

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

MARA RÚBIA DE OLIVEIRA BEZERRA

**CARVACROL COMO ALTERNATIVA SUSTENTÁVEL
PARA CONSERVAÇÃO DE MILHO FRENTE A FUNGOS
DO GÊNERO *Fusarium***

CUITÉ/PB

2017

MARA RÚBIA DE OLIVEIRA BEZERRA

**CARVACROL COMO ALTERNATIVA SUSTENTÁVEL PARA CONSERVAÇÃO
DE MILHO FRENTE A FUNGOS DO GÊNERO *Fusarium***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Unidade Acadêmica de Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção de título de Bacharel em Nutrição, com linha específica em Micologia Aplicada a Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira.

Cuité/PB

2017

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

B574C Bezerra, Mara Rúbia de Oliveira.

Carvacrol como alternativa sustentável para conservação de milho frente a fungos do gênero Fusarium. / Mara Rúbia de Oliveira Bezerra. – Cuité: CES, 2018.

50 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Nutrição) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2018.

Orientador: Fillipe de Oliveira pereira.

1. Antifúngico. 2. Fusarium. 3. Carnacrol. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 615.281.9

MARA RÚBIA DE OLIVEIRA BEZERRA

**CARVACROL COMO ALTERNATIVA SUSTENTÁVEL PARA CONSERVAÇÃO
DE MILHO FRENTE A FUNGOS DO GÊNERO *Fusarium***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Unidade Acadêmica de Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção de título de Bacharel em Nutrição, com linha específica em Micologia Aplicada a Alimentos.

Aprovado em 14 de agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira
Universidade Federal de Campina Grande
Orientador

Profa. Dra. Igara Oliveira Lima
Universidade Federal de Campina Grande
Examinador

MSc. Viviane Priscila Barros de Medeiros
Universidade Federal da Paraíba
Examinador

Cuité - PB

2017

*Dedico aos meus pais e a todos que
contribuíram direta ou indiretamente para
realização deste trabalho.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pelo dom da vida, por guiar meus passos, me dar forças para seguir, pelas oportunidades e pessoas maravilhosas que encontrei pelo caminho.

Aos meus pais, Meire e Chaga, meu porto seguro. Agradeço por todo amor e confiança. Aos meus irmãos, Larissa, Márcio, Israel e minha amada família que sempre me incentivaram e acreditaram.

Especialmente agradeço a Sabrina minha companheira de casa, graduação e vida, pela amizade, apoio, companheirismo, amor e por sempre acreditar no meu potencial, a caminhada não seria a mesma sem você. A Fran, minha companheira de casa que tanto cuidou e cuida de mim, meus eternos agradecimentos. Ao meu eterno camarote da 25, Sávio, Matheus, Antônio, Aninha, Dany, Emily, Heron, Ellen, Jackson, Jean, Milly, Vitor e Renata, vocês são exemplos de amizade, carinho, amor e compreensão. Obrigada por fazer meus dias mais felizes e leves. Aos amigos que mesmo de longe Carol, Geicy, Marley e Airton, que me apoiaram e torceram por mim. As minhas amigas “as nutrigirls” Sara, Aline, Leila e Alessandra pelas boas risadas e momentos que dividimos durante a graduação. Enfim agradeço a todos pelo carinho e apoio.

Ao meu orientador, professor Dr. Fillipe de Oliveira Pereira, pela dedicação, orientação, incentivo e por acreditar na realização deste trabalho. Seus ensinamentos e amizade ultrapassam os limites profissionais. Obrigada pelo exemplo de caráter, dedicação, responsabilidade e humildade.

Agradeço aos professores do curso de nutrição que desempenharam com dedicação as aulas ministradas e pela contribuição na minha vida acadêmica e profissional. Agradeço aos professores que participaram da banca Prof.^a Dr.^a Igara Oliveira Lima e Msc. Viviane Priscila Barros de Medeiros, por terem aceitado o convite e pelas valiosas contribuições.

Aos meus colegas e amigos do GPFungos. Agradeço pelo apoio na bancada e pelo trabalho em equipe que sempre desenvolvemos.

Ao programa PIBIC pelo apoio financeiro para elaboração deste trabalho que foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

Obrigada a todos que, mesmo não estando citados aqui, tanto contribuíram para a conclusão desta etapa e para a Mara Rúbia que sou hoje.

“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 Carolina

RESUMO

BEZERRA, M. R. O. **Carvacrol como alternativa sustentável para conservação de milho frente a fungos do gênero *Fusarium***. 2017. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2017.

Os fungos estão envolvidos em diversos processos infecciosos em alimentos, causando perdas e problemas de intoxicação aos consumidores. O gênero *Fusarium* apresenta espécies de fitopatógenos importantes e estão entre os principais produtores de micotoxinas. Tendo em vista a importância que estes micro-organismos possuem nos alimentos e na saúde de humanos faz-se necessário estudos que busquem maneiras de controlar o crescimento de tais organismos. Dentre eles, destaca-se o uso de produtos naturais como os terpenos que apresentam potencial atividade antifúngica frente a fungos contaminantes de alimentos a exemplo do carvacrol. O presente estudo investigou a atividade antifúngica do carvacrol frente às cepas fúngicas de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium graminearum*, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição e fungicida mínima (CFM), observando as interferências no crescimento micelial (crescimento micelial radial) e conidiogênese. Além disso, foi analisado o efeito protetor de carvacrol em ensaios de infecção em grãos de milho. O carvacrol conseguiu inibir o crescimento de 100% das cepas testadas nas concentrações que variaram de 32 a 128 µg/mL. As cepas *F. graminearum* 02, 03 e 04 se mostraram mais sensíveis apresentando CIM de 32 µg/mL. A CFM com valor 128 µg/mL foi capaz de causar a morte de 37,5% das cepas avaliadas. O carvacrol nas concentrações de 1/2CIM e CIM inibiu de forma significativa a produção de micélio, conidiogênese e germinação de conídios das cepas *Fusarium oxysporum* 01 e *Fusarium graminearum* 02. Os grãos de milho armazenados em conserva com carvacrol nas concentrações de CIM e CIMx2 não apresentaram infecção aparente. A partir destes resultados, constatou-se que carvacrol possui potencial antifúngico promissor e sugere-se que no futuro possa ser utilizado na conservação de alimentos como uma alternativa sustentável.

Palavras-chaves: *Fusarium*, alimentos, antifúngico, milho e carvacrol.

ABSTRACT

BEZERRA, M. R. O. **Carvacrol as a sustainable alternative for canned corn against fungi of the genus *Fusarium***. 2017. 53 f. Course Completion Work (Graduation in Nutrition) – Federal university of Campina Grande, Cuité, 2017.

The fungi are involved in several infectious processes in food; causing losses and poisoning problems for consumers. The genus *Fusarium* comes up with important Phytopathogens species and these are between the main producers of mycotoxins; therefore, are needed studies that look for ways of the growth control to these organisms. One of them stands out the use of natural products as the terpenes with potential activity antifungal against contaminated fungi of aliments for example the Carvacrol. The present study investigated an antifungal activity of the carvacrol against fungal strains of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium graminearum*, determining the minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution and minimal fungicidal concentration (MFC), looking their interferences on mycelial growth (Radial mycelial growth) and conidiogenesis. Lastly, the protective effect of carvacrol was analyzed in trials of the infection in corn grains. The carvacrol succeeded in inhibiting the growth in 100% of the tested strains concentrations that ranging from 32 to 128 µg/ml. The strains *F. graminearum* 02, 03, and 04 were more sensible with CIM of 32 µg/ml. The CFM with 128 µg/ml was capable to cause the death of 37,5% of the strains analyzed. The carvacrol in the concentrations of 1/2CIM and CIM significantly inhibited the production of mycelium, conidiogenesis and germination of conidia of the strains *Fusarium oxysporum* 01 and *Fusarium graminearum* 02. The corn grains stored in canned carvacrol in the concentrations of CIM and CIMx2 don't presented apparent infection. After these results, is noted that the carvacrol has a promising antifungal potential and is suggested that in the future can be used in canned food as a sustainable alternative.

Key-words: *Fusarium*, food, antifungal, corn and carvacrol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Fusarium oxysporum</i> por microscopia óptica.....	16
Figura 2 – <i>Fusarium graminearum</i> por microscopia óptica.....	16
Figura 3 – Anatomia do grão de milho e suas partes.....	20
Figura 4 – Fórmula molecular do Carvacrol.....	24
Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de carvacrol frente às cepas de <i>Fusarium</i> spp.....	31
Figura 5- Crescimento micelial radial (mm) de <i>Fusarium graminearum</i> 02 (A) e <i>Fusarium oxysporum</i> 01 (B) na presença e na ausência de carvacrol.....	33
Figura 6 - Número de conídios/mL de <i>Fusarium graminearum</i> 02 (A) e <i>Fusarium oxysporum</i> 01 (B) na presença e na ausência de carvacrol.....	35
Figura 7 - Percentual de conídios germinados de <i>Fusarium graminearum</i> 02 (A) e <i>Fusarium oxysporum</i> 01 (B) na presença e na ausência de carvacrol.....	35
Figura 8 – Grãos de milho infectados por <i>Fusarium graminearum</i> 02 por microscopia óptica.....	37
Figura 9 – Grão de milho infectado por <i>Fusarium oxysporum</i> 01 por microscopia óptica.....	37
Figura 10 - Efeitos das concentrações de carvacrol no crescimento de <i>Fusarium graminearum</i> 02 (A) e <i>Fusarium oxysporum</i> 01 (B) em grãos para de milho para consumo animal artificialmente infectados.....	38
Figura 11 - Efeitos das concentrações de carvacrol no crescimento de <i>Fusarium graminearum</i> 02 (A) e <i>Fusarium oxysporum</i> 01 (B) em grãos de milho para consumo humano artificialmente infectados.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS

ASD - Ágar Sabouraud dextrose

CES - Centro de Educação e Saúde

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CONAB – Companhia Nacional de abastecimento

DMSO – Dimetilsulfóxido

KCl – Cloreto de potássio

NaCl – Cloreto de sódio

OMS – Organização Mundial da Saúde

UAS - Unidade Acadêmica de Saúde

UFCG - Universidade Federal de Campina Grande

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 <i>Fusarium spp.</i>	15
3.2 O MILHO NO BRASIL, SUA IMPORTÂNCIA E EVOLUÇÃO.....	19
3.3 CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS.....	21
3.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O CARVACROL.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 LOCAL DE EXECUÇÃO.....	25
4.2 DROGAS.....	25
4.3 CEPAS FUNGICAS.....	25
4.4 MEIOS DE CULTURA.....	25
4.5 INÓCULO.....	26
4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	26
4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM).....	27
4.8 EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL.....	27
4.9 EFEITOS SOBRE A CONIDIOGÊNESE.....	27
4.10 EFEITOS SOBRE A GERMINAÇÃO DOS CONÍDIOS.....	28
4.11 INFECÇÃO EM GRÃOS DE MILHO.....	28
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

Os fungos pertencem ao reino *Fungi*, constituído de organismos unicelulares conhecidos por leveduras e seres pluricelulares chamados de fungos filamentosos. São seres ubíquos e se dispersam na natureza através do ar atmosférico ou por outras vias como água, insetos, homem e animais. Eles são estudados como agentes causadores de doenças em humanos, animais e plantas, bem como quanto ao seu papel nos alimentos como contaminantes, deteriorantes e produtores de substâncias tóxicas (ENGELKIRK; DUBEN-ENGELKIRK, 2012; RIQUELME, 2013).

A contaminação de alimentos por fungos resulta em perdas para o produtor dos alimentos e para o consumidor, pois estes micro-organismos também podem produzir toxinas. Dentre os fungos toxigênicos, encontra-se o gênero *Fusarium* o qual engloba espécies patogênicas de plantas quando as mesmas se encontram tanto no campo quando armazenadas (BRYDEN, 2012).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma doença de origem alimentar é geralmente de natureza infecciosa ou tóxica, provocada por agentes que entram no organismo por meio da ingestão de alimentos ou de água a exemplo dos fungos. Neste caso em especial, os alimentos podem funcionar como veículos para muitos fungos causadores de doenças de origem alimentar (NEWELL et al., 2010).

Os cereais são uma importante fonte nutricional para humanos e animais, inclusive dotados de relevância cultural para o Brasil e Nordeste brasileiro. Grãos de milho e de outros cereais como trigo podem ser colonizados por fungos filamentosos, incluindo espécies do gênero *Fusarium*, o qual podem causar significativas perdas de qualidade dos grãos e redução de seu cultivo. *Fusarium* spp. é constituído de espécies fúngicas a exemplo da espécie *F. oxysporum* e *F. graminearum* que produzem toxinas como fumonisina, zearalenona e deoxivalenol, entre outras (ALMEIDA et al., 2000; DOMENICO et al., 2015).

Considerando a importância da fitossanidade na agricultura e com os problemas ocasionados pelos produtos químicos à saúde e ao ambiente, os óleos essenciais vêm sendo uma alternativa de controle desses agentes fitopatogênicos, pragas agrícolas e plantas infestantes (OOTANI et al., 2013). É dentro desse contexto que muitos estudos de atividade antifúngica *in vitro* têm sido realizados com produtos naturais, a exemplo dos óleos essenciais.

Os óleos essenciais são complexos de compostos voláteis caracterizados pelo odor forte e são formados pelas plantas como metabólitos secundários, encontrados em suas folhas, resinas, frutos, flores, troncos e outras partes. Esses óleos são fitocomplexos que podem ser constituídos por até mais de 60 componentes individuais, entre fenilpropanoides e terpenos (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010). O carvacrol é um monoterpene fenólico amplamente distribuído na natureza com grande potencial antimicrobiano (LIMA et al., 2013; ABBASZADEH et al., 2014).

Neste contexto, este trabalho representa uma possibilidade de obtenção de informações ainda ausentes na literatura científica, no que diz respeito aos efeitos inibitórios de carvacrol frente a cepas de *Fusarium oxysporum* (isoladas de grãos de milho) e *Fusarium graminearum* (isoladas de grãos de trigo). Embora o potencial antifúngico deste monoterpene seja relatado na literatura, não há registros de sua atividade frente a estas espécies, com ênfase em seus aspectos de desenvolvimento e contaminação de cereais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antifúngica do carvacrol frente às cepas de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium graminearum* isoladas de grãos milho e trigo, respectivamente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima e fungicida mínima de carvacrol frente as cepas ensaiadas;
- Avaliar o efeito das drogas-teste sobre a conidiogênese, crescimento micelial e germinação de conídios das cepas ensaiadas;
- Analisar o efeito protetor de carvacrol em ensaios de infecção em grãos de milho.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Fusarium spp.*

Os fungos são organismos que constituem um grupo bem diversificado, formado de leveduras, fungos filamentosos e cogumelos, os últimos conhecidos como macrofungos. Eles são estudados como agentes causadores de doenças em humanos, animais e plantas, bem como quanto ao seu papel nos alimentos como contaminantes, deteriorantes e produtores de substâncias tóxicas (ENGELKIRK; DUBEN-ENGELKIRK, 2012).

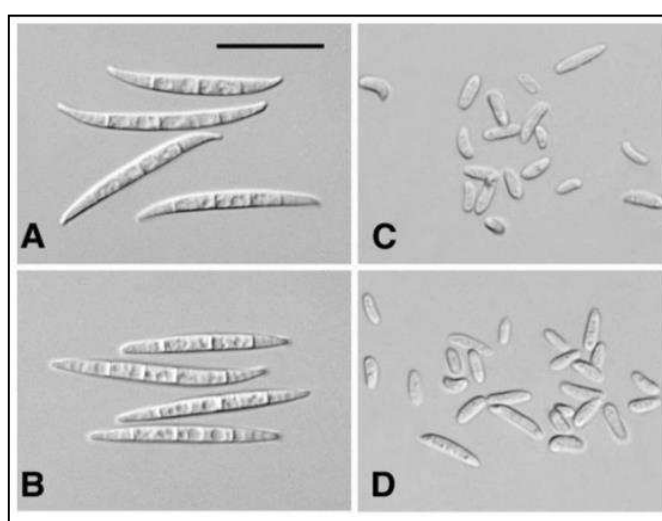
A denominação “fungos contaminantes” é aplicada aos diversos gêneros fúngicos que colonizam o ambiente, cujas estruturas fúngicas podem ser veiculadas através do ar atmosférico ou por outras vias como água, insetos, homem e animais. Logo, seus propágulos (esporos) podem ser encontrados em altas concentrações nos mais variados ambientes. Estes fungos podem causar a deterioração de materiais e alimentos, alergias, intoxicações e infecções (LACAZ et al., 2002).

As doenças ocasionadas pelos fungos contaminantes de alimentos e suas micotoxinas são variadas, causam impacto social, em especial, nas comunidades agrícolas que mantêm contato contínuo com estes alimentos. No geral, essas substâncias causam efeitos tóxicos agudos e/ou crônicos em animais (ESCRIVÁ; FONT; MANYES, 2015). Os alimentos e produtos alimentícios são frequentemente contaminados por infestações fúngicas e suas micotoxinas. Isso ocorre geralmente durante a pós-colheita, transporte e armazenamento o que resulta em perdas na quantidade, qualidade sensorial e no valor nutricional dos alimentos (KEDIA et al., 2014).

O gênero *Fusarium* foi introduzido por Link em 1809 e apresenta-se como um grupo de fungos contaminantes de alimentos com filamentos hialinos, septados e em algumas amostras, as hifas são 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 algodosa e tom branco que pode adquirir diferentes tonalidades, com o decorrer do tempo (SUMMERELL; LESLIE, 2011).

Infecções nas plantações de milho por *Fusarium* spp. podem causar doenças graves, como podridão das sementes, das raízes e podridão da orelha e do núcleo da planta (LOGRIECO et al., 2002; MEISSLE et al., 2010; OLDENBURG, 2005; OLDENBURG et al., 2017). A podridão das raízes do milho pode induzir danos graves à planta levando a senescência prematura. A podridão de Gibberella ou a "podridão da orelha vermelha" é uma das infecções mais comuns causada principalmente por *Fusarium graminearum*, a infecção é reconhecível através da descoloração rosa-avermelhada das partes infectadas (OLDENBURG et al, 2017).

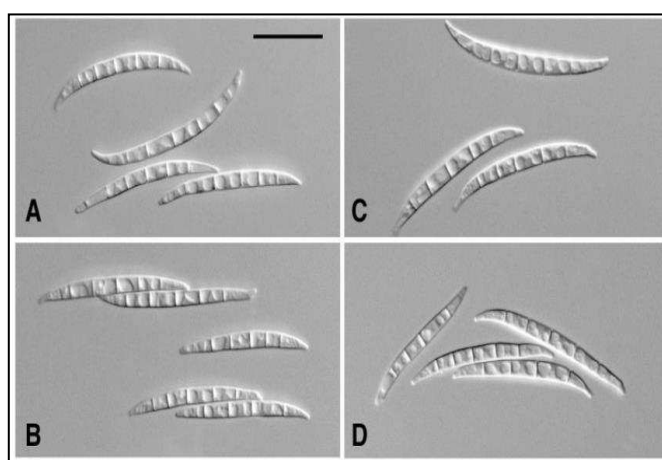
Figura 1 – Imagens de *Fusarium oxysporum* por microscopia óptica.



Fonte: SUMMERELL; LESLIE (2011).

A - B: Macroconídios; C - D: Microconídios. Barras: 25 μ m

Figura 2 – Imagens de *Fusarium graminearum* por microscopia óptica.



Fonte: SUMMERELL; LESLIE (2011).

A - D: Macroconídios. Barras: 25 μ m

O gênero *Fusarium* inclui espécies de patógenos importantes, capazes de produzir micotoxinas que ao acometerem as plantas ainda no campo como também quando seus produtos estão estocados para o consumo humano e animal (BRYDEN, 2012). Atualmente, suas espécies estão entre as produtoras de micotoxinas mais prevalentes em todo o mundo, especialmente quando infectam cereais cultivados na América, Europa e Ásia (ESCRIVÁ; FONT; MANYES, 2015).

A maioria dos membros do gênero *Fusarium* produzem sob condições ambientais favoráveis uma série de metabolitos secundários, que variam amplamente de estrutura química. Alguns dos metabolitos secundários como micotoxinas tóxicas e/ou cancerígenas para seres humanos e animais podem ter um importante papel na doença das plantas. Essas micotoxinas são comumente encontradas em cereais e em produtos de origem animal consumidos diariamente (ESCRIVÁ; FONT; MANYES, 2015).

O conhecimento dos efeitos das micotoxinas está se expandindo rapidamente, principalmente devido ao desenvolvimento de novas técnicas que facilitam o estudo desses compostos. O trato intestinal é a primeira barreira contra antígenos ingeridos, incluindo micotoxinas. Após a ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas, os enterócitos podem estar expostos a altas concentrações de toxinas interferindo assim nas funções intestinais, podendo causar doenças inflamatórias intestinais crônicas (ESCRIVÁ; FONT; MANYES, 2015). No entanto, as consequências da ingestão de baixas concentrações destes componentes podem provocar alterações de ordem metabólica, fisiológica e distúrbios imunológicos (KANORA; MAES, 2009).

As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos que causam problemas tóxicos agudos e crônicos aos animais e homens, além da redução na produção agrícola e animal (BRYDEN, 2012). As mais importantes classes de micotoxinas produzidas por espécies de *Fusarium* são fumonisina, zearalenona e tricotecenos. Além destas, também produzem toxinas emergentes como: fusaproliferina, beauvericina, eniáticas e moniliforminas (HOVE et al., 2016; SUMMERELL; LESLIE, 2011).

Os tricotecenos são facilmente absorvidos através dos sistemas tegumentares e gastrointestinais, permitindo um rápido efeito em tecidos que se proliferam

rapidamente. Os tricotecenos são tóxicos para animais e sua exposição tem sido associada a distúrbios reprodutivos em animais. Por causa de seus efeitos sobre o sistema imunológico, a exposição à tricotecenos poderia predispor humanos e animais para doenças infecciosas, especialmente na população mais sensível como crianças, pessoas imunodeprimidas e idosos.

Vários estudos *in vivo* relatam 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 (ESCRIVÁ et al., 2015; KORAICHI et al., 2012).

Entre as principais fontes de contaminação por *Fusarium* spp. encontram-se o milho e trigo. Diversos relatos apontam para sua alta incidências em grãos de milho, incluindo culturas realizadas em território brasileiro principalmente em São Paulo, Paraná e Mato Grosso que são os maiores produtores de milho do país (DOMENICO et al., 2015; OLDENBURG; ELLNER, 2015;). O gênero *Fusarium* é um patógeno vegetal capaz de produzir micotoxinas em condições de campo e de armazenamento (BRYDEN, 2012).

Fusarium oxysporum é a espécie mais amplamente distribuída do gênero, onde é comumente encontrada como agente contaminante de milho. Ele pode causar o tombamento da planta por infecção e podridão de suas raízes pois é muito comum em solos contaminados. Além disso, os estoques de grãos de milho podem ser afetados, interferindo no desenvolvimento normal da planta ao ser cultivada. Uma indicação de que *F. oxysporum* está envolvido é a presença de esporulação sob a forma de coloração laranja a cor amarela sobre os caules de plantas infectadas (GORDON; SWETT; WINGFIELD, 2015).

Fusarium graminearum é uma espécie cosmopolita, encontrada principalmente em alguns tipos de cereais, como cevada, arroz, trigo e milho. Os isolados de *F. graminearum* produzem três importantes micotoxinas denominadas zearalenona, a qual tem sido relatada em diversos alimentos em regiões da China, África e América do Sul, nivalenol e deoxynivalenol. Outras toxinas são importantes como aurofusarina, culmorinas, fusarina C, fusarocromanona e esteroides. Estas toxinas podem causar distúrbios no trato gastrintestinal, alterações

nos níveis hormonais bem como diminuição da fertilidade (ATOUI et al., 2012; GORDON et al., 2015; SUMMERELL; LESLIE, 2011).

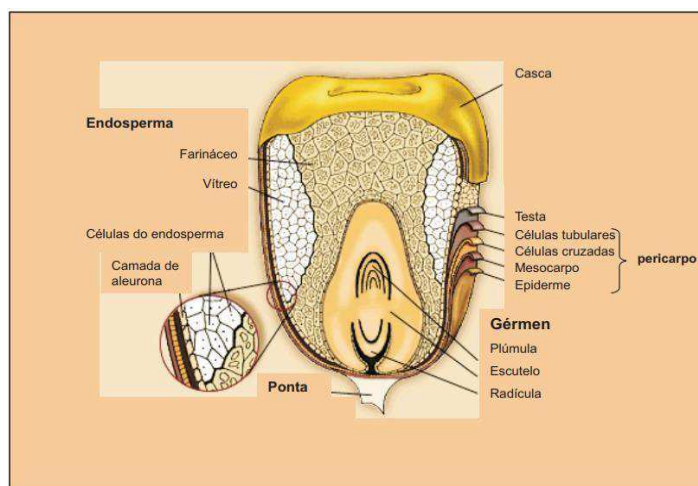
3.2 O MILHO NO BRASIL, SUA IMPORTÂNCIA E EVOLUÇÃO

O milho é produzido mundialmente e apresenta grande importância econômica em diversos países, uma vez que o mesmo pode ser utilizado sob diversas formas. Seu consumo é destinado tanto para o consumo humano, podendo ser transformado em óleo, farinha, amido, margarina, xarope de glicose, cereais matinais, corantes, gelatinosos, adesivos, alimentos proteicos como para a alimentação de animais, sendo esse seu principal destino na fabricação de ração animal, silagem ou consumo direto (PAES, 2006).

O milho 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. No Nordeste, o milho tem papel fundamental na alimentação, sendo consumido desde o litoral ao sertão, sob uma variedade de comidas da região (CAMPOS et al., 2008).

Os grãos do milho são, geralmente, amarelos ou brancos, podendo apresentar colorações variando desde o preto até o vermelho. O peso individual do grão varia, em média, de 250 a 300 mg e sua composição média em base seca é 72% de amido, 9,5% proteínas, 9% fibra (a maioria resíduo detergente neutro) e 4% de óleo. Conhecido botanicamente como uma 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 dentro do grão (DE MELO et al, 2010).

Figura 3 – Anatomia do grão de milho e suas partes.



Fonte: PAES (2006).

O endosperma representa aproximadamente 83% do peso seco do grão, consistindo principalmente de amido (88%), organizado na forma de grânulos. No endosperma estão também presentes as proteínas de reserva (8%) do tipo prolaminas, chamadas zeínas (PAES, 2006).

O germen representa 11% do grão de milho e concentra quase a totalidade dos lipídeos (óleo e vitamina E) (83%) e dos minerais (78%) do grão, além de conter quantidades importantes de proteínas (26%) e açúcares (70%). Essa fração é a única viva do grão e onde estão presentes as proteínas do tipo albuminas, globulinas e glutelinas, que diferem significativamente, em composição e organização molecular, daquelas encontradas no endosperma e, por conseguinte, diferindo das primeiras em qualidade nutricional e propriedades tecnológicas (BERGAMIN et al, 2011).

O pericarpo representa, em média, 5% do grão, sendo a estrutura que protege as outras estruturas do grão da elevada umidade do ambiente, insetos e microrganismos. As camadas de células que compõem essa fração são constituídas de polissacarídeos do tipo hemicelulose (67%) e celulose (23%), embora também contenha lignina (0.1%) (PAES, 2006).

O Brasil é um importante produtor de milho. Na primeira safra de 2017, foram produzidos acima de 30,0 milhões de toneladas, as exportações em maio fecharam em trezentas e dez toneladas, um valor muito baixo, porém, quando comparado ao mesmo período, em anos anteriores, tem-se um recorde para o mês.

Para a segunda safra de milho a estimativa é de aumento na área semeada. A destinação de área para o cultivo deve ultrapassar os 11,5 milhões de hectares, aumento de 9,0% (CONAB, 2017).

Considerando a importância nutricional, cultural e econômica do milho, os consumidores, os produtores de alimentos e produtos alimentares derivados deste cereal, exigem a aplicação de conservantes que sejam mais seguros para os seres humanos. Com isso, vários produtos vegetais têm sido reconhecidos e utilizados para inativação microbiana nas indústrias de alimentos, devido suas propriedades antimicrobianas e sua origem natural, e aparentemente sustentável, ou seja, que não agrida o meio ambiente ou prejudique a saúde dos consumidores, garantindo que as futuras gerações tenham os recursos necessários para suprir suas necessidades (COELHO et al., 2015; TIAN et al., 2011;).

3.3 CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

A segurança e qualidade microbiana dos alimentos podem ser estabelecidas por métodos que garantam a inativação ou inibição da proliferação de micro-organismos como fungos. Atualmente, este controle pode ser realizado por métodos físicos como congelamento, aquecimento, liofilização, secagem, irradiação entre outros; ou adição de produtos com ação antimicrobiana que podem causar danos à célula microbiana, interferir com seu processo de desenvolvimento, adaptação ou multiplicação, sem ocasionar prejuízo das características funcionais, nutricionais e sensoriais (ESPINA et al., 2014; TAWEMA et al., 2016).

A irradiação de alimentos é um tratamento físico onde os alimentos são expostos à ação direta das radiações ionizantes para ampliar sua vida prateleira e garantir sua segurança. A Irradiação inativa os micro-organismos, danificando seu DNA o que impede sua proliferação. A luz ultravioleta (UV) e a irradiação gama são os principais métodos utilizados na indústria alimentar, embora o termo "irradiação" refere-se mais frequentemente à radiação gama (LACROIX, 2007).

A ação do calor é bastante utilizada em virtude de sua ação letal frente aos micro-organismos, o que resulta no aumento da vida de prateleira dos alimentos. Existem dois tipos de tratamento térmico: uma denominada pasteurização, que pretende reduzir a carga microbiana, e a outra, esterilização, cujo objetivo é a destruição dos micro-organismos presentes ou não (ORDÓNEZ et al., 2005).

O emprego de baixas temperaturas é um dos métodos mais antigos para conservação de alimentos e baseia-se na inibição total ou parcial dos principais agentes responsáveis pela alteração dos alimentos. A aplicação do frio, tanto da refrigeração como no 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).

Outro método de conservação é através da adição de alguns produtos nos alimentos, que podem ser de origem natural ou artificial. A definição das Autoridades Europeias de Segurança Alimentar (EFSA) para o aditivo alimentar é "qualquer substância normalmente não consumido como alimento e não usado como ingrediente característico de um alimento, seja ou não, com a adição intencional para aumentar o valor nutritivo, com propósito tecnológico na fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, transporte ou armazenamento de tais alimentos, ou pode razoavelmente esperar que resulte, nele ou seus subprodutos tornando-se, direta ou indiretamente, um componente desses alimentos" (EFSA, 2008; SALTMARSH et al., 2013).

Os aditivos alimentares podem ser divididos em cinco grupos de moléculas: conservantes, aditivos nutricionais, agentes corantes, agentes aromatizantes, agentes texturizadores. Além disso, os conservantes são subdivididos em antimicrobianos, antioxidantes e agentes anticorrosivos. Quanto aos antimicrobianos utilizados nos alimentos, os mais difundidos são benzoatos, sorbatos, propionatos, nitritos e nitratos, que vem causando inúmeros prejuízos à saúde do consumidor, que quando consumidos em longo prazo podem ser cancerígenos (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015).

Existem antimicrobianos naturais de três fontes, derivados de micro-organismos, de animais e de plantas. Antimicrobianos derivados de plantas são geralmente compostos pertencentes ao seu metabolismo secundário, que conferem proteção de predadores, código para sinalizar moléculas e ajudar a planta resistir ao estresse. Exemplos de compostos deste metabolismo são terpenos, esteróides, alcalóides e polifenóis. Outro grupo muito importante de moléculas com atividade antimicrobiana são os óleos essenciais. Destes, óleo de orégano e seus componentes timol e carvacrol são uns dos mais importantes. Existe um grande número de

gêneros alimentícios onde foram aplicados óleos essenciais como em carne, peixe, produtos lácteos, vegetais, arroz e frutas (BAINES; SEAL, 2010).

São necessárias abordagens inovadoras e naturais para melhorar a alimentação do ponto de vista microbiológico. Considerando a importância da fitossanidade na agricultura e com os problemas ocasionados pelos produtos químicos à saúde e ao ambiente, os óleos essenciais e seus componentes vêm sendo uma alternativa de controle de agentes fitopatogênicos, pragas agrícolas e plantas infestantes (OOTANI et al., 2013).

3.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O CARVACROL

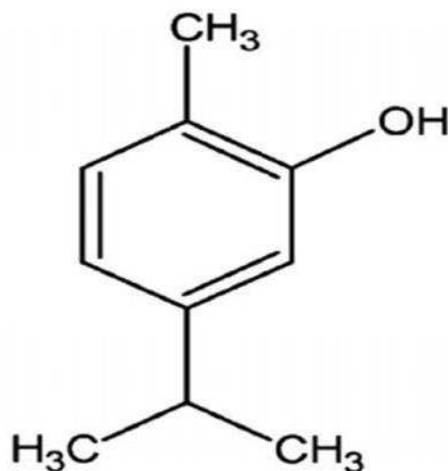
Considerando que a contaminação de cereais como o milho são hoje um grande problema para os produtores, a busca de novos produtos que auxiliem de alguma forma a inibir este processo se torna urgente. E, neste contexto, os produtos naturais são importantes instrumentos no desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas ou de aplicabilidade na ciência dos alimentos, onde as plantas se colocam como fontes importantes de moléculas biologicamente ativas que podem ser utilizadas obtenção de novas drogas. Especialmente na ciência dos alimentos, a busca de novas ferramentas para assegurar a produção de alimentos isentos de perigos microbiológicos é de interesse relevante. Na área de agentes antimicrobianos, é notável o número de drogas derivadas de produtos naturais para uso clínico ou como agente saneante de ambientes, eugenol, citral, citronelal são alguns exemplos (BRAZ FILHO, 2010; NEWMAN; CRAGG, 2012;).

Dentre os produtos provenientes das plantas com destacável aplicabilidade antifúngica, destacam-se os óleos essenciais e seus componentes. Os óleos essenciais são complexos de compostos voláteis caracterizados pelo odor forte e são formados pelas plantas como metabólitos secundários, encontrados em suas folhas, resinas, frutos, flores, troncos e outras partes. Esses óleos são fitocomplexos que podem ser constituídos por até mais de 60 componentes individuais, entre fenilpropanoídeos e terpenos (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010).

Os terpenos são compostos hidrogenados de cadeias carbônicas cíclicas ou alifáticas, largamente distribuídos na natureza. Os terpenos são classificados de acordo com suas unidades de átomos de carbono em hemiterpenos (C₅),

monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) (HYLDGAARD et al. 2012).

Figura 4 – Fórmula molecular do Carvacrol



Fonte: TONGNUANCHAN; BENJAKUL (2014)

O carvacrol é um monoterpeneo fenólico que possui atividade antimicrobiana reconhecida contra fungos de importância para os alimentos como *Fusarium verticillioides*, *Penicillium expansum*, *Rhizopus oryzae*, *Alternaria alternaria*, *Cladosporium spp* e *Aspergillus spp*. (ABBASZADEH et al., 2014; BASSOLÉ et al., 2010; LIMA et al., 2013; MOTA et al., 2012). O crescimento de *Aspergillus niger* foi completamente inibido por carvacrol na concentração de 0,025% (BOUDDINE et al., 2014). O carvacrol é o principal componente do óleo essencial de *Origanum vulgare L.* (GOVINDARAJAN et al., 2016; STANOJEVIC et al., 2016).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE EXECUÇÃO

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia, ambos da Unidade Acadêmica de Saúde (UAS) do Centro de Educação e Saúde (CES), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

4.2 DROGAS

Carvacrol foi adquirido da Sigma-Aldrich® (Brasil). As emulsões 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 a concentração de 1 µg/mL utilizando o próprio meio de cultura RPMI 1640.

4.3 CEPAS FÚNGICAS

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram utilizadas quatro cepas de *F. oxysporum* (01, 02, 03 e 04) isoladas de grãos de *Zea mays* (milho) e quatro de *F. graminearum* (01, 02, 03 e 04) isoladas de grãos de *Triticum aestivum* L. (trigo), gentilmente 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.

4.4 MEIOS DE CULTURA

Foram utilizados os meios sólidos ágar Sabouraud dextrose (ASD) e ágar batata dextrose (ABD), os quais foram solubilizados com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121 °C por 15 minutos, conforme normas do fabricante (Difco®). O meio líquido RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato

também foi utilizado e preparado de acordo o documento M38-A do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2002).

4.5 INÓCULO

As cepas fúngicas foram cultivadas em ABD a 28°C por 7 dias. As recentes colônias fúngicas foram cobertas com solução salina estéril (NaCl 0,9 %), e as suspensões feitas por suaves agitações com auxílio de uma alça descartável. 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) (CLSI, 2002; PETRIKKOU et al., 2001).

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A determinação da CIM do carvacrol foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo chato, conforme adaptação do documento M38-A do CLSI (2002). Em cada linha da placa, foram adicionados 100 µL de carvacrol duplamente concentradas e diluídas em RPMI 1640. Em cada cavidade da placa, foram adicionados 100 µL 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 (0,5%) na concentração usada para a solubilização das drogas acrescido do inóculo e do meio de cultura. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por 7 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). A CIM é definida como a menor concentração de carvacrol capaz

de inibir 100% o crescimento fúngico observado nas cavidades. O experimento foi realizado em triplicata.

4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Uma alíquota de 10 μ L de cada cavidade onde não houve crescimento fúngico foi semeada em uma placa com ASD, a qual foi incubada a 28°C por 7 dias. A CFM foi considerada a menor concentração semeada em ASD em que houve crescimento menor que 3 unidades formadoras de colônias. O experimento foi realizado em triplicata e os valores de CIM foram expressos como média geométrica (ABBASZADEH et al., 2014).

4.8 EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL

A análise da interferência de carvacrol 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 ASD acrescido de carvacrol em diversas concentrações (1/2 CIM e 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. O experimento foi realizado em triplicata (KHAN; AHMAD, 2011).

4.9 EFEITOS SOBRE A CONIDIOGÊNESE

Os efeitos do carvacrol sobre a produção de conídios pelas cepas fúngicas foram analisados após cultivo das cepas em ASD na ausência e presença de diferentes concentrações das drogas-teste, conforme Tzortzakis e Economakis (2007). Em placas de Petri (90 x 15mm) descartáveis e esterilizadas, foram vertidos 10 mL de ASD fundido e ajustado na temperatura de 35°C em banho-maria. Em seguida, foi adicionada a droga com o objetivo de alcançar diferentes concentrações (1/2 CIM e CIM). Um experimento controle sem adição das drogas ao ASD fundido

também foi realizado. Os fungos foram cultivados na superfície do meio e as placas incubadas a 28°C por até 7 dias. Após período de incubação, os conídios foram coletados adicionando 5 mL de solução salina estéril sobre a superfície das colônias fúngicas, e após suaves agitações com auxílio de uma pipeta de transferência. A suspensão foi então coletada, e analisada em um hemocítômetro para contagem do número de conídios em cada grupo testado. Os ensaios foram feitos em triplicata.

4.10 EFEITOS SOBRE A GERMINAÇÃO DOS CONÍDIOS

Em tubos de ensaio estéreis, 500 µL de RPMI 1640 acrescido de carvacrol em diversas concentrações (1/2 CIM e CIM), foram homogeneamente misturadas com 500 µL da suspensão dos conídios fúngicos e imediatamente incubados a temperatura de 28°C. Amostras dessa mistura foram tomadas após 24 h para análise. O número de conídios germinados e não germinados foi determinado em cada grupo experimental, utilizando um hemocítômetro. O percentual de conídios germinados foi calculado para cada grupo experimental. Um controle com ausência de drogas foi utilizado. Todo o experimento foi feito em triplicata (PEREIRA et al., 2015).

4.11 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. Os grãos de milho foram secos a 40°C por 48 horas, uma condição recomendada durante os períodos de estoque das sementes antes do consumo. Só foram utilizadas os grãos que não apresentaram doença aparente. Os grãos 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 para garantir a esterilidade dos mesmos (DAMBOLENA et al., 2010).

Para avaliar os efeitos inibitórios de carvacrol sobre a infecção *in vivo*, as sementes autoclavadas foram imersas (200 µL) no inóculo fúngico (10^6 UFC/mL)

por 1 minuto, em um béquer estéril. Após isso, foram divididas em tubos de ensaio, obedecendo aos seguintes grupos: teste (CIMx2 e CIM) e controle, contendo 10 sementes cada. Nos grupos teste, foi adicionadas diferentes concentrações de carvacrol. E nos grupos controle, foi adicionada solução salina estéril. Após isso, todos os tubos foram selados e incubados a 28°C por 7 dias para determinar a incidência de grãos de milho infectadas (crescimento do micélio fúngico sobre os grãos) e não-infectadas (ausência de crescimento micelial fúngico sobre os grãos) em todos os grupos. Para identificar a incidência de infecção de sementes sem sinais de infecção aparente após o tratamento, as sementes foram transferidas para placas de Petri com agar batata dextrose com cloranfenicol (10 sementes por placas) e incubadas a 28°C por 3, 6 e 9 dias, para promover o crescimento do fungo. Após incubação, uma colônia fúngica foi analisada morfológicamente para identificar a presença do fungo em questão (MENNITI et al., 2010). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os efeitos do vapor das drogas-teste sobre a infecção artificial de sementes de milho também foram avaliados. Após idêntico processo de indução da infecção, cerca de 10 sementes foram colocadas em placas de Petri descartáveis contendo um papel de filtro (90 mm) embebido de diversas concentrações (CIM e 2xCIM) de carvacrol no interior da tampa da placa. As placas foram rapidamente seladas e incubadas a 28°C por 24 horas. Após isso, o papel foi removido e a placa foi novamente selada e incubada por 7 dias para realização da leitura das sementes infectadas. Para identificar a incidência de infecção de sementes sem sinais de infecção aparente, as sementes foram transferidas para placas de Petri com agar bata dextrose com cloranfenicol (10 sementes por placas) e incubadas a 28°C por 3, 6 e 9 dias, para promover o crescimento do fungo. Após incubação, uma colônia fúngica foi analisada morfológicamente para identificar a presença do fungo em questão (MENNITI et al., 2010).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de CIM foram expressos pela média geométrica dos resultados. Os resultados de crescimento micelial, germinação de conídios e conidiogênese foram expressos em média \pm desvio padrão. A avaliação estatística destes resultados foi

feita para determinar diferenças significantes, quando um valor de $p < 0,05$ aplicando-se teste t não pareado. Para os resultados da infecção no milho foi utilizado o teste de Fischer.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, a CIM do carvacrol foi determinada pelo método de microdiluição. Os seus respectivos valores são apresentados na tabela 1. O carvacrol conseguiu inibir o crescimento das cepas testadas nas concentrações que variaram de 32 a 128 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de carvacrol frente às cepas de *Fusarium* spp.

Cepas	CIM ($\mu\text{g/mL}$)*	CFM ($\mu\text{g/mL}$)*
<i>F.oxysporum</i> 01	64	64
<i>F.oxysporum</i> 02	64	64
<i>F.oxysporum</i> 03	128	128
<i>F.oxysporum</i> 04	64	128
<i>F.graminearum</i> 01	128	128
<i>F.graminearum</i> 02	32	256
<i>F.graminearum</i> 03	32	32
<i>F.graminearum</i> 04	32	256

*Média geométrica de três experimentos.

As cepas *F.graminearum* 02, 03 e 04 se mostraram mais sensível ao monoterpeno, uma vez que teve seu crescimento inibido quando exposta 32 $\mu\text{g/mL}$ de carvacrol, enquanto todas as outras cepas apresentaram inibição de crescimento quando expostas a concentrações maiores de carvacrol. O crescimento no grupo controle (ausência de droga) foi visualizado, confirmando a viabilidade do inóculo fúngico. DMSO não inibiu o crescimento fúngico, nas concentrações testadas, confirmando que o impedimento do crescimento foi devido à presença de carvacrol. Desse modo, fica evidente o poder antifúngico do carvacrol frente às cepas testadas.

Os métodos de diluição em caldo são os ensaios mais utilizados para determinar a atividade antifúngica. O documento padronizado para fungos filamentosos (M38-A2, 2008) de CLSI, descreve a susceptibilidade do teste de microdiluição para drogas antifúngicas. Esses métodos fornecem dados quantitativos sobre a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

O ensaio de microdiluição é recomendado para a triagem de compostos devido ao alto potencial de produção, considerável redução no uso de tecnologias e exigência de uma pequena quantidade de amostra. Além disso, esse método poderia ser aplicado para diferentes microorganismos (DJOUOSSI et al., 2015; GEHRKE et al., 2013;

JOHANN et al., 2010; MELO et al., 2013; NJATENG et al., 2015; POZZATTI et al., 2008; SCORZONI et al., 2016).

Embora o potencial antifúngico deste monoterpene seja relatado na literatura, não há registros de sua atividade frente a estas espécies (Tabela 1), com ênfase em seus aspectos de desenvolvimento e contaminação de cereais. Fatores relevantes como estes, impulsionam para a realização desta pesquisa.

A CFM do carvacrol foi determinada por semeadura em placa. Nesse teste, foi observado que a concentração de 128 µg/mL foi capaz de causar a morte de 37,5% das cepas avaliadas (Tabela 1). A cepa *F.graminearum* 03 mostrou-se mais sensível, com a morte causada com 32 µg/mL de carvacrol, já as cepas mais resistentes foram a *F.graminearum* 02 e *F.graminearum* 04, onde foram necessário 256 µg/mL de carvacrol para ocasionar a sua morte (Tabela 1).

O uso contínuo de herbicidas tem sido um problema, por causar contaminação do lençol freático e o acúmulo de metais pesados nos alimentos (VYVYAN, 2002). Os óleos essenciais são produtos naturais de plantas que degradam-se rapidamente no ambiente, e são geralmente considerados como sustentáveis. Os óleos e seus componentes como os terpenos podem ser aplicados antes do plantio ou em pulverizações dirigidas entre cultivo de plantas, ou mesmo como um tratamento pós-emergência para o tratamento de algumas espécies vegetais (TWORKOSKI, 2002).

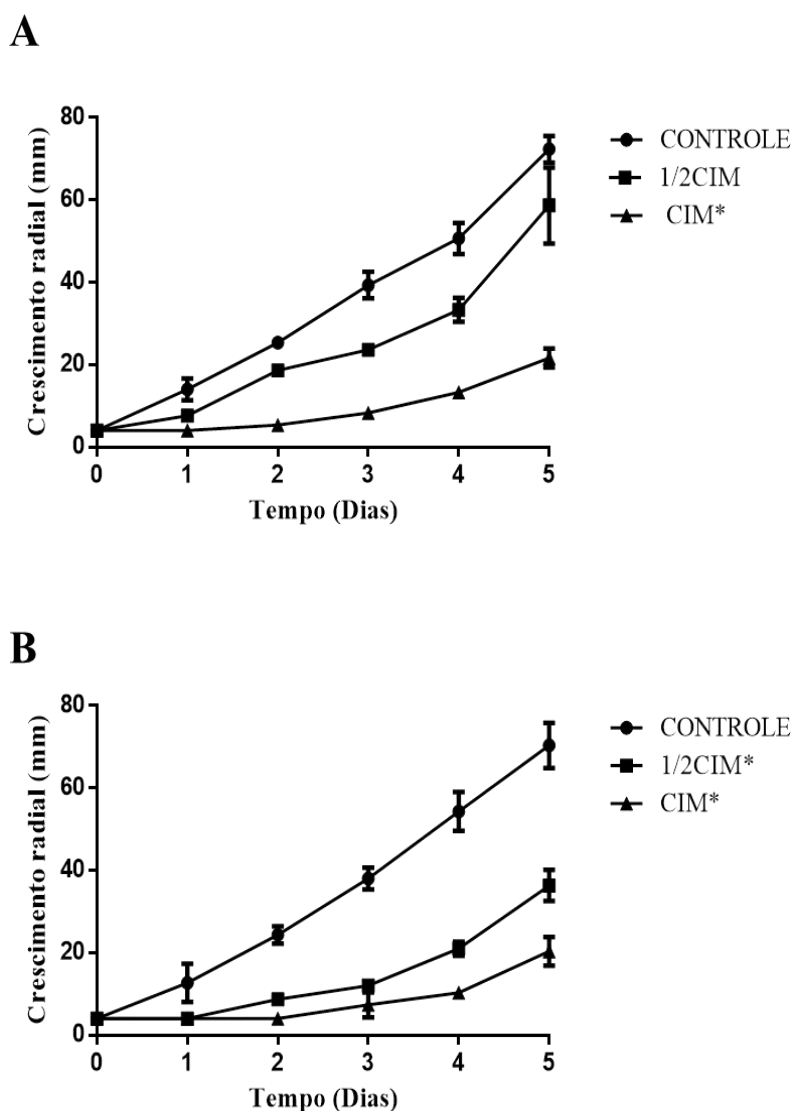
Os agentes antimicrobianos naturais são preferidos para serem usados na preservação de alimentos contra patógenos transmitidos por alimentos, uma vez que são mais aceitáveis para o consumo humano (PISKERNIK et al., 2011; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010; TIWARI et al., 2009).

Foram investigados os efeitos do carvacrol sobre o crescimento micelial, conidiogênese e germinação de conídios sobre o gênero *Fusarium* spp. Através da escolha de duas cepas *F.oxysporum* 01 e *F.graminearum* 02. Onde a cepa *F.oxysporum* 01 apresentou valores da CIM e CFM de 64 µg/mL, e a cepa *F.graminearum* 02 de 32 e 256 µg/mL, respectivamente.

O efeito de 1/2CIM e CIM do carvacrol sobre o crescimento micelial foi determinada através do crescimento radial do micélio (Figura 5). A Figura 5A mostra que apenas a concentração de CIM inibiu de forma significativa o crescimento micelial *F.graminearum* 02 ($p < 0.05$) em comparação com o controle e

com 1/2CIM. Em relação *F. oxysporum* 01, os efeitos foram semelhantes, porém com inibição de forma significativa nas concentrações de CIM e 1/2CIM do carvacrol (Figura 5B) no quinto dia de análise. Com esses resultados, é perceptível a inibição da produção de micélio pelas cepas testadas, na presença do carvacrol.

Figura 5- Crescimento micelial radial (mm) de *Fusarium graminearum* 02 (A) e *Fusarium oxysporum* 01 (B) na presença e na ausência de carvacrol.



* $p < 0,05$ quando comparado ao controle (teste t não pareado), no último dia de análise.

O micélio é caracterizado como um conjunto de células que formam hifas septadas – filamento fúngico ou um segmento do micélio filamentosos – encontrados

no interior ou na superfície do meio de crescimento, quando cultivados em laboratório. O crescimento fúngico envolve transporte e assimilação de nutrientes, seguido pela sua integração pelos componentes intracelulares que posteriormente desencadeiam divisão celular e o conseqüente o aumento da biomassa fúngica (LACAZ et al., 1998; WALKER; WHITE, 2005).

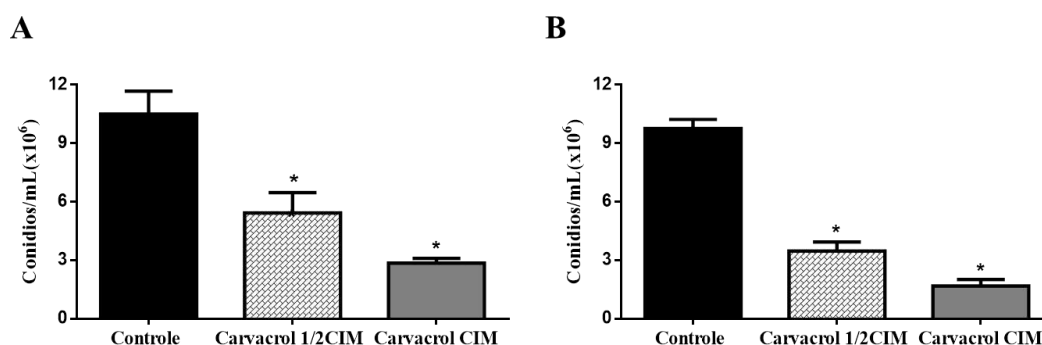
Considerando isto, estes resultados apresentados pelo carvacrol são de suma importância para evitar a contaminação de alimentos, pois esse processo causa a deterioração e perda dos alimentos, uma vez que, um alimento com alterações na aparência não será consumido. Portanto, a diminuição do crescimento radial do micélio na presença de carvacrol sugere que as etapas necessárias para a formação do micélio estejam sendo interferidas pela presença da droga, uma vez que é necessário que haja a formação dos conídios, e que eles germinem para que, em seguida o micélio seja formado (LIU et al., 2007). Com base nisso o presente estudo analisou também seus efeitos na conidiogênese e na germinação de conídios.

Os conídios são estruturas responsáveis pela reprodução assexuada dos fungos filamentosos e por sua disseminação espacial como é no caso do *Fusarium* spp (SIDRIM; ROCHA, 2010).

A conidiogênese representa a formação assexuada do conídio, que possibilita a reprodução de células fúngicas (KERN; BLEVINS, 1999). A inibição dessas etapas dificultarão o crescimento e disseminação fúngica, impossibilitando a contaminação e, conseqüentemente a deterioração dos alimentos pelo fungo.

Os possíveis efeitos do carvacrol sobre a produção de conídios frente as cepas *F. graminearum* 02 e *F. oxysporum* 01 estão expressos na Figura 6. Nas concentrações de 1/2CIM e CIM o carvacrol inibiu significativamente a produção de conídios ($p < 0.05$) para as duas cepas. Além dessa, outra etapa se faz necessária, a germinação dos conídios, processo que possibilita que o fungo produza novas células concluindo assim seu processo reprodutivo.

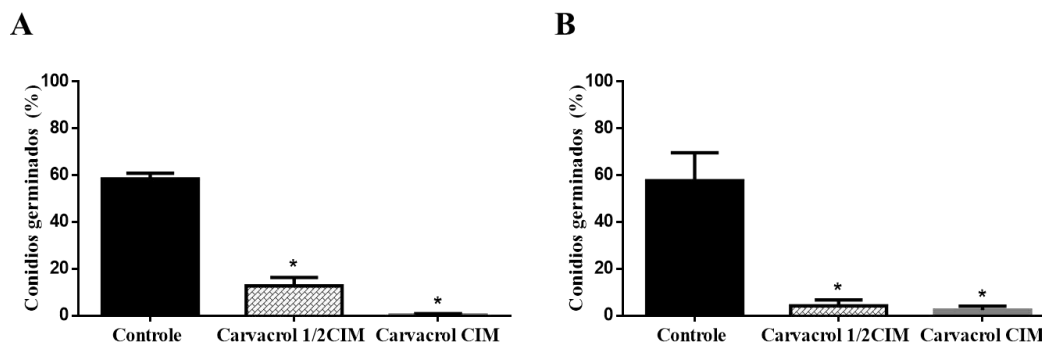
Figura 6 - Número de conídios/mL de *Fusarium graminearum* 02 (A) e *Fusarium oxysporum* 01 (B) na presença e na ausência de carvacrol.



* $p < 0,05$ quando comparado ao controle (teste t não pareado), no último dia de análise.

A porcentagem de conídios germinados de *F. graminearum* 02 e *F. oxysporum* 01 podem ser observados na Figura 7. O carvacrol inibiu significativamente ($p < 0,05$) a germinação de conídios em todas as concentrações (1/2CIM e CIM) nas cepas testadas.

Figura 7 - Percentual de conídios germinados de *Fusarium graminearum* 02 (A) e *Fusarium oxysporum* 01 (B) na presença e na ausência de carvacrol.



* $p < 0,05$ quando comparado ao controle (teste t não pareado), no último dia de análise.

O mecanismo da atividade antifúngica que o carvacrol atuou não é bem compreendido, embora ruptura da membrana e parede celular com deformação morfológica, colapso e deterioração dos conídios e/ou hifas têm sido propostos (ABBASZADEH et al., 2014).

Em um estudo realizado com células planctônicas, foi identificado que por causa de sua natureza hidrofóbica, o carvacrol interage com a bicamada lipídica das membranas citoplasmáticas, interferindo na permeabilidade da membrana, levando à perda de integridade celular e vazamento de material celular (LUZ et al., 2012; ESPINA et al, 2017). Diante do que foi observado com os resultados obtidos nos testes realizados, acredita-se que o carvacrol atuou de forma parecida, rompendo a integridade da membrana celular corroborando assim com o estudo de Espina (2017).

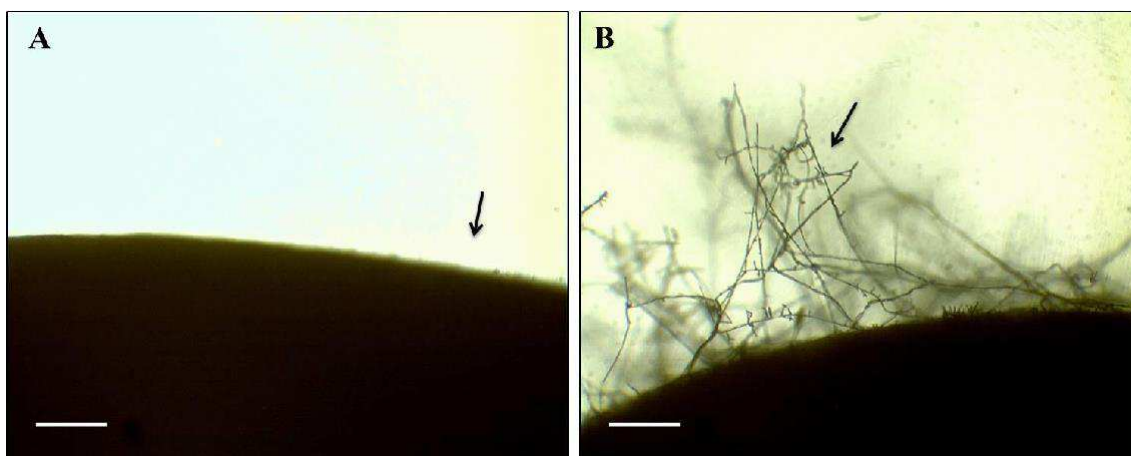
Lima et al. (2013) propôs que o modo de ação de carvacrol contra fungos do gênero *Candida* envolve a interação com ergosterol, sendo capaz de atuar alterando a estrutura da membrana celular fúngica. Outro estudo mostrou que o carvacrol apresenta atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans*, podendo atuar ligando-se ao ergosterol exógeno (NÓBREGA et al., 2016).

O carvacrol apresentou atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* promissora contra leveduras deteriorantes do vinho, causando dano e vazamento do conteúdo citoplasmático da membrana (CHAVAN; TUPE 2014).

Após três dias da realização do teste com o vapor do carvacrol verificou-se que todos os grãos de milho apresentaram infecção aparente, indicando assim que o sistema de vapor de carvacrol nas concentrações de CIM e 2xCIM não foram eficazes para o controle do crescimento das cepas analisadas.

Na figura 8 e 9 mostra o crescimento do fúngico no milho (grão). Quando não houve crescimento aparente (milhos sadios), não foram observados presença do fungo no microscópio. Devido a esse fato, os grãos que não apresentaram infecção aparente foram cultivados para verificar sua viabilidade.

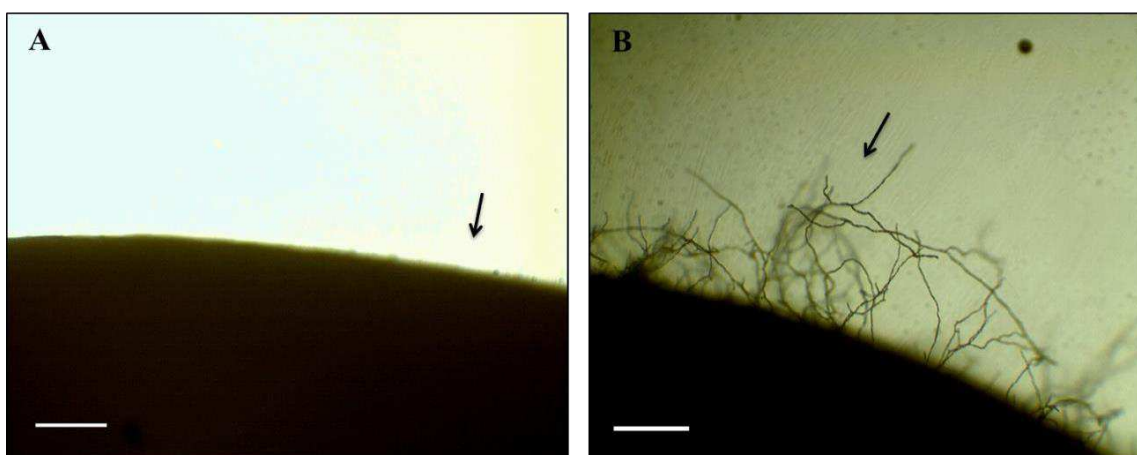
Figura 8 – Imagens de grãos de milho infectados por *Fusarium graminearum* 02 por microscopia óptica.



Fonte: própria.

A: grão de milho sem adição de inóculo, a região negra (seta) é o grão. **B:** micélio de *F. graminearum* 02 sobre o grão de milho (seta). Barras: 200 μm (40x).

Figura 9 – Imagem de grão de milho infectado por *Fusarium oxysporum* 01 por microscopia óptica.



Fonte: própria.

A: grão de milho sem adição de inóculo, a região negra (seta) é o grão. **B:** micélio de *F. oxysporum* 01 sobre o grão de milho (seta). Barras: 200 μm (40x).

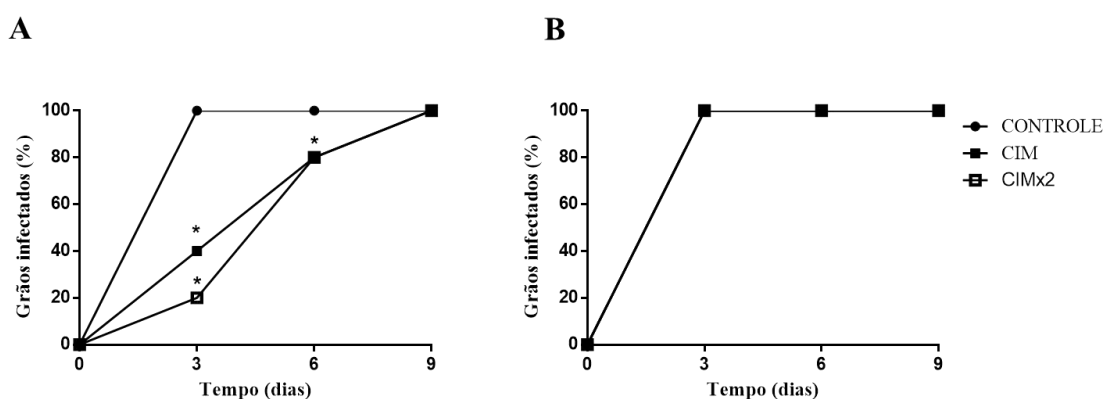
Buscando maior aplicabilidade do carvacrol como alternativa na conservação de grãos de milho, no presente estudo, foi explorada a capacidade do carvacrol de controlar crescimento de *F. graminearum* 02 e *F. oxysporum* 01 em grãos de milho para consumo animal (Figura 10) e humano (figura 11) armazenados em

solução de conserva com carvacrol. A incidência de grãos infectados por *F. graminearum* 02 (A) e *F. oxysporum* 01 (B) foi completa (100% após três dias de incubação) no controle (ausência de droga) quando analisados visualmente. Por outro lado, no experimento teste, nenhum grão apresentou-se visualmente infectado pelos fungos após exposição ao carvacrol (CIM e 2xCIM).

Os grãos visualmente não infectados foram semeados em placas com ASD para verificar a viabilidade fúngica presente no sistema de conserva. A exposição a 2xCIM de carvacrol sobre a cepa de *F. graminearum* 02 alcançou um bom controle de seu crescimento ($p < 0,05$) apresentando apenas 20% no terceiro dia de incubação (figura 10A); a concentração de CIM também se mostrou bastante eficaz ($p < 0,05$) com crescimento de 40% (Figura 10A). Na figura 10B pode-se observar que com três dias houve um crescimento de 100% de crescimento fúngico. No final dos nove dias houve um crescimento de 100%, que pode ser explicado, devido ao fato de o carvacrol ser um produto volátil e pode facilmente evaporar, diminuindo a concentração da droga que deveria estar em contato com as células fúngicas. O carvacrol mostrou melhor atividade frente a cepa de *F. graminearum* 02 (A).

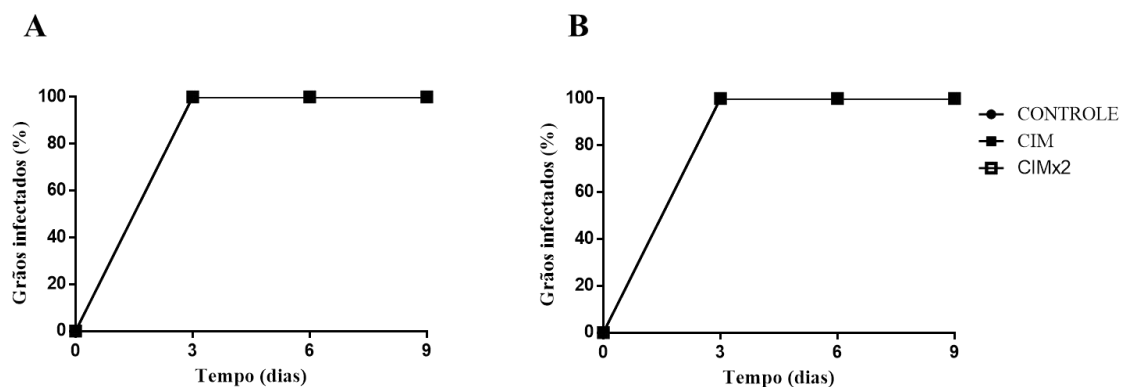
Na figura 11 pode-se observar que houve crescimento de 100% após três dias de incubação em todas as concentrações testadas. Esses resultados podem ter sido afetados pela baixa presença de umidade no grão. Nenhum dos grãos de milho tratados com carvacrol apresentou algum tipo de odor característico do produto.

Figura 10 - Efeitos das concentrações de carvacrol no crescimento de *Fusarium graminearum* 02 (A) e *Fusarium oxysporum* 01 (B) em grãos para de milho para consumo animal artificialmente infectados.



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

Figura 11 - Efeitos das concentrações de carvacrol no crescimento de *Fusarium graminearum* 02 (A) e *Fusarium oxysporum* 01 (B) em grãos de milho para consumo humano artificialmente infectados.



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

O carvacrol mostrou maior eficácia quando em contato com o grão, indicando a possibilidade de um sistema de conservação onde o grão esteja em contato direto com o carvacrol. Esse sistema poderia ser na forma de conservas que normalmente utiliza sais como o cloreto de sódio (NaCl) e o cloreto de potássio (KCl). Além de conferir o sabor salgado aos alimentos, os sais podem inibir o crescimento de fungos patogênicos e deteriorantes. No entanto, há relatos afirmando os possíveis danos do excesso destes sais à saúde humana, exigindo-se sua diminuição nos alimentos. Associado a isto, alguns estudos relatam a presença de tolerância ou adaptação microbiana a estes sais (KAMLEH et al., 2011; LIM; HAMMER, 2015). Sugere-se que com o uso do carvacrol nas conservas a quantidade de sais utilizada diminua. Outros estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

A OMS recentemente convocou uma redução mundial do consumo de sal a fim de reduzir a incidência de doenças cardiovasculares. Se o nível de sal em alimentos processados é reduzido, é possível que seja necessários outros aditivos para manter a segurança dos alimentos (BURT, 2004).

Os óleos essenciais e seus componentes mostram uma bioatividade promissora *in vitro*, no entanto podem interagir com alguns componentes dos alimentos (gorduras, proteínas, carboidratos) e pH. Diferentes estudos relatam níveis mais elevados de bioatividade em pHs ácidos, pois os óleos essenciais se

comportam de forma mais hidrofóbica e entram mais facilmente nas células (NEGI, 2012; PERRICONE et al., 2015). Existe uma crescente necessidade de legislação transparente sobre os aditivos naturais, pois eles são de crescente interesse em países desenvolvidos (CAROCHO; MORALES; FERREIRA 2015).

Os óleos essenciais e seus componentes são antimicrobianos naturais que foram utilizados com sucesso na indústria alimentar (TIWARI et al., 2009; OOTANNI et al., 2013). Em um estudo realizado com couve-flor fresca a irradiação gama foi combinado com pulverização de formulações antimicrobianas contendo óleo essencial de orégano e utilizado com sucesso para inibir o crescimento de bactérias patogênicas e leveduras (TAWEMA et al., 2016). Estes resultados mostram, assim como, este estudo o grande potencial do carvacrol como antimicrobiano natural.

Outros estudos foram realizados utilizando óleos essenciais e seus componentes como alternativa para conservação de alimentos. O óleo essencial de *Origanum vulgare L.* que tem como principal componente o carvacrol, foi utilizado para controlar a podridão macia de *Rhizopus* e a qualidade das ameixas (*Prunus domestica L.*) durante o armazenamento em temperatura ambiente, onde conseguiu inibir o crescimento micelial, a germinação de esporos e a esporulação de *R. stolonifer* (ANDRADE et al., 2017).

As investigações desenvolvidas nesta pesquisa contribuem para os estudos de atividade antimicrobiana de produtos naturais, com ênfase na atividade de carvacrol contra *F. graminearum* 02 e *F. oxysporum* 01, um importante contaminante do milho. Os resultados apresentados podem servir de guia para futuros estudos *in vivo*, buscando maior aplicabilidade deste produto na indústria de alimentos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este composto apresenta algumas características importantes como baixa toxicidade, volatilidade, facilidade de obtenção. Além da crescente procura por alimentos que sejam produzidos, conservados e distribuídos por meio de métodos sustentáveis, que garantam a segurança alimentar da população e dos animais são uns dos fatores responsáveis pelo destaque desse monoterpene. O uso do carvacrol para controle do crescimento de fungos e na conservação de alimentos é uma alternativa sustentável promissora.

No presente trabalho o carvacrol revelou seu potencial antifúngico frente as cepas de *F. graminearum* 02 e *F. oxysporum* 01. A atividade antifúngica do carvacrol está relacionada com a inibição da produção micelial, conidiogênese e da germinação de conídios das cepas analisadas. O carvacrol mostrou uma excelente atividade *in vitro*, o que indica um grande potencial para realizar pesquisas *in vivo* com possível aplicabilidade na indústria e produção de alimentos.

O estudo realizado com o milho em contato direto com o carvacrol mostrou maior eficácia quando comparado com a utilização do vapor do carvacrol, indicando que seja melhor utiliza-lo em conservas.

Reforça-se a importância do desenvolvimento de outros estudos para avaliar o mecanismo de ação do carvacrol frente outras espécies de fungos contaminantes de alimentos e sua possível aplicabilidade na indústria de alimentos como alternativa sustentável para reduzir o uso de conservantes químicos que tanto agredem o meio ambiente.

REFERENCIAS

ABBAS, R. N.; TANVEER, A.; KHALIQ, A., IQBAL, A.; GHAFFARI, A. R., MATLOOB, A.; MAQSOOD, Q. Maize (*Zea mays* L.) germination, growth and yield response to foliar application of *Moringa oleifera* Lam. leaf extracts. **Crop Environ**, v. 4, n. 1, p. 39-45, 2013.

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.

ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour Fragrance Journal**, v. 25, n. 6, p. 407-426, 2010.

ALMEIDA, A.P.; CORREA, B.; MALLOZZI, M. A. B. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 321-326, 2000.

ANDRADE, S. C. A.; ANDRADE, S. C.; BARETTO, T. A.; ARCANJO, N. M., MADRUGA, M. S.; MEIRELES, B., CORDEIRO, Â. M.; MAGNANI, M. Control of Rhizopus soft rot and quality responses in plums (*Prunus domestica* L.) coated with gum arabic, oregano and rosemary essential oils. **Journal of Food Processing and Preservation**, p. 1-14, 2017.

ARUNACHALAM, C.; DOOHAN, F. M. Trichothecene toxicity in eukaryotes: Cellular and molecular mechanisms in plants and animals. **Toxicology letters**, v. 217, n. 2, p. 149-158, 2013

ATOUI, A.; KHOURY, A.E.; KALLASSY, M.; LEBRIHI, A. Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* by real-time PCR system and zearalenone assessment in maize. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, v. 1-2, p. 59–65, 2012.

BAINES, D.; SEAL, R.. **Natural food additives, ingredients and flavourings**. Cambridge, UK: Woodhead Publishing. 2012?

BASSOLÉ, I. H. N.; LAMIEN-MEDA, A.; BAY-ALA, B.; TIROGO, S.; FRANZ, C.; NOVAK, J.; NEBIÉ, R. C.; AND DICKO, M. H. Composition and

antimicrobial activities of *Lippia multi-flora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 7825–7839, 2010.

BOUDDINE, L.; LOUASTE, B.; ACHAHBAR, S.; CHAI, N.; CHAMRI, F., REMMAL, A. Comparative study of the antifungal activity of some essential oils and their major phenolic components against *Aspergillus niger* using three different methods. **Afr. J. Biotechnol.** 11, 14083-14087, 2012

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.

CAMPOS, R. F. F.; FERREIRA, J. F.; MANGUEIRA, M. N.; GONÇALVES, M. C. R. Gastronomia Nordestina: uma mistura de sabores brasileiros. *In*: ENCONTRO DE INICIAÇÃO À DOCÊNCIA/PRAC/UEPB, 11., 2008, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa. UFPB. 2009. Disponível em: <www.prac.ufpb.br/anais/xenex_xienid/xi_enid/.../6CCSDNMT01.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2017.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Natural food additives: Quo vadis?. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 284-295, 2015.

CHAVAN, P. S.; TUPE, S. G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. **Food Control**, v. 46, p. 115-120, 2014.

CSLI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi.** Approved standard M38-A. 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. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: nono levantamento – junho, 2017**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

DAMBOLENA, J.S.; ZUNINO, M. P.; LUCINI, E. I. OLMEDO, R., BANCHIO, E., BIMA, P. J., ZYGADLO, J. A.. Total phenolic content, radical scavenging properties, and essential oil composition of *Origanum* species from different populations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 1115–1120, 2010.

DJOUOSSI, M. G.; TAMOKOU, J. D.; NGNOKAM, D.; KUIATE, J. R.; TAPONDJOU, L. A.; HARAKAT, D.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L.. Antimicrobial and antioxidant flavonoids from the leaves of *Oncoba spinosa* Forssk. (Salicaceae). **BMC Complement Altern Med**. v. 15, n. p. 1-8, 2015.

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.

EFSA Regulation. European food Safety Authority, Regulation No. 1333/2008. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32008R1333&from=EN>>. Acessado em: 25 jun. 2017..

ENGELKIRK, P. G.; DUBEN-ENGELKIRK, **Burton - Microbiologia para as ciências da saúde**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 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. **International Journal of Food Microbiology**, . v. 189, p.119-125, 2014.

ESPINA, LAURA BERDEJO, D.; ALFONSO, P.; GARCÍA-GONZALO, D.; PAGÁN, R. Potential use of carvacrol and citral to inactivate biofilm cells and eliminate biofouling. **Food Control**, 2017.

GEHRKE, I. T.; TEIXEIRA, NETO, A.; PEDROSO, M.; MOSTARDEIRO, C. P.; DA CRUZ, I. B.; SILVA, U. F.; ILHA, V.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F.; Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). **J Ethnopharmacol.** v. 148, n. 2, p. 486-491, 2013.

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

GOVINDARAJAN, M. RAJESWARY; M., HOTI, S. L.; BENELLI, G. . Larvicidal potential of carvacrol and terpinen-4-ol from the essential oil of *Origanum vulgare* (Lamiaceae) against *Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Culex quinquefasciatus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). **Research in Veterinary Science**, v. 104, p. 77-82, 2016.

HOVE, M. VAN POUCKE, C.; NJUMBE-EDIAGE, E.; NYANGA, L. K.; DE SAEGER, S. . Review on the natural co-occurrence of AFB1 and FB1 in maize and the combined toxicity of AFB1 and FB1. **Food Control**, v. 59, p. 675-682, 2016.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1-24, 2012.

JOHANN, S.; SÁ, N. P.; LIMA, L. A.; CISALPINO, P. S.; COTA, B. B.; ALVES, T. M.; SIQUEIRA, E. P.; ZANI, C. L.; Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Annal of Clinical Microbioly Antimicrobials.** v. 9, n. 30, p. 1-6, 2010.

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

KEDIA, A.; PRAKASH, B.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Antifungal and antiaflatoxic 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

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia médica.** 2. ed. São Paulo: Premier, 1999.

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.

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.

LANZA, E. F. E.; Zambolim, L.; Costa, R. V.; Figueiredo, J. E.; Silva, D. D., Queiroz, V. A., Cota, L. V. . Symptomatological aspects associated with fungal incidence and fumonisin levels in corn kernels. **Tropical Plant Pathology**, p. 1-5, 2017.

LIMA, I. O.; PEREIRA, F. O.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O.; MENEZES, E. A.; CUNHA, F. A.; DINIZ, M. F. F. M. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 25, n. 2, p. 138-142, 2013.

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.

LOGRIECO, A.; MORETTI, A.; PERRONE, G.; MULÈ, G. . Biodiversity of complexes of mycotoxinogenic fungal species associated with *Fusarium* ear rot of maize and *Aspergillus* rot of grape. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 11–16, 2007.

LUZ, I. NETO, N. J. G.; TAVARES, A. G.; MAGNANI, M.; DE SOUZA, E. L. Exposure of *Listeria monocytogenes* to sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in a food-based medium does not induce direct or cross protection. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 667-672, 2012.

MELO, J.O.; BITENCOURT, T. A.; FACHIN, A. L.; CRUZ, E. M.; JESUS, H. C.; ALVES, P. B.; ARRIGONI-BLAN F. f. M., FRANCA,S. C., BELEBONI, R. O.; FERNANDES, R. P.; BLANK, A. F.; SCHER, R. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. **Acta Tropica**. v. 128, n. 1, p. 110-115,2013.

MEISSLE, M.; MOURON, P.; MUSA, T.; BIGLER, F.; PONS, X.; VASILEIADIS, V. P.; OTTO, S.; ANTICHI, D.; KISS, J.; PÁLINKÁS, Z.; DORNER, Z.; VAN DER WEIDE, R.; GROTEN, J.; CZEMBOR, E.; ADAMCZYK, J.; THIBORD, J. B.; MELANDER, B.; CORDSEN NIELSEN, G.; POULSEN, R. T.; ZIMMERMANN, O.; VERSCHWELE, A.; OLDENBURG, E. Pests, pesticide use and alternative options in European maize production: current status and future prospects. **Journal of Applied Entomology**, v. 134, n. 5, p. 357–375, 2010.

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.

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, p. 14418-14433, 2012.

NEGI, P. S.. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International journal of food microbiology**, v. 156, n. 1, p. 7-17, 2012.

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.

NJATENG, G. S.; DU, Z.; GATSING, D.; DONFACK, A. R. N.; TALLA, M. F., WABO, H. K., TANE, P.; MOUOKEU, R. S.; LUO, X.; KUIATE, J. R. Antifungal properties of a new terpenoid saponin and other compounds from the stem bark of *Polyscias fulva* Hiern (Araliaceae). **BMC Complement Alternative and Medicine**. v. 15, n. 25, p.1-12, 2015.

NÓBREGA, R. O.; TEIXEIRA, A. P. D. C.; OLIVEIRA, W. A. D.; LIMA, E. D. 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.

NOGUEIRA, J. W. A.; COSTA, R. A.; DA CUNHA, M. T.; CAVALCANTE, T. T. A. Antibiofilm activity of natural substances derived from plants. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 26, p. 1051-1060, 2017.

OLDENBURG, E.; ELLNER, F. Distribution of disease symptoms and mycotoxins in maize ears infected by *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum*. **Mycotoxin Research**. v. 31, n. 3, p. 117-126, 2015

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.

OOTANI, M. A.; RAMOS, A. C. C.; BRITO, D. R.; SILVA, J. B.; CAJAZEIRAS, 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. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2006.
Disponível em:
<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2006/circular/Circ_75.pdf>.
Acesso em: 30 jul. 2015.

PEREIRA, F. D. O.; MENDES, J. M.; LIMA, I. O.; MOTA, K. S. D. L.; OLIVEIRA, W. A. D.; LIMA, E. D. O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 2, p. 228- 234, 2015.

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, n. 76, p. 1-7, 2015.

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. **Journal of Clinical Microbiology**. n. 39, v. 4, p. 1345-1347, 2001.

PISKERNIK, S. et al. Redução de *Campylobacter jejuni* por antimicrobianos naturais em condições relacionadas com carne de frango. **Food Control**, v. 22, n. 5, p. 718-724, 2011.

POZZATTI, P.; SCHEID, L. A.; SPADER, T. B.; ATAYDE, M. L.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H.. *In vitro* activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 54, n. 1, p. 950-956, 2008.

RIQUELME, M. Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. **Annual review of microbiology**, v. 67, p. 587-609, 2013.

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

SCORZONI, L.; SANGALLI-LEITE, F.; DE LACORTE SINGULANI, J.; COSTA-ORLANDI, C. B.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 123, p. 68-78, 2016.

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

STANOJEVIĆ, L. P. et al. Atividade antioxidante do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.). **Biologica Nyssana**, v. 7, n. 2, 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.

TAJKARIMI M. M.; IBRAHIM S. A.; CLIVER D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, n. 9, p.1199–1218, 2010.

TAWEMA, P.; H. N. 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.

TIWARI, B. K.; VALDRAMIDIS; V DONNELL,C ; MUTHUKUMARAPPAN,K CULLEN,P; BOURKE,P Application of natural antimicrobials for food preservation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 14, p. 5987- 6000, 2009.

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

TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 2, p. 253-258, 2007.

VYVYAN, J. R. Alleloquímicos como leads para novos herbicidas e agroquímicos. **Tetrahedron**, v. 58, n. 9, p. 1631-1646, 2002.

WALKER, G.; WHITE, N. A. Introduction to fungal physiology. *In*: KAVANAGH, K. . **Fungi: biology and applications**. England: John Wiley & Sons Ltd., 2005.