ANÁLISE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*: ADAPTAÇÕES EM FUNÇÃO DO USO DO CARVACROL

Jaqueline PASTRO[1], Emerson Wendes Santos PARAGUASSÚ[1], Cláudia Moreira Santa Catharina WEIS[2], Felipe Guilherme Brunetto BRETSCHNEIDER[1], Franciélly STADLER[3], Edilaine Mauricia Gelinski GRABICOSKI[1], Alessandra MACHADO-LUNKES[3]

[1] Departamento Acadêmico de Ciências Agrárias
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Francisco Beltrão
Francisco Beltrão – Paraná - Brasil

[2] Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos
Universidade Estadual de Londrina
Londrina – Paraná – Brasil

[3] Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Francisco Beltrão e Londrina
Paraná - Brasil

E-mails: jaquelinepastro@alunos.utfpr.edu.br, emersonp@alunos.utfpr.edu.br, engalimclaudiaweis@gmail.com, felipebretschneider@gmail.com, stadler.alipr@gmail.com, edilainem@utfpr.edu.br, amachado@utfpr.edu.br

Resumo: *O carvacrol é um composto natural, presente no óleo essencial de orégano que apresenta potencial antimicrobiano contra diversos microrganismos, principalmente fungos. No entanto sua aplicação na indústria de alimentos é limitada devido a alterações de aroma e sabor nos alimentos, o que torna necessário sua utilização em baixas concentrações. Para determinar sua atividade antifúngica contra Alternaria alternata, Colletotrichum gloeosporioides, Colletotrichum* sp. e *Fusarium solani, foram realizados ensaios em microplaca de 96 poços, onde houve controle da atmosfera gasosa por meio de material selante, chegando assim a concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima com maior confiabilidade. Os resultados mostraram que o carvacrol inibiu a proliferação do Colletotrichum* sp. *e do Colletotrichum gloeosporioides, porém os valores de concentração inibitória mínima foram superiores quando o ensaio foi realizado sem uso da borracha seladora, evidenciando que a atmosfera gasosa do carvacrol interfere na realização do ensaio.*

Palavras-chave: *Carvacrol; Fase vapor; Composto antifúngico; Análise in vitro.*

INTRODUÇÃO

As perdas pós-colheita de frutos no Brasil ficam acima de 30% em relação ao total produzido e boa parte disso ocorre por contaminações fúngicas, dentre as quais, boa parte são causadas por fungos (DUTOT; NELSON; TYSON, 2013; FAO, 2011; REIS; COSTA, 2012; SEBRAE, 2015). O percentual expressivo de desperdício desses alimentos, mostra a demanda crescente por maneiras de mitigar as perdas pós-colheita e garantir a manutenção da qualidade dos frutos, além de aumentar a vida útil destes produtos (VAN LONG, JOLY, DANTIGNY, 2016).

Tradicionalmente, como forma de diminuir as perdas ocasionadas por doenças fúngicas, se faz uso de fungicidas sintéticos (RAJENDRAN, 2016). No entanto, o uso de produtos químicos inadequados, em quantidades superiores ao necessário, assim como colheita logo após a pulverização faz com que haja níveis excessivos de pesticidas em vegetais, frutas, legumes e grãos. Esses resíduos podem causar inúmeras complicações à saúde e por isso à procura dos consumidores por alimentos mais saudáveis e seguros, faz com que seja necessário a busca por novos antimicrobianos de fontes naturais (ZABKA; PAVELA, 2013)

Um antimicrobiano obtido de fonte natural que já vem sendo estudado para a redução e controle do desenvolvimento de doenças fúngicas é o carvacrol (ABBASZADEH *et al*., 2014). O carvacrol é um fenol monoterpênico, presente majoritariamente no óleo essencial de orégano, podendo ser encontrado também no óleo essencial de tomilho (BASER, 2008; RYU *et al*., 2018). Este composto natural é usado em alimentos como aromatizante e conservante, e como agente antimicrobiano contra microrganismos resistentes a antibióticos comerciais (SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015). Sua utilização é permitida em doses controladas e o mesmo é classificado como seguro pelo Food and Drugs Administration (FDA) (FDA, 2011).

A aplicabilidade do carvacrol em alimentos se torna limitada em função das alterações de sabor e aroma, para isto o efeito antimicrobiano desejado deve ser alcançado em baixas concentrações, a fim de minimizar o sabor e aroma indesejado nos alimentos (SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014). Nesse sentido, este trabalho teve como

objetivo determinar de maneira assertiva a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do carvacrol frente ao *Fusarium solani*, *Alternata alternaria*, *Colletotrichum* sp. e *Colletotrichum gloeosporioides* a partir do uso de borracha seladora no ensaio antifúngico em microescala em placa de 96 poços.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O carvacrol é um fenol monoterpênico, presente majoritariamente no óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare*) e é chamado de 5-isopropil-2-metilfenol pela IUPAC (BASER, 2008; RYU *et al*., 2018). Este composto pode ser obtido biosinteticamente a partir do γ-terpineno com o auxílio de p-isopropil tolueno, por síntese química e também por métodos biotecnológicos (BASER, 2008). O mesmo apresenta características lipofílicas, é insolúvel em água e altamente solúvel em etanol, éter etílico e acetona (SHARIFI-RAD *et al*., 2018).

O carvacrol tem sido reconhecido como um novo tipo de bioconservante devido à sua capacidade de aumentar a vida útil de frutas e vegetais, regular seu metabolismo fisiológico, aumentar sua resistência a doenças e melhorar sua qualidade de armazenamento (OCHOA-VELASCO *et al*., 2021).

Alguns estudos destacam que o carvacrol pode ser usado como agente antimicrobiano alternativo contra bactérias patogênicas como, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Bacillus cereus*, além de fungos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium* spp, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus oryzae* (ABBASZADEH *et al*., 2014; LANDRY *et al*., 2015; ULTEE, *et al*., 2000). Um estudo mais atual realizado por Mi *et al*. (2023) observou que o tratamento com carvacrol inibiu significativamente o crescimento micelial e a germinação de esporos dos fungos *Clonostachys rosea* e *Fusariam equiseti*, comumente encontrados em kiwis.

Uma forma amplamente utilizada para verificar o desempenho de antimicrobianos naturais é a análise *in vitro*, que consiste na utilização da técnica de microdiluição em meio líquido, em que é determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração

fungicida mínima (CFM) ou a concentração bactericida mínima (CBM) do agente estudado (FIEIRA *et al*, 2013).

Diferentes trabalhos realizaram análise antimicrobiana *in vitro* para determinar a capacidade inibitória de proliferação de microrganismos pelo carvacrol (ABBASZADEH *et al*., 2014; ADDO; LI; YU; XIAO, 2023; ARAUJO; LONGO, 2016; CACCIATORE *et al.*, 2022; FREITAS *et al.*, 2013). No entanto, ao observar o método descrito nos trabalhos não há relato de nenhum tipo de controle da fase vapor do carvacrol na realização destas análises, em função da sua alta volatilidade. De fato, em estudo que determinou a dose inibitória mínima por contato gasoso, o carvacrol inibiu o crescimento de *S. aureus* (ATCC 25923) e *C. albicans* (ICB12) nas concentrações de 1 $mg.mL^{-1}$ de ar e 0,25 $mg.mL^{-1}$ de ar, respectivamente (FREITAS *et al*., 2013). A atividade antimicrobiana do carvacrol em fase vapor também foi observada pelo estudo de Lopez (2007), contra uma variedade de cepas bacterianas e fúngicas. Além disso, a rápida liberação de vapor de carvacrol apresentou alta ação antimicrobiana a partir do uso de nanogeradores foto-acionados, inativando significativamente S. *aureus* e *E. coli* por meio de contato gasoso (NONG *et al*., 2021).

Assim, os resultados da ação antimicrobiana do carvacrol decorrem da habilidade que o mesmo tem de acumular-se na membrana celular devido a sua hidrofobicidade, além da possibilidade que ele tem de formar ligações liberando prótons e por consequência, provocando alterações conformacionais na membrana, ocasionando morte celular (ARFA *et al*., 2006). No primeiro caso, a hidrofobicidade é explicada pelo caráter lipofílico do carvacrol que possibilita grande interação com a bicamada lipídica da membrana citoplasmática bacteriana, ficando alinhado às cadeias de ácidos graxos causando a expansão e desestabilização da estrutura da membrana, aumentando sua fluidez e permeabilidade (ALLAOUA *et al*., 2018; GARCÍA-SALINAS, 2018; MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018).

METODOLOGIA

Para a avaliação da atividade antifúngica *in vitro* o carvacrol (Sigma-Aldrich, USA) foi diluído em etanol 70% e sua concentração variou de 0,68-300 mM. Os fungos

filamentosos estudados foram *Colletotrichum gloeosporioides* (CBMAI 864), *Fusarium solani* (CCT 1204) e *Alternaria alternata* (CCT 2816). *C. gloeosporioides* e *A. alternata* foram cultivados em ágar extrato de malte e *F. solani* e *C.* sp. foram cultivados em ágar batata dextrose. O cultivo de *C. gloeosporioides* e de *C.* sp. foi realizado a 28 °C por oito dias, enquanto que os outros dois fungos foram cultivados a 25 °C por sete dias.

A determinação da CIM ocorreu através do método de microdiluição utilizando a microplaca de 96 poços (Fieira *et al*., 2013) e os fungos testados foram usados em uma concentração de 1×10^5 esporos.mL^{-1}. A borracha seladora de silicone (Axygen) foi utilizada devido a volatilização do carvacrol na microplaca. O crescimento do fungo foi acompanhado pela turbidez a 630 nm usando leitora TP Reader NM (Thermoplate, Curitiba, Brasil). O valor da CIM corresponde a menor concentração que o carvacrol causou 100% de inibição do crescimento dos fungos.

A CFM foi realizada retirando o volume total do poço que apresentou inibição, e esta alíquota foi adicionada em placas de Petri contendo o meio de cultivo adequado e plaqueadas pelo método de *spread plate*. Todos os ensaios microbiológicos foram conduzidos em triplicatas de duas repetições. Posteriormente as placas foram incubadas em estufas do tipo B.O.D. durante 7 dias e definido como CFM a menor concentração capaz de matar o fungo teste (Fieira *et al*., 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em trabalho prévio do grupo de pesquisa, Stadler (2018) obteve resultados de CIM para *Alternaria alternata*, *C. gloeosporioides* e *Fusarim solani* que diferiam entre si em função do protocolo de análise antifúngica em microescala em placa de 96 poços. Quando a análise era realizada sem o uso de uma borracha selante de silicone notou-se que na microplaca de 96 poços, as linhas adjacentes a linha de avaliação das diferentes concentrações de carvacrol, não havia ocorrido proliferação microbiana. Tal fato poderia estar relacionado com a capacidade que o carvacrol possui em inibir a proliferação de microrganismos na sua fase vapor, logo sem a vedação dos poços, aqueles onde a concentração empregada de carvacrol é pequena, sofre interferência da fase gasosa dos poços

em que foi utilizada maior concentração (LOPEZ *et al*., 2007). Assim, passou-se a empregar em suas análises antifúngicas uma borracha seladora para isolar a atmosfera gasosa de cada poço da microplaca de 96 poços (Tabela 1).

Com vistas a ampliar os conhecimentos sobre a capacidade antifúngica do carvacrol contra o gênero *Colletotrichum*, Bretschneider *et al*. (2019) relatou a inibição do crescimento de *Colletotrichum* sp. (Tabela 1)

Tabela 1 – CIM e CFM do carvacrol de análise antifúngica em meio líquido.

	Sem borracha		**Com borracha**	
Microrganismo	**CIM (µg.mL^{-1})**	**CFM (µg.mL^{-1})**	**CIM (µg.mL^{-1})**	**CFM (µg.mL^{-1})**
A. alternata	282	563	563	563
C. gloeosporioides	140	563	282	563
C. sp.	141	282	282	282
F. solani	3,51	282	70,8	282

Fonte: Autores, 2023.

Semelhantemente aos trabalhos prévios do grupo, as análises antifúngicas foram conduzidas usando a borracha seladora a fim de isolar a atmosfera gasosa de cada poço, para que os ensaios antifúngicos pudessem ser conduzidos de forma tal, a evitar interferência entre os poços, ou seja, garantido que não haja interferência ente os microensaios avaliados. A concentração fungicida mínima do carvacrol contra C. *gloeosporioides, C.* sp. e *A. alternata* foram superiores ao valor encontrados para a CIM conforme descritos para outros fungos do gênero *Aspergillus, Botrytis, Fusarium* (ABBASZADEH *et al*., 2014). Ainda, Semelhantemente a este trabalho que se baseou no método padrão de análise antifúngica pelo método de microdiluição (CLSI, 2002), Abbaszadeh *et al*., (2014) apresentou valores de CIM inferiores a 400 µg mL^{-1} do carvacrol para diferentes fungos, incluindo aqueles avaliados neste trabalho. Estes autores não fazem menção a ação antifúngica do carvacrol na fase vapor e tão pouco o uso da borracha seladora nos ensaios antifúngicos.

Os valores de CIM, mostrados na tabela 1, para os fungos avaliados foram de 2 a 8 vezes maiores quando se fez o uso da borracha seladora em comparação aos ensaios em que não se fez o isolamento da atmosfera de cada um dos 96 poços da microplaca. No entanto, o

carvacrol não foi capaz de modificar a CFM de todos os fungos avaliados, indicando que uma concentração eficaz para matar o microrganismo pode não ocorrer na fase de vapor. Assim, a utilização da borracha seladora permitiu definir a CIM de forma inequívoca.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O carvacrol inibiu a proliferação dos microrganismos estudados nas análises antifúngicas *in vitro* em microplacas de 96 poços. A presença da borracha de silicone na análise limitou ação antifúngica do carvacrol na fase vapor e assim, A. *alternata*, *C.* sp., *C. gloeosporioides* e *F. solani* foram mais resistentes a sua ação. Os ensaios antimicrobianos em meio líquido em placa de 96 poços utilizando agentes antimicrobianos com capacidade de expressar sua atividade biológica na fase vapor como é o caso do carvacrol, devem ser realizados com o uso de borracha seladora.

REFERÊNCIAS

ABBASZADEH, S. *et al*. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal of Mycologie Médicale*, v. 24, n. 2, p.51-56, 2014.

ADDO, K A.; LI, H.; YU, Y.; XIAO, X. Unraveling the mechanism of the synergistic antimicrobial effect of cineole and carvacrol on Escherichia coli O157:H7 inhibition and its application on fresh-cut cucumbers. *Food Control*, v. 144, 2023.

ARAUJO, M. M de; LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de Origanum vulgare (orégano) diante das cepas de Escherichia coli e Staphylococcus aureus. *Arquivos do Instituto Biológico*., v.83, p.1-7, 2016.

ARFA, A. B. *et al*. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, v.43, n.2, p.149-154, 2006.

ALLAOUA, M. et al. Pharmacokinetic and antimicrobial activity of a new carvacrol-based product against a human pathogen, Campylobacter jejuni**.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 125, p. 1162-1174, 2018.

BASER, K. H. C. Atividades Biológicas e Farmacológicas de Carvacrol e Carvacrol Bearing Essential Oils. *Atual Projeto Farmacêutico*, v. 14, p. 3106-3120, 2008.

BRETSCHNEIDER, F. G. B., *et al*. Atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de revestimento comestível ativo contra *Colletotrichum* sp. *Higiene Alimentar*, v.33, p.2687-2691, 2019.

CACCIATORE, F. A., *et al*. Carvacrol encapsulation into nanoparticles produced from chia and flaxseed mucilage: Characterization, stability and antimicrobial activity against *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, v. 108, n. 104116, 2022.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, CLSI Document M27-A2*. CLSI, ed., 2002.

DUTOT, M.; NELSON, L.M.; TYSON, R.C. Predicting the spread of postharvest disease in stored fruit, with application to apples. *Postharvest Biology and Technology*, v. 85, n. 1, p. 45–56, 2013.

FIEIRA, C.; OLIVEIRA, F.; CALEGARI, R.P.; MACHADO, A.; COELHO, A.R. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of natural inhibitors against *Penicillium expansum***.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 33, p. 40-46, 2013.

FREITAS, M. A., *et al*. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do carvacrol através dos métodos de contato direto e gasoso. *Bioscience Journal*, v. 29, n. 3, p. 781-786, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. *Global Food Losses and Food Waste: Extent, causes and prevention*. Rome, 2011.Disponível em: < https://www.fao.org/sustainable-food-value-chains/library/details/en/c/266053/>. Acessado em: maio/2023.

GARCÍA-SALINAS, S. *et al*. Evaluation of the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Different Components of Natural Origin Present in Essential Oils. *Molecules*, [S.L.], v. 23, n. 6, p. 1399, 8 jun. 2018.

LANDRY, K. S.; MICHELI, S.; MCCLEMENTS D. J.; MCLANDSBOROUGH, L. Effectiveness of a spontaneous carvacrol nanoemulsion against *Salmonella enterica Enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 on contaminated broccoli and radish seeds. *Food Microbiology*, v. 51, n. 1, p.10-17, 2015.

LOPEZ, P *et al* . Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 1, p. 4348-4356, 2007.

MARINELLI, L.; STEFANO, A.; CACCIATORE, I. Carvacrol and its derivatives as antibacterial agents. *Phytochemistry Reviews*, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 903-921, 16 abr. 2018.

MI, T.; *et al*. Carvacrol exhibits direct antifungal activity against stem-end rot disease and induces disease resistance to stem-end rot disease in kiwifruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 127, n. 102065, 2023.

NONG, W., *et al*. Photo-triggered on-demand carvacrol vapor release from nano-generators for non-contact bacterial inactivation between nanomaterials and bacteria. *Chemical Engineering Journal*, v. 420, n. 1, 2021.

ULTEE, A. *et al*. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*, v. 63, n. 5, p. 620-624, 2000.

RAJENDRAN, S. Acute toxic effect of pesticides on human beings: A review. *Research and Reviews: Journal of Chemistry*, v. 5, n. 2, p. 99-106, 2016.

REIS, A.; COSTA, H. *Principais doenças do morangueiro no Brasil e seu controle*. Brasília: Embrapa, 2012.

RYU, V. *et al*. Effect of ripening inhibitor type on formation, stability, and antimicrobial activity of thyme oil nanoemulsion. *Food Chemistry***,** v. 245, n.1, p. 104-111, 2018.

SHARIFI-RAD, M. *et al*. Carvacrol and human health: A comprehensive review. Phytother Research, v. 1 n. 1 p. 1-13, 2018.

SILVA, L. R. *et al*. Estimativa e causas de perdas pós-colheita de frutas frescas na Microrregião de Chapadinha, MA, Brasil. *Revista Agroambiente On-line***,** v. 12, n. 4, p. 288-299, 2018.

SISTEMA DE APOIO A MICRO E PEQUENA EMPRESA – SEBRAE. Agronegócio Fruticultura. Brasília: SEBRAE, 2015. 5 p. (Boletim Técnico).

SIVAKUMAR, D.; BAUTISTA-BAÑOS, S. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*, v. 64, n. 1, p. 27-37, 2014

STADLER, F. *Antifúngicos naturais e tiabendazol no controle de Colletotrichum gloeosporioides, Alternaria alternata e Fusarium solani*. 2018. 76 p. Dissertação - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2018.

SUNTRES, Z. E.; COCCIMIGLIO, J.; ALIPOUR, M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 55, n. 3, p. 304-318, 2015.

VAN LONG, N.N.; JOLY, C.; DANTIGNY, P. Active packaging with antifungal activities, *International Journal of Food Microbiology*, v. 220, p. 73 – 90, 2016.

OCHOA-VELASCO, C. E., *et al*. Starch Edible Films/Coatings Added with Carvacrol and Thymol: In Vitro and In Vivo Evaluation against Colletotrichum gloeosporioides. **Alimentos**, v. 10, n. 1, p. 175, 2021.

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