



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO BACHARELADO EM FARMÁCIA

CÉSAR AUGUSTO COSTA DE MEDEIROS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BSB15 ASSOCIADO AO CLORETO DE SÓDIO
PARA O CONTROLE DE FUSARIOSE EM GRÃOS DE MILHO**

CUITÉ – PB

2019

CÉSAR AUGUSTO COSTA DE MEDEIROS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BSB15 ASSOCIADO AO CLORETO DE SÓDIO
PARA O CONTROLE DE FUSARIOSE EM GRÃOS DE MILHO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de farmácia da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira

CUITÉ – PB

2019

M488a

Medeiros, César Augusto Costa de.

Avaliação do potencial de BSB15 associado ao cloreto de sódio para o controle de fusariose em grãos de milho / César Augusto Costa de Medeiros. – Cuité, 2019.

50 f.: il. color.

Monografia (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, 2019.

"Orientação: Prof. Dr. Filipe de Oliveira Pereira".

Referências.

1. *Fusarium*. 2. Infecção fúngica. 3. Associação. 4. Terpenos. 5. Alimentos. I. Pereira, Filipe de Oliveira. II. Título.

CDU 616.98 (043)

CÉSAR AUGUSTO COSTA DE MEDEIROS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BSB15 ASSOCIADO AO CLORETO DE SÓDIO
PARA O CONTROLE DE FUSARIOSE EM GRÃOS DE MILHO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de farmácia da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira

APROVADO EM: 11 / 06 / 2019

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira

(Orientador/UAS/CES/UFCG)

Prof. Dr. Igara Oliveira Lima

(Examinador/UAS/CES/UFCG)

Me. Gezaildo Santos Silva

(Examinador/Mestre)

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por me proporcionar diversas oportunidades, e a meus pais, Eva e Jorge, por lutarem dia após dia para que eu pudesse chegar até onde cheguei.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por todas as oportunidades que me concedeu, por ter colocado em meu caminho pessoas maravilhosas que sempre acreditaram em mim e sempre lutaram pela minha vitória.

Agradeço imensamente a minha família, em especial aos meus pais, Eva e Jorge, por serem pessoas maravilhosas, minha base, e sempre terem lutado, dia após dia, para me proporcionarem um excelente futuro, sempre confiando na minha capacidade. Ao meu irmão, Luiz Henrique, por me apoiar em diversos momentos da vida.

Agradeço ao Prof. Dr. Fillipe de Oliveira, por me proporcionar a oportunidade de participar desta pesquisa e por sempre se mostrar um orientador paciente, presente, extrovertido e prestativo. Todos os conhecimentos e ensinamentos de vida que foram repassados iram comigo durante toda minha vida acadêmica e profissional.

Agradeço também ao GPFungos, o grupo de pesquisa em antifúngicos do CES orientado pelo Prof. Dr. Fillipe de Oliveira. Vocês foram essenciais para o andamento de todas as pesquisas que desenvolvemos no decorrer destes anos. Agradeço em especial a Mara Rúbia, por se mostrar tão prestativa nas horas de colaborar com esta pesquisa.

Agradeço a todos os professores do curso de Farmácia da UFCG e também aqueles que fizeram parte da minha vida acadêmica, o ensinamento de cada um foi e sempre será essencial para que eu me torne um profissional cada vez melhor.

Agradeço a todos que colaboraram de forma direta ou indireta para construção desta pesquisa, seja cedendo substâncias para testes, cepas fúngicas ou algo que se tenha feito necessário.

Gratidão ao meu grupão, Bruna, Maria, Camila, Letícia, Sabrina, Luana, Marcus, Lucas, Thaynara, Carol, Iara por compartilharem comigo tantos momentos incríveis, tantas risadas, desabafos, farras, estudos, e tudo de melhor que vivemos nestes anos, serão momentos que ficaram para sempre guardados em nossas memórias, um pedaço de cada um de vocês já faz parte de mim.

Agradeço a minha eterna duplinha de 3, Iara e Carol, por terem compartilhado tantas histórias boas, tantas conversas, tantos estudos e tantas ajudas. Nossas noites perdidas de sono, seja estudando ou assistindo um filme, serão inesquecíveis também.

Agradeço a famosa casa do estágio I CG (Bruna, Thaynara, Lucas, Yanne, Fernando, Eu), vocês conseguiram me proporcionar uma das melhores épocas da minha graduação, todas as nossas risadas, farras, estresses e vexames valeram à pena, e tudo foi maravilhoso da sua forma, eu jamais esquecerei cada detalhe destes momentos maravilhosos, das nossas tardes de piscina, das nossas idas a academia, foi tudo perfeito, do seu jeitinho.

Agradeço a casa do estágio II CG (Thaynara, Fernando, Marcus, Matheus, Mirla, Yanne, Rafaela, Letícia, Eu), por também dividirem comigo tanta companhia e por me aguentarem nos momentos de estresse durante a produção deste TCC, obrigado por estes momentos maravilhosos.

Agradeço do fundo do meu coração a algumas pessoas que entraram na minha vida como anjos, saibam que cada momento de ajuda, de conselhos, de risadas, de brincadeiras, de “vai dar certo” ou discussões foram especiais e importantes para amadurecermos, eu amo vocês, é uma amizade que quero cultivar e fortalecer a cada dia, vocês iram para sempre no meu coração, são vocês, Thaynara, Maria, André Lucas, Josué, Genisson.

Gratidão aos meus amigos do coração, Clarinha, Manu, Higor, que estiveram comigo durante toda a minha graduação e que sempre me apoiaram para que eu buscasse meus objetivos e lutasse pelos meus sonhos, além de me levarem para vários momentos de descontração, amo vocês.

Agradeço a Jael Lima, por todo o ensinamento e aprendizado repassado. Muitos dos conhecimentos para construção deste trabalho eu devo a você, que nunca mediu esforços para me repassar parte do que sabia, sempre tendo muita paciência nas horas das correções. Sei que cada “vai dar certo”, “vai ficar tudo bem”, “você vai conseguir” e “vai vencer na vida” foram sinceros, desejo todo sucesso do mundo a você, e sei que tudo vai dar certo para nós dois.

Um dia, Deus resolveu me presentear com uma pessoa incrível, ou melhor, com a melhor pessoa que eu poderia conhecer, literalmente uma irmã, além, algo que vai além de uma irmandade, um companheirismo inexplicável, um amor fora do comum. A pessoa a quem eu agradeço, exclusivamente, em um parágrafo para chamar de seu, é Bruna. Nossa amizade se trata do primeiro tudo, do primeiro “oi”, do primeiro rolê, festinha, estudo, ajuda, desabafo,

conselho, e mais uma lista infinita. Esta é a pessoa que eu confio tudo da minha vida, que eu faria de tudo para a ver bem, sem medir esforços, porque uma certeza eu tenho, que a reciprocidade entre nós é algo que reina. Sempre que eu lhe falar que a amo, saiba que eu estou expressando apenas 1% dos meus sentimentos por você, que são um mix de tudo de melhor que você possa imaginar. Se um dia eu olhar para o lado e você estiver distante, saiba que esta distância é apenas quantitativa, quilômetros, mas que sua energia maravilhosa, e um pedacinho de você estará comigo, e os minutos para receber um novo abraço seu serão sempre contados. TE AMO!

Por fim, de uma forma mais completa, quero agradecer grandiosamente a minha turma, Turma XVI de farmácia, todos vocês são pessoas incríveis e essenciais para que pudéssemos ser essa turma incrível em união, ajuda para com o outro, melhores festas, risadas e diversos momentos que nunca serão apagados. Cada um de vocês foi essencial para tornar essa jornada da graduação mais leve e mais fácil de se lidar, sabendo que estando a grande maioria longe de suas famílias, nós mesmos nos tornamos uma família, a família dos eternos feras!

Para concluir meus agradecimentos, deixo aqui registrada uma bela frase de reflexão para esta família que a graduação me presenteou, e espero que todos levem consigo esta frase, assim como eu, e ela diz o seguinte: “Não nos despediremos, apenas nos afastaremos para darmos ao destino o prazer de nos reencontrarmos! ” AMO VOCÊS!

“Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas. ”

Cora Coralina

RESUMO

A deterioração de alimentos acontece frequentemente por microrganismos, a exemplo dos fungos, que tornam-se responsáveis por sérias perdas na produção e problemas de saúde relacionado ao consumo destes alimentos contaminados. *Fusarium* é um dos principais gêneros de fungos micotoxigênicos causadores de diversos danos em matriz alimentar, em que a contaminação de grãos de milho é um exemplo. Em virtude disso, pesquisas que envolvem a utilização de produtos naturais para o controle de fungos em alimentos vem se mostrando como uma alternativa viável em substituição aos conservantes químicos usuais. O presente estudo avaliou o potencial antifúngico de BSB15 (sesquiterpeno), também quando associado ao Cloreto de Sódio (NaCl), a partir da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de ambas as substâncias, por técnicas de microdiluição, que então permitiram posteriores ensaios *in vivo*, e assim, a observação de seus efeitos contra fusariose em grãos de milho para o consumo humano e animal. A determinação da CIM do BSB15 e NaCl, possibilitou quantificar suas atividades frente as cepas de *Fusarium oxysporum*, onde observou-se também a interferência que os mesmos causavam no crescimento miscelial (crescimento micelial radial) da espécie fúngica. Testes envolvendo a contaminação artificial de grãos de milho foram realizados frente a diversas concentrações de BSB15 e NaCl isolados e associados, visto que este grão se apresentar como uma excelente fonte energética e nutricional, e bastante susceptível a contaminação por *Fusarium*, desta forma, diante dos resultados obtidos, BSB15 se mostrou eficaz no controle do *F. oxysporum*, principalmente quando associado ao NaCl, com significativo sinergismo entre estes. Ainda nos ensaios *in vivo*, é possível que alguns interferentes do próprio grãos tenham causado resistência do *F. oxysporum* ou até mesmo redução na eficiência do BSB15, mesmo quando associado ao NaCl, necessitando de maiores concentrações do produto natural e sal para que se obtivesse o mesmo efeito protetor da matriz alimentar. BSB15 e NaCl se mostraram eficientes mesmo em seus valores subinibitórios, quando associados.

Palavras-chave: *Fusarium*, Infecção fúngica, Associação, Terpenos, Alimentos.

ABSTRACT

Food spoilage often occurs by micro-organisms, such as fungi, which are responsible for serious losses in production and health problems related to the consumption of these contaminated foods. *Fusarium* is one of the main genera of mycotoxigenic fungi causing several damages in food matrix, in which the contamination of corn kernels is an example. As a result, research involving the use of natural products to control fungi in food has been shown to be a viable alternative to the usual chemical preservatives. The present study evaluated the antifungal potential of BSB15 (sesquiterpene), also when associated to Sodium Chloride (NaCl), from the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of both substances by microdilution techniques, which then allowed further tests *in vivo*, and thus the observation of its effects against fusariosis on corn grains for human and animal consumption. The determination of the CIM of BSB15 and NaCl made it possible to quantify its activities against the strains of *Fusarium oxysporum*, where it was also observed the interference that they caused in the mycelial growth (radial mycelial growth) of the fungal species. Tests involving the artificial contamination of corn grains were carried out against different concentrations of BSB15 and NaCl isolated and associated, since this grain presents as an excellent energetic and nutritional source, and is very susceptible to contamination by *Fusarium*, in this way, before the BSB15 was effective in the control of *F. oxysporum*, especially when associated with NaCl, with significant synergism between them. Even in the *in vivo* assays, it is possible that some interferers of the grain itself caused resistance of *F. oxysporum* or even reduction in the efficiency of BSB15, even when associated to NaCl, requiring higher concentrations of the natural product and salt to obtain the protective effect of the food matrix. BSB15 and NaCl were efficient even in their subinhibitory values, when associated.

Key words: *Fusarium*, Fungal infection, Association, Terpenes, Food.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Anatomia do grão de milho	19
Figura 2: Micromorfologia do <i>Fusarium oxysporum</i> por microscopia óptica	21
Figura 3: Efeito inibitório do BSB15, NaCl e suas associações sobre o crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> 134	35
Figura 4: Sistema de conserva líquida com BSB15 e NaCl e suas associações frente ao desenvolvimento de <i>Fusarium oxysporum</i> 134 em grãos de milho humano e animal	36
Figura 5: Efeito inibitório de BSB15 e NaCl e suas associações frente ao desenvolvimento de <i>Fusarium oxysporum</i> 134 em grãos de milho humano (A) e animal (B)	37
Figura 6: Efeito inibitório de BSB15 e NaCl, frente as suas associações frente ao desenvolvimento de <i>Fusarium oxysporum</i> 134 no líquido de conserva de milho humano (A) e animal (B), respectivamente	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) de BSB15 e NaCl frente a cepas de <i>Fusarium oxysporum</i>	33
Tabela 2 – Valores de CIM ($\mu\text{g} / \text{mL}$) de BSB15 e NaCl e o efeito da associação contra <i>Fusarium oxysporum</i> 134	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Microgramas
µL	Microlitros
AB	Ágar Batata
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
CES	Centro de Educação e Saúde
CIM 1/2	Concentração subinibitória
CIM 1/4	Concentração subinibitória
CIM 1/8	Concentração subinibitória
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CONAB	Companhia Nacional de abastecimento
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTA	Doença Transmitida por Alimentos
mL	Mililitros
NaCl	Cloreto de sódio
OE	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
UAS	Unidade Acadêmica de Saúde
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1. Milho e sua importância.....	19
3.2. Considerações sobre fungos e <i>Fusarium oxysporum</i>	20
3.3. Importância da conservação de alimentos.....	24
3.4. Produtos naturais, óleos essenciais e terpenos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Local da pesquisa.....	30
4.2. Droga-teste	30
4.3. Inóculo fúngico.....	30
4.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	31
4.5. Estudos de associação de BSB15 com NaCl.....	31
4.6. Efeitos sobre o crescimento micelial	32
4.7. Contaminação em grãos de milho.....	32
4.8. Análise estatística	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÃO.....	41
7. REFERENCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

A contaminação e a deterioração de alimentos por microrganismos acarretam a grandes problemas relacionados a perdas de produção e a Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), respectivamente. Dentre um dos principais causadores de contaminação de vários *commodities* agrícolas antes da colheita ou até mesmo em condições pós-colheita, destacam-se os fungos. (ABBASZADEH et al., 2014; MACWAN et al., 2016; VILLEGAS-RASCON et al., 2017). Além de causarem fortes impactos econômicos e apresentar alta variabilidade populacional e genética, os fungos fitopatogênicos afligem a segurança alimentar, uma vez que suas micotoxinas entram na cadeia alimentar humana e animal (JIMTHA et al., 2016).

Os cereais, como os grãos de milho, são produtos alimentícios considerados como uma excelente fonte nutricional que podem ser colonizados facilmente por fungos, no qual causam significativas perdas de qualidade dos grãos e redução de seu cultivo. Dentre os principais gêneros fúngicos, *Fusarium*, de filamentos hialinos e septados, apresenta-se como um dos maiores grupos responsáveis por esta contaminação. (DOMENICO et al., 2015; ESCRIVÁ, FONT e MANYES, 2015;).

Fusarium oxysporum é a espécie mais amplamente distribuída do gênero, comumente encontrada como agente contaminante de milho, causando desde trombamento da planta por infecção e podridão de suas raízes, até interferindo no desenvolvimento normal da mesma. Sua patogenicidade se deve a capacidade de produção uma variedade de micotoxinas, sendo principalmente a fumonisinas, zearalenona e tricotecenos, representando desde efeitos tóxicos agudos e crônicos, ou até propriedades carcinogênicas (GRENIER E APPLGATE, 2013; GORDON et al., 2015).

Com o objetivo de reduzir as perdas, o uso de fungicidas químicos durante a produção de alimentos tornou-se uma alternativa viável, porém tanto a questão econômica como segurança alimentar e ambiental têm desestimulado a utilização desses compostos, visto que estes podem ser associados também a problemas teratogênicos, carcinogênicos e tóxicos quando aplicados em alimentos para consumo (ABBASZADEH et al., 2014).

Além das problemáticas supracitadas, a recente percepção negativa do consumidor e a resistência de fungos em relação a produtos químicos sintéticos mudou o rumo de pesquisas

para o desenvolvimento de alternativas naturais. Atualmente, este controle pode ser realizado por métodos físicos ou adição de produtos que podem causar danos à célula microbiana, interferindo no seu processo de desenvolvimento, adaptação ou multiplicação. Alguns exemplos desses produtos são sais, como o cloreto de sódio (NaCl), muito utilizados na conservação de alimentos, ou ácidos orgânicos, como terpenos, diversamente encontrado e extraídos de matrizes vegetais (ESPINA et al., 2014; MACWAN et al., 2016; TAWEMA et al., 2016).

De acordo com Quintanilha et al., (2017) e Corpas-López et al., (2018), dentre os terpenos, destaca-se o BSB15, um álcool sesquiterpênico monocíclico insaturado, presente em óleos essenciais de várias plantas, principalmente das flores de *Matricaria chamomilla*, sendo amplamente utilizado devido as suas propriedades anti-inflamatórias, microbidas (MAURYA et al. 2014), larvicidas e anticancerígenas (MIRAJ e ALESAEID, 2016).

Neste contexto, este trabalho representa uma possibilidade de obtenção de informações ainda ausentes na literatura científica a respeito do potencial inibitório do BSB15 associado ao NaCl, frente as cepas de *F. oxysporum* isolados de grãos de milho, com ênfase em métodos de conservação que visem a sustentabilidade. Embora este sesquiterpeno seja relatado na literatura, ainda não há registros de sua atividade inibitória de crescimento fúngico desta espécie.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Investigar o potencial antifúngico de BSB15 e suas associações com NaCl frente a cepas fúngicas de *Fusarium oxysporum*.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima de BSB15 e NaCl frente às cepas ensaiadas.
- Avaliar o efeito da associação de BSB15 com NaCl frente às cepas ensaiadas.
- Avaliar o efeito de BSB15, NaCl e suas associações sobre crescimento micelial das cepas ensaiadas.
- Avaliar o potencial protetor de BSB15, NaCl e suas associações frente a contaminação das cepas fúngicas ensaiadas em grãos de milho.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Milho e sua importância

O milho classifica-se como um cereal de grande importância econômica em diversos países. Isso se deve ao potencial produtivo, composição química e valor nutritivo, sendo bastante utilizado para consumo humanos e animais, além de importante matriz energética na produção de biocombustível como o etanol (ABUZAR et al., 2011; DI DOMENICO, 2015; ABUDABUS et.al 2017).

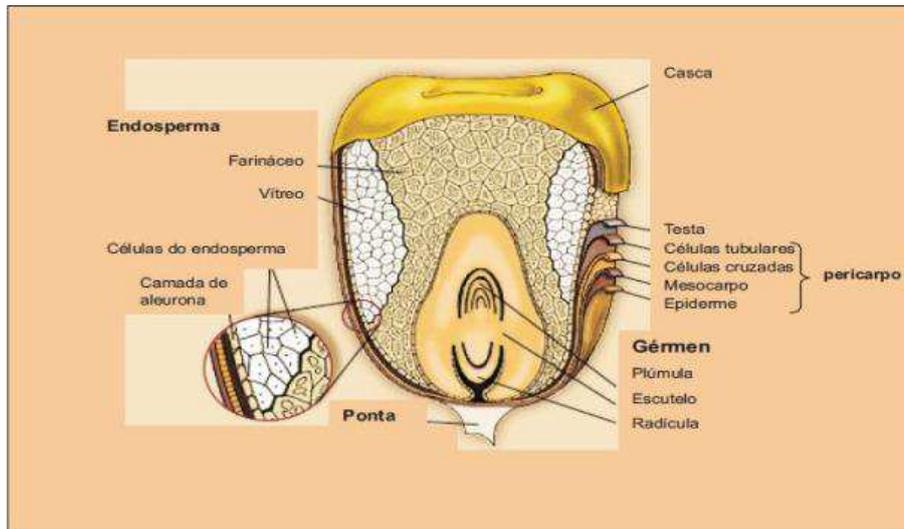
Na maioria das vezes, o grão de milho apresenta-se amarelo ou branco, podendo variar também de preto ou vermelho. Sua composição é basicamente amido (72%), proteínas (9,5%), fibras (9%) e óleo (4%), conhecido botanicamente como cariopse, o grão de milho é formado por quatro principais estruturas físicas: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta, as quais diferem em composição química e também na organização interna, como podemos observar na figura 1 (PAES, 2006).

O Brasil é o único país onde as condições climáticas permitem o cultivo de milho em duas épocas do ano, sendo o terceiro maior produtor mundial do milho, caracterizando uma considerável importância dentro do cenário da produção agropecuária. Na safra 2017/2018, a produção total das culturas de grãos no país foi estimada em 229,5 milhões de toneladas, sendo a segunda maior da história (CONAB, 2017).

Especialmente no Nordeste, o milho tem papel fundamental na alimentação, sendo consumido desde o litoral ao sertão, sob uma variedade de comidas regionais. Está na história do Brasil desde os primórdios do descobrimento, e possui tradição na culinária brasileira com pratos como pamonha, curau, mingau, pipoca, cuscuz, dentre outros que são produtos alimentícios dotados de grande valor nutricional (CAMPOS et al., 2008).

Considerando a vasta produção, grande parte de todo o milho é armazenado para fornecer demanda ao longo do ano, acarretando como consequência a exposição dos grãos a uma série de perdas de tributos, como as propriedades nutricionais, viabilidade das sementes, qualidade sanitária e valor comercial. Isso se deve ao fato de ser um substrato rico em amido, tornando-se bastante suscetível ao desenvolvimento de infecções por pragas e fungos tanto no campo como durante o armazenamento (FARONI et al., 2005; REED et al., 2007; DAWLAL et al., 2012; NOGAIM, 2012).

Figura 1 – Anatomia do grão de milho



Fonte: PAES (2006)

É então que grande parte da tecnologia que permite obter melhores resultados em diferentes condições de cultivo e armazenamento do milho aplica-se no principal insumo que é a semente. No entanto, o avanço da biotecnologia possibilitou uma grande ascensão na produção de milho no Brasil, diante a novas ferramentas que proporcionam a proteção do grão através da aplicação de uma variedade de produtos e técnicas que permite a flexibilidade no cultivo, na colheita, no armazenamento e no processamento, reduzindo perdas e levando em consideração os aspectos nutricionais, culturais e econômicos do cereal (PEREIRA FILHO, BORGUI, 2016).

3.2. Considerações sobre fungos e *Fusarium oxysporum*

Os fungos compreendem um grupo heterogêneo formado de leveduras, fungos filamentosos e cogumelos, que atuam como sapróbrios, parasitas e, com menor frequência, como simbioses, que vivem em associação com outros organismos (OLIVEIRA, et al, 2011). São seres estudados como agentes causadores de doenças em humanos, animais e plantas, bem como quanto ao seu papel na indústria de alimentos e medicamentos (ENGELKIRK; DUBEN-ENGELKIRK, 2012).

A denominação “fungos contaminantes” é aplicada aos diversos gêneros capazes de colonizar o ambiente, cujas estruturas fúngicas podem ser veiculadas através do ar atmosférico ou por outras vias como água, insetos, homem e animais. Logo, seus propágulos (conídios) encontram-se em altas concentrações nos mais variados ambientes, podendo causar desde a contaminação e deterioração de materiais e alimentos até alergias, intoxicações e infecções (LACAZ et al., 2002).

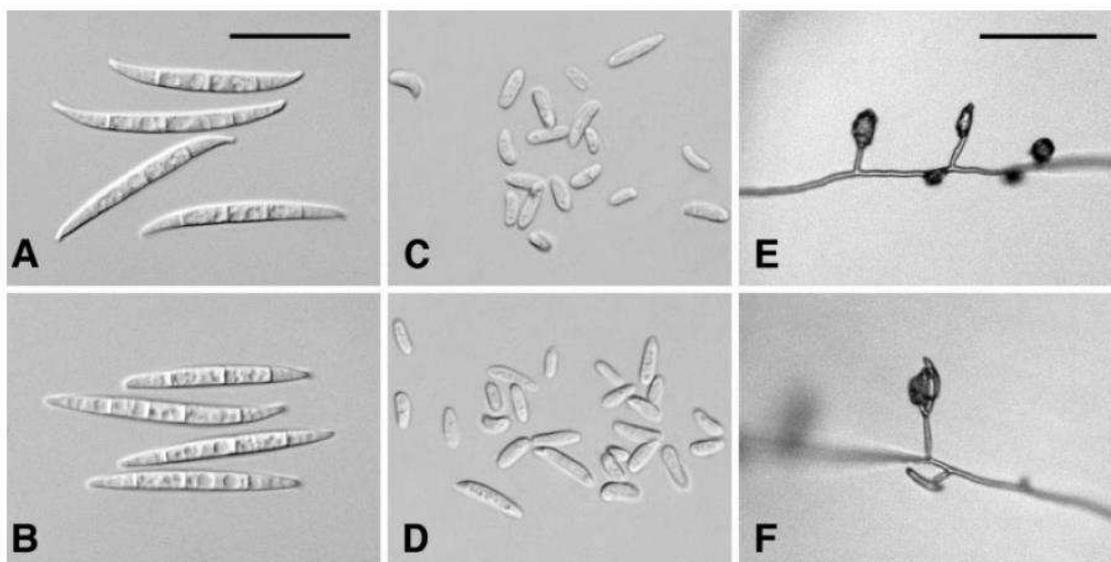
De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma doença de origem alimentar é algo geralmente de natureza infecciosa ou tóxica, provocada por agentes que entram no organismo através da ingestão de alimentos ou de água contaminada. Neste caso em especial, os alimentos podem funcionar como veículos para muitos fungos produtores de toxinas (WHO, 2002; NEWELL et al., 2010).

Estes alimentos e produtos alimentícios são frequentemente contaminados por infestações fúngicas e suas micotoxinas. Isso ocorre geralmente durante a pré e pós-colheita, transporte e armazenamento, quando realizados de forma inadequada, o que resulta em perdas na quantidade, qualidade, no valor nutricional dos alimentos e também impactos na saúde da população, e em especial, nas comunidades agrícolas que mantêm contato contínuo com tais alimentos, onde, no geral, essas substâncias causam efeitos tóxicos agudos e/ou crônicos (KEDIA et al., 2014; ESCRIVÁ; FONT; MANYES, 2015).

Diante dos diversos grupos de fungos contaminantes de alimentos, destaca-se o gênero *Fusarium*, capaz de acometer as mais variadas espécies de cereais quando os mesmos se encontram tanto no campo como em armazenamento (BRYDEN, 2012).

O gênero *Fusarium* atualmente apresenta-se como um grupo de fungos contaminantes de alimentos que possuem filamentos hialinos, septados e, em alguns casos, hifas irregulares. Os filamentos podem apresentar ramificações, com ângulo de 45 graus. As espécies desse gênero apresentam fiálides perpendiculares aos filamentos fúngicos, isoladas ou ramificadas, evidenciando-se ou não sobre estas, macrofialoconídios ou microfialoconídios. Suas colônias são de textura algodoadosa e tom branco que pode adquirir diferentes tonalidades, com o decorrer do tempo. Sua micromorfologia pode ser observada na Figura 2 (SUMMERELL; LESLIE, 2011).

Figura 2 – Micromorfologia do *Fusarium oxysporum* por microscopia óptica



Fonte: LESLIE (2006)

A – B: Macroconídio; **C – D:** Microconídio; **E – F:** Microconídio. Barra de escala: **A – D =** 25 μm ; **E – F =** 50 μm .

Sendo assim, observou-se o milho como um dos principais alimentos favoráveis à contaminação por fungos filamentosos do gênero *Fusarium*, onde diversos relatos apontam para sua alta incidência nestes grãos, incluindo culturas realizadas em território brasileiro (DOMENICO et al., 2015; OLDENBURG et al., 2017). Ainda, outros estudos relatam a frequência destes fungos contaminantes de milho em outros países como Itália, Estados Unidos, Irã e Síria (VENTURINI et al., 2011; MADANIA et al., 2013).

Diversos estudos apontam o *Fusarium* como uma das espécies que estão entre as mais prevalentes produtoras de micotoxinas. Estas últimas, classificadas como uma gama de metabólitos secundários produzidos por fungos, que causam problemas tóxicos agudos e crônicos aos animais e homens, geram problemas em todo o mundo, especialmente quando contaminam cereais cultivados (BRYDEN, 2012; ESCRIVÁ, FONT, MAYNES, 2015). As mais importantes classes de micotoxinas produzidas por esta espécie são fumonisina, zearalenona e tricotecenos. Além destas, também produzem toxinas emergentes como a fusaproliferina, beauvericina, eniatinas e moniliforminas. Alguns destes metabólitos

secundários são considerados altamente tóxicos e/ou cancerígenos para seres vivos. (SUMMERELL; LESLIE, 2011).

O conhecimento dos efeitos das micotoxinas está crescendo rapidamente, principalmente devido ao desenvolvimento de novas técnicas que facilitam o estudo desses compostos. Após a ingestão dos alimentos contaminados e a exposição tanto de altas quanto de baixas concentrações das toxinas, pode-se gerar alterações de ordem metabólica, fisiológica e distúrbios imunológicos ou até desordens agudas e crônicas na saúde dos seres vivos (ESCRIVÁ; FONT; MANYES, 2015; KANORA; MAES, 2009).

Com relação as principais toxinas, os tricotecenos são facilmente absorvidos através dos sistemas tegumentares e gastrointestinais, permitindo um rápido efeito em tecidos que se proliferam rapidamente. São tóxicos para animais e sua exposição tem sido associada a distúrbios reprodutivos. Por causa de seus efeitos sobre o sistema imunológico, a exposição humana à tricotecenos poderia predispor uma ampla gama de doenças infecciosas, especialmente na população mais sensível como crianças, pessoas imunodeficientes e idosos. Vários estudos *in vivo* relatam também o efeito toxicológico da zearalenona no sistema reprodutivo, incluindo aumento do útero, diminuição da fertilidade e mudanças nos níveis séricos de progesterona e estradiol em animais de laboratório. Os efeitos tóxicos causados por essas toxinas incluem vômitos, dor abdominal, náuseas e ganho de peso reduzido em animais (KORAICHI et al., 2012; ESCRIVÁ, FONT, MAYNES, 2015).

O *Fusarium oxysporum*, espécie mais amplamente distribuída do gênero, classifica-se como um dos mais incidentes em relação a contaminação de grãos de milho por ser comumente encontrado em solos contaminados ou nos próprios vegetais, gerando tombamento da planta tanto por contaminação como por podridão de suas raízes. Além disso, o acometimento do *F. oxysporum* em estoques de grãos de milho, podem vir a interferir no desenvolvimento normal da planta, visto que parte da produção deste grão muitas vezes é destinada para a utilização em um novo plantio, e assim os mesmos poderão carregar estruturas fúngicas como fragmentos de hifas e conídios que contaminarão a nova plantação (GORDON et al., 2015).

Também frente a contaminação ocasionada por estes fungos ao milho, vários fatores do próprio grão podem afetar o crescimento dos mesmos, tais como, teor de umidade, condição física e sanitária, nível de inoculação do fungo, conteúdo de oxigênio, armazenamento, insetos e ácaros. Uma indicação de que *F. oxysporum* esteja envolvido, é a presença de esporulação

sob a forma de coloração laranja a cor amarela sobre os caules de plantas infectadas (GELLI; JAKABI; PORTO, 1990; GORDON et al., 2015).

3.3. Importância da conservação de alimentos

A conservação no ramo de alimentos tem como garantia a segurança do alimento, que visa a garantia do direito de todos ao acesso a alimentos de qualidade, que não causem problemas à saúde do consumidor, e que tenham tempo de vida útil bem extenso em quantidade suficiente e de modo permanente, com curso em práticas saudáveis e respeitando as características culturais de cada povo. As práticas de segurança voltadas ao alimento começaram a ser empregadas após o fim da Primeira Guerra Mundial, apontando para a necessidade de formação de estoques estratégicos de alimentos e fortalecendo a ideia de que a soberania de um país dependia de sua capacidade de auto suprimento de produtos essenciais (MALUF; MENEZES, 2013).

A saúde humana, a produção agrícola e a estabilidade no comércio nacional e internacional de grãos podem ser gravemente afetadas pela contaminação por microrganismos. O clima temperado do Brasil favorece o crescimento de fungos produtores de micotoxinas, além de que muitos alimentos oferecem diversos atributos favoráveis para o crescimento dos mesmos. (BRYDEN, 2012).

Dessa forma, grandes avanços na área de tecnologia dos alimentos têm se instaurado com intuito de reduzir casos de DTA. Entretanto, um número inaceitável de DTA ocorre todos os anos, demonstrando que os controles na produção de alimentos ainda precisam apresentar diversas melhorias (NICOLAU, 2014).

Visto que esta falha no controle gera consideráveis contaminações e perdas econômicas, o aumento da produtividade e demanda exige maior qualidade e segurança principalmente na cadeia produtiva, e sabendo que o período de produção agrícola torna-se susceptível a contaminação, o desenvolvimento de fungos em alimentos pode causar alterações em suas propriedades físicas, químicas e estruturais (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A qualidade microbiana dos alimentos pode ser estabelecida por métodos que garantam a inativação ou a destruição de micro-organismos como fungos. Atualmente, este controle pode ser realizado por métodos físicos, como congelamento, aquecimento, liofilização, secagem,

irradiação entre outros (ESPINA et al., 2014; TAWEMA et al., 2016). Segundo Lacroix (2007), a irradiação de alimentos é um tratamento físico onde os alimentos são expostos à ação direta das radiações ionizantes para ampliar sua vida de prateleira e garantir sua segurança. Irradiação inativa os micro-organismos, danificando seu DNA, o que impede sua proliferação. A luz ultravioleta (UV) e a irradiação gama são dois dos principais métodos utilizados na indústria alimentar.

Ainda visando o aumento da vida útil dos alimentos, através da destruição dos microrganismos, a ação letal de diferentes temperaturas é bastante considerada. Existem dois tipos de tratamento térmico com calor, uma denominada pasteurização, que pretende fundamentalmente a higienização dos alimentos, e a outra, esterilização, cujo objetivo é a destruição, ou não, dos microrganismos presentes (ORDÓNEZ et al., 2005).

Assim como o calor, o emprego de baixas temperaturas também é um método bastante utilizado, o qual se baseia na inibição total ou parcial dos principais agentes responsáveis pela alteração dos alimentos. A aplicação do frio, tanto pelo método da refrigeração como pelo congelamento, permite prolongar a vida útil dos alimentos, sejam eles frescos ou processados, durante períodos relativamente longos, sem alteração mínima em suas características nutritivas e sensoriais (ORDÓNEZ et al., 2005).

A adição de produtos com ação antimicrobiana também é bastante utilizada. Estes podem causar danos à célula microbiana, interferindo seu processo de desenvolvimento, adaptação ou multiplicação. Alguns dos exemplos desses produtos são sais e ácidos orgânicos. A definição das Autoridades Europeias de Segurança Alimentar (EFSA) para o aditivo alimentar é "qualquer substância normalmente não consumida como alimento e não usado como ingrediente característico dos mesmos, com a adição intencional para aumentar a vida útil, o valor nutritivo, e que possui propósito tecnológico na fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, transporte ou armazenamento de tais alimentos (EFSA, 2008; SALTMARSH; SALTMARSH, 2013; TAWEMA et al., 2016).

Dessa forma, o uso de sais como o NaCl e sais de cura para o controle microbiano vem sendo visto como alternativa em desfavor a deterioração alimentar há anos. Estes agentes têm como base de sua propriedade antimicrobiana a redução da disponibilidade intracelular de água no agente contaminante (HARPER; GETTY, 2012). A presença destes produtos propicia uma reduzida atividade de água nos alimentos que induz diversas respostas adaptativas dos micro-

organismos na perspectiva de manter o equilíbrio osmótico das membranas biológicas. Isto inclui a alteração da composição lipídica das membranas celulares (BLESA et al., 2008).

O cloreto de sódio (NaCl) é um dos sais mais utilizados como método de conservação, onde além de conferir o sabor salgado aos alimentos, podem inibir o crescimento de fungos patogênicos e deteriorantes. No entanto, há relatos afirmando os possíveis danos do excesso de sais à saúde humana, levando ao foco de aplicações destes em conjunto com outros aditivos, visando uma redução na sua concentração efetiva para conservação do alimento (KAMLEH et al., 2012).

Muitos produtos químicos sintéticos também receberam destaque por bastante tempo como opção eficaz na conservação de alimentos com objetivo principal de reduzir perdas. Porém, em razão de questões econômicas, segurança alimentar e ambiental, houve um desinteresse no uso desses compostos, visto que estes podem ser associados a problemas teratogênicos, carcinogênicos e tóxicos quando aplicados em determinada matriz que será consumida por humanos e animais e por estarem também relacionados a resistência de insetos, pragas, fungos fitopatogênicos devido ao seu uso indiscriminado (OOTANI, 2013; ABBASZADEH et al., 2014).

Sendo assim, diante de diversas polêmicas e da negativa percepção dos consumidores a respeito do uso de produtos químicos sintéticos em matriz alimentar, e considerando a importância da fitossanidade na agricultura, pesquisadores vêm mudando o rumo das pesquisas para o desenvolvimento de alternativas naturais de controle desses agentes fitopatogênicos, sem causar impactos negativos e que sejam seguros e eficientes (OOTANI, 2013; MACWAN et al., 2016).

Assim, vários produtos naturais vieram a ser reconhecidos nas indústrias de alimentos, devido suas propriedades antimicrobianas e sustentáveis, que não agridam o meio ambiente ou que não prejudique a saúde dos consumidores, garantindo que as futuras gerações tenham os recursos necessários para suprir suas necessidades (TIAN et al., 2012; COELHO et al., 2015).

Uma dessas alternativas é o uso de Óleos Essenciais (OE). Tratam-se de fitocomplexos compostos por substâncias voláteis, naturais e aromáticos, derivados de vias metabólicas complexas, a fim de proteger o organismo vegetal de diversos microrganismos patogênicos, e que se apresentam como uma resposta às necessidades atuais do mercado consumidor: a obtenção de alimento isento de conservantes artificiais, mas que tenham vida útil prolongada (CHERRAT et al., 2014; MACWAN et al., 2016).

No entanto, o uso desses OEs em alimentos é limitado por causa da necessidade de altas concentrações dos mesmos para atingir o seu potencial antimicrobiano, que acabaria por influenciar negativamente nas propriedades sensoriais destes produtos alimentícios, mesmo havendo uma melhoria na qualidade e segurança (CHERRAT et al., 2014; RIBEIRO SANTOS et al., 2017).

Muitas vezes, esta necessidade do uso de altas concentrações de OEs para obter o potencial protetor, vem de fatores característicos da própria matriz alimentar, onde teor de gordura, proteína, atividade de água, pH e enzimas podem diminuir a eficácia destes compostos (BURT, 2004).

Para contornar este problema, a utilização de estratégias que permitam aumentar a eficácia dos produtos naturais em concentrações mais baixas começou a ser necessária, e novamente muitos pesquisadores atentaram-se para o desenvolvimento de combinações inteligentes de diferentes tecnologias. Dessa forma, a utilização de terapias combinatórias permitiu alcançar os níveis exigidos de segurança, mantendo a qualidade sensorial dos alimentos (CHERRAT, 2014).

3.4. Produtos naturais, óleos essenciais e terpenos

O emprego do controle convencional de agentes infestantes, baseado na aplicação de produtos químicos sintéticos, é considerado perigoso, podendo ocasionar desequilíbrios ao meio ambiente, a saúde do consumidor, bem como o aumento da resistência de insetos e pragas aos produtos químicos utilizados (VELEZ, 2016).

Por estes e outros motivos, as discussões sobre o “sustentável” tornam-se cada vez mais constantes. Sustentabilidade é basicamente a capacidade de satisfazer suas necessidades sem comprometer a capacidade de futuros também satisfazerem as necessidades. Sendo assim, o desenvolvimento sustentável é aquele que melhora a qualidade da vida do homem na terra, não coloca em risco os elementos do meio ambiente e respeita à capacidade de produção de diversas áreas distintas, e dos ecossistemas nos quais vivemos (MIKHAILOVA, 2004)

Então, considerando que a contaminação de alimentos é hoje um grande problema para os produtores, a busca de novas substâncias que auxiliem de alguma forma a inibir este processo se torna urgente. Neste contexto, os produtos naturais são importantes instrumentos no

desenvolvimento de novas ferramentas de conservação onde as plantas então como fontes importantes de moléculas biologicamente ativas, utilizadas na obtenção de novas drogas. Na área de agentes antimicrobianos, é notável o número de drogas derivadas de produtos naturais para uso clínico ou como agente saneante de ambientes, BSB15 é um exemplo (BRAZ FILHO, 2010; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Apesar da descoberta de novas moléculas e da disponibilidade de novas formulações para reduzir a toxicidade, o risco de novos ou melhores mecanismos de resistência e ainda assegurar produção de alimentos isentos de perigos microbiológicos, a procura por estes novos agentes antifúngicos e a caracterização de novos alvos é uma necessidade contínua, especialmente na ciência dos alimentos (AGARWAL et al., 2008; MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008; WIEDERHOLD; PATTERSON, 2015).

Dentre os produtos provenientes das plantas com possível aplicabilidade antifúngica, os óleos essenciais e seus componentes tem ganhado destaque. São elementos voláteis originados do metabolismo secundário das plantas, encontrados em suas folhas, resinas, frutos, flores, troncos, exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos, atração de agentes de polinização, proteção contra perda de água, aumento de temperatura e como inibidores de germinação. Óleos essenciais consistem numa mistura de hidrocarbonetos (terpenos, sesquiterpenos, entre outros) e compostos oxigenados (álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis, éteres fenólicos e outros) (SIMÕES; SPITZER, 2007; BAKKALI et al., 2008; ADORJAN; BUCHBAUER, 2010).

É então que muitos estudos de atividade antifúngica têm sido realizados com estes produtos naturais, no caso do presente trabalho, atenta-se para os terpenos. Os mesmos são compostos hidrogenados de cadeias carbônicas cíclicas ou alifáticas, largamente distribuídos na natureza, presentes em óleos essenciais de uma ampla variedade de plantas aromáticas, que abrangem uma grande variedade de substâncias formadas pela união de unidades pentacarbonadas chamada isopreno, sendo agrupadas em: hemiterpenos (C5), monoterpenos (duas unidades de isopreno, C10), sesquiterpenos (três unidades de isopreno, C15), diterpenos (quatro unidades de isopreno, C20), triterpenos (seis unidades de isopreno, C30) e carotenoides (SANTOS, 2015).

Dentre a ampla gama de terpenos, o BSB15 apresenta-se como um álcool sesquiterpênico monocíclico, isolado pela primeira vez em 1951 das flores de camomila (*Matricaria chamomilla*). Caracterizado por seu aroma fraco e doce, é um líquido bastante

lipofílico, incolor, com uma densidade relativamente baixa (0,93) e propenso à oxidação (PERBELLINI et al., 2004; KAMATOU, 2010).

Muito conhecido principalmente por suas atividades farmacológicas, a utilização do BSB1515 como agente anti-inflamatório é bem relatada. Este composto também exibe várias outras propriedades tais como atividades analgésicas (BARRETO et al., 2016), antimicrobianas (STANOJEVIC et al., 2016) e anticancerígenas (YOKOYAMA et al., 2016). Devido à baixa toxicidade do mesmo, tem sido utilizado também como ingrediente em formulações dermatológicas e cosméticas, tais como cremes de barbear, loções para mãos e corpo, desodorantes, produtos de cuidados com o sol e pós-sol, produtos de cuidados com pediátricos e cremes esportivos, sem qualquer relato de efeito adverso (KAMATOU, 2010).

Devido a estes fatores, o BSB15 é passível de promover ações extraordinárias entre os antimicrobianos naturais, como possível inibidor seletivo da biossíntese de ergosterol. Seu uso como agente antifúngico na forma pura é considerável, assim, pode ser possivelmente utilizado como composto principal no desenvolvimento de futuras drogas antifúngicas (PAULI, 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local da pesquisa

O trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica e no Laboratório de Microbiologia, ambos da UAS/CES/UFCG.

4.2. Droga-teste

BSB15 foi cedido pelo Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba. O NaCl foi adquirido na (Sigma-Aldrich[®], Brasil). Suas respectivas soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, dissolvendo-os primeiramente em 100 µL dimetilsulfóxido (DMSO) a 100% e utilizando água destilada esterilizada em quantidade suficiente para obter a concentração inicial de 1024 µg/mL. A partir desta concentração, foram feitas diluições seriadas em razão de dois até alcançar concentrações inferiores utilizando o próprio meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich[®], Brasil).

4.3. Inóculo fúngico

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram utilizadas cepas de *F. oxysporum* isoladas de grãos de milho (FO 73, 105, 132, 134, 136 e 141) cedidas pela colaboradora Me. Juliana Moura Mendes Arrua do Centro Multidisciplinar de Investigações Tecnológicas da Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguai. Todas as cepas foram mantidas em tubos de ensaio contendo ágar batata dextrose inclinado sob refrigeração (8°C), no Laboratório de Bioquímica até o momento dos testes.

As cepas fúngicas foram cultivadas em ágar batata dextrose (Difco[®]) a 28°C por 7 dias. As recentes colônias fúngicas foram cobertas com de solução salina estéril (NaCl 0,9 %), e as suspensões feitas por suaves agitações com auxílio de uma pipeta de transferência. A mistura resultante de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para tubos de ensaio esterilizados. Após agitação de 15 segundos, cada suspensão foi deixada em repouso por 3-5 minutos e o

sobrenadante foi recolhido em tubos de ensaio estéreis. As densidades das suspensões de cada cepa foram ajustadas em espectrofotômetro a 530 nm para um valor de 68-70% de transmitância, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente $1-5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias em 1 mL (UFC/mL) (PETRIKKOU et al., 2001; CLSI, 2002).

4.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das drogas-teste foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo chato (CLSI, 2002). Em cada linha da placa, foram adicionados 100 μ L das drogas-teste duplamente concentradas e diluídas em RPMI 1640. Em cada cavidade da placa, foram adicionados 100 μ L do inóculo previamente preparado, diluído em RPMI 1640 na proporção 1:50. Um controle fúngico foi realizado substituindo as drogas-teste por solução salina esterilizada (controle de crescimento). Um controle de esterilidade também foi realizado, colocando-se apenas o meio de cultura, sem o inóculo. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelo DMSO utilizado na preparação das soluções, foi feito um controle com DMSO na concentração 0,5%, usada para a solubilização das drogas acrescido do inóculo e do meio de cultura. 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. A CIM é definida como a menor concentração das drogas-teste capaz de inibir 100% o crescimento fúngico observado nas cavidades.

4.5. Estudos de associação de BSB15 com NaCl

O efeito da associação do BSB15 com NaCl foi determinado pela técnica de *checkerboard*, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo chato. Diluições das soluções dos terpenos e sais (1/8CIM, 1/4CIM, 1/2CIM, CIM, 2×CIM, 4×CIM) foram feitas em RPMI 1640. Após isto, uma alíquota de 50 μ L de NaCl foi adicionada nos poços da placa no sentido vertical e, em seguida, 50 μ L de uma determinada diluição dos terpenos foram adicionados no sentido horizontal da placa. Por fim, foram adicionados 100 μ L do inóculo diluído em RPMI 1640 (1:50). Desta maneira, foram obtidas misturas de diversas

concentrações de ambas as drogas. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por até 7 dias para a realização da leitura das melhores concentrações que inibiram o crescimento do fungo. O índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) foi calculado através da soma: $CIF^A + CIF^B$, onde A representa o BSB15 e B o NaCl. O $CIF^A = CIM^A$ combinado/ CIM^A sozinho, enquanto que o $CIF^B = CIM^B$ combinado/ CIM^B sozinho. O ICIF foi interpretado da seguinte maneira: sinergismo (< 0,5), aditividade (0,5-1,0), indiferença (> 1,0 e < 4,0) ou antagonismo (> 4,0) (LEWIS et al., 2002; CORREA-ROYERO et al., 2010).

4.6. Efeitos sobre o crescimento micelial

A análise da interferência das drogas-teste sobre o crescimento micelial foi realizada pela medição do crescimento micelial radial em meio sólido. Para isto, inicialmente foram preparadas placas de Petri com 10 mL de agar Sabouraud dextrose (Difco®) acrescido das drogas-teste em diversas concentrações múltiplas de CIM. Em seguida, um fragmento de aproximadamente 5 mm do micélio das cepas fúngicas recém cultivadas foram colocadas no centro da placa contendo o ASD. Um controle negativo foi também realizado na ausência de qualquer droga. Todo o sistema foi incubado a 28°C por um tempo total de 7 dias, quando a cada dia o crescimento micelial radial foi registrado (KHAN; AHMAD, 2011).

4.7. Contaminação em grãos de milho

Foram utilizados dois grupos de grãos de milho: grãos para consumo humano cedidos pela Secretaria de Agricultura de Cuité e grãos para consumo animal (ração) fornecidos pela CONAB, entre os meses de maio e julho de 2016. As sementes de milho sem doenças aparentes foram secas a 40°C por 48 horas, uma condição recomendada durante os períodos de estoque das sementes antes do consumo. As sementes saudáveis de cada grupo de milho (300 g) foram acondicionadas em erlenmeyers âmbar e autoclavadas por 15 minutos a 121°C em dois dias consecutivos e guardadas a temperatura ambiente até o momento dos testes (DAMBOLENA et al., 2010).

Para avaliar os efeitos inibitórios das drogas-teste sobre a contaminação *in vivo*, as sementes previamente autoclavadas foram imersas (200 μ L) no inóculo fúngico (10^6 UFC/mL) por 1 minuto, em tubos de ensaio estéreis. Após isso, houve a divisão da seguinte forma, em 3 grupos teste (NaCl; terpeno isolado; associação de NaCl + terpeno) e um controle, contendo 10 sementes cada. Nos grupos teste, adicionou-se diferentes concentrações das drogas-teste (BSB15 na CIM, BSB15 1/2CIM, BSB15 1/4CIM, BSB15 1/8CIM, BSB15 1x2CIM, BSB15 1x4CIM; assim como para NaCl na CIM, NaCl 1/2CIM, NaCl 1/4CIM, NaCl 1/8CIM, NaCl 1x2CIM, NaCl 1x4CIM) e associações (NaCl + BSB15 em concentrações de 1/8CIM, 1/4CIM, 1/2CIM, CIM, 1x2CIM). E nos grupos controle, adicionou-se água destilada estéril. Após isso, todas as placas foram seladas e incubadas a 28°C por 7 dias para determinar a incidência de sementes de milho contaminadas e não-contaminadas em todos os grupos. Para identificar a incidência de contaminação de sementes sem sinais de contaminação aparente após o tratamento, as sementes foram transferidas para placas de Petri (10 sementes por placas) e incubadas a 28°C por 7, 14 e 21 dias. Já para determinar a presença de unidades formadoras de colônias (UFC) viáveis, uma alíquota de 10 microlitros do líquido de conserva foi retirada e transferidas para placa de Petri com agar saboraud dextrose e incubada durante 5 dias para análise de crescimento fungico. Após incubação do milho, uma colônia fúngica foi analisada morfológicamente para identificar a presença do fungo em questão (MENNITI et al., 2010).

4.8. Análise estatística

Os valores de CIM foram expressos pela média geométrica dos resultados. Os resultados dos ensaios que avaliaram os efeitos das drogas-teste sobre o crescimento micelial e contaminação dos grãos de milho foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). A avaliação estatística destes resultados foi feita empregando-se o teste t não pareado, onde determinou-se diferenças significantes, quando um valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com objetivo de determinar o potencial antifúngico de BSB15, os diversos ensaios foram realizados para obter a relação de suas concentrações capazes de exercer o efeito protetor inibitório. Os valores da CIM para o BSB15 e NaCl frente as cepas de *F. oxysporum* estão expostos na Tabela 1. BSB15 conseguiu inibir o crescimento das cepas testadas nas concentrações que variaram de 128 a 1024 µg/mL, porém, se mostrou mais eficaz, apresentando menor valor de CIM quando comparado ao NaCl.

As cepas *F. oxysporum* 132, 134, 136 e 141 se mostraram mais sensíveis, uma vez que tiveram seu crescimento inibido quando exposta a 128 µg/mL de BSB15, enquanto todas as demais cepas apresentaram inibição de crescimento quando expostas a concentrações maiores do mesmo. Em relação ao controle (ausência de droga), houve crescimento de *F. oxysporum* em todas as cepas. O DMSO não impediu o crescimento fúngico na concentração testada.

Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM) de BSB15 e NaCl frente a cepas de *Fusarium oxysporum*.

Cepas	BSB15 (µg/mL)*	NaCl (µg/mL)*
<i>Fusarium oxysporum</i> 73	256	16384
<i>Fusarium oxysporum</i> 105	1024	16384
<i>Fusarium oxysporum</i> 132	128	16384
<i>Fusarium oxysporum</i> 134	128	16384
<i>Fusarium oxysporum</i> 136	128	16384
<i>Fusarium oxysporum</i> 141	128	16384

*Média geométrica de três experimentos

De acordo com Perricone et al., (2015), ensaios feitos com produtos naturais podem se apresentar bastante eficientes no controle de fungos, onde a determinação da CIM se torna necessária para avaliar quantidades mínimas que controlem os mesmos. Na CIM, os produtos naturais causam suficiente estresse na célula do fungo, inibindo seu crescimento. Relata-se

também que moléculas lipofílicas como terpenos podem facilmente penetrar a célula fúngica, alterando a funcionalidade da membrana plasmática.

Em estudos realizados anteriormente, presentes na literatura, há relatos da atividade de BSB15 contra outros microrganismos, onde o mesmo apresentou uma promissora atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e *Candida albicans*, embora tenha exibido menor atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* (DUKE, 2002; VAN ZYL, 2006).

Quando se trata de utilização de óleos essenciais e seus componentes em matriz alimentar, as concentrações destes compostos não podem atingir altos valores de CIM, visto o risco de alteração das propriedades sensoriais do alimento. Como resposta à esta necessidade, muitas pesquisas focam para o desenvolvimento de combinações inteligentes de diferentes compostos, onde os tratamentos com estes produtos atinjam os níveis de segurança, manutenção das qualidades do alimento e redução das concentrações necessárias para alcançar suas propriedades antimicrobianas (CHERRAT et al., 2014; PERRICONE et al., 2015).

Em estudos de associação, as variadas concentrações de BSB15 e NaCl que foram testadas em conjunto, tiveram o intuito de observar estas possíveis diminuições nos valores da CIM. Como resultado a isto, observou-se um aumento da atividade do BSB15 associado ao NaCl, com significativa redução nos valores de CIM, representando um sinergismo (ICIF = 0,25), mesmo tratando-se de valores subinibitórios (1/8CIM, 1/4CIM, 1/2CIM) no ensaio *in vitro*, como pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2: Valores de CIM ($\mu\text{g} / \text{mL}$) de BSB15 e NaCl e o efeito da associação contra *Fusarium oxysporum* 134.

Drogas	CIM isolado	CIM associado	ICIF
BSB15	128	16	0,25 (sinergismo)
NaCl	16384	2048	

*Média geométrica de três experimentos. Índice da concentração inibitória fracionada (ICIF)

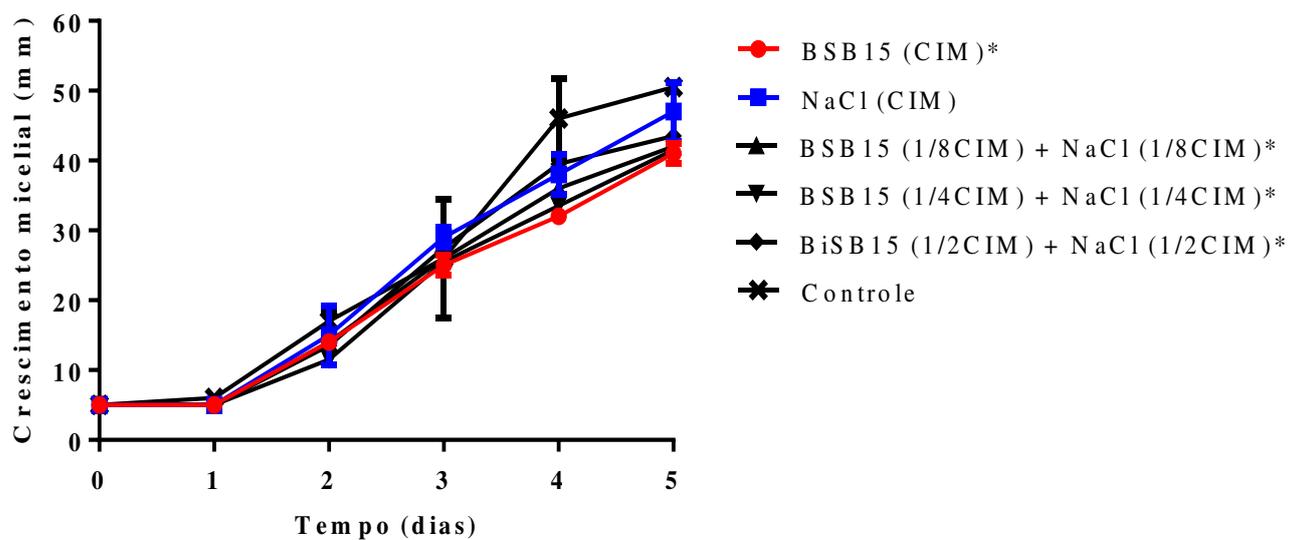
A eficácia limitada da monoterapia torna a combinação de drogas um alvo para desenvolvimento de novos métodos, no intuito de obter estratégias promissoras para melhorar

a eficácia geral e diminuir possíveis interferências na matriz alimentar. O sinergismo representa uma interação positiva quando o efeito das substâncias combinadas é maior que a soma dos efeitos individuais, com potenciais benefícios que vão desde ação dos efeitos antifúngicos por diferentes mecanismos, expansão do espectro de ação, menor dosagem e diminuição de resistência (LIU et al. 2014; FINQUELIEVICH et al., 2014; MACWAN et al., 2016; CHANG et al. 2017).

Considerando que as associações das drogas em concentrações subinibitórias foram eficazes em inibir o crescimento fúngico, estes valores foram utilizados posteriormente nos ensaios de crescimento micelial e contaminação de grãos de milho. Todos os valores subinibitórios, quando em associação, foram eficientes na inibição do crescimento do *F. oxysporum*, quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

Os resultados dos ensaios de crescimento micelial estão expostos na figura 3. Considerando o último dia da análise (dia 5), BSB15 isolado e associado com NaCl inibiram o crescimento micelial quando comparado ao controle ($p < 0,05$). Este mesmo efeito não foi observado no caso da utilização do NaCl quando isolado ($p > 0,05$).

Figura 3: Efeito inibitório do BSB15, NaCl e suas associações sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* 134.

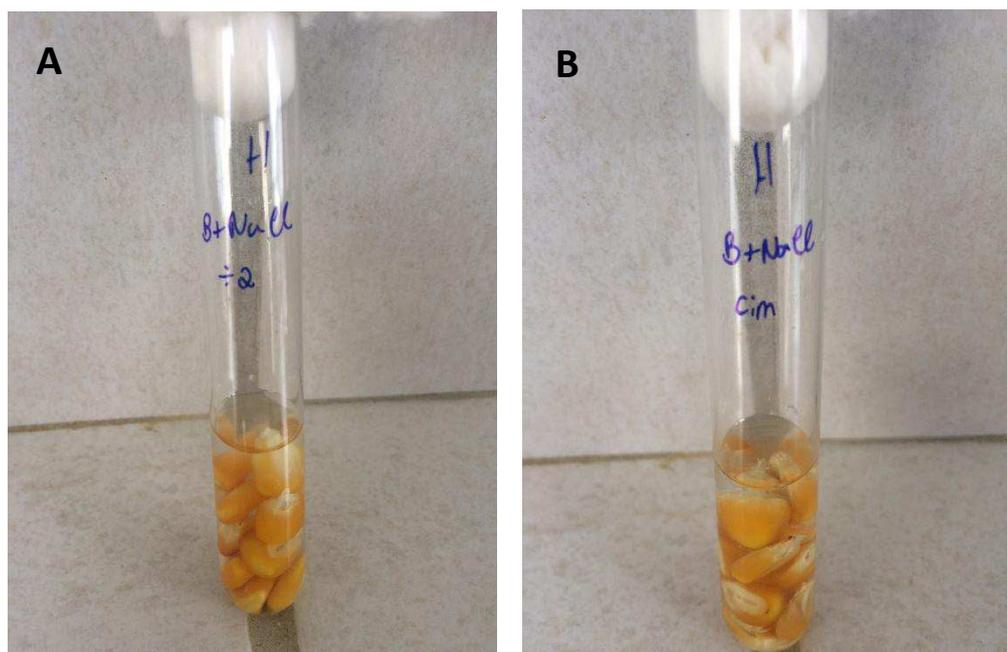


* $p < 0,05$ quando comparado ao controle no dia 5 (teste t não pareado)

O micélio é caracterizado como um conjunto de células que formam hifas septadas, encontradas no interior ou na superfície do meio de crescimento, quando cultivada em laboratório. Considerando que o crescimento do micélio representa o crescimento fúngico, e considerando também que este crescimento, quando em matriz alimentar, não gera boa impressão, visto que um alimento com alterações nas aparências não será consumido, o BSB15 associado ao NaCl se mostra eficiente na diminuição deste crescimento radial do micélio, onde se sugere que etapas necessárias para formação do mesmo estejam sendo interferidas pela presença das drogas (LIU et al., 2007).

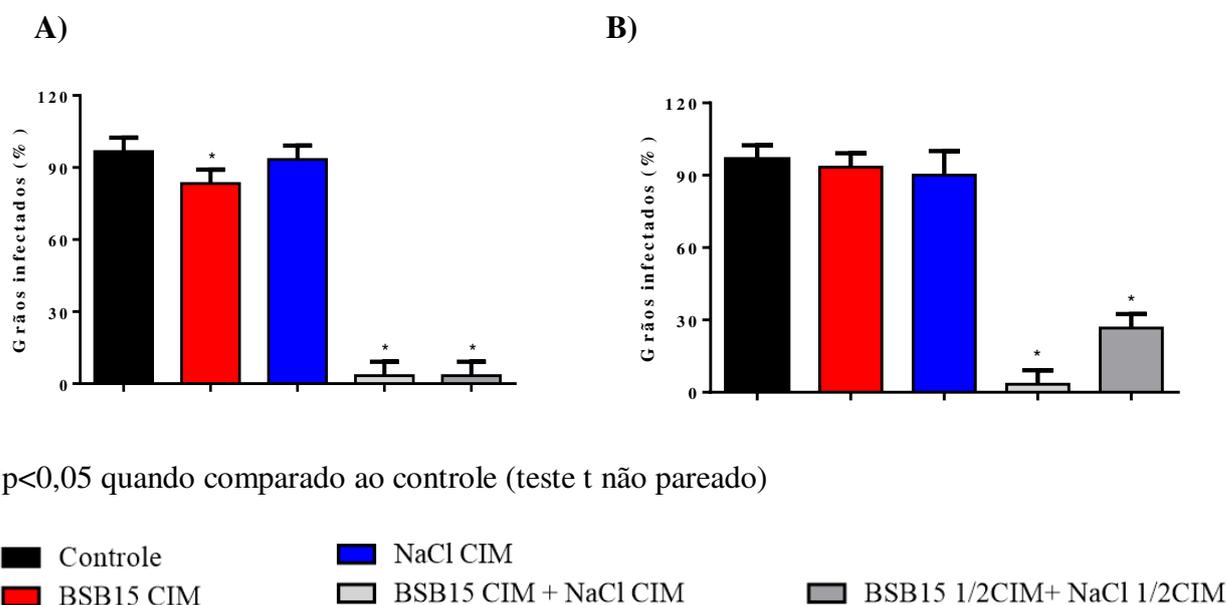
Posteriormente, em ensaios realizados com grãos de milho artificialmente contaminados, o tratamento com BSB15 e NaCl associados (1/8CIM ou 1/4CIM), não conseguiu controlar o patógeno. Dessa forma, a associação de BSB15 (1/2CIM) e NaCl (1/2CIM) se mostrou eficiente quando comparado ao controle (Figura 4 A), inibindo o crescimento de *F. oxysporum* no grão de milho humano e animal ($p < 0,05$), resultado semelhante aos obtidos com a associação das drogas na CIM (Figura 4 B), como pode-se observar na figura 5. As drogas isoladas nas respectivas CIM não diferiram do controle ($p > 0,05$), com exceção do milho humano tratado com BSB15 na CIM.

Figura 4: Sistema de conserva líquida com BSB15 e NaCl e suas associações frente ao desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* 134 em grãos de milho humano e animal.



A: BSB15 (1/2CIM) e NaCl (1/2CIM). **B:** BSB15 (CIM) e NaCl (CIM).

Figura 5: Efeito inibitório de BSB15 e NaCl e suas associações frente ao desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* 134 em grãos de milho humano (A) e animal (B).

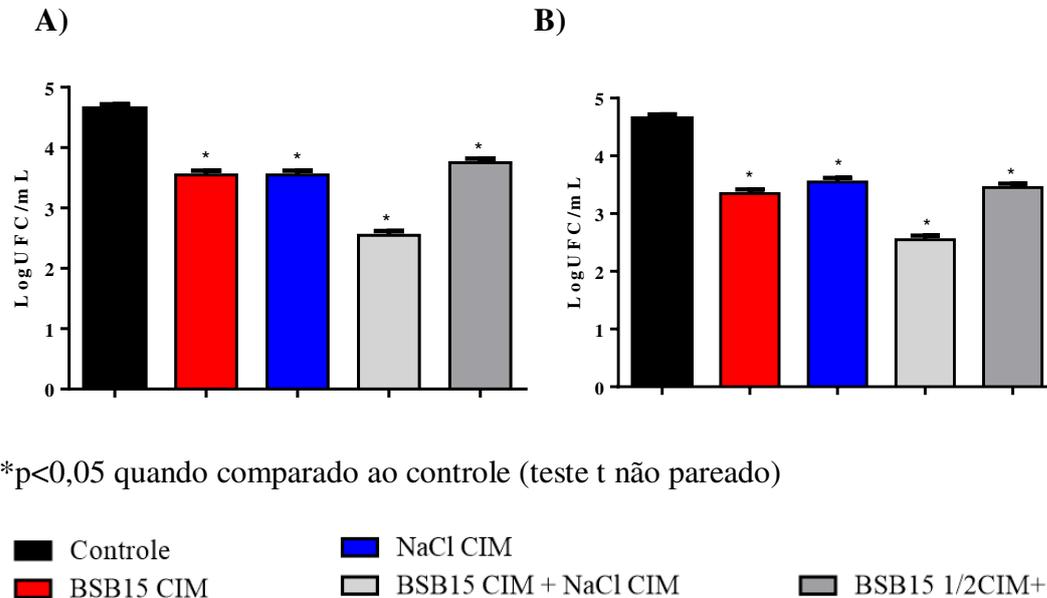


O alto valor nutricional e energético dos grãos de milho justificam a grande incidência de doenças fúngicas nele presente, com consequente produção de micotoxinas e formação de radicais livres, afetando diretamente sua produção (OLIVEIRA et al., 2017). Dessa forma, alternativas naturais e seguras do ponto de vista sanitário e ambiental, com efeitos fungicidas ou fungistáticos, se tornam consideráveis em substituição a aditivos sintéticos (PERRICONE et al., 2015; GUERRA et al., 2017; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017).

Quanto ao líquido de conserva dos grãos de milho, a análise do mesmo indica que as drogas isoladas ou associadas não apresentaram efeito fungicida, e sim fungistático, foi observado que todos os grupos-teste demonstraram menores valores de células viáveis (LogUFC/mL) do que o controle (p<0,05), como podemos observar na figura 6.

A partir dos estudos realizados, podemos observar que o BSB15 se apresenta como alternativa potencial, em substituição dos aditivos químicos, para o controle da deterioração do *F.oxysporum*. Os caracteres lipofílicos de seu esqueleto de hidrocarbonetos junto ao seu caráter hidrofílico de seus grupos funcionais são de principal importância antifúngica (KAMATOU e VILJOEN, 2010; MACWAN et al., 2016).

Figura 6: Efeito inibitório de BSB15 associado a NaCl, frente ao desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* 134 no líquido de conserva de milho humano (A) e animal (B), respectivamente.



Calo et al., (2015), em seus estudos, afirmam que métodos adicionais para aumentar a atividade de produtos naturais inclui aumento do teor de sal, resultando em melhor rendimento da atividade das drogas, similar aos achados no presente trabalho, onde podemos observar que a associação de BSB15 e NaCl é evidentemente sinérgica e torna-se um fato relevante, principalmente por conseguirmos menores concentrações efetivas de NaCl, visto que há uma inviabilidade do uso de quantidades elevadas de sal nos alimentos, mesmo quando se trata de meios de conservas.

Outros relatos a respeito de utilização de métodos combinatórios entre produtos naturais potencialmente antifúngicos e sais são encontrados na literatura, onde os autores afirmam a viabilidade dessas estratégias, havendo redução da CIM e ainda combatendo a resistência microbiana (CHERRAT et al., 2014; PIPPI et al. 2015, RM MACHADO et al. 2016; MORAES et al. al. 2016; DANIELLI et al. 2017).

Apesar de vários estudos terem sido realizados *in vitro* para a avaliação das propriedades antifúngicas de alguns OEs, poucos estudos relataram sua bioatividade em matriz alimentar. Segundo TYAGI et al., (2014), quando se trata da matriz alimentar em si, notou-se que as

concentrações das substâncias antifúngicas não são tão eficazes quanto nos ensaios *in vitro*, mesmo quando associadas. Além do mais, alguns componentes alimentares como gorduras, hidratos de carbono, proteínas, sais e até o pH podem reduzir os efeitos dos antimicrobianos. De fato, o mesmo efeito observado nos ensaios *in vitro* é conseguido na matriz de alimentos somente com concentrações mais altas, como pode ser visto no presente trabalho.

Ainda se sabe que mesmo os óleos essenciais e seus componentes sendo lipofílicos, os fatores intrínsecos e extrínsecos como altas concentrações de gorduras e proteínas em alimentos, podem também proteger os microrganismos, fornecendo-os uma camada protetora (PERRICONE et al., 2015; MACWAN et al., 2016).

Em relação ao exposto, podemos observar que mesmo havendo necessidade de aumento das concentrações de BSB15 e NaCl nos estudos em matriz alimentar, a interação entre as drogas se apresentou relevante ($p < 0,05$), onde os valores subinibitórios ($1/2\text{CIM}$) ainda se mostraram suficientes para o controle do patógeno no grão de milho para consumo humano e animal.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados observados, é possível concluir que o BSB15 se mostrou eficaz no controle do *Fusarium oxysporum*, porém a aplicação de tecnologias que venham a reduzir a sua CIM torna-se benéfica por se tratar de matriz alimentar. Dessa forma, a associação de produto natural com NaCl demonstrou sinergismo, onde em concentrações subinibitórias, impediu o crescimento micelial fúngico *in vitro* e em grãos de milho artificialmente contaminados por *F. oxysporum*.

Com relação aos ensaios *in vivo*, conclui-se que as características do próprio alimento possivelmente podem interferem na atividade das drogas, ocorrendo uma resistência do fungo ao BSB15, mesmo quando associado ao NaCl, onde se fez necessário a aplicação de maiores concentrações do produto natural e do sal para obter a mesma atividade antifúngica. Os valores subinibitórios da associação (1/2CIM) permaneceram eficientes na garantia de impedir o possível crescimento do fungo no grão de milho e posteriormente o adoecimento do mesmo.

Tendo em vista a possível utilização do BSB15 e NaCl no grão de milho, para controle do microrganismo, novos ensaios para avaliar efeitos também sinérgicos em outras matrizes alimentares também serão necessários. Além disso, por se tratar de componentes de óleos aromáticos, possíveis alterações em aspectos sensoriais são consideradas, relevantes principalmente por tratarmos de ensaios em alimentos, necessitando também de investigações futuras quanto a possíveis interferências que estes produtos podem causar.

Por fim, considerando o potencial tecnológico deste estudo, e a eficiência que o BSB15 proporciona na proteção de matriz alimentar contra infestações por *F. oxysporum*, quando associado ao NaCl, voltado também para uma alternativa sustentável, este trabalho possibilitou a geração de uma patente. A mesma foi registrada no dia 27 de novembro de 2018, com número de registro BR 10 2018 074391 0, e intitulada como Composição Antifúngica para Controle de Doenças Fitopatogênica Composta de Mistura de BSB15 e NaCl.

7. REFERENCIAS

- 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/Journal of Medical Mycology**, v. 24, n. 2, p. e51-e56, 2014.
- ABUDABOS, A. M.; AL-ATIYAT, R. M.; ALBATSHAN, H. A.; ALJASSIM, R.; ALJUMAAH, M. R.; ALKHULAIFI, M. M.; STANLEY, D. M. Effects of concentration of corn distillers dried grains with solubles and enzyme supplementation on cecal microbiota and performance in broiler chickens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 18, p. 7017-7026, 2017.
- ABUZAR, M. R.; SADOZAI, G. U.; BALOCH, M. S.; BALOCH, A. A.; SHAH, I. H.; JAVAID, T. & HUSSAIN, N. Effect of plant population densities on yield of maize. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 21, n. 4, p. 692-695, 2011.
- ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour Fragrance Journal**, v. 25, n. 6, p. 407-426, 2010.
- AGARWAL, A.K.; XU, T.; JACOB, M.R.; FENG, Q.; LI, X.C.; WALKER, L.A.; CLARK, A.M. Genomic and genetic approaches for the identification of antifungal drug targets. **Infect Disord. Drug Targets**, v.8, n. 1, p. 2–15, 2008.
- AGEITEC. Importância socioeconômica do milho. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Agência de Informações Tecnológicas da EMBRAPA, 2014.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARRETO, R. S.; QUINTANS, J. S.; AMARANTE, R. K.; NASCIMENTO, T. S.; AMARANTE, R. S.; BARRETO, A. S. & ZENGIN, G. Evidence for the involvement of TNF- α and IL-1 β in the antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Stachys lavandulifolia* Vahl.(Lamiaceae) essential oil and (-)- α -bisabolol, its main compound, in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 191, p. 9-18, 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.
- 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.
- BLESA E.; ALIÑO M.; BARAT J. M.; GRAU R, TOLDRÁ F, PAGÁN M. J. Microbiology and physico-chemical changes of dry-cured ham during the post-salting stage as affected by partial replacement of NaCl by other salts. **Meat Sci.** 78(1-2):135-42, 2008.

BRAZ FILHO, R. Phytochemical contribution to development of a emergent country. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BRYDEN, W. L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science Technology**, v. 173, p. 134-158, 2012.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

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.

CAMPOS, R. F. F.; DE FRANÇA FERREIRA, J.; NUNES, M. Gastronomia nordestina: uma mistura de sabores brasileiros. **XI Encontro de Iniciação à Docência. Universidade Federal da Paraíba**, 2009. Disponível em: <
http://www.prac.ufpb.br/anais/xenex_xienid/xi_enid/monitoriapet/ANAIS/Area6/6CCSDNM_T01.pdf. Acesso em 06/05/2019.

CHANG, Y. L.; YU, S. J.; HEITMAN, J.; WELLINGTON, M. & CHEN, Y. L. New facets of antifungal therapy. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 222-236, 2017.

CHERRAT, L.; ESPINA, L.; BAKKALI, M.; GARCÍA-GONZALO, D.; PAGÁN, R. & LAGLAOUI, A. Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 6, p. 1197-1204, 2014.

CHERRAT, L.; ESPINA, L.; BAKKALI, M.; PAGÁN, R. & LAGLAOUI, A. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 22, p. 221-229, 2014.

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

COELHO, C. C. S.; SILVA, O. F.; CAMPOS, R. S.; BEZERRA, V. S.; CABRAL, L. M. C. Ozonização como tecnologia pós-colheita na conservação de frutas e hortaliças: Uma revisão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 4, p. 369-375, 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Levantamento da safra 2012/13. Panorama do Setor de armazenagem no Brasil: Conab, 2014. Disponível em: <
<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/gaos/boletim-da-safra-de-gaos/item/1659-12-levantamento-safra-2012-13>>. Acesso em: 12/03/2019

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: nono levantamento – junho, 2017. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253>>. Acesso em: 12/03/2019.

CORPAS-LÓPEZ, V.; MERINO-ESPINOSA, G.; ACEDO-SÁNCHEZ, C.; DÍAZ-SÁEZ, V.; NAVARRO-MOLL, M. C.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F.; & MARTÍN-SÁNCHEZ, J. Effectiveness of the sesquiterpene (-)- α -bisabolol in dogs with naturally acquired canine leishmaniosis: an exploratory clinical trial. *Veterinary research communications*, p. 1-10, 2018.

CORREA-ROYERO, J.; TANGARIFE, V.; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; MESA-ARANGO, A. In vitro antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 734-741, 2010

COSTA, D. F.; VIEIRA, B. S.; LOPES, E. A. & MOREIRA, L. C. B. Aplicação de fungicidas no controle de doenças foliares na cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 11, n. 1, p. 98-105, 2012.

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

DANIELLI, L. J.; PIPPI, B.; SOARES, K. D.; DUARTE, J. A.; MACIEL, A. J.; MACHADO, M. M. & APEL, M. A. Chemosensitization of filamentous fungi to antifungal agents using *Nectandra Rol. ex Rottb.* species essential oils. **Industrial crops and products**, v. 102, p. 7-15, 2017.

DAWLAL, P.; BARROS, E.; MARAIS, G. J. Evaluation of maize cultivars for their susceptibility towards mycotoxigenic fungi under storage conditions. **Journal of stored products research**, v. 48, p. 114-119, 2012.

DOMENICO, A. S. D.; 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, 2015.

DUKE, J. A. Handbook of medicinal herbs. **CRC press**, 2002.

EFSA, GMO. Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 46, p. S2, 2008.

ENGELKIRK, P. G.; DUBEN-ENGELKIRK, J. Burton, microbiologia para ciências da saúde. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 388, 2012.

ESCRIVÁ, L.; FONT, G.; MAYNES, L. In vivotoxicity studies of Fusarium mycotoxins in the last decade: **A review. Food and Chemical Toxicology**. v. 78, p. 185–206, 2015.

ESPINA, L.; MONFORT, S.; ALVAREZ, I.; GARCIA-GONZALO, D.; PAGAN, R. Combination of pulsed electric fields, mild heat and essential oils as an alternative to the ultrapasteurization of liquid whole egg. **Int J Food Microbiol**. 17;189:119-25. Epub 2014.

FARONI, L. R. A.; BARBOSA, G. D. O.; SARTORI, M. A.; CARDOSO, F. D. S. & ALENCAR, E. D. Avaliação qualitativa e quantitativa do milho em diferentes condições de armazenamento. **Engenharia na Agricultura**, v. 13, n. 03, p. 193-201, 2005.

FINQUELIEVICH, J.; TUR-TUR, C.; ERASO, E.; JAUREGIZAR, N.; QUINDÓS, G. & GIUSIANO, G. Combination antifungal therapy: A strategy for the management of invasive fungal infections. **Rev Esp Quimioter**, v. 27, n. 3, p. 141-158, 2014.

FORRER, M.; KULIK, E. M.; FILIPPI, A. & WALTIMO, T. The antimicrobial activity of alpha-bisabolol and tea tree oil against *Solobacterium moorei*, a Gram-positive bacterium associated with halitosis. **Archives of oral biology**, v. 58, n. 1, p. 10-16, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. **São Paulo: Editora Atheneu**, 2008. 182 p.

GELLI, D. S.; JAKABI, M.; PORTO, E. Isolamento de *Aspergillus* spp aflatoxigênicos de produtos alimentícios. **Rev. Inst. Adolfo Lutz. São Paulo**, v. 50, n.1, p. 319-323, 1990.

GORDON, T. G.; SWETT, C. L.; WINGFIELD, M. J. Management of Fusarium diseases affecting conifers. **Crop Protection**, n. 73, p. 28-39, 2015.

GRENIER, B. & APPELEGATE, T. J. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: Meta-analysis of published experiments in animals. **Toxins**, v. 5, n. 2, p. 396-430, 2013.

GUERRA, F. Q.; ARAÚJO, R. S.; SOUSA, J. P.; SILVA, V. A.; PEREIRA, F. O.; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. & LIMA, E. O. A new coumarin derivative, 4-acetatecoumarin, with antifungal activity and association study against *Aspergillus* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2017.

HARPER, N. M.; GETTY, K. J.K. Effect of Salt Reduction on Growth of *Listeria monocytogenes* in Meat and Poultry Systems. **Journal of Food Science**, 77: M669–M674, 2012.

JIMTHA, J. C.; JISHMA, P.; ARATHY, G. B.; ANISHA, C. & RADHAKRISHNAN, E. K. Identification of plant growth promoting Rhizosphere *Bacillus* sp. WG4 antagonistic to *Pythium myriotylum* and its enhanced antifungal effect in association with *Trichoderma*. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 16, n. 3, p. 578-590, 2016.

K MAURYA, A.; SINGH, M., DUBEY, V.; SRIVASTAVA, S.; LUQMAN, S. & U BAWANKULE, D. α -(-)-bisabolol reduces pro-inflammatory cytokine production and

ameliorates skin inflammation. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 173-181, 2014.

KAMATOU, G. P. P; VILJOEN, A. M. A review of the application and pharmacological properties of α -Bisabolol and α -Bisabolol-rich oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 1, p. 1-7, 2010.

KAMLEH, R.; OLABI, A.; TOUFEILI, I.; NAJM, N. E.; YOUNIS, T.; AJIB, R. The effect of substitution of sodium chloride with potassium chloride on the physicochemical, microbiological, and sensory properties of Halloumi cheese. **J Dairy Sci.** 95(3):1140-51, 2012.

KANORA, A.; MAES, D. The role of mycotoxins in pig reproduction: a review. **Veterinari Medicina**. v. 54, n. 12, p. 565-576, 2009.

KEDIA, A.; PRAKASH, B.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Antifungal and antiaflatoxigenic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 168, p. 1-7, 2014

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

KORAICHI, F.; VIDEMANN, B.; MAZALLON, M.; BENAHMED, M.; PROUILLAC, C. & LECOEUR, S. Zearalenone exposure modulates the expression of ABC transporters and nuclear receptors in pregnant rats and fetal liver. **Toxicology letters**, v. 211, n. 3, p. 246-256, 2012.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Tratado de micologia médica. 9. ed. **São Paulo: Sarvier**, 2002.

LACROIX, M.; VIGNEAULT, C. Irradiation treatment for increasing fruit and vegetable quality. **Stewart Postharvest Review**, v. 3, n. 3, p. 1-8, 2007.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. & BULLOCK, S. The *Fusarium* laboratory manual. **Ames, IA: Blackwell Pub.**, 2006.

LEWIS, R. E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSEK M. E. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time–kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 345–351, 2002.

LIM E. L.; HAMMER K. A. Adaptation to NaCl Reduces the Susceptibility of *Enterococcus faecalis* to *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil. **Curr Microbiol.**71(4):429-33. 2015.

LIU, S.; HOU, Y.; CHEN, X.; GAO, Y.; LI, H. & SUN, S. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans*

infections and insight into new antifungal agent discovery. **International journal of antimicrobial agents**, v. 43, n. 5, p. 395-402, 2014.

LIU, T.; ZHANG, Q.; WANG, L.; YU, L.; LENG, W.; YANG, J.; CHEN, L.; PENG, J. The use of global transcriptional analysis to reveal the biological and cellular events involved in distinct development phases of *Trichophyton rubrum* conidial germination. **BMC Genomics**, v. 8, n. 100, p. 1-14, 2007.

MACWAN, S. R.; DABHI, B. K.; APARNATHI, K. D. & PRAJAPATI, J. B. Essential oils of herbs and spices: Their antimicrobial activity and application in preservation of food. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 885-901, 2016.

MADANIA, A.; ALTAWIL, M.; NAFFAA, W.; VOLKER, P.H.; HAWAT, M. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* isolated from maize in Syria. **Journal of Phytopathology**, v. 161, p. 452-458, 2013.

MALUF, R. S.; MENEZES, F. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Caderno "Segurança Alimentar". **Paris: Fhp**, 2000.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v.83, n. 5-6, p. 166-369, 2008.

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.

MIKHAILOVA, I. Sustentabilidade: evolução dos conceitos teóricos e os problemas da mensuração prática. **Revista Economia e Desenvolvimento**, n. 16, 2004.

MIRAJ, S.; ALESAEIDI, S. A systematic review study of therapeutic effects of *Matricaria recuita* chamomile (chamomile). **Electronic physician**, v. 8, n. 9, p. 3024, 2016.

MORAES, R. C.; CARVALHO, A. R.; LANA, A. J. D.; KAISER, S.; PIPPI, B.; FUENTEFRIA, A. M. & ORTEGA, G. G. In vitro synergism of a water insoluble fraction of *Uncaria tomentosa* combined with fluconazole and terbinafine against resistant non-*Candida albicans* isolates. **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 406-415, 2017.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R. & DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.

NEWELL, D. G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H. Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. 1, p.3-15, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Produtos naturais como fontes de novos medicamentos ao longo dos 30 anos de 1981 a 2010. **Revista de produtos naturais**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NICOLAU, M. C. Biocontrole de *Fusarium verticillioides* em milho e trigo. 2014. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

NOGAIM, Q. A. Natural incidence of fungi and mycotoxins on corn grains in Ibb (Yemen). **Pakistan Journal of Life and Social Science**, v. 10, n. 2, p. 111-115, 2012.

OLDENBURG, E.; HÖPPNER, F., ELLNER, F., WEINERT, J. *Fusarium* diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed. **Mycotoxin Research**, v. 33, n. 3, p. 1-16, 2017.

OLIVEIRA, L. G. D.; CAVALCANTI, M. A. D. Q.; PASSAVANTE, J. Z. D. O.; FERNANDES, M. J. D. S. & LIMA, D. M. D. M. Filamentous fungi isolated from Candeias Beach, Pernambuco, Brazil. **Hoehnea**, v. 38, n. 2, 2011.

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

OOTANI, M. A.; AGUIAR, R. W.; RAMOS, A. C.; BRITO, D. R.; SILVA, J. B. D. & CAJAZEIRA, J. P. Use of essential oils in agriculture. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-175, 2013.

ORDÓÑEZ, J. A. Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos. **Porto Alegre: Artmed**, 2005

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2006. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/489376/1/Circ75.pdf>>. Acesso em: 06/05/2019

PAULI, A. α -Bisabolol from Chamomile—A specific ergosterol biosynthesis inhibitor?. **International Journal of Aromatherapy**, v. 16, n. 1, p. 21-25, 2006.

PERBELLINI, L.; GOTTARDO, R.; CAPRINI, A.; BORTOLOTTI, F.; MARIOTTO, S., & TAGLIARO, F. Determination of alpha-bisabolol in human blood by micro-HPLC–ion trap MS and head space-GC–MS methods. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1-2, p. 373-377, 2004.

PEREIRA FILHO, I. A.; BORGHI, E. Mercado de sementes de milho no Brasil: safra 2016/2017. **Embrapa Milho e Sorgo-Documentos (INFOTECA-E)**, 2016.

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, p. 76, 2015.

PETERSEN, P.; SILVEIRA, L.; DIAS, E.; CURADO, F. & SANTOS, A. Sementes ou grãos? Lutas para desconstrução de uma falsa dicotomia. **Revista Agriculturas: experiências em agroecologia**, v. 10, n. 1, p. 36-46, 2013.

PETRIKKOU, E.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; GÓMEZ, A.; MOLLEJA, A.; MELLADO, E. Inoculum standardization for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans. **J Clin Microbiol.** n. 39, v. 4, p. 1345-7, 2001.

PIPPI, B.; LANA, A. J. D.; MORAES, R. C.; GÜEZ, C. M.; MACHADO, M.; OLIVEIRA, L. F. S. & FUENTEFRIA, A. M. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 4, p. 839-850, 2015.

QUINTANILHA, N. P.; COSTA, I. D. S. M., DE SOUZA RAMOS, M. F., DE OLIVEIRA MIGUEL, N. C., & PIERRE, M. B. R. α -Bisabolol improves 5-aminolevulinic acid retention in buccal tissues: Potential application in the photodynamic therapy of oral cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 174, p. 298-305, 2017.

REED, C.; DOYUNGAN, S.; IOERGER, B.; GETCHELL, A. Response of storage molds to different initial moisture contents of maize (corn) stored at 25 C, and effect on respiration rate and nutrient composition. **Journal of Stored Products Research**, v. 43, n. 4, p. 443-458, 2007.

RIBEIRO-SANTOS, R.; ANDRADE, M.; DE 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.

RM MACHADO, G. D.; PIPPI, B.; DALLA LANA, D. F.; AMARAL, A. P. S.; TEIXEIRA, M. L.; SOUZA, K. C. D. & FUENTEFRIA, A. M. Reversal of fluconazole resistance induced by a synergistic effect with *Acca sellowiana* in *Candida glabrata* strains. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 11, p. 2410-2419, 2016.

SAKKAS, H.; GOUSIA, P.; ECONOMOU, V.; SAKKAS, V.; PETSIOS, S. & PAPADOPOULOU, C. In vitro antimicrobial activity of five essential oils on multidrug resistant Gram-negative clinical isolates. *Journal of intercultural ethnopharmacology*, v. 5, n. 3, p. 212, 2016.

SALTMARSH, M.; SALTMARSH, M. Essential guide to food additives. 4. ed. **Royal Society of Chemistry**, 2013.

SANTOS D. Y. A. C.; SANTOS, D. Y. A. C. Botânica aplicada: metabólicos secundários na interação planta-ambiente, Tese de Doutorado. **Universidade de São Paulo**. p. 2, 2015.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER. Óleos voláteis. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. **Porto Alegre: Editora da UFRGS**, 6. ed, 2007.

STANOJEVIC, L. P.; MARJANOVIC-BALABAN, Z. R.; KALABA, V. D.; STANOJEVIC, J. S.; CVETKOVIC, D. J. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Chamomile Flowers Essential Oil (*Matricaria chamomilla* L.). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 19, n. 8, p. 2017-2028, 2016.

SUMMERELL, B. A.; LESLIE, J. F. Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? **Fungal Divers.** v. 50, n. 1, p. 135–144, 2011.

TAWEMA, P.; HN, J.; VU, K. D.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of combined UV-C or gamma radiation with natural antimicrobial formulations against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, and total yeasts/molds in fresh cut cauliflower. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, P. 451–456, 2016.

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.

TYAGI, A. K.; GOTTARDI, D.; MALIK, A. & GUERZONI, M. E. Chemical composition, in vitro anti-yeast activity and fruit juice preservation potential of lemon grass oil. **LWT-Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 731-737, 2014.

VAN ZYL, R. L.; SEATLHOLO, S. T.; VAN VUUREN, S. F. & VILJOEN, A. M. The Biological Activities of 20 Nature Identical Essential Oil Constituents. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, 2006.

VELEZ, B. A. A. Controle associado de isolados do complexo de espécies de *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) e extrato de mastruz visando o controle da Cochonilha do Carmim. 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/24419>>. Acesso em: 23/04/2019.

VENTURINI, G.; ASSANTE, G.; VERCESI, A. *Fusarium verticillioides* contamination patterns in Northern Italian maize during the growing season. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 50, p.110-120, 2011.

VILLEGAS-RASCON, R. E.; LÓPEZ-MENESES, A. K.; PLASCENCIA-JATOMEA, M.; COTA-ARRIOLA, O.; MORENO-IBARRA, G. M.; CASTILLÓN-CAMPAÑA, L. G. & CORTEZ-ROCHA, M. O. Control of mycotoxigenic fungi with microcapsules of essential oils encapsulated in chitosan. *Food Sci. Technol*, **Campinas**, 2017.

WIEDERHOLD, N. P.; PATTERSON, T. F. What's new in antifungals: an update on the in-vitro activity and in-vivo efficacy of new and investigational antifungal agents. **Current opinion in infectious diseases**, v. 28, n. 6, p. 539-545, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food safety and foodborne illness, Revised January. 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.html>>. Acesso em: 23 abril 2013.

YOKOYAMA, Y.; KOKURYO, T.; YAMAGUCHI, J.; E NAGINO, M. Anti-cancerous effects of α -bisabolol on pancreatic cancer: Basic research toward a clinical application. **Pancreatology**, v. 4, n. 16, p. S69, 2016.

