



# Efeitos antifúngico e antiaflatoxigênico de timol e carvacrol em *Aspergillus flavus*

## *Antifungal and antiaflatoxigenic activities of thymol and carvacrol against Aspergillus flavus*

Lydiana Pollis Nakasugi<sup>1</sup>, Natália Silva Bomfim<sup>2</sup>, Jessica Cristina Zoratto Romoli<sup>3</sup>, Samuel Botião Nerilo<sup>4</sup>, Milena Veronezi Silva<sup>5</sup>, Gustavo Henrique Rocha Oliveira<sup>6</sup>, Miguel Machinski Jr<sup>7\*</sup>

<sup>1</sup> Docente do Centro Universitário Ingá – UNINGÁ, Maringá (PR), Brasil. <sup>2</sup> Docente da Faculdade de Tupã, grupo UNIESP, Tupã (SP), Brasil. <sup>3</sup> Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá (PR), Brasil. <sup>4</sup> Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá (PR), Brasil. <sup>5</sup> Doutorando do Programa de Pós-graduação em Toxicologia da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo (SP), Brasil. <sup>6</sup> Docente permanente dos Programas de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PCS) e em Ciência de Alimentos (PPC) da UEM, Maringá (PR), Brasil. <sup>7</sup> Docente permanente dos Programas de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PCS) e em Ciência de Alimentos (PPC) da UEM, Maringá (PR), Brasil.

\*Autor correspondente: Miguel Machinski JR - E-mail: mmjunior@uem.br

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do timol e carvacrol contra *Aspergillus flavus* e a produção de aflatoxinas. Foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM), o espectro fungitóxico e a atividade inibidora de micotoxinas pelo timol e carvacrol. Os resultados mostraram que timol e carvacrol exibiram ação fungicida de acordo com a CIM de 2500 e 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Tanto o timol quanto o carvacrol inibiram significativamente o crescimento de *A. flavus* ( $p < 0,05$ ) a partir de 600 e 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. A biomassa fúngica, estimada pela determinação da concentração de ergosterol, foi significativamente reduzida ( $p < 0,05$ ) em 2500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de timol e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de carvacrol. O timol e o carvacrol exibiram efeitos antiaflatoxigênicos em 600 e 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. O timol e o carvacrol exibiram atividade antifúngica, mas não exibiram alta atividade antiaflatoxigênica. Carvacrol e timol podem ser considerados como potentes compostos naturais antifúngicos contra *A. flavus*.

Palavras-chave: Aflatoxinas. Agentes antimicrobianos. Micotoxinas. Produtos naturais. Terpenos.

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of thymol and carvacrol upon production of aflatoxins by *Aspergillus flavus* and upon its growth. Minimal inhibitory concentration (MIC), fungitoxic spectrum and mycotoxin inhibition were assessed. Results showed thymol and carvacrol exhibited fungicidal action, as determined by MIC values of 2500 and 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. Both thymol and carvacrol significantly inhibited growth of *A. flavus* ( $p < 0.05$ ) at concentrations of 600 and 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. Fungal biomass, as estimated by determination of ergosterol concentration, was significantly reduced ( $p < 0.05$ ) at thymol concentrations of 2500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and at carvacrol concentrations of 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Thymol and carvacrol exhibited antiaflatoxigenic effects at concentrations of 600 and 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. While both thymol and carvacrol showed possessing antifungal activities, neither were highly antiaflatoxigenic. Carvacrol and thymol might be considered for use as potential antifungal natural compounds against *A. flavus*.

Keywords: Anti-infective agents. Aflatoxins. Mycotoxins. Natural products. Terpenes.

Recebido em Outubro 01, 2019

Aceito em Julho 07, 2020

## INTRODUÇÃO

As aflatoxinas (AFs) são metabólitos secundários altamente tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos produzidos por espécies de *Aspergillus*. Espécies desse gênero são difundidas em naturalmente nos ambientes, representando um risco para a saúde humana e animal. As aflatoxinas estão entre as substâncias mutagênicas e carcinogênicas mais potentes conhecidas, com base em estudos realizados em animais de experimentação e em estudos epidemiológicos em humanos. O vírus da hepatite B (VHB) é um contribuinte crítico para potencializar a indução do câncer de fígado pelas AFs.<sup>1</sup> A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classifica as AFs como cancerígenos do grupo I e, portanto, carcinogênicos para humanos.<sup>2</sup> Inúmeros alimentos podem ser contaminados por AFs, como cereais, oleaginosas, especiarias, sementes de algodão, leite, carne e frutas secas. No entanto, milho, amendoim e arroz são os itens mais comumente afetados.<sup>1</sup>

Durante anos, fungicidas químicos sintéticos foram considerados suficientes para controlar o crescimento fúngico na produção de alimentos. Entretanto, esses produtos representam potenciais riscos para a saúde humana e contribuem para a poluição do meio ambiente. Além disso, o uso contínuo desses compostos sintéticos levou, em muitos casos, à proliferação de biotipos resistentes de patógenos fúngicos. Portanto, novas abordagens para o controle de doenças pós-colheita são alternativas que devem ser priorizadas aos fungicidas sintéticos.<sup>3</sup>

Os óleos essenciais (OEs) são substâncias naturais de propriedades antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes, comumente utilizadas na indústria alimentícia; são classificadas como GRAS (*Geralmente Reconhecidas como Seguras*) pela *Food and Drug Administration* (FDA).<sup>4</sup> Muitos componentes químicos encontrados nos OEs também foram aceitos pela Comissão Europeia como agentes aromatizantes para uso em alimentos como linalool, timol, eugenol, carvona, cinamaldeído, vanilina, carvacrol, citral e limoneno.<sup>5</sup> A composição química dos OEs varia dependendo da genética da planta,

tempo de colheita, condições climáticas e geográficas, luminosidade, mudanças dos métodos de extração.<sup>6</sup> De fato, a literatura científica descreve variações no perfil químico de vários OEs. Assim, a composição química de um OE precisa ser padronizada antes de ser totalmente avaliado e recomendado como um conservante alimentar, uma vez que qualquer variação em sua composição modificaria sistematicamente sua atividade antifúngica.<sup>7</sup> Tal atividade antifúngica se deve aos compostos majoritários ou as interações sinérgicas entre diferentes compostos menores. Portanto, o uso de compostos isolados de OEs pode representar uma alternativa não só ao uso de fungicidas sintéticos, mas também ao uso de OEs *in natura* devido à variação de seu perfil químico.<sup>3,5,8</sup>

Vários autores demonstraram e/ou compararam a ação antifúngica de OEs ou de seus compostos isolados. Abbaszadeh *et al.*<sup>8</sup> demonstraram a eficácia antifúngica de timol, carvacrol, eugenol e mentol no controle de fungos relevantes para alimentos. O timol foi associado à inibição do crescimento do *Cladosporium* spp. e o carvacrol teve atividade significativamente fungicida sobre *Aspergillus* spp. Os autores sugerem o papel de compostos menores agindo sinérgicamente com os majoritários ( $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol e cânfora), pois melhora a atividade antifúngica dos OEs de *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Lavandula dentata* e *Laurus nobilis* em *A. flavus* e *A. carbonarius*.<sup>7,9</sup> Eugenol e nerol têm potencial efeito inibitórios sobre as cepas de *Aspergillus*.<sup>10</sup> Wang *et al.*<sup>11</sup> demonstraram ação antifúngica do cinamaldeído, citral, geraniol e carvacrol sobre *A. flavus*, *A. carbonarius* e *Penicillium viridicatum*. Lasram *et al.*<sup>12</sup> relataram o efeito antifúngico e antiaflatoxigênico da carvona sobre *A. flavus*.

Carvacrol e tomilho são os principais compostos químicos encontrados em alguns OEs, como os obtidos de orégano (*Oreganum* sp.) e tomilho (*Thymus* sp.). Esses compostos têm se mostrado eficientes na redução da contaminação microbiana dos alimentos, e melhoram a qualidade geral das frutas armazenadas, preservando suas propriedades organolépticas, nutritivas e funcionais

por mais tempo.<sup>13</sup> Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do timol e carvacrol sobre o crescimento e desenvolvimento do *Aspergillus flavus* e a produção de aflatoxinas.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Soluções padrão de timol e carvacrol:** Os padrões de timol e carvacrol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). Os padrões foram dissolvidos separadamente em soluções aquosas contendo Tween 80 (0,1%) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) a fim de obter soluções padrão de trabalho em concentrações de 250 a 20.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de timol e carvacrol, respectivamente. As soluções foram armazenadas a 4 °C até o momento de uso.

**Condições de cultivo do microrganismo:** a cepa AF42 de *A. flavus*, isolada de amendoins armazenados e previamente identificada como altamente produtora de aflatoxinas B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) e B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), foi selecionada para esta investigação. A cepa fúngica foi mantida em glicerol (15%) a -20°C no banco de fungos isolados da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Brasil. Novas culturas do microrganismo foram cultivadas em tubos contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) (Neogen® Co., Lansing, MI, EUA), e mantidas por 7 dias a 25°C em uma incubadora (modelo 411 – FPD 335, Ethik Technology, Vargem Grande Paulista, Brasil) no escuro. Posteriormente foram realizados os seguintes experimentos: determinação da concentração inibitória mínima (CIM), determinação de concentração fungicida mínima (CFM), avaliação do crescimento micelial e dos efeitos do timol e carvacrol na produção de aflatoxinas e ergosterol.

**Determinação da CIM e CFM:** a fim de determinar a CIM e a CFM do timol e carvacrol em *A. flavus*, os experimentos foram realizados de acordo com o documento M38-A2 da Comissão Nacional de Normas Clínicas Laboratoriais,<sup>14</sup> com as devidas adaptações às macrodiluições para leveduras e fungos filamentosos. Timol e carvacrol foram dissolvidos em Tween 80 (0,1%) para que fossem obtidas concentrações que variavam de 600 a 10.000  $\mu\text{g}$

$\text{mL}^{-1}$  para timol e de 15 a 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para carvacrol. Uma suspensão contendo conídios de *A. flavus* a uma concentração de 10<sup>4</sup> UFC  $\text{mL}^{-1}$  foi preparada em meio RPMI-1640 sintético (0,5 mL) utilizando a câmara de Neubauer. Um tubo contendo a suspensão de conídios foi preparado como controle fúngico. Os tubos foram incubados a 35°C por 72 h. A CIM foi definida como a menor concentração dos compostos testados que inibiram o crescimento visual de *A. flavus*. Posteriormente, as alíquotas foram retiradas dos tubos que não apresentavam crescimento visual fúngico e inoculadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud. As placas foram incubadas a 25°C por 72 h. A CFM foi determinada de acordo com a ausência de crescimento fúngico nas placas.

**Efeitos do timol e carvacrol no crescimento de *A. flavus*:** Timol e carvacrol foram diluídos em solução de Tween 80 (0,1%) de acordo com as concentrações estabelecidas pela CIM e CFM. Foram testadas duas concentrações superiores e duas concentrações inferiores a CFM. Diferentes soluções contendo os compostos testes foram adicionadas aos frascos de Erlenmeyer contendo 24 mL de meio líquido extrato de sacarose de levedura (YES). Alíquotas de 10<sup>6</sup> conídios de *A. flavus*  $\text{mL}^{-1}$  foram adicionadas a cada frasco contendo meio de cultura e compostos teste. Os frascos foram incubados a 25°C no escuro por 7 dias. Um frasco contendo nistatina com uma concentração de 1.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  também foi preparado para se o controle positivo (CP). Outro frasco contendo apenas o inóculo no meio da cultura foi preparado como controle fúngico (CF).

Após o período de incubação, o conteúdo de cada frasco foi filtrado através de papel filtro padrão. A biomassa separada do teor líquido foi pesada e posteriormente utilizada para extração de ergosterol, enquanto os conteúdos filtrados foram posteriormente utilizados para extração de aflatoxinas.<sup>15</sup>

**Determinação do peso úmido do micélio:** o micélio retido no papel filtro foi coletado em tubos anteriormente pesados, que foram pesados novamente, a diferença entre os pesos determina o peso úmido do micélio.<sup>16</sup> O percentual de inibição do crescimento micelial foi determinado utilizando-se as

fórmulas:  $[(Pc - Pt)/Pc] \times 100$ , onde o Pc representa o peso médio do micélio obtido a partir dos frascos de CF, enquanto Pt representa o peso médio da micelia obtida dos frascos testes.

*Extração de ergosterol:* o micélio foi transferido para tubos contendo 20 mL de metanol, 5 mL de etanol e 2 g de hidróxido de potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha). Cada tubo contendo essa solução foi homogeneizado por 5 minutos em agitador de tubos (KMC 1300V, Bucheon, Coreia) e deixado em banho de água EV 015 (Evlab, Londrina, Brasil) a 70°C por 40 min. Após o resfriamento à temperatura ambiente, 5 mL de água destilada foram adicionados a cada tubo que foram então centrifugados a 1735 g por 20 min (Universal 320R, Hettich, Tuttingen, Alemanha). O sobrenadante foi removido e o n-hexano (F. Maia, Cotia, Brasil) foi adicionado em volume igual a cada tubo. Após 2 minutos de agitação, a fração orgânica foi coletada e colocada em um frasco de vidro âmbar. O solvente em cada tubo foi evaporado (White Martins, Rio de Janeiro, Brasil). O resíduo obtido foi armazenado a -20°C até a análise cromatográfica.<sup>15</sup>

*Parâmetros cromatográficos para detecção e quantificação de ergosterol:* 1 mL de etanol (Panreac, Barcelona, Espanha) foi adicionado nas amostras e filtradas através de filtros de seringa Millex-LCR (0,45  $\mu\text{m}$  x 13 mm, PTFE modificado) (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA). O padrão de Ergosterol foi adquirido da Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA) e preparado de acordo com as instruções do fabricante. O equipamento de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) utilizado foi um Finnigan Surveyor Plus (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) possuindo um sistema de detecção UV/VIS. A coluna cromatográfica utilizada foi uma coluna analítica de fase C<sub>18</sub>, Spherisorb® (150 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Waters, Wexford, Irlanda). As condições cromatográficas foram metanol de fase móvel (100%), tempo de análise de 10 min, volume de injeção de 100  $\mu\text{L}$ , vazão de 1,5 mL min<sup>-1</sup> e comprimento de onda de 282 nm. Todos os reagentes foram de grau HPLC. Uma curva de calibração do padrão ergosterol variando de 10 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi construída para determinar as concentrações de ergosterol. O tempo de retenção foi de 4,6 minutos. Os limites de

detecção e quantificação foram de 1,5 e 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. A recuperação foi de  $77,4 \pm 7,2\%$ .<sup>15</sup>

#### **Avaliação do efeito anti-aflatoxigênico do timol e carvacrol:**

*Extração de aflatoxinas:* o filtrado obtido a partir das amostras foi submetido a processos de extração.<sup>15</sup> Da solução filtrada, para cada amostra, 20 mL foram transferidos para funis de separação (125 mL) aos quais 10 mL de n-hexano foram adicionados. Após 1 minuto de agitação manual, a fase aquosa foi separada da fase orgânica, a fase orgânica foi descartada. A fase aquosa foi novamente colocada no funil de separação, ao qual foram adicionados 10 mL de clorofórmio (F. Maia Indústria e Comércio Ltda., Cotia, Brasil). O funil de separação foi agitado por 3 minutos. A fração de clorofórmio foi então filtrada através de papel filtro padrão com o auxílio de sulfato de sódio anidro e coletado em frascos de vidro âmbar. Outros 10 mL de clorofórmio foram adicionados à fase aquosa e processo de extração e filtração repetidos. Os frascos âmbar foram colocados em um banho de água a 65°C para evaporação de solvente. O resíduo obtido foi armazenado a -18°C até a análise cromatográfica.

*Determinação de aflatoxinas pelo HPLC:* resíduos obtidos após a extração de aflatoxinas foram ressuspensos em 1 mL de água:metanol (50:50, v/v) e depois filtrados através de uma membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Os padrões de aflatoxinas foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e as soluções de trabalho e estoque foram preparadas de acordo com o Manual de Métodos Oficiais de Análise da Associação de Química Analítica Oficial Internacional.<sup>17</sup> As concentrações das aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> foram avaliadas utilizando-se o mesmo equipamento descrito acima, mas com uma coluna cromatográfica de fase C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Pickering Laboratories Inc., Mountain View, CA, EUA). A derivação pós-coluna foi realizada pelo Kobra Cell® (Biopharm Rhone Ltda., Glasgow, Escócia). As condições cromatográficas foram: fase móvel metanol-acetonitrila de água (20:60:20, v/v/v) contendo 119 mg L<sup>-1</sup> de brometo de potássio (Quimex SA, Productos y Insumos Quimicos, Lima, Peru) acidificado com 350  $\mu\text{L}$  de ácido nítrico 4 mol L<sup>-1</sup> (Labsynthy®, Diadema, SP, Brasil), volume de injeção de 100  $\mu\text{L}$ , vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, detecção de fluorescência em comprimentos de onda de excitação

e emissão de 362 e 425 nm, respectivamente. Todos os reagentes eram de grau HPLC. Uma curva de calibração variando de 1 a 20 ng mL<sup>-1</sup> foi construída utilizando diferentes soluções contendo padrões de AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> nas concentrações 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 e 20 ng mL<sup>-1</sup> para determinar a concentração de aflatoxinas. O tempo de corrida foi de 25 minutos. Os tempos de retenção foram de 11 min para AFB<sub>2</sub> e de 13 min para AFB<sub>1</sub>. A recuperação média e precisão para AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> foram de 93,1 e 7,9%, 103 e 6%, respectivamente. O limite de detecção foi de 0,05 e 0,04 ng mL<sup>-1</sup>, e o limite de quantificação foi de 0,5 e 0,4 ng mL<sup>-1</sup> para AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>, respectivamente. O percentual de inibição da produção de AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> em cada concentração de timol e carvacrol foi calculado em comparação com o controle fúngico (CF).

**Análise estatística:** os experimentos foram realizados em quadruplicata. Os resultados foram analisados usando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.). Para determinar diferenças para comparações múltiplas e fator único foram realizadas análises unidirecionais de variância (ANOVA) seguidas de testes pós-hoc de Tukey. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, e as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### CIM E CFM

A CIM e CFM para timol foram de 2500  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, no qual foi verificado que o timol possui ação

fungicida. Quando avaliado em *Candida albicans*, a CIM para timol foi de 125  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> e em *Penicillium digitatum* e *P. italicum*, CIM foi de 500  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, o que demonstra que a ação fungicida do timol depende da espécie fúngica.<sup>18,19</sup> Abbaszadeh *et al.*<sup>8</sup> determinaram a CIM para timol em diferentes isolados fúngicos, esta variou entre 100 e 500  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, corroborando com os dados aqui mostrados. A inibição de crescimento mais eficiente foi verificada quando o timol foi testado em *Cladosporium* spp., seguido por *Aspergillus* spp., *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp., *Alternaria alternata* e *Rhizopus oryzae*.

Quanto ao carvacrol, a CIM foi determinada em 30  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, enquanto o MFC foi determinado em uma concentração de 60  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> para *A. flavus*. No presente estudo, ao contrário do timol, o carvacrol exibiu ação fungistática. Esses resultados corroboram os dados de Abbaszadeh *et al.*<sup>8</sup> que relataram carvacrol possui ações fungistática contra o mesmo fungo, CIM sendo de 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> e CFM de 125  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.

### EFEITOS DO THIMOL E CARVACROL NO CRESCIMENTO DE *A. Flavus*

O timol (Tabela 1) reduziu significativamente o peso fúngico do micélio (peso úmido) em todas as concentrações testadas em comparação com o controle fúngico (FC). Isso foi observado na amostra de controle positivo (PC). Carvacrol (Tabela 1) reduziu significativamente o peso fúngico micelial em todas as concentrações avaliadas, percentuais de inibição variando de 38,40 a 48,80%. A inibição completa foi observada apenas na amostra correspondente ao controle positivo (PC).

**Tabela 1.** Efeito inibitório do timol e carvacrol no desenvolvimento micelial do *Aspergillus flavus*

(Continua)

Timol ( $\mu$ g/mL)	Peso do micélio (g)	Inibição do crescimento <sup>a</sup> (%)
CF	12,5	-
600	5,73*	54,4 $\pm$ 0,30*
1250	4,63*	63,2 $\pm$ 0,15*
2500	0,23*	98,4 $\pm$ 0,05*
5000	-	100,0 $\pm$ 0,0*
CP	-	100,0 $\pm$ 0,0*

(Conclusão)

Timol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Peso do micélio (g)	Inibição do crescimento <sup>a</sup> (%)
Carvacrol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Peso do micélio (g)	Inibição do crescimento <sup>b</sup> (%)
CF	12,5	-
15	7,83*	38,4 $\pm$ 0,40*
30	7,23*	42,4 $\pm$ 0,78*
60	7,56*	40,0 $\pm$ 0,64*
125	7,70*	38,4 $\pm$ 0,52*
250	6,39*	48,8 $\pm$ 0,62*
CP	-	100,0 $\pm$ 0,0*

\*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparada ao controle fúngico.

Valores expressos com média  $\pm$  desvio padrão na inibição do desenvolvimento.

CF – controle fúngico, inóculo. CP – controle positivo, inóculo tratado com 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  nistatina.

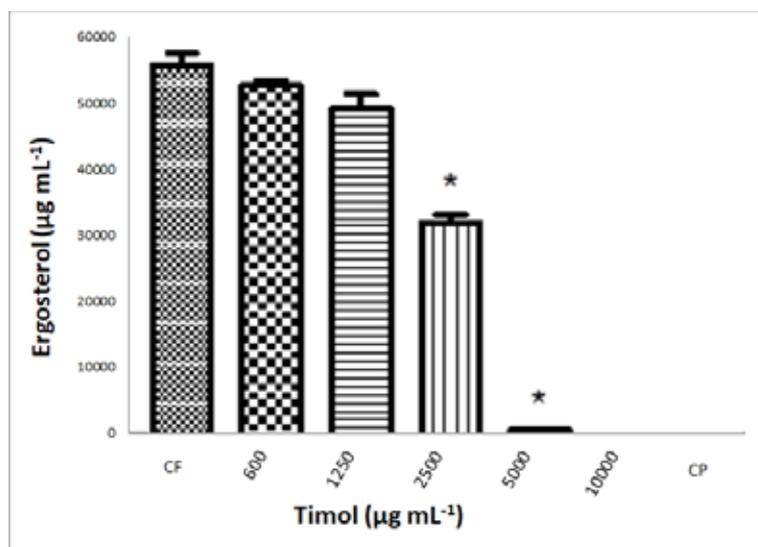
Da mesma forma, Gandomi et al.<sup>20</sup> avaliaram os efeitos do óleo essencial obtido da *Zataria multiflora* Boiss (uma planta semelhante ao tomilho que cresce apenas no Irã, Paquistão e Afeganistão) em *A. flavus*. Os autores relataram que o composto majoritário encontrado foi o carvacrol (71,12%), e que todas as concentrações testadas (50 a 1.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram capazes de prevenir o crescimento fúngico, especialmente em concentrações superiores a 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , onde a inibição do crescimento foi completa. Carvacrol, o principal composto fenólico encontrado no óleo essencial de *Z. Multiflora* foi indicado como o composto responsável pelos efeitos antifúngicos.

#### EFEITOS DE TIMOL E CARVACROL NA BIOSÍNTESE ERGOSTEROL

Ergosterol é responsável por manter a integridade e a funcionalidade das células. Uma redução do teor de ergosterol geralmente leva à perda da estabilidade da membrana e leva a distúrbios osmóticos e compromete o crescimento e a proliferação de células fúngicas.<sup>21</sup> Portanto, a quantidade de ergosterol produzida por *A. flavus* exposta a diferentes concentrações de timol e carvacrol foi quantificada, permitindo quantificar a biomassa fúngica por sua vez. O mecanismo de ação de timol e carvacrol que leva à inibição do crescimento micelial de fungos toxigênicos não é claro; aparentemente, esses compostos formam pontes de hidrogênio em locais ativos de enzimas-chave. Nossos resultados

confirmam tais inferências, pois a quantidade de ergosterol na célula fúngica diminuiu quando a cepa *A. flavus* foi exposta ao timol e carvacrol em todas as concentrações testadas (Fig. 1 e 2).

A Figura 1 mostra a inibição da produção de ergosterol por *A. flavus* após o tratamento com timol. Os resultados mostram uma redução significativa nas quantidades de ergosterol em concentrações de 2500 e 5000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em comparação com o controle fúngico (FC). A inibição nessas concentrações também é significativamente mais acentuada em comparação com os resultados obtidos em concentrações mais baixas. Ochoa-Velasco et al.<sup>3</sup> relataram resultados semelhantes ao testar os efeitos do timol em *F. verticillioides*.

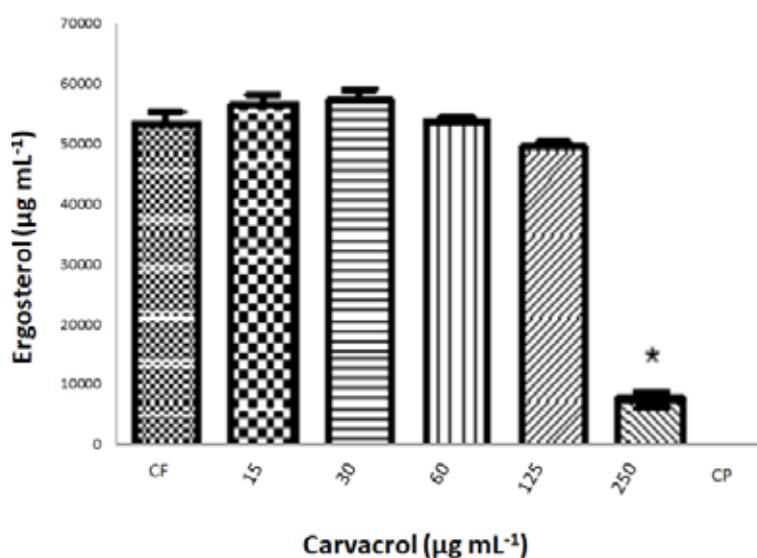


**Figura 1.** Efeito inibitório do timol na biossíntese de ergosterol por *Aspergillus flavus*.

(CF) - Controle fúngico sem tratamento. (CP) - controle positivo, nistatina (1000 µg mL<sup>-1</sup>). Os tubos de ensaio foram incubados durante 7 dias a 25 ° C em meio líquido YES (n = 4). \* p < 0,05.

Os resultados apresentados na Figura 2 demonstram a ação inibitória do carvacrol na produção de ergosterol por *A. flavus*. Há uma inibição significativa da produção de ergosterol em uma concentração de 250 µg mL<sup>-1</sup> não apenas em comparação com o controle fúngico (FC), mas também em relação às outras concentrações testadas. Estudo realizado por outros autores mostrou que o

timol e o carvacrol, quando testados em *C. albicans*, reduziram a produção de ergosterol em até 98%, dependendo da concentração testada (100 µg mL<sup>-1</sup>).<sup>22</sup> Ahmad et al.<sup>22</sup> relataram a inibição da produção de ergosterol em concentrações acima dos valores estabelecidos para CIM, semelhante aos resultados encontrados no presente estudo.



**Figura 2.** Efeito inibitório do carvacrol na biossíntese de ergosterol por *Aspergillus flavus*.

(CF) - Controle fúngico sem tratamento. (CP) - controle positivo, nistatina (1000 µg mL<sup>-1</sup>). Os tubos de ensaio foram incubados durante 7 dias a 25 ° C em meio líquido YES (n = 4). \* p < 0,05

Alguns compostos antifúngicos podem afetar o desenvolvimento micelial e a produção de ergosterol devido à tensão bioquímica. Esses compostos são capazes de ativar um mecanismo de compensação que gera uma resposta adaptativa pelo fungo, causando reprogramação da expressão de genes responsáveis pela translação de proteínas de parede celular.<sup>23</sup> O resultado imediato foi um aumento não significativo ( $p > 0,05$ ) na biossíntese de ergosterol, como observado na Figura 2 com o uso de carvacrol em concentrações de 15, 30 e 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os autores observaram que em baixas concentrações, óleos essenciais e seus compostos podem danificar a parede celular fúngica e causar um aumento na produção de ergosterol, resultando no aumento da biomassa fúngica.<sup>24</sup>

#### EFEITOS ANTIAFLATOXIGÊNICOS DE TIMOL E CARVACROL

A Tabela 2 mostra os resultados para os efeitos do timol na produção de AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>. O timol apresentou efeitos antiaflatoxigênicos em concentrações acima de 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pois reduziu a produção de AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>. A produção de aflatoxinas aumentou, mas não significativamente ( $p > 0,05$ ) na concentração de 1250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de timol. Concentrações mais baixas de compostos inibitórios podem causar uma resposta adaptativa para proteger o fungo, resultando em alterações epigenéticas causando aumento da produção de toxinas.<sup>24</sup>

**Tabela 2.** Efeito inibitório do timol na produção de aflatoxinas pelo *Aspergillus flavus*

Timol ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Aflatoxina B <sub>1</sub>		Aflatoxina B <sub>2</sub>	
	Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	Inibição (%)	Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	Inibição (%)
CF	133301 ± 3971	-	7095 ± 345,9	-
600	64054 ± 84420*	51,94	3576 ± 4747*	49,59
1250	146395 ± 27246	-	8558 ± 828,3	-
2500	93949 ± 68918*	29,52	4626 ± 3145*	34,79
5000	ND**	100,00	ND**	100,00
CP	ND**	100,00	ND**	100,00

ND – não detectado.

\* diferença significativa comparada ao controle fúngico ( $p < 0,05$ ).

\*\* não há diferença significativa com os grupos comparados (CP).

Valores de concentração obtidos por análise em HPLC e expressas como média ± desvio padrão.

CF – controle fúngico, inóculo.

CP – controle positivo, inóculo tratado com 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  nistatina.

A Tabela 3 mostra os resultados dos efeitos do carvacrol na produção de aflatoxinas por *A. flavus*. Uma redução significativa da produção de aflatoxinas só pode ser observada em uma concentração de carvacrol de 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo de apenas 39,68 e 19,15% para AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>, respectivamente. Nistatina, a referência antifúngica usada como PC, inibiu completamente a síntese de AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> por *A. flavus*. Corroborando com nossos dados, outros autores relataram que o carvacrol inibiu a produção

de aflatoxinas em *A. parasiticus* em 92,64% em uma concentração de 1.320  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , evidenciando que este composto de fato possui efeitos antiaflatoxigênicos.<sup>26</sup>

**Tabela 3.** Efeito inibitório do carvacrol na produção de aflatoxinas em *Aspergillus flavus*

Carvacrol ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Aflatoxina B <sub>1</sub>		Aflatoxina B <sub>2</sub>	
	Concentração ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Inibição (%)	Concentração ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Inibição (%)
CF	133301 $\pm$ 3971	-	7095 $\pm$ 345,9	-
15	127702 $\pm$ 6193*	4,20	7570 $\pm$ 172*	-
30	127549 $\pm$ 10089*	4,31	7355 $\pm$ 160,9*	-
60	118349 $\pm$ 7555*	1,21	6832 $\pm$ 151,8*	3,70
125	80404 $\pm$ 20334***	39,68	5736 $\pm$ 553,4***	19,15
CP	ND***	100,00	ND***	100,00

ND – não detectado.

\* diferença significativa comparada ao controle fúngico ( $p < 0,05$ ).

\*\* não há diferença significativa com os grupos comparados (CP).

Valores de concentração obtidos por análise em HPLC e expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

CF – controle fúngico, inóculo.

CP – controle positivo, inóculo tratado com 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  nistatina.

Outros autores ao analisar os efeitos do óleo essencial de *Z. multiflora* em *A. flavus*, constataram que ele exibiu ação antiaflatoxigênica em concentrações de 50 e 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .<sup>20</sup> Mostraram que o carvacrol, um dos principais compostos desse óleo essencial, pode ser considerado um inibidor da produção de toxinas. No entanto, a associação com outros compostos encontrados no óleo essencial também deve ser levada em consideração. Prevenção da formação de micélio e conídios por fungos toxigênicos é uma das características da inibição da síntese de aflatoxinas.

## CONCLUSÕES

O presente artigo demonstrou que o carvacrol e timol inibem diretamente o crescimento micelial de *A. flavus*. Timol e carvacrol também parecem ter como alvo a biossíntese do ergosterol em *A. flavus*, levando a ruptura severa da membrana. O timol e o carvacrol apresentam atividade antifúngica, mas não demonstraram alta atividade antiaflatoxigênica. Carvacrol e timol, que são considerados como compostos naturais geralmente reconhecidos como seguros (GRAS), podem ser considerados como

potentes compostos naturais antifúngicos a serem usados contra *A. flavus*. Futuros estudos devem ser realizados como a aplicação de carvacrol e timol em práticas agrícolas como fungicidas naturais que poderiam substituir parcialmente fungicidas sintéticos.

## AGRADECIMENTOS

Este artigo é derivado de uma tese de mestrado apresentada pelo primeiro autor e financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (028054/2009). Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código financeiro 001, bem como pelo CNPq devido à concessão de bolsa de iniciação científica ao terceiro autor.

## REFERÊNCIAS

1. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Evaluation of certain contaminants in food: eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: WHO Technical Report Series, N. 1002; 2017.

2. Rushing BR, Selim MI. Aflatoxin B<sub>1</sub>: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food Chem Toxicol.* 2019; 124, 81-100.
3. Ochoa-Velasco CE, Navarro-Cruz AR, Vera-López O, Palou E, Avila-Sosa R. Growth modeling to control (in vitro) *Fusarium verticillioides* and *Rhizopus stolonifer* with thymol and carvacrol. *Rev Argent Microbiol.* 2018; 50, 70-74.
4. Food and Drug Administration (FDA). Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. 2<sup>nd</sup> ed. Silver Spring: U.S. Department of Health and Human Services, 2012.
5. An P, Yang X, Yu J, Qi J, Ren X, Kong Q. -Terpineol and terpene-4-ol, the critical components of tea tree oil, exert antifungal activities *in vitro* and *in vivo* against *Aspergillus niger* in grapes by inducing morphous damage and metabolic changes of fungus. *Food Control.* 2019; 98, 42-53.
6. Bomfim NS, Nakassugi LP, Oliveira JFP, Kohiyama CY, Mossini SAG, Grespan R, Nerilo SB, Mallmann CA, Abreu Filho BA, Machinski Jr M. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. *Food Chem.* 2015; 166, 330-336.
7. Dammak I, Hamdi Z, El Euch SK, Zemni H, Mliki A, Hassouna M, Lasram S. Evaluation of antifungal and anti-ochratoxigenic activities of *Salvia officinalis*, *Lavandula dentata* and *Laurus nobilis* essential oils and a major monoterpene constituent 1,8-cineole against *Aspergillus carbonarius*. *Ind Crops Prod.* 2019; 128, 85-93.
8. Abbaszadeh S, Aharifzadeh A, Ahokri H, Khosravi AR, Abbasdeh A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food relevant fungi. *J Mycol Med.* 2014; 24, 51-56.
9. Prakash B, Kedia A, Mishra PK, Dwivedy AK, Dubey NK. Assessment of chemically characterized *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its major compounds as plant-based preservative in food system based on their efficacy against food-borne moulds and aflatoxin secretion and as antioxidant. *Int J Food Sci Technol.* 2015; 50, 1792-1798.
10. Wang Y, Zeng X, Zhou Z, Xing K, Tessema A, Zeng H, Tian J. Inhibitory effect of nerol against *Aspergillus niger* on grapes through a membrane lesion mechanism. *Food Control.* 2015; 55, 54-61.
11. Wang H, Yang Z, Ying G, Yang M, Nian Y, Wei F. Antifungal evaluation of plant essential oils and their major components against toxigenic fungi. *Ind Crops Prod.* 2018; 120, 180-186.
12. Lasram S, Zemni H, Hamdi Z, Chenenaoui S, Houissa H, Tounsi MS, Ghorbel A. Antifungal and antiaflatoxigenic activities of *Carum carvi* L., *Coriandrum sativum* L. seed essential oils and their major terpene component against *Aspergillus flavus*. *Ind Crops Prod.* 2019; 134, 11-18.
13. Palou L, Ali A, Fallik E, Romanazzi G. GRAS, plant- and animal-derived compounds as alternatives to conventional fungicides for the control of postharvest disease of fresh horticultural produce. *Postharvest Biol Technol.* 2016; 122, 41-52.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. NCCLS document M38-A2. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2008.
15. Kohiyama CY, Ribeiro MMY, Mossini SAG, Bando E, Bomfim NS, Nerilo SB, Rocha GHO, Grespan R, Mikcha JMG, Machinski Jr M. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chem.* 2015; 173, 1006-1010.
16. Tariq S, Wani S, Rasool W, Shafi K, Bhat MA, Prabhakar A, Shalla AH, Rather MA. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microb Pathog.* 2019; 134, 103580(1-20).
17. Association of Official Agricultural Chemists International (AOAC). Natural Toxins. In: AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of

- Official Analytical Chemists. 20<sup>th</sup> ed. Arlington: The Association of Official Analytical Chemists; 2016. p. 2-46.
18. Braga PC, Culini M, Alfieri M, Dal Sasso M. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 31, 472-477.
19. Pérez-Alfonso CO, Martínez-Romero D, Zapata PJ, Serrano M, Valero D, Castilho S. The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* involved in lemon decay. *Int J Antimicrob Chemother*. 2012; 158, 101-106.
20. Gandomi H, Misaghi A, Basti AA, Bokaei S, Khosravi A, Abbasifar A, Javan AJ. Effect of *Zataria multiflora* Boiss essential oil on growth and aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* in culture media and cheese. *Food Chem Toxicol*. 2009; 47, 2397-2400.
21. Prakash B, Dubey NK, Kedia A, Singh A, Singh P. Efficacy of essential oil combination of *Curcuma longa* L. and *Zingiber officinale* Rosc. as a postharvest fungitoxicant, aflatoxin inhibitor and antioxidant agent. *J Food Saf*. 2012; 32, 279-288.
22. Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Kham LA, Manzoor N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011; 30, 41-50.
23. Prakash B, Kedia A, Mishra PK, Dwivedy AK, Dubey NK. Assessment of chemically characterized *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its major compounds as plant-based preservative in food system based on their efficacy against food-borne moulds and aflatoxin secretion and as antioxidant. *Int J Food Sci Technol*. 2015; 50, 1792-1798.
24. Nerilo SB, Rocha GHO, Tomoike C, Mossini SAG, Grespan R, Mikcha JMG, Machinski Jr M. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production by *Zingiber officinale* essential oil in *Aspergillus flavus*. *Int J Food Sci Technol*. 2016; 51, 286-292.
25. Razzaghi-Abyanch M, Shams-Ghahfarokh M, Yoshinari T, Mohammad-Bagher R, Jaimand K, Nagasawa H, Sakuda S. Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Int J Food Microbiol*. 2008; 123, 228-233.