



CAMILA KOPEZKY POSSARI

**ATIVIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE ESPÉCIES
DE *Aspergillus* spp. AFLATOXIGÊNICAS ISOLADAS DE
CASTANHA DO BRASIL**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAMILA KOPEZKY POSSARI

**ATIVIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE ESPÉCIES DE *Aspergillus* spp.
AFLATOXIGÊNICAS ISOLADAS DE CASTANHA DO BRASIL**

Dissertação apresentada à faculdade de engenharia de alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Camila Kopezky Possari e orientada pela Profa Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte.

Assinatura da Orientadora

Campinas
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

P843a Possari, Camila Kopezky, 1987-
Atividade de óleos essenciais sobre espécies de *Aspergillus* spp.
aflatoxigênicas isoladas de castanha do Brasil / Camila Kopezky Possari. –
Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Marta Cristina Teixeira Duarte.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia de Alimentos.

1. Castanha do Brasil. 2. Aflatoxinas. 3. *Aspergillus flavus*. 4. *Aspergillus
nomius*. I. Duarte, Marta Cristina Teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Activity of essential oils on aflatoxigenic species of *Aspergillus* spp.
isolated from Brazil nuts

Palavras-chave em inglês:

Brazil nut

Aflatoxins

Aspergillus flavus

Aspergillus nomius

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Marta Cristina Teixeira Duarte [Orientador]

Fabiana Fantinati-Garboggini

Eliane Aparecida Benato Rodrigues da Silva

Data de defesa: 10-09-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Campinas, _____ de _____ de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte (Orientadora)

Universidade Estadual de Campinas – Titular

Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini

Universidade Estadual de Campinas – Titular

Dra. Eliane Aparecida Benato Rodrigues da Silva

Instituto Biológico – Titular

Dra. Marta Hiromi Taniwaki

Instituto de Tecnologia de Alimentos – Suplente

Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder

Universidade Estadual de Campinas – Suplente

Resumo

A castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) é a segunda mais importante fonte extrativista da floresta amazônica. Desta forma, não são utilizados defensivos químicos e a produção da castanha do Brasil é considerada orgânica tendo sua extração ambientalmente correta, porém este baixo nível tecnológico favorece o crescimento de fungos potencialmente produtores de micotoxinas como os do grupo *Aspergillus* section *flavi*. Visando reduzir esta contaminação, uma das possibilidades é a utilização de óleos essenciais, que apresentam propriedades antimicrobianas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de 11 óleos essenciais de espécies medicinais e aromáticas sobre cepas aflatoxigênicas de *A. flavus*, *A. nomius* e *A. arachidicola* isoladas de castanha do Brasil. O ensaio de microdiluição mostrou que os óleos que apresentaram melhor atividade antifúngica contra estes os isolados foram *Cinnamomum burmannii* e *Eugenia caryophyllata*, com MIC de 250 µg/mL e 500 µg/mL, respectivamente. A inibição do crescimento micelial dos fungos foi melhor quando estes foram submetidos à ação por contato com os óleos essenciais, do que por ação de seus compostos voláteis, sendo as concentrações referentes às de MIC capazes de inibir totalmente o crescimento dos fungos. A produção de aflatoxina por *A. flavus* foi inibida somente pelo óleo essencial de *E. caryophyllata*, na concentração de 500 µg/mL. Ensaios *in vivo* conduzidos com a casca da castanha do Brasil mostraram que o óleo essencial de *C. burmannii* inibiu o fungo a 500 µg/mL e propiciou maior redução na porcentagem de infecção pelos isolados de *A. flavus*. Quanto aos isolados de *A. nomius* e *A. arachidicola*, a menor porcentagem de infecção foi obtida após tratamento com o óleo essencial de *E. caryophyllata* na concentração de 1000 µg/mL. Os óleos de *E. caryophyllata* e *C. burmannii* mostraram ser alternativas naturais para controle do crescimento de *A. flavus*, *A. nomius* e *A. arachidicola* e da produção de aflatoxinas por *A. flavus*, através da ação na redução da contaminação fúngica das castanhas do Brasil.

Palavras chave: Castanha do Brasil, aflatoxinas, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius*.

Abstract

The Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) is the second most important forest source of the Amazon rainforest. Thus, no chemical pesticides are used and the production of Brazil nuts is considered organic and an environmentally friendly extraction. However, this low technological level favors the growth of potentially mycotoxin producing fungi such as *Aspergillus* section *flavi*. In order to reduce this contamination, one possibility is the use of essential oils that exhibit antimicrobial properties. The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of 11 essential oils of medicinal and aromatic species on aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*, *A. nomius* and *A. arachidicola* isolated from Brazil nuts. The microdilution assay showed that the oils from *Cinnamomum burmannii* and *Eugenia caryophyllata* presented the best antifungal activity against all isolates, with MIC of 250 µg/mL and 500 µg/mL, respectively. The inhibition of mycelial growth of the fungi was better when submitted to action by contact than by action of oils volatile compounds, with concentrations of MIC able to completely inhibit the growth of fungi. The aflatoxin production was inhibited only by *E. caryophyllata* essential oil at a concentration of 500 µg/mL. In vivo assays conducted with shells of Brazil nut showed that the essential oil of *C. burmannii* at 500 µg/mL provided greater reduction in the percentage of infection by *A. flavus* isolates. As the isolates of *A. nomius* and *A. arachidicola*, the infection rate was lower after the treatment with the essential oil of *E. caryophyllata* in the concentration of 1000 µg/mL. The essential oils of *E. caryophyllata* and *C. burmannii* showed to be natural alternatives for controlling the growth of *A. flavus*, *A. nomius* and *A. arachidicola* and aflatoxin production by *A. flavus*, through the reduction of the fungal contamination of Brazil nuts.

Key words: Brazil nut, aflatoxins, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius*.

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	2
2.1 Castanha do Brasil	2
2.2 Importância econômica da castanha do Brasil	6
2.3 Cadeia produtiva da castanha do Brasil	7
2.3.1 Etapa pré-colheita.....	7
2.3.2 Etapa de colheita e pós-colheita	8
2.3.3 Etapa na unidade de beneficiamento.....	10
2.4 Micotoxinas	11
2.4.1 Aflatoxinas	12
2.5 Gênero <i>Aspergillus</i>	14
2.5.1 <i>Aspergillus flavus</i> Link	15
2.5.2 <i>Aspergillus nomius</i> Kurtzmann, Horn & Hesseltine.....	17
2.5.3 <i>Aspergillus arachidicola</i> Pildain, Frisvad & Samson	18
2.6 Legislação	19
2.7 Óleos essenciais	21
2.7.1 <i>Artemisia annua</i> L.....	23
2.7.2 <i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.....	23
2.7.3 <i>Cinnamomum burmannii</i> (Nees & T. Nees) Blume	24
2.7.4 <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf	24
2.7.5 <i>Cyperus articulatus</i> L.	25
2.7.6 <i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.	25
2.7.7 <i>Lippia sidoides</i> Cham.....	26
2.7.8 <i>Piper abutiloides</i> Kunth	26
2.7.9 <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	27
2.7.10 <i>Thymus vulgaris</i> L.....	27
2.7.11 <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	28
3. Objetivos.....	30
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivos específicos	30
4. Material e Métodos	30
4.1 Seleção dos fungos.....	30
4.1.1 Plaqueamento das castanhas.....	30
4.1.2 Isolamento e identificação dos fungos de interesse.....	31

4.1.3 Teste de produção de aflatoxinas	32
4.2. Material Vegetal	32
4.2.1 Manutenção e cultivo das espécies na CPMA (Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA – UNICAMP)	33
4.2.2 Obtenção dos óleos essenciais	33
4.3 Determinação da atividade antifúngica dos óleos essenciais pelo teste da microdiluição	34
4.3.1 Preparo das amostras para os testes de atividade antifúngica.....	34
4.3.2 Preparo de inóculo padronizado para os testes de atividade antifúngica	34
4.3.3 Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) dos óleos essenciais	35
4.3.4 Determinação da concentração fungicida mínima (MFC) dos óleos essenciais de maior atividade	35
4.4 Ação <i>in vitro</i> dos óleos essenciais selecionados.....	36
4.4.1 Aplicação por contato	36
4.4.2 Exposição aos compostos voláteis dos óleos essenciais	36
4.5 Ação dos óleos essenciais sobre a produção de aflatoxinas pelos fungos..	37
4.6 Ação dos óleos essenciais selecionados sobre os fungos em castanha do Brasil	37
4.6.1 Irradiação das castanhas	37
4.6.2 Efeito preventivo	37
4.6.3 Avaliação da microbiota	38
5. Resultados e Discussão	38
5.1 Seleção dos fungos.....	38
5.1.1 Infecção fúngica das castanhas.....	38
5.1.2 Isolamento e identificação dos fungos	40
5.1.3 Produção de aflatoxinas pelos fungos selecionados	47
5.2 Efeito dos óleos essenciais sobre as espécies de <i>Aspergillus</i> isoladas de castanha do Brasil.....	48
5.2.1 Determinação da concentração mínima inibitória - MIC	48
5.2.2 Determinação da concentração fungicida mínima – MFC	49
5.3 Ação dos óleos essenciais através da aplicação por contato e por voláteis	51
5.4 Ação dos óleos essenciais sobre a produção de aflatoxinas	60
5.5 Ação dos óleos essenciais de <i>Eugenia caryophyllata</i> e <i>Cinnamomum burmanii</i> sobre fungos em cascas de castanha do Brasil	63

5.5.1 Efeito preventivo	63
6. Conclusões	68
7. Referências Bibliográficas	70

Dedico este trabalho às pessoas
mais importantes da minha vida:
Meus pais Luiz e Neusa, os
verdadeiros responsáveis pela
minha chegada até aqui e meu
noivo Leonardo grande
companheiro.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, que me deu a vida e a chance de conseguir alcançar meus objetivos, além de muita força nos momentos difíceis;

À Dra. Marta Duarte, pela orientação, atenção, carinho e amizade;

À Dra. Marta Taniwaki, por me aceitar, confiar no meu trabalho e dedicar valioso tempo com ensinamentos;

À Dra. Beatriz Iamanaka, por confiar no meu trabalho e pelo grande carinho;

Às queridas amigas Aline, Júlia e Rachel pela imensa ajuda e incentivo;

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL, e todas as pessoas que me ajudaram a conquistar mais esta etapa;

Ao CPQBA e todos os colegas que me auxiliaram na realização deste trabalho, especialmente Alessandra!

E ao meu amado noivo Leonardo, que me apoiou, me incentivou e teve muita paciência em todos os momentos. Eu te amo!

Lista de Ilustrações

Figura 1. Castanha do Brasil. Semente sem casca (A), Ouriço contendo castanhas (B), Castanheira (C) e Semente com casca (D).....	4
Figura 2. Estruturas químicas das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , M ₁ , M ₂ , G ₁ e G ₂	13
Figura 3. Representação esquemática da morfologia de um <i>Aspergillus</i>	16
Figura 4. Plantas medicinais e aromáticas. (A) <i>Artemisia annua</i> ; (B) <i>Campomanesia xanthocarpa</i> ; (C) <i>Cinnamomum burmannii</i> ; (D) <i>Cymbopogon citratus</i> ; (E) <i>Cyperus articulatus</i> ; (F) <i>Eugenia caryophyllata</i> ; (G) <i>Lippia sidoides</i> ; (H) <i>Piper abutiloides</i> ; (I) <i>Schinus terebinthifolius</i> ; (J) <i>Thymus vulgaris</i> ; (L) <i>Zingiber officinale</i>	29
Figura 5. Plaqueamento da castanha do Brasil no meio DG18.....	31
Figura 6. Infecção fúngica das amostras de castranha do Brasil. Plaqueamento direto em meio DG18 após 5 dias a 25 °C.....	39
Figura 7. Porcentagem média de infecção da amostra de castanha do Brasil em função dos grupos/gêneros de fungos encontrados.....	39
Figura 8. <i>A. flavus</i> selecionados a partir do cultivo em CYA após 7 dias de incubação à 25 °C. (A) <i>A. flavus</i> 1 e (B) <i>A. flavus</i> 2.....	40
Figura 9. Reverso das colônias de <i>A. flavus</i> quando cultivados em meio AFPA após 7 dias de incubação à 25 °C.....	42
Figura 10. Micromorfologia dos isolados de <i>A. flavus</i>	42
Figura 11. <i>A. nomius</i> cultivados em CYA após 7 dias de incubação à 25 °C. (A) <i>A. nomius</i> 1 e (B) <i>A. nomius</i> 2.....	43
Figura 12. <i>A. nomius</i> após 7 dias de incubação a 25 °C em meio AFPA.....	44

Figura 13. Micromorfologia dos isolados de <i>A. nomius</i> (400x).....	44
Figura 14. <i>A. arachidicola</i> cultivados em CYA após 7 dias de incubação à 25 °C. (A) <i>A. arachidicola</i> 1 e (B) <i>A. arachidicola</i> 2.....	45
Figura 15. <i>A. arachidicola</i> após 7 dias de incubação a 25 °C em meio AFPA.....	46
Figura 16. Micromorfologia dos isolados de <i>A. arachidicola</i> (400x).....	46
Figura 17. Produção de aflatoxinas pelas espécies <i>A. flavus</i> , <i>A. nomius</i> e <i>A. arachidicola</i> isolados de amêndoas de castanha do Brasil.....	47
Figura 18. Ensaio de aplicação por contato dos óleos essenciais de <i>Eugenia caryophyllata</i> (250 µg/mL) e <i>Cinnamomum burmannii</i> (125 µg/mL), após incubação por 7 dias a 25 °C.....	58
Figura 19. Aplicação dos óleos essenciais de <i>Eugenia caryophyllata</i> (500 µg/mL) e <i>Cinnamomum burmannii</i> (250 µg/mL) sobre <i>Aspergillus</i> spp por ação dos voláteis, após 7 dias de incubação a 25 °C.....	59
Figura 20. Ação dos óleos essenciais de <i>Eugenia caryophyllata</i> (250 e 125 µg/mL) e <i>Cinnamomum burmannii</i> (125 e 100 µg/mL) após tratamento por contato sobre a produção de aflatoxina por <i>Aspergillus flavus</i>	61
Figura 21. Ação dos óleos essenciais de <i>Eugenia caryophyllata</i> (250 e 125 µg/mL) e <i>Cinnamomum burmannii</i> (125 e 100 µg/mL) após tratamento por contato sobre a produção de aflatoxina por <i>Aspergillus nomius</i>	62
Figura 22. Ação dos óleos essenciais de <i>Eugenia caryophyllata</i> (250 e 125 µg/mL) e <i>Cinnamomum burmannii</i> (125 e 100 µg/mL) após tratamento por contato sobre a produção de aflatoxina por <i>Aspergillus arachidicola</i>	63
Figura 23. Porcentagem de infecção por <i>Aspergillus</i> spp. das cascas de castanha do Brasil, após tratamento com óleos essenciais de <i>Eugenia caryophyllata</i> e <i>Cinnamomum burmannii</i> após 7 dias de incubação a 25 °C.....	64

Figura 24. Representação da infecção fúngica de cascas de castanha do Brasil antes e depois do tratamento com óleos essenciais de *E. caryophyllata* e *C. burmanii*, nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL respectivamente.....65

Lista de Tabelas

Tabela 1. Informação nutricional da Castanha do Brasil e os valores de ingestão diários recomendados (VD)	5
Tabela 2. Limites máximos tolerados para aflatoxinas em diversos alimentos.....	20
Tabela 3. Plantas medicinais e aromáticas da CPMA do CPQBA/UNICAMP estudadas no presente projeto (N = Nativa; E = Exótica).....	33
Tabela 4. Crescimento de <i>A. flavus</i> em meio CYA após incubação por 7 dias em diferentes temperaturas.....	41
Tabela 5. Crescimento de <i>A. nomius</i> em meio CYA após incubação por 7 dias em diferentes temperaturas.....	66
Tabela 6. Crescimento de <i>A. arachidicola</i> em meio CYA após incubação por 7 dias em diferentes temperaturas	46
Tabela 7. Atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre os isolados de <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. nomius</i> e <i>A. arachidicola</i> isolados de castanha do Brasil.....	48
Tabela 8. Determinação da MFC, menor concentração do óleo essencial capaz de atuar como fungicida sobre <i>Aspergillus</i> spp.....	50
Tabela 9. Média do crescimento micelial radial (mm) e porcentagem de inibição do fungo (óleo essencial de <i>Eugenia caryophyllata</i>), em função da dose e do tratamento sobre <i>A. flavus</i>	51
Tabela 10. Média do crescimento micelial radial (mm) e porcentagem de inibição do fungo (óleo essencial de <i>Cinnamomum burmannii</i>), em função da dose e do tratamento sobre <i>A. flavus</i>	52

Tabela 11. Média do crescimento micelial radial (mm) e porcentagem de inibição do fungo (óleo essencial de <i>Eugenia caryophyllata</i>), em função da dose e do tratamento sobre <i>A. nomius</i>	54
Tabela 12. Média do crescimento micelial radial (mm) e porcentagem de inibição do fungo (óleo essencial de <i>Cinnamomum burmannii</i>), em função da dose e do tratamento sobre <i>A. nomius</i>	54
Tabela 13. Média do crescimento micelial radial (mm) e porcentagem de inibição do fungo (óleo essencial de <i>Eugenia caryophyllata</i>), em função da dose e do tratamento sobre <i>A. arachidicola</i>	55
Tabela 14. Média do crescimento micelial radial (mm) e porcentagem de inibição do fungo (óleo essencial de <i>Cinnamomum burmannii</i>), em função da dose e do tratamento sobre <i>A. arachidicola</i>	56
Tabela 15. Composição química do óleo essencial de <i>Eugenia caryophyllata</i>	66
Tabela 16. Composição química do óleo essencial de <i>Cinammomum burmannii</i>	67

1. Introdução

Seguida da extração madeireira, a castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) é a principal fonte extrativista da floresta amazônica, representando grande importância para o ecossistema. Está relacionada com a cultura das populações tradicionais e povos indígenas que lá habitam, e cujos produtos e subprodutos são utilizados como fonte de alimentação, remédios e renda há muitas gerações (APIZ, 2009; TAVARES et al., 2010).

Sua produção anual está em torno de 30 mil toneladas e mais de 90% deste total é destinado à exportação para países como Estados Unidos, Inglaterra, Alemanha, França e Itália (APIZ, 2009).

Por ser um produto extrativista, não são utilizados defensivos químicos para controle de pragas e plantas daninhas, portanto a produção da castanha do Brasil é considerada orgânica e sua extração ambientalmente correta (CAMPO/PAS, 2004). Porém, o baixo nível tecnológico da cadeia produtiva associado às condições inadequadas de manejo e manuseio da castanha propicia a contaminação com consequente risco à saúde do consumidor (CAMPO/PAS, 2004).

Os principais contaminantes da castanha são fungos do grupo *Aspergillus* section *flavi*, produtores de aflatoxinas, micotoxinas com grande risco de toxicidade para a saúde humana e animal, e com grande poder carcinogênico (CALDERARI, 2011). Este grupo fúngico possui condições ideais de crescimento e produção de aflatoxinas nas condições da cadeia produtiva da castanha do Brasil, como por exemplo, durante o armazenamento, onde a temperatura e umidade relativa do ar são elevadas e não são controladas (PITT; HOCKING, 2009).

Para se preservar a característica extrativista, deve-se evitar o uso de defensivos químicos na cadeia produtiva da castanha, visando a redução da contaminação de aflatoxinas. Nestas condições, uma das opções seria o uso de

produtos derivados de vegetais, tais como óleos essenciais extraídos de plantas medicinais e aromáticas, que apresentam propriedades antifúngicas comprovadas (BASER; BUCHBAUER, 2010).

Dentre os produtos derivados de plantas conhecidos, os óleos essenciais têm grande aplicação biológica como agentes antimicrobianos, representando uma extensão do papel que exercem na própria planta, que é a defesa contra fitopatógenos (VILELA, 2007). Assim, diversos estudos têm demonstrado a eficácia de óleos essenciais no controle de fungos do gênero *Aspergillus* produtores de aflatoxinas. No entanto, não foram encontrados na literatura resultados de estudos *in vitro* ou *in vivo* envolvendo a aplicação de óleos essenciais no controle de espécies fúngicas aflatoxigênicas isoladas da castanha do Brasil, o que torna atrativa a proposta apresentada neste estudo, que visa também o controle da produção de aflatoxinas através do uso de óleos essenciais.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Castanha do Brasil

Segundo a classificação botânica, a castanha do Brasil pertence à Divisão *Angiospermae*, classe Dicotiledônea, ordem *Myrtiflorae*, família *Lecythidaceae*, gênero *Bertholletia* e espécie *excelsa* (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

A espécie foi identificada pelo geólogo alemão Baron Von Humboldt, juntamente com seu companheiro de viagem Aimé Bonpland, durante uma viagem à América do Sul no período de 1799 a 1804. Ao retornarem ao país de origem, o botânico Carl Sigmund Kunth auxiliou na classificação dos exemplares, e a descrição da castanha do Brasil ficou sendo *Bertholletia excelsa* H.B.K. (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

As castanheiras são árvores de grande porte, que podem atingir até 60 m de altura e sua base pode chegar até 4 m de diâmetro. Desenvolvem-se bem em regiões de clima tropical chuvoso, onde os períodos de estiagem são bem

definidos. Árvores deste porte têm idade estimada de 800 anos e apresentam uma boa produção de frutos (MULLER et al, 1995; PACHECO; SCUSSEL, 2006; TONINI, et al., 2008).

O conjunto de castanheiras denominado castanhal, corresponde a formações arbóreas muito altas e densas, semelhantes a uma floresta. No Brasil, os castanhais estão presentes nos Estados do Acre, Amazonas, Pará, Roraima e Rondônia, e em boa parte do Maranhão, Tocantins e Mato Grosso. No exterior são encontradas na Guiana Francesa, Suriname, Guiana, Venezuela, Peru e Bolívia (PENNACCHIO, 2007; LORENZI, 2010).

Na Amazônia brasileira, a temperatura onde estão presentes os castanhais varia entre 24,3 e 27,2 °C, com valores máximos de 30,6 °C e 32,6 °C e mínimos de 19,2 °C e 23,4 °C. As médias anuais de precipitação variam entre 1400 e 2800 mm e a umidade relativa entre 79% e 86% (MULLER et al., 1995).

O período de floração da árvore ocorre na época de seca, correspondendo aos meses de novembro a fevereiro. Neste período, a árvore apresenta flores brancas, com aproximadamente 4 cm de diâmetro e seis pétalas. A maturidade dos frutos pode ser atingida após 15 meses da queda das flores (PACHECO; SCUSSEL, 2006; LORENZI, 2010).

Os frutos da castanheira são chamados de ouriços. Consistem em duas camadas esféricas de substância lenhosa, sendo a externa mais fina e a interna uma cápsula. São espessas e possuem o interior repleto de sementes de castanhas, envoltas por uma polpa amarelada. O peso varia entre 0,5 a 5 kg e pode conter de 10 a 25 sementes (PACHECO; SCUSSEL, 2006). Uma única árvore pode produzir de 100 a 150 kg de castanhas na época da safra (APIZ, 2009).

A coleta destes frutos geralmente se inicia em novembro e é finalizada em abril, ocorrendo durante o período das chuvas. A colheita convencional é inviável, devido ao elevado porte das árvores e pelo risco de serem colhidos frutos imaturos. Portanto, são colhidos aqueles frutos que já caíram no chão, por estarem

certamente maduros (MULLER et al., 1995). A Figura 1 ilustra a árvore, o fruto e as sementes da castanha do Brasil.

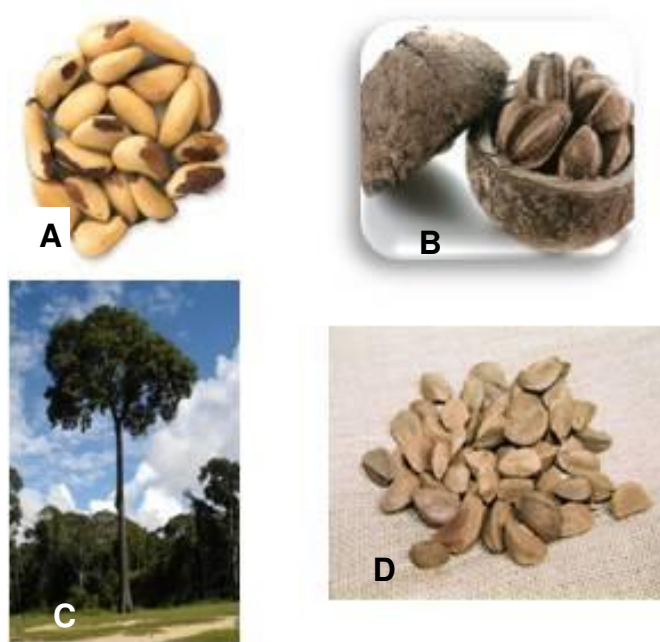


Figura 1. Castanha do Brasil. Semente sem casca (A), Ouriço contendo castanhas (B), Castanheira (C) e Semente com casca (D). Fonte: Google.

A amêndoa da castanha é bastante apreciada não só pelo seu sabor, como também pelo seu alto valor nutritivo, pois é rica em proteínas, vitaminas A, B1, B2 e C, cálcio, fósforo, magnésio, potássio, selênio e cobre (PACHECO, 2007). Há diferenças na quantidade de nutrientes de cada castanha, pois isso varia em função do tamanho da castanha, sua variedade e origem, e os componentes mais abundantes são os carboidratos, seguidos pelos lipídios, proteínas e fibras, de forma que o valor energético é bastante elevado (Tabela 1) (MOODLEY et al., 2007).

Um grande foco da pesquisa sobre a castanha do Brasil é a presença de selênio, uma vez que este nutriente possui ação antioxidante nos processos metabólicos (PACHECO; SCUSSEL, 2006). Sua atuação está relacionada com

reações redox, hormônio tireoideano, metabolismo da função imunológica, prevenção de doenças crônicas não transmissíveis e reprodução (KRYUKOV et al., 2003; SOUZA; MENEZES, 2004).

Tabela 1. Informação nutricional da Castanha do Brasil e valores de ingestão diários recomendados (VD)

Porção de 100 g		
	Quantidade por porção	% VD
Valor calórico	676 kcal	34
Carboidratos	79 g	26
Proteínas	14g	19
Gorduras totais	67 g	122
Gorduras saturadas	15 g	69
Gorduras trans	0 g	VD não estabelecido
Colesterol	0 mg	0
Fibra alimentar	8 g	32
Sódio	<5 mg	0,08
Cálcio	146 mg	18
Ferro	2 mg	16
Selênio	204 µg	600

Fonte: Cooperacre, 2014

A composição lipídica também é muito importante, uma vez que são os lipídeos que conferem características sensoriais aos alimentos, como odor e cor. A amêndoa da castanha contém boa quantidade de óleo de alto valor alimentar, e o teor de lipídeos atinge 60-70%. O teor de ácidos graxos saturados (mirístico e palmitoléico) e insaturados é superior a outras sementes oleaginosas. Estudos comprovam que há uma relação entre a frequência de consumo de castanha e a redução da incidência de doenças do coração, funcionando como uma espécie de cardioprotetor (PACHECO; SCUSSEL, 2006; FREITAS; NAVES, 2010; COOPERACRE, 2014).

2.2 Importância econômica da castanha do Brasil

A castanha do Brasil é o principal produto extrativo não madeireiro da Amazônia. Além da sua utilização como fonte alimentícia, seu tronco é utilizado na construção civil e naval; o ouriço é utilizado como carvão vegetal em fornos ou como artigo para artesanatos; as cascas das amêndoas são empregadas como fonte para biocombustíveis. O óleo obtido pela prensagem das sementes também tem diversas formas de utilização, como fabricação de cosméticos e fitoterápicos, fonte de carbono para micro-organismos em meios específicos e como lubrificante na aviação (CAMPO/PAS, 2004).

É um dos produtos que é originário de países subdesenvolvidos, mas é consumido por países desenvolvidos, como por exemplo, Estados Unidos, China, Áustria, França, Itália, Alemanha e Inglaterra (TAVARES et al., 2010).

Como o nível tecnológico na colheita da castanha é baixo ou mínimo, e as condições de manejo e manuseio da matéria-prima são muitas vezes inadequadas, há possibilidade de aparecerem pontos de contaminação, ocasionando riscos à saúde do consumidor e perdas econômicas. As bactérias do grupo coliformes e os fungos produtores ou não de toxinas, têm seu crescimento favorecido devido à prolongada exposição a fatores ambientais e às más condições de manipulação na indústria (CAMPO/PAS, 2004).

Por ser um produto de elevada importância para a economia dos estados da Amazônia brasileira, a presença de fungos toxigênicos na castanha do Brasil é crítica, uma vez que as barreiras sanitárias impostas pela União Européia são rígidas e impõem baixos limites para a presença de aflatoxinas em castanhas. Assim, o Brasil tem encontrado dificuldade para exportação, especialmente de castanhas com cascas que não passam por etapas de processamento (PACHECO; SCUSSEL, 2006; FERREIRA, 2013).

2.3 Cadeia produtiva da castanha do Brasil

O sistema de produção tradicional da castanha do Brasil é baseado na unidade familiar e não envolve investimentos tecnológicos, sendo utilizadas técnicas simples de coleta para este fim. As condições higiênicas muitas vezes são precárias e a coleta, amontoa e quebra dos ouriços para retirada das castanhas são realizadas ainda na floresta, seguida das etapas de transporte, armazenamento e beneficiamento (SOUZA et al., 2013).

2.3.1 Etapa pré-colheita

A pré-colheita compreende a fase inicial e exploratória da castanha do Brasil. Tem sido cada vez mais adotada pelos extrativistas, que estão seguindo as boas práticas de manejo, que consistem em cuidados simples e que devem ser seguidos desde a coleta do produto até o empacotamento e a industrialização, visando melhorar a qualidade das castanhas produzidas (ÁLVARES, 2013; SOUZA et al., 2013).

Segundo Campo/PAS (2004), Apiz (2009), esta etapa inclui as seguintes fases:

- Mapeamento e marcação das árvores: Elaboração de mapas indicando a localização exata, algumas vezes com auxílio de GPS, das possíveis castanheiras a serem manejadas. A marcação das árvores selecionadas é feita com fita ou plaquetas.

- Corte dos cipós: Etapa importante que visa melhorar a produtividade das castanheiras, pois os cipós ali presentes comprometem o desenvolvimento da copa da árvore, limitando a produção dos frutos (ouriço).

- Limpeza da base das castanheiras: É a retirada dos frutos que caíram em safras anteriores e ficaram amontoados na base da árvore. Esta etapa é considerada crítica, pois estes ouriços e castanhas ficaram em contato com o solo

e expostos a elevada umidade e temperatura ao longo do ano todo, o que favorece o desenvolvimento de diversos micro-organismos, dentre estes os fungos do gênero *Aspergillus*, que possui espécies produtoras de aflatoxinas. Se esta etapa não for realizada, esses ouriços e castanhas contaminados podem ser coletados juntamente com os da safra atual, facilitando a contaminação das novas castanhas por fungos e aflatoxinas.

2.3.2 Etapa de colheita e pós-colheita

Campo/PAS (2004), Apiz (2009) e Souza et al. (2013) listam as seguintes fases na pós-colheita:

- **Coleta e amontoa dos ouriços:** Como a castanheira é muito alta, a coleta direta da árvore torna-se inviável, portanto é esperada a queda do ouriço para depois coletá-lo. A época que esta fase acontece é durante as estações chuvosas. Após a queda, os ouriços são amontoados próximos à base das castanheiras, onde ficam por algum tempo até serem recolhidos e levados ao local de quebra.

A demora na coleta é justificada pelos extrativistas devido ao risco iminente durante a época da safra, em que os ouriços continuam caindo de árvores de até 40 m de altura. O fator preocupante é que, devido a este contato com o solo, que pode ser longo, juntamente com as condições climáticas da região, a contaminação fúngica da castanha do Brasil é bastante grande e preocupante, pois o solo é um habitat de fungos toxigênicos (BAQUIÃO et al., 2012).

- **Seleção dos ouriços:** Durante a coleta e amontoa, deve-se realizar a seleção dos ouriços descartando-se frutos que apresentem elevada contaminação microbiológica ou qualquer outro tipo de defeito que comprometa sua qualidade visual, nutricional ou mercadológica (ÁLVARES, 2013). O descarte dos ouriços deve ser feito em local distante dos pontos de coleta podendo ser enterrados ou utilizados para outros fins como combustível, produção de artesanato, entre outros. (SOUZA et al., 2013).

- Quebra dos ouriços: Realizada manualmente para retirada das castanhas. São descartadas as que apresentarem contaminação visível. O descarte das castanhas é considerado um ponto crítico, pois podem levar a contaminação para safras futuras, portanto deve ser feito longe do ponto de coleta.

- Transporte para a unidade de produção: É o transporte das castanhas da floresta para o armazém, realizado por animais de carga ou por pessoas utilizando cestos de fibras naturais.

- Lavagem das castanhas: Nem sempre esta prática é realizada, porém quando acontece é realizada em rios próximos aos castanhais. A função desta lavagem é a retirada de impurezas e castanhas chochas.

Tonin et al. (2008) conduziram um estudo junto aos extrativistas em Roraima. Mais da metade dos entrevistados realizavam a etapa de lavagem das castanhas de maneira inadequada, ou seja, em água parada, muitas vezes utilizando pneus velhos como vasilhas. Além disso, alguns alegavam não realizar a secagem ao sol, somente armazenavam as castanhas molhadas e as deixavam secando em conjunto, dentro de sacos.

- Secagem das castanhas: Depois de lavadas, as castanhas são secas em secadores solares ou espalhadas em mesas de secagem. Se esta secagem não for eficiente, o teor de umidade da castanha aumentará e haverá favorecimento de desenvolvimento de fungos micotoxigênicos.

- Armazenamento na unidade de produção: Quando a castanha não é comercializada imediatamente após a coleta, é realizado o armazenamento do produto com a casca, em local construído especificamente para isso. São galpões de madeira com tamanho compatível com a produção, ou seja, devem-se evitar grandes pilhas de castanha que dificultam a circulação de ar. Estes galpões devem ser construídos a uma altura média de 1 m do chão permitindo a circulação de ar e evitando, assim, o contato com o solo, elevada umidade e entrada de animais. As

paredes e pisos devem ter frestas de aproximadamente 1,5 cm para permitir a melhor aeração do produto (SOUZA et al., 2013).

- Transporte para a unidade de beneficiamento: Este transporte pode ser rodoviário ou fluvial. Quando realizado da segunda forma, é recomendado o uso de estrados no fundo da embarcação para evitar contato da castanha com o fundo da embarcação.

2.3.3 Etapa na unidade de beneficiamento

O beneficiamento é realizado em usinas, com equipamentos para a produção em larga escala e segue as seguintes etapas (CAMPO/PAS, 2004, PACHECO; SCUSSEL, 2006; SOUZA et al., 2013):

- Recepção e seleção das castanhas: Através de inspeção visual são eliminadas as castanhas quebradas, com coloração diferente e contendo contaminação visível por fungos.

- Armazenamento das castanhas: Aquelas que possuem casca são armazenadas em galpões com boa ventilação, embaladas em sacos de polipropileno e são mantidas sobre estrados limpos, evitando o contato com o piso e umidade. Os lotes a granel são mantidos em baias ou silos igualmente impermeáveis e de fácil limpeza e sanitização. O teor de umidade e temperatura dos lotes, principalmente daqueles mantidos à granel devem ser monitorados e registrados diariamente (ÁLVARES, 2013).

- Lavagem: A castanha é submersa em água potável à temperatura ambiente. Sua função é a remoção de matéria orgânica e restos de terra ainda aderidos à castanha. É necessário controlar o teor de cloro da água (0,5 ppm – 0,8 ppm) para maximizar a lavagem, além de realizar a limpeza e sanitização dos tanques e utensílios no final de cada turno (CAMPO/PAS, 2014).

- Tratamento térmico: As castanhas são tratadas por imersão em água em ebulição por 1 a 2 min a 100 °C, ou autoclavadas acima de 250 °C por 2 a 5

segundos, sendo este o processo mais utilizado. Esta etapa além de favorecer a diminuição da carga microbiana, facilita a retirada da casca.

- **Quebra:** As castanhas, ainda quentes, são transferidas para as mesas de quebra onde o processo é feito mecanicamente, com o auxílio de uma prensa manual. A casca é descartada.

- **Seleção:** Realizada manualmente para eliminar as castanhas deterioradas ou danificadas fisicamente.

- **Classificação:** Conforme as especificações para padronização, comercialização e classificação definidas pelo Ministério da Agricultura, de acordo com o tamanho.

- **Desidratação:** Processo realizado em estufa a 60 °C por 24 horas para atingirem umidade entre 11 e 15%. As castanhas com casca podem ser secas em secadores rotativos, obedecendo o mesmo teor de umidade.

- **Pesagem e embalagem:** as amêndoas descascadas são pesadas e embaladas a vácuo por processo semi-automático em sacos aluminizados com capacidade para 20 kg. Este material é indicado para retardar o processo de oxidação, resultando em sabor e odor indesejáveis. As castanhas com casca são embaladas em sacos de polipropileno de 60 kg.

- **Armazenamento do produto final até o transporte para o comércio.**

2.4 Micotoxinas

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, capazes de provocar doenças ou morte quando são ingeridas por animais ou pelo homem (PITT; HOCKING, 2009; SAMSON et al., 2010). A produção de micotoxinas pode ocorrer em qualquer época do cultivo, da colheita ou até mesmo da estocagem dos alimentos, uma vez que é dependente do crescimento fúngico;

porém, a toxina pode permanecer após a destruição do fungo que a produziu (IAMANAKA et al. 2010).

O prejuízo econômico causado pela produção de micotoxinas é muito grande, representando perda direta de produtos agrícolas, perda de animais, custos indiretos dos sistemas de controle para algumas micotoxinas, custos de destoxificação, além da rejeição de produtos pelos importadores (SAMSON et al., 2010). Cerca de 300 micotoxinas diferentes já foram identificadas. Destas, 20 são consideradas mais frequentes e capazes de oferecer risco à saúde, porém, somente aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, patulina, tricotecenos e zearalenona possuem limites máximos na legislação brasileira RDC nº 7 de 18 de Fevereiro de 2011 (ANVISA, 2011).

2.4.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas foram descobertas na década de 60, o que explica o fato de serem as micotoxinas mais estudadas até o momento. São mais frequentemente encontradas em alimentos que não foram adequadamente armazenados após a colheita (IARC, 2002; PITT; HOCKING, 2009; SAMSON et al., 2010).

Já foram isolados cerca de 20 compostos classificados como aflatoxinas, porém somente seis são consideradas mais importantes: Aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e M₂ (Figura 2). A denominação refere-se às cores que emitem (blue e green) sob luz ultravioleta em comprimento de onda de 365 nanômetros (nm) e os números 1 e 2 são devido à distância da migração dos compostos após cromatografia em camada delgada. As duas últimas são metabólitos da aflatoxina B₁ em humanos e animais (KELLER et al., 2005).

A Figura 2 mostra as estruturas químicas das principais aflatoxinas.

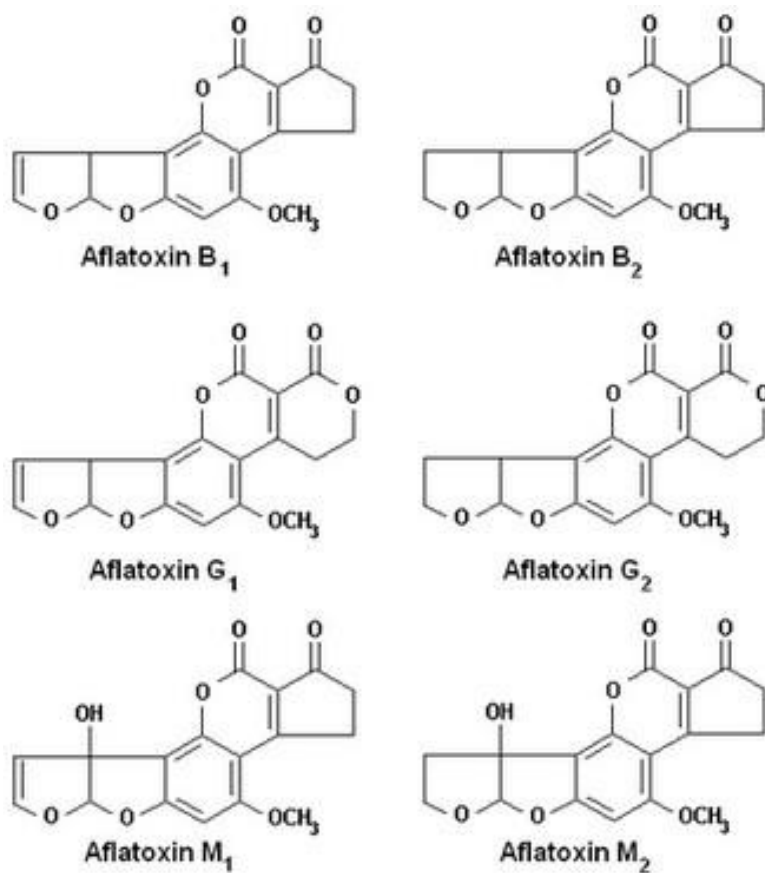


Figura 2. Estruturas químicas das aflatoxinas B₁, B₂, M₁, M₂, G₁ e G₂.

Fonte: <http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/aflatoxin-in-maizet1974/p0.htm>

A aflatoxina B₁ é a mais frequente e a aflatoxina G₁ não é reportada na ausência da B₁. Já as aflatoxinas B₂ e G₂ são geralmente encontradas com menor frequência na natureza (IARC, 1993). Segundo IARC (2002), a aflatoxina B₁ é classificada como Grupo 1, ou seja, potencialmente carcinogênica para humanos, além de ser hepatotóxica.

A intoxicação por aflatoxinas pode ser de duas formas: aguda ou crônica, dependendo da concentração presente no alimento ingerido. Quando o teor é baixo, porém o tempo de ingestão é longo, a aflatoxicose é chamada de crônica. Já o efeito agudo ocorre quando são ingeridos alimentos contendo altos teores da

micotoxina, sendo irreversível, de percepção rápida dos sintomas e pode levar animais ou o homem a morte (BENNETT; KLICH, 2003).

O trato gastrointestinal absorve facilmente as moléculas de aflatoxina. Após caírem na corrente sanguínea, são distribuídas para diferentes órgãos, como fígado, músculos, tecidos adiposos e rins. Os sintomas causados pela ingestão desta micotoxina são diarreia sanguinolenta, cirrose, síndrome de Reye (encefalopatia com degeneração gordurosa do cérebro), hemorragia nos rins, diminuição do sistema imunológico (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

Pacheco et al. (2010) detectaram aflatoxinas em 7,5% das 120 amostras de castanha do Brasil coletadas em Manaus nas colheitas de 2003 e 2004. As aflatoxinas foram detectadas nas amostras oriundas das etapas de recepção e comercialização.

Calderari (2011) realizou estudo com 143 amostras de castanha do Brasil obtidas dos estados do Pará, Amazonas e São Paulo. Foi detectada a presença de aflatoxinas, sendo que cinco amostras excederam o limite máximo de aflatoxinas totais estabelecido pela ANVISA (10 µg/kg para castanhas do Brasil, sem casca, destinadas ao consumo direto).

2.5 Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* pertence à classe dos eurotiomicetos, ocorrem em grande variedade de habitats, especialmente como saprófitas em solos, alimentos armazenados, entre outros. São caracterizados pela formação de conidióforos com estipes grandes e espessas, terminando na forma de vesícula. Estas são geralmente esféricas e são base para o crescimento de métulas e/ou fiálides, que por sua vez, são o local onde se formam os conídios (esporos assexuados) (KLICH; PITT, 1988; PITT; HOCKING, 2009).

Os *Aspergillus* são capazes de crescer em uma ampla faixa de temperatura, possuem esporos resistentes à luz e a substâncias químicas, portanto conseguem competir com outros gêneros pelo domínio na contaminação de alimentos. Nos

trópicos e sub-trópicos sua ocorrência é maior do que a do gênero *Penicillium*, e várias espécies são capazes de produzir metabólitos tóxicos, chamados de micotoxinas (SAMSON et al., 2010; PITT; HOCKING, 2009). Dentro deste gênero encontram-se as seções *Flavi*, *Nigri* e *Circumdati*, as quais possuem as espécies produtoras de aflatoxinas e ocratoxinas, além de diversos outros metabólitos tóxicos. As principais espécies pertencentes ao grupo *Aspergillus* section *flavi* são: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* e a recente *A. arachidicola* (FEIBELMAN et al., 1998; FRISVAD et al., 2008; PILDAIN et al., 2008).

2.5.1 *Aspergillus flavus* Link

A espécie *A. flavus* é comum no mundo todo, ocorrendo em alimentos como amendoim, milho, cereais, castanhas e em muitos outros (SAMSON et al., 2010).

Sua macromorfologia consiste em colônias com crescimento rápido em CYA (Agar Czapeck) a temperaturas entre 25 °C e 37 °C, com incubação de sete dias. A coloração é verde amarelado ou verde oliva, e o reverso da colônia é creme. A textura é geralmente flocosa no centro e cerca de 50% dos isolados produzem esclerócios inicialmente brancos que se tornam pretos com o tempo (PITT; HOCKING, 2009; SAMSON et al., 2010).

Quando colocados no meio de cultura Agar *Aspergillus Flavus Parasiticus* (AFPA) e incubados por sete dias a 25 °C apresentam o reverso da colônia com coloração laranja. Esta reação ocorre em cepas produtoras de ácido aspergílico que reagem com íons férricos do citrato férrico presente na composição do meio (PITT et al., 1983).

Quando observado ao microscópio óptico, *A. flavus* apresenta-se na maioria das vezes na forma bisseriada (com métula e fiálide) (Figura 3), mas também pode ser observada a forma unisseriada (somente com fiálide). A vesícula é globosa, com diâmetro entre 30 e 50 µm. Os conídios são globosos ou subglobosos, levemente rugosos, com diâmetro variando entre 3 a 6 µm (PITT; HOCKING, 2009).

Alguns isolados de *A. flavus* são capazes de produzir somente a aflatoxina B₁, ou B₁ e B₂ enquanto outros não produzem, além de ácido kójico, ácido-3-nitropropiónico, ditriptofenalina e ácido ciclopiazônico (PITT; HOCKING, 2009; SAMSON et al., 2010).

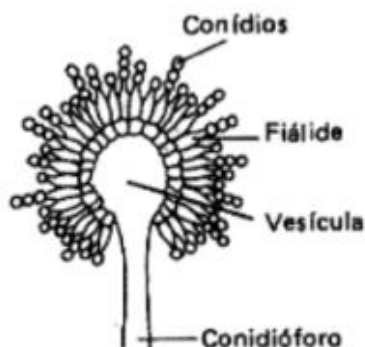


Figura 3: Representação esquemática da morfologia de um *Aspergillus*.

Fonte: http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_microorg/fungos5.gif

As temperaturas de crescimento deste fungo podem variar entre 10 °C e 48 °C, com ótimo a 33 °C. A atividade de água pode variar entre 0,78 em 33 °C e 0,84 em 25 °C (PITT; HOCKING, 2009; SAMSON et al., 2010).

Baquião (2012) analisou amostras de castanha do Brasil durante várias etapas do processamento do produto. Nas amostras coletadas ainda em campo, o fungo prevalente nas amêndoas foi o *A. flavus* (2548×10^6 UFC/g). No armazenamento, o gênero *Aspergillus* spp também foi prevalente nas amêndoas (1528×10^4 UFC/g). Destes, foram isolados *A. flavus* (439×10^4 UFC/g) e *A. nomius* (261×10^4 UFC/g), entre outros.

O estudo de Arrus et al. (2005) objetivou a avaliação do crescimento de *A. flavus* em castanhas incubadas em diferentes temperaturas e diferentes umidades. Este trabalho mostrou que houve ótimo crescimento fúngico após três semanas de incubação a 25-30 °C, com umidade relativa de 97%. Além disso, sob essas condições, os autores encontraram altos valores de aflatoxina B₁ (4483 µg/kg).

Calderari (2011) coletou 143 amostras de castanhas do Brasil (amêndoas e cascas), provenientes dos estados do Pará, Amazonas e São Paulo. Foram isolados e identificados 13.625 fungos, com uma média de infecção que variou de 51,9 a 100%. Os gêneros mais incidentes foram: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eurotium*, entre outros. O total de *A. flavus* foi de 703 isolados.

2.5.2 *Aspergillus nomius* Kurtzmann, Horn & Hesseltine

A espécie *A. nomius* já foi encontrada em diferentes substratos como nozes, cana-de-açúcar, sementes e grãos armazenados, além da castanha do Brasil (VARGA et al., 2011; CALDERARI et al., 2013).

Apresenta colônias flocosas de coloração branca ou levemente esverdeada, com estruturas conidiais geralmente produzidas nas extremidades depois de um período de incubação superior a sete dias. Quando isoladas em agar Czapeck, as colônias apresentam diâmetro entre 40 e 70 mm depois de sete dias de incubação a 25 °C. A 42 °C, o diâmetro diminui para o máximo de 15 mm. No meio de cultura AFPA apresenta a coloração laranja no reverso da colônia (KURTZMAN et al., 1987).

Quando observado ao microscópio óptico, o fungo apresenta-se predominantemente na forma uniseriada, mas também pode ser observada a forma bisseriada. Os conidióforos são incolores, rugosos. A vesícula tem a forma globosa ou subglobosa, com diâmetro variando entre 25 a 65 µm. Os conídios são globosos ou subglobosos, rugosos, com diâmetro variando entre 4,5 a 6,5 µm (KURTZMAN et al., 1987; BAQUIÃO et al., 2013).

Com relação aos metabólitos, *A. nomius* são produtores de aflatoxinas B₁ B₂ G₁ G₂, aflavinina, ácido tenuazônico e ácido kojico e não são produtores de ácido ciclopiazônico e ácido aspergílico (KURTZMAN et al., 1987; SAMSON et al., 2010; BAQUIÃO et al., 2013; CALDERARI et al., 2013).

O fungo *A. nomius* pode ser mais comum em castanhas do Brasil do que o esperado, devido ao fato de possuir características semelhantes ao *A. flavus*, o que dificulta sua identificação (OLSEN et al., 2008).

Calderari et al. (2013) coletaram 288 amostras de castanha do Brasil da região Amazônica e do estado de São Paulo. De todas as amostras, 4172 fungos *Aspergillus* section *flavi* foram isolados. Destes, a espécie de maior incidência foi *A. nomius* (1235 isolados). Todos os isolados desta espécie foram considerados potencialmente produtores de aflatoxinas B e G.

Olsen et al. (2008) analisaram amostras de castanha do Brasil comercializadas na Itália e obtiveram 22 isolados fúngicos, pertencentes ao grupo *Aspergillus* section *Flavi*. Destes, 19 foram identificados como *A. flavus* e três como *A. nomius*. No mesmo trabalho, os autores avaliaram o potencial de produção de aflatoxinas por estes isolados, concluindo que dez cepas de *A. flavus* eram potencialmente produtoras de aflatoxina do tipo B, e todos os *A. nomius* de aflatoxinas do tipo B e G.

Reis et al. (2012) isolaram 254 espécies de *Aspergillus* a partir de 200 amostras de castanhas. Destes isolados, a frequência de *A. nomius* identificados por taxonomia polifásica atingiu uma média de 56% em amêndoas e 63,8% em cascas.

2.5.3 *Aspergillus arachidicola* Pildain, Frisvad & Samson

Esta é uma espécie descrita recentemente por Pildain et al. (2008). Os isolados da espécie *A. arachidicola* são comuns em amendoim e na castanha do Brasil (SAMSON, et al., 2010).

As colônias são aveludadas com inúmeros conídios e apresentam coloração verde oliva para marrom com textura áspera, com ausência de esclerócios. No meio Agar Czapeck, o diâmetro da colônia chega a 65 mm depois de sete dias a 25 °C. Já a 37 °C, o diâmetro chega a 70 mm. O fungo também apresenta bom

crescimento a 42 °C. Depois de sete dias a 25 °C em meio AFPA, o reverso da colônia apresenta cor laranja (PILDAIN et al., 2008).

Quando observado ao microscópio óptico, *A. arachidicola* pode apresentar-se na forma bisseriada ou unisseriada. A vesícula é globosa ou subglobosa, com diâmetro variando entre 28 a 50 µm. Os conídios são globosos ou subglobosos, com diâmetro entre 4,5 a 5 µm, rugosos e com coloração esverdeada (PILDAIN et al., 2008).

Além disso, os isolados são capazes de produzir aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ácido kójico, parasiticolida, ácido aspergílico e crisogina (PILDAIN et al., 2008; SAMSON, et al., 2010).

No trabalho de Calderari et al. (2013) houve a detecção de *A. arachidicola* em duas amostras de amêndoas de castanha antes do processamento, e em uma amostra de casca adquirida em mercado de rua.

2.6 Legislação

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), novos limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos foram publicados no Diário Oficial da União, na Resolução RDC Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011. O LMT de aflatoxinas totais (B₁+B₂+G₁+G₂) para castanha do Brasil com casca para consumo direto é de 20 µg/kg, para castanha do Brasil sem casca para consumo direto é de 10 µg/kg e para castanha do Brasil sem casca, para processamento posterior é de 15 µg/kg (ANVISA, 2011). A Tabela 2 mostra os LMT de aflatoxinas para diferentes alimentos.

Tabela 2. Limites máximos tolerados para aflatoxinas em diversos alimentos (ANVISA, 2011).

Micotoxinas	Alimento	Limite (µg/kg)
Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	5
	Feijão	5
	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	10
	Frutas desidratadas e secas	10
	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	20
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	10
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	15
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1
	Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância	1
	Amêndoas de cacau	10
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Especiarias: <i>Capsicum</i> spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta caiena e pimentão-doce); <i>Piper</i> spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada) <i>Zingiber officinale</i> (gengibre) <i>Curcuma longa</i> (curcuma). Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	20
	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20

2.7 Óleos essenciais

Óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis produzidos por certos vegetais, obtidos em diversas partes da planta através de métodos físicos como a prensagem e a destilação (SIMÕES et al., 2007; BASER; BUCHBAUER, 2010). Apresentam-se como uma mistura de diferentes concentrações de

hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteresóxidos, peróxidos, entres outros. Portanto existe uma imensa variação na composição química de óleos essenciais (SIMÕES et al., 2007; BASER; BUCHBAUER, 2010).

Os óleos essenciais possuem diversas funções ecológicas, atuando como mensageiros internos da planta e defesa contra o estresse e ataque de patógenos, além de apresentarem utilidade para o uso comercial (BASER; BACHBAUER, 2010).

Dentre as aplicações potenciais está o uso dos óleos essenciais como antimicrobianos, sendo uma alternativa natural aos produtos sintéticos, o que vem de encontro à crescente exigência dos consumidores por aditivos naturais (FREIRE, 2008).

Na célula microbiana, os óleos essenciais são capazes de danificar vários sistemas enzimáticos, como aqueles envolvidos na produção de energia celular e na síntese de compostos estruturais (CONNER; BEUCHAT, 1984).

Rasooli et al. (2006) estudaram o mecanismo de inibição dos óleos essenciais de *Thymus eriocalyx* e *T. x-porlock* sobre *A. niger* e verificaram que nas concentrações de 125 ppm e 250 ppm, respectivamente, os óleos foram capazes de causar severos danos na parede celular, membrana celular e organelas. Foram observadas mudanças morfológicas nas hifas, rompimento da membrana plasmática e destruição das mitocôndrias.

Pimentel et al. (2010) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (cipó–corimbó) sobre cepas de *A. flavus* e concluíram que a inibição total do crescimento micelial ocorreu na concentração de 782 ppm.

Também Freire (2008) testou óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Illicium verum* (anis-estrelado) e *Origanum manjorona* (manjerona) sobre *A. parasiticus* e observou concentrações mínimas inibitórias para o crescimento micelial de 0,25, 2 e 2 µL/mL, respectivamente.

Paranagama et al. (2003) estudaram o efeito do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) sobre *A. flavus* isolados de arroz armazenado. O óleo apresentou efeitos fungistático e fungicida de 0,6 e 1 mg/mL, respectivamente.

Em um estudo similar, Pereira et al. (2006) avaliaram o efeito inibitório *in vitro* de óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), cebola (*Allium cepa*), manjerição (*Ocimum basilicum*), menta (*Mentha piperita*) e orégano (*Origanum vulgare*) sobre o desenvolvimento de *Fusarium sp.*, *Aspergillus ochraceus*, *A. flavus* e *A. niger*. O óleo que apresentou melhor atividade foi o de orégano, que inibiu o crescimento de todos os fungos na concentração de 500 mg/mL, exceto *A. niger*, que necessitou da concentração de 1000 mg/mL. Os demais óleos tiveram efeito na concentração de 1500 mg/mL, para todos os fungos.

Os óleos essenciais de manjerição doce (*O. basilicum*), cassia (*Cinnamomum cássia*), coentro (*Coriandrum sativum*) e louro (*Laurus nobilis*) foram testados quanto à inibição do crescimento micelial de *A. parasiticus*. O único óleo essencial que não apresentou efeito sobre o fungo foi o de coentro. O restante foi capaz de inibir o crescimento micelial nas concentrações 1-5% (v/v) (ATANDA et. al., 2007).

Thanaboripat et al. (2007) também estudaram o efeito de 16 óleos essenciais sobre o crescimento de *A. flavus*. O óleo de *Melaleuca cajuputi* (madeira branca) foi o que apresentou maior poder de inibição, seguido pelo óleo de *Cinnamomum cassia* (cassia) e *Lavandula officinalis* (alfazema).

Ferreira et al. (2013) avaliaram o potencial inibitório do óleo essencial de *Curcuma longa* L. (açafrão da Índia) sobre a produção de aflatoxinas. Os autores concluíram que 0,5% (v/v) de óleo sobre o meio de cultura testado foi capaz de reduzir em 99,9% a produção de aflatoxina B₁ e B₂.

O estudo de Velluti et al. (2004) demonstrou que os óleos de canela (*C. zeylanicum*), orégano (*O. vulgare*) e limão (*Citrus limon*) apresentaram efeito sobre a produção das micotoxinas zearalenona e desoxinivalenol produzidas por *Fusarium graminearum*, em grãos de milho contaminados.

As aflatoxinas B₁B₂G₁ e G₂ produzidas por *A. parasiticus*, e seu crescimento micelial foram totalmente inibidos pela ação de 450 ppm de óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (RASSOLI et al., 2007).

2.7.1 *Artemisia annua* L.

A planta *A. annua* é uma espécie da família Asteraceae, aromática e arbustiva. É conhecida como Quinghao na China, de onde é originária e como Alfazema no Brasil. Sua composição química é constituída por sesquiterpenos, flavonóides, cumarinas, triterpenóides, compostos esteroides, fenóis, purinas, lipídeos e compostos alifáticos (BHAKUNI et al., 2001).

Sua atividade antimicrobiana foi previamente relatada por Juteau et al. (2002), que utilizaram seu óleo essencial visando controle do crescimento das leveduras *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, observando inibição do crescimento.

2.7.2 *Campomanesia xanthocarpa* Berg

A *C. xanthocarpa*, cujo nome popular é guabiroba, pertence à família Myrtaceae. É uma árvore frutífera, nativa da região sul do Brasil (ALICE et al., 1995).

Na medicina popular, a infusão de folhas de guabiroba é utilizada como depurativa, anti-diarréica, anti-reumática e na redução do colesterol plasmático (Pavan et al., 2009).

Cavalcanti et al. (2012) estudaram a atividade antifúngica do óleo em questão contra cepas das leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Os autores obtiveram resultados satisfatórios de inibição das leveduras através da avaliação da medida dos halos de inibição formados, de 20, 36 e 18 mm, respectivamente.

O extrato metanólico de *C. xanthocarpa* foi também capaz de formar halos de inibição de 9,5, 11 e 11,5 mm nas concentrações 100, 200 e 300 µg/mL, respectivamente, no meio de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e halos com 6,5 e 7,5 mm nas concentrações 200 µg e 300 µg/mL no meio de cultivo de *C. albicans* (DESOTI et al., 2011).

2.7.3 *Cinnamomum burmannii* (Nees & T. Nees) Blume

A espécie *C. burmannii*, pertencente à família Lauraceae, é uma árvore pequena, comumente conhecida por cassia da indonésia em sua região de origem, que é o sudeste asiático, e como canela no Brasil. É muito utilizada como especiaria na culinária (AL-DHUBIAB, 2012).

Através do trabalho de Shan et al. (2007) foi possível identificar os compostos majoritários do óleo da casca de *C. burmannii*. O principal composto é o E-cinnamaldeído (83,6%), seguido de vários polifenóis. Também Viegas et al. (2005) estudaram o óleo essencial das folhas frescas da canela (*C. zeilanicum*) contra 37 isolados do grupo *A. flavus*. O resultado obtido foi positivo, havendo inibição do crescimento micelial.

2.7.4 *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

A espécie *C. citratus* é pertencente à família Gramineae. Seu nome popular é capim cidreira. É uma planta rasteira, de fácil cultivo, nativa da Ásia, porém amplamente distribuída pelo Brasil (SCHUCK, 2001).

Os compostos químicos majoritários do óleo essencial de *C. citratus*, obtido por Bassolé et al. (2011) foram geranial (48,1%), seguido por neral (34,6%) e myrceno (11%).

Nguefack et al. (2004) avaliaram o efeito inibitório do óleo essencial de *C. citratus* contra *A. flavus* e *A. fumigatus*. A dose de 1200 ppm foi eficiente para inibir o crescimento micelial de ambos os fungos. Em um trabalho similar, Pawar e Thaker (2006) verificaram que o óleo de capim cidreira foi eficaz na inibição do crescimento do *A. niger*, resultando em um halo de inibição de 33 mm, quando aplicado em discos de difusão.

A inibição do crescimento micelial de *A. flavus* foi observado no trabalho de Sessou et al. (2013), que testaram o óleo essencial de *C. citratus* nas concentrações de 800 mg/mL e 1000 mg/mL. O resultado foi 69,2% e 100% de inibição, respectivamente, para *A. flavus*.

2.7.5 *Cyperus articulatus* L.

A priprioca, como é conhecida popularmente, é uma espécie brasileira, pertencente à família Cyperaceae, cultivada por muitas comunidades rurais do Pará e comercializada como uma planta aromática, que desperta muito interesse da indústria de cosméticos (ZOGHBI et al., 2006; CASTELLANI et al., 2011).

Segundo Olawore et al. (2006), os compostos químicos majoritários presentes no óleo essencial de *C. articulatus* originário da Nigéria são ciperotundona (42%), seguido de piperitona (10%) e γ -maaliene (8,4%).

Bisht et al., (2011) analisaram o óleo essencial de *C. rotundus*, que é nativo da Índia. Como resultado do trabalho, os autores verificaram que o óleo foi capaz de inibir a esporulação dos fungos *A. flavus* e *Fusarium oxysporum*.

2.7.6 *Eugenia caryophyllata* Thunb.

O óleo essencial extraído da planta *E. caryophyllata* pertencente à família Myrtaceae, popularmente chamada de cravo, é comumente utilizado de forma medicinal, como no alívio de dores e também nas indústrias de fragrâncias (CHAIEB et al., 2007).

O maior componente químico do óleo essencial de cravo é o Eugenol (cerca de 78%), seguido de β -cariofileno e outros constituintes, como álcool benzílico (PRASHAR et al., 2006).

Segundo Pawar e Thaker (2006), o óleo de *E. caryophyllata* apresentou efeito inibitório no crescimento de *A. niger*, resultando em um halo de inibição de 36 mm, quando aplicado em discos de difusão e em seguida no meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar).

2.7.7 *Lippia sidoides* Cham

Alecrim-pimenta, como é conhecida popularmente a *L. sidoides*, pertence à família Verbenaceae e é uma planta nativa da caatinga do nordeste do Brasil. É uma planta incluída em programas governamentais de fitoterapia por ser considerada agente anti-infeccioso de uso local (MATOS; OLIVEIRA, 1998).

As diversas espécies do gênero *Lippia* apresentam-se, quase sempre, aromáticas e ornamentais. Dados de estudos biológicos mostram que muitas delas são capazes de exercerem atividades sobre o sistema nervoso central, além de propriedades antivirais e analgésicas (SOARES, 2001). O maior componente químico do óleo essencial de *L. sidoides* é o timol (aproximadamente 43%), seguido do α -feladreno (22,4%) (FONTENELLE, 2008; CARVALHO et al., 2013).

Carvalho et al. (2013) avaliaram o efeito do óleo essencial de *L. sidoides* sobre o fungo fitopatógeno *Thielaviopsis paradoxa*. O crescimento micelial e a produção de conídios foram totalmente inibidos na concentração 0,3 μ g/mL. O mesmo resultado foi obtido por Oliveira et al. (2008), onde a mesma concentração do óleo essencial de *L. sidoides* (0,3 μ g/mL) foi capaz de inibir o crescimento micelial dos fungos *A. niger*, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp. e *F. oxysporum*.

2.7.8 *Piper abutiloides* Kunth

A planta *P. abutiloides*, popularmente chamada de caapeba, é pertencente à família Piperaceae. Nativa do Brasil, é conhecida por suas propriedades

antimicrobianas, antivirais, antioxidantes, anti-tumorais, entre outras. O óleo essencial possui os compostos pseudodillapiol, eupomatenóide-6 e conocarpano (JOHANN et al., 2008). Os mesmos autores realizaram estudo com o óleo essencial de *P. abutiloides*. O objetivo foi fracionar o óleo a fim de obter os componentes isolados e aplicar sobre diferentes cepas fúngicas, como *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* e *Sporothrix schenckii*. O melhor resultado obtido foi a concentração mínima inibitória de 0,3 µg/mL contra *C. glabrata*.

2.7.9 *Schinus terebinthifolius* Raddi

Conhecida como aroeira, *S. terebinthifolius* é pertencente à família Anacardiaceae, é nativa da América do Sul e comumente encontrada na arborização das ruas. Seu fruto é vermelho e o cheiro se assemelha ao da pimenta (BARBOSA et al., 2007). Em sua composição química estão presentes os seguintes compostos: α e β -pineno, Δ^3 -careno, limoneno, entre outros. (LIMA et al., 2006; BARBOSA et al., 2007).

Oliveira Junior et al. (2013) avaliaram o efeito do óleo essencial de *S. terebinthifolius* sobre o crescimento micelial do fungo *Colletotrichum gloesporioides*, um importante fitopatógeno responsável pela antracnose em várias frutas. Como resultado obtiveram uma inibição de 79% do crescimento fúngico na concentração de 0,5% de óleo.

2.7.10 *Thymus vulgaris* L.

Tomilho, como é chamado popularmente, o *T. vulgaris* é uma erva aromática, pertencente à família Lamiaceae, muito comum na Europa e muito utilizada para adicionar aroma e sabor em muitas comidas. Para a medicina, é utilizado no tratamento de dores de cabeça, tosse, diarreia, disfunção renal, entre outros (LEE et al., 2005).

O óleo de *Thymus* apresenta como constituinte principal o timol (72%), que é uma substância natural muito requisitada por indústrias químicas e de cosméticos, seguido por carvacrol (5,7%) e monoterpenos (MATOS; OLIVEIRA, 1998; LEE et al., 2005).

Pawar e Thaker (2006) estudaram o óleo de *T. vulgaris* e concluíram que ocorreu certa inibição do fungo *A. niger*, porém o óleo essencial em questão não se mostrou tão eficaz, formando um halo de 17 mm quando aplicado em discos de difusão. Por outro lado, Nguefack et al. (2009) obtiveram resultados satisfatórios na inibição de *A. ochraceus* utilizando o óleo essencial de *T. vulgaris*.

2.7.11 *Zingiber officinale* Roscoe

O gengibre é uma planta herbácea pertencente à família Zingiberaceae, originária da ilha de Java, Índia e China (YASSIN et al., 2012). Os principais compostos químicos presentes no óleo essencial de *Z. officinale*, obtidos por Singh et al. (2008) foram o geranial (26%) seguido de α -zingibereno (9,5%), entre outros compostos.

Pesquisadores testaram a capacidade inibitória do óleo de *Z. officinale* sobre o crescimento de *Fusarium verticillioides*. Como resultado obtiveram a concentração mínima inibitória de 2500 μ g/mL (YAMAMOTO - RIBEIRO et al., 2013).

El – Baroty et al. (2010) testaram o óleo de *Z. officinale* contra *A. niger*, e após incubação por 5 dias a 27 °C obtiveram inibição total do fungo na concentração de 100 μ g/mL. Para *A. flavus*, a inibição do crescimento micelial não foi satisfatória, havendo apenas 23,8 % de inibição do crescimento micelial do fungo na maior concentração testada, ou seja, 1000 mg/mL (Sessou et al., 2013)

A Figura 4 ilustra as plantas medicinais e aromáticas estudadas no presente trabalho.

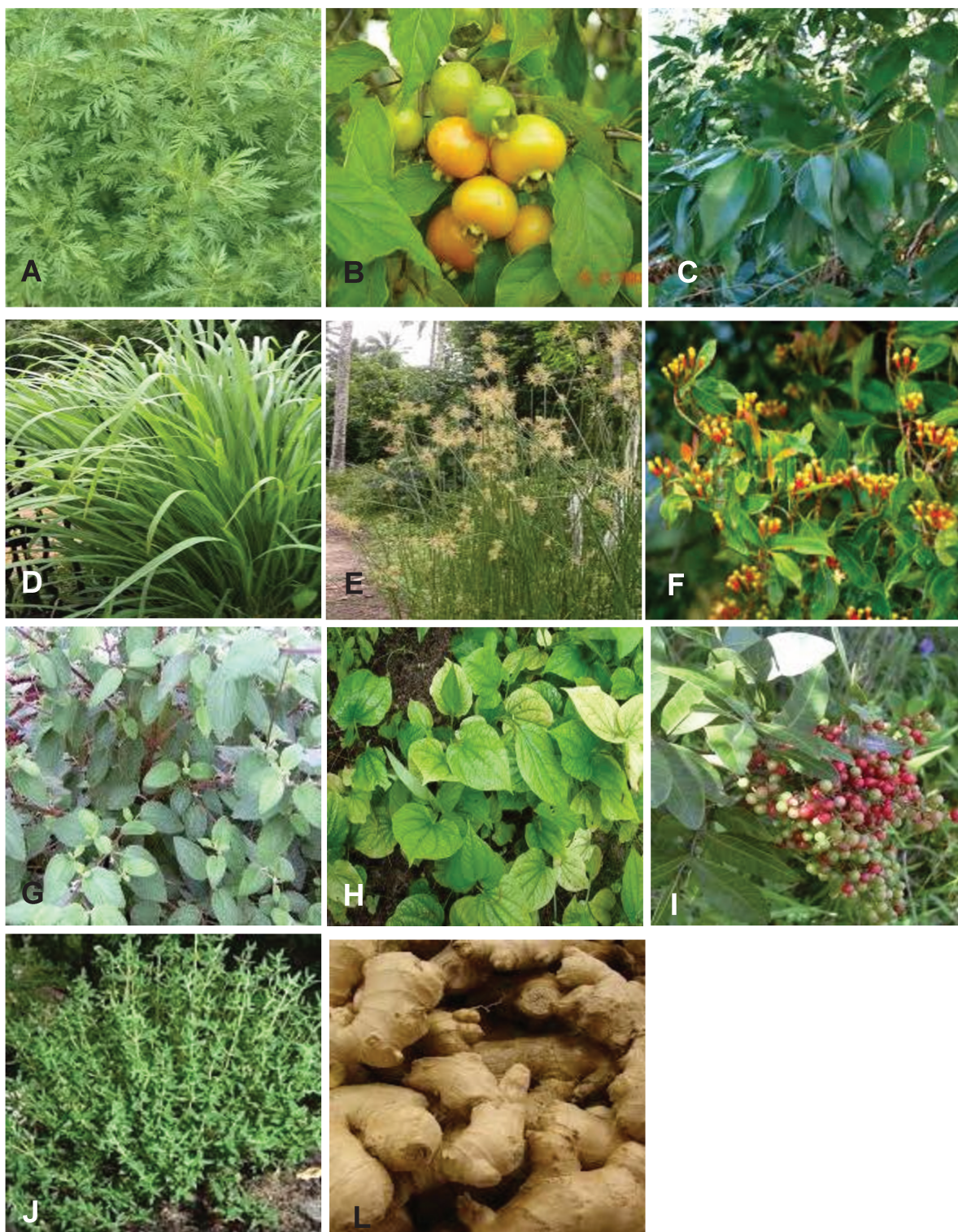


Figura 4. Plantas medicinais e aromáticas. (A) *Artemisia annua*; (B) *Campomanesia xanthocarpa*; (C) *Cinnamomum burmannii*; (D) *Cymbopogon citratus*; (E) *Cyperus articulatus*; (F) *Eugenia caryophyllata*; (G) *Lippia sidoides*; (H) *Piper abutiloides*; (I) *Schinus terebinthifolius*; (J) *Thymus vulgaris*; (L) *Zingiber officinale*. Fonte Google.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica de óleos essenciais provenientes de 11 espécies de plantas medicinais e aromáticas, sobre cepas aflatoxigênicas de *A. flavus*, *A. nomius* e *A. arachidicola* isoladas de castanha do Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração fungicida mínima (MFC) dos óleos essenciais sobre os fungos aflatoxigênicos;
- Avaliar o efeito dos óleos essenciais sobre o crescimento fúngico, no que diz respeito à morfologia, formação de esporos e coloração da colônia (qualitativamente);
- Avaliar o efeito dos óleos essenciais sobre a produção de aflatoxinas pelas espécies de *Aspergillus*;
- Avaliar o efeito dos óleos essenciais no controle de fungos em cascas de castanha do Brasil.

4. Material e Métodos

4.1 Seleção dos fungos

4.1.1 Plaqueamento das castanhas

Os fungos utilizados neste trabalho foram provenientes de amostra de castanha do Brasil adquirida no comércio de Manaus. Os fungos foram isolados através do método de Plaqueamento direto proposto por Pitt e Hocking (2009), no qual 50 pedaços de castanhas foram submetidos à desinfecção superficial com hipoclorito de sódio 0,4% por 2 min, sob agitação manual.

Logo após esta etapa, os 50 pedaços foram distribuídos em dez placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Dicloran 18% Glicerol (DG18) (Figura 5) e incubados em estufa à temperatura de 25 °C, por um período de 5 dias. A escolha deste meio de cultura foi devido a sua recomendação para amostras com atividade de água menor que 0,95 (PITT; HOCKING, 2009).

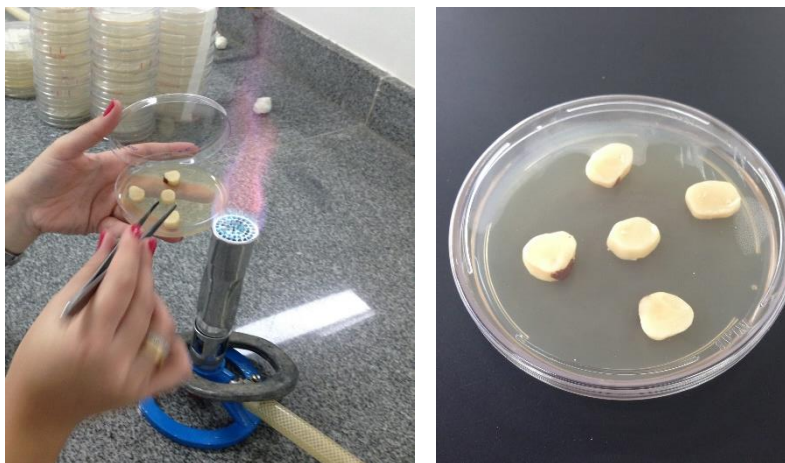


Figura 5. Plaqueamento da castanha do Brasil no meio DG18.

4.1.2 Isolamento e identificação dos fungos de interesse

Os fungos que, visualmente, pertenciam ao grupo *Aspergillus* section *flavi* foram transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA) e incubadas por 7 dias a 25 °C. Após este período, as colônias isoladas foram repicadas em três pontos equidistantes na placa, nos seguintes meios de cultura: CYA, Ágar *A. flavus parasiticus* (AFPA) e Ágar extrato de levedura sacarose (YESA). Todas as placas foram incubadas a 25 °C, por 7 dias. Em seguida, foi realizada a observação das estruturas fúngicas para a identificação morfológica. Para isto foi preparada uma lâmina para visualização microscópica, de acordo com Samson *et al.* (2010). A cultura crescida em CYA teve a superfície raspada com o auxílio de uma agulha e suas hifas transferidas delicadamente para uma lâmina. Em seguida, foi adicionada uma gota de álcool 70% e uma gota de ácido láctico padrão analítico, finalizando com a adição de uma

lamínula. A lâmina seguiu para visualização em microscópio óptico, nos aumentos de 100, 400 e 1000X e a identificação foi realizada sob orientação da Dra. Marta H. Taniwaki do Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas.

As culturas crescidas em AFPA foram avaliadas quanto à coloração que prevaleceu no reverso da placa, e as culturas crescidas em YESA foram utilizadas para o teste de produção de aflatoxinas.

4.1.3 Teste de produção de aflatoxinas

A técnica que foi utilizada para avaliar a capacidade de produção de aflatoxinas é denominada Ágar Plug associada à cromatografia em camada delgada (CCD), de Filtenborg et al. (1983). Após o crescimento das colônias em YESA, um pequeno pedaço do micélio fúngico (plug) localizado no centro da colônia foi retirado, e a este foram adicionadas três gotas de solução clorofórmio:metanol 1:1 (v:v) para extração da toxina. Este plug foi aplicado em uma placa de cromatografia de silicagel-G (Merck, Alemanha) de 500 µm de espessura. Na mesma placa foram aplicados 2 µL do padrão de aflatoxinas (Sigma, St Louis, EUA) visando comparação com os plugs preparados a partir dos meios de cultura de crescimento dos fungos.

Para realização da cromatografia, a placa foi colocada em uma cuba contendo a fase móvel, constituída de solução de tolueno, acetato de etila, ácido fórmico 90% e clorofórmio, na proporção 7:5:2:5 (v:v:v:v). Após secagem, a placa foi visualizada em câmara UV (Cole Parmer, Illinois, EUA) nos comprimentos de onda de 365 nm e 254 nm e os resultados comparados ao padrão.

4.2. Material Vegetal

Foram utilizadas as seguintes plantas provenientes da CPMA - Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA/UNICAMP, conforme Tabela 3.

A autorização de acesso ao Patrimônio Genético foi concedida pelo CNPq sob nº 010654/2-13-5.

4.2.1 Manutenção e cultivo das espécies na CPMA (Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA – UNICAMP)

As espécies mantidas na CPMA foram cultivadas em canteiros sob irrigação, no campo do CPQBA, visando manutenção e produção para garantir material suficiente aos estudos.

Tabela 3. Plantas medicinais e aromáticas da CPMA do CPQBA/UNICAMP estudadas no presente projeto (N = Nativa; E = Exótica).

Espécie medicinal e/ou aromática	Família	Nome popular	No. CPMA	Origem
<i>Artemisia annua</i> L.	Verbenaceae	Alfazema	714	E
<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.	Myrtaceae	Guabiroba	2146	N
<i>Cinnamomum burmannii</i> (Nees & T. Nees) Blume	Lauraceae	Canela	2446	E
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf	Poaceae	Capim limão	503	E
<i>Cyperus articulatus</i> L.	Cyperaceae	Priprioca	222	N
<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.	Myrtaceae	Cravo da Índia	Comercial	E
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	Verbenaceae	Alecrim pimenta	2082	N
<i>Piper abutiloides</i> Kunth	Piperaceae	Caapeba	411	N
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Anacardiaceae	Aroeira	1707	N
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Lamiaceae	Tomilho	2171	E
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Zingiberaceae	Gengibre	533	E

4.2.2 Obtenção dos óleos essenciais

As extrações dos óleos essenciais foram realizadas por hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger. Foram pesadas cerca de 100 g das partes aéreas ou raízes da planta fresca em balão de fundo redondo de 1000 mL, e adicionados 700 mL de água destilada, procedendo-se à destilação por 2 h. Em seguida, a fase

aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 50 mL) e a fase orgânica obtida foi submetida à secagem com sulfato de sódio anidro, filtrada sob algodão e o solvente evaporado à secura (MING et al., 1996).

4.3 Determinação da atividade antifúngica dos óleos essenciais pelo teste da microdiluição

4.3.1 Preparo das amostras para os testes de atividade antifúngica

Para os testes de atividade antifúngica, os óleos essenciais foram solubilizados em meio RPMI 1640 adicionado de até 2,5% de dimetilsulfóxido (DMSO), a fim de obter uma solução estoque com concentração final de 8 mg/mL (CLSI, 2002).

4.3.2 Preparo de inóculo padronizado para os testes de atividade antifúngica

Os fungos selecionados no item 4.1.2 foram inoculados em Agar Czapeck (CYA) e incubados a 25 °C por 7 dias. Após este período, as culturas foram cobertas com 1 mL de solução salina 0,85% esterilizada e 0,01 mL de uma solução de Tween 20 (0,5%), homogeneizando delicadamente com uma alça de Drigalski, obtendo-se assim, uma suspensão de esporos. A mistura resultante de conídios e fragmentos de hifas foi retirada e transferida para um tubo de ensaio esterilizado (CLSI, 2002).

Após 3 a 5 min, quando as partículas mais pesadas se depositaram ao fundo, a suspensão superior foi transferida para outro tubo de ensaio, e homogeneizada em vortex durante 15 s. A densidade da suspensão foi lida em espectrofotômetro e ajustada para uma densidade óptica (DO) de 0,09 a 0,11 (transmitância de 80 a 82%). Em seguida, 1 mL dessa suspensão foi diluído no meio padrão RPMI-1640 (1:50), correspondendo a 2x a densidade necessária de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL, aproximadamente (CLSI, 2002).

4.3.3 Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) dos óleos essenciais

Em uma microplaca esterilizada de 96 orifícios ou poços foram depositados 100 μ L de caldo RPMI-1640. Na primeira coluna da placa, foram acrescentados 50 μ L do óleo a ser analisado, de concentração conhecida. Na segunda coluna foram depositados 100 μ L do óleo já diluído em RPMI-1640 previamente, sendo o conteúdo do orifício homogeneizado com o meio e transferido para o orifício da coluna seguinte, repetindo-se este procedimento até a coluna 11, de modo a obter concentrações entre 0,019 e 2,0 mg/mL. Os 100 μ L finais foram desprezados. A última coluna da placa (coluna 12) serviu como controle do micro-organismo, portanto, não foi adicionada de óleo. Em seguida, 100 μ L da suspensão de esporos preparada conforme descrito no item 4.3.2 foram adicionados. As placas foram seladas com Parafilm®, incubadas a 25 °C e observadas quanto ao crescimento após 7 dias. A MIC (Concentração Mínima Inibitória) foi definida como a menor concentração do óleo capaz de inibir o crescimento do micro-organismo, visualmente detectado pela mudança de coloração do meio RPMI, de rosa (original) para amarelo (indicação de mudança de pH pelo crescimento microbiano (CLSI, 2002)). O ensaio foi realizado em triplicata.

4.3.4 Determinação da concentração fungicida mínima (MFC) dos óleos essenciais de maior atividade

A Concentração Fungicida Mínima (MFC) dos óleos essenciais de maior atividade sobre os fungos estudados foi avaliada através do plaqueamento de 20 μ L do material contido no poço de MIC, e dos três poços subseqüentes de maior concentração. As placas foram incubadas a 25 °C durante 7 dias e avaliadas quanto ao crescimento fúngico (CLSI, 2002). O ensaio foi realizado em triplicata.

4.4 Ação *in vitro* dos óleos essenciais selecionados

4.4.1 Aplicação por contato

A técnica utilizada foi de acordo com Viegas (2004) e Wang et al. (2005). Para a realização deste teste, os óleos que apresentaram maior atividade antifúngica foram diluídos separadamente em solução de dimetil sulfóxido (DMSO) 2,5%, até atingirem as concentrações de 1/4 MIC, 1/2 MIC, MIC, 2 MIC e 3 MIC.

Em seguida, 4 mL da solução de óleo diluído foi adicionado a 4 mL de CYA antes de solidificar (aproximadamente 45 °C), e homogeneizado na própria placa de Petri. Após a solidificação do meio, o fungo foi inoculado em um ponto central da placa, com o auxílio de uma agulha. Foi utilizado como controle o fungo inoculado no meio de cultura CYA, sem óleo essencial. O ensaio foi realizado em triplicata.

Após a realização das etapas citadas, as placas foram incubadas a 25 °C por 7 dias, e a avaliação do crescimento micelial consistiu na mensuração do raio de cada colônia em dois diferentes sentidos pré-estabelecidos. Com base na média aritmética das duas medições de cada replicata, o cálculo da porcentagem de inibição com relação ao controle foi realizado através da seguinte equação:

$$\text{Porcentagem de inibição} = (1 - D_a/D_b) \times 100$$

Sendo que D_a : Diâmetro da colônia na placa contendo o teste e D_b : Diâmetro da colônia na placa controle

4.4.2 Exposição aos compostos voláteis dos óleos essenciais

Para o teste de ação dos voláteis, os óleos que apresentaram maior atividade antifúngica foram diluídos separadamente em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 2,5%, até atingirem as concentrações de 1/4 MIC, 1/2 MIC, MIC, 2 MIC e 3 MIC.

O meio de cultura Agar Czapeck (CYA) foi adicionado em placas de Petri no volume de 4 mL. Após a solidificação, 4 mL do óleo essencial já diluído foram aplicados na superfície de um disco de papel de filtro com 4 cm de diâmetro,

previamente esterilizado (ALVAREZ-CASTELLANOS, 2001). O papel de filtro foi fixado na tampa da placa de Petri e o fungo inoculado em um ponto central da placa, com o auxílio de uma agulha. A placa foi incubada a 25 °C por 7 dias. O ensaio foi realizado em triplicata.

O cálculo da porcentagem de inibição foi o mesmo realizado para o teste via aplicação por contato.

4.5 Ação dos óleos essenciais sobre a produção de aflatoxinas pelos fungos

Para avaliação da ação dos óleos essenciais sobre a produção de aflatoxina pelos fungos, a técnica utilizada foi a descrita no item 4.1.3. Porém, as colônias utilizadas foram aquelas que apresentaram crescimento após os tratamentos por contato com os óleos essenciais e por ação de seus compostos voláteis.

4.6 Ação dos óleos essenciais selecionados sobre os fungos em castanha do Brasil

4.6.1 Irradiação das castanhas

Antes dos estudos realizados para verificação da ação *in vivo* dos óleos essenciais de melhor atividade, amostras de castanhas foram submetidas a processo de esterilização por irradiação, necessário para eliminar sua microbiota natural.

O volume de 1 kg de castanhas do Brasil com casca foi tratado pelo processo de radiação gama, com dose de 10 kGy (COELHO, 2012), utilizando dosímetro Amber/Red Perspex (Harwell Dosimeters - UK). A irradiação foi conduzida na empresa CBE, Unidade de Esterilização Cotia.

4.6.2 Efeito preventivo

Para este teste foram selecionados os óleos essenciais que apresentaram maior atividade antifúngica sobre cada micro-organismo estudado. Assim, os óleos

foram diluídos em água destilada esterilizada até atingirem as concentrações referentes à de MIC, obtidas nos ensaios de atividade, e ainda 2 vezes esta concentração. Foram tomados 20 g de castanha do Brasil, esterilizados por irradiação, que em seguida foram pulverizados com solução de óleo diluído (30 µL/g), de maneira uniforme, utilizando-se spray manual. Após 24 h, as castanhas foram pulverizadas com suspensão de esporos 5×10^5 conídios/mL do fungo a ser estudado e incubadas a 25 °C por 7 dias (SOYLU et al., 2010).

Castanhas controle foram inoculadas somente com a suspensão de conídios.

4.6.3 Avaliação da micobiota

Após serem submetidas ao teste preventivo, a micobiota das castanhas foi avaliada empregando-se a técnica do plaqueamento direto (PITT; HOCKING, 2009). As placas foram incubadas a 25 °C por 7 dias.

5. Resultados e Discussão

5.1 Seleção dos fungos

5.1.1 Infecção fúngica das castanhas

Após 5 dias de incubação a 25 °C, as amêndoas de castanha do Brasil apresentaram infecção fúngica estão exemplificados (Figura 6).

A partir da avaliação das amêndoas infectadas foi calculada a porcentagem média de infecção das castanhas, em função dos fungos encontrados, ou seja, *Aspergillus* dos grupos *flavi* e *nigri* e os gêneros *Penicillium* e *Eurotium* (Figura 7). Através destes resultados, e de comparação com resultados obtidos em estudos anteriores (CALDERARI, 2011) foi possível concluir que houve alta infecção de fungos do grupo *A. section flavi* nas amostras de castanhas do Brasil avaliadas.

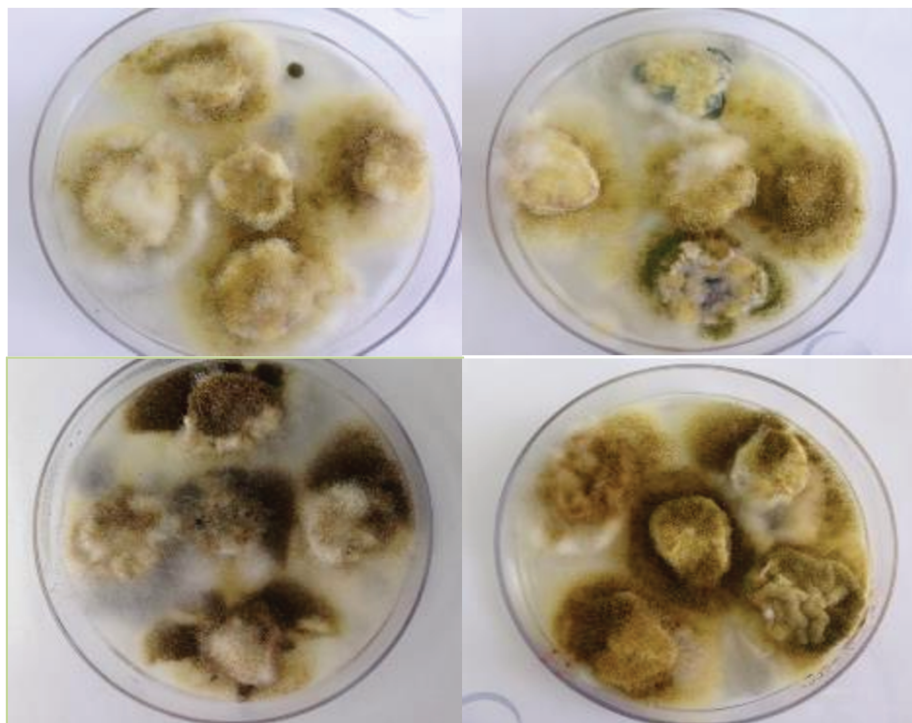


Figura 6. Infecção fúngica das amostras de castranha do Brasil. Plaqueamento direto em meio DG18 após 5 dias a 25 °C.

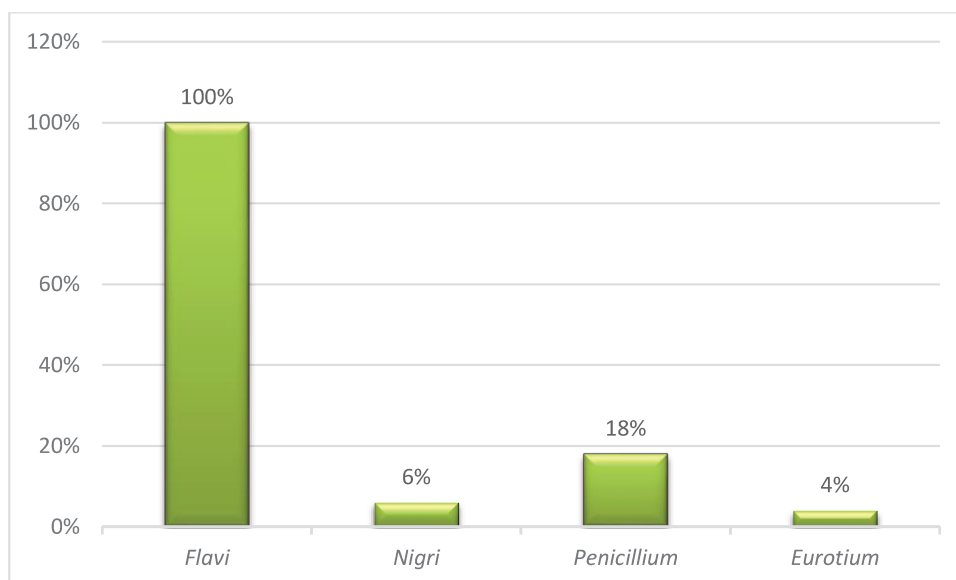


Figura 7. Porcentagem média de infecção da amostra de castanha do Brasil em função dos grupos/gêneros de fungos encontrados.

Os fungos predominantes na amostra analisada no presente trabalho corroboram os resultados encontrados por Arrus et al. (2005), que analisaram amostras de castanhas do Brasil da Amazônia peruana e observaram a predominância de *Aspergillus* spp., seguido de *Penicillium* spp. Também Pacheco et al. (2010) analisaram a micobiota de 120 amostras de castanhas do Brasil e detectaram que *A. flavus* foi a espécie que apresentou a maior porcentagem de infecção (27,5%), seguido de *P. glabrum* (21,5%).

5.1.2 Isolamento e identificação dos fungos

A partir do plaqueamento inicial, as cepas de *Aspergillus* section *flavi* foram isoladas nos devidos meios de cultura e, em seguida, identificadas morfológicamente através da confecção de lâminas, em nível de espécie. A identificação foi realizada sob orientação da Dra. Marta Taniwaki, do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Campinas, SP. Em seguida, foram selecionados, ao acaso, dois isolados de cada espécie para realização dos ensaios subsequentes deste trabalho.

5.1.2.1 *Aspergillus flavus*

Os dois isolados identificados como *A. flavus* selecionados para os estudos posteriores estão exibidos na Figura 8.

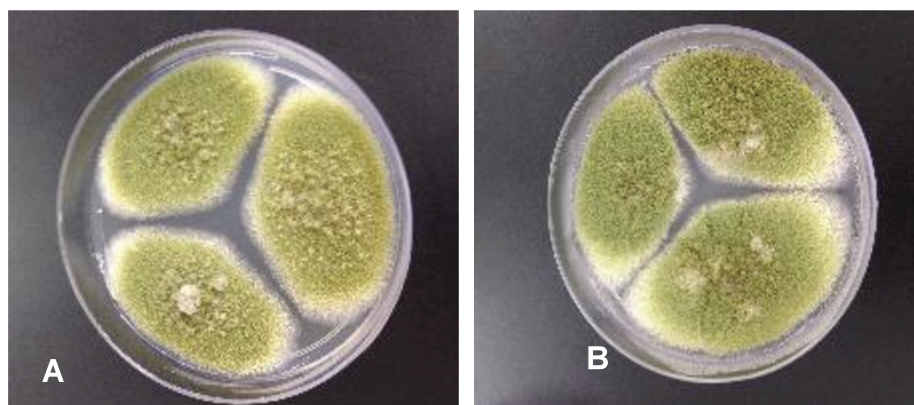


Figura 8. *A. flavus* selecionados a partir do cultivo em CYA após 7 dias de incubação à 25 °C. (A) *A. flavus* 1 e (B) *A. flavus* 2.

Ambas as colônias identificadas como *A. flavus* apresentaram coloração verde oliva, com textura flocosa no centro e extremidades brancas, conforme características de coloração utilizadas na identificação de *Aspergillus*, seguindo os autores Pitt e Hocking (2009) e Samson et al. (2010).

Após 7 dias de incubação em meio CYA, os isolados 1 e 2 apresentaram valores médios de diâmetro das colônias de 60 mm e 62 mm, respectivamente. Porém, quando submetidos à incubação em temperaturas mais elevadas, de 37 °C e 42 °C, o diâmetro das colônias sofreu alteração em função do crescimento mais lento geralmente observado para *A. flavus* nessas temperaturas (Tabela 4).

Além da avaliação da morfologia macroscópica em meio CYA, os fungos isolados foram transferidos para o meio de cultura *Aspergillus Flavus Parasiticus* Agar (AFPA), a fim de verificar a coloração do reverso da colônia. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 9 confirmam o reverso laranja apresentado por *A. flavus* em função da produção de ácido aspergílico.

Tabela 4. Crescimento de *A. flavus* em meio CYA após incubação por 7 dias em diferentes temperaturas.

<i>A. flavus</i>	Diâmetro (mm) ¹		
	25 °C	37 °C	42 °C
1	60	55	45
2	62	51	35

¹ Diâmetro das colônias representado pela média da medida de três colônias da mesma placa de Petri.

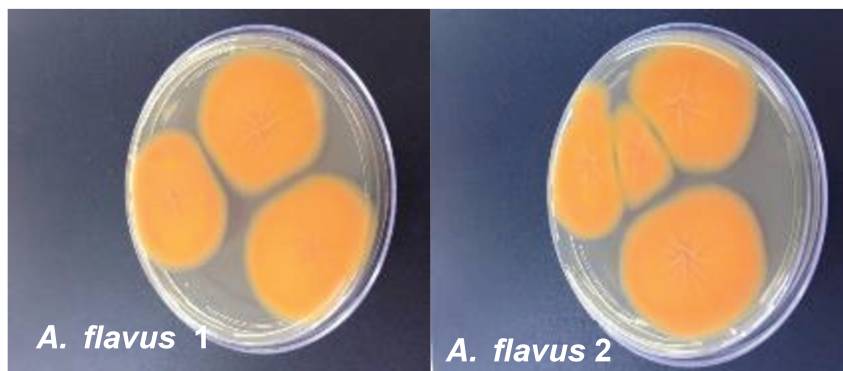


Figura 9. Reverso das colônias de *A. flavus* quando cultivados em meio AFPA após 7 dias de incubação à 25 °C.

A Figura 10 ilustra os isolados de *A. flavus* quando observados ao microscópio óptico, nos aumentos de 400X e 1000X.

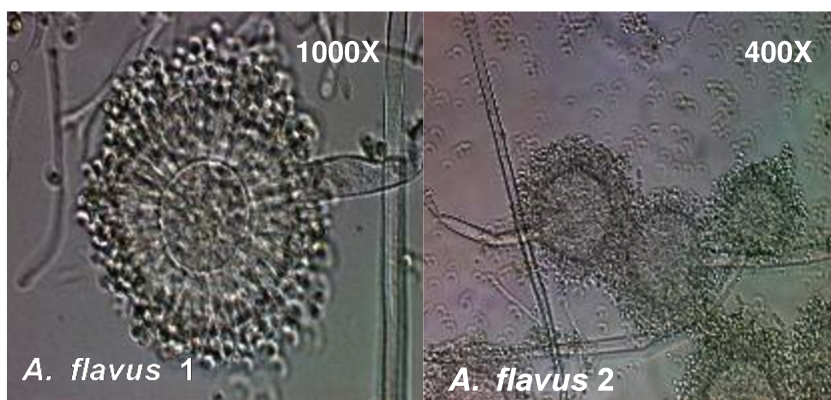


Figura 10. Micromorfologia dos isolados de *A. flavus*.

5.1.2.2 *Aspergillus nomius*

Os isolados identificados como *A. nomius* que foram selecionados para os testes posteriores estão exibidos na Figura 11.

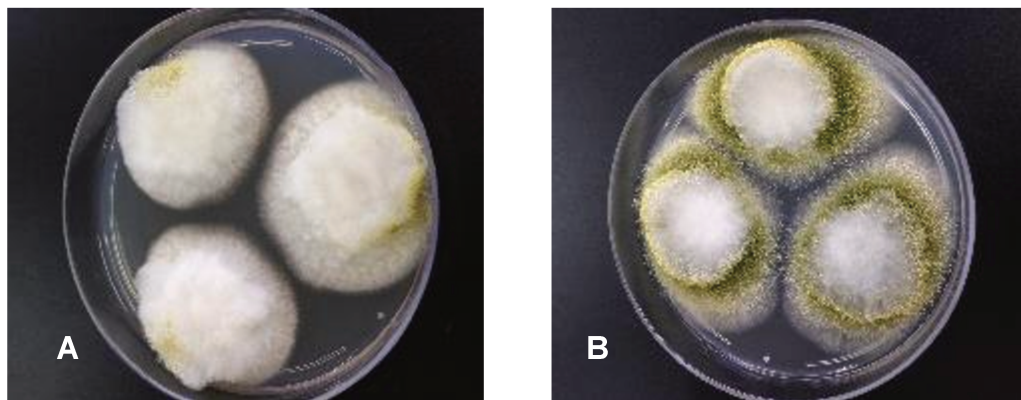


Figura 11: *A. nomius* cultivados em CYA após 7 dias de incubação à 25 °C. (A) *A. nomius* 1 e (B) *A. nomius* 2.

Conforme pode ser observado na Figura 11, a macromorfologia dos fungos desta espécie após cultivo por 7 dias de incubação apresentou colônias flocosas de coloração branca, semelhantes a algodão. O isolado 1 apresentou menor quantidade de estruturas conidiais ao redor da colônia do que o isolado 2, o que demonstra variabilidade intraespecífica. Após este período e temperatura de incubação, os isolados 1 e 2 apresentaram média do diâmetro dos três pontos de 57,7 mm e 45,3 mm, respectivamente.

Quando foram submetidos à incubação a 37 °C e 42 °C foi observado que a 37 °C houve maior crescimento e esporulação do que a 25 °C, enquanto a 42 °C o crescimento foi menor, o que pode ser confirmado pela medida do diâmetro das colônias (Tabela 5).

O resultado obtido após cultivo dos isolados em meio de cultura AFPA está ilustrado na Figura 12. Conforme esperado, os reversos de ambas as colônias apresentaram coloração laranja claro. Esses resultados referentes a morfologia macroscópica de *A. nomius* estão de acordo com Kurtzmann et al. (1987), que descreveram esta espécie.

A Figura 13 mostra os isolados de *A. nomius* quando observados ao microscópio óptico, no aumento de 400X.

Tabela 5. Crescimento de *A. nomius* em meio CYA após incubação por 7 dias em diferentes temperaturas

<i>A. nomius</i>	Diâmetro (mm) ¹		
	25 °C	37 °C	42 °C
1	57,7	63	20
2	45,3	62	12

¹Diâmetro das colônias representado pela média da medida de três colônias da mesma placa de Petri.

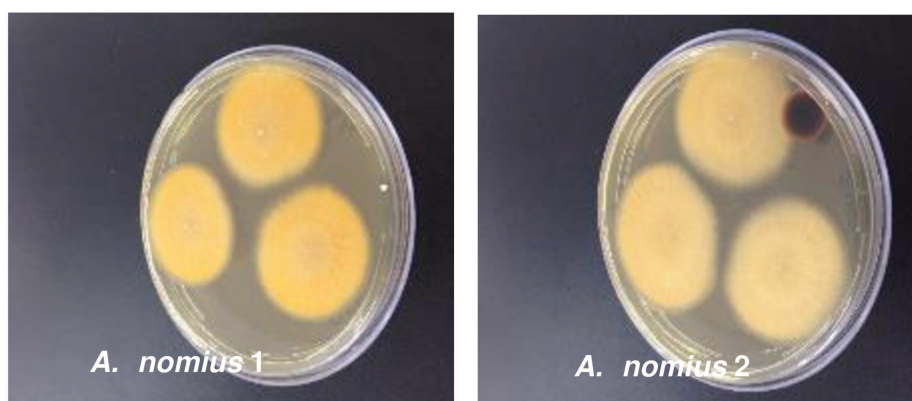


Figura 12. *A. nomius* após 7 dias de incubação a 25 °C em meio AFPA.

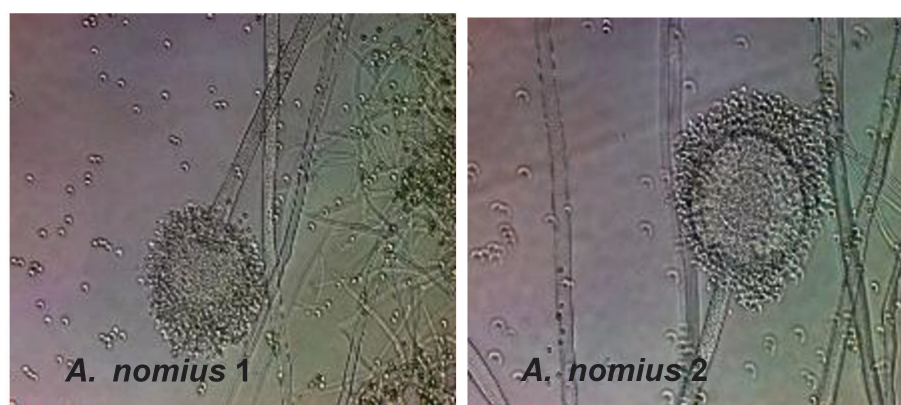


Figura 13. Micromorfologia dos isolados de *A. nomius* (400x).

5.1.2.3 *Aspergillus arachidicola*

Os isolados identificados como *A. arachidicola* selecionados para os ensaios posteriores estão exibidos na Figura 14.

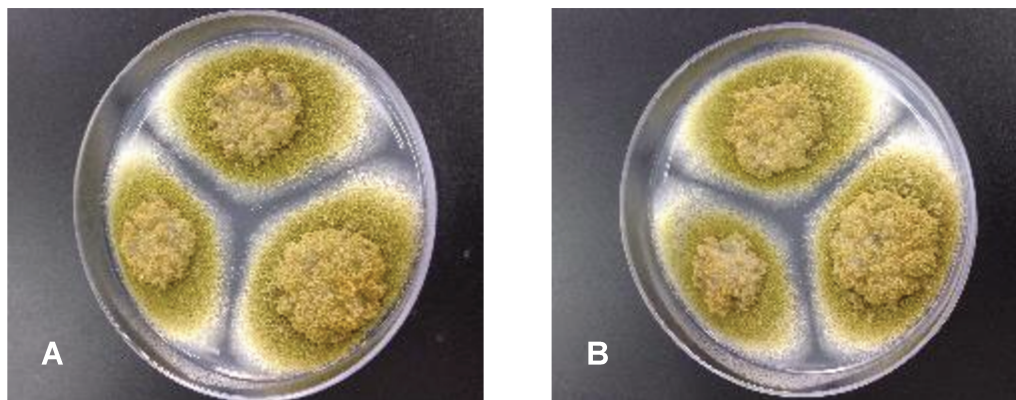


Figura 14: *A. arachidicola* cultivados em CYA após 7 dias de incubação à 25 °C. (A) *A. arachidicola* 1 e (B) *A. arachidicola* 2.

Após 7 dias de cultivo em CYA e incubação a 25 °C, os fungos desta espécie apresentaram colônia verde oliva aveludada com centro flocoso, e muitas estruturas conidiais.

A média do diâmetro das colônias de *A. arachidicola* após este período e temperatura de incubação foi de 65,3 mm e 65,7 mm para os isolados 1 e 2, respectivamente. Quando submetidos à incubação a 37 °C, os diâmetros das colônias não sofreram alterações significativas, enquanto a 42 °C houve diminuição no tamanho das colônias (Tabela 6).

Quando *A. arachidicola* foi inoculado no meio AFPA, o reverso da placa apresentou coloração laranja, como mostra a Figura 15, indicando a produção de ácido aspergílico.

A Figura 16 mostra os isolados de *A. arachidicola* quando observados no microscópio óptico, no aumento de 400X.

Tabela 6. Crescimento de *A. arachidicola* em meio CYA após incubação por 7 dias em diferentes temperaturas.

<i>A. arachidicola</i>	Diâmetro (mm) ¹		
	25 °C	37 °C	42 °C
1	65,3	66	35
2	65,7	61	32

¹ Diâmetro das colônias representado pela média da medida de três colônias da mesma placa de Petri.

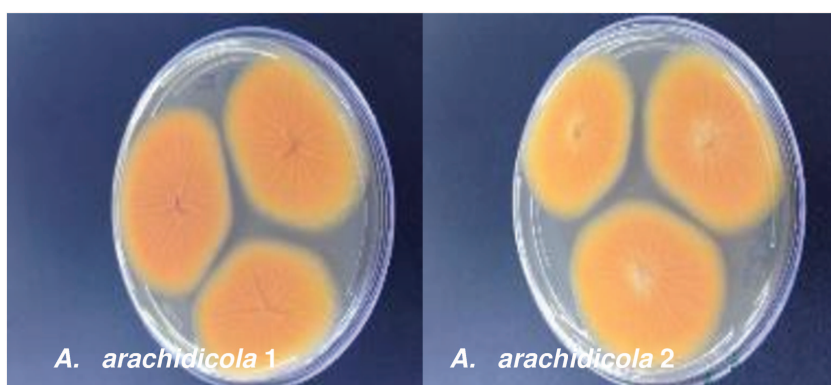


Figura 15. *A. arachidicola* após 7 dias de incubação à 25 °C em meio AFPA.

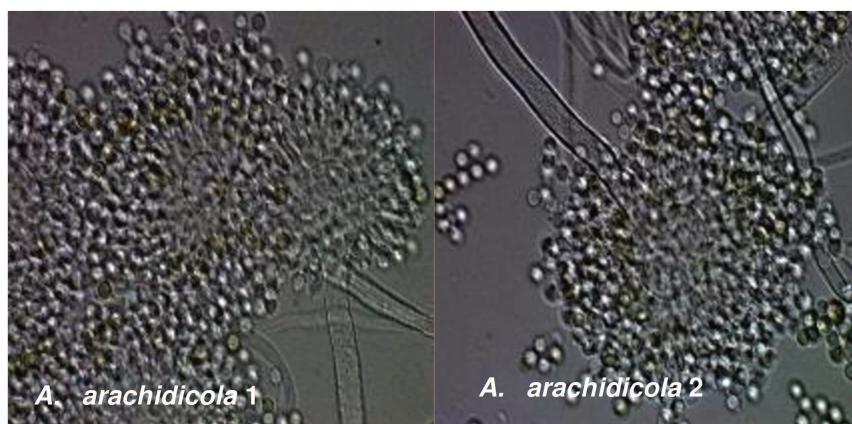


Figura 16. Micromorfologia dos isolados de *A. arachidicola* (400x).

5.1.3 Produção de aflatoxinas pelos fungos selecionados

Os isolados de *A. flavus*, *A. nomius* e *A. arachidicola* foram testadas quanto à capacidade de produção de aflatoxinas, através da técnica de Agar plug no meio YESA, seguida de cromatografia em camada delgada (CCD). A Figura 17 ilustra a placa de CCD, que mostra que houve produção de aflatoxinas pelos isolados.

De acordo com os resultados, o isolado *A. flavus* 1 produziu as aflatoxinas B₁ e B₂, enquanto o isolado 2 produziu aflatoxina B₁. Ambos os isolados de *A. nomius* e *A. arachidicola* produziram as aflatoxinas B₁B₂G₁G₂. Os resultados estão de acordo com o esperado com relação à produção de aflatoxinas para estas espécies (KURTZMANN et al., 1987; PILDAIN et al., 2008; SAMSON et al., 2010).

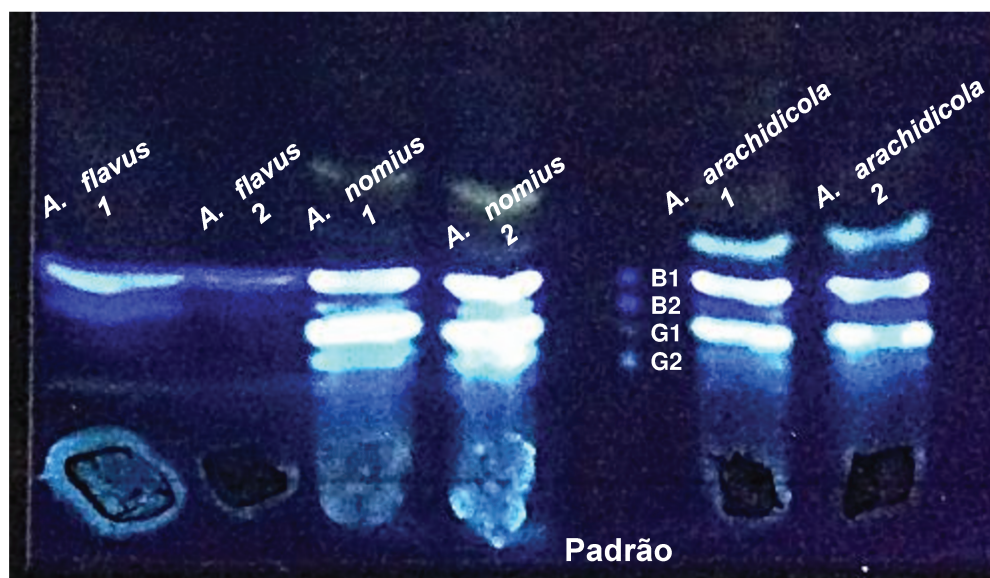


Figura 17. Produção de aflatoxinas pelas espécies *A. flavus*, *A. nomius* e *A. arachidicola* isolados de amêndoas de castanha do Brasil.

5.2 Efeito dos óleos essenciais sobre as espécies de *Aspergillus* isoladas de castanha do Brasil.

5.2.1 Determinação da concentração mínima inibitória - MIC

A determinação da MIC dos óleos essenciais obtidos a partir das plantas medicinais e aromáticas escolhidas para o presente estudo foi realizada pelo teste da microdiluição em microplacas. A concentração máxima de óleos essenciais empregada nos ensaios foi de 2000 µg/mL. Os resultados de inibição dos fungos pelos óleos essenciais estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre os isolados de *Aspergillus flavus*, *A. nomius* e *A. arachidicola* isolados de castanha do Brasil.

Óleos essenciais de plantas medicinais aromáticas	MIC (µg/mL)					
	<i>A. flavus</i>		<i>A. nomius</i>		<i>A. arachidicola</i>	
	1	2	1	2	1	2
<i>Artemisia annua</i>	500	*	*	*	1000	2000
<i>Campomanesia xanthocarpa</i>	1000	*	*	*	*	*
<i>Cinnamomum burmannii</i>	*	*	*	*	*	*
<i>Cymbopogon citratus</i>	*	*	*	*	*	*
<i>Cyperus articulatus</i>	1000	1000	1000	2000	500	1000
<i>Eugenia caryophyllata</i>	500	500	500	500	500	500
<i>Lippia sidoides</i>	500	1000	1000	1000	500	1000
<i>Piper abutiloides</i>	*	*	*	*	*	*
<i>Schinus terebinthifolius</i>	*	*	*	*	*	*
<i>Thymus vulgaris</i>	250	250	250	250	250	250
<i>Zingiber officinale</i>	*	*	2000	*	*	*

(*) > 2000 µg/mL; Média de 3 repetições.

De acordo com os resultados da Tabela 7, os óleos essenciais de melhor atividade antifúngica foram os de *E. caryophyllata* (cravo da índia) e *C. burmanii* (canela), que apresentaram valores de MIC de 500 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente. Os óleos provenientes dessas duas espécies mostraram também

um bom espectro de ação, uma vez que a inibição foi observada para todos os isolados de *Aspergillus*.

Estes valores confirmam os resultados obtidos em trabalhos anteriores sobre a ação do óleo de *E. caryophyllata* (RAHIMIFARD et al., 2008) e *C. burmanii* (VIEGAS et al., 2005; THANABORIPAT et al. 2007) sobre *A. flavus*. Resultado semelhante foi obtido por Dzamic et al. (2009) que constataram que o óleo de *E. caryophyllata* apresentou forte ação não somente contra *A. flavus*, mas contra outros fungos, como *Penicillium* e *Fusarium*.

A maioria dos demais óleos essenciais estudados apresentaram ou valores superiores de MIC ou baixo espectro de ação, ou ainda não apresentaram atividade na faixa de concentração estudada, isto é, até 2000 µg/mL.

Em relação aos resultados obtidos no presente trabalho, de acordo com a classificação de Duarte et al., (2005), que propuseram que a atividade antimicrobiana de materiais vegetais, tais como óleos essenciais, pode ser considerada elevada quando a MIC for de até 500 µg/mL, ação moderada quando a mesma for entre 600 e 1000 µg/mL e de fraca ação quando a mesma for acima de 1000 µg/mL, pode-se inferir que os óleos essenciais de *E. caryophyllata* e *C. burmanii* apresentaram forte ação para todos os isolados de *Aspergillus* estudados, e foram escolhidos para os ensaios posteriores de determinação do modo de ação *in vitro* e *in vivo* sobre os fungos isolados da castanha do Brasil.

5.2.2 Determinação da concentração fungicida mínima – MFC

Após o plaqueamento em CYA do conteúdo da microplaca correspondente ao compartimento da MIC e de três concentrações acima desta, seguido de incubação a 25 °C por 7 dias, as menores concentrações capazes de agir como fungicidas (MFC) estão apresentadas na Tabela 8.

A partir dos resultados, pode-se observar que o óleo essencial que apresentou ação fungicida contra a maioria dos isolados das espécies de fungos estudadas foi o *C. burmanii*, sendo capaz de inibir 100% do crescimento das culturas, nas menores concentrações.

O óleo essencial de *E. caryophyllata*, também escolhido para os ensaios posteriores de determinação do modo de ação *in vitro* e *in vivo* sobre os fungos isolados da castanha do Brasil, apresentou ação fungicida em concentrações mais altas de óleos essenciais, ou seja, entre 500 e 2000 µg/mL.

Tabela 8. Determinação da MFC, menor concentração do óleo essencial capaz de atuar como fungicida sobre *Aspergillus* spp.

Óleos essenciais de plantas medicinais aromáticas	MFC (µg/mL)					
	<i>A. flavus</i>		<i>A. nomius</i>		<i>A. arachidicola</i>	
	1	2	1	2	1	2
<i>Artemisia annua</i>	500	*	*	*	*	*
<i>Campomanesia xanthocarpa</i>	*	*	*	*	*	*
<i>Cinnamomum burmannii</i>	*	*	*	*	*	*
<i>Cymbopogon citratus</i>	*	*	*	*	*	*
<i>Cyperus articulatus</i>	1000	2000	*	*	2000	2000
<i>Eugenia caryophyllata</i>	500	1000	2000	2000	1000	2000
<i>Lippia sidoides</i>	500	2000	2000	2000	2000	1000
<i>Piper abutiloides</i>	*	*	*	*	*	*
<i>Schinus terebinthifolius</i>	*	*	*	*	*	*
<i>Thymus vulgaris</i>	*	1000	250	250	250	500
<i>Zingiber officinale</i>	*	*	1000	*	*	*

(*) MFC > 2000 µg/mL; Média de 3 repetições.

5.3 Ação dos óleos essenciais através da aplicação por contato e por voláteis

Os resultados obtidos para o crescimento micelial (mm) e porcentagem de inibição dos isolados pelos óleos essenciais estão apresentados nas Tabelas 9 a 14.

Ao analisar os resultados de crescimento micelial e inibição dos isolados de *A. flavus* na presença das diferentes concentrações do óleo essencial de *E. caryophyllata*, pode-se verificar que para ambos os isolados de *A. flavus* a aplicação por contato foi capaz de inibir totalmente o crescimento a partir da concentração referente à de MIC, ou seja, 500 µg/mL (Tabela 9). Em relação à aplicação por voláteis, o mesmo foi observado para o isolado 1, enquanto que para o isolado 2 a concentração necessária para causar inibição total do crescimento foi a partir de 1000 µg/mL.

Tabela 9. Média do crescimento micelial radial (mm) e porcentagem de inibição do fungo (óleo essencial de *Eugenia caryophyllata*), em função da dose e do tratamento sobre *A. flavus*.

Óleo essencial (µg/mL)	<i>A. flavus</i> 1				<i>A. flavus</i> 2			
	C (mm)	Inibição (%)	V (mm)	Inibição (%)	C (mm)	Inibição (%)	V (mm)	Inibição (%)
0	46,75	0	42,5	0	53,5	0	45,5	0
125	42,75	9	38	11	42,25	22	40	13
250	30	36	25	42	32	41	35,5	22
500*	0	100	0	100	0	100	5,5	88
1000	0	100	0	100	0	100	0	100
1500	0	100	0	100	0	100	0	100

C: Aplicação por contato; V: Aplicação por voláteis; *Concentração correspondente à MIC; Média de 3 repetições/tratamento.

De acordo com esses resultados podemos inferir que o isolado 2 de *A. flavus* apresentou maior resistência ao óleo essencial de *E. caryophyllata* do que o isolado 1, quando aplicado por ação dos voláteis, o que demonstra que mesmo dentro de

uma mesma espécie de micro-organismo podem ocorrer diferenças na susceptibilidade aos óleos essenciais.

Resultados satisfatórios foram também obtidos para o óleo de *E. caryophyllata*, no estudo de Dzamic et al. (2009), onde o volume de 2,5 µL/mL do óleo puro foi capaz de inibir 100% do crescimento de *A. flavus* quando adicionado por contato.

Os resultados referentes à aplicação do óleo essencial de *C. burmannii* sobre as espécies de *A. flavus*, através da aplicação por contato e por voláteis estão apresentados na Tabela 10.

Ao analisar os resultados da Tabela 10 é possível concluir que a aplicação do óleo essencial de *C. burmannii* por contato, na concentração referente à de MIC (250 µg/mL), foi suficiente para inibir totalmente o crescimento micelial de ambos isolados, demonstrando maior eficácia do que a aplicação por voláteis.

Tabela 10. Média do crescimento micelial radial (mm) e porcentagem de inibição do fungo (óleo essencial de *Cinnamomum burmannii*), em função da dose e do tratamento sobre *A. flavus*.

Óleo essencial (µg/mL)	<i>A. flavus</i> 1				<i>A. flavus</i> 2			
	C (mm)	Inibição (%)	V (mm)	Inibição (%)	C (mm)	Inibição (%)	V (mm)	Inibição (%)
0	46,75	0	42,5	0	53,5	0	45,5	0
100	25,75	45	31	28	48,75	9	40	13
125	14	71	26,5	38	24,25	55	35,5	22
250*	0	100	23	46	0	100	31,5	31
500	0	100	0	100	0	100	0	100
1000	0	100	0	100	0	100	0	100
1500	0	100	0	100	0	100	0	100

C: Aplicação por contato; V: Aplicação por voláteis; *Concentração correspondente à MIC; Média de 3 repetições/tratamento.

Quando Alvarez-Castellanos et al. (2001) estudaram a ação do óleo essencial das flores de crisântemo (*Chrysanthemum coronarium*) sobre o fungo *A. flavus*, os autores obtiveram resultados semelhantes aos observados no presente trabalho, pois a aplicação do óleo por contato também mostrou maior eficiência no controle do crescimento fúngico do que por aplicação de seus compostos voláteis. Também Tian et al. (2012) utilizaram o óleo essencial de canela indígena (*C. jensenianum*) e obtiveram resultados satisfatórios contra *A. flavus* quando utilizada a técnica por contato. Por outro lado, resultados contrários foram obtidos por Vilela (2007), que observaram maior eficiência para a aplicação por voláteis.

Em contrapartida, Sessou et al. (2013) obtiveram apenas 35% de inibição do crescimento micelial de *A. flavus* na concentração de 1000 µL/mL do óleo essencial de *C. zeylanicum*.

As Tabelas 11 e 12 mostram as respostas obtidas para os isolados de *A. nomius* com relação aos modos de aplicação testados, para os óleos essenciais de *E. caryophyllata* e *C. burmannii*, respectivamente.

Os resultados da Tabela 11 mostram que o isolado 2 de *A. nomius* apresentou maior resistência ao óleo de *E. caryophyllata* quando submetido à ação por voláteis, pois a concentração de MIC (500 µg/mL) não foi capaz de reduzir 100% do crescimento micelial como observado para o isolado 1.

Quando os isolados de *A. nomius* foram submetidos à ação do óleo essencial de *C. burmannii* (Tabela 12), os dois modos de aplicação utilizados não incorreram em diferenças no crescimento e inibição no caso do isolado 1, pois a concentração de MIC (250 µg/mL) foi capaz de inibir 100% do crescimento micelial em ambos os tratamentos. Por outro lado, a concentração necessária para causar o mesmo efeito no isolado 2 foi duas vezes maior (500 µg/mL) quando este foi submetido à ação dos compostos voláteis do óleo.

Tabela 11. Média do crescimento micelial radial (mm) e porcentagem de inibição do fungo (óleo essencial de *Eugenia caryophyllata*), em função da dose e do tratamento sobre *A. nomius*.

Óleo essencial (µg/mL)	<i>A. nomius 1</i>				<i>A. nomius 2</i>			
	C (mm)	Inibição (%)	V (mm)	Inibição (%)	C (mm)	Inibição (%)	V (mm)	Inibição (%)
0	50,25	0	46,5	0	41,25	0	44,5	0
125	47	7	42	10	40	4	40	11
250	36,75	27	37,5	20	29,25	30	28,5	36
500*	0	100	0	100	0	100	7	85
1000	0	100	0	100	0	100	0	100
1500	0	100	0	100	0	100	0	100

C: Aplicação por contato; V: Aplicação por voláteis; *Concentração correspondente à MIC; Média de 3 repetições/tratamento.

Tabela 12. Média do crescimento micelial radial (mm) e porcentagem de inibição do fungo (óleo essencial de *Cinnamomum burmannii*), em função da dose e do tratamento sobre *A. nomius*.

Óleo essencial (µL/mL)	<i>A. nomius 1</i>				<i>A. nomius 2</i>			
	C (mm)	Inibição (%)	V (mm)	Inibição (%)	C (mm)	Inibição (%)	V (mm)	Inibição (%)
0	50,25	0	46,5	0	41,25	0	44,5	0
100	49,25	2	44,25	5	40,25	3	42,5	5
125	45,5	16	39	17	28	33	38	15
250*	0	100	0	100	0	100	33,5	25
500	0	100	0	100	0	100	0	100
1000	0	100	0	100	0	100	0	100
1500	0	100	0	100	0	100	0	100

C: Aplicação por contato; V: Aplicação por voláteis; *Concentração correspondente à MIC; Média de 3 repetições/tratamento.

As Tabelas 13 e 14 mostram as respostas dos isolados de *A. arachidicola* com relação às diferentes concentrações dos óleos essenciais de *E. caryophyllata* e *C. burmannii*, respectivamente, quando aplicados pelos dois modos de ação.

Analisando os resultados e os modos de ação do óleo de *E. caryophyllata* sobre os isolados de *A. arachidicola*, pode-se inferir que os modos de ação apresentaram efeitos semelhantes, ou seja, a concentração de MIC (500 µg/mL) foi capaz de inibir o crescimento micelial. A exceção foi para o isolado 1, para o qual foi observado maior concentração necessária para inibição na aplicação por contato, ou seja, 1000 µg/mL (Tabela 13).

Tabela 13. Média do crescimento micelial radial (mm) e porcentagem de inibição do fungo (óleo essencial de *Eugenia caryophyllata*), em função da dose e do tratamento sobre *A. arachidicola*.

Óleo essencial (µg/mL)	<i>A. arachidicola</i> 1				<i>A. arachidicola</i> 2			
	C (mm)	Inibição (%)	V (mm)	Inibição (%)	C (mm)	Inibição (%)	V (mm)	Inibição (%)
0	55	0	45,5	0	52,5	0	44	0
125	45,75	17	35	24	45,5	14	35	21
250	31	44	28	39	30,5	42	29,5	33
500*	23,5	58	0	100	0	100	0	100
1000	0	100	0	100	0	100	0	100
1500	0	100	0	100	0	100	0	100

C: Aplicação por contato; V: Aplicação por voláteis; *Concentração correspondente à MIC; Média de 3 repetições/tratamento.

O óleo essencial de *C. burmannii* foi capaz de inibir o crescimento micelial do isolado 2 na concentração de ½ MIC (125 µg/mL), quando aplicado por contato. Quanto ao isolado 2, não foram observadas diferenças em relação ao tratamento utilizado, pois a concentração de MIC (250 µg/mL) foi capaz de inibir o crescimento micelial tanto na aplicação por contato quanto por voláteis (Tabela 14).

Tabela 14. Média do crescimento micelial radial (mm) e porcentagem de inibição do fungo (óleo essencial de *Cinnamomum burmannii*), em função da dose e do tratamento sobre *A. arachidicola*.

Óleo essencial (µg/mL)	<i>A. arachidicola</i> 1				<i>A. arachidicola</i> 2			
	C (mm)	Inibição (%)	V (mm)	Inibição (%)	C (mm)	Inibição (%)	V (mm)	Inibição (%)
0	55	0	45	0	52,5	0	44	0
100	54	2	37	18	28,75	46	40,5	8
125	27,5	50	25	45	0	100	37	16
250*	0	100	0	100	0	100	33,8	24
500	0	100	0	100	0	100	0	100
1000	0	100	0	100	0	100	0	100
1500	0	100	0	100	0	100	0	100

C: Aplicação por contato; V: Aplicação por voláteis; *Concentração correspondente à MIC; Média de 3 repetições/tratamento.

Assim, os resultados obtidos através da aplicação dos óleos essenciais pelos dois diferentes modos, contato e voláteis indicam que para todos os isolados, exceto o isolado 1 de *A. arachidicola*, a ação por contato foi mais eficiente, ou seja, ambos os óleos propiciaram redução de 100% do crescimento micelial quando utilizados em menores concentrações do que quando submetidos apenas à ação de seus compostos voláteis.

Os isolados das espécies de *Aspergillus* também foram analisados quanto à morfologia da colônia quando submetidos à ação dos óleos essenciais, nas concentrações referentes à ½ MIC (aplicação por contato) e de MIC (aplicação dos voláteis). Os aspectos das colônias dos fungos assim tratados estão ilustrados nas Figuras 18 e 19, em duplicata.

Ao comparar o crescimento e aspecto das colônias dos fungos tratados com os óleos essenciais com os dos ensaios controles (Figura 18), foi possível observar que nas concentrações de $\frac{1}{2}$ MIC ambos os óleos foram capazes de alterar a coloração das colônias após 7 dias de incubação a 25 °C. Houve perda da pigmentação, de verde para branco, e diminuição da esporulação (não quantificado), observada pela mudança na textura das colônias, além da redução dos diâmetros das mesmas.

Ainda, conforme os resultados da Tabela 14 e Figura 18 o óleo essencial de *C. burmanii*, a partir da concentração de 125 µg/mL, no teste por contato, foi capaz de inibir totalmente o crescimento de *A. arachidicola* (isolado 2) durante o período avaliado.

Ao analisar os resultados exibidos na Figura 18 foi possível observar que quando submetidos à aplicação dos compostos voláteis do óleo essencial de *E. caryophyllata*, na concentração de MIC, apenas os isolados 2 de *A. flavus* e *A. nomius* foram capazes de crescer, embora com diferença marcante quanto ao tamanho e coloração da colônia desses isolados, ocasionada por ação do óleo essencial.



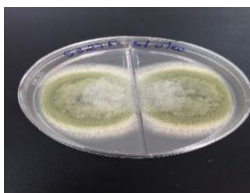
***A. flavus* 1 - Controle**



A. flavus* 1 – *E. caryophyllata



A. flavus* 1 – *C. burmannii



***A. flavus* 2 - Controle**



A. flavus* 2 – *E. caryophyllata



A. flavus* 2 – *C. burmannii



***A. nomius* 1 - Controle**



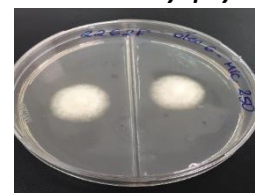
A. nomius* 1 – *E. caryophyllata



A. nomius* 1 – *C. burmannii



***A. nomius* 2 - Controle**



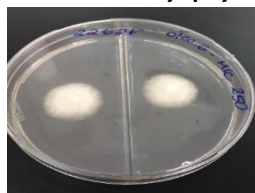
A. nomius* 2 – *E. caryophyllata



A. nomius* 2 – *C. burmannii



***A. arachidicola* 1 - Controle**



***A. arachidicola* 1-
*E. caryophyllata***



A. arachidicola* 1 – *C. burmannii



***A. arachidicola* 2 - Controle**



***A. arachidicola* 2-*E.*
*caryophyllata***



A. arachidicola* 2 – *C. burmannii

Figura 18. Ensaio de aplicação por contato dos óleos essenciais de *Eugenia. caryophyllata* (250 µg/mL) e *Cinnamomum burmannii* (125 µg/mL), após incubação por 7 dias a 25 °C.

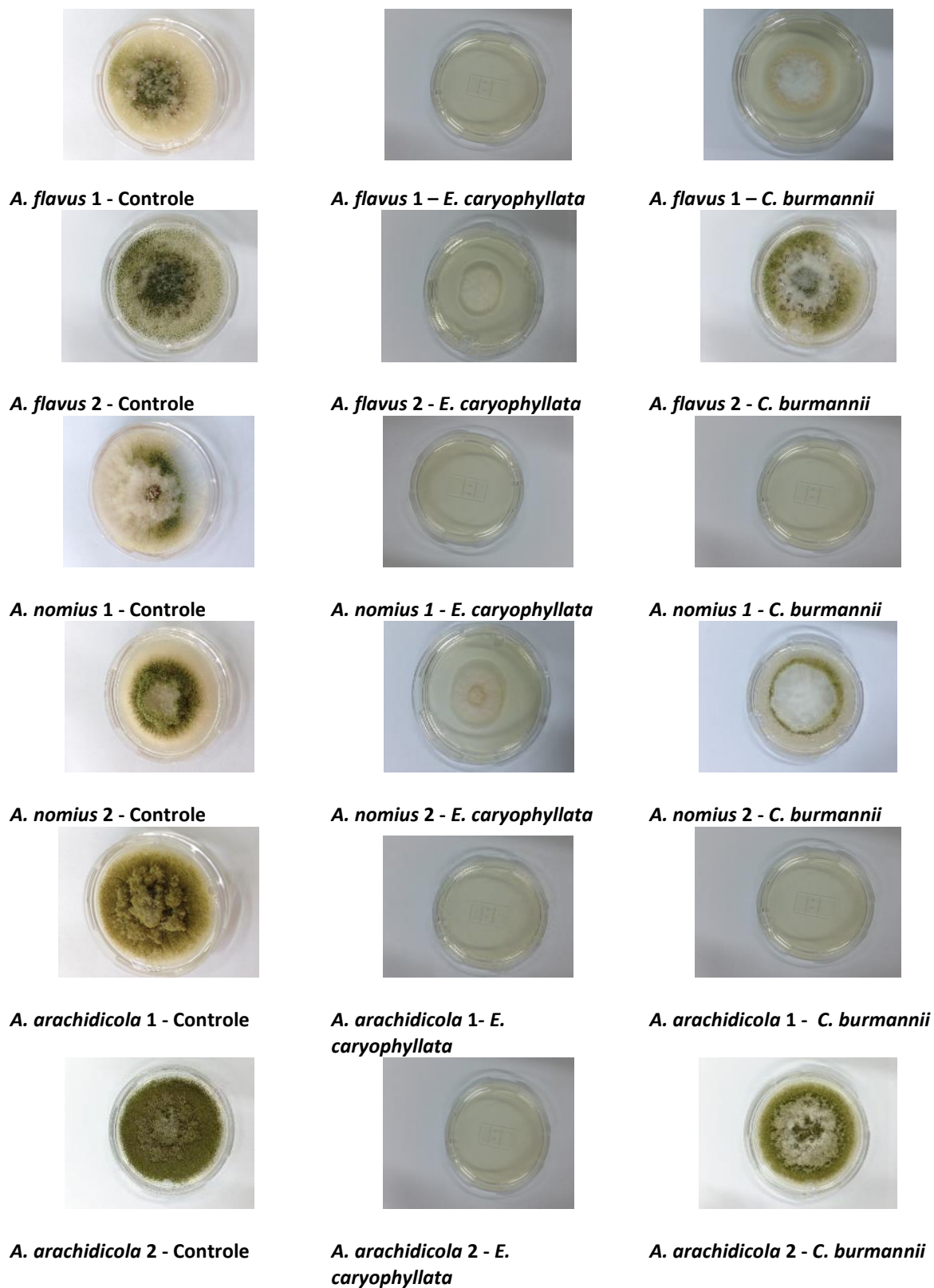


Figura 19. Aplicação dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllata* (500 µg/mL) e *Cinnamomum.burmannii* (250 µg/mL) sobre *Aspergillus* spp por ação dos voláteis, após 7 dias de incubação a 25 °C.

Diferenças nas culturas das espécies de *Aspergillus* foram também observadas quando o óleo de *C. burmanii* foi aplicado por ação dos voláteis, quando comparadas ao controle (Figura 19). Os dois isolados de uma mesma espécie responderam de maneira distinta, sendo o isolado 1 mais sensível e o isolado 2 mais resistente à ação deste óleo essencial. Dentre os isolados de *A. flavus*, que embora tenham tido crescimento menos vigoroso do que o controle, apenas o isolado 2 apresentou esporulação (análise qualitativa).

Ainda, nenhum crescimento foi observado para os isolados 1 de *A. nomius* e *A. arachidicola*, enquanto os isolados 2 não apresentaram mudanças marcantes em resposta à presença do óleo de *C. burmanii*.

Ao comparar o crescimento das colônias após a aplicação por contato e por voláteis, foi possível afirmar que o tratamento por contato foi capaz de alterar de forma mais nítida a macromorfologia das colônias.

Cabe lembrar que nas concentrações referentes às de MIC, houve inibição total dos isolados de *Aspergillus* (Tabelas 9 a 14).

5.4 Ação dos óleos essenciais sobre a produção de aflatoxinas

A avaliação da ação dos óleos essenciais sobre a produção de aflatoxinas pelos isolados de *Aspergillus* foi realizado após os testes de aplicação por contato e por compostos voláteis, nas concentrações de $\frac{1}{4}$ de MIC, $\frac{1}{2}$ MIC, após 7 dias de incubação das placas a 25 °C. Após este período a produção de aflatoxinas foi avaliada pela técnica de ágar plug, seguido de análise por cromatografia em camada delgada. Não foi realizado este ensaio para as concentrações que inibiram o crescimento fúngico, ou seja, a de MIC e 2MIC. Ensaio controle sem aplicação do óleo essencial foi incluído no ensaio. Os resultados estão apresentados nas Figuras 20, 21 e 22, respectivamente, para *A. flavus*, *A. nomius* e *A. arachidicola*.

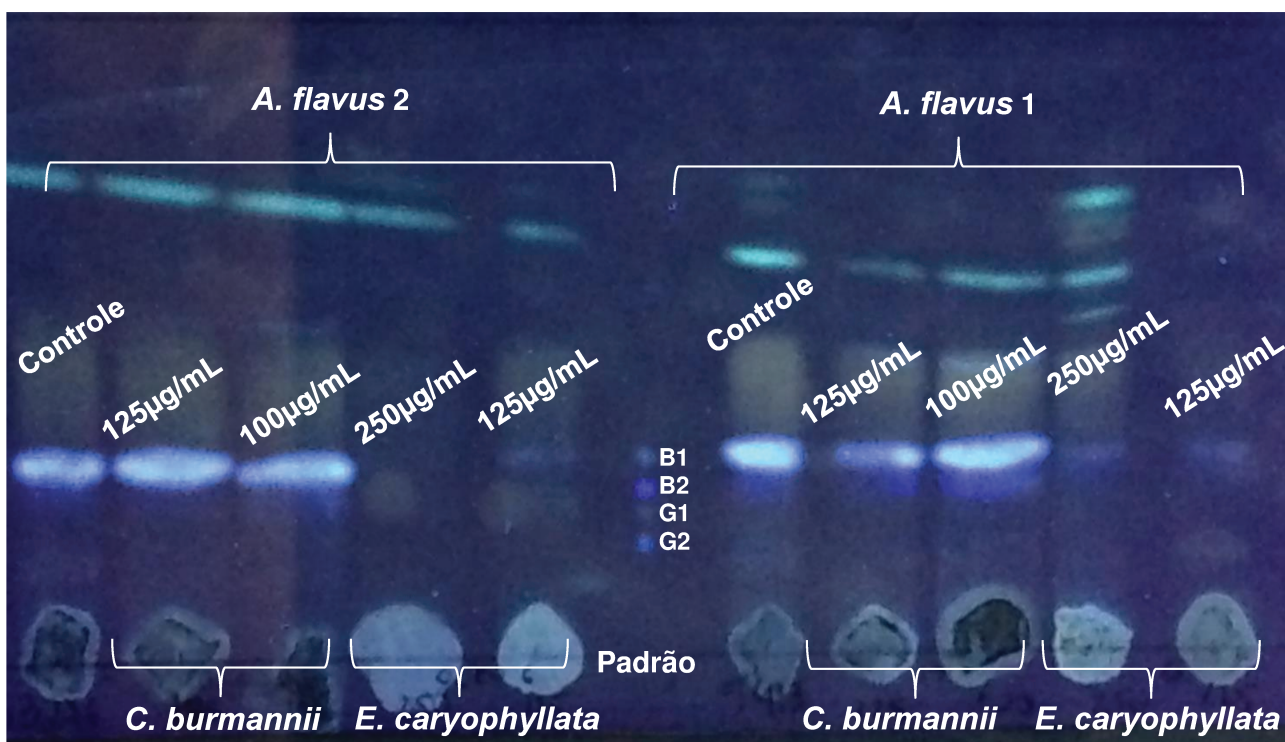


Figura 20. Ação dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllata* (250 e 125 µg/mL) e *Cinnamomum burmannii* (125 e 100 µg/mL) após tratamento por contato sobre a produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus*.

Os resultados da Figura 20 mostram claramente que houveram redução e inibição da produção de aflatoxinas pelos isolados de *A. flavus* quando submetidos à aplicação do óleo essencial de *E. caryophyllata* por contato. Na concentração de $\frac{1}{2}$ MIC (250 µg/mL) o óleo essencial de *E. caryophyllata* inibiu totalmente a produção de aflatoxina B1 pelo isolado *A. flavus* 2, enquanto para o isolado *A. flavus* 1 a mesma foi reduzida, o que pode ser notado pela diminuição da intensidade de cor da banda correspondente a mesma. Também a concentração correspondente a $\frac{1}{4}$ MIC (125 µg/mL) foi capaz de reduzir a produção da micotoxina em questão, para ambos os isolados. Por outro lado, o óleo de *C. burmannii* não foi capaz de inibir a produção de aflatoxina pelos isolados de *A. flavus*.

Rassoli et al. (2006) relataram a inibição da produção da aflatoxina produzida por *A. flavus* após tratatamento com óleo essencial de *Rosamarinus officinalis*, na concentração de 450 ppm. Ferreira et al. (2013) também obtiveram resultados satisfatórios na inibição de aflatoxina produzida por *A. flavus*, a partir de óleo essencial de açafraão.

Finalmente, a Figura 21 mostra que não houve inibição da produção de aflatoxinas pelos isolados de *A. nomius* e a Figura 22 mostra que as concentrações de 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial de *E. caryophyllata* foram capazes de reduzir a produção de aflatoxinas por ambos isolados de *A. arachidicola*.

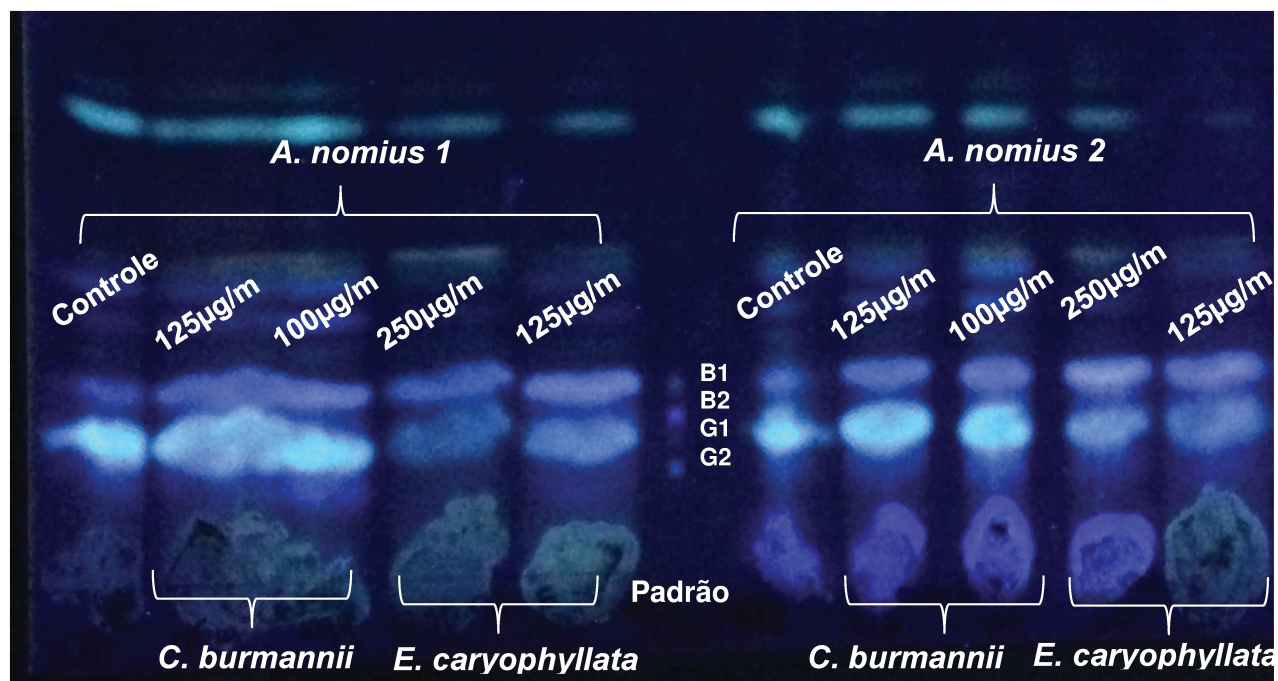


Figura 21. Ação dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllata* (250 e 125 $\mu\text{g/mL}$) e *Cinnamomum burmannii* (125 e 100 $\mu\text{g/mL}$) após tratamento por contato sobre a produção de aflatoxina por *Aspergillus nomius*.

Mahmoud (1994) concluiu que o composto eugenol, presente no óleo essencial de *E. caryophyllata* foi capaz de impedir o crescimento e a produção de aflatoxina B₁ por *A. flavus*.

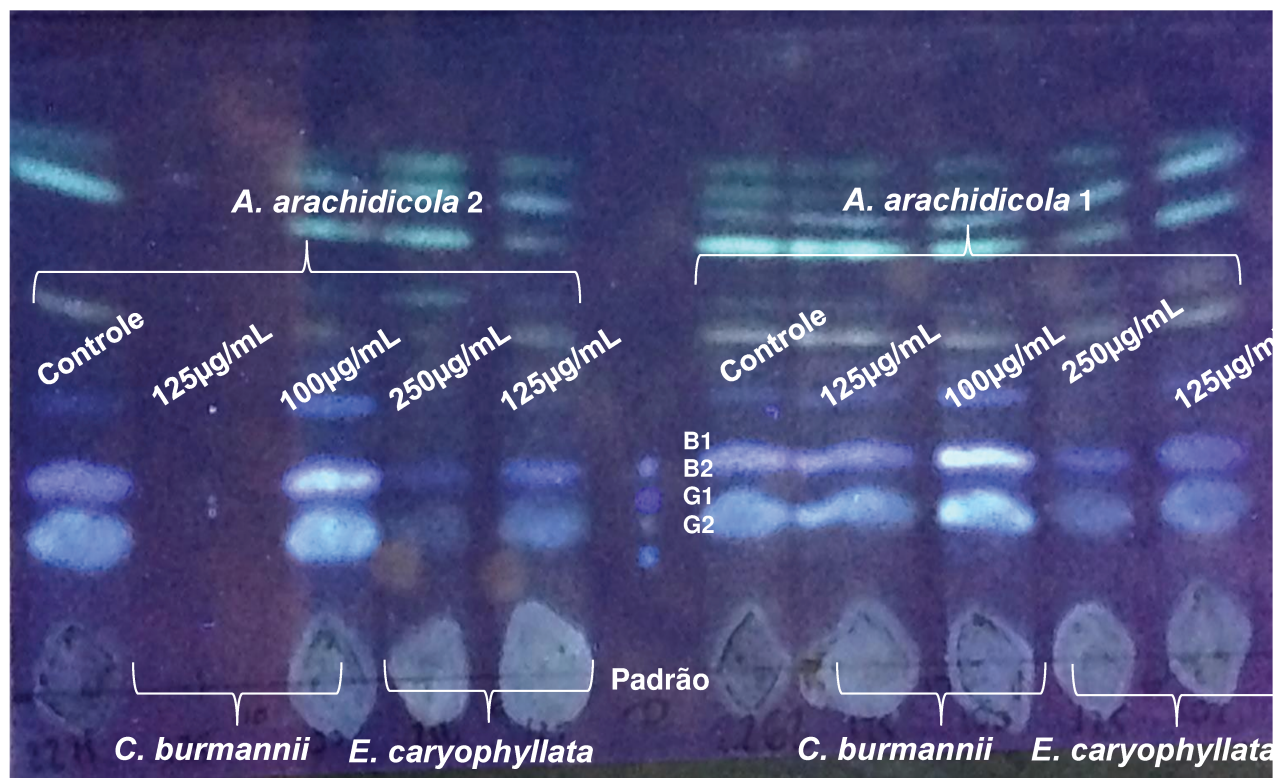


Figura 22. Ação dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllata* (250 e 125 µg/mL) e *Cinnamomum burmannii* (125 e 100 µg/mL) após tratamento por contato sobre a produção de aflatoxina por *Aspergillus arachidicola*.

5.5 Ação dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllata* e *Cinnamomum burmannii* sobre fungos em cascas de castanha do Brasil

5.5.1 Efeito preventivo

Os resultados obtidos após incubação por 7 dias a 25 °C estão apresentados na Figura 23.

Ao analisar os resultados, foi possível observar que houve redução na porcentagem de infecção das cascas submetidas aos tratamentos com óleos essenciais. Para os isolados de *A. flavus*, o óleo que permitiu obter a menor porcentagem de infecção fúngica, de 35%, foi o de *C. burmannii* na concentração de 2 MIC (500 µg/mL). Já para os isolados de *A. nomius* e *A. arachidicola*, o óleo essencial que permitiu o melhor resultado foi o de *E. caryophyllata*, também na concentração de 2 MIC (1000 µg/mL), quando a porcentagem de infecção observada foi de 0% e 15%, respectivamente. Cabe ressaltar que o ensaio controle para o isolado de *A. nomius* 1 não teve uma resposta satisfatória quanto à porcentagem de infecção.

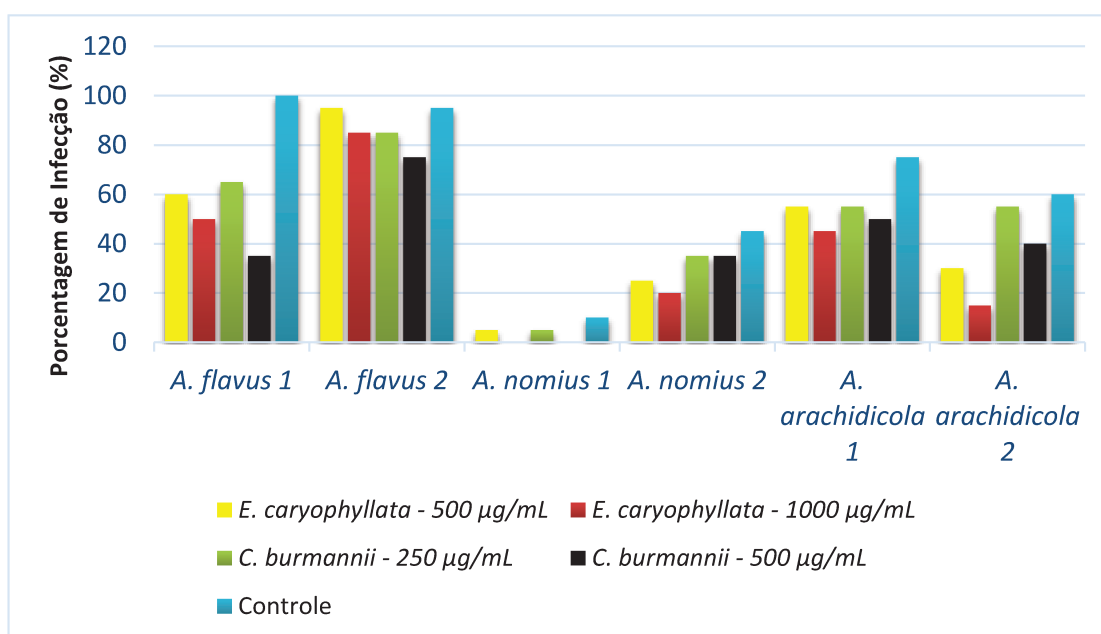
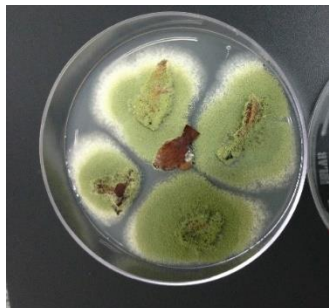


Figura 23. Porcentagem de infecção por *Aspergillus* spp. das cascas de castanha do Brasil, após tratamento com óleos essenciais de *Eugenia caryophyllata* e *Cinnamomum burmannii* após 7 dias de incubação a 25 °C.

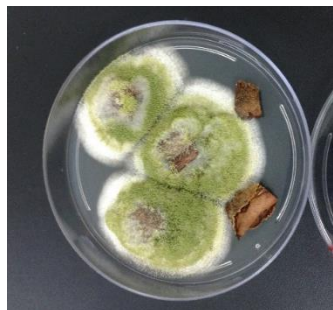
A Figura 24 exemplifica a diferença na porcentagem de infecção fúngica entre o controle, sem intervenção de óleos essenciais e após o tratamento com óleos essenciais.



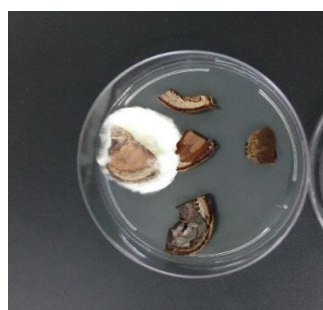
***A. flavus* 1 - Controle**



***A. flavus* 1 - *C. burmannii* 500 µg/mL**



***A. nomius* 2 - Controle**



***A. nomius* 2 - *E. caryophyllata* 1000 µg/mL**



***A. arachidicola* 1 - Controle**



***A. arachidicola* 1- *E. caryophyllata* 1000 µg/mL**

Figura 24. Representação da infecção fúngica de cascas de castanha do Brasil antes e depois do tratamento com óleos essenciais de *E. caryophyllata* e *C. burmanii*, nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL respectivamente.

Estudos concomitantes a este realizados na Divisão de Microbiologia do CPQBA/UNICAMP identificaram os compostos majoritários presentes nos óleos essenciais de *E. caryophyllata* e *C. burmanii*, que foram também capazes de inibir o crescimento e a produção de aflatoxinas por *A. flavus* NRRL 3252.

Através de análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) foram identificados 99,6% dos compostos do óleo essencial de *E. caryophyllata* (Tabela 15) sendo possível observar que o composto majoritário foi o eugenol, que compreendeu 89,10% dos componentes presentes no óleo. Outros compostos encontrados foram o acetato de eugenol, citronelal, citral, β -cariofileno e α -cariofileno, em menores proporções.

Tabela 15. Composição química do óleo essencial de *Eugenia caryophyllata*.

% Relativa	Composto químico
0,59	Citronelal
0,20	Salicilato de metila
0,20	<i>cis</i> - Citral
0,25	Citral
89,0	Eugenol
2,60	β - Cariofileno
0,39	α - Cariofileno
4,46	Acetato de eugenol
0,39	Óxido de cariofileno

Na análise química dos constituintes do óleo de *C. burmanii*, por CG-EM (Tabela 16), 99.60% dos constituintes foram identificados, sendo o E - cinamaldeído (37,93%) e o acetato de cinamila (35,46%) os compostos majoritários. Foi

observada ainda a presença de borneol, terpineol, ácido benzoico e de outros compostos minoritários.

Tabela 16. Composição química do óleo essencial de *Cinammomum burmannii*

% Relativa	Composto Químico
0,38	Isopulegol
0,35	(R)-(+)- Citronelal
0,86	Benzenepropanal
1,39	Borneol
0,30	Tepineol
0,37	β -Citral
37,9	E - Cinamaldeído
0,33	Eugenol
1,69	Hidrocinamil sobutirato
0,19	Cariofileno
35,5	Acetato de cinamila
0,89	Oxido de cariofileno
16,5	Ácido benzóico

Os resultados obtidos a partir do presente trabalho permitem afirmar que os óleos essenciais de *E. caryophyllata* e *C. burmanii* apresentam potencial para inibir ou reduzir o crescimento e a produção de aflatoxinas pelos fungos *A. flavus*, *A. nomius* e *A. arachidicola*. Estudos complementares deverão ser conduzidos a fim de quantificar a inibição das aflatoxinas pelos óleos essenciais.

6. Conclusões

- Dos 11 óleos essenciais estudados, os de *Eugenia caryophyllata* e *Cinnamomum burmannii* apresentaram elevada atividade contra os dois isolados de *Aspergillus flavus*, *A. nomius* e *A. arachidicola* selecionados, apresentando valores de MIC de 500 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente. Esses óleos apresentaram também ação fungicida, porém a concentrações mais elevadas, entre 500 µg/mL e 2000 µg/mL para *E. caryophyllata* e 250 µg/mL e 1000 µg/mL para *C. burmannii*.

- Os resultados de crescimento micelial e inibição dos isolados de *A. flavus*, *A. nomius* e *A. arachidicola* obtidos na presença das diferentes concentrações do óleo essencial de *E. caryophyllata*, mostrou que para ambos os isolados de *A. flavus* e *A. nomius* e isolado 2 de *A. arachidicola*, a aplicação por contato foi capaz de inibir totalmente o crescimento a partir da concentração referente à de MIC (500 µg/mL). Quanto ao isolado 1 de *A. arachidicola*, a concentração necessária foi maior, de 1000 µg/mL.

- A aplicação por contato dos óleos essenciais de *E. caryophyllata* e *C. burmannii*, nas concentrações de 250 µg/mL e 125 µg/mL, respectivamente ($\frac{1}{2}$ MIC) proporcionou maiores alterações na macromorfologia das colônias, no que diz respeito ao tamanho, cor e esporulação, do que quando aplicados pela ação de seus compostos voláteis.

- O óleo essencial de *E. caryophyllata*, aplicado por contato na concentração de 250 µg/mL ($\frac{1}{2}$ MIC), inibiu a produção de aflatoxina B1 pelo isolado 1 de *A. flavus*. Para o isolado 2, foi observada apenas redução da produção de aflatoxina, nesta mesma concentração.

- Não houve inibição da produção de aflatoxinas pelos isolados de *A. nomius* quando submetidos aos óleos essenciais de *E. caryophyllata* e *C. burmannii*, nas

concentrações de 250 µg/mL e 125 µg/mL, respectivamente ($\frac{1}{2}$ MIC) e 125 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente ($\frac{1}{4}$ MIC).

- As aflatoxinas produzidas pelos isolados de *A. arachidicola* foram reduzidas pelo óleo essencial de *E. caryophyllata*, aplicado por contato, nas concentrações de 250 e 125 µg/mL (MIC e $\frac{1}{2}$ MIC respectivamente).

- Através dos ensaios com aplicação do óleo em cascas de castanha do Brasil, foi possível concluir que o óleo essencial mais eficiente na redução da porcentagem de infecção fúngica foi o de *C. burmannii* na concentração de 500 µg/mL (2 MIC) para os isolados de *A. flavus* e o óleo essencial de *E. caryophyllata*, na concentração de 1000 µg/mL (2 MIC), para os isolados de *A. nomius* e *A. arachidicola*.

7. Referências Bibliográficas

- AL-DHUBIAB, B. Pharmaceutical applications and phytochemical profile of *Cinnamomum burmannii*. *Pharmacognosy*, v. 6, n. 12, p. 125-131, 2012.
- ALICE, C. B., SIQUEIRA, N. C. S., MENTZ, L. A., SILVA, G. A. A. B., JOSÉ, K. F. D. *Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico*. Canoas: Ulbra, 1995. 205 p.
- ÁLVARES, V.S. *Princípios para o manejo pós colheita da castanha do Brasil*. EMBRAPA ACRE. Disponível em: <www.embrapa.com.br> Acesso em 05 Jul. 2013.
- ALVAREZ-CASTELLANOS, P.P.; BISHOP, C.D.; PASCUAL – VILLALOBOS M.J. Antifungal activity of the essential oil of flower heads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Photochemistry*, Oxford, v. 57, p. 99 – 102, 2001
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº7 de 18 de fevereiro de 2011. *Diário Oficial da União*. n. 37, seção 1, 22 de fevereiro de 2011.
- APIZ. Associação do povo indígena Zoró. In: *Boas práticas de coleta, armazenamento e comercialização da castanha do Brasil*. 2ª edição. Cuiabá – Mato Grosso. Defanti Editora, 2009.
- ARRUS, K. BLANK, G., ABRAMSON, D., CLEAR, R., HOLLEY, R.A., Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *Journal of Stored Products Research*, v. 41, p. 513 – 527, 2005.
- ATANDA, O. O., AKPAN, I., OLUWAFEMI, F. The potential of some spice essential oils in the control of *Aspergillus parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. *Food Control*, v. 18, p. 601 – 607, 2007.
- BAQUIÃO, A.C. *Fungos e micotoxinas em castanhas do Brasil, da colheita ao armazenamento*, (tese) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo – SP, Brasil, 142 p., 2012.
- BAQUIÃO, A. C., OLIVEIRA, M. M. M., REIS, T. A., ZOERZETE, P., ATAYDE, D. D., CORREA, B. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *Food Chemistry*, v. 139, p. 1127 – 1132, 2013.
- BAQUIÃO, A.C.; ZOERZETE, P.; REIS, T.A.; ASSUNÇÃO, E.; VERGUEIRO, S.; CORREA, B. Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. *Food Control*, v. 28, p. 224 – 229, 2012.

BARBOSA, L. C. A., DEMUNER, A. J., CLEMENTE, A. D., PAULA, V. F., ISMAIL, F. M. D., Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Química Nova*, v. 30, n. 8, 1959 – 1965, 2007.

BASER, K.H.C.; BUCHBAUER, G. *Handbook of essential oils: Science, technology, and applications*. Boca Raton – Flórida. CRC Press, 2010, 975 p.

BASSOLÉ, I. H. N., LAMIEN – MEDA, A., BAYALA, B., OBAME, L. C., ILBOUDO, A. J., FRANZ, C. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*, v. 18, p. 1070 – 1074, 2011.

BHAKUNI, R. S., JAIN, D. C., SHARMA, R. P., KUMAR, S. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Current Science*, v. 80, n. 1, p. 35 – 48, 2001.

BENNETT, J.W., KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n. 3, 497 – 516, 2003.

BISHIT, A., BISHIT, G. R. S., SINGH, M., GUPTA, R., SINGH, V. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of tubers of *Cyperus rotundus* Linn. collected from Dehradun (Uttarakhand). *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, v. 2, n. 2, 2011.

CALDERARI, T.O. *Biodiversidade de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas em castanha do Brasil*, (dissertação) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Uniersidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas - SP, Brasil, 145 p., 2011.

CALDERARI, T. O., IAMANAKA, B. T., FRISVAD, J. C., PITT, J. I., SARTORI, D., PEREIRA, J. L., FUNGARO, M. H. P., TANIWAKI, M. H. The biodiversity of *Aspergillus* section Flavi in brazil nuts: From rainforest to consumer. *International Journal of Food Microbiology*, v. 160, p. 267 – 272, 2013.

CAMPO/PAS, *Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da castanha do Brasil*. Série Qualidade e Segurança dos Alimentos. Brasília, DF: Campo PAS, 2004.

CARVALHO, R. R. C., LARANJEIRA, D., FILHO, J. L. C., SOUZA, P. E., BLANK, A. F., ALVES P. B., JESUS, H. C., WARWICK. *In vitro* activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms . *Química Nova*, v. 36, n. 2, p. 241 – 244, 2013.

CASTELLANI, D.C.; DOMENICO, C.; RONCOLETTA, L.M.A.; SILVA, A.C.; TOZAKI R.M.; OLIVEIRA, D.H. Technical coefficients of priprioca production (*Cyperus articulatus* L.) in organic system at the region of Belém (PA). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.13. 2011.

CAVALCANTI, Y. W., PÉREZ, A. L. A. L. XAVIER, G. D. R., ALMEIDA, L. F. D., PADILHA, W. W. N. Atividade Antifúngica de Extratos Vegetais Brasileiros sobre Cepas de *Candida*. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v. 16, n. 1, p. 43 – 48, 2012.

CESCHINI, V. C. Potencial antifúngico de extratos de folhas de *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. sobre *Aspergillus flavus* (dissertação) Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo – USP, Piracicaba – SP, Brasil, 97 p., 2011.

CHAIK K., HAJLAOUI H., ZMANTAR T., NAKBI K.A.B., ROUABHIA M., MAHDOUAN K. I., BAKHROUF A. The chemical composition and biological activity of essential oil, *Eugenia cryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytother. Research.*, v. 21, n. 6, p. 501-506, 2007.

CLSI. *Referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos*, M38A, v. 22, n. 16, 2002.

COELHO, E. A. A. *Efeitos da radiação gama e feixe de elétrons sobre amostras de castanhas do Brasil inoculadas artificialmente com Aspergillus flavus* (dissertação), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São paulo – USP, São Paulo, Brasil, 85 p. 2012.

CONNER, D. E., BEUCHAT, L. R. Effects of Essential Oils from Plants on Growth of Food Spoilage Yeasts. *Journal of Food Science*, v. 49, p. 429 – 434, 1984.

COOPERACRE. Cooperativa central de comercialização extrativista do Estado do Acre. *Ficha técnica de produtos – Castanha do Brasil*. Disponível em <www.cooperacre.com> Acesso em 25 de ago. 2013.

DESOTI, V. C., MALDANER, C. L., CARLETTO, M. S., HEINZ, A. A., COELHO, M. S., PIATI, D., TIUMAN, T. S. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. *Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR*, v. 15, n. 1, p. 3-13, 2011.

DUARTE, M. C., FIGUEIRA, G. M., SARTORATTO, A., REHDER, V. L. G., DELARMELINA, C. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.97, n.2, p. 305-11, 2005.

DZAMIC, A., SOKOVIC, M., RISTIC, M. S., GRIJIC – JOVANOVIC, S., VUKOJEVIC, J., MARIN, P. D. Chemical composition and antifungal activity of *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllata* essential oils. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 45, n. 2, 2009.

EL – BAROTY, G. S., EL-BAKY, H. H. A., FARAG, R. S., SALEH, M. A. characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. *African Journal of Biochemistry Research*, v. 4, n. 6, p. 167 – 174, 2010.

FEIBELMAN T.P.; COTTY P.J.; DOSTER M.A.; MICHAILIDES T.J. A morphologically distinct strain of *Aspergillus nomius*. *Mycologia* v.90, n.4, p.618-623, 1998.

FERREIRA, F.D.; KEMMELMEIER, C.; ARROTÉIA, C.C.; COSTA, C.L.; MALLMANN, C.A.; JANEIRO, V.; FERREIRA, F.M.D.; MOSSINI, S.A.G.; SILVA, E.L.; JUNIOR, M.M. Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry*, v. 136, p. 789 – 793, 2013.

FERREIRA, P. R. A Bolívia é uma das causas da crise. A expansão da fronteira agrícola está reduzindo a atividade extrativista da castanha. Disponível em <www.revistaagroamazonia.com.br/castanha1> Acesso em 26 de ago. 2013.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C.; SVENDENSEN, J.A.; Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, v.45, p. 81-85, 1983.

FONTENELLE, R. O. S. *Efeito antifúngico de óleos essenciais de Lippia sidoides cham., Croton argyrophyllodes Muell., Croton zenhtneri Pax et Hoffm., Croton nepetaefolius Baill. e de seus principais constituintes contra dermatófitos e Candida spp. isolados de cães* (tese), Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza – CE, Brasil, 150 p., 2008.

FREIRE, J.M. *Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: Caracterização química e atividade biológica sobre Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Aspergillus flavus e Aspergillus parasiticus*. (Dissertação) Agroquímica, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, Brasil, 68 p., 2008.

FREITAS, J. B., NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. *Revista de Nutrição*, v. 23, p. 269 – 279, 2010.

FRISVAD, J.C.; ANDERSEN B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycologicalresearch*, v.112 n.2, p. 231-240, 2008.

IAMANAKA, B.T.; OLIVEIRA, I.S.; TANIWAKI, M.H. *Micotoxinas em alimentos*. In: Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica. Recife: Comunigraf, 2010, 368 p.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. In: *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* Lyon, France, v. 82, p.171–300, 2002.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In: *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, France, 1993, v. 56, 571 p.

JOHANN, S., COTA, B. B., SOUZA-FAGUNDES, E. M., PIZZOLATTI, M. G., RESENDE, M. A., ZANI, C. L. Antifungal activities of compounds isolated from *Piper abutiloides* Kunth. *Mycoses*, v.52, p. 499 – 506, 2008.

JUTEAU, F., MASOTTI, V., BESSIÈRE, J. M., DHERBOMEZ, M., VIANO, J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. *Fitoterapia*, v. 73, p. 532 – 535, 2002.

KELLER N.P.; TURNER G.; BENNETTI J.W. Fungal secondary metabolism - Biochemistry to genomics. Nature Publishing Group – *Nature Reviews* v.3 p. 937-947, 2005.

KLICH, M.A.; PITT, J.I. *A Laboratory Guide to Common Aspergillus Species and their teleomorphs*. Austrália: Division of Food Science and Technology, 1988, 134 p.

KURTZMAN, C.P.; HORN, B.W.; HESSELTINE, C.W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 53, p. 147 -158,1987.

KRYUKOV, G. V., CASTALLANO S., NOVOSELOV S. V., LOBANOV A. V., ZEHTAB O., GUIGÓ R., GLADYSHEV V. N. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, v. 300, n. 5624, p. 1439 – 1443, 2003.

LEE, S., UMANO, K., SHIBAMOTO, T., LEE, K. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, v. 91, p. 131 – 137, 2005.

LIMA, M. R. F., LUNA, J. S., SANTOS, A. F., ANDRADE, M. C., SANT'ANA, A. E. G., GENET, J., MARQUEZ, B., NEUVILLE, L., MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 105, n. 1-2, p. 137 – 147, 2006.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. São Paulo: Instituto Plantarum Ltda, 2010, 384 p.

MAHMOUD, A.L.E. Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents. *Letters in Applied Microbiology*, v.19, p.110-113, 1994.

MATOS, F. J. A., OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham. – Farmacognosia, química e farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 79, n. 3/4, p. 84 – 87, 1998.

MING, L.C.; FIGUEIREDO, R.O.; MACHADO, S.R.; ANDRADE, R.M.C. Yield of essential oil of and citral content in different parts of lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). Poaceae. *Acta Horticulturae*, n.426, p.555–559, 1996.

MOODLEY, R. ; KINDNESS, A.; JONNALAGADDA, S. B. Elemental composition and chemical characteristics of five edible nuts (almond, Brazil, pecan, macadamia and walnut) consumed in Southern Africa. *Journal of Environmental Science and Health*, v. 42, p. 585 – 591, 2007.

MULLER, C.H.; FIGUEREDO, F.J.C.; KATO, A.K.; CARVALHO, J.E.U.; STEIN, R.L.B.; SILVA, A. *A cultura da castanha-do-Brasil*. EMBRAPA, Brasília, 1995, 65 p.

NGUEFACK, J. LEKAGNE, JB. DONGMO, C.D. DAKOLE, V. LETH, H.F. VISMER, J. TORP, E.F.N. GUEMDJOM, M. MBEFFO, O. TAMGUE, D. FOTIO, P.H. AMVAM ZOLLO, A.E. NKENGFACK. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, v.131, n. 2–3, p.151-156, 2009.

NGUEFACK. J.; LETH, V.; AMVAM ZOLLO, P.H.; MATHUR, S.B. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin. *International Journal of Food Microbiology*, v.94. n3, p. 329-334, 2004.

OLAWORE, N. O., USMAN, L. A., OGUNWANDE, I. A., ADELEKE, K. A. Constituents of Rhizome Essential Oils of Two Types of *Cyperus articulatus* L. Grown in Nigeria. *Journal of Essential Oils Research*, v. 18, p. 604 – 606, 2006.

OLIVEIRA, O.R.; TERAQ, D.; CARVALHO, A.C.P.P.; INNECCO, R.; ALBUQUERQUE, C.C de A. Effect of essential oil from genus *Lippia* plants over the control of fungi contaminants on the micro propagation of plants. *Revista Ciência e Agronomia*, v. 39, n. 01, p. 94-100, Jan.- Mar., 2008.

OLIVEIRA JUNIOR L.F.G.; SANTOS, R.B.; REIS, F.O.; MATSUMOTO, S.T.; BISPO, W.M.S.; MACHADO, L.P.; OLIVEIRA, L.F.M. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 15, n. 1, p. 150 – 157, 2013.

OLSEN M., JOHNSON P., MÖLLER T., PALADINO R., LINDBLAD M. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? *World Mycotoxin Journal*, v. 1, n. 2, p. 123 – 126, 2008.

PACHECO, A. M., LUCAS, A., PARENTE, R., PACHECO, N. Association between aflatoxina and aflatoxigenic fungi in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.30, n.2, p. 330 – 334, 2010.

PACHECO A.M.; SCUSSEL V.M. *Castanha-do-Brasil – Da floresta tropical ao consumidor*. Florianópolis: Editograf, 2006. 176p.

PACHECO, A. M., SCUSSEL, V. M. Selenium and aflatoxina levels in raw Brazil nuts from the Amazon basin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 26, p. 11087 – 11092, 2007.

PARANAGAMA, P.A.; ABEYSEKERA, K.H.T.; ABEYWICKRAMA, K.; NUGALIYADD, L. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology*, v. 37, p. 86–90, 2003.

PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; COELHO, R. G.; COUTINHO, I. D.; HONDA, N. K.; CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; LEITE, S. R. A.; SATO, D. N. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). *Química nova*, v. 32, p. 1222-1226, 2009.

PAWAR, V.C., THAKER V.S. In vitro efficacy of oils against *Aspergillus niger*. *Mycosis*, v. 49, n. 4, p. 316-323, 2006.

PENNACCHIO, H.L. Castanha do Brasil proposta de preço mínimo safra 2006/2007. *Rev. Conab*, v. 1, p. 124 – 127, 2007.

PEREIRA, M. C., VILELA, G. R., COSTA, L. M., A., S., SILVA, R. F., FERNANDES, A. F., FONSECA, E. W., N., PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. *Ciências Agrotec.*, v. 30, n. 4, p. 731 – 738, 2006.

PILDAIN, M. B.; FRISVAD, J. C.; VAAMONDE, G.; CABRAL, D.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, p. 725 – 735, 2008.

PIMENTEL, F.A.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; GUIMARÃES, L.G.L.; SILVA, D.M. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excels*). *Acta Amazônica*, v. 40, p. 213-220, 2010.

PITT, J.I.; A.D. HOCKING. *Fungi and Food Spoilage*. Springer. 3ª Edição, 2009, 471p.

PITT, J. I., GLENN, D. R., HOCKING, A. D. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 54, p. 109 – 114, 1983.

PRASHAR, A., LOCKE I.C., EVANS C.S. Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cells. *Cell Prolif.*, v.39, p. 241-248, 2006.

RAHIMIFARD, N., SABZEVARI, O., SHOEIBI, S., PAKZAD, S. R., AJDARY, S., HAJIMEHDIPOOR, H., BAGHERI, F., SAFAEE, M. Antifungal activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* on *Candida albicans*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. *Biomedical & Pharmacology Journal*, v. 1, n. 1, p. 43 – 46, 2008

RASOOLI, I., REZAEI, M. B., ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control*, v. 17, p. 359 – 364, 2006.

REIS, T. A., OLIVEIRA, T. D., BAQUIÃO, A. C., GONÇALVES, S. S., ZORZETE, P., CORREA, B. Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. *International Journal of Food Microbiology*, v. 159, p. 61 – 68, 2012.

SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J.C.; ANDERSEN, B., *Food and Indoor Fungi*. Utrecht, The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2010, 390p.

SAMSON, R.A; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? *Medical Mycology*, v.1, p.1-8, 2009.

SCHUCK V. J. A.; FRATINI, M. RAUBER, C. S.; HENRIQUES, A.; SCHAPOVA E. E. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 37, n. 1, 2001.

SESSOU, P., FAROUGOU, S., AHOUNOU, S., HOUNNANKPON, Y., AZKPOTA, P., YOUSAO, I., SOHOUNHOLOUE, D. Comparative study of antifungal activities of six selected essential oils against fungal isolates from cheese wagashi in Benin. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, p. 1 – 7, 2013.

SHAN, B., CAI, Y., BROOKS, J. D., CORKE, H. Antibacterial properties and major bioactive components of Cinnamon Stick (*Cinnamomum burmannii*): Activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 5484 – 5490, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 6 Ed., Porto Alegre: UFRGS, 2007.

SINGH, G., KAPOOR, I. P. S., SINGH, P., HELUANI, C. S., LAMPASONA, M. P., CATALAN, C. A. N. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 3295 – 3302, 2008.

SOARES, L. *Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de Lippia alba (miller) n. E. Brown ex britt. & wils. (falsa-melissa) verbenaceae* (dissertação) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brasil, 189 p., 2001.

SOUZA, J.M.L., CARTAXO, C.B.C., LEITE, F.M.N., SOUZA, L.M. Manual de Segurança e qualidade para a cultura da castanha do Brasil. Disponível em: < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Manual+castanha_000g2hia5yh02wx5ok0ghx3a9j5yyj4v.pdf> Acesso em: 05 de ago, 2013.

SOUZA, M. L., MENEZES, H. C. Processamento de amêndoa e torta de castanha do Brasil e farinha de mandioca: Parâmetros de qualidade. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 1, p. 120 – 128, 2004.

SOYLU, E.M.; KURT, S.; SOYLU, S. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 143, p. 183-189, 2010.

TAVARES F.F.; FISCHER T.B.; TONETTE R. *Agregação de valor na castanha do Brasil: o caso da Natura Ekos*. Núcleo de estudos do agronegócio, ESPM – SP, 2010.

THANABORIPAT D., SUVATHI Y., SRILOHASIN P., SRIPAKDEE S., PATTHANAWANITCHAI O., CHAROENSETTASILP S. Inhibitory effect of essential oils on the growth of *aspergillus flavus*. *Kmitl Science Technology Journal*, v. 7, n. 1, p. 1 – 7, 2007.

TIAN J., HUANG B., LUO X., ZENG H., BAN X., HE J., WANG Y. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. *Food Chemistry*, v. 130, p. 520 – 527, 2012.

TONINI E.; KAMINSKI P.M.; COSTA P.; SCHWNGBER L.A.M. Estrutura populacional e produção de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* Bompl.) e Andiroba (*Carapa* sp.) no sul do Estado de Rorâima. Anais do 1º Seminário do Projeto Kamukaia - *Manejo sustentável de produtos florestais não madeireiros na Amazônia*. EMBRAPA Acre, 2008.

TULLIO, V.; NOSTRO, A.; MANDRAS, N.; DUGO, P.; BANCHE, G.; CANNATELLI, M.A.; CUFFINI, A.M.; ALONZO, V. et al. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, p. 1544–1550, 2007.

VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology*, v.69, p. 57–80, 2011.

VELLUTI, A., MARÍN, S., GONZALEZ, P., RAMOS, A. J., SANCHIS, V. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. *Food Microbiology*, v. 21, p. 649 – 656, 2004.

VIEGAS, E. C. *Emprego de Óleos Essenciais de Plantas Medicinais no Controle de Aspergillus spp. em Sementes de Amendoim (Arachis hypogaea L.)*. Tese (Doutorado em Ciência em Fitotecnia). Seropédica, RJ. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2004, 89p.

VIEGAS, E. C., SOARES, A., CARMO, M. G. F., ROSSETTO, C. A. V. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.23, n.4, p.915-919, 2005.

VILELA, G.R. *Efeito do óleo essencial de Eucalyptus globulus sobre espécies produtoras de aflatoxinas*. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos). Piracicaba, SP. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007, 65p.

WANG, S.H.; CHEN, P.F.; CHANG, S.T. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 813-818, 2005.

YAMAMOTO – RIBEIRO, M. M. G., GRESPAN, R., KOHIYAMA, C. Y., FERREIRA, F. D., MOSSINI, S. A. G., SILVA, E. L., FILHO, B. A. A., MIKCHA, J. M. G., JUNIOR, M. M. Effect of *Zingiber officinale* essential oil on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. *Food Chemistry*, v. 141, p. 3147 – 3152, 2013.

YASSIN, N. A. Z., ELROKH, E. M., EL-SHENAWY, S. M. A., IBRAHIM, B. M. M. The study of the antispasmodic effect of Ginger (*Zingiber officinale*) in vitro. *Der Pharmacia Lettre*, v. 4, n. 1, p. 263 – 274, 2012.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; OLIVEIRA, J. et al. Yield and chemical composition of the essential oil of the stems and rhizomes of *Cyperus articulatus* L. cultivated in the state of Pará, Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 2006.