirrose hepática, síndrome de Reye, hemorragias e morte (VECCHIA; CASTILHOS-FORTES, 2007; SILVA et al., 2015).

Diante do exposto, torna-se evidente a necessidade da adoção de estratégias no controle de insetos e fungos para a conservação das plantas e grãos de milho. Um dos principais métodos de controle dessas doenças em plantas são os fungicidas, compostos químicos amplamente utilizados devido a sua facilidade de aplicação e os resultados imediatos obtidos. Alguns desses compostos químicos não matam os fungos, apenas inibem seu crescimento temporariamente, são os chamados fungistáticos. Outros inibem a produção de esporos sem afetar o crescimento das hifas no interior dos tecidos e neste caso são chamados de antiesporulantes (BORTOLINI; GHELLER, 2012).

No Brasil ainda são utilizados muitos agrotóxicos proibidos em outros países por apresentarem efeitos negativos para a saúde humana ou para o meio ambiente. De acordo com dados da ANVISA, cerca de um terço desses agrotóxicos são produtos de alto grau de toxicidade, contribuindo para intoxicações em agricultores e consumidores. Dessa forma, alguns dos efeitos que os agrotóxicos podem causar à saúde humana são: dermatites; neurotoxicidade retardada; infertilidade; distúrbios psiquiátricos; neurológicos; surdez; doença de Parkinson; câncer, entre outras (CONSEA, 2012; GOMES; FRINHANI, 2017).

Alguns estudos estão sendo desenvolvidos com o intuito de preservar a qualidade dos grãos e subprodutos armazenados. Uma alternativa que tem se expandido de forma considerável nos últimos anos é a utilização do gás ozônio (O₃), um poderoso agente oxidante resultante do rearranjo de átomos de oxigênio que pode ser gerado através de um processo de descarga elétrica ou pela incidência de radiação eletromagnética de alta energia (luz ultravioleta) no ar, tornando-se uma alternativa ecologicamente correta e economicamente viável (ROZADO et al., 2008; NASCIMENTO; RIBEIRO; PIMENTEL, 2016).

Uma vez que a utilização de produtos químicos, como os herbicidas, inseticidas e fungicidas (OLIVEIRA; FAVARETO; ANTUNES, 2013), para a realização da

conservação dos grãos tem custos elevados e acarreta em riscos à saúde e ao meio ambiente (ALVARENGA; QUEIROZ; NADAE, 2017), há uma busca por uma agricultura menos poluidora e aumenta-se o consumo de produtos orgânicos. Produtos alternativos têm sido estudados como uma alternativa viável e sustentável para controle desses agentes fitopatogênicos, pragas agrícolas e plantas infestantes (FLÁVIO et al., 2011; OOTANI et al., 2013).

3.3 Produtos naturais (carvacrol e timol)

Diante da situação atual de contaminação de cereais, como em questão o milho, e devido as desvantagens geradas pelos métodos convencionais agrícolas, como a poluição ambiental, há um aumento no interesse por novos produtos químicos para o controle de pragas. Busca-se por práticas alternativas, para evitar ou reduzir essas contaminações, de modo que não haja agressão do meio ambiente, sendo os produtos naturais o foco principal dessa busca (VIEGAS JÚNIOR, 2003; GONÇALVES; MATTOS; MORAIS, 2009; CABRAL; PINTO; PATRIARCA, 2013).

Alguns extratos de plantas e fitoconstituintes são conhecidos por terem propriedades antimicrobianas (COUTINHO et al., 2009). Sabe-se que os óleos essenciais obtidos a partir do *Origanum vulgare* (orégano), um tempero mediterrâneo tradicional, possuem forte atividade antimicrobiana devido ao seu conteúdo muito elevado de monoterpenos e compostos oxigenados, como c-terpineno e p-cimeno, timol e carvacrol (LIOLIOS et al., 2009).

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, em geral odoríferas e líquidas, obtidas de matérias-primas vegetais, considerados uma das fontes potenciais para a triagem de agentes antimicrobianos, antioxidantes e de radicais livres. São compostos químicos complexos, formados como metabolitos secundários por plantas aromáticas, destacando-se a presença de terpenos. Devido as suas propriedades antimicrobianas, suas atividades constituíram a base de muitas aplicações, sendo utilizados na agricultura na conservação de alimentos crus e processados, produtos farmacêuticos, medicamentos alternativos e terapias naturais (BAKKALI et al., 2008; HUSSAIN, 2011; MAIA; DONATO; FRAGA, 2015).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e

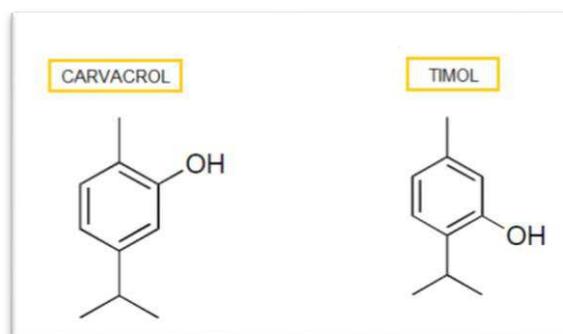
também contra herbívoros, reduzindo o apetite por tais plantas. Eles também podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólenes e sementes, ou repelir outros indesejáveis. Podem ser sintetizados por todos os órgãos das plantas, ou seja, brotos, flores, folhas, hastes, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira ou casca, sendo armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008; MAIA; DONATO; FRAGA, 2015).

Os terpenos são considerados a classe de substâncias mais encontrada nas plantas, abrangendo uma grande variedade de substâncias de origem vegetal e tendo importância ecológica bem estabelecida como defensivos de plantas (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Terpenos e terpenóides são os principais compostos de óleos essenciais de plantas aromáticas, a exemplo do carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) e do timol (2-isopropil-5-metilfenol), que são monoterpênicos fenólicos e isômeros (Figura 5, p. 22), sendo constituintes majoritários de óleos essenciais da família Lamiaceae, a exemplo das espécies *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris* (orégano e tomilho) (BAKKALI et al., 2008; ÖZKAN; ERDOGAN, 2011; RAMOS et al., 2012; VERAS et al., 2013).

O carvacrol e o timol já foram utilizados na medicina tradicional e hoje podem ser aplicados nas indústrias alimentares, em bebidas e formulações comerciais, como repelentes, por apresentarem propriedades aromatizantes e conservantes. Ambos demonstram ampla variedade de atividades biológicas, incluindo, atividades antiinflamatórias, antioxidantes, antitumor, analgésicas, antihepatotóxicas, inseticidas e antimicrobianas (NOSTRO; PAPALIA, 2012; MARCHESI et al., 2016).

Figura 5: Estruturas químicas dos monoterpênicos fenólicos carvacrol e timol.



Fonte: (BAKKALI et al., 2008).

O mecanismo de ação desses fitoconstituintes ainda não está muito bem elucidado, mas acredita-se que sua natureza hidrofóbica lhes permite reagir com os lipídios da membrana citoplasmática e mitocôndria dos microrganismos, tornando-os permeáveis e levando ao vazamento dos componentes celulares. Quando ocorre o distúrbio da integridade da membrana, suas funções são comprometidas, não ocorrendo a divisão mitótica e impedindo a sobrevivência dos patógenos (FUKAYAMA et al., 2005; LIOLIOS et al., 2009; ÖZKAN; ERDOGAN, 2011).

Neste sentido, os fitconstituintes carvacrol e timol se fazem candidatos promissores para a investigação de sua ação na conservação de grãos de milho. No presente estudo, seu efeito será testado *in vitro* e em modelo de contaminação de grãos de milho contra cepas de *Aspergillus* spp. contaminantes, podendo de alguma forma colaborar com as práticas de segurança alimentar e com novas informações a respeito dessa área que ainda precisa ser mais explorada.

4. METODOLOGIA

4.1 Local de Trabalho

Todos os experimentos referentes a este trabalho foram realizados nos laboratórios de Microbiologia e Bioquímica, ambos localizados no Centro de Educação e Saúde/Universidade Federal de Campina Grande, campus Cuité/PB.

4.2 Cepas Fúngicas

Para a realização do trabalho, foram utilizadas três cepas fúngicas do gênero *Aspergillus* spp., sendo uma *A. flavus* (ATCC-13013), uma *A. fumigatus* (ATCC-40640) e uma *A. niger* (LM-27), cedidas pela colaboradora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima (Laboratório de Micologia Clínica/Departamento de Ciências Farmacêuticas/Universidade Federal da Paraíba).

4.3 Drogas-teste

Os fitoconstituintes testados foram o carvacrol e o timol (Sigma-Aldrich®).

4.4 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados foram os meios sólidos Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e Ágar Batata Dextrose (ABD), devidamente solubilizados com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121 °C por 15 minutos, conforme normas do fabricante, e o meio líquido RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato também preparado de acordo com o documento M38-A do CLSI (2002).

4.5 Inóculo

As cepas fúngicas foram cultivadas em ASD a 28 °C por 7 dias. As recentes colônias fúngicas foram cobertas com solução salina estéril (NaCl 0,9 %) com auxílio de uma pipeta de transferência, e as suspensões realizadas por suaves agitações de 15 segundos. As misturas resultantes de conídios e fragmentos de hifas foram

transferidas para tubos de ensaio esterilizados. As densidades das suspensões de cada cepa foram ajustadas em espectrofotômetro a 530 nm para um valor de $70\% \pm 2$ de transmitância, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 1.5×10^6 unidades formadoras de colônias em 1 mL (UFC/mL) (PETRIKKOU et al., 2001; CLSI, 2002).

4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM das drogas-teste foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo em “U”. Primeiro, as emulsões (drogas-teste) foram preparadas dissolvendo a quantidade previamente calculada dos fitoconstituintes em 50 μ L de tween 80 (Polisorbato 80), também sendo utilizado o próprio meio RPMI para dissolução. A partir desta solução, a diluição seriada foi realizada em tubos de ensaio a uma razão de 2, a fim de obter concentrações finais nas placas de 2048 μ g/mL até 16 μ g/mL. Em seguida, foram adicionados 100 μ L dessas diluições em cada linha da placa, sendo cada linha referente a determinada concentração. Por fim, foram adicionados 100 μ L do inóculo previamente preparado, diluído em RPMI 1640 na proporção 1:50. Três controles foram realizados, um controle fúngico, contendo apenas o meio RPMI e o inóculo, para observar a viabilidade da cepa. Um controle de esterilidade, utilizando-se apenas o meio de cultura, sem o inóculo. E um controle contendo o meio de cultura, o inóculo e o tween 80 na concentração usada para a solubilização das drogas, para verificar a ausência de interferência deste nos resultados. As placas foram seladas e incubadas a 28 °C por até 7 dias para a realização da leitura. Os valores de CIM foram determinados pela análise visual da inibição do crescimento em cada cavidade, comparando os testes com o controle de crescimento (ausência de drogas). Portanto foi determinada como CIM a menor concentração das drogas (produto natural ou droga-teste) capaz de inibir 100% o crescimento fúngico observado nas cavidades. O experimento foi realizado em triplicata e os valores de CIM expressos como média geométrica (CLSI, 2002; SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007; HUSSAIN et al., 2011).

4.7 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Para determinar a CFM uma alíquota de 10 µL foi retirada de cada cavidade onde não houve crescimento fúngico, sendo semeada em uma placa contendo ASD, a qual foi incubada a 28 °C por 7 dias. Em seguida foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFCs), onde a CFM considerada foi aquela cuja menor concentração semeada em ASD demonstrou crescimento menor do que 3 UFCs. O experimento foi realizado em triplicata e os valores da CFM expressos como média geométrica (CLEELAND; SQUIRES, 1991; KLEPSEK; WOLFE; PFALLER, 1998; ESPINEL-INGROFF et al., 2002).

4.8 Efeitos Sobre o Crescimento Micelial Fúngico

A análise da interferência das drogas-teste sobre o crescimento micelial fúngico foi realizada pela medição do crescimento micelial radial em meio sólido. Para isto, inicialmente foram preparadas placas de Petri com 10 mL de ASD acrescido das drogas-teste em diversas concentrações (CIM e 2xCIM). Em seguida, um fragmento de aproximadamente 5 mm do micélio das cepas fúngicas recém cultivadas foram colocadas no centro da placa. Um controle negativo também foi realizado na ausência de qualquer droga. Todo o sistema foi incubado a 28 °C por um total de 7 dias, onde o crescimento micelial radial foi registrado diariamente. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em média ± desvio padrão (KHAN; AHMAD, 2011).

4.9 Efeitos Sobre a Conservação de Grãos de Milho

Foram utilizados grãos de milho crioulo de consumo humano cedidos pela Secretaria de Agricultura da cidade de Cuité-PB. Os grãos de milho foram secos a 40 °C por 48 horas para alcançar aproximadamente 14% de umidade. Apenas foram utilizados os grãos que não aparentaram doença visual. Os grãos de milho saudáveis foram acondicionados em erlenmeyers e autoclavados por 15 minutos a 121 °C (DAMBOLENA et al., 2010). Para avaliar os efeitos inibitórios das drogas-teste sobre o modelo de grãos infectados, as drogas foram distribuídas em tubos de ensaio nas concentrações a serem testadas (CIM e 2xCIM) diluídas em água destilada estéril, em

seguida os grãos autoclavados foram imersos em 200 μ L do inóculo fúngico (10^6 UFC/mL) por 1 minuto e transferidos para os tubos, sendo 10 grãos do milho possivelmente infectado em cada tubo. Os tubos foram incubados a 28 °C por 7 dias sendo realizada análise visual.

A próxima etapa foi distribuir os grãos dos tubos para placas de Petri contendo meio ABD com cloranfenicol, para determinar a presença ou ausência do crescimento fúngico no meio, as placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias, a leitura foi feita diariamente. Três controles foram realizados com ausência das drogas. Um controle fúngico contendo o meio e o milho infectado, um controle de esterilidade, utilizando o meio e o milho estéril. E outro controle contendo o meio, o milho infectado e o tween 80 na concentração usada para a solubilização das drogas, para verificar a ausência de interferência deste nos resultados.

Também foram avaliados os efeitos do vapor das drogas-teste sobre a infecção artificial de grãos de milho. Após idêntico processo de indução da infecção, cerca de 10 grãos foram colocados em placas de Petri descartáveis contendo um papel de filtro (90 mm) embebido de diversas concentrações das drogas-teste (CIM e 2xCIM) no interior da tampa da placa. As placas foram rapidamente seladas e incubadas a 28 °C por 24 horas. Para identificar a presença de infecção através de crescimento no meio, os grãos foram transferidos para placas de Petri com ABD contendo cloranfenicol (10 grãos por placa) e incubados a 28 °C por 7 dias, sendo a leitura feita diariamente. Os ensaios foram realizados em triplicata. A avaliação estatística dos resultados foi feita para determinar diferenças significantes, quando um valor de $p < 0,05$ aplicando-se teste t não pareado, foi utilizado o teste de Fischer. (MENNITI et al., 2010).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dessa maneira, o potencial antifúngico dos fitoconstituintes carvacrol e timol frente às cepas do gênero *Aspergillus* spp., foi investigado através da técnica de microdiluição, a tabela 1 sistematiza os resultados da determinação da concentração inibitória mínima (CLSI, 2002).

Tabela 1: Ausência ou presença de crescimento fúngico nas concentrações testadas dos fitoconstituintes carvacrol e timol frente às cepas de *Aspergillus* spp.

	<i>A. flavus</i> ATCC-13013	<i>A. fumigatus</i> ATCC-40640	<i>A. niger</i> LM-27
2048 µg/mL	C(-)T(+)	C(-)T(-)	C(-)T(-)
1024 µg/mL	C(-)T(+)	C(-)T(-)	C(-)T(-)
512 µg/mL	C(-)T(+)	C(-)T(+)	C(-)T(-)
256 µg/mL	C(+)T(+)	C(-)T(+)	C(-)T(-)
128 µg/mL	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(-)T(-)
64 µg/mL	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(-)T(+)
32 µg/mL	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)
16 µg/mL	C(+)T(+)	C(+)T(+)	C(+)T(+)

(+): Crescimento fúngico visível; (-): Não houve crescimento fúngico visível; C: Carvacrol; T: Timol.

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

As CIMs do carvacrol encontradas para as cepas de *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* e *A. niger* foram respectivamente de 512 µg/mL, 256 µg/mL e 64 µg/mL. Já em relação ao timol não houve CIM nas concentrações testadas para a cepa de *A. flavus*. Para a cepa de *A. fumigatus* a CIM determinada foi de 1024 µg/mL e para *A. niger* de 128 µg/mL.

O controle fúngico contendo apenas o meio RPMI e o inóculo apresentou crescimento em todos os poços da placa de microdiluição, assim como o controle contendo o meio RPMI, o inóculo e o tween 80, demonstrando a ausência de interferência do tween 80 no experimento. Não houve crescimento no controle de esterilidade contendo apenas o meio de cultura, garantindo condições viáveis para a execução do método.

A atividade antifúngica de diversos óleos essenciais frente a fungos patogênicos existentes no ambiente já vem sendo bastante estudada, avaliada e comprovada (PAULI; SCHILCHER, 2015).

Sartoratto et al. (2004) compararam seus estudos com a literatura e concluíram que valores de CIM entre 50-500 µg/mL são considerados possuir forte atividade antimicrobiana, valores entre 600-1500 µg/mL possuem atividade considerada moderada e valores acima de 1500 µg/mL possuem fraca atividade. Dessa forma, pode-se considerar que no presente estudo, apenas o timol não apresentou forte atividade frente às cepas de *A. flavus* e *A. fumigatus*.

Em pesquisa realizada por Abbaszadeh et al. (2014) foi examinada a atividade antifúngica de alguns fitoconstituintes contra 11 cepas de fungos decompositores de alimentos, obtendo-se resultados positivos contra cepas de *Aspergillus* spp., os valores de CIM encontrados variaram entre 125-200 µg/mL para o timol e 50-100 µg/mL para o carvacrol, concentrações ainda menores do que as obtidas no presente estudo.

Nóbrega et al. (2016) investigaram o potencial antifúngico do carvacrol contra cepas de *Cryptococcus neoformans* obtendo resultados de CIM entre 25-81 µg/mL, confirmando sua forte atividade antifúngica. Também em avaliação de potencial antifúngico, o monoterpene timol foi estudado por Mota et al. (2012), apresentando atividades fungistática e fungicida promissoras contra cepas de *Rhizopus oryzae*, os valores de CIM variaram entre 128-256 µg/mL.

Em estudo realizado por Zabka et al. (2013), foi testada a eficácia de 21 compostos fenólicos contra cepas de fungos filamentosos toxigênicos, dentre estas uma *A. flavus* e uma *A. fumigatus*, os valores de CIM encontrados para o timol variaram entre 76-255 µg/mL, e para o carvacrol entre 131-262 µg/mL, ambos foram considerados os fenóis mais promissores uma vez que apresentaram a maior eficácia entre os compostos testados.

Stević et al. (2014) relatam a atividade antifúngica de diversos óleos essenciais em seu trabalho, dentre eles o óleo de *Thymus vulgaris* (contendo 43,7% de timol em sua composição), apresentando concentrações de 1180 µg/mL para cepa de *A. flavus* e 280 µg/mL para cepa de *A. niger*, e o óleo de *Origanum heracleoticum* (contendo 75,8 % de carvacrol em sua composição) apresentando concentração de 140 µg/mL para ambas as cepas.

Esses são apenas alguns estudos, entre os diversos que vêm sendo realizados com óleos essenciais ou seus componentes, demonstrando a atividade antimicrobiana dos monoterpenos utilizados e corroborando com o presente estudo.

Uma vez determinada a concentração inibitória mínima, a próxima etapa foi determinar a concentração fungicida mínima para as cepas que apresentaram CIM menores do que 1000 µg/mL. Na tabela 2, a CFM foi considerada como a menor concentração semeada que apresentou crescimento menor do que 3 UFCs (KLEPSEK; WOLFE; PFALLER, 1998).

Tabela 2: Concentração fungicida mínima (CFM) dos fitoconstituintes carvacrol e timol frente às cepas de *Aspergillus* spp.

	CEPAS		
	<i>A. flavus</i> ATCC-13013	<i>A. fumigatus</i> ATCC-40640	<i>A. niger</i> LM-27
CIM	C(+)T(*)	C(+)T(*)	C(-)T(-)
2xCIM	C(+)T(*)	C(+)T(*)	C(-)T(-)
4xCIM	C(-)T(*)	C(-)T(*)	C(-)T(-)

(-): crescimento fúngico menor do que 3 UFCs; (+): crescimento fúngico igual ou maior do que 3 UFCs; (*): não realizada CFM devido aos altos valores da CIM; C: carvacrol; T: timol.

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

A concentração fungicida mínima determinada para a cepa de *A. niger* foi equivalente ao valor de sua CIM para ambos os constituintes, enquanto que para as cepas de *A. flavus* e *A. fumigatus* a CFM foi equivalente a quatro vezes o valor de sua CIM.

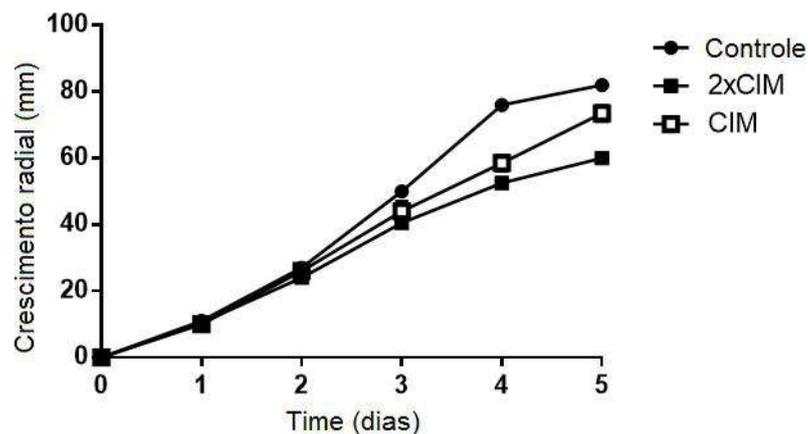
Tullio et al. (2007) determinaram a atividade *in vitro* de sete óleos essenciais contra alguns fungos de importância ambiental e clínica, sendo alguns do gênero *Aspergillus*, encontrando valores de CFM, geralmente, uma ou mais concentrações superiores às CIMs.

Em estudo com onze cepas fúngicas e quatro fitoconstituintes, dentre eles o carvacrol e o timol, Abbaszadeh et al. (2014) encontraram resultados sempre mais elevados para CFMs em relação aos valores das CIMs, demonstrando que em muitos casos se faz necessária a utilização de uma dose maior do que a inibitória para se ter um efeito fungicida.

O efeito dos fitoconstituintes sobre o crescimento micelial fúngico também foi avaliado. Os seguintes gráficos demonstram o crescimento micelial radial, medido diariamente, em placas de Petri contendo meio ABD e as drogas-teste nas concentrações CIM e 2xCIM encontradas anteriormente.

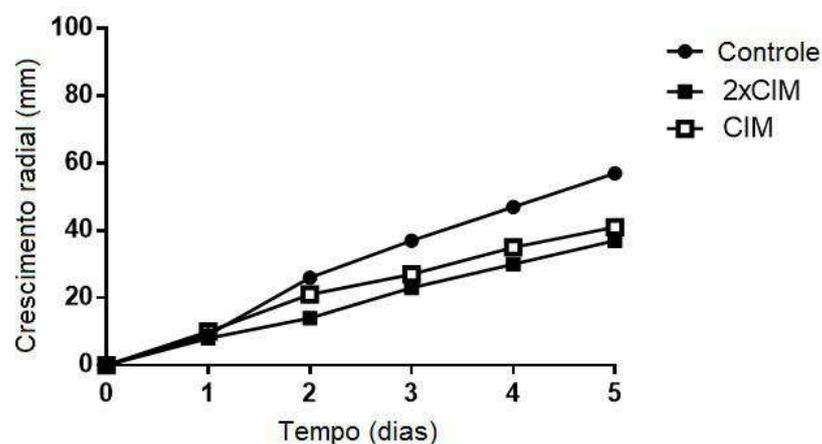
Pôde-se observar nos gráficos 1 e 2 que o carvacrol, nas concentrações CIM e 2xCIM, foi capaz de reduzir o crescimento micelial radial das cepas de *A. fumigatus* e *A. flavus* testadas. Assim como na CFM, o timol foi apenas aplicado à cepa de *A. niger*, observando-se no gráfico 3 que ambos os fitoconstituintes apresentaram valores de redução muito próximos nas duas concentrações testadas para esta cepa.

Gráfico 1: Crescimento micelial radial (mm) de *Aspergillus fumigatus* na presença e ausência de carvacrol.



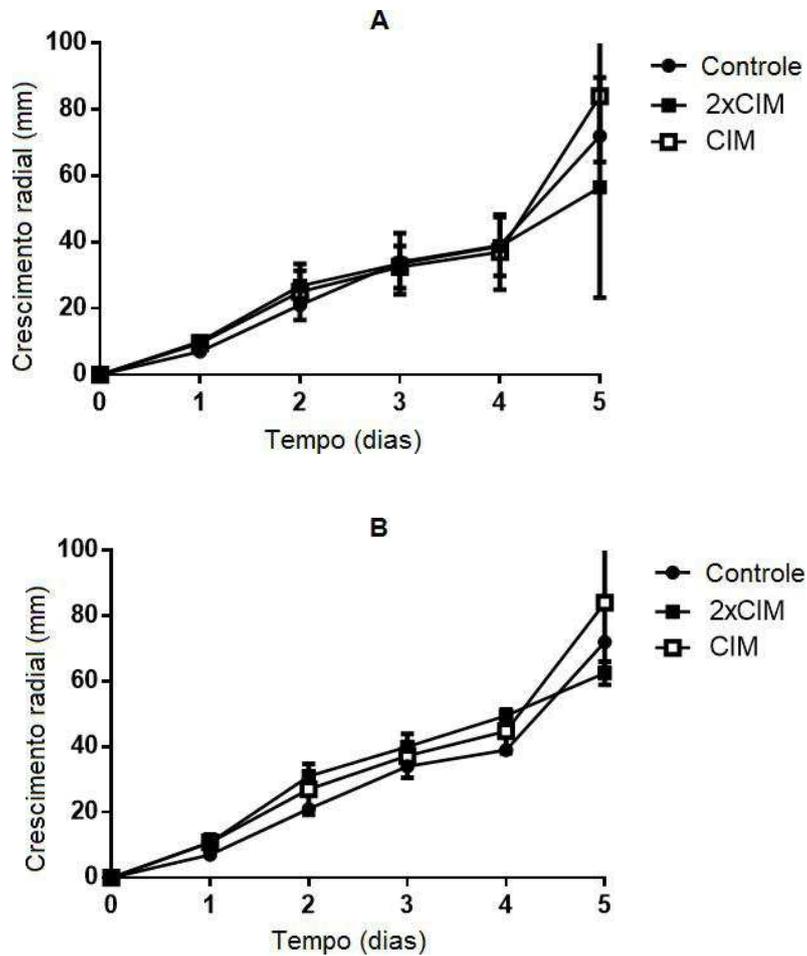
Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Gráfico 2: Crescimento micelial radial (mm) de *Aspergillus flavus* na presença e ausência de carvacrol.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Gráfico 3: Crescimento micelial radial (mm) de *Aspergillus niger* na presença e ausência de carvacrol (A) e timol (B).



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Romero et al. (2012) aplicaram o óleo essencial de *Origanum vulgare* contra alguns fungos fitopatogênicos, observando inibição completa do crescimento micelial a partir de concentrações de 500 µg/mL.

Em estudo com OE de *Cinnamomum jensenianum* aplicado contra cepas de *A. flavus*, Tian et al. (2012) obtiveram redução significativa no crescimento do micélio com porcentagens de redução variando entre 27,6% e 87,0%, seus resultados indicaram que o crescimento do micélio foi consideravelmente reduzido com a crescente concentração do OE, mas aumentou com o tempo de incubação.

Tao, OuYang e Jia (2014) determinaram a eficácia antifúngica do OE citral contra o crescimento micelial de *Penicillium italicum*, observando inibição do crescimento variando entre 29,39% e 100% nas concentrações testadas.

É importante ressaltar que os estudos demonstrados anteriormente utilizaram óleos essenciais, e não componentes isolados destes, como no presente trabalho.

Na literatura, na maioria dos casos, apenas os componentes principais de certos óleos essenciais são analisados, entretanto, é provável que os vários componentes dos OEs desempenhem um papel na definição da fragrância, da densidade, da textura, da cor e acima de tudo, da penetração desses óleos (MOHAMMAD et al., 2013).

Ochoa-Velasco et al. (2017) avaliaram a atividade antifúngica do timol e carvacrol sozinhos e associados contra cepas de *Fusarium verticillioides* e *Rhizopus stolonifer* e constataram que as misturas dos dois monoterpenos necessitaram de menores concentrações para inibir o crescimento das cepas estudadas, dessa forma demonstrando maior eficácia associados do que sozinhos.

Ahmad et al. (2014) também relatam, em seu estudo a respeito do óleo essencial de *Thymus vulgaris*, a importância de pesquisar as interações entre seus componentes, uma vez que cada componente tem seu modo de ação e combinados são capazes de reduzir as concentrações necessárias para atingir um efeito antimicrobiano.

Estudos demonstraram que o mecanismo de ação antimicrobiano de compostos fenólicos como o carvacrol e o timol ocorre de maneira semelhante, eles interagem com as membranas celulares causando danos estruturais e funcionais (PERRICONE et al., 2015).

Uma das principais causas de deterioração de alimentos é o crescimento de fungos, pois necessitam de uma baixa atividade de água (aw) para sobreviver, são tolerantes a ambientes de baixo pH e seus esporos são resistentes a diversas temperaturas (AZEREDO, 2012). Portanto, a redução ou inibição do crescimento micelial fúngico torna-se significativa para a desaceleração da decomposição de alimentos.

Dessa forma, a etapa seguinte do trabalho foi avaliar o efeito dos terpenos em modelo de contaminação de grãos de milho de consumo humano, tendo em vista a importância de infecções fúngicas em alimentos.

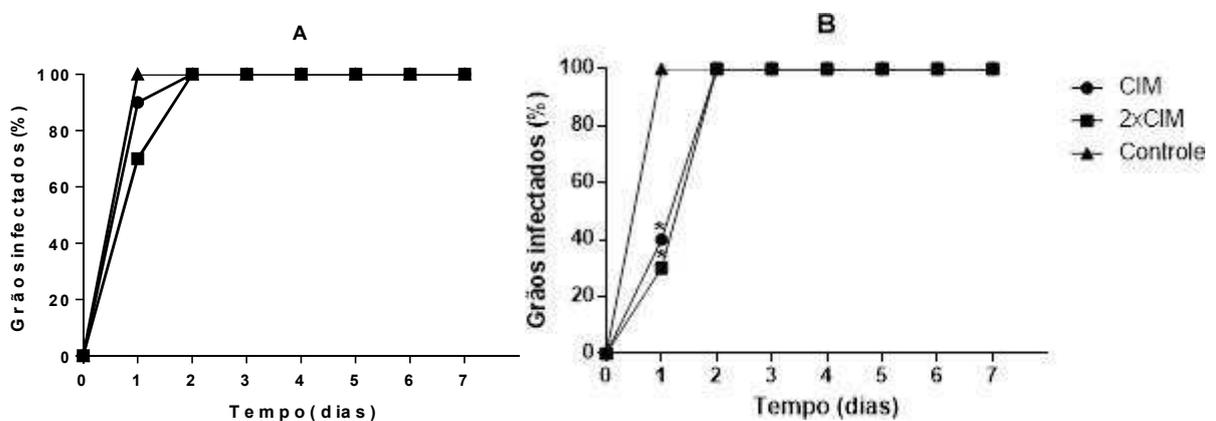
As perdas pós-colheita de produtos alimentícios agrícolas devido à deterioração por diferentes pragas de armazenamento são um problema sério para as indústrias agroalimentares (PRAKASH et al., 2013), os grãos de milho infectados por

fungos constituem-se em importantes fontes de inóculos, cujos patógenos podem causar podridão de grãos (SILVA et al., 2015).

Os alimentos devem ser ofertados à população sob a ótica da segurança alimentar e nutricional, obedecendo três dimensões básicas, como disponibilidade, acessibilidade e utilização, para isso, são necessárias uma gestão sustentável de recursos naturais e eliminação de padrões insustentáveis de consumo e produção (BERRY et al., 2015).

A possível atividade conservante dos fitoconstituintes nos grãos de milho foi avaliada aplicando-se as concentrações de CIM e 2xCIM obtidas no teste *in vitro*. Os grãos de milho foram armazenados em soluções contendo as drogas-teste nas concentrações desejadas, vale ressaltar que o timol só foi testado para a cepa de *A. niger* devido aos valores de CIM encontrados. Após 7 dias em conserva os grãos que não aparentaram infecção foram transferidos para placas de Petri contendo ABD, o gráfico 4 demonstra o crescimento fúngico nos grãos em função do tempo.

Gráfico 4: Efeitos das concentrações de carvacrol no crescimento de *Aspergillus fumigatus* (A) e *Aspergillus flavus* (B) em grãos de milho experimentalmente infectados.



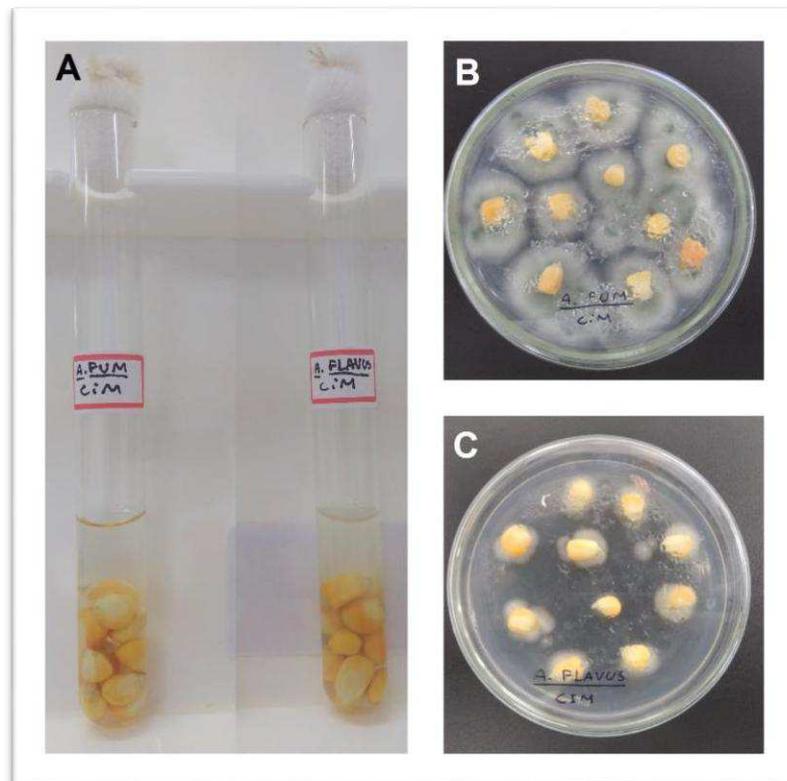
*p < 0,05 quando comparado ao controle (teste exato de Fischer), por dia de análise.

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Durante o período em conserva os tubos controle (um contendo o meio e o inóculo e outro contendo o meio, inóculo e tween 80) apresentaram crescimento fúngico visível, enquanto que os tubos contendo a solução com carvacrol, nas concentrações de CIM e 2xCIM e os grãos possivelmente infectados com *A. flavus* e

A. fumigatus, não aparentaram crescimento. Porém, ao serem transferidos para as placas de Petri houve crescimento fúngico visível nos grãos em dois dias de incubação (Figura 6, p. 35), indicando que o carvacrol atuou de forma inibitória somente enquanto em contato com o milho.

Figura 6: Grãos de milho possivelmente infectados com *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus*.



Legenda: **A** – Grãos em tubos de ensaio após 7 dias em contato com as concentrações inibitórias mínimas do fitoconstituente carvacrol, não apresentando infecção visível; **B e C** – Grãos transferidos para placas de Petri contendo meio ágar batata dextrose, apresentando crescimento fúngico visível após 48h de incubação.

Fonte: Autor.

Em relação à cepa de *A. niger*, tanto o carvacrol quanto o timol, nas concentrações estudadas, não apresentaram atividade inibitória ao serem aplicados no modelo de contaminação de grãos de milho, todos os tubos contendo os grãos em contato com as drogas-teste apresentaram crescimento fúngico visível.

Apesar da alta eficácia dos OEs e seus constituintes contra patógenos transmitidos por alimentos em testes conduzidos *in vitro*, o mesmo efeito nos produtos alimentares geralmente só é alcançado quando utilizam-se concentrações maiores desses óleos (AVILA-SOSA et al., 2012). Indicando que, possivelmente, a utilização

da combinação entre os constituintes do presente estudo ou sua união com outros componentes poderia levar à um efeito sinérgico e a inibição de crescimento fúngico de forma mais satisfatória.

Todos os testes realizados com o vapor de contato dos monoterpenos demonstraram crescimento nos grãos de milho em dois dias de incubação, tanto para as concentrações de CIM quanto para 2xCIM, indicando a ineficiência da aplicação do vapor dos monoterpenos frente às cepas estudadas. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que as substâncias testadas são muito voláteis e podem sofrer interferência de diversos fatores do ambiente e armazenamento (PASSONE; GIRARDI; ETCHEVERRY, 2013).

Phillips; Laird e Allen (2012), utilizando vapor do óleo essencial de citrus obtiveram uma redução de 70.8% no crescimento de *A. niger* em grãos, vale ressaltar que o óleo de citrus não possui carvacrol ou timol na sua composição, e sua atividade pode ser explicada pela presença dos diferentes constituintes no OE. A utilização do vapor de óleos essenciais pode ser uma vantagem na aplicação de alimentos uma vez que há menor interação entre o vapor e as propriedades sensoriais dos preparados.

As doenças transmitidas por alimentos são um crescente problema de saúde pública, fazendo-se necessário um controle bem-sucedido de patógenos através do uso de técnicas de preservação na fabricação em todo o processo de produção dos alimentos, da colheita à mesa (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). Algumas espécies de *Aspergillus* são capazes de produzir micotoxinas tóxicas, as chamadas aflatoxinas, que são relatadas em várias culturas agrícolas, principalmente as de milho e amendoim, sendo a contaminação do milho de grande preocupação, uma vez que esta cultura desempenha um papel importante no abastecimento de alimentos em todo o mundo (BATTILANI et al., 2016).

Em modelo de grãos de milho contaminados experimentalmente com *A. flavus*, Esper et al. (2014) testaram o óleo essencial de *Origanum vulgare* para avaliar a produção de aflatoxinas B1, obtendo efeito inibitório na produção dessas aflatoxinas de até 90% para todas as concentrações testadas, tornando o óleo de *O. vulgare* uma boa alternativa para o controle e proteção contra a produção de aflatoxina B1 em grãos de milho. Não foi avaliada a presença de micotoxinas no presente trabalho, porém essa é uma linha de estudo pertinente que pode ser seguida em trabalhos futuros.

Stojković et al. (2013) relataram a dificuldade de realizar comparações entre diferentes estudos envolvendo os óleos essenciais, principalmente pela utilização de diferentes metodologias, cepas microbianas, e fontes das amostras de antimicrobianos testados, o que é pertinente a este estudo uma vez que a metodologia utilizada é uma adaptação e não há estudos semelhantes recentes.

Em relação à conservação de alimentos, estudos mostram que os consumidores estão cada vez mais cientes dos efeitos que os aditivos sintéticos podem causar nos alimentos, aumentando assim a rejeição por produtos com esses aditivos e induzindo a busca por produtos considerados naturais, como os óleos essenciais. Em consequência, tem-se aumentado os estudos relacionados aos OEs para que estes sejam utilizados como aditivos alternativos, o fato de empregar plantas que foram usadas historicamente na medicina alternativa e cuja segurança é comprovada, gera confiança aos consumidores cada vez mais interessados em obter "produtos verdes", aumentando também o benefício econômico devido à possibilidade de proporcionar um uso para uma ampla gama de plantas (CABRAL; PINTO; PATRIARCA, 2013; BEARTH; COUSIN; SIEGRIST, 2014; TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017).

A adoção de uma abordagem sustentável na conservação de alimentos pode contribuir com objetivos nutricionais, sociais, econômicos e ambientais. Estes sistemas devem reduzir a pressão sobre os ecossistemas, aumentando sua capacidade de resistência, para isso se fazem necessárias práticas inovadoras de produção de alimentos interligando a nutrição, agricultura e saúde (DWIVEDI et al, 2017).

Atuais estudos de revisão discorrem a respeito dos avanços recentes referentes ao uso de óleos essenciais e sua eficácia para aplicações como conservantes alimentares (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014; CALO et al., 2015). Uma das alternativas que visam aumentar a vida útil de alguns alimentos nas prateleiras e diminuir as concentrações antimicrobianas utilizadas é a incorporação de OEs em filmes ou revestimentos comestíveis, estes podem servir como transportadores que liberam antimicrobianos na superfície do alimento, controlando o crescimento microbiano, atrasando a transmissão de umidade, oxigênio, aroma e solutos (RUIZ-NAVAJAS et al., 2013).

Nesse contexto também surgem as embalagens ativas de alimentos, que incorporam os OEs e já vêm sendo aplicadas em alguns alimentos, como: carne

fresca, manteiga, presunto e peixe. As embalagens interagem com o produto com o intuito de prolongar sua vida útil e manter ou melhorar as propriedades sensoriais dos alimentos embalados (ATARÉS; CHIRALT, 2016).

Outra forma de aplicação de OEs em produtos alimentares é o encapsulamento destes em nanopartículas, dessa forma busca-se diminuir suas interações com componentes da matriz dos alimentos, como gordura, amido e proteínas, minimizando os efeitos sensoriais dos óleos essenciais nos alimentos (DONSÌ et al., 2011; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; EL ASBAHANI et al., 2015).

Dessa forma, vários trabalhos têm demonstrado o potencial de aplicação de óleo essenciais (tanto *in vitro* quanto em preparações alimentares) como compostos antimicrobianos contra fungos deteriorantes de alimentos (PERETTO et al., 2014; TYAGI et al., 2014; MATEO et al., 2017).

6. CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos foi possível concluir que o carvacrol apresentou atividade antifúngica *in vitro* contra todas as cepas de *Aspergillus* spp. testadas, nas condições avaliadas, enquanto que o timol apenas não apresentou atividade para a cepa de *A. flavus* nas concentrações utilizadas.

As CIMs e 2xCIMs encontradas para os fitoconstituintes foram capazes de retardar o crescimento micelial fúngico, nos primeiros dias de incubação, em todas as cepas testadas.

Em relação à aplicação dos fitoconstituintes em modelo de contaminação de grãos de milho, o carvacrol se mostrou mais eficaz do que o timol, apresentando efeito inibitório para as cepas de *A. flavus* e *A. fumigatus* enquanto utilizado em contato com os grãos, o que o torna uma boa opção de escolha para futuros estudos em aplicações alimentares.

É importante ressaltar que mais estudos sejam realizados nessa área, buscando compreender as interações entre os componentes dos óleos essenciais e as matrizes alimentares, assim como as interações de sinergismo entre os óleos, seus componentes e outros compostos, a fim de diminuir os efeitos negativos sobre as características físico-químicas e sensoriais dos alimentos, bem como as concentrações necessárias para se obter efeitos inibitórios fúngicos satisfatórios.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, S.; SHARIFZADEH, A.; SHOKRI, H.; KHOSRAVI, A. R.;
ABBASZADEH, A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as
alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de Mycologie
Médicale**. v. 2, n. 2, p. 51-56, 2014.
- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse:
aplicações biotecnológicas. **Revista Uningá Review**, v. 21, n. 1, p. 55-59, 2015.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Detecção e
Identificação dos Fungos de Importância Médica**. Módulo VII. 2004. Disponível
em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf>.
Acesso em: 9 set. 2017.
- AHMAD, A.; VAN VUUREN, S.; VILJOEN, A. Unravelling the complex antimicrobial
interactions of essential oils—the case of *Thymus vulgaris* (Thyme). **Molecules**, v.
19, n. 3, p. 2896-2910, 2014.
- ALVARENGA, R. P.; QUEIROZ, T. R.; NADAE, J. Risco tóxico e potencial perigo
ambiental no ciclo de vida da produção de milho. **Espacios**, v. 38, n. 1, p. 12, 2017.
- ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Essential oils as additives in biodegradable films and
coatings for active food packaging. **Trends in food science & technology**, v. 48, p.
51-62, 2016.
- AVILA-SOSA, R.; PALOU, E.; MUNGUÍA, M. T. J.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V.;
CRUZ, A. R. N.; LÓPEZ-MALO, A. Antifungal activity by vapor contact of essential
oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. **International journal of
food microbiology**, v. 15, n. 1, p. 66-72, 2012.
- AZEREDO, H. M. C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. 2. ed. Embrapa,
Brasília: Editora técnica, 2012.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARONIO, M.; MIOTTO, L. T. *Aspergillus flavus* PRODUTOR DE AFLATOXINAS. **Revista Conversatio**, v. 1, n. 1, p. 168-182, 2016.

BATTILANI, P.; TOSCANO, P.; VAN DER FELLS-KLERX, H. J.; MORETTI, A.; LEGGIERI, M. C.; BRERA, C.; RORTAIS, A.; GOUMPERIS, T.; ROBINSON, T. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. **Scientific reports**, v. 6, p. 24328, 2016.

BEARTH, A.; COUSIN, M. E.; SIEGRIST, M. The consumer's perception of artificial food additives: Influences on acceptance, risk and benefit perceptions. **Food Quality and Preference**, v. 38, p. 14-23, 2014.

BENTO, L. F.; CANEPPELE, M. A. B.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; KOBAYASTI, L.; CANEPPELE, C.; ANDRADE, P. J. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 44-9, 2012.

BERRY, E. M.; DERNINI, S.; BURLINGAME, B.; MEYBECK, A.; CONFORTI, P. Food security and sustainability: can one exist without the other?. **Public Health Nutrition**, v. 18, n. 13, p. 2293–2302, 2015.

BORTOLINI, A. M. M.; GHELLER, J. A. Aplicação de diferentes fungicidas no controle de doenças foliares na cultura do milho em relação à produtividade. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 1, p. 109-121, 2012.

CABRAL, L. C.; PINTO, V. F.; PATRIARCA, A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 1, p. 1-14, 2013.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. **Evaluation of new antimicrobials "in vitro" and in experimental animal infections.** In: LORIAN, V. M. D. Antibiotics in laboratory medicine. 3ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p.739-788, 1991.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38- A. v. 22, n. 16, Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, United States of America, 2002.

CONSEA – Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. **Mesa de Controvérsias sobre os Impactos dos Agrotóxicos na Soberania e Segurança Alimentar e Nutricional e o Direito Humano à Alimentação Adequada.**

Organizada pelo Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. Brasília. 2012. Disponível em:

<<http://antigo.contraosagrototoxicos.org/index.php/materiais/relatorios/ Mesa-de-controversias-sobre-impactos-dos-agrotoxicos-na-soberania-e-seguranca-alimentar-e-nutricional-e-no-direito-humano-a-alimentacaoadequada-relatorio-final/detail>>.

Acesso em: 16 de jan. 2018.

COUTINHO, H.D.M., COSTA, J.G.M., LIMA, E.O., FALCAO-SILVA, V.S., SIQUEIRA-JUNIOR, J.P. In vitro interference of Momordica charantia and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 1056-1059, 2009.

DAMBOLENA, J. S.; ZUNINO, M. P.; LÓPEZ, A. G.; RUBINSTEIN, H. R.; ZYGADLO, J. A.; MWANGI, J. W.; THOITHI, G. N.; KIBWAGE, I. O.; MWALUKUMBI, J. M.; KARIUKI, S. T. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 2, p. 410-414, 2010.

DI DOMENICO, A. S.; CHRIST, D.; HASHIMOTO, E. H.; BUSSO, C.; COELHO, S. R. M. Evaluation of quality attributes and the incidence of *Fusarium sp.* and *Aspergillus sp.* in different types of maize storage. **Journal of Stored Products Research**, v. 61, p. 59-64, 2014.

DONSÌ, F.; ANNUNZIATA, M.; SESSA, M.; FERRARI, G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 67, 2011.

DWIVEDI, S. L.; VAN BUEREN, E. T. L.; CECCARELLI, S.; GRANDO, S.; UPADHYAYA, H. D.; ORTIZ, R. Diversifying food systems in the pursuit of sustainable food production and healthy diets. **Trends in plant science**, v. 22, n. 10, p. 842-856, 2017.

EL ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; ADDI, E. A.; CASABIANCA, H.; EL MOUSADIK, A.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. Essential oils: from extraction to encapsulation. **International journal of pharmaceutics**, v. 483, n. 1, p. 220-243, 2015.

ESPER, R. H.; GONÇALEZ, E.; MARQUES, M. O.; FELICIO, R. C.; FELICIO, J. D. Potential of essential oils for protection of grains contaminated by aflatoxin produced by *Aspergillus flavus*. **Frontiers in microbiology**, v. 5, 2014.

ESPINEL-INGROFF, A.; FOTHERGILL, A.; PETER, J.; RINALDI, M. G.; WALSH, T. J. Testing conditions for determination of, minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp: NCCLS collaborative study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3204-3208, 2002.

FLÁVIO, N. S. D. S.; SALES, N. L. P. S.; MENEZES, J. B. C.; SILVA, K. M.; AQUINO, L. F. S.; CATÃO, H. C. R. M. Óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* e *Annona crassiflora* no tratamento de sementes de sorgo. **Resumos do VII Congresso Brasileiro de Agroecologia – Fortaleza/CE – 12 a 16/12/2011. Cadernos de Agroecologia – ISSN**, v. 6, n. 2, p. 2236-7934, 2011.

FUKAYAMA, E. H.; BERTECHINI, A. G.; GERALDO, A.; KATO, R. K.; MURGAS, L. D. S. Extrato de Orégano como Aditivo em Rações para Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2316-2326, 2005.

GOMES, C. V.; FRINHANI, F. D. M. D. Alimentação saudável como direito humano à saúde: uma análise das normas regulamentadoras da produção de alimentos orgânicos. *Leopoldianum*, v. 43, n. 121, p. 22, 2017.

GONÇALVES, G. G.; MATTOS, L. P. V.; MORAIS, L. A. S. Óleos essenciais e extratos vegetais no controle de fitopatógenos de grãos de soja. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 102-107, 2009.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; NIGAM, P. S.; SARKER, S. D.; MOORE, J. E. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 1199-1206, 2011.

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, 2012.

KHAN, M. S.; AHMAD, In vitro antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon*-species against *Aspergillus fumigates* and *Trichophyton rubrum*. **Phytomedicine**, v. 19, n. 1, p. 48-55, 2011.

KLEPSEK, M. E.; WOLFE, E. J.; PFALLER, M. A. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41, p. 397-401, 1998.

LIOLIOS, C. C.; GORTZI, O.; LALAS, S.; TSAKNIS, J.; CHINO, I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 77-83, 2009.

MAIA, T. F.; DONATO, A.; FRAGA, M. E. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, n. 1, p. 105-116, 2015.

MARCHESE, A.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; BARBIERI, R.; DI LORENZO, A.; NABAVI, S. F.; GORTZI, O.; IZADI, M.; NABAVI, S. M. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food chemistry**, v. 210, p. 402-414, 2016.

MARCIA, B. A.; LAZZARI, F. A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 18, n. 4, p. 363-367, 1998.

MATEO, E. M.; GÓMEZ, J. V.; DOMÍNGUEZ, I.; GIMENO-ADELANTADO, J. V.; MATEO-CASTRO, R.; GAVARA, R.; JIMÉNEZ, M. Impact of bioactive packaging systems based on EVOH films and essential oils in the control of aflatoxigenic fungi and aflatoxin production in maize. **International Journal of Food Microbiology**, v. 254, p. 36-46, 2017.

MCCLENNY, N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. **Medical Mycology Supplement**, v. 43, p. 125-128, 2005.

MENNITI, A. M.; GREGORI, R.; NERI, F. Activity of natural compounds on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production in stored maize kernels. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 3, p. 304-309, 2010.

MOHAMMADI, P.; LOTFI, N.; NASERI, L.; ETEBARIAN, H. R. Antifungal activities of essential oils from some Iranian medicinal plants against various post harvest moulds. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 23, p. 1699-1708, 2013.

MORAES, A. M. L.; PAES, R.A.; HOLANDA, V. L. Micologia. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Orgs.). **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**: volume 4. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC; 2009. p. 399-496. Disponível em: <www.fiocruz.br/ioc/media/ConceitosMetodos_volume4.pdf>.

MOTA, K. S. L.; PEREIRA, F. O.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, I. O.; LIMA, E. O. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. Essential oil and Its Constituent

Phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with Ergosterol. **Molecules**, v. 17, n. 12, 2012.

MURRAY, P. R.; ROSSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia: Médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

NASCIMENTO, R. L. S.; RIBEIRO, D. F.; PIMENTEL, M. A. G. Eficiência do gás ozônio na desinfecção microbiológica de grãos de milho armazenado. Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC/BIC JÚNIOR, 10., 2016, Sete Lagoas. [Trabalhos apresentados]. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2016.

NÓBREGA, R. O.; TEIXEIRA, A. P. C.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O.; LIMA, I. O. Investigation of the antifungal activity of carvacrol against strains of *Cryptococcus neoformans*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 11, p. 2591-2596, 2016.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future prospectives. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, v. 7, n. 1, p. 28-35, 2012.

OCHOA-VELASCO, C. E.; NAVARRO-CRUZ, A. R.; VERA-LÓPEZ, O.; PALOU, E.; AVILA-SOSA, R. Growth modeling to control (in vitro) *Fusarium verticillioides* and *Rhizopus stolonifer* with thymol and carvacrol. **Revista Argentina de Microbiología**, 2017.

OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, A.; SULYOK, M.; KRŠKA, R.; MALLMANNA, C. A. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South 1 region of Brazil. **Food Control**, n. 73, p. 127-132, 2017.

OLIVEIRA, T. G.; FAVARETO, A. P. A.; ANTUNES, P. A. Agrotóxicos: levantamento dos mais utilizados no oeste paulista e seus efeitos como desreguladores endócrinos. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n. 11, 2013.

OOTANI, M. A.; AGUIAR, R. W.; RAMOS, A. C. C.; BRITO, D. R.; SILVA, J. B.; CAJAZEIRA, J. P. Utilização de Óleos Essenciais na Agricultura. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-175, 2013.

ÖZKAN, A.; ERDOGAN, A. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, p. 735-742, 2011.

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. EMBRAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2006. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/489376/aspectos-fisicos-quimicos-e-tecnologicos-do-grao-de-milho>>. Acesso em: 12 set. 2017.

PASSONE, M. A.; GIRARDI, N. S.; ETCHEVERRY, M. Antifungal and antiaflatoxic activity by vapor contact of three essential oils, and effects of environmental factors on their efficacy. **LWT-Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 434-444, 2013.

PAULI, A.; SCHILCHER, H. In vitro antimicrobial activities of essential oils monographed in the European pharmacopoeia 8th edition. In: Baser, K.H.C.; BUCHBAUER, G. (Ed.). **Handbook of essential oils, science, technology and applications**. CRC Press, 2015.

PEREIRA FILHO, I. A.; BORGHI, E. **Mercado de Sementes de Milho no Brasil Safra 2016/2017**. EMBRAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1060346/mercado-de-sementes-de-milho-no-brasil-safra-20162017>>. Acesso em: 25 out. 2017.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS POR *Aspergillus flavus* E *Aspergillus parasiticus*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 1, 2002.

PERETTO, G.; DU, W. X.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; SARREAL, S. B. L.; HUA, S. S. T.; SAMBO, P.; MCHUGH, T. H. Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vapors released from edible films. **Postharvest Biology and Technology**, v. 89, p. 11-18, 2014.

PERRICONE, M.; ARACE, E.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M.; BEVILACQUA, A. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; GOZZI, G.; EHRLICH, K.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; MEIJER, M.; NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R. A. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 53-66, 2007.

PETRIKKOU, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ, A.; MOLLEJA, A.; MELLADO, E. Inoculum standardization for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 39, v. 4, p. 1345-7, 2001.

PINTO, N. F. J. A.; SANTOS, M. A.; WRUCK, D. S. M. Principais doenças da cultura do milho. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 233, p. 82-94, 2006.

PHILLIPS, C. A.; LAIRD, K.; ALLEN, S. C. The use of Citri-V™®-An antimicrobial citrus essential oil vapour for the control of *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* in vitro and on food. **Food research international**, v. 47, n. 2, p. 310-314, 2012.

PRAKASH, B.; SINGH, P.; YADAV, S.; SINGH, S. C.; DUBEY, N. K. Safety profile assessment and efficacy of chemically characterized *Cinnamomum glaucescens* essential oil against storage fungi, insect, aflatoxin secretion and as antioxidant. **Food and chemical toxicology**, v. 53, p. 160-167, 2013.

RANUM, P.; PEÑA-ROSAS, J. P.; GARCIA-CASAL, M. N. Global maize production, utilization, and consumption. **New York Academy of Sciences**, v. 1312, n. 1, p. 105-112, 2014.

RAMOS, M.; JIMÉNEZ, A.; PELTZER, M.; GARRIGÓS, M. C. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 3, p. 513-519, 2012.

RIBEIRO-SANTOS, R.; ANDRADE, M.; MELO, N. R.; SANCHES-SILVA, A. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 61, p. 132-140, 2017.

ROMERO, A. L.; ROMERO, R. B.; SILVA, E. L.; SOUZA DINIZ, S. P. S.; OLIVEIRA, R. R.; VIDA, J. B. Composição química e atividade do óleo essencial de *origanum vulgare* sobre fungos fitopatogênicos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2012.

ROZADO, A. F.; FARONI, L. R. A.; URRUCHI, W. M. I.; GUEDES R. N. C.; PAES J. L. Aplicação de ozônio contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 3, p. 282-285, 2008.

RUIZ-NAVAJAS, Y.; VIUDA-MARTOS, M.; SENDRA, E.; PEREZ-ALVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. *In vitro* antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 386-392, 2013.

SARKER, S.D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, p. 321-324, 2007.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVADP, J. C.; VAN DIJCK, W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 59, p. 426-435, 2002.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SILVA, D. D.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; LANZA, F. E.; GUIMARÃES, E. A. **Micotoxinas em Cadeias Produtivas do Milho: Riscos à Saúde Animal e Humana**. EMBRAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1037807/micotoxinas-em-cadeias-produtivas-do-milho-riscos-a-saude-animal-e-humana>>. Acesso em: 13 set. 2017.

SMIDERLE, O. J.; GIANLUPPI, D.; JUNIOR, M. M. Tratamento e qualidade de sementes de milho durante o armazenamento em Roraima. **Revista Acadêmica: ciências agrárias e ambientais**, v. 1, n. 4, p. 75-83, 2003.

STEVIC, T.; BERIC, T.; ŠAVIKIN, K.; SOKOVIĆ, M.; GOĐEVAC, D.; DIMKIĆ, I.; STANKOVIĆ, S. Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 116-122, 2014.

STOJKOVIĆ, D.; GLAMOČLIJA, J.; ĆIRIĆ, A.; NIKOLIĆ, M.; RISTIĆ, M.; ŠILJEGOVIĆ, J.; SOKOVIĆ, M. Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. **Archives of biological sciences**, v. 65, n. 2, p. 639-643, 2013.

TAO, N.; OUYANG, Q.; JIA, L. Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism. **Food Control**, v. 41, p. 116-121, 2014.

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.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. **Journal of food science**, v. 79, n. 7, 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed editora, 2002.

TULLIO, V.; NOSTRO, A.; MANDRAS, N.; DUGO, P.; BANCHE, G.; CANNATELLI, M. A.; CUFFINI, A. M.; ALONZO, V.; CARLONE, N. A. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 6, p. 1544-1550, 2007.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRAVAGLIA, D. P. *Crescimento de Aspergillus flavus e produção de aflatoxina em grãos de milho armazenados sob diferentes temperaturas*. 2011. 50f. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2011.

TYAGI, A. K.; BUKVICKI, D.; GOTTARDI, D.; TABANELLI, G.; MONTANARI, C.; MALIK, A.; GUERZONI, M. E. Eucalyptus essential oil as a natural food preservative: *in vivo* and *in vitro* antiyeast potential. **BioMed research international**, 2014.

VECCHIA, A. D.; CASTILHOS-FORTES, R. Contaminação fúngica em granola comercial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 324-327, 2007.

VERAS, H. N. H.; ARARUNA, M. K. A.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A.; Topical Antiinflammatory Activity of Essential Oil of *Lippia sidoides* Cham: Possible Mechanism of Action. **Phytotherapy research**, v. 27, n. 2, p. 179-185, 2013.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

ZABKA, M.; PAVELA, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**, v. 93, n. 6, p. 1051-1056, 2013.

ZULKIFLI, N. A.; ZAKARIA, L. Morphological and molecular diversity of *Aspergillus* from corn grain used as livestock feed. **Hayati Journal of Biosciences**, v. 24, p. 26-34, 2017.