

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

FRANCIÉLLY STADLER

**ANTIFÚNGICOS NATURAIS E TIABENDAZOL NO CONTROLE DE**  
*Colletotrichum gloesporioides, Alternaria alternata e Fusarium solani*

DISSERTAÇÃO

LONDRINA  
2018

FRANCIÉLLY STADLER

**ANTIFÚNGICOS NATURAIS E TIABENDAZOL NO CONTROLE DE**  
***Colletotrichum gloesporioides*, *Alternaria alternata* e *Fusarium solani***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Machado-Lunkes  
Coorientador: Prof. Dr. Eder da Costa dos Santos

LONDRINA  
2018

## TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

S777a Stadler, Franciélly

Antifúngicos naturais e tiabendazol no controle de *Colletotrichum gloesporioides*,  
*Alternaria alternata* e *Fusarium solani* / Franciélly Stadler. - Londrina : [s.n.], 2018.  
76 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Alessandra Machado-Lunkes

Coorientador: Prof. Dr. Eder da Costa dos Santos

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Londrina, 2018.

Bibliografia: f. 38-47.

1. Pragas agrícolas - Controle. 2. Compostos bioativos. 3. Peptídeos. 4. Fungicidas.  
5. Testes microbiológicos. I. Machado-Lunkes, Alessandra, orient. II. Santos, Eder da  
Costa dos, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de  
Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. V. Título.

CDD: 664

---

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Título da Dissertação n. \_\_\_\_**

**ANTIFÚNGICOS NATURAIS E TIABENDAZOL NO CONTROLE DE  
*Colletotrichum gloesporioides*, *Alternaria alternata* e *Fusarium solani***

por

**FRANCIÉLLY STADLER**

**Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos, pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTAL – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Câmpus Londrina às 8 h de 01 de setembro de 2018. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta por:**

---

Dr<sup>a</sup>. Alessandra Machado-Lunkes  
Orientadora  
UTFPR Câmpus Francisco Beltrão

---

Dr.<sup>a</sup> Kérley Braga Pereira Bento Casaril  
Membro Titular  
UNIOESTE Câmpus Francisco Beltrão

---

Dr<sup>a</sup>. Elisabete Hiromi Hashimoto  
Membro Titular  
UTFPR Câmpus Ponta Grossa

Visto da coordenação:

---

Dr<sup>a</sup>. Lucia Felicidade Dias  
(Coordenadora do PPGTAL)

A folha de aprovação assinada encontra-se arquivada na secretaria do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos

## **AGRADECIMENTOS**

A Professora Alessandra Machado Lunkes e ao Professor Eder da Costa dos Santos por não medirem esforços para me auxiliar, pela orientação, pelos grandes ensinamentos e pela motivação ao longo do caminho

A professora Dra. Maria Terêsa Machini pela possibilidade de realizar a síntese química em seu laboratório.

Aos alunos de Iniciação Científica Felipe Guilherme Bretschneider, Cláudia Moreira, Amanda Adria e Jhonatan Dannebrock, pela ajuda na realização dos ensaios biológicos.

Aos Laboratoristas e aos colegas de laboratório pelos momentos compartilhados.

Aos colegas Rosemar Frigotto Saggin e Ronaldo Santos pelos momentos compartilhados.

A família pelo apoio, por estarem ao meu lado ao longo desses três anos.

*“Você pode ser o que você quiser ser, ou o que os outros querem que você seja.”*

## RESUMO

STADLER, Franciély. **Antifúngicos naturais e tiabendazol no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata* e *Fusarium solani***. 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2018.

A fruticultura contribui expressivamente no agronegócio brasileiro, entretanto, a perda pós-colheita pode chegar a 30 % da produção de frutas, sendo a infecção por fungos patogênicos uma das principais causas. A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* está envolvida na deterioração de frutas como mamão, manga, maracujá, acacate, fruta do conde e morango, *Fusarium solani* no mamão e maracujá e *Alternaria alternata* em mamão, citrus, morango, melão e manga. Devido ao surgimento de cepas fúngicas resistentes, cresce a preocupação com a segurança alimentar e questões ambientais, elevando o interesse por métodos alternativos para o controle das perdas pós-colheita. Neste contexto, compostos naturais, dentre eles os peptídeos antimicrobianos e o carvacrol vêm se destacando como uma alternativa no controle devido a sua alta especificidade, baixo nível de resistência e amplo espectro de ação. O presente estudo objetivou sintetizar quimicamente e aplicar dipeptídeos como agentes antifúngicos, assim como aplicar o carvacrol isolado e em combinação com o tiabendazol como antifúngicos. Os peptídeos c(D-Tyr-L-Leu) e c(D-Pro-D-Tyr) foram sintetizados em fase líquida pelo acoplamento entre resíduos de aminoácidos protegidos e as reações de ciclização dos dipeptídeos esterificados sob refluxo. Os produtos sintéticos foram analisados em cromatógrafo líquido e sua identidade química confirmada por espectrometria de massas. A atividade antifúngica dos compostos foi avaliada em ensaio *in vitro* pelo método de microdiluição contra *C. gloeosporioides*, *F. solani* e *A. alternata*. O ensaio de sinergismo foi realizado através do método “tabuleiro de xadrez”. O c(D-Tyr-L-Leu) e c(D-Pro-D-Tyr) não apresentaram ação inibitória contra *C. gloeosporioides*, *F. solani* e *A. alternata* nas concentrações avaliadas. O carvacrol apresentou CIM de  $282 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $282 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $563 \mu\text{g mL}^{-1}$ , para *C. gloeosporioides*, *F. solani* e *A. alternata*, respectivamente. Ainda, foi capaz de matar estes três fungos na concentração  $563 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O carvacrol quando associado ao tiabendazol mostrou efeito aditivo contra *C. gloeosporioides* (FICI 0,5) e sinérgico contra *A. alternata* (FICI 0,141). Desta maneira, foi possível reduzir a concentração do carvacrol e do tiabendazol em 75% para o *C. gloeosporioides* e em 87,5% e 98,4% para *A. alternata*, respectivamente. A combinação de carvacrol com tiabendazol é uma proposta de redução da quantidade de antimicrobianos comerciais a ser aplicado na fruticultura.

**Palavras-chave:** Peptídeos antimicrobianos. Diketopiperazina. Antifúngico, Concentração inibitória mínima.

## ABSTRACT

STADLER, Franciély. **Natural antifungals and thiabendazole in the control of *Colletotrichum gloesporioides*, *Alternaria alternata* and *Fusarium solani***. 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Federal Technology University - Parana. Londrina, 2018.

Fruit production contributes significantly to the Brazilian agribusiness, however, post-harvest loss can reach up to 30% of fruit production, and pathogenic fungal infection is one of the main causes. The anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum gloesporioides*, is involved in the deterioration of fruits such as papaya, mango, passion fruit, avocado, sugar-apple and strawberry, *Fusarium solani* in papaya and passion fruit and *Alternaria alternata* in papaya, citrus, strawberry, melon and mango. Due to the emergence of resistant fungal strains, concern for food safety and environmental issues has grown, raising interest in alternative methods to control post-harvest losses. In this context, natural compounds, among them antimicrobial peptides and carvacrol, have been highlighted as an alternative in the control due to their high specificity, low level of resistance and wide spectrum of action. The present study aimed to chemically synthesize and to apply dipeptides as antifungal agents, as well as to apply carvacrol alone and in combination with thiabendazole as antifungal agents. Material and methods: peptides c(D-Tyr-L-Leu) and c(D-Pro-D-Tyr) were synthesized in the liquid phase by the coupling between protected amino acid residues and the cyclization reactions of the esterified dipeptides under reflux. The synthetic products were analyzed in liquid chromatograph and their chemical identity confirmed by mass spectrometry. The antifungal activity of the compounds was evaluated *in vitro* by the microdilution method against *C. gloesporioides*, *F. solani* and *A. alternata*. The synergism test was performed using the "checkerboard" method. The c(D-Tyr-L-Leu) and c(D-Pro-D-Tyr) showed no inhibitory action against *C. gloesporioides*, *F. solani* and *A. alternata* at the concentrations evaluated. Carvacrol presented MICs of 282  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 282  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 563  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for *C. gloesporioides*, *F. solani* and *A. alternata*, respectively. Yet, it was able to kill these three fungi in concentration of 563  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . When carvacrol was associated with thiabendazole, it showed an additive effect against *C. gloesporioides* (FICI 0.5) and synergistic against *A. alternata* (FICI 0.141). This way, it was possible to reduce the concentration of carvacrol and thiabendazole by 75% for *C. gloesporioides* and 87.5% and 98.4% for *A. alternata*, respectively. The combination of carvacrol and thiabendazole is a proposal to reduce the amount of commercial antimicrobials to be applied in fruit farming.

**Keywords:** Antimicrobial peptides. Diketopiperazine. Antifungal. Minimum inhibitory concentration.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Artigo 1

Figura 1 - Esquema geral de síntese dos dipeptídeos cíclicos.....	53
Figura 2 - Perfil cromatográfico em CLAE-FR do c(D-Tyr-L-Leu) (A) e c(D-Pro-D-Tyr) (B).....	54
Figura 3 - Perfis cromatográficos em CLAE-FR do Boc-D-Pro-D-Tyr-OMe (A) e de seu produto bruto de ciclização (B).....	55
Figura 4 – Diferença entre a coloração das cepas de <i>C. gloesporioides</i> do presente trabalho e de Kumar et al., (2013).....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações dos compostos antifúngicos testados.....	34
<b>Artigo 1</b>	
Tabela 1 - Dados cromatográficos e pureza dos dipeptídeos cíclicos.....	54
Tabela 2 - Massa molar dos dipeptídeos na análise por espectrometria de massas.....	55
<b>Artigo 2</b>	
Tabela 1 – CIM do carvacrol com e sem o uso da borracha seladora de microplaca.....	68
Tabela 2 – Interação entre carvacrol e tiabendazol pelo método do “tabuleiro de xadrez” .....	70

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AFPs	Peptídeos Antifúngicos
AMPs	Peptídeos Antimicrobianos
CBMAI	Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria
CCT	Coleção de Culturas Tropical
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionária
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase inversa
DCM	Diclorometano
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI-MS	Espectrometria de massas de ionização por electrospray
HOBt	N-hidroxibenzotriazol
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
Leu	Leucina
MeOH	Metanol
Pro	Prolina
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético
T <sub>r</sub>	Tempo de retenção
Tyr	Tirosina
UFC	Unidade Formadora de Colônias

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
3.1 PERDAS PÓS-COLHEITA DO MAMÃO.....	16
3.2 RESISTÊNCIA MICROBIANA AOS ANTIFÚNGICOS COMERCIAIS.....	17
3.3 COMPOSTOS BIOATIVOS.....	20
3.3.1 Carvacrol.....	21
3.3.2 Peptídeos Antifúngicos.....	23
3.3.2.1 Dipeptídeos cíclicos.....	27
3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS NATURAIS E COMERCIAIS COMBINADOS.....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
4.1 CEPAS FÚNGICAS TESTADAS.....	32
4.2 MEIOS DE CULTURA.....	32
4.3 REAGENTES E SOLVENTES QUÍMICOS.....	33
4.4 DILUIÇÃO DOS COMPOSTOS NATURAIS PARA AS ANÁLISES ANTIFÚNGICAS.....	33
4.5 PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	34
4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	34
4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA.....	35
4.8 SINERGISMO ENTRE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS NATURAIS E COMERCIAIS.....	35
4.9 SÍNTESE QUÍMICA E PURIFICAÇÃO DOS DIPEPTÍDEOS.....	36
4.10 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	37
<b>REFERENCIAS</b> .....	38
<b>RESULTADOS</b> .....	48
ARTIGO 1.....	49
SÍNTESE QUÍMICA DE DIPEPTÍDEOS E ANÁLISE ANTIMICROBIANA CONTRA <i>Colletotrichum gloesporioides</i> , <i>Fusarium solani</i> e <i>Alternaria alternata</i>	
ARTIGO 2.....	63
COMBINAÇÃO DE CARVACROL E TIABENDAZOL CONTRA <i>Colletotrichum</i>	

*gloesporioides, Fusarium solani e Alternaria alternata*

<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	76
-----------------------------------	----

## 1 INTRODUÇÃO

A produção nacional de frutas supera os 40,0 milhões de toneladas, sendo o Brasil o responsável por 4,8 % do volume mundial colhido (DERAL, 2014). Devido à grande variedade de culturas a fruticultura vem conquistando resultados expressivos para o agronegócio brasileiro (SEBRAE, 2015). Contudo, melhorias em alguns aspectos são imprescindíveis para a manutenção da competitividade do setor, como o aumento da eficiência produtiva e a redução das perdas pós-colheita (COSTA; GUILHOTO; BURNQUIST, 2015). De fato, o Brasil possui 30% da sua produção de frutas e hortaliças desperdiçadas na pós-colheita (FAO, 2011; SEBRAE, 2015) sendo a deterioração por fungos uma das principais causas destas perdas (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2013; ALKAN; FORTES, 2015).

Atualmente, o principal método de controle dessas doenças são os fungicidas comerciais. Porém, com o uso frequente, e recorrente, destes defensivos agrícolas aumentam a pressão de seleção natural de cepas de microrganismos resistentes (NUNES, 2012). Além disso, seu uso indiscriminado na agricultura é um problema de saúde pública (PIGNATI et al., 2017). Por esta razão, existe uma crescente preocupação relacionada à segurança alimentar e ao meio ambiente. Conseqüentemente, isto eleva o interesse por métodos alternativos para o controle das perdas pós-colheita (NUNES, 2012).

Nesse contexto, os produtos naturais vêm se destacando, dentre eles o carvacrol e peptídeos antimicrobianos, ambos reconhecidos na literatura por suas variadas ações biológicas (PAPALIA, 2012; NOSTRO; GYAWALI; IBRAHIM, 2014; KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018).

O carvacrol, é um monoterpeno presente no orégano e tomilho, usado em alimentos como aromatizante e conservante, além de poder ser aplicado como um agente antimicrobiano contra microrganismos resistentes a antibióticos comerciais (SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015; MOHAMMAD et al., 2017). Entretanto, seu uso é limitado em alimentos, por causar alterações de sabor e aroma, (ZHOU et al., 2007). Buscando a redução da concentração de carvacrol aplicado, esse composto natural, a combinação com outros compostos antimicrobianos vêm sendo estudada (BURT, 2004; ZHOU et al., 2007; ALVES et al., 2016).

Os peptídeos antifúngicos possuem alta especificidade, baixo nível de resistência e amplo espectro de ação, sendo considerados de grande potencial para a indústria de alimentos. A maioria dos peptídeos antifúngicos possui entre 11 a 20 resíduos de aminoácidos e a tendência é sintetizar peptídeos cada vez mais curtos em busca da redução de custos (AKKAM, 2016). Assim, os dipeptídeos cíclicos, constituídos por dois resíduos de aminoácidos, produzidos de forma sintética vêm de encontro a essa tendência (CROWLEY; MAHONY; SINDEREN, 2013; PERZBORN; SYLDATK; RUDAT, 2013). Dentre os naturais, foi reportado que o dipeptídeo cíclico c(D-Tyr-L-Leu) mostrou atividade antifúngica *in vitro* contra *C. gloeosporioides* (KUMAR et al., 2013). O ciclo c(D-Pro-D-Tyr) também foi estudado, e mostrou atividade contra alguns fungos incidentes no mamão, como, *Rhizoctonia sonali*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. (KUMAR; NAMBISAN; MOHANDAS, 2014).

A redução de perdas através de soluções eficientes na cadeia produtiva agroindustrial torna-se essencial para garantir a segurança alimentar e nutricional, e, representa ganhos econômicos substanciais. Estudos mostram que a diminuição das perdas pode ampliar o valor da produção agrícola para R\$ 9,8 bilhões, elevando em R\$ 18 bilhões o valor da economia e, em 9,7 bilhões o produto interno bruto do país, e ainda, pode gerar mais de 300 mil empregos (FAO, 2011; COSTA; GUILHOTO; BURNQUIST, 2015).

Frente a este panorama de crescente importância da fruticultura no país, e a problemática perda de frutos na pós-colheita, este trabalho pretendeu usar as potencialidades antifúngicas do carvacrol e dos peptídeos antifúngicos no combate aos fungos deteriorantes do mamão. Adicionalmente, usar estes antifúngicos em baixas concentrações a fim atingir o efeito antimicrobiano na menor concentração possível, minimizando alterações indesejáveis nos alimentos e reduzindo o custo de aplicação.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Aplicar antifúngicos naturais isolados ou em combinação com o tiabendazol no controle da proliferação de *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium solani* e *Alternaria alternata*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade fungistática *in vitro* dos compostos naturais, c(D-Tyr-L-Leu) e c(D-Pro-D-Tyr) e carvacrol contra *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium solani* e *Alternaria alternata*;
- Determinar a ação fungicida dos compostos naturais que apresentaram ação fungistática;
- Testar o carvacrol e o tiabendazol de forma associada na inibição da multiplicação de *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium solani* e *Alternaria alternata*.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 PERDAS PÓS-COLHEITA DO MAMÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, com uma produção de 40,9 milhões de toneladas em 2015. Esses expressivos resultados na oferta de frutas tropicais e de clima temperado devem-se a ampla diversidade de genótipos de culturas e a vasta variedade de condições edafoclimáticas do país (SEBRAE, 2015, DERAL, 2017). O mamão é de grande importância econômica, social e nutricional, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial da fruta (FAO, 2014), com uma produção, em 2016, de mais de 1,5 milhões de toneladas em uma área plantada superior a 30 mil hectares e um valor da produção de 1,2 milhões de reais (IBGE, 2016).

Em média, 30% da produção nacional de frutas é desperdiçada (FAO, 2011; SEBRAE, 2015). Porém no mamão, a incidência de doenças fúngicas no período pós-colheita pode chegar a 70% em alguns estados do Brasil, evidenciando a importância econômica oriunda das perdas desse período na fruta (FURTUNATO et al., 2015).

O mamão é cultivado na maioria das regiões tropicais e subtropicais do mundo (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2013). Está em sexto lugar entre as frutas exportadas, com 33.688 toneladas em 2014, ficando atrás somente do melão, manga, limão, banana e maçã (SEBRAE, 2015). Porém seu período de conservação é curto devido ao rápido amadurecimento e à deterioração pós-colheita (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2013; GALO et al., 2014). Possui altas taxas de perdas (40%) quando comparado a outras frutas, como manga (20%), melão (20%), melancia (20%), uva (20%) e laranja (15%), além de um curto período de armazenamento de até três semanas (EMBRAPA, 2013).

Distúrbios fisiológicos como sardas na pele (perda de látex), translucidez (acúmulo de água no apoplasto), amaciamento (deficiência de cálcio) ou grumos duros na polpa (inativação da parede celular por altas temperaturas) afetam negativamente a qualidade da fruta e reduzem sua vida de prateleira (OLIVEIRA; VITÓRIA, 2011).

A podridão durante o armazenamento é um dos principais problemas associados à comercialização do mamão, sendo que as doenças nessa fruta estão em sua maioria associadas a fungos (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2013; ONIHA; EGWARI, 2015).

Infecções fúngicas podem acontecer nas fases de produção agrícola (20%), manuseio e armazenamento (10%), processamento e embalagem (20%), distribuição (12%) e consumo familiar (10%). A redução dos mecanismos de defesa da fruta após a colheita pode explicar o aumento da incidência de fungos nesse período (FAO, 2011; ONIHA; EGWARI, 2015).

Durante o processo de amadurecimento dos frutos ocorrem inúmeras alterações fisiológicas que aumentam a susceptibilidade e facilitam à infecção e desenvolvimento de microrganismos deteriorantes. Fungos fitopatogênicos podem estar presentes na fruta verde e permanecerem, na forma latente, da maturação à senescência (ALKAN; FORTES, 2015).

Tais perdas acarretam um desperdício de importantes recursos, como solo, água, energia e insumos, utilizados na produção, assim como, emissões desnecessárias de gases de efeito estufa. Tudo isso impacta diretamente na segurança alimentar (em termos de produção de alimentos) e no desenvolvimento econômico (FAO, 2011; COSTA; GUILHOTO; BURNQUIST, 2015).

Os mais frequentes fitopatógenos do mamão são *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium* spp., *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Rhizopus* spp., *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus* spp., *Curvularia* spp., *Penicillium* spp. e *Phomopsis caricae-papayae*. A antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* pode ser a principal patologia pós-colheita do mamão (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2013; FURTUNATO et al., 2015; ONIHA; EGWARI, 2015).

### 3.2 RESISTÊNCIA MICROBIANA AOS ANTIFUNGICOS COMERCIAIS

Os fungicidas comerciais são o principal método de controle de doença pós colheitas em frutos. Porém cresce a preocupação com questões ambientais, segurança alimentar e o aumento de patógenos resistentes (OLIVEIRA et al., 2015).

A Índia, maior produtor mundial de frutas segundo a FAO (2014), distribui quase noventa mil toneladas de pesticidas nos campos. O uso indiscriminado de pesticidas está contaminando a terra, a água, o ar e os alimentos (RAJENDRAN, 2016). O Brasil está entre os maiores consumidores de agrotóxicos no mundo, seu uso na agricultura é um problema de saúde pública, tendo em vista as contaminações no ambiente, em alimentos e as intoxicações na saúde humana (PIGNATI et al., 2017).

Os principais fungicidas utilizados em algumas plantas frutíferas e especificamente no mamão, fruta com elevados índices de perdas, são o tiabendazol e BenomyI<sup>®</sup>, que não são utilizados em vários países devido à propensão à resistência do fungo e a efeitos nocivos à saúde humana. Além disso, sua aplicação leva à produção de águas residuais que exigem desintoxicação (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2013; PERRUCHON et al., 2017).

O tiabendazol é um antifúngico de amplo espectro, pois age contra fungos patogênicos de várias plantas. O composto não apresenta cor, nem cheiro, quando aplicado na planta é rapidamente absorvido pelas raízes e então difundido para toda a planta. É considerado seguro, de baixa toxicidade para pessoas e animais (ROBINSON; PHARES; GRAESSLE, 1978). SÉIDE et al. (2015) afirmam que fungicidas comerciais podem causar hepatotoxicidade em humanos. O que pode gerar um grave problema de saúde pública. Em seu estudo, concluiu que o tiabendazol pode suprimir hepatócitos por apoptose, o que indica dano hepático e morte celular.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2018) todos os agrotóxicos causam algum tipo de dano à saúde humana se não forem utilizados de forma adequada. A exposição em longo prazo, em doses relativamente pequenas, a exposição crônica dos trabalhadores, ou ainda a ingestão de alimentos com resíduos pela população podem causar anomalias na gravidez, com morte fetal e mal formações das crianças; anomalias das glândulas de homens e mulheres que se traduzem pela infertilidade, a feminização masculina, tumores de tireóide, de testículos, próstata, mamas e ovários; o aparecimento de câncer; as anomalias dos cromossomos que passam de uma geração a outra, entre outros.

A eliminação desses compostos em estações de tratamento de água convencionais é praticamente nula, conseqüentemente os resíduos desses compostos são descarregados na natureza, agravando ainda mais o potencial de resistência dos microrganismos (PÉREZ et al., 2013).

O uso de produtos químicos inadequados, em quantidades superiores ao necessário, assim como colheita logo após a pulverização fazem com que hajam níveis excessivos de pesticidas em vegetais, frutas, legumes e grãos. Esses resíduos podem causar inúmeras complicações à saúde, como câncer, defeitos genéticos e impotência (RAJENDRAN, 2016). Existem cepas resistentes para quase todas as classes de fungicidas agrícolas (ISHII, 2006; DEISING; REIMANN; PASCHOLATI, 2008). O tipo de resistência depende de vários fatores, como o modo de ação, o gene-alvo único, a extensão da aplicação, a exclusividade de uso, a taxa de crescimento do fungo e a resistência cruzada na classe fungicida (CAMPBELL; CHAN; KIM, 2012).

Crescem os obstáculos no uso de agentes antifúngicos na agricultura, além do desenvolvimento de resistência microbiana, outras questões que preocupam são os elevados custos e os efeitos colaterais dos compostos comerciais. Esses problemas são intensificados devido aos esforços para controle de microrganismos resistentes, onde são usadas doses cada vez maiores, por períodos mais prolongados (CAMPBELL; CHAN; KIM, 2012). Outro problema a ser considerado é a toxicidade à saúde humana. A resistência cruzada dos fungos infecciosos humanos pode ser uma consequência dos fungicidas aplicados na agricultura. Isso pode acontecer com os triazóis, agentes antifúngicos usados na agricultura e na medicina (FISHER, et al., 2018).

O mecanismo de resistência pode acontecer pela mutação de um aminoácido de proteína do fungo alvo, tornando o antifúngico ineficaz, independentemente da quantidade aplicada. Outros tipos de resistência incluem a redução da absorção do fungicida devido a estrutura alterada da membrana, a superexpressão do gene alvo ou a degradação do fungicida (CAMPBELL; CHAN; KIM, 2012).

Apesar dos avanços nos antifúngicos comerciais, o aumento dos casos de infecção e resistência a antifúngicos é preocupante, o que torna difícil o controle de doenças fúngicas (SCORZONI et al., 2017). CABAN et al. (2009) avaliaram a resistência de cepas de *Penicillium expansum* isoladas de maçãs ao tiabendazol, concluindo que até 69% das cepas apresentavam resistência. Evidencia-se a importância do desenvolvimento de novos agentes antifúngicos com novos mecanismos de ação, tanto para a proteção humana quanto vegetal (JIANG et al., 2008; WEERDEN; BLEACKLEY; ANDERSON, 2013; AKKAM, 2016). Surge então

com grande relevância a ideia do emprego de produtos naturais para controle de doenças pós-colheita como alternativa à fungicidas sintéticos comerciais (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2013).

### 3.3 COMPOSTOS BIOATIVOS

O uso inadequado de antimicrobianos resultou no aumento da resistência de alguns microrganismos, incluindo patógenos transmitidos pelos alimentos. Os mesmos, além de resistentes aos antimicrobianos, estão tornando-se tolerantes aos métodos de conservação de alimentos. Além disso, os consumidores estão mais atentos quanto o impacto negativo dos conservantes artificiais (sintéticos) à saúde (GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

Alimentos processados com concentrações mínimas de aditivos alimentares são uma tendência crescente entre os consumidores (PINHEIRO et al., 2011). Para tanto se faz necessário o desenvolvimento de bioprocessos que possibilitem a produção ou extração de compostos bioativos de origem natural (MARTINS et al., 2011).

Os compostos bioativos são naturalmente produzidos e isolados a partir de plantas, animais, bactérias, algas e fungos, e também fazem parte dos sistemas de defesa do hospedeiro (BARREIRO; BOLZANI, 2009; GYAWALI; IBRAHIM, 2014). O Brasil, possui vasta diversidade biológica, que está fortemente vinculada a alternativas para a descoberta de novos compostos antifúngicos. Os avanços são em sua maior parte baseados em produtos naturais, estes aprovados por órgãos fiscalizadores em todo o mundo. Neste sentido, a química de compostos naturais é de grande impacto na descoberta e síntese de novos compostos antifúngicos (BARREIRO, 2009).

Compostos naturais, como a natamicina, a nisina, os óleos essenciais de plantas vem sendo relatados como agentes antimicrobianos contra microrganismos patogênicos e deteriorantes (MARCHESE et al., 2016; DALHOFF, 2018; JHONSON et al., 2018). E assim, a ação conservante destes compostos naturais pode contribuir com a redução das etapas de processamento físico dos alimentos, que muitas vezes

altera as propriedades organolépticas dos mesmos (JUNEJA; DWIVEDI; YAN, 2012).

O emprego de compostos bioativos na indústria de alimentos é uma abordagem alternativa e segura para o controle de patógenos, no intuito de melhorar a segurança, a qualidade e, estender a vida útil dos alimentos, inibindo o crescimento de células microbianas (JUNEJA; DWIVEDI; YAN, 2012). Além de ação antimicrobiana, podem apresentar ação antioxidante (ALVES-SILVA et al., 2013), anti-inflamatória (MICHALAK; CHOJNACKA, 2015) antitumoral (RAFFA et al., 2017) e contra doenças cardiovasculares (RANGEL-HUERTA et al., 2015).

Compostos bioativos são considerados uma inovação no que se refere a segurança alimentar, normalmente não alteram as propriedades sensoriais como sabor, odor, cor, textura e valor nutricional do produto. Entretanto, podem impactar em alguns aspectos intrínsecos e extrínsecos, na formulação e no armazenamento de alimentos, o que justifica a necessidade de estudos detalhados, com abordagens quantitativas, para avaliar a eficiência antimicrobiana (TIWARI et al., 2009).

Para incorporação desses agentes bioativos em frutas, uma opção que vem sendo estudada são os revestimentos comestíveis, uma tecnologia ambientalmente segura, que controla os processos de oxidação, a transferência de umidade e a troca de gases (DHALL, 2013; RAGHAV; AGARWAL; SAINI, 2016).

### 3.3.1 Carvacrol

A fim de reduzir a contaminação microbiana, os óleos essenciais podem ser aplicados em indústrias de alimentos e bebidas (MIRANDA et al., 2016). Eles são líquidos, voláteis, límpidos e normalmente sem cor; podem ser solubilizados em solventes orgânicos ou em lipídeos e sua densidade é em geral mais baixa que a da água. Estudos evidenciam que os óleos essenciais sejam uma opção ambiental e economicamente viável para substituição ou ação conjunta a antioxidantes e antimicrobianos tradicionais, buscando reduzir a quantidade dessas substâncias nos alimentos, através do efeito sinérgico entre os produtos (MARCHESE et al., 2016; MIRANDA et al., 2016).

Carvacrol é um fenol monoterpênico presente majoritariamente no óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare*) sendo assim, o principal responsável pelas atividades biológicas do orégano (BASER, 2008). Este composto natural, cujo nome IUPAc é 5-isopropil 2-metilfenol, está presente também no tomilho (*Thymus vulgaris*) (RYU et al., 2018) e alecrim-pimenta (*Lippia sidoides Cham*) (COSTA et al., 2007).

O carvacrol é obtido biosinteticamente a partir do  $\gamma$ -terpineno com o auxílio de *p*-isopropil tolueno, não podendo ser citado como derivado do fenol (BASER, 2018). Pode ainda ser sintetizado quimicamente ou obtido por métodos biotecnológicos. Ele apresenta características lipofílicas, é insolúvel em água e altamente solúvel em etanol, éter etílico e acetona. Ainda, sua densidade é de 0,976 g mL<sup>-1</sup> em temperatura ambiente (SHARIFI-RAD et al., 2018).

Estudos *in vitro* e *in vivo* do carvacrol evidenciam uma ampla variedade de propriedades farmacológicas e biológicas, como antibacteriana, antifúngica, antioxidantes, anticancerígenos, antígenotóxica, antimutagênica, analgésica, antiespasmódica, espasmolítica, angiogênica, anti-inflamatória, antiagregante plaquetária, antiparasitária, inseticida, anti-hepatotóxica e hepatoprotetora (BASER, 2008; SEOW et al., 2014; SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015).

Pode ser aplicado como um agente antimicrobiano alternativo contra bactérias patogênicas resistentes (MOHAMMAD et al., 2017), assim como patógenos presentes em alimentos, como *Escherichia coli*, *Salmonella* (LANDRY et al., 2015) e *Bacillus cereus* (ULTEE, et al., 2000) e 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).

A ação antimicrobiana do carvacrol se deve ao grupo hidroxila livre, sua hidrofobicidade e sua porção fenólica (SHARIFI-RAD et al., 2018). De acordo com RAO et al. (2010) tanto a presença dos terpenóides, quanto sua natureza hidrofóbica atuam na difusão através da membrana lipídica. A estrutura química possui uma hidroxila livre e um anel aromático, que podem estar associados a sua ação antimicrobiana.

Utilizado em baixas concentrações, o carvacrol, atua como ingrediente e conservante de condimentos alimentares, também faz parte de fragrâncias em formulações cosméticas (SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015). O carvacrol tem seu uso limitado na aplicação em alimentos, devido as 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 dos alimentos (SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014).

SEOW et al. (2014) evidenciaram que combinações de óleos essenciais com outros aditivos alimentares demonstraram efeitos aditivos ou sinérgicos, propondo uma alternativa lucrativa, saudável e sem perda de qualidade sensorial à indústria alimentar e aos consumidores (ZHOU et al., 2007; LANGEVELD; VELDHUIZEN; BURT, 2014). Desta maneira, na busca da redução da concentração inibitória mínima da proliferação de microrganismos, a aplicação do carvacrol em combinação com outros compostos antimicrobianos vêm sendo estudada (ZHOU et al., 2007). De fato, o carvacrol possui ação de forma isolada ou em conjunto com outros compostos, e demonstram ação sinérgica entre o carvacrol e o seu precursor *p*-cimeno (ULTEE et al., 2000).

ALVES et al. (2016) testaram o sinergismo entre alguns óleos essenciais, dentre eles o carvacrol e a nisina, contra bactérias presentes no leite, encontrando atividades inibitórias de nisina e os compostos testados, bem como sinergismo nas combinações contra *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Peptídeos antimicrobianos também podem ser aplicados com sucesso em combinação com antifúngicos comerciais (TAVEIRA et al., 2016).

### 3.3.2 Peptídeos antifúngicos

As proteínas são formadas através da união de dois ou mais resíduos de aminoácidos por ligações peptídicas entre os grupos amina e carboxila, podendo chegar a milhares de resíduos ligados. Os peptídeos, que são classificados como aqueles que possuem até 100 resíduos de aminoácidos, são diferenciadas pela sua estrutura química, podem conter éster ou amida em sua carboxila terminal, podem ser sulfatados ou fosforilados em um ou mais resíduos ou possuir uma acetila em seu grupo amino terminal. Podem ser cíclicos, semicíclicos ou lineares, constituídos por D-aminoácidos ou aminoácidos não usuais e o seu resíduo N-terminal pode conter um ácido piroglutâmico (GUTTE, 1995). Os peptídeos são obtidos pela

hidrólise química ou enzimática das ligações peptídicas e pela tecnologia do DNA recombinante (MACHADO et al., 2004).

Destacam-se na literatura por suas propriedades biológicas diversificadas. Apresentam propriedades anti-envelhecimento, anticancerígena, antidiabética, anti-hipertensivas, antioxidante, anti-inflamatória, atuam ainda na redução do colesterol, na regulação da saciedade e da homeostase entre glicose e insulina (AGYEI; DANQUAH, 2012; CASTRO; SATO, 2015; LI-CHAN, 2015). Os potenciais terapêuticos são atribuíveis às características químicas e estruturais, como hidrofobicidade, basicidade, composição e sequência de aminoácidos (AGYEI; DANQUAH, 2012).

Dentro do grande grupo dos peptídeos destacam-se os peptídeos bioativos, os quais vem da hidrólise de proteínas, estes possuem alta especificidade e baixa toxicidade, tornando-os altamente interessantes para as indústrias alimentícias como antimicrobianos (CASTRO; SATO, 2015).

O banco de dados *BioPep* (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>) contempla 3263 peptídeos bioativos, que podem ser obtidos a partir de alimentos de origem animal ou vegetal. A limitação quando se trata de peptídeos é a falta de métodos de alto rendimento para a produção de grandes quantidades dos mesmos (AGYEI; DANQUAH, 2012).

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) fazem parte da imunidade inata e estão na primeira linha de defesa de vários organismos. No homem, encontram-se dois grandes grupos: catelicidinas e defensinas. Fornecem proteção frente a patógenos ambientais, atuando contra bactérias, leveduras, fungos, vírus, entre outros (LAI; GALLO, 2009; SILVA; MACHADO, 2012; COSTA et al., 2015). Seu rápido efeito sobre microrganismos e suas atividades antimicrobianas de largo espectro, o tornam de grande interesse para as áreas da saúde e agricultura (MARÓTI et al., 2011).

Após adsorção inicial dos AMPs a integridade citoplasmática da bactéria é comprometida por alguns eventos. Destacam-se três modelos de mecanismo de ação dos peptídeos, são eles ripas de barril, tapete e poro toroidal (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011).

Modelo ripas de barril (*barrel-stave*): peptídeos concentram-se na membrana até atingir uma concentração limite e inserir-se através da mesma (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011). O lado hidrofóbico do AMP relaciona-se com os lipídeos da

membrana plasmática através das suas cadeias carbônicas, expondo seu lado hidrofílico e compondo o lúmen do canal transmembranar formado (TOKE, 2010).

Modelo carpete: é o modelo mais citado de ruptura de membrana por AMP. Prediz a interação eletrostática entre resíduos positivos do peptídeo e cargas negativas dos fosfolipídeos; os peptídeos concentram-se na superfície da membrana plasmática, recobrando-a de modo semelhante a um tapete, podendo levar a permeabilização (TOKE, 2010; COSTA et al., 2015).

Modelo poro toroidal: nesse modelo os poros de peptídeos e lipídeos estão alinhados. O peptídeo anifático une-se a membrana plasmática fosfolipídica, por meio de uma interação eletrostática, unindo-se à mesma. Separam-se as cabeças polares dos fosfolipídeos e a monocamada lipídica superior é induzida a dobrar-se através do poro. O lúmen do poro constitui-se por moléculas de peptídeos e cabeças polares dos fosfolipídeos alternadas (TOKE, 2010; NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011).

A membrana citoplasmática é importante para muitas funções celulares essenciais, como a permeabilidade seletiva, energia celular e a motilidade. A interrupção de processos intracelulares associam-se a morte e permeabilização celular. São estudados três mecanismos de morte celular: disfunção da membrana, inibição de funções intracelulares e inibição da síntese de biopolímero extracelular. Esses mecanismos ocorrem individualmente ou simultaneamente, mesmo sobre os mesmos microrganismos, alguns mecanismos podem prevalecer de acordo com as configurações ambientais, a fase de crescimento e a presença de respostas imunes (COSTA et al., 2015).

Alguns peptídeos são capazes de atravessar a bicamada lipídica sem causar danos a mesma, através da segmentação de componentes intracelulares, do bloqueio da atividade enzimática ou da inibição da síntese de proteínas e de ácido nucleico. Estes mecanismos são reforçados pela cationicidade, que promove interações com porções negativas como as proteínas fosforiladas, os lipídeos da membrana externa, e os ácidos nucleicos. Essa propriedade, que em conjunto com a significativa quantidade de resíduos hidrofóbicos, promove a seletividade à membranas citoplasmáticas carregadas negativamente (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011; COSTA et al., 2015).

Muitos AMPs possuem uma eficiente atividade antifúngica, com potencial de aplicação para o controle de fungos que ameaçam a saúde e a segurança da

alimentar humana (WEERDEN; BLEACKLEY; ANDERSON, 2013). É difícil classificar os AMPs exclusivamente como Peptídeos Antifúngicos (AFPs) ou antibacterianos devido a seu amplo espectro de atividade (AKKAM, 2016).

Peptídeos antifúngicos possuem um grande potencial como novos medicamentos, considerando sua alta especificidade, baixo nível de resistência e amplo espectro antifúngico. Possuem características biofísicas e modo de ação diversos, provavelmente, cada família de peptídeo tem uma única relação estrutura-atividade (AKKAM, 2016).

Os peptídeos antifúngicos disponíveis atualmente na base de dados de peptídeos antimicrobianos em maio de 2018 ([http://aps.unmc.edu/AP/database/query\\_input.php](http://aps.unmc.edu/AP/database/query_input.php)), totalizam cerca de 1063 AMPs com atividade antifúngica, considerando “fungos” como opção de busca, na seleção da seção, atividade antimicrobiana (WANG; LI; WANG, 2009).

Para o desenvolvimento de AFPs é necessário conhecer seu mecanismo de ação sobre as células fúngicas. As atividades antibacterianas dos peptídeos têm sido muito estudadas, porém pouco se sabe sobre os efeitos antifúngicos (WEERDEN; BLEACKLEY; ANDERSON, 2013).

Vários peptídeos antimicrobianos possuem especificidade sobre células fúngicas e não são ativos contra as bactérias. Outros podem ter diferentes mecanismos de ação frente a bactérias e fungos. Inicialmente acredita-se que os AMPs agem através da permeabilização da membrana. O mecanismo de ação antifúngico é mais complexo e, normalmente envolve a entrada do peptídeo para dentro da célula. Um único peptídeo pode ter mais de um modo de ação, dependendo do tipo de célula alvo (WEERDEN; BLEACKLEY; ANDERSON, 2013).

A parede celular em fungos é composta principalmente de quitina, glucanos, mananos e glicoproteínas, existindo evidências de ligações cruzadas entre eles. Portanto, mais difícil de atravessar quando comparada às bactérias (JIANG et al., 2008).

Peptídeos antifúngicos são ricos em aminoácidos polares e neutros, sugerindo uma relação única estrutura-atividade (JIANG et al., 2008). Os agentes antifúngicos padrões interagem ou inibem o ergosterol, o principal esteroide na membrana plasmática fúngica. Os AMPs que atuam na permeabilização de membranas, não interagem de maneira específica com a membrana e o ergosterol não é seu único alvo. Os principais fosfolipídeos em fungos são fosfatidilcolina e

fosfatidiletanolamina. Existem ainda pequenas quantidades de fosfatidilinositol carregado negativamente, fosfatidilserina e difosfatidilglicerol (JIANG et al., 2008).

Os peptídeos antifúngicos possuem carga líquida majoritariamente catiônica, com carga global positiva, que varia entre 1-15 e liga-se a membrana carregada negativamente por interação eletrostática. O aumento da carga líquida positiva afeta de diferentes maneiras a atividade antifúngica, sua quantidade pode não ser tão importante quanto a localização do resíduo catiônico. Existem alguns AFPs neutros e aniônicos com cargas líquidas entre -1 a -8 a pH neutro, que pode levar repulsão com a membrana carregada negativamente. Nesse caso, a interação entre as bicamadas lipídicas e o peptídeo é modulada pela estrutura secundária e pela distribuição de carga. Os resíduos de aminoácidos estão distribuídos possibilitando a acessibilidade e limitando a aversão de resíduos carregados negativamente, porém isso não se adequa a todos os aniônicos (AKKAM, 2016).

O aumento da atividade antifúngica depende da sequência peptídica e da estrutura. Os AFPs podem ser divididos em cinco categorias de acordo com a sua conformação:  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -folha,  $\alpha$ -hélice/ $\beta$ -folha misto, peptídeos ricos em aminoácidos e desconhecidos. Mais de 50% são desconhecidos, e entre os restantes, as  $\alpha$ -hélices são mais abundantes. Estes peptídeos tornam-se helicoidais através de interação com uma membrana anfipática, como uma membrana fúngica. Os AFPs com estrutura  $\beta$ -folha possuem uma característica em comum, a presença de dois resíduos de cisteína (AKKAM, 2016).

A maioria dos AFPs formam estruturas anfipáticas após a interação com as membranas alvo. A anfipaticidade é determinada pelo momento hidrofóbico, onde a hidrofobicidade medida em diferentes ângulos de rotação (0-180 graus) por resíduo. Em geral, há um aumento da atividade antifúngica com o aumento do momento hidrofóbico, devido a permeabilização da membrana, independentemente da estrutura secundária e da carga líquida. Porém, o aumento da anfipaticidade não interfere apenas na atividade antifúngica, sugere-se para manter momento hidrofóbico menor que 0,381 no desenvolvimento de novos peptídeos (AKKAM, 2016).

A hidrofobicidade da maioria dos peptídeos antifúngicos varia entre 30-60% (AKKAM, 2016). A hidrofobicidade tem diferentes efeitos sobre a atividade antifúngica, de acordo com a classe dos fungos. Aumentando a hidrofobicidade observou-se um impacto negativo sobre a ação antimicrobiana, exceto em fungos da

classe *Ascomycota*, onde a atividade antifúngica aumentou com o aumento da hidrofobicidade (JIANG et al., 2008).

### 3.3.2.1 Dipeptídeos cíclicos

O total de resíduos de aminoácidos é importante para a estrutura secundária e o modo de ação de AFPs. A maior parte dos AFPs tem entre 11 e 40 resíduos de aminoácidos. Em alguns AFPs o comprimento completo não é essencial para atingir plena atividade, sendo uma tendência, conceber peptídeos curtos buscando reduzir custos (AKKAM, 2016).

Os dipeptídeos cíclicos, também conhecidos como dicetopiperazinas são pequenos peptídeos encontrados na natureza em uma grande variedade, de importância indiscutível (THAJUDEEN et al., 2010). Constituídos por dois resíduos de aminoácidos, vem sendo estudado devido a suas propriedades bioativas, como a ação antifúngica (CROWLEY; MAHONY; SINDEREN, 2013; PERZBORN; SYLDATK; RUDAT, 2013).

Podem ser biossintetizados a partir de aminoácidos por vários organismos, como mamíferos, sendo considerados metabólitos funcionais secundários da clivagem terminal do peptídeo (MARTINS; CARVALHO, 2007). Também podem ser isolados de fungos, de bactérias Gram-positivas, e cerca de 90% das bactérias Gram-negativas produzem dipeptídeos (CARVALHO; ABRAHAM, 2012).

Devido ao sistema heterocíclico existente em vários produtos naturais os dipeptídeos cíclicos tornam-se uma fonte importante de novos compostos biologicamente ativos, com várias possibilidades terapêuticas (MARTINS; CARVALHO, 2007). Desde 1924, surgiram um grande número de dipeptídeos cíclicos como agentes antioxidantes (FURUKAWA et al., 2012), anticancerígenos (VAN DER MERWE et al., 2008), antivirais (SINHA et al., 2004), antifúngicos (KUMAR et al., 2013), antibacterianos (KUMAR et al., 2013) e anti-hiperglicêmico (SONG et al., 2003).

O dipeptídeo cíclico c(D-Tyr-L-Leu) mostrou atividade antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides* em uma concentração inibitória mínima:  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$  (KUMAR et al., 2013). O peptídeo c(D-Pro-D-Tyr) apresenta atividade contra os

fungos *Fusarium oxysporium*, *Rhizoctonia sonali* e *Penicillium expansum* (KUMAR; NAMBISAN; MOHANDAS, 2014).

Os dipeptídeos cíclicos podem ser sintetizados em laboratório (MARTINS; CARVALHO, 2007), pelo acoplamento de um aminoácido cujo grupo amino está protegido com outro aminoácido, um éster de aminoácido, seguido pela desproteção do grupo amino com ácido ou base, e então ciclização intramolecular sob condições térmicas (THAJUDEEN et al., 2010).

### 3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS NATURAIS E COMERCIAIS COMBINADOS

A lenta evolução quando se trata de novos agentes antifúngicos limita o combate à doenças fúngicas. Combinações de antifúngicos comerciais já foram usadas, porém nem sempre apresentam resultados satisfatórios e vem sendo frequentemente associados a um aumento de efeitos secundários. Neste contexto, surgem os compostos naturais, quando combinados aos antifúngicos comerciais podem aumentar a eficácia dos mesmos (CAMPBELL; CHAN; KIM, 2012).

Esses compostos naturais possuem atividade antifúngica, mas em níveis insuficientes para atuar isoladamente. Sua principal função é interromper a resposta do estresse fúngico, desestabilizar a integridade da membrana celular, aumentar o estresse oxidativo através do estímulo a produção de espécies reativas de oxigênio e ainda a apoptose (CAMPBELL; CHAN; KIM, 2012).

A combinação de compostos antifúngicos comerciais e compostos naturais surge para melhorar a eficácia de drogas antifúngicas. Quando um agente natural é associado a um agente comercial, pode haver uma interação aditiva ou sinérgica, aumentando a eficácia antifúngica, reduzindo as dosagens efetivas, os efeitos colaterais negativos como a toxicidade e os custos, podendo ainda conter a resistência fúngica. A avaliação do efeito de uma combinação de drogas *in vitro* pode ser realizada pelo método do “tabuleiro de xadrez” (CAMPBELL; CHAN; KIM, 2012; SVETAZ, 2016; SCORZONI et al., 2017). As concentrações do composto A estão dispostas horizontalmente e do composto B verticalmente em uma placa de

micropoços. As diluições são baseadas na CIM das substâncias (BHAT; AHANGAR, 2007).

O efeito dessas combinações pode ser classificado de acordo com Bath (2004) em:

- Aditivo: quando a combinação de dois produtos é igual a soma do efeito de cada agente isolado, ou seja, quando a soma da CIM do composto A a CIM do composto B no teste de sinergismo se iguala a ação do composto A ou B isolado.
- Sinérgico: quando a combinação de dois agentes resulta em uma CIM maior que a de um agente administrado isolado, ou seja, quando a soma da CIM do composto A a CIM do composto B no teste de sinergismo é superior a ação do composto A ou B isolado.
- Antagonismo: um dos produtos diminui a ação de outro produto, pode ser chamado de antídoto.

O efeito aditivo é mais comum entre produtos químicos com mecanismos de ação similares e exercem efeitos tóxicos sobre o mesmo órgão. O efeito sinérgico é mais comum em produtos que possuem diferentes mecanismos de ação (BATH, 2004). Exemplo de sinergismo é o trabalho de AL-ANI et al. (2015) cuja combinação de veneno de abelha e o antimicrobiano melitina em ensaio em tabuleiro de xadrez potencializou o efeito bactericida de ambos os compostos pela ação dos compostos em vários alvos moleculares. Ainda, CASTRO et al. (2015) testou a combinação entre timol e nistatina contra três espécies de *Candida*, pelo mesmo método. Foi possível observar 87,4% de redução da CIM dos dois compostos e um índice FIC de 0,25.

No que diz respeito ao antifúngico comercial tiabendazol, D'AQUINO et al. (2013) associaram sorbato de potássio ao tiabendazol no controle de *Penicillium digitatum* em frutas no período pós-colheita, fato que potencializou a ação do tiabendazol e possibilitou a redução dos resíduos do mesmo, quando comparado ao fruto tratado apenas com tiabendazol.

GONZALEZ et al. (2002) testaram a ação combinada de dois peptídeos com conhecida ação antifúngica (FRLKFHF-NH<sub>2</sub> e FRLKFHI-NH<sub>2</sub>) e o tiabendazol por meio do ensaio em tabuleiro de xadrez, obtendo resultados positivos que indicaram sinergismo dos compostos contra cepas de *Fusarium sambucinum* resistentes.

Os óleos essenciais são relatados na literatura por possuírem ação aditiva ou sinérgica, tornando-se alternativas para a redução do uso de antibióticos

(LANGEVELD et al., 2014). Essa ação sinérgica pode ser explicada pelos diferentes mecanismos de ação dos compostos, a associação pode reduzir a resistência dos microrganismos, causar interações físico-químicas e ainda afetar múltiplos alvos na membrana do microrganismo (LANGEVELD et al., 2014). Situação que não é diferente para o carvacrol componente majoritário do óleo de orégano (BASER, 2008). De fato, foi possível observar através de um ensaio em tabuleiro de xadrez o efeito aditivo do carvacrol e do timol quando combinados com a tilmicosina e o sinergismo quando carvacrol ou timol foi combinado adoxiciclina (KISSELS et al., 2017).

A atividade antimicrobiana das combinações de etanol e carvacrol, cinamaldeído e carvacrol, dióxido de enxofre e carvacrol, dióxido de enxofre e cinamaldeído, dióxido de enxofre e isotiocianato de alila e isotiocianato de alila e cinamaldeído foram avaliadas contra *Penicillium notatum*. Foi possível identificar sinergismo entre as combinações de compostos antifúngicos. A redução da concentração de cada composto avaliado teve por consequência a redução de seu impacto nas propriedades organolépticas dos compostos aromáticos (TUNC et al., 2007).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios biológicos e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizados nos Laboratórios de Microbiologia e Equipamentos Finos da UTFPR – FB, respectivamente. A síntese química e a espectrometria de massas de todos os peptídeos estudados foram realizadas nos Laboratórios de Química do Complexo de Laboratórios da UTFPR - Campus Francisco Beltrão, e do Departamento de Bioquímica do IQ-USP, respectivamente.

### 4.1 CEPAS FÚNGICAS TESTADAS

As cepas utilizadas nos ensaios microbiológicos foram *Colletotrichum gloeosporioides* (*C. gloeosporioides* - CBMAI 864) adquirido na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (Unicamp), *Fusarium solani* (*F. solani* - CCT 1204, isolado de fluido de usinagem) e *Alternaria alternata* (*A. alternata* - CCT 2816, isolada do pepino), adquiridos na Fundação André Tosello.

### 4.2 MEIOS DE CULTURA

O ágar extrato de malte foi utilizado no cultivo de *C. gloeosporioides*, e formulado com as seguintes proporções de reagentes: 10 g L<sup>-1</sup> de caldo extrato de malte (Kasvi, Brasil), e 20 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico (Kasvi, Brasil), com pH ajustado para 5,2 com o auxílio de HCl 0,1%. Para *A. alternata* o meio foi formulado com 20 g L<sup>-1</sup> de extrato de malte (Kasvi, Brasil) e 20 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico (Kasvi, Brasil), e o pH ajustado para 6,5 com o auxílio de HCl 0,1%.

O meio ágar batata dextrose (BDA – Merck, Alemanha) foi utilizado na proporção de 39 g L<sup>-1</sup> para o cultivo de *F. solani* (pH 5,6).

Para as análises antifúngicas *in vitro* foi utilizado o caldo extrato de malte (Kasvi, Brasil) 10 g L<sup>-1</sup> para *C. gloeosporioides* (pH ajustado para 5,2), caldo extrato

de malte (Kasvi, Brasil) 20 g L<sup>-1</sup> para *A. alternata* (pH ajustado para 6,5), e caldo sabouraud (Himedia, India) 30 g L<sup>-1</sup> (pH ajustado a 5,6) para *F. solani*.

#### 4.3 REAGENTES E SOLVENTES QUÍMICOS

Os reagentes ativadores do grupo carboxila dos derivados de aminoácidos foram N-hidroxibenzotriazol (HOBt) e diisopropilcarbodimida (DIC) da Sigma-Aldrich (USA). Os derivados de aminoácidos protegidos em suas cadeias laterais utilizados na síntese foram N-Boc-D-Pro-OH (Sigma-Aldrich, USA), Boc-D-Tyr-OH (Bachem, USA), cloreto de L-Leu-OMe (TCI, India) e cloreto de D-Tyr-Methyl-OMe (Chem-Impex Int'l Inc USA) e os reagentes trietilamina (TEA), diisopropiletilamina (DIPEA), provenientes da Vetec (Brasil) e Sigma-Aldrich (USA), respectivamente. Os reagentes utilizados para a ciclização dos dipeptídeos protegidos foram sec-butanol, tolueno, ácido fórmico e anisol provenientes da Sigma-Aldrich (USA). O carvacrol foi adquirido da Sigma-Aldrich (USA) e a sua pureza era de 99,5%.

Os solventes empregados foram diclorometano (DCM) e metanol procedentes da Neon Comercial (Brasil) e Vetec (Brasil), respectivamente. Todos eram de grau analítico e foram aplicados sem tratamento prévio.

Para preparação dos eluentes da CLAE e LC-MS foram utilizados água ultra-pura (Merck KGaA, Alemanha), acetonitrila (ACN) (Vetec Química Fina Ltda, Brasil) e TFA (Merck KGaA, Alemanha) de grau cromatográfico.

Para diluição dos compostos antifúngicos para os ensaios foi utilizado DMSO (Sigma-Aldrich, USA) e Etanol (Sigma-Aldrich, USA).

#### 4.4 DILUIÇÃO DOS COMPOSTOS NATURAIS PARA AS ANÁLISES ANTIFÚNGICAS

A concentração do carvacrol variou de 0,63 a 300 mM usando como diluente o etanol 70%. Os dipeptídeos c(D-Tyr-L-Leu) e c(D-Pro-D-Tyr) foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO ≥ 99,9%, Sigma-Aldrich, USA) na concentração de 160 mM,

a diluição seriada foi realizada com água destilada estéril até a concentração mínima de 0,3 mM. O tiabendazol (Sigma-Aldrich, USA) foi dissolvido em DMSO e o etanol 70% foi usado em sua diluição seriada (0,04 a 160 mM) (Tabela 1)

Tabela 1 – Concentrações dos compostos antifúngicos testados

<b>Composto</b>	<b>Concentração (mM)</b>									
c(D-Tyr-L-Leu)	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,63	0,31
c(D-Pro-D-Tyr)	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,63	0,31
Carvacrol	300	150	75	37,5	18,7	9,3	4,7	2,3	1,2	0,58
Tiabendazol <sup>a</sup>	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,63	0,31
	10	5	2,5	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02

<sup>a</sup> As concentrações de 0,02 até 10 mM foram utilizadas nos ensaios para *F. solani*

#### 4.5 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Os repiques das culturas foram realizados semanalmente. O cultivo de *C. gloeosporioides* foi realizado a 28 °C por oito dias, *F. solani* e *A. alternata* foram cultivados a 25 °C por sete dias, em estufa tipo BOD. Em seguida, colônias foram transferidas para 2 mL de caldo (Sabouraud ou extrato de malte) e o conteúdo do tubo foi agitado em vórtex (Phoenix<sup>®</sup> AP56, Brasil) durante 15 segundos para posterior contagem de esporos na câmara de Neubauer e diluição. A concentração final de inóculo usada foi de 10<sup>5</sup> esporos mL<sup>-1</sup>.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A ação fungistática foi avaliada por ensaio de inibição de crescimento em caldo como descrito por FEHLBAUM et al., (1994), com algumas modificações realizadas por FIEIRA et al., (2013). A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada em microplaca de poliestireno de 96 poços de fundo

chato. A cada poço foi adicionado 10 µL do composto sintético, 10 µL de água destilada estéril e 80 µL de inóculo a  $10^5$  esporos mL<sup>-1</sup>, sendo esta a concentração final no ensaio.

As microplacas com *C. gloeosporioides* foram incubadas a 28 °C por 96 horas. Para *F. solani* e *A. alternata* a incubação foi realizada a 25 °C por 48 horas. Foi observado o crescimento microbiano com o auxílio do leitor de microplacas (Thermoplate®) a uma absorvância de 630 nm. O valor da CIM corresponde a menor concentração que o composto testado causa 100 % de inibição do crescimento dos fungos. Os ensaios foram realizados em triplicata, o antifúngico tiabendazol foi usado como controle positivo de inibição de multiplicação celular. Os ensaios foram realizados em triplicata com duas repetições.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA

Para determinação da concentração fungicida mínima (CFM) foi retirado o conteúdo total do poço que não apresentou crescimento fúngico e inoculado em ágar batata dextrose para *F. solani* e extrato de malte para *C. gloeosporioides* e *A. alternata* (método *spread plate* – espalhamento em superfície). Em 25 °C para *F. solani* e *A. alternata* e 28 °C para *C. gloeosporioides*. Após 7 dias de incubação foi realizada a contagem das colônias. A CFM foi determinada como a mínima concentração, em que não houve crescimento em placa de Petri. Os ensaios foram realizados em triplicata com duas repetições.

#### 4.8 SINERGISMO ENTRE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS NATURAIS E COMERCIAIS

Em uma microplaca de 96 poços foi adicionado 5 µL de uma série de oito diluições do composto A, e em seguida foi adicionado 5 µL de uma série de oito diluições do composto B. Cada poço foi inoculado com 80 µL de uma suspensão de esporos do microrganismo teste ( $10^5$  esporos mL<sup>-1</sup>) e mais 10 µL água estéril. A

incubação foi realizada a 25 °C por 48 horas para *A. alternata* e *F. solani* e a 28 °C por 96 horas para *C. gloesporioides*. Os valores da CIM dos compostos foram utilizados para calcular a Concentração Inibitória Fracionária (CIF), definida como a razão entre a CIM do composto na combinação e a CIM do mesmo sozinho. O índice CIF, é a soma dos CIF de cada agente, nas suas concentrações mais efetivas (BONAPACE et al., 2002). Os ensaios foram realizados em triplicata com duas repetições.

CIF A = CIM composto A na combinação/CIM composto A sozinho

CIF B = CIM composto B na combinação/CIM composto B sozinho

Índice CIF = CIF A + CIF B

Foi considerado como efeito aditivo quando o índice CIF fica entre 0,5 e 1, sinérgico, quando o índice CIF fica menor ou igual 0,5 e antagonista quando o índice CIF fica entre 1 e 2 (BHAT; AHANGAR, 2007).

#### 4.9 SÍNTESE QUÍMICA E PURIFICAÇÃO DOS DIPEPTÍDEOS

A síntese do c(D-Tyr-L-Leu) aconteceu em fase líquida pela reação entre Boc-D-Tyr-OH e H<sub>2</sub>N-Leu-OCH<sub>3</sub> usando como reagente acoplador DCC/HOBt em DCM. O dipeptídeo correspondente (Boc-D-Tyr-L-Leu-OCH<sub>3</sub>) foi desprotegido com ácido fórmico e anisol (99:1) e posteriormente ciclizado sob refluxo em sec-butanol e tolueno (4:1) (van der MERWE et al., 2008). Para a síntese do c(D-Pro-D-Tyr) foi utilizado o Boc-D-Pro-OH e H<sub>2</sub>N-D-Tyr-OCH<sub>3</sub> e posterior etapa de ciclização empregando sec-butanol e tolueno (4:1) e 2,5 equivalentes de trietilamina (TEA) (TULLBERG et al. 2006).

A purificação do c(D-Tyr-L-Leu) foi realizada empregando a técnica de recristalização ou por cromatografia em coluna aberta de sílica gel 60 (0,040 - 0,063 mm) usando uma mistura contendo DCM/MeOH como eluente.

O dipeptídeo c(D-Pro-D-Tyr) foi purificado por CLAE-FR utilizando um sistema de Waters modelo 600E preparativo, composto de uma bomba quaternária (Waters Delta 600 Pump), um detector UV (Waters 2487 Dual Absorbance Detector), um injetor de amostras manual (Rheodyne 3725i-119), um controlador de gradiente automatizado (Waters 600 Controller), um registrador Kipp & Zonen SE 124. Foi utilizado coluna preparativa (Vydac C18, 10 $\mu$ m, 300 Å, 2,2 x 25 cm) sob as condições de separação que empregaram solvente A (H<sub>2</sub>O/ 0,1% TFA) e solvente B (10% ACN/ 0,09% TFA) sob um fluxo de eluição de 10 mL min<sup>-1</sup> em um gradiente linear 5 a 35% do solvente B em 90 minutos

#### 4.10 MÉTODOS ANALÍTICOS

Os produtos resultantes das sínteses peptídeos brutos e purificados foram analisados no cromatógrafo líquido Dionex U300<sup>®</sup> da UTFPR- Francisco Beltrão. A coluna de fase reversa utilizada foi Vydac C18 analítica (0,45 x 25,0 cm tamanho da partícula de 5  $\mu$ m e de poro de 300 Å), gradiente linear de 5% a 95% de solvente B em 30 minutos; fluxo de 1mL mim<sup>-1</sup>; comprimento de onda de 210 nm; solvente A constituído por TFA 0,1% em água; solvente B constituído por ACN 60% ACN/H<sub>2</sub>O contendo 0,09% de TFA para c(D-Tyr-L-Leu) ou 40% ACN/H<sub>2</sub>O contendo 0,09% de TFA para c(D-Pro-D-Tyr).

A relação massa carga (m/z) do pepdídeos foram determinadas em espectrômetro de massa tipo íon-trap da Bruker (modelo Amazon X<sup>®</sup>) no Laboratório de Química do Departamento de Bioquímica do IQ-USP. Foi empregada a técnica de ionização por electrospray (ESI-MS) com a voltagem do capilar de 4500 V a 220 °C.



## REFERÊNCIAS

AGYEI, D.; DANQUAH, M. K. Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. **Trends in Food Science and Technology**, v.23, n.2, p.62-69, 2012.

AKKAM, Y. A Review of antifungal peptides: basis to new era of antifungal drugs. **Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.9, n.1, p.51-75, 2016.

AL-ANI, I. et al. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. **Phytomedicine**, 2015.

ALKAN, N.; FORTES, A. M. Insights into molecular and metabolic events associated with fruit response to postharvest fungal. **Frontiers in Plant Science**, v.6, n.889, p.1-14, 2015.

ALVES, F. et al. Short communication: Inhibitory activities of the lantibiotic nisin combined with phenolic compounds against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in cow milk. **Journal of Dairy Science**. v. 99, n.3, p. 1831-1836, 2016.

ALVES-SILVA, J. M. et al. Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. **Food Control**, v. 32, n. 2, p. 371-378, 2013.

ANDRADE, B. F. M. T. et al. Antimicrobial activity of essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 1, p. 34-40, 2014.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agrotóxico, herbicida e pesticida. Disponível em < <http://portal.anvisa.gov.br/> > Acesso 17/06/2018.

BARREIRO, E. J. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BASER, K. H. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 29, p. 3106-3119, 2008.

BAUTISTA-BAÑOS, S. et al. A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. **Crop Protection**, v.49, p.8-20, 2013.

BHAT, A.S.; AHANGAR, A.A. Methods for detecting chemical-chemical interaction in toxicology. **Toxicol Mech Methods**, v. 17, n. 8, p. 441-50, 2007.

BONAPACE, C.R. et al. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, n. 4, p. 363-6, 2002.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CABAN, R. et al. Comparison of methods to detect resistance of *Penicillium expansum* to thiabendazole. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 241-246, 2009.

CAMPBELL, B. C.; CHAN, K. L.; KIM, J. H. Chemosensitization as a means to augment commercial antifungal agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 79, p. 1-20, 2012.

CARVALHO, M. P.; ABRAHAM, W. R. Antimicrobial and biofilm inhibiting diketopiperazines. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 21, p. 3564-3577, 2012.

CASTRO, R. C. et al. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 417, p. 1-7, 2015.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. **Food Research International**, v.74, n.1, p.185-198, 2015.

CHUNG, D.; CHO, T. J.; RHEE, M.S. Citrus fruit extracts with carvacrol and thymol eliminated 7-log acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes*: A potential of effective natural antibacterial agents. **Food Research International**, v. 107, n. 1, p. 578-588, 2018.

COSTA, C. C.; GUILHOTO, J. J. M.; BURNQUIST, H. L. Impactos socioeconômicos de reduções nas perdas pós-colheita de produtos agrícolas no Brasil. **Revista Economia e Sociologia Rural**, v. 53, n. 3, p. 395-408, 2015.

COSTA, J. P. et al. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 2023-2040, 2015.

COSTA, A.S. et al. Estabelecimento de alecrim-pimenta in vitro. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n.1, p. 068-072, 2007.

CROWLEY, S.; MAHONY, J.; SINDEREN, D. V. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. **Trends in Food Science and Technology**, v.33, n.2, p. 93-109, 2013.

D'AQUINO, S. et al. Combined effects of potassium sorbate, hot water and thiabendazole against green mould of citrus fruit and residue levels. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 858-864, 2013.

DALHOFF, A. Does the use of antifungal agents in agriculture and food foster polyene resistance development? A reason for concern. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 13, n.1, p. 40-48, 2018.

DEISING, H. B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S. F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 286-295, 2008.

DERAL - GOVERNO DO PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Economia Rural. Fruticultura. 2017. Disponível em <[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2017/Fruticultura\\_2016\\_17.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2017/Fruticultura_2016_17.pdf)>. Acesso em: 10 set. 2018.

DHALL, R.K. Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 5, p. 435-50, 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Mamão. 2018. Disponível em <<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mamao>> Acesso em: 27 fev. 2018.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Mamão. 2016. Disponível em < <https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mamão>> Acesso em: 16 mai. 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Mamão: Fitossanidade**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Produção e Mercado de Frutas: Situação e Perspectivas. 2013. Disponível em < [https://docs.google.com/file/d/0B720W\\_Z6N7NRRU4wb0gtU1U1Rmc/edit](https://docs.google.com/file/d/0B720W_Z6N7NRRU4wb0gtU1U1Rmc/edit)> Acesso em: 16 mai. 2016.

FEHLBAUM, P. et al. Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 30, p. 33159-33163, 1994.

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, n. 1, p. 40-46, 2013.

FISHER, M. C, et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 739-742, 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Global Food Losses and Food Waste: Extent, causes and prevention**. Rome, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. Statistics Division, 2014. Disponível em <<http://faostat3.fao.org>>. Acesso em: 26 fev. 2018.

FURTUNATO, T. C. S. et al. Característica físico-química e incidência de patógenos fúngicos em mamão 'Formosa' comercializado no sertão paraibano. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, n. 2, p. 09-14, 2015.

FURUKAWA, T. et al. Cyclic dipeptides exhibit potency for scavenging radicals. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 2002–2009, 2012.

GONZALEZ, C. F. ET AL. Independent and synergistic activity of synthetic peptides against thiabendazole-resistant *Fusarium sambucinum*. **Phytopathology**, v. 92, n.8, p.917-924, 2002.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, n.1, p.412-429, 2014.

GUTTE, B. **Peptides: Synthesis, Structure, and Applications**, Academic Press: New York, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção Agrícola Municipal**, v. 40, p.1-102, Rio de Janeiro, 2013.

ISHII, H. Impact of Fungicide Resistance in Plant Pathogens on Crop Disease Control and Agricultural Environment. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 40, n. 3, p. 205-211, 2006.

JIANG, Z. et al. Effects of hydrophobicity on the antifungal activity of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 72, n. 6, p. 483–495, 2008.

JOHNSON, C. P. et al. Nisin and other antimicrobial peptides: Production, mechanisms of action, and application in active food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 48, n.1, p. 179-194, 2018.

JUNEJA, V. K.; DWIVEDI, H. P; YAN, X. Novel natural food antimicrobials. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 381-403, 2012.

KHAN, S. H.; AKED, J.; MAGAN, N. Control of the anthracnose pathogen of banana (*Colletotrichum musae*) using antioxidants alone and in combination with thiabendazole or imazalil. **Plant Pathology**, v. 50, n. 5, p. 601-608, 2001.

KISSELS, W.; WU, X.; SANTOS R.R. Short communication: Interaction of the isomers carvacrol and thymol with the antibiotics doxycycline and tilmicosin: In vitro effects against pathogenic bacteria commonly found in the respiratory tract of calves. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 2, p. 970-974, 2017.

KUMAR, N. et al. Isolation and antifungal properties of cyclo (D-Tyr-L-Leu) diketopiperazine isolated from *Bacillus* sp. associated with rhabditid entomopathogenic nematode. **Natural Product Research**, v. 27, n. 23, p. 2168-72, 2013.

KUMAR, S. N.; NAMBISAN, B.; MOHANDAS, C. Purification and identification of two antifungal cyclic dipeptides from *Bacillus cereus* subsp. *thuringiensis* associated with a rhabditid entomopathogenic nematode especially against *Fusarium oxysporum*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 190–197, 2014.

LAI, Y. GALLO, R. L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 3, p. 131-141, 2009.

LANGEVELD, W. T.; VELDHUIZEN, E. J. A.; BURT, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76-94, 2014.

LI-CHAN, E. C. Y. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, n. 1, p. 28-37, 2015.

MACHADO, A. et al. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.781-789, 2004.

MARCHESE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, n. 1, p. 402-414, 2016.

MARÓTI, G. et al. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. **Research in Microbiology**, v.162, n.4, p.363-374, 2011.

MARTINS, M. B.; CARVALHO, I. Diketopiperazines: biological activity and synthesis, **Tetrahedron**, v. 63, n. 40, p. 9923–9932, 2007.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365-373, 2011.

MICHALAK, I; CHOJNACKA, K. Algae as production systems of bioactive compounds. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, n. 2, p. 160–176, 2015.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.

MOHAMMAD, Y. M. et al. Carvacrol and thymol: strong antimicrobial agents against resistant isolates. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 63-68, 2017.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v.29, n.9, p. 464-472, 2011.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future perspectives. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 28–35, 2012.

NUNES, C. A. Biological control of postharvest diseases of fruit. **European Journal of Plant Pathology**, v.133, n.1, p.181-196, 2012.

OLIVEIRA, T. et al. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas. **Revisão anual de patologia e plantas**, 2015.

ONIHA, M.; EGWARI, L. Fruit, leaf and stem diseases of *Carica papaya* L. **Agriculture and Food Journal of International Scientific Publications**, v.3, n.1, p.398-407, 2015.

PÉREZ, S. et al. Fate of thiabendazole through the treatment of a simulated agro-food industrial effluent by combined MBR/Fenton processes at µg/L scale. **Water research**, v. 51, n. 1, p. 55-63, 2013.

PERZBORN, M.; SYLDATK, C.; RUDAT, J. Separation of cyclic dipeptides (diketopiperazines) from their corresponding linear dipeptides by RP-HPLC and method validation. **Chromatography Research International**, v. 2013, n.1, p.1-8, 2013.

PERRUCHON, C. et al. Isolation of a bacterial consortium able to degrade the fungicide thiabendazole: The key role of a *Sphingomonas* phylotype. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.101, n.9, p. 3881-3893, 2017.

PIGNATI, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a vigilância em saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p.3281-3293, 2017.

PINHEIRO, F. A. et al., Perfil de Consumidores em Relação à Qualidade de Alimentos e Hábitos de Compras. **Journal of Health Science**, v. 13, n. 2, p. 95-102, 2011.

RAFFA, D. et al. Recent discoveries of anticancer flavonoids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 142, n. 1, p. 213-228, 2017.

RAGHAV, P. K.; AGARWAL, N.; SAINI, M. Edible coating of fruits and vegetables: a review. **International Journal of Scientific Research and Modern Education**, v.1, n1, p. 188-204, 2016.

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.

RANGEL-HUERTA, O. D. et al. A systematic review of the efficacy of bioactive compounds in cardiovascular disease: Phenolic compounds. **Nutrients**, v. 7, n. 7, p. 5177-5216, 2015.

ROBINSON, H. J.; PHARES, H. F.; GRAESSLE, O. E. The Toxicological and Antifungal Properties of Thiabendazole. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1, n. 4, p. 471-476, 1978.

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.

SCORZONI, L. et al. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. 36. p. 1-23, 2017.

SÉIDE, M. et al. The fungicide thiabendazole causes apoptosis in rat hepatocytes. **Toxicology In Vitro**, v. 32, n. 1, p. 232-239, 2015.

SEOW, Y. X. et al. Plant essential oils as active antimicrobial agents. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 5, p. 625-644, 2014.

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

SILVA, F. P.; MACHADO, M. C. C. Antimicrobial peptides: Clinical relevance and therapeutic implications. **Peptides**, v.36, n. 2, p.308-314, 2012.

SINHA, S. et al. Synthesis and antiviral properties of arabino and ribonucleosides of 1,3-dideazaadenine, 4-nitro-1,3-dideazaadenine and diketopiperazine. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**, v. 23, n. 12, p. 1815-1824, 2004.

SISTEMA DE APOIO A MICRO E PEQUENA EMPRESA – SEBRAE. **Boletim de Inteligência: Agronegócio Fruticultura**. SEBRAE, 2015.

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.

SONG, M. K. et al. Anti-hyperglycemic activity of zinc plus cyclo (His-Pro) in genetically diabetic Goto-Kakizaki and aged rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, n.11, p. 1338-1345, 2003.

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

SVETAZ, L. A. Antifungal drugs combinations: a patent review 2000-2015. **Journal Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 26, n. 4, p. 439-453, 2016.

SUWANAMORNLEERT, P. et al. Antifungal activity of plant-derived compounds and their synergism against major postharvest pathogens of longan fruit in vitro. **International Journal of Food Microbiology**, v. 271, n. 1, p. 8-14, 2018.

TAVEIRA, G. B. et al. Thionin-like peptide from *Capsicum annum* fruits: mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida* species. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 1-13, 2016.

THAJUDEEN, H et al. An efficient green synthesis of proline-based cyclic dipeptides under water-mediated catalyst-free conditions. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 9, p. 1303–1305, 2010.

TIWARI, B. K. et al. Application of natural antimicrobials for food preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.14, p.5987–6000, 2009.

TOKE, O. Antimicrobial Peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. **Biopolymers**, v. 80, n.6, p.717–735, 2005.

TULLBERG, M.; GROTLI, M.; LUTTMAN, K. Efficient synthesis of 2,5-diketopiperazines using microwave assisted heating. **Tetrahedron**, v.62, n.1, p.7484–7491, 2006.

TUNC, S. et al. Combined effect of volatile antimicrobial agents on the growth of *Penicillium notatum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 3, p. 263-270, 2008.

van der MERWE, E. et al. The synthesis and anticancer activity of selected diketopiperazines. **Peptides**, v.29, n.8, p.1305-1311, 2008.

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.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic Acids Research**, v.37, n.1, p. 933-937, 2009.

WEERDEN, N. L.; BLEACKLEY, M. R.; ANDERSON, M. A.; Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 19, p.3545-70, 2013.

ZHOU, F. et al. Synergistic effect of thymol and carvacrol combined with chelators and organic acids against *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 7, p. 1704–1709, 2007.

## RESULTADOS

Os resultados desta dissertação serão apresentados no formato de artigos científicos, conforme descritos abaixo:

ARTIGO 1 – SÍNTESE QUÍMICA DE DIPEPTÍDEOS E ANÁLISE ANTIMICROBIANA CONTRA *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium solani* e *Alternaria alternata*

ARTIGO 2 – COMBINAÇÃO DE CARVACROL E TIABENDAZOL CONTRA *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium solani* e *Alternaria alternata*

REVISTA: Ciencia Rural (ISSN 1678-4596).

ARTIGO 1 - SÍNTESE QUÍMICA DE DIPEPTÍDEOS E ANÁLISE ANTIMICROBIANA CONTRA *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium solani* e *Alternaria alternata*

**SÍNTESE QUÍMICA DE DIPEPTÍDEOS E ANÁLISE ANTIMICROBIANA CONTRA *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium solani* e *Alternaria alternata***

Franciély Stadler\*, Eder da Costa dos Santos, Alessandra Machado-Lunkes

Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Londrina, Brasil. Avenida dos Pioneiros, 3131, 86036-370, Londrina, Paraná, Brasil. Telefone: +55 (43) 3315-6100, Fax +55 (43) 3315-6121. \*E-mail: stadler.alipr@gmail.com

**RESUMO**

O mamão que possui uma produção mundial de 13 milhões de toneladas, é a terceira fruta mais consumida no Brasil, mas também é o fruto de maior perda no período pós-colheita. Para controlar estas perdas e consumir alimentos livres de agrotóxicos, tem-se buscado aplicar compostos de origem natural, dentre eles os peptídeos antimicrobianos. Este trabalho teve como objetivo sintetizar quimicamente e avaliar a ação antifúngica dos dipeptídeos contra os principais fungos deteriorantes do mamão, *C.gloesporioides*, *F. solani* e *A. alternata*. A síntese do peptídeo c(D-Tyr-L-Leu) aconteceu de maneira satisfatória, ocorreram dificuldades de síntese na ciclização do Boc-D-Pro-D-Tyr-OMe, precursor do c(D-Pro-D-Tyr), que foram contornadas com a adição de trietilamina no meio reacional. O c(D-Tyr-L-Leu) e c(D-Pro-D-Tyr) não apresentaram ação inibitória da proliferação do fungos estudados nas concentrações avaliadas nos ensaios antifúngicos *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo, contrapondo resultados publicados.

**Palavras-chave:** Peptídeos antimicrobianos. Síntese química. Diketopiperazina. Antifúngico.

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil são colhidos mais de 40 milhões de toneladas de frutos ao ano (FAO, 2014; SEBRAE, 2015) entretanto, 30% desta produção é desperdiçada no período pós-colheita (FAO, 2011). O mamão, possui valores expressivos de perdas, o que acontece devido à alta suscetibilidade a deterioração por fungos, sendo a antracnose provocada pelo *Colletotrichum gloeosporioides* a maior causa dessas perdas no período pós-colheita da fruta. Outros microrganismos responsáveis por doenças no fruto são *Alternaria alternata* e *Fusarium solani* (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2013; EMBRAPA, 2013; EMBRAPA, 2016). O aumento da eficiência produtiva e a redução das perdas pós-colheita é essencial, além disso, cresce a demanda dos consumidores por alimentos livres de agrotóxicos, como os compostos naturais (COSTA; GUILHOTO; BURNQUIST, 2015; RANA; PAUL, 2017).

Dentre os diferentes compostos naturais empregados para combater a proliferação de microrganismos (MARCHESE et al., 2016; DALHOFF, 2018; JHONSON et al., 2018), os peptídeos antimicrobianos fazem parte da imunidade inata e estão na primeira linha de defesa de vários organismos, desta maneira são seguros para serem aplicados em alimentos. Atuam contra bactérias, leveduras, vírus e fungos filamentosos (LAI; GALLO, 2009; SILVA; MACHADO, 2012; COSTA et al., 2015).

Especificamente, os peptídeos antifúngicos possuem baixa resistência e amplo espectro de ação, sendo sua estrutura primária constituída em média por vinte resíduos de aminoácidos. A aplicabilidade destes compostos aumenta quando os mesmos são estruturalmente simples, assim é interessante sintetizar peptídeos cada vez mais curtos em busca da redução de custos (AKKAM, 2016). Desta maneira, os dipeptídeos cíclicos, produzidos de forma sintética podem atender esta necessidade (CROWLEY; MAHONY; SINDEREN, 2013; PERZBORN; SYLDATK; RUDAT, 2013).

Dentre os produtos naturais, foi relatado que o dipeptídeo cíclico c(D-Tyr-L-Leu) isolado de *Bacillus* sp. mostrou atividade antifúngica *in vitro* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (KUMAR et al., 2013). Outro peptídeo, o c(D-Pro-D-Tyr), isolado de *Bacillus cereus* apresentou ação contra alguns fungos como

*Rhizoctonia sonali*, *Fusarium oxysporium* e *Penicillium expansum* (KUMAR; NAMBISAN; MOHANDAS, 2014).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar, purificar e caracterizar quimicamente os dipeptídeos c(D-Tyr-L-Leu) e c(D-Pro-D-Tyr). Além de avaliar a ação antifúngica *in vitro* contra *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium solani* e *Alternaria alternata*, fungos deteriorantes do mamão.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Síntese e purificação química de dipeptídeos

A síntese foi realizada em fase líquida pela reação entre Boc-D-Tyr-OH e H<sub>2</sub>N-Leu-OCH<sub>3</sub> usando como reagente acoplador DCC/HOBt em DCM. O dipeptídeo correspondente (Boc-D-Tyr-L-Leu-OCH<sub>3</sub>) foi desprotegido com ácido fórmico e anisol (99:1) e posteriormente ciclizado sob refluxo em sec-butanol e tolueno (4:1), obtendo c(D-Tyr-L-Leu) (van der MERWE et al., 2008). Para a síntese do Boc-D-Pro-D-Tyr-OCH<sub>3</sub> foi utilizado entre Boc-D-Pro-OH e H<sub>2</sub>N-D-Tyr-OCH<sub>3</sub> e um protocolo diferenciado para a ciclização de acordo com Tullberg et al. (2006), para o qual foi adicionado trietilamina (TEA) na etapa da ciclização.

A purificação do c(D-Tyr-L-Leu) foi realizada empregando a técnica de recristalização ou por cromatografia em coluna aberta de sílica gel 60 (0,040 - 0,063 mm) usando uma mistura contendo DCM/MeOH como eluente.

O dipeptídeo c(D-Pro-D-Tyr) foi purificado por CLAE-FR utilizando um sistema de Waters modelo 600E preparativo, composto de uma bomba quaternária (Waters Delta 600 Pump), um detector UV (Waters 2487 Dual Absorbance Detector), um injetor de amostras manual (Rheodyne 3725i-119), um controlador de gradiente automatizado (Waters 600 Controller), um registrador Kipp & Zonen SE 124. Foi utilizado coluna preparativa (Vydac C18, 10µm, 300 Å, 2,2 x 25 cm) sob as condições de separação que empregaram solvente A (H<sub>2</sub>O/ 0,1% TFA) e solvente B (10% ACN/ 0,09% TFA) sob um fluxo de eluição de 10 mL min<sup>-1</sup> em um gradiente linear 5 a 35% do solvente B em 90 minutos.

Os produtos resultantes das sínteses peptídeos brutos e purificados foram analisados no cromatógrafo líquido Dionex U300. A coluna de fase reversa utilizada foi Vydac C18 analítica (0,45 x 25,0 cm tamanho da partícula de 5 µm e de poro de 300 Å), gradiente linear de 5% a 95% de solvente B em 30 minutos; fluxo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ ; comprimento de onda de 210 nm; solvente A constituído por TFA 0,1% em água; solvente B constituído por ACN 60% ACN/H<sub>2</sub>O contendo 0,09% de TFA para c(D-Tyr-L-Leu) ou 40% ACN/H<sub>2</sub>O contendo 0,09% de TFA para c(D-Pro-D-Tyr).

A relação massa carga (m/z) do peptídeos foram determinadas em espectrômetro de massas tipo íon-trap da Bruker (modelo Amazon X). Foi empregada a técnica de ionização por electrospray (ESI-MS) com a voltagem do capilar de 4500 V a 220 °C.

## 2.2 Ensaio biológicos

As cepas utilizadas foram *Colletotrichum gloeosporioides* (CBMAI 864) adquirido na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (Unicamp), *Fusarium solani* (CCT 1204) e *Alternaria alternata* (CCT 2816), adquiridos na Fundação André Tosello. *C. gloeosporioides* e *A. alternata* foram cultivados em ágar extrato de malte e *F. solani* foi cultivado em ágar batata dextrose. O cultivo do *C. gloeosporioides* foi realizado a 28 °C por oito dias, *F. solani* e *A. alternata* foram cultivados a 25 °C por sete dias, em estufa tipo BOD. A padronização dos esporos para o ensaio foi realizada em câmara de Neubauer. A concentração final de inóculo foi de 10<sup>5</sup> esporos mL<sup>-1</sup>.

Os dipeptídeos c(D-Tyr-L-Leu) e c(D-Pro-D-Tyr) foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO ≥ 99,9%, Sigma-Aldrich, USA) na concentração de 160 mM, a diluição seriada foi realizada com água destilada estéril até a concentração mínima de 0,3 mM. O controle positivo utilizado foi o tiabendazol (Sigma-Aldrich, USA) dissolvido em DMSO e o etanol 70% em diluição seriada (0,04 a 160 mM).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada de acordo com FEHLBAUM et al., (1994), com algumas modificações realizadas por FIEIRA et al., (2013), em microplaca de 96 poços, onde cada poço continha 10 µL do composto sintético, 10 µL de água destilada estéril e 80 µL de inóculo a 10<sup>5</sup> esporos mL<sup>-1</sup>. As

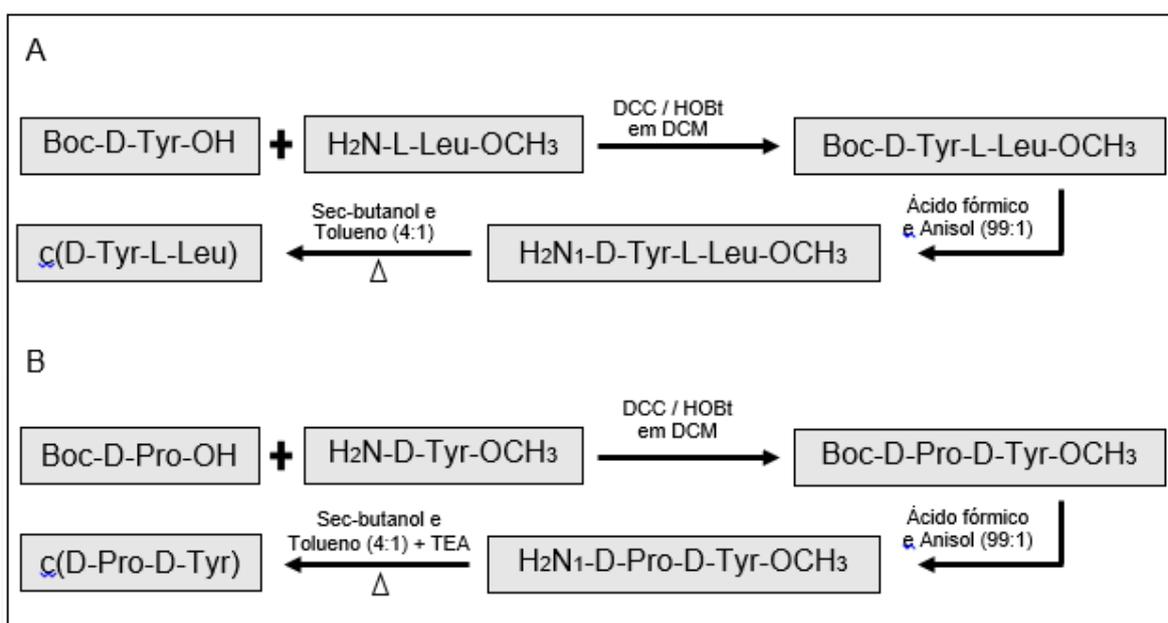
microplacas foram incubadas sob condições ideais de crescimento de cada microrganismo. A leitura dos resultados foi feita através do leitor de microplacas (Thermoplate<sup>®</sup>) a uma absorvância de 630 nm. O valor da CIM corresponde a menor concentração que o composto testado causa 100 % de inibição do crescimento dos fungos. O antifúngico tiabendazol foi usado como controle positivo de inibição de crescimento celular.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 SÍNTESE QUÍMICA DOS DIPEPTÍDEOS

O presente trabalho apresenta a primeira síntese química dos dipeptídeos em questão. Essa produção de forma sintética se faz necessária para comprovar a ação do composto natural, através da obtenção de um produto com pureza e em quantidade adequada para realização das avaliações biológicas. Assim, o esquema geral de síntese dos dipeptídeos está apresentado na figura 1.

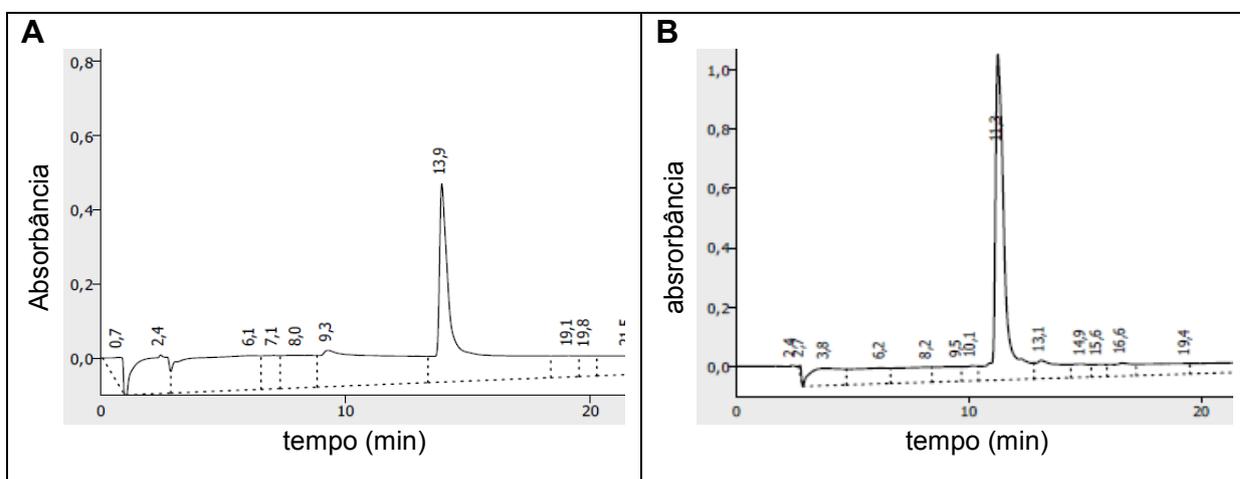
Figura 1 - Esquema geral de síntese dos dipeptídeos cíclicos.



\* A – esquema de síntese de c(D-Tyr-L-Leu), B – esquema de síntese de c (D-Pro-D-Tyr).

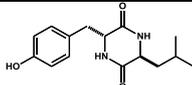
A síntese do peptídeo c(D-Tyr-L-Leu) aconteceu de maneira satisfatória e o perfil cromatográfico do mesmo está apresentado na figura 2. Dificuldades sintéticas aconteceram na etapa de ciclização do Boc-D-Pro-D-Tyr-OMe, peptídeo precursor do c(D-Pro-D-Tyr), que foram contornadas com a adição de trietilamina no meio reacional. Os rendimentos da síntese e purificação dos dipeptídeos não foram superiores a 10%.

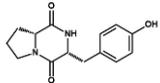
Figura 2 – Perfil cromatográfico em CLAE-FR do c(D-Tyr-L-Leu) (A) e c(D-Pro-D-Tyr) (B). Condições: Solvente A: 0,1%TFA/água, solvente B: 40% acetonitrila em água contendo 0,09% de TFA, gradiente 5-95% em 30 minutos, fluxo 1mL/min,  $\lambda$ : 210 nm.



A polaridade das amostras está associada ao tempo de retenção na cromatografia, quanto maior o tempo de retenção mais apolar é o composto (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010). Assim, o dipeptídeo c(D-Tyr-L-Leu) apresentou uma maior hidrofobicidade que o c(D-Pro-D-Tyr) o que pode ser observado pelo tempo de retenção superior na análise em cromatógrafo líquido usando como eluente uma mistura de água e acetonitrila (Figura 2, Tabela 1, Tabela 2).

Tabela 1 - Dados cromatográficos e pureza dos dipeptídeos cíclicos

Dipeptídeo	Estrutura química	CLAE-FR Solvente B	T <sub>R</sub> (min); ACN para eluição (%)	Pureza (%)
c(D-Tyr-L-Leu)		40% ACN / H <sub>2</sub> O contendo 0,09% de TFA	13,9; 44	> 95

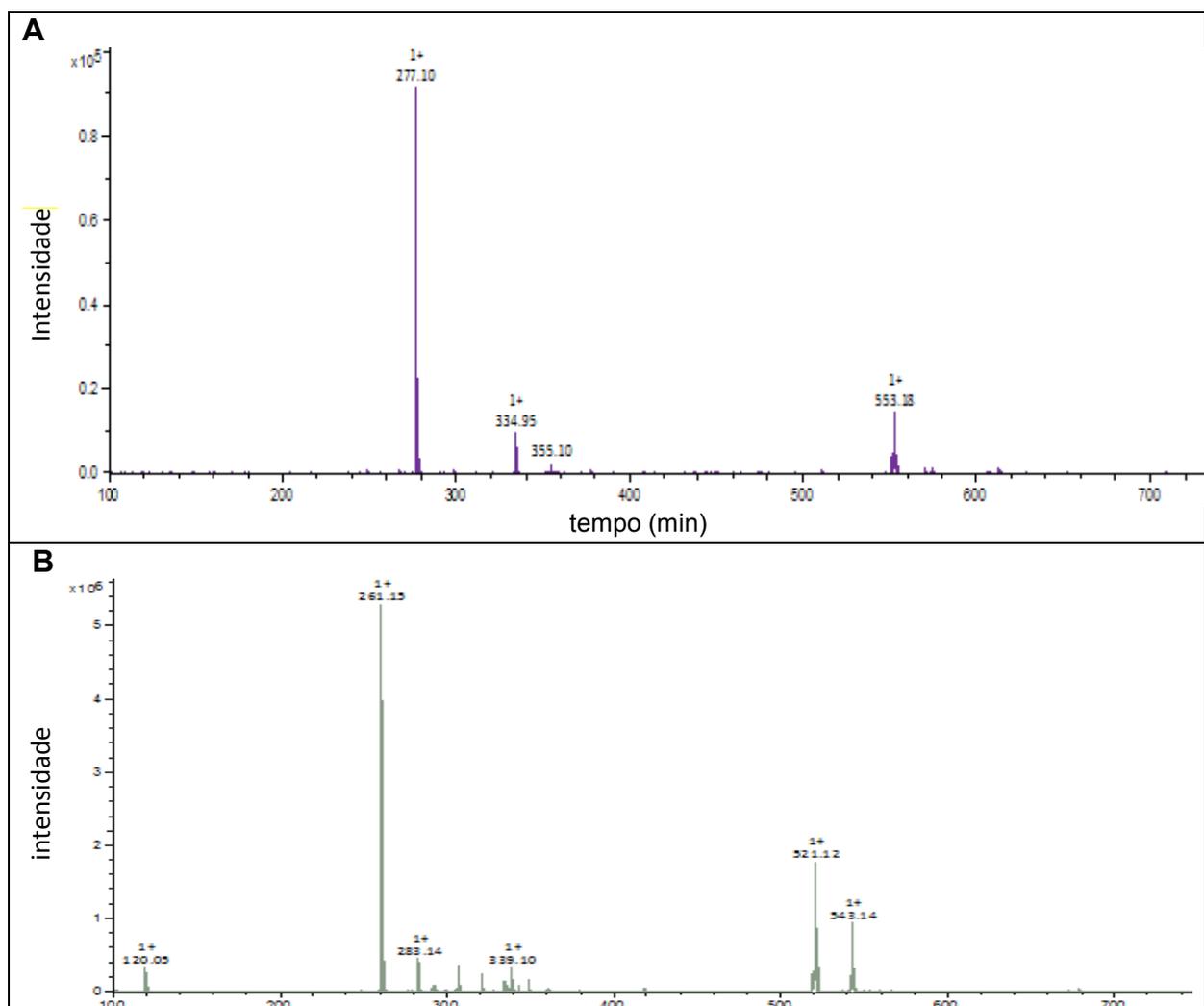
C(D-Pro-D-Tyr)		40% ACN / H <sub>2</sub> O contendo 0,09% de TFA	11,3; 39	> 95
----------------	---	--	----------	------

A espectrometria de massas possibilitou a confirmação dos produtos sintetizados. A tabela 2 apresenta a massa molar dos dipeptídeos, já a figura 3 apresenta os picos no espectro de massas, que correspondem aos produtos.

**Tabela 2** - Massa molar dos dipeptídeos na análise por espectrometria de massas.

Dipeptídeo	Massa molar m/z: observada (calculada)
c(D-Tyr-L-Leu)	277,10 (276,34)
c(D-Pro-D-Tyr)	261,15 (260,32)

**Figura 3** – Espectros de massas do c(D-Tyr-L-Leu) (A) e do c(D-Pro-D-Tyr) (B). Condições da ESI-MS: Capilar: 4500V, Temperatura: 220°C, modo de ionização: ES+.



tempo (min)
-------------

### 3.2 ATIVIDADE FUNGISTÁTICA

Os dipeptídeos c(D-Tyr-L-Leu) e c(D-Pro-D-Tyr) não apresentaram ação fungistática contra *C. gloesporioides* (CBMAI 864), *F. solani* (CCT 1204) e *A. alternata* (CCT 2816). KUMAR et al. (2013) testaram o dipeptídeo c(D-Tyr-L-Leu) isolado de *Bacillus* sp., contra o *C. gloesporioides*, obtendo a CIM de 8µg/mL, resultados inferiores ao presente trabalho (>2211 µg/mL). Entretanto, não relatou a quantidade de esporos de *C. gloesporioides* que foram usadas no ensaio antifúngico, o que dificulta a comparação e pode explicar a diferença nos resultados.

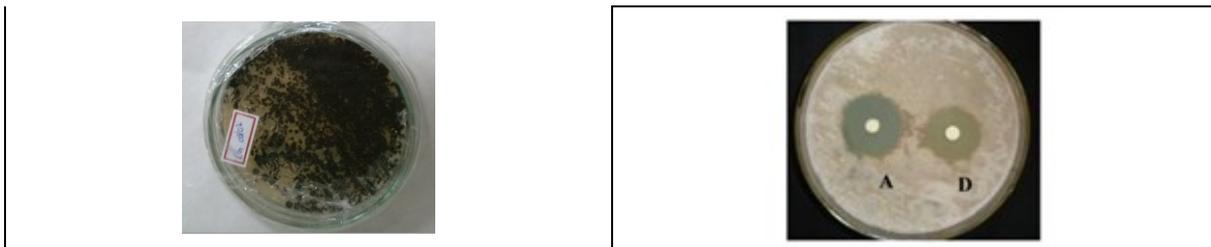
Outros fatores diferenciam os estudos e podem explicar os resultados, KUMAR et al (2013) realizou seu ensaio em meio sólido, no presente estudo optou-se pelo ensaio em meio líquido, visando a otimização do tempo, redução no consumo de reagentes e peptídeos. Ainda, a literatura relata uma maior sensibilidade para este tipo de ensaio (OSTROSKY et al., 2008; BONA et al., 2014).

No presente trabalho o meio utilizado para o cultivo *C. gloesporioides* foi o ágar-extrato de malte, recomendado para o crescimento ótimo do microrganismo, já KUMAR et al (2013) realizou o cultivo em ágar batata dextrose. Ambos os meios são ricos em carboidratos, o pH varia de 4,6 a 5,2 respectivamente. Sabe-se que o pH são fatores que impactam na atividade antifúngica dos compostos (KACPRZYK et al., 2007; ARENAS et al., 2016), porém a diferença é pequena entre os estudos.

A concentração inibitória inferior a encontrada no presente trabalho, possivelmente, seja fruto de fatores bióticos (características genéticas das cepa – genótipo). Observa-se uma diferença entre a cor das cepas utilizadas nos estudos, o que enfatiza que existe uma diferença entre elas e uma consequente sensibilidade diferente ao dipeptídeo.

**Figura 4** – Diferença entre a coloração das cepas de *C. gloesporioides* do presente trabalho e de KUMAR et al., (2013)

<b>A</b>	<b>B</b>
----------	----------



\* A – *C. gloesporioides* cepa utilizada no estudo; B – *C. gloesporioides* KUMAR et al., (2013).

Semelhantemente ao presente estudo YONEZAWA et al (2011) não encontraram atividade antimicrobiana para o isômero do c(D-Pro-D-Tyr) contra *Penicillium crustosum*, *Schizophyllum commune*, *Trichophyton concentricum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. O peptídeo c(L-Pro-L-Tyr) foi capaz de produzir um fraco halo de inibição para *Aspergillus niger* pelo método de disco de papel contendo 125 µg do dipeptídeo por disco.

Peptídeos antimicrobianos carregados positivamente possuem fortes interações eletrostáticas com fosfolipídios carregados negativamente da membrana, o que pode ajudar na expressão da ação antimicrobiana (KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018). Os dipeptídeos cíclicos aqui estudados que não possuem carga em sua cadeia lateral possivelmente estabelecem sua ação antifúngica por interação hidrofóbica, ou seja, o tipo de interação entre um PAM e a membrana do microrganismo relatada na literatura como mais fraca (KACPRZYK et al., 2007). Sabendo que a interação eletrostática eleva a ação antimicrobiana, sugere-se sintetizar os peptídeos lineares  $H_2N-D-Tyr-L-Leu-OCH_3$  e  $H_2N-D-Pro-D-Tyr-O OCH_3$ , o que poderia intensificar a ação antimicrobiana deste tipo de peptídeo por este apresentar a porção N-terminal livre.

#### 4 CONCLUSÃO

A síntese proporcionou produto com elevada pureza, porém com baixos rendimentos. Os dipeptídeos c(D-Tyr-L-Leu) e c(D-Pro-D-Tyr) não apresentaram ação antimicrobiana contra os fungos *F. solani*, *C. gloesporioides* e *A. alternata* nas concentrações avaliadas. Estes resultados ampliam o conhecimento sobre a ação antifúngica destes dipeptídeos e contribuem com informações adicionais para o desenho de peptídeos mais ativos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGYEI, D.; DANQUAH, M. K. Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. **Trends in Food Science and Technology**, v. 23, n. 2, p. 62-69, 2012.

ALKAN, N.; FORTES, A. M. Insights into molecular and metabolic events associated with fruit response to postharvest fungal. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 889, p. 1-14, 2015.

ARENAS, I.; VILLEGAS, E.; WALLS, O.; BARRIOS, H.; RODRÍGUEZ, R.; CORZO G. Antimicrobial activity and stability of short and long based arachnid synthetic peptides in the presence of commercial antibiotics. **Molecules**, v. 21, n. 225, p. 1-17, 2016.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; SIVAKUMAR, D.; BELLO-PÉREZ, A.; VILLANUEVA-ARCE, R.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M. A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. **Crop Protection**, v. 49, n. 1, p. 8-20, 2013.

BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K. JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

BOUDINE, L.; LOUASTE, B.; ELOUTASSI, N.; CHAMI, N.; CHAMI, F.; REMMAL, A. Antifungal activity of oregano essential oil and thymol against some fungi isolated from corn grains. **International Journal of Innovation and Applied Studies**, v. 17, n. 4, p. 1120-1124, 2016.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. **Food Research International**, v.74, n.1, p.185-198, 2015.

COSTA, F. et al. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 1, p. 1431–1440, 2011.

COSTA, C. C.; GUILHOTO, J. J. M.; BURNQUIST, H. L. Impactos Socioeconômicos de Reduções nas Perdas Pós-colheita de Produtos Agrícolas no Brasil. **Revista Economia e Sociologia Rural**, v.53, n.3, p.395-408, 2015.

CROWLEY, S.; MAHONY, J.; SINDEREN, D. V. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. **Trends in Food Science and Technology**, v.33, n.2, p. 93-109, 2013.

DALHOFF, A. Does the use of antifungal agents in agriculture and food foster polyene resistance development? A reason for concern. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 13, n.1, p. 40-48, 2018.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Mamão. 2016. Disponível em < <https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mamão>> Acesso em: 16 mai. 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Mamão: Fitossanidade**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Produção e Mercado de Frutas: Situação e Perspectivas. 2013. Disponível em < [https://docs.google.com/file/d/0B720W\\_Z6N7NRRU4wb0gtU1U1Rmc/edit](https://docs.google.com/file/d/0B720W_Z6N7NRRU4wb0gtU1U1Rmc/edit)> Acesso em: 16 mai. 2016.

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, n. 1, p. 40-46, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Global Food Losses and Food Waste: Extent, causes and prevention**. Rome, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. Statistics Division, 2014. Disponível em <<http://faostat3.fao.org>>. Acesso em: 26 fev. 2018.

Food and Drug Administration (FDA). Código de Regulamentos Federais. 2018. Disponível em <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?FR=172.515>> Acesso em: 16 mar. 2018.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agentes. **Food Control**, v. 46, n.1, p.412-429, 2014.

JIANG, Z.; KULLBERG, B. J.; LEE, H. V. D.; VASIL, A. I.; HALE, J. D.; MANT, C. T.; HANCOCK, R. E. W. VASIL, M. L.; NETEA, M. G.; HODGES, R. S. Effects of hydrophobicity on the antifungal activity of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. **Chemical Biology and Drug Design**, v.72, n.6, p.483–495, 2008.

JUNEJA, V. K.; DWIVEDI, H. P; YAN, X. Novel Natural Food Antimicrobials. **Annual Review of Food Science and Technology**. v.3, n.1, p. 381-403, 2012.

KACPRZYK, L. RYDENGÅRD, V.; MÖRGELIN, M.; DAVOUDI, M.; PASUPULETI, M.; MALMSTEN, M.; SCHMIDTCHEN, A. Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1768, n. 11, p. 2667-2680, 2007.

KANDASAMY, S. K.; LARSON, R. G. Effect of salt on the interactions of antimicrobial peptides with zwitterionic lipid bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1274-1284, 2006.

KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. **Biomolecules**, v. 8, n. 4, p. 1-24, 2018.

KUMAR, N.; GORANTLA, J.N.; MOHANDAS, C.; NAMBISAN, B.; LANKALAPALLI, R.S. Isolation and antifungal properties of cyclo (D-Tyr-L-Leu) diketopiperazine isolated from Bacillus sp. associated with rhabditid entomopathogenic nematode. **Natural Product Research**, v.27, n. 23, p.2168-72, 2013.

KUMAR, S. N.; NAMBISAN, B.; MOHANDAS, C. Purification and identification of two antifungal cyclic dipeptides from Bacillus cereus subsp. thuringiensis associated with a rhabditid entomopathogenic nematode especially against Fusarium oxysporum. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 29, n.2, p. 190–197, 2014.

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.

LI-CHAN, E. C. Y. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. **Current Opinion in Food Science**, v.1, n.1, p.28-37, 2015.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

MALIK, E. et al. DENNISON, S.R.; HARRIS, F.; PHOENIX, D. A. pH Dependent Antimicrobial Peptides and Proteins, Their Mechanisms of Action and Potential as Therapeutic Agents. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 67; p. 1-35, 2016.

MARCHESE, A.; ORHAN I. E.; DAGLIA, M.; BARBIERI, R.; DI LORENZO, A.; NABAVI, S. F.; GORTZI, O.; IZADI, M.; NABAVI, S. M. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, n.1, p. 402-414, 2016.

MIRANDA, C. A. S. F.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEIREDO, A. C. S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.

MOHAMMAD, Y. M.; RAEI, P.; ALIZADEH, N.; KAFIL, H. S. Carvacrol and thymol: strong antimicrobial agents against resistant isolates. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 28, n. 2, p, 63-68, 2017.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PERZBORN, M.; SYLDATK, C.; RUDAT, J. Separation of cyclic dipeptides (diketopiperazines) from their corresponding linear dipeptides by RP-HPLC and method validation. **Chromatography Research International**, v. 2013, n.1, p.1-8, 2013

RANA, J.; PAUL, J. Consumer behavior and purchase intention for organic food: A review and research agenda. **Journal of Retailing and Consumer Services**, v.38, n. 1, p. 157-165, 2017.

RYAM, L. A. ZANNINI, E.; DAL BELLO, F.; PAWLOWSKA, A.; KOEHLER, P.; ARENDT, E. K. *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 1, p. 276–283, 2011.

SANTOS, J. C. P.; SOUSA, R. C. S.; OTONI, C. G.; MORAES, A. R. F.; SOUZA, V. G. L.; MEDEIROS, E. A. A.; ESPITIA, P. J. P.; PIRES, A. C. S.; COIMBRA, J. S. R.; SOARES, N. F. F. Nisin and other antimicrobial peptides: Production, mechanisms of action, and application in active food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 48, n.1, p. 179-194, 2018.

SISTEMA DE APOIO A MICRO E PEQUENA EMPRESA – SEBRAE. **Boletim de Inteligência: Agronegócio Fruticultura**. SEBRAE, 2015.

THAJUDEEN, H.; PARK, K.; MOON, S.; HONG, I. S. An efficient green synthesis of proline-based cyclic dipeptides under water-mediated catalyst-free conditions. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 9, p. 1303–1305, 2010.

TULLBERG, M.; GROTLI, M.; LUTHMAN, K. Efficient synthesis of 2,5-diketopiperazines using microwave assisted heating. **Tetrahedron**, v.62, n.1, p.7484–7491, 2006.

van der MERWE, E.; HUANG, D.; PETERSON, D.; KILIAN, G.; MILNE, P.J.; VAN DE VENTER, M.; FROST, C. The synthesis and anticancer activity of selected diketopiperazines. **Peptides**, v.29, n.8, p.1305-1311, 2008.

WEERDEN, N. L.; BLEACKLEY, M. R.; ANDERSON, M. A.; Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 19, p.3545-70, 2013.

YONEZAWA, K.; YAMADA, K.; KOUNO I. New diketopiperazine derivatives isolated from sea urchin-derived bacillus sp. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 1, p. 106-108, 2011.

**ARTIGO 2 – COMBINAÇÃO DE CARVACROL E TIABENDAZOL CONTRA**  
*Colletotrichum gloesporioides, Fusarium solani e Alternaria alternata*

**COMBINAÇÃO DE CARVACROL E TIABENDAZOL CONTRA *Colletotrichum***  
***gloesporioides, Fusarium solani e Alternaria alternata***

Franciéllly Stadler\*, Eder da Costa dos Santos, Alessandra Machado-Lunkes

Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Londrina, Brasil. Avenida dos Pioneiros, 3131, 86036-370, Londrina, Paraná, Brasil. Telefone: +55 (43) 3315-6100, Fax +55 (43) 3315-6121. \*E-mail: stadler.alipr@gmail.com

**REVISTA:** Ciencia Rural (ISSN 1678-4596)

**Resumo:**

Devido à resistência microbiana aos antifúngicos comerciais, a toxicidade e os efeitos secundários à saúde e à natureza, crescem o uso de compostos alternativos para controlar a perda pós-colheita de frutas durante o armazenamento. Dentre eles destaca-se o carvacrol, um composto natural que atrai atenção devido a possibilidade de uso seguro, a sua biodegradabilidade, e por ser ecologicamente correto e economicamente viável. Porém o mesmo altera as características organolépticas do alimento em que é aplicado. Para levantar sua atividade contra fungos patogênicos de frutas, como *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium solani* e *Alternaria alternata* realizaram-se ensaios em microplaca de 96 poços, chegando a concentração inibitória mínima dos compostos. O mesmo procedimento foi realizado com o antifúngico comercial. Buscando reduzir o sabor residual do carvacrol e os efeitos secundários relacionados ao tiabendazol foi testado a combinação de ambos, por meio do ensaio de “tabuleiro de xadrez”. Os resultados foram positivos, obtendo efeito aditivo contra *C. gloesporioides* (FICI 0,5) e sinérgico contra *A. alternata* (FICI 0,141), reduzindo a concentração do carvacrol em 75% e 87,5%, e do tiabendazol, em 75% e 98,4%, para *C. gloesporioides* e para *A. alternata*, respectivamente.

**Palavras-chave:** Carvacrol, Sinergismo, Pós-colheita, Antifúngico.

## INTRODUÇÃO

A fruticultura contribui de forma expressiva para o agronegócio brasileiro, com mais de 40 milhões de toneladas de frutos colhidos ao ano (FAO, 2014; SEBRAE, 2015). Contudo, para manter a competitividade do setor, melhorias em alguns aspectos são essenciais, como a redução das perdas pós-colheita e o aumento da eficiência produtiva (COSTA et al., 2015). De fato, o Brasil possui 30% da produção de frutas desperdiçadas no período pós-colheita (FAO, 2011; SEBRAE, 2015).

A redução de perdas através de soluções eficientes na cadeia produtiva agroindustrial torna-se essencial para garantir a segurança alimentar e nutricional, e, representa ganhos econômicos substanciais. A atenuação das perdas pode ampliar o valor da produção agrícola para R\$ 9,8 bilhões, elevando em R\$ 18 bilhões o valor da economia e, em 9,7 bilhões o PIB do país, e ainda, pode gerar mais de 300 mil empregos (FAO, 2011; COSTA et al., 2015).

A contaminação por fungos deteriorantes é uma das principais causas de perdas no período pós-colheita de frutas (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2013; ALKAN & FORTES, 2015). O mamão, fruta de grande produção no Brasil e no mundo, também é a fruta que mais apresenta perdas na pós-colheita. Isso decorre da elevada suscetibilidade, principalmente associada a fungos, sendo o *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da antracnose, o maior responsável pelas perdas pós-colheita da fruta. Outros microrganismos responsáveis por doenças no fruto são *Alternaria alternata* e *Fusarium solani* (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2013; EMBRAPA, 2016).

Os principais fungicidas utilizados para o mamão, fruta com elevados índices de perdas, são o tiabendazol e Benomyl<sup>®</sup>, que não são utilizados em vários países devido à propensão à resistência do fungo e a efeitos nocivos à saúde humana (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2013; PERRUCHON et al., 2017). Além disso, o uso indiscriminado de fungicidas comerciais na agricultura é um problema de saúde pública tendo em vista as contaminações no ambiente, em alimentos e as intoxicações na saúde humana. O Brasil está entre os países de maior consumo de agrotóxicos no mundo (PIGNATI et al., 2017).

Paralelamente a isso, cresce a busca dos consumidores por alimentos livres de produtos químicos (MOHAMMAD et al., 2017), o que eleva cada vez mais o interesse pelo uso de compostos naturais. Estes antimicrobianos de fontes naturais

podem ser aplicados na indústria de alimentos para melhorar a qualidade e estender a vida útil dos alimentos (JUNEJA et al., 2012; CALO et al., 2015; MIRANDA et al., 2016).

Nesse contexto, o carvacrol, um monoterpeneo presente em plantas aromáticas como tomilho e orégano vem destacando-se. Utilizado em baixas concentrações em alimentos como aromatizante e conservante, ainda pode ser aplicado como um agente antimicrobiano para controle de microrganismos resistentes (SUNTRES et al., 2015; MOHAMMAD et al., 2017).

Entretanto, o carvacrol causar alterações de sabor e de aroma. Neste sentido, faz-se necessário atingir o efeito antimicrobiano na menor concentração possível, minimizando alterações sensoriais indesejáveis em determinados produtos (ZHOU et al., 2007). A aplicação do carvacrol em combinação com outros compostos antimicrobianos vêm sendo estudada, podendo solucionar estas alterações (ZHOU et al., 2007). De fato, o carvacrol pode ter ação de forma isolada ou em sinergia com outros compostos. Estudos demonstram a ação sinérgica entre o carvacrol e o seu precursor *p*-cimeno (BURT, 2004; ALVES et al., 2016).

Antimicrobianos e componentes de óleos essenciais agindo sinergicamente vêm ganhando destaque, pois podem afetar múltiplos alvos, gerar interações físico-químicas e atuar na inibição de mecanismos de resistência antibacteriana. Esse efeito aditivo ou sinérgico, sugere que os óleos essenciais são alternativas em busca da redução de antimicrobianos comerciais (LANGEVELD et al., 2014). Diante disso, torna-se interessante usar o carvacrol em sinergia com outros compostos antifúngicos, para o controle da deterioração microbiana, tanto pela atenuação do sabor e aroma do carvacrol, quanto pela redução de fungicidas comerciais e seus efeitos secundários.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi encontrar a concentração inibitória mínima e a concentração fungicida mínima do carvacrol e do tiabendazol. Em seguida avaliar a ação fungicida das combinações entre carvacrol e o tiabendazol, buscando reduzir a concentração inibitória de ambos os compostos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cepas padrão

As cepas utilizadas foram *Colletotrichum gloeosporioides* (CBMAI 864) adquirido na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (Unicamp), *Fusarium solani* (CCT 1204) e *Alternaria alternata* (CCT 2816), adquiridos na Fundação André Tosello. *C. gloeosporioides* e *A. alternata* foram cultivados em ágar extrato de malte e *F. solani* foi cultivado em ágar batata dextrose. O cultivo de *C. gloeosporioides* foi realizado a 28 °C por oito dias, *F. solani* e *A. alternata* foram cultivados a 25 °C por sete dias, em estufa tipo BOD. A padronização dos esporos para o ensaio foi realizada em câmara de Neubauer. A concentração final de inóculo usada foi de  $10^5$  esporos mL<sup>-1</sup>.

### Diluição de compostos antifúngicos

O carvacrol proveniente da Sigma-Aldrich (USA), foi diluído em etanol 70% na concentração de 300 mM até a concentração mínima de 0,63 mM. O tiabendazol (Sigma-Aldrich, USA) foi dissolvido em DMSO (Sigma-Aldrich, USA) e o etanol 70% foi usado em sua diluição seriada (0,04 a 160 mM).

### Ensaio fungistático e fungicida

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada de acordo com FEHLBAUM et al., (1994), com algumas modificações realizadas por FIEIRA et al., (2013), em microplaca de 96 poços, onde cada poço continha 10 µL do composto sintético, 10 µL de água destilada estéril e 80 µL de inóculo a  $10^5$  esporos mL<sup>-1</sup>. Foi necessário o uso de uma película protetora devido à pressão de vapor do carvacrol. As microplacas foram incubadas sob condições ideais de crescimento de cada microrganismo. A leitura dos resultados foi feita através do leitor de microplacas (Thermoplate®) a uma absorbância de 630 nm. O valor da CIM corresponde a menor

concentração que o composto testado causa 100% de inibição do crescimento dos fungos.

Para determinação da concentração fungicida mínima (CFM) foi retirado o conteúdo total do poço que não apresentou crescimento fúngico e inoculado em ágar extrato de malte para *C. gloesporioides* e *A. alternata* e ágar batata dextrose para *F. solani* (método *spread plate* – espalhamento em superfície) na condição ideal o crescimento do microrganismo. Após 7 dias de incubação foi realizada a contagem das colônias. A CFM foi determinada como a mínima concentração, em que não houve crescimento em placa de Petri.

### Sinergismo entre compostos antifúngicos

Em uma microplaca de 96 poços foi adicionado, em cada poço, 5 µL de uma série de diluições do composto A, e em uma segunda dimensão foi adicionado 5 µL de uma série de diluições do composto B. Cada poço foi inoculado com 80 µL de uma suspensão de esporos do microrganismo teste ( $10^5$  esporos mL<sup>-1</sup>) e mais 10 µL água estéril. A incubação foi realizada a 25 °C por 48 horas para *A. alternata* e *F. solani* e, a 28 °C por 96 horas para *C. gloesporioides*. Cálculo da Concentração Inibitória Fracionária (CIF) e índice CIF (BONAPACE et al., 2002):

CIF A = CIM composto A na combinação/CIM composto A sozinho

CIF B = CIM composto B na combinação/CIM composto B sozinho

Índice CIF = CIF A + CIF B

Foi considerado como efeito aditivo quando o índice CIF fica entre 0,5 e 1, sinérgico, quando o índice CIF fica menor ou igual 0,5 e antagonista quando o índice CIF fica entre 1 e 2 (BHAT & AHANGAR, 2007).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O antifúngico comercial tiabendazol (Sigma-Aldrich, USA) apresentou uma CIM para *C. gloesporioides*, *A. alternata* e *F. solani*, de 500 µM, 500 µM e 4 µM, respectivamente. O mesmo não apresentou ação fungicida, na maior concentração testada (16000 µM), contra nenhum dos microrganismos avaliados.

Notou-se nos ensaios antifúngicos em microplaca de 96 poços que as linhas onde não tinha aplicação de carvacrol apresentaram os poços límpidos, ou seja, não havia ocorrido proliferação microbiana. Tal fato poderia estar relacionado com a capacidade que o carvacrol possui de inibir a proliferação de microrganismos na sua fase vapor (LÓPES et al., 2007). Para comprovar tal hipótese, optou-se pelo uso de uma borracha seladora para microplaca de 96 poços.

A borracha seladora isola a atmosfera gasosa de cada poço, possibilitando a realização dos ensaios antimicrobianos impedindo a interferência entre os poços, ou seja, entre os micros ensaios. Assim, os resultados da CIM antes e após o uso da borracha seladora estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – CIM do carvacrol com e sem o uso da borracha seladora de microplaca

Microrganismo	Sem película		Com película	
	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CFM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CFM ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>F. solani</i>	70,8*	563*	282	563
<i>A. alternata</i>	282	563	563	563
<i>C. gloesporioides</i>	140	563	282	563

\* Dados prévios do grupo de pesquisa (ADRIA et al., 2017)

A tabela 1 apresenta a ação fungistática e fungicida do carvacrol com e sem a interferência da pressão de vapor. Os resultados comprovam a hipótese de que os ensaios antimicrobianos em meio líquido com carvacrol usando a microdiluição em placas de 96 poços sem o isolamento de cada microensaio pode ser influenciado pela ação antimicrobiana do carvacrol na fase vapor.

A concentração fungicida mínima do carvacrol contra *C. gloesporioides* foi o dobro do valor da CIM, corroborando com ABBASZADEH et al., (2014), que observaram que a concentração do carvacrol que exibe atividade fungicida era maior que para a ação fungistática contra diversas espécies de fungos. A atividade inibitória contra *C. gloesporioides* foi constatada na literatura através de um ensaio em meio sólido, onde foram testados diversos óleos essenciais inoculados em discos de papel, e o carvacrol mostrou-se o mais eficaz para inibir o crescimento micelial do microrganismo em todas as concentrações testadas (2,5 e 8  $\mu\text{L disco}^{-1}$ ) (HONG et al., 2015).

*A. alternata* apresentou uma CIM e CFM de 563  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , quantidade superior à obtida por ABBASZADEH et al. (2014) que relataram a concentração de 350  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e de 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em em ensaio antimicrobiano em meio líquido,

respectivamente. Ainda, neste trabalho os autores usaram uma concentração de microbiana de  $1 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . Esta diferença pode estar relacionada múltiplos fatores que as células microbianas são expostas, como as várias cepas de fungos, a origem da substância antimicrobiana, a resistência dos microrganismos, entre outros fatores (SINIGAGLIA et al., 1998). Por outro lado, PERINA et al. (2015) também encontraram em ensaio em microplaca de 96 poços valores inferiores ao presente estudo, para o mesmo microrganismo utilizando uma concentração de  $2,0 \times 10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . Os autores relataram uma CIM de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o óleo de tomilho, cujo principal constituinte de é o carvacrol, e para o óleo essencial timol, respectivamente.

Segundo ZABKA e PAVELA (2018), o gênero *Fusarium* é um dos fungos mais significativos do planeta e os óleos essenciais são uma excelente alternativa de origem natural para o seu controle. No presente estudo, a inibição de *F. solani* se deu na concentração de  $282 \mu\text{g mL}^{-1}$  e ação fungicida a  $563 \mu\text{g mL}^{-1}$  sendo este trabalho o primeiro relato de ação antifúngica do carvacrol contra esta espécie. Entretanto a literatura traz relatos de atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporium* a CIM de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  e a CFM de  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ , em ensaio que utilizou  $1 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . Sugerindo que o composto pode ser aplicado no controle da decomposição de alimentos no período pós colheita, de forma segura, pois o carvacrol não apresenta risco em alimentos em uma quantidade inferior a  $50 \text{mg kg}^{-1}$  (ABBASZADEH et al., 2014). Além disso, o uso de carvacrol está regulamentado pelo FDA, no Código de Regulamentos Federais, na seção 172.515 (FDA, 2018).

O carvacrol é provável que seja acumulado na membrana celular devido a sua hidrofobicidade, além disso, a presença de uma hidroxila livre influencia sua atividade antimicrobiana. Sua capacidade de ligação de hidrogênio e liberação de prótons pode provocar alterações conformacionais na membrana, ocasionando morte celular (ARFA et al., 2006). Em outro trabalho que discute a ação antimicrobiana do carvacrol, os autores usam-se do óleo de orégano para relatar que a presença dos terpenóides, e sua natureza hidrofóbica também é que contribui para a difusão do óleo através da membrana lipídica. Além disso, a estrutura química do carvacrol e do timol contém um grupo hidroxila livre e um anel aromático, os quais podem estar relacionados a toxicidade apresentada. A dissociação de  $\text{H}^+$  do grupo livre  $-\text{OH}$  é facilitada pelos elétrons alterados do carvacrol. Prótons e cátions monovalentes são deslocados através da membrana por gradiente diferencial, sendo

idênticos ao íon  $K^+$ , alterando o pH, despolarizando e aumentando sua permeabilidade da membrana celular (RAO et al., 2010). Terpenos tem sua atividade antifúngica relacionada aos seus grupos hidroxila. O carvacrol causa danos na membrana celular interagindo com esteróis, entre eles o ergosterol, o que resulta na morte do fungo (NAZZARO et al., 2017).

O efeito sinérgico pode ser útil para aumentar as propriedades antimicrobianas, reduzindo a quantidade efetiva de óleos essenciais, o que resulta na redução da alteração do sabor original do alimento (SIVAKUMAR & BAUTISTA-BAÑOS, 2014). Estudos mostram ação sinérgica do timol e carvacrol com o fluconazol contra *C. albicans* (NAZZARO et al., 2017). KISSELS et al., (2017) observaram o sinergismo combinando o carvacrol com doxiciclina, sugerindo a aplicação como adjuvante de antimicrobianos.

Diante disso, visando reduzir a concentração inibitória mínima do carvacrol, devido ao seu sabor residual, assim como do tiabendazol, um antifúngico comercial relacionado a resistência fúngica, toxicidade entre outros efeitos secundários o presente estudo testou a combinação de ambos, obtendo-se resultados positivos, como demonstrado na tabela 2.

**Tabela 2** – Interação entre carvacrol e tiabendazol pelo método do “tabuleiro de xadrez”

Fungo	Agente antimicrobiano	CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		FIC	FICI	% redução da CIM
		Individual	Combinada			
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	carvacrol	282	70,5	0,25	0,5	75,0
	tiabendazol	100,8	25,2	0,25		75,0
<i>Alternaria alternata</i>	carvacrol	563	70,5	0,125	0,141	87,5
	tiabendazol	100,8	1,6	0,016		98,4
<i>Fusarium solani</i>	carvacrol	282	140,8	0,499	0,999	50,1
	tiabendazol	0,8	0,4	0,5		50,0

\* CIM: Concentração inibitória mínima, FIC: concentração inibitória fracionária, razão da CIM do agente na combinação pela CIM do agente sozinho, FICI: índice FIC, soma da FIC de cada agente,  $FIC \leq 0,5$ : sinergismo;  $0,5 - 2,0$ : aditivo;  $\geq 2,0$ : antagonismo (BHAT & AHANGAR, 2007).

Existem vários mecanismos de ação relacionados a atividade sinérgica de agentes antifúngicos, dentre elas a inibição em diferentes estágios nas vias intracelulares fúngicas essenciais a sobrevivência celular; o aumento da penetração de um agente antifúngico e função da ação de outro composto antifúngico na membrana celular; a inibição de proteínas transportadoras; e a inibição simultânea

de diferentes alvos celulares (CASTRO et al., 2015). A ação sinérgica de tiabendazol e carvacrol pode envolver o aumento da suscetibilidade do fungo aos diferentes mecanismos de ação dos compostos, levando ao aumento da permeabilidade celular e a morte celular.

Semelhantemente a este trabalho que usou o “tabuleiro de xadrez” para avaliação a ação antimicrobiana de compostos associados os óleos essenciais de canela combinado com os óleos essenciais de tomilho ou de alho não apresentaram ação aditiva ou sinérgica contra *F. solani*. HORVÁTH et al. (2016) acreditam que a interação depende do microrganismo e da composição química dos óleos essenciais.

Resultado contrário foi obtido por CASTRO et al. (2015) quando testaram a combinação de timol com nistatina, e encontraram uma redução significativa nos valores de CIM. Para ambos os produtos, a redução da CIM, foi de 87,4% para as três cepas de *Candida* spp testadas. O valor do índice FIC foi de 0,25, indicando um efeito sinérgico.

## CONCLUSÃO

O carvacrol apresentou ação fungicida e fungistática contra os três microrganismos testados. O tiabendazol inibiu a proliferação dos fungos, porém não apresentou ação fungicida. Quando aplicados em conjunto os compostos apresentaram efeito aditivo contra *C. gloesporioides* (FICI 0,5) e sinérgico contra *A. alternata* (FICI 0,141), reduzindo a concentração do carvacrol em 75% e 87,5%, e do tiabendazol em 75% e 98,4%, para *C. gloesporioides* e para *A. alternata*, respectivamente. Ainda, a borracha seladora de microplaca apresentou-se como um item indispensável em ensaios antimicrobianos em meio líquido realizados em microplaca de 96 poços envolvendo compostos que possuem ação antimicrobiana na fase de vapor. Considerando a o uso de tiabendazol e carvacrol na fruticultura, a combinação dos compostos é positiva, pois pode reduzir a quantidade de tiabendazol aplicado e o sabor residual de carvacrol em frutas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASZADEH, S. et al. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 24, n. 2, p.51-56, 2014. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.01.063>> Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.01.063.

ADRIA, A. et al. Estudo da inibição do crescimento de *Fusarium solani* usando carvacrol e peptídeos antimicrobianos. **XXII Seminário De Iniciação Científica e Tecnológica**, 7, p. 1-4, 2017.

ALKAN, N.; FORTES, A. M. Insights into molecular and metabolic events associated with fruit response to postharvest fungal. **Frontiers in Plant Science**, v.6, n.889, p.1-14, 2015. Available from: <<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00889>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.3389/fpls.2015.00889.

ALVES, F.C.B. et al. Inhibitory activities of the lantibiotic nisin combined with phenolic compounds against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in cow milk. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 1831-1836, 2016. Available from: <<https://doi.org/10.3168/jds.2015-10025>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.3168/jds.2015-10025.

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. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x.

BAUTISTA-BAÑOS, S. et al. A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. **Crop Protection**, v.49, p.8-20, 2013. Available from: <[10.1016/j.cropro.2013.02.011](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.011)>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.011>.

BHAT, S. A.; AHANGAR A. A. Methods for detecting chemical–chemical interaction in toxicology. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 17, n. 1, p. 441–450, 2007. Available from: <<https://doi.org/10.1080/15376510601177654>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1080/15376510601177654.

BONAPACE, C.R. et al. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, n. 4, p. 363-6, 2002. Available from: <[https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00473-X](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00473-X)>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1016/S0732-8893(02)00473-X.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, v. 54, n. 1, p. 111-119, 2015. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.12.040

CASTRO, R. D. et al. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 417, p. 2-7, 2015. Available from: <<https://doi.org/10.1186/s12906-015-0947-2>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1186/s12906-015-0947-2.

COSTA, C. C. et al. Impactos socioeconômicos de reduções nas perdas pós-colheita de produtos agrícolas no Brasil. **Revista Economia e Sociologia Rural**, v.53, n.3, p.395-408, 2015. Available from: <10.1590/1234-56781806-9479005303002>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1234-56781806-9479005303002>.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Mamão**. Available from: <<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mamão>>. Accessed: Mai. 16, 2016.

Food and Drug Administration (FDA). Código de Regulamentos Federais. Available from: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?FR=172.515>>. Accessed: Mai. 16, 2019.

FEHLBAUM, P. et al. Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 30, p. 33159-33163, 1994.

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, n. 1, p. 40-46, 2013. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612013000500007>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1590/S0101-20612013000500007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Global Food Losses and Food Waste: Extent, causes and prevention**. Rome : 2011. 29p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. Statistics Division, 2014. Available from: <<http://faostat3.fao.org>>. Accessed: Fev. 26, 2018.

HONG, J. K. et al. Application of Volatile Antifungal Plant Essential Oils for Controlling Pepper Fruit Anthracnose by *Colletotrichum gloeosporioides*. **The Plant Pathology Journal**, v. 31, n. 3, p. 269-277, 2015. Available from: <<https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2015.0027>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.5423/PPJ.OA.03.2015.0027.

HORVÁTH, G. et al. Effects of essential oil combinations on pathogenic yeasts and moulds. **Acta Biologica Hungarica**, v. 67, n. 2, p. 205–214, 2016. Available from: <<https://doi.org/10.1556/018.67.2016.2.8>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1556/018.67.2016.2.8.

JUNEJA, V. K.; DWIVEDI, H. P; YAN, X. Novel natural food antimicrobials. **Annual Review of Food Science and Technology**. v.3, n.1, p. 381-403, 2012.

Available from: <<https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101241>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1146/annurev-food-022811-101241.

KISSELS, W.; WU, X.; SANTOS, R.R. Interaction of the isomers carvacrol and thymol with the antibiotics doxycycline and tilmicosin: In vitro effects against pathogenic bacteria commonly found in the respiratory tract of calves. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 2, p. 970-974, 2017.

Available from: <<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11536>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.3168/jds.2016-11536.

KASVI. Catálogo KASVI 2017/2018, v. 1, 2017. Available from:

<<http://kasvi.com.br/wp-content/uploads/2015/04/cat%C3%A1logo2018-2.pdf>>

Accessed: Ago. 13, 2018. 193 p.

LANGEVELD, W. T.; VELDHUIZEN, E. J.; BURT, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 1, p.76-94, 2014. Available from: <<https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.763219>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.3109/1040841X.2013.763219.

LOPEZ, P. 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. Available from:

<<https://doi.org/10.1021/jf063295u>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1021/jf063295u.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016. Available from: <<http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20160025>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.5935/1806-6690.20160025.

MOHAMMAD, Y. M. et al. Carvacrol and thymol: strong antimicrobial agents against resistant isolates. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 63-68, 2017. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1097/MRM.000000000000100>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1097/MRM.000000000000100.

NAZZARO, F. et al. Essential oils and antifungal activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 1-20, 2017. Available from: <<http://dx.doi.org/10.3390/ph10040086>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.3390/ph10040086.

PERINA, J. F. et al. Thymus vulgaris essential oil and thymol against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler: effects on growth, viability, early infection and cellular mode of action. **Pest management Science**, v. 71, n. 10, p. 1371-1378, 2015. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1002/ps.3933>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1002/ps.3933.

PERRUCHON, C. et al. Isolation of a bacterial consortium able to degrade the fungicide thiabendazole: the key role of a *Sphingomonas phylotype*. **Applied**

**Microbiology Biotechnology**, v. 101, n. 9, p. 3881-3893, 2017. Available from: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-017-8128-5>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1007/s00253-017-8128-5.

PIGNATI, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p.:3281-3293, 2017. Available from: < <http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1590/1413-812320172210.17742017.

RAO, A. et al. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the tor pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5062- 5069, 2010. Available from: < <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01050-10>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1128/AAC.01050-10.

SINIGAGLIA, M. et al. Influence of temperature, pH and water activity on “in vitro” inhibition of *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling by yeasts. **Microbiological Research**, v.153, n.2, p.137-143, 1998.

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. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.05.012>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1016/j.cropro.2014.05.012.

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. Available from: < <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.653458>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1080/10408398.2011.653458.

ZABKA M., PAVELA R. Review Chapter: *Fusarium* genus and essential oils. **Natural Antimicrobial Agents**, v. 19, n.1, p. 95,120, 2018. Available from: <[https://doi.org/10.1007/978-3-319-67045-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-67045-4_5)>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.1007/978-3-319-67045-4\_5.

ZHOU, F. et al., Synergistic effect of thymol and carvacrol combined with chelators and organic acids against *Salmonella Typhimurium*. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 7, p. 1704-1709, 2007. Available from: < <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.7.1704>>. Accessed: Ago. 13, 2018. doi: 10.4315/0362-028X-70.7.1704.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A síntese proporcionou produto com elevada pureza, porém com baixos rendimentos levando em conta as etapas de síntese, isolamento e purificação dos dipeptídeos. Os dipeptídeos c(D-Tyr-L-Leu) e c(D-Pro-D-Tyr) não apresentaram inibição contra os fungos avaliados. Tentativas para estabelecer um protocolo para análise *in vitro* em meio sólido foram realizadas, porém não houve sucesso nos resultados e o dipeptídeo c(D-Tyr-L-Leu) não inibiu *C. gloesporioides* nos ensaios realizados. Estes resultados descartam a possibilidade de que o meio em que a análise antimicrobiana foi realizada é a resposta das diferenças de resultados conseguidas neste trabalho e os relatos da literatura. Pesquisas futuras devem avaliar a influência do diluente do peptídeo nestas análises antifúngicas. A caracterização química dos dipeptídeos deve ser complementada utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear a fim de saber se alguma diferença na estrutura química pode explicar a divergência de resultados deste trabalho com os previamente relatados.

Sabe-se que a carga e a hidrofobicidade interferem no potencial antimicrobiano de peptídeos sendo a interação eletrostática entre o peptídeo e a membrana do microrganismo a mais forte. Os dipeptídeos aqui estudados possuem elevada hidrofobicidade, o que pode ter influenciado nos resultados. Sabendo que a interação eletrostática eleva a ação antimicrobiana, sugere-se refazer as análises com dipeptídeos lineares cuja estrutura química contenha o grupo carboxila esterificado e o grupo amino livre. No momento em que os dipeptídeos apresentarem ação antimicrobiana, a combinação com carvacrol deverá ser investigada.

O uso prático do carvacrol na fruticultura deve ser explorado com vistas a reduzir a quantidade de antifúngicos comerciais usados no controle de doenças na pós-colheita. Estudos devem investigar a forma de aplicação do carvacrol (individual ou combinada) na forma de sachê ou revestimento comestível, e isto assunto de interesse do grupo de pesquisa deste trabalho.