



ALESSANDRA MARCON GASPERINI

**EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O CRESCIMENTO E
PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS POR *Aspergillus flavus***

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ALESSANDRA MARCON GASPERINI

**EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O CRESCIMENTO E
PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS POR *Aspergillus flavus***

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marta Cristina Teixeira Duarte

Este exemplar corresponde a versão final da dissertação defendida pela aluna Alessandra Marcon Gasperini e orientada pela Prof.^a Dr.^a Marta Cristina Teixeira Duarte.

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Helena Joana Flipsen - CRB 8/5283

G214e Gasperini, Alessandra Marcon, 1990-
Efeito de óleos essenciais sobre o crescimento e produção de aflatoxinas por
Aspergillus flavus / Alessandra Marcon Gasperini. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Aflatoxina. 2. Óleos essenciais. 3. Antifúngicos. 4. *Aspergillus flavus*. 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: Effect of essential oils on the growth and aflatoxin production by
Aspergillus flavus

Palavras-chave em inglês:

Aflatoxins

Essential oils

Antifungal

Aspergillus flavus

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Marta Cristina Teixeira Duarte [Orientador]

Beatriz Thie Iamanaka

Nadia Regina Rodrigues

Data de defesa: 26-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Campinas, 26 de agosto de 2014

BANCA EXAMINADORA

Dr.^a MARTA CRISTINA TEIXEIRA DUARTE

TITULAR

Dr.^a BEATRIZ THIE IAMANAKA

TITULAR

Dr.^a NADIA REGINA RODRIGUES

TITULAR

Dr.^a GABRIELA ALVES DE MACEDO

SUPLENTE

Dr.^a SUZETE APARECIDA LANZA DESTÉFANO

SUPLENTE

RESUMO

O fungo *Aspergillus flavus* é responsável pela degradação de alimentos, além de produzir aflatoxinas que são reconhecidas como potentes carcinógenos. Atualmente, frente ao aumento acelerado de cepas resistentes aos antifúngicos sintéticos e à pressão dos consumidores pela substituição destes por produtos naturais, a busca de novos antimicrobianos a partir de óleos essenciais (OE) tem se tornado uma opção promissora. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de 13 OE, provenientes de plantas medicinais e aromáticas no controle do crescimento de *A. flavus* CCT 0614 e produção das aflatoxinas AFB1 e AFB2. Ensaio *in vitro* realizados pelo teste da microdiluição mostraram que os OE de *Cinamomum burmanii* (MIC 0,2 mg.mL⁻¹) e *Cymbopogon citratus*, *C. martinii*, *C. winterianus*, *Eugenia caryophyllata* e *T. vulgaris* (MIC 0,5 mg.mL⁻¹) apresentaram elevada ação anti – *A. flavus*. Em relação à produção de biomassa seca pelo fungo na presença dos OE, nas concentrações correspondentes a de mínima concentração inibitória (MIC) e 2xMIC, houve diminuição significativa em relação ao controle ($p > 0,05$). A avaliação do crescimento radial de *A. flavus* quando submetido à ação dos compostos voláteis (AV) do OE de *C. burmanii* a 0,2 mg.mL⁻¹ mostrou inibição total até 336 h. Por outro lado, os OE de *E. caryophyllata*, *T. vulgaris* e *C. citratus* reduziram o crescimento radial do fungo quando incorporados ao meio de cultura e quando submetidos a ação dos voláteis. Os OE mais ativos foram analisados através de CG-EM, que permitiu identificar nos óleos compostos conhecidos pela ação antimicrobiana. Em seguida, o OE de *C. citratus* foi selecionado para estudo dos efeitos sobre a produção de aflatoxinas por *A. flavus*, quantificada por CLAE-FL. Os resultados mostraram que o OE de *C. citratus* foi capaz de reduzir a produção de AFB1 em 95% quando incorporado ao meio a 0,5 mg.mL⁻¹, enquanto houve um aumento de cerca de 53% na produção da micotoxina a 0,25 mg.mL⁻¹, após o mesmo período. Não foi detectada a presença da AFB2. Os resultados deste trabalho indicam que os OE estudados representam uma alternativa promissora no controle do crescimento *A. flavus* e, o OE de *C. citratus* à produção de AFB1. A possibilidade de aplicação dos OE por AV é uma alternativa atrativa, pelo fato de não afetar as propriedades físicas e sensoriais do alimento.

Palavras chave: Aflatoxinas, óleos essenciais, antifúngicos, *Aspergillus flavus*.

ABSTRACT

The fungus *Aspergillus flavus* is responsible for damage in foods, and by aflatoxins production that are recognized as potent carcinogens. Currently, due to rapid increase of resistant strains to synthetics antifungal, and consumer pressure to replacing these synthetics compounds by natural products, the search for new antimicrobial from essential oils (EO) has become a promising option. This study aimed evaluate the capacity of 13 EO from medicinal and aromatic plants in the control of growth and aflatoxins B1 and B2 production by *A. flavus* CCT 0614. *In vitro* assays performed by microdilution method demonstrated that EO of *Cinnamomum burmanii* (MIC 0.2 mg.mL⁻¹) and *Cymbopogon citratus*, *C. martinii*, *C. winterianus*, *Eugenia caryophyllata* and *T. vulgaris* (MIC 0.5 mg.mL⁻¹) showed strong action anti - *A. flavus*. In relation to fungal biomass dry weight in the presence of OE in the concentrations corresponding to minimum inhibitory concentration (MIC) and 2xMIC, occurred a significant decrease compared to control ($p < 0.05$). The radial growth of *A. flavus* was inhibited totally until 336 h when submitted to the action of the volatile compounds (AV) of *C. burmanii* at 0.2 mg.mL⁻¹. In contrast, the OE of *E. caryophyllata*, *T. vulgaris* and *C. citratus* reduced the radial growth of the mould when were incorporated to medium (IP) and when used in AV. EO that showed higher action were analysed by CG-MS this allowed identify the compounds known by antimicrobial action. The EO of *C. citratus* was selected to evaluation of the effects on the aflatoxins production by *A. flavus*, which was quantified by HPLC-FL. The results showed that *C. citratus* EO (0.5 mg.mL⁻¹) was able to reduce 95% of AFB1 production, while the production increase about 53% with 0.25 mg.mL⁻¹ after the same period. The presence of AFB2 was not detected. The most active EO were identified by GC-MS, which show the presence of compounds with known antimicrobial activity. The results of this study indicate that the EO studied represent a promising alternative to control the growth and AFB1 production by *A. flavus*. The possibility of application of EO by AV is an attractive alternative, in view of the fact that it does not affect the physical and sensory properties of food.

Keywords: Aflatoxins, essential oils, antifungal, *Aspergillus flavus*.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo Geral	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Fungos em alimentos	4
3.1.1. Produção de micotoxinas	6
3.1.2. <i>Aspergillus flavus</i> e aflatoxinas.....	7
3.1.3. Amostragem e técnicas de identificação de aflatoxinas.....	10
3.1.4. Legislação para micotoxinas	13
3.1.5. Impactos econômicos	14
3.1.6. Estratégias para prevenção de micotoxinas.....	15
3.2. Óleos essenciais.....	16
3.2.1. Emprego de óleos essenciais como antifúngicos	17
3.2.2. Mecanismos de ação de óleos essenciais	19
3.2.3. Plantas selecionadas para o presente estudo.	20
3.2.3.1. <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>C. martinii</i> e <i>C. winterianus</i>	20
3.2.3.2. <i>Origanum vulgare</i>	21
3.2.3.3. <i>Aloysia gratissima</i>	21
3.2.3.4. <i>Cinnamomum burmannii</i>	22
3.2.3.5. <i>Cordia verbenacea</i>	22
3.2.3.6. <i>Cyperus articulatus</i>	23

3.2.3.7. <i>Lippia sidoides</i>	23
3.2.3.8. <i>Piper abutiloides</i>	24
3.2.3.9. <i>Thymus vulgaris</i>	24
3.2.3.10. <i>Vetiveria zizanoides</i>	24
3.2.3.11. <i>Eugenia caryophyllata</i>	25
3.2.4. Métodos para avaliar a atividade antifúngica de óleos essenciais	25
3.2.4.1. Métodos de difusão em ágar.....	25
3.2.4.2. Método de difusão em disco.....	26
3.2.4.3. Método de diluição em caldo	26
3.2.4.4. Fatores que afetam o resultado da atividade antifúngica	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Material vegetal	28
4.2. Manutenção e cultivo das espécies na CPMA.....	28
4.3. Extração dos óleos essenciais.....	28
4.4. Equipamentos e vidraria.....	29
4.5. Reagentes, soluções e outros materiais	30
4.6. Meios de cultura	30
4.6.1. Meio para determinação da atividade antifúngica	30
4.6.2. Meio para manutenção, crescimento e indução à esporulação.	31
4.6.3. Meio para avaliação da produção de aflatoxinas	31
4.7. Fracionamentos dos OE de maior atividade antifúngica.....	31
4.8. Análise química dos OE e frações por Cromatografia a Gás (CG).....	32
4.9. Determinação da Atividade Antifúngica	32
4.9.1. Micro-organismo.....	32

4.9.2. Preparo dos OE para os testes de atividade antifúngica.....	32
4.9.3. Preparo e padronização de inóculo fúngico	33
4.9.4. Determinação da Concentração mínima inibitória dos OE e frações... ..	33
4.9.5. Determinação da Concentração mínima inibitória dos OE combinados	34
4.9.6. Determinação da Concentração mínima fungicida dos OE e frações	34
4.9.7. Produção de biomassa na presença dos OE	35
4.9.8. Efeito do OE de maior atividade sobre o crescimento fúngico em meio sólido.....	35
4.9.8.1. Ensaio com OE incorporado no meio de cultura (IP).....	35
4.9.8.2. Ensaio com OE aplicado no papel filtro – ação dos voláteis (AV)	36
4.10. Efeito do OE de <i>C. citratus</i> sobre a produção de aflatoxinas por <i>A. flavus</i>	37
4.11. Metodologia analítica para quantificação das aflatoxinas	38
4.11.1. Verificação do método.....	38
4.11.2. Extração	38
4.11.3. Reação de derivatização	38
4.11.4. Quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	39
4.12. Análise estatística.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Atividade anti- <i>A. flavus</i> dos OE	40
5.2. Determinação da Concentração mínima inibitoria dos OE combinados.....	42
5.3. Determinação da atividade antifúngica da fração dos OE.....	42
5.4. Produção de biomassa na presença dos OE.....	44
5.5. Efeito do OE de maior atividade sobre o crescimento em meio sólido.....	44
5.6. Efeito do OE de <i>C. citratus</i> na produção de aflatoxinas por <i>A. flavus</i>	48

5.7. Análise química dos óleos e frações por Cromatografia a Gás (CG-EM)	53
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS	61
ANEXOS	79

*“Todos temos máquinas do tempo: as que nos levam
ao passado são as lembranças e as que nos fazem
seguir em frente são os sonhos ”*

H. G. Wells

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a minha família que mesmo distante sempre será essencial e importante. Aos meus pais, Nelson e Idilema Gasperini, que são meus exemplos de superação, honestidade e força, que sempre me apoiaram, incentivaram e ensinaram os maiores valores da vida. À minha irmã Andressa por sempre acreditar em mim, pelo incentivo e pela força dada para superar a distância que nos separa. Ao meu namorado Silvino Rodrigues por estar sempre ao meu lado com apoio incondicional para alcançar meus objetivos.

À Prof. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte, pela orientação, oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela confiança em meu trabalho, ensinamentos e por todo o incentivo durante minha permanência da Divisão de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA).

Aos pesquisadores do CPQBA que colaboraram na realização deste trabalho, em especial à Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder e Dr. Adilson Sartoratto da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica, Dra. Nadia R. Rodrigues da Divisão de Química Analítica, Dra. Glyn Mara Figueira e Benício Pereira da Divisão de Agrotecnologia.

A todos os técnicos, funcionários e estagiários do CPQBA, em especial da Divisão de Microbiologia, Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica, Divisão de Química Analítica e da Divisão de Agrotecnologia que sempre auxiliaram e me ensinaram muito.

Ao programa de pós graduação de Ciência em alimentos da Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade de ingresso no curso.

À Comissão de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida.

Aos amigos Caroline Breda, Flávia Pinho, Patrícia Reffatti, Camila Possari, Laura Matsumura, Tássia Pessato, Meíssa Essenfelder e Gustavo de Almeida pela companhia, troca de conhecimento, pelo apoio e inúmeros momentos de alegria compartilhados durante o mestrado. E também ao meu velho amigo Michel Kanemanu que sempre me apoia e muitas vezes me ajudou a achar a solução para problemas.

Enfim, a todas as pessoas que participaram, contribuindo para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente, os meus agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula química estrutural das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.	9
Figura 2. Método de aplicação do OE pela ação dos voláteis (AV).....	36
Figura 3. Direções perpendiculares utilizadas para medidas do raio de crescimento da colônia fúngica nos testes IP e AV.	36
Figura 4. Produção de biomassa por <i>A. flavus</i> CCT 0614 após 96h na presença dos OE de maior atividade antifúngica.	45
Figura 5. Ensaio de aplicação de OE de <i>C. citratus</i> na concentração de MIC e ½ MIC através da ação dos voláteis (AV).	52
Figura 6. Ensaio de aplicação do OE de <i>C. citratus</i> na concentração de MIC e ½ MIC incorporado ao meio de cultura (IP).	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais micotoxinas, fungos produtores e produtos afetados.....	7
Tabela 2. Limites para a presença de micotoxinas em alimentos, de acordo com a RDC 07/2011 da ANVISA.	14
Tabela 3. Espécies medicinais da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do CPQBA/UNICAMP utilizadas no presente estudo.	29
Tabela 4. Concentração mínima inibitória (MIC) e concentração fungicida mínima (MFC) dos OE frente a <i>A. flavus</i>	41
Tabela 5. Rendimento em OE das plantas medicinais e aromáticas de maior atividade anti- <i>A.flavus</i>	41
Tabela 6. MIC (mg.mL ⁻¹) da mistura 1:1 dos OE de maior atividade, frente <i>A. flavus</i>	43
Tabela 7. Rendimento (%), MIC e MFC (mg.mL ⁻¹) das frações 1 e 2 dos OE de maior atividade contra <i>A. flavus</i>	44
Tabela 8. Taxa média de crescimento e tempo médio de fase <i>lag</i> de <i>A. flavus</i> em meio sólido, na presença de OE em teste incorporado (IP) e por ação dos voláteis (AV).	46
Tabela 9. Efeito da aplicação do OE de <i>C. citratus</i> sobre a produção de aflatoxinas AFB1 e AFB2 por <i>A. flavus</i>	51
Tabela 10. Valores de recuperação para níveis de fortificação com AFB1 e AFB2.....	51
Tabela 11. Composição química do OE bruto e frações de <i>C. burmanii</i>	55
Tabela 12. Composição química do OE bruto e frações de <i>E. caryophyllata</i>	55
Tabela 13. Composição química do OE bruto e frações de <i>T. vulgaris</i>	56
Tabela 14. Composição química do OE bruto e frações de <i>C. martinii</i>	56
Tabela 15. Composição química do OE bruto e frações de <i>C. winterianus</i>	57
Tabela 16. Composição química do OE bruto e frações de <i>C. citratus</i>	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association Of Analytical Communities</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia a Gás
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPMA	Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre penta hidratado
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de Massas
FAO	<i>Food Agricultural Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FeSO_4	Sulfato ferroso
FL	Fluorescência
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
K_2HPO_4	Fosfato de potássio dibásico
KCl	Cloreto e potássio
LMT	limites máximos tolerados
MgSO_4	Sulfato de magnésio
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnésio hepta hidratado
NaNO_3	Nitrato de sódio
OE	Óleo essencial/ óleos essenciais
OMS	Organização Mundial da Saúde
TFA	Ácido Trifluoracético
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de zinco hepta hidratado

INTRODUÇÃO

A contaminação por bactérias e fungos causa a perda de toneladas de alimentos todos os anos, sendo um fator de importância crucial na sua conservação. Entre os principais impactos causados pelo crescimento de fungos filamentosos estão a descoloração, redução no valor comercial (PARDO et al., 2005), diminuição no poder germinativo em sementes, perda de matéria seca, aquecimento, odor desagradável, alterações químicas e nutricionais (HERMANN et al., 2006).

Durante a multiplicação de fungos em alimentos e bebidas, além das alterações físicas visíveis, muitas espécies são capazes de produzir substâncias voláteis que afetam a qualidade sensorial, e metabólitos secundários tóxicos, conhecidos como micotoxinas. Cerca de 100 mil fungos filamentosos já foram identificados (TUNLID; TALBOT, 2002) mas somente um número relativamente pequeno apresenta a capacidade de produzir micotoxinas (D'MELLO; MACDONALD, 1997).

Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são considerados os mais importantes dentre os produtores de micotoxinas (NUNES et al., 2003), sendo as mais conhecidas e estudadas a ocratoxina A, tricotecenos (DON, T-2, DAS), zearalenona, fumonisina, moniliformina, toxina PR, patulina, e aflatoxinas. Dentre estas, merecem destaque as aflatoxinas produzidas pelo gênero *Aspergillus*, sendo de maior ocorrência em cepas das espécies *A. flavus* Link ex Fries e *A. parasiticus* Speare do que em *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. pseudotamarii* e *A. niger* (KLICH et al., 2000).

Dentre os cerca de 18 análogos de aflatoxina conhecidos, os mais tóxicos são o B1, B2, G1 e G2. Todas as aflatoxinas têm efeito carcinogênico (PITT, 2004), teratogênico, mutagênico e imunossupressor. A *International Agency for Research on Cancer* classifica a aflatoxina B1 como pertencente ao grupo 1, altamente carcinogênica para humanos, sendo metabolizada pelo fígado com efeito hepatotóxico e cumulativo (IARC, 2002)

Atualmente, o crescimento de fungos em alimentos é controlado pelo uso de compostos químicos sintéticos, que tem restringido devido aos possíveis efeitos maléficos à saúde e à resistência microbiana aos produtos conhecidos (TRIPATHY;

DUBEY, 2004), havendo a necessidade da descoberta de novas alternativas seguras ao homem, animais e ao ambiente. Neste contexto, os óleos essenciais têm sido propostos como agentes antimicrobianos alternativos às drogas sintéticas, uma vez que apresentam atividade comprovada no controle de fitopatógenos, devido à sua ação antifúngica (KOTZEKIDOU et al., 2008; BANG, 2007). De fato, os óleos essenciais são misturas complexas de compostos químicos aromáticos voláteis, produzidos por plantas a partir do metabolismo secundário, justamente em resposta ao estresse e ao ataque de patógenos (BUCHBAUER, 2010). Do mesmo modo, muitos óleos essenciais têm demonstrado também ampla ação inibitória *in vitro* contra leveduras e bolores de importância na etapa pós-colheita de alimentos. São reportados na literatura científica efeitos fisiológicos *in vitro* e *in vivo* contra *A. flavus* e *A. parasiticus*, que confirmam o efeito inibidor dos óleos essenciais sobre a biossíntese de aflatoxinas (SOLIMAN; BADEA, 2002; NGUEFACK et al., 2004; KUMAR et al., 2008; RAZZAGHI-ABYANEH et al., 2009).

Embora a atividade antimicrobiana de óleos essenciais tenha sido comprovada cientificamente somente nas últimas décadas, as propriedades antisséptica, bactericida, virucida e fungicida são conhecidas desde a antiguidade (ADORJABAM; BUCHEBAUER, 2010).

Diante da crescente busca por maior qualidade e segurança dos alimentos, grande esforço tem sido dirigido para a redução do uso de substâncias químicas utilizadas no cultivo, pós-colheita e armazenagem, além da necessidade de se melhorar a estabilidade na estocagem e reduzir a contaminação por micotoxinas, especialmente aflatoxinas. Desta forma, este trabalho visa encontrar, no emprego de óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas, uma forma de reduzir a produção de aflatoxinas por cepas de *A. flavus*, como alternativa natural ao uso de fungicidas químicos convencionais, empregados no cultivo e na estocagem de alimentos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação de óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas sobre o crescimento de *Aspergillus flavus* CCT 0614 e produção de aflatoxinas.

2.2. Objetivos Específicos

- Obter os óleos essenciais das plantas *Aloysia gratissima*, *Cinnamomum burmani*, *Cordia verbenaceae*, *Cyperus articulatus*, *Cymbopogon citratus*, *C. martinii*, *C. winterianus*, *Eugenia caryophyllata*, *Lippia sidoides*, *Piper abutiloides*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e *Vetiveria zizanoides*.
- Determinar a concentração mínima inibitória (MIC) e concentração fungicida mínima (MFC) dos óleos essenciais para inibição de *A. flavus*, quando utilizados isoladamente ou em mistura;
- Fracionar os óleos essenciais de maior atividade e determinar a concentração mínima inibitória (MIC) e concentração fungicida mínima (MFC) das frações;
- Analisar quimicamente os óleos essenciais de maior atividade e suas frações.
- Avaliar o efeito dos óleos essenciais de maior atividade sobre o crescimento fúngico radial, produção de biomassa e produção de aflatoxinas *in vitro* por *A. flavus*;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Fungos em alimentos

Os fungos compreendem um grupo de micro-organismos diversificado e abundante na natureza. Possuem estruturas unicelulares ou multicelulares, sendo classificados de acordo com sua morfologia em filamentosos (bolors) e leveduriformes (PRADO, 2007). São seres eucarióticos, isto é, apresentam uma membrana nuclear que envolve os cromossomos e o nucléolo. Classificam-se como seres heterotróficos por não possuírem pigmentos fotossintéticos (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Os bolors possuem uma estrutura básica formada por filamentos denominados hifas, que em conjunto formam o micélio. As hifas podem ser divididas em septadas, onde as células se intercomunicam através de poros, ou não septadas, onde os núcleos celulares encontram-se dispersos ao longo de toda hifa (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

Os fungos filamentosos são organismos amplamente distribuídos na natureza (MAGAN et al., 2003) e, os seus esporos podem ser encontrados na atmosfera, mesmo em altas altitudes e podem ser disseminados pelo vento e correntes de ar, como também podem ser transmitidos por insetos, roedores e outros animais (JEFF-AGBOOLA et al., 2012).

Na indústria de alimentos, há muitos anos utilizam-se fungos para a produção de produtos fermentados como cervejas, vinhos e pães, e na indústria farmacêutica para obtenção de compostos ativos como penicilina, estatinas e ciclosporinas (PITT; HOCKING, 2009; KELLER et al., 2005). Por outro lado, Lakićević et al. (2011) relataram que o ataque fúngico aos alimentos, de maneira não controlada ou negativa acarreta em deterioração. Responsáveis por vários graus de deterioração e decomposição dos alimentos, os fungos podem invadir e crescer em qualquer tipo de alimento, a qualquer momento. Invadem culturas tanto no campo antes da colheita, como durante o armazenamento.

Gislason (2011) citou que a capacidade dos fungos em atacar diversos alimentos deve-se em grande parte, à sua relativa versatilidade quanto às exigências ambientais. Embora a maioria das espécies de fungos seja aeróbia obrigatória, com requisito de pH variando de 2 a 9 e faixa de temperatura de 10 a 35 °C, algumas são capazes de crescer

abaixo ou acima desses intervalos (TOURNAS et al., 1998). Jay (2005) descreveu que os requisitos de umidade dos fungos de origem alimentar são relativamente baixos, a maioria das espécies pode crescer a uma atividade de água (a_w) de 0,85 ou menos, embora leveduras geralmente exijam uma maior atividade de água.

Os alimentos possuem muitas substâncias orgânicas que apresentam nutrientes essenciais adequados para o crescimento fúngico (KAWASHIMA; VALENTE, 2006). Gonzalez et al. (2008) afirmaram que a quantidade e o tipo de micro-organismos encontrado nos alimentos dependem da resistência de cada alimento, assim como das condições de seu armazenamento. Ainda, conforme Caldas et al. (2002), essa contaminação pode acontecer no campo, antes ou após a colheita, e durante o transporte e o armazenamento do produto.

Ao invadir o alimento, Jeff-Agboola et.al. (2012) indicaram que os fungos podem produzir um grande número de enzimas durante seu crescimento, como lipases, proteases, carboidrases, que provocam um elevado grau de deterioração. No interior do alimento, anteriormente Filtenborg et al. (1996) descreveram que as enzimas podem continuar suas atividades independentemente da destruição ou remoção do micélio fúngico. Dentre os principais impactos causados pela contaminação fúngica, Pardo et al. (2005) relataram a descoloração, redução no valor comercial, diminuição no poder germinativo, perda de matéria seca, aquecimento. Nguefack et al., (2009) citaram também odor desagradável devido a produção de metabólitos voláteis e mudanças químicas e nutricionais foram observadas por Hermanns et al. (2006). Além disso, muitas espécies de fungos são capazes de produzir substâncias voláteis durante o processo de crescimento e multiplicação, que além de afetarem a qualidade sensorial de alimentos e bebidas, são metabólitos tóxicos para animais e humanos (LEONI et al., 2001; BATTILANI et al, 2006). A descoberta destes metabólitos, denominados micotoxinas e sua presença em alimentos tornou-se um problema de saúde pública e tem impulsionado um grande número de pesquisas nesta área (PITT; HOCKING, 2009).

3.1.1. Produção de micotoxinas

O conhecimento da toxicidade de alguns fungos data de muitos séculos. Entretanto, somente na década de 1850, quando a ingestão de centeio infectado pelo fungo *Claviceps purpurea* foi relacionada com as características clínicas do ergotismo, a possibilidade de haver risco à saúde humana e animal pela ingestão de metabólitos tóxicos produzidos por fungos foi levantada (SANTURIO, 2000).

A história das micotoxinas teve início em 1960, após um surto de mortes inexplicáveis de perus no Reino Unido. O surto ficou mundialmente conhecido como '*turkey X disease*' e foi relacionado com a ração ministrada às aves, à base de amendoins importados da África e do Brasil, (LANCASTER et al., 1961; LOURENÇO, 2006; FOOD and INGREDIENTS BRASIL, 2009). Foi verificado que o amendoim da ração estava contaminado com uma substância fluorescente produzida por fungo do gênero *Aspergillus* (LANCASTER et al., 1961). A partir de então, inúmeras pesquisas têm sido realizadas a fim de se investigar a produção e os efeitos das diversas micotoxinas produzidas por fungos filamentosos em alimentos.

Micotoxinas são definidas como metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos (BENNET; KLICH, 2003; JAY, 2005) e podem ocorrer em diversas culturas, como cereais, castanhas, café, cacau, frutas secas e muitos outros produtos (SCUDAMORE; BANKS, 2004). Além da alta toxicidade, algumas micotoxinas são correlacionadas com incidência de alguns tipos de câncer, características essas que as tornam mais relevante aos aspectos globais de segurança alimentar humana e animal (MOHAMADI SANI et al., 2010; MASHA, 2010).

Durante o desenvolvimento dos micro-organismos, os metabólitos primários são essenciais para o desenvolvimento e, os secundários são formados durante o final da fase exponencial de crescimento e não possuem significância aparente, conforme exposto por Jay (2005). Freire et al. (2007) descreveram que em geral, esses metabólitos secundários parecem ser formados quando grandes quantidades de precursores de metabólitos primários, tais como aminoácidos, acetato, piruvato e outros são acumulados. Ainda, de

acordo com Jay (2005), a síntese de micotoxinas representa uma maneira dos fungos reduzirem a quantidade de precursores, os quais não são requeridos para o metabolismo.

Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são considerados os mais importantes produtores de micotoxinas (NUNES et al., 2003). As principais toxinas produzidas por espécies desses gêneros estão listadas na Tabela 1. De acordo com Granada et al. (2003), as aflatoxinas produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, destacam-se por serem altamente tóxicas e carcinogênicas para homens e animais, tornando-se assim, um fator preocupante para a indústria alimentícia.

Tabela 1. Principais micotoxinas, fungos produtores e produtos afetados (FONSECA, 2003)

Micotoxina	Fungos Produtores	Produtos afetados
Aflatoxina	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	Milho, amendoim e outros
Ocratoxina A	<i>A. ochraceus</i> <i>A. nigri</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	Trigo, cevada, milho, aveia, outros
Tricotecenos (DON, T-2, DAS)	<i>Fusarium graminearum</i> <i>F. culmorum</i>	Milha, trigo, cevada.
Zearalenona	<i>F. graminearum</i>	Milho, trigo, cevada, gramíneas.
Fumonisina	<i>F. verticillioides</i> <i>F. proliferatum</i>	Milho
Moniliformina	<i>F. moniliforme</i>	Milho
Toxina PR, patulina	<i>P. roqueforti</i>	Silagem de feno, gramíneas.

3.1.2. *Aspergillus flavus* e aflatoxinas

Dobson (2011) relatou que no gênero *Aspergillus* estão incluídas mais de 100 espécies reconhecidas, a maioria das quais crescem bem em meios sintéticos ou semissintéticos comuns, sendo que cerca de 50 espécies demonstram a produção de metabólitos tóxicos, as aflatoxinas. Aflatoxina é um termo coletivo dado para um grupo de toxinas liberadas por algumas cepas de *A. flavus* (YU et al., 2004; GIBRIEL et al., 2011) e *A. parasiticus*, durante seu crescimento em substrato favorável à sua produção (PITT, 2004;

VIEGAS; ROSSETO, 2006). *A. flavus* e *A. parasiticus* são distribuídos em todo o mundo, com tendência a serem mais comuns em países com climas tropicais que têm faixas extremas de pluviosidade, temperatura e umidade. (YU et al., 2004; GIBRIEL et al., 2011).

Aspergillus flavus pode ser facilmente distinguido de outras espécies de *Aspergillus* por não crescer a 5 °C, crescer rapidamente de 25 a 37 °C e também pela formação de conídios de coloração amarelo-esverdeada brilhante quando cultivado em ágar extrato de malte (MEA) ou ágar Czapek extrato de levedura (CYA) conforme estudado por Dobson (2011). Colônias de crescimento em CYA podem variar de crescimento rápido, atingindo cerca de 60 a 70 mm de diâmetro, a crescimento lento, de 30-40 mm de diâmetro, à temperatura ambiente (24-26 °C) em 10 dias de acordo com Pitt e Hocking (2009). Esta espécie é xerofílica, capaz de crescer em atividade de água mínima (a_w) de 0,78 com crescimento ótimo em 0,99. Pitt e Hocking (2009) relataram ainda, que o crescimento em diferentes valores de a_w exige uma temperatura específica: 0,78 em 33 °C, 0,82 em 25 °C, 0,81 em 30 °C e 0,80 em 37 °C. Os conídios germinam em a_w de 0,75 a 29 °C, mas não crescem, enquanto que em a_w inferior a 0,75 os conídios permanecem latentes, mas viáveis.

Embora os níveis ótimos de pH variem com a espécie de fungo, o crescimento de *A. flavus* não é afetado por mudanças de pH, podendo crescer em uma ampla faixa de pH 2,1 a pH 11,2, embora o crescimento seja mais lento em pH<3,5 (PITT; HOCKING, 2009; DOBSON, 2011).

Dobson (2011) descreveu que as temperaturas de crescimento de *A. flavus* são variáveis, ocorrendo crescimento em baixas (10-12 °C) e em altas (50-55 °C) temperaturas, com ótimo em aproximadamente 33 °C. Em condições de estocagem, a temperatura mínima de crescimento do fungo é entre 0 e 5 °C, com ótimo crescimento entre 25 e 30 °C. Com relação à produção de aflatoxina, *A. flavus* produz facilmente a 25 °C e dificilmente a 10 °C. Ainda de acordo com Dobson (2011), os membros do grupo *A. flavus* são amplamente distribuídas na natureza e têm sido rotineiramente isolados do solo, principalmente em áreas tropicais e subtropicais, de forragem e vegetação em decomposição.

Dobson, (2011) citou também que *A. flavus* possui a capacidade de infectar culturas de milho, amendoim e sementes de algodão ainda no campo, enquanto que em outros tipos

de culturas agrícolas invade as sementes pós-colheita, demonstrando características de fungo de armazenamento. Devido aos problemas potenciais associados com a produção de aflatoxina, a presença de *A. flavus* é monitorada em diferentes matrizes alimentares. O ataque desse fungo pode ocasionar a descoloração dos grãos, mudar características químicas e nutricionais, reduzir a germinação e contaminá-los com aflatoxinas, as quais são altamente tóxicas (KABAK; DOBSON; VAR, 2006).

De acordo Pitt e Hocking (2009), *A. flavus* produz somente aflatoxinas B1 e B2, alguns isolados não produzem aflatoxinas, e outros produzem também ácido ciclopiazônico (CPA). *A. parasiticus* e *A. nomius* são produtores das quatro aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), mas não produzem CPA. Cepas de *A. parasiticus* produzem mais aflatoxinas do que de *A. flavus*, no entanto são encontrados com menor frequência na natureza.

Todas as formas de aflatoxinas (Figura 1) são compostos heterocíclicos altamente oxigenados e têm um núcleo de cumarina fundido com bifurano e contém um anel 36 pentenona ou uma lactona (VIEGAS, 2004), tendo como precursor a esterigmatocistina (JAY, 2005). Aflatoxinas são produzidos através de uma via de biossíntese incluindo esterigmatocistina (AFB1, AFG1) ou dihidrosterigmatocistina (AFB2, AFG2) como precursor imediato, de acordo com Jay (2005).

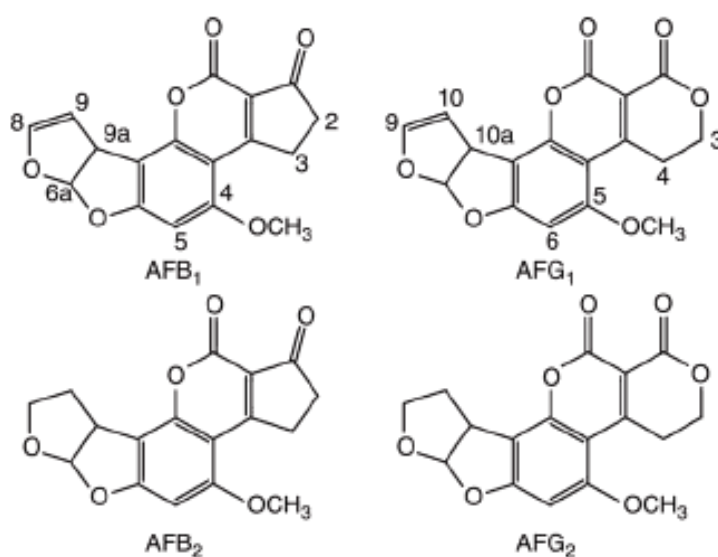


Figura 1. Fórmula química estrutural das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (TABATA, 2011).

As duas principais formas de aflatoxinas, B e G (blue e green), caracterizadas e visualizadas pela cor da sua fluorescência em UVp (ultravioleta próximo 360 nm) e são subclassificadas como B1, B2, G1 e G2, de acordo com a cor e sequência da localização no cromatograma de camada delgada (VIEGAS; ROSSETTO, 2006).

As aflatoxinas estão classificadas entre os mais tóxicos compostos naturais, de ocorrência comum (DHINGRA; COELHO NETTO, 1998). Todas as aflatoxinas têm efeito carcinogênico, teratogênico, mutagênico e imunossupressor de acordo com Pitt (2004). A pequena diferença estrutural causa a grande diferença na toxidez de cada uma, sendo aflatoxina B1 a mais tóxica e a mais comum de todas. As formas B1, G1 e G2 também são carcinogênicas, mas com menor potência (BENNETT; KLICH, 2003).

A frequência relativa da contaminação por aflatoxinas em humanos ainda é desconhecida, tem-se relato de casos esporádicos em animais. No noroeste da Índia, 397 pessoas foram afetadas e 108 pessoas morreram em 1974. A fonte da contaminação deste surto foi o milho contaminado com 0,25 a 15 mg. Kg⁻¹ de aflatoxina (FDA, 2012). Ngindu et al. (1982) relataram pela primeira vez um surto no Quênia, onde 20 pacientes foram hospitalizados com 60% de mortalidade, com dose diária de aflatoxina ingerida estimada em no mínimo 38 µg.Kg⁻¹ do peso corpóreo. Desde 2004 vários outros surtos de aflatoxicose foram documentados em regiões rurais do Quênia, resultando em cerca de 500 doenças agudas e 200 mortes associadas ao consumo de milho (AZZIZ-BAUMGARTNER et al. 2005; DANIEL et al. 2011).

Informações sobre surtos de aflatoxicose em humanos são escassas, devido, principalmente, à dificuldade de diagnóstico e associação. No Brasil não há dados sobre surtos ou casos por essas intoxicações por aflatoxinas e outras micotoxinas.

3.1.3. Amostragem e técnicas de identificação de aflatoxinas

A contaminação de produtos agrícolas com micotoxinas não está presente de maneira uniforme na mesma amostra ou lote (PIEADDE, 2002; WHITAKER; SLATE; JOHANSON, 2005). Assim, as amostras devem ser constituídas de várias pequenas porções tomadas de diferentes locais por todo o lote, de modo que a amostragem gere uma

porção representativa de um mesmo lote de amostra, com o intuito de indicar a natureza, a qualidade e o tipo de micotoxina (CASEMG, 2005).

Antes da escolha de uma boa técnica de identificação, Sabino (1985) salientou que a extração das micotoxinas presentes na amostra deve ser estudada. O autor ainda afirma que a eficiência na extração de uma micotoxina depende do bom contato interno entre o solvente e a amostra. Segundo Jaimez (2000), muitas micotoxinas são facilmente solúveis em vários solventes orgânicos, mas pouco solúveis em água. A extração de micotoxinas depende das propriedades físico-químicas dos produtos contaminados, sendo que cada produto possui um método de extração adequado. Com relação às aflatoxinas, Jaimez (2000) as descreve como solúveis em solventes levemente polares e insolúveis em solventes completamente apolares. Uma mistura de solventes orgânicos entre os quais acetona, clorofórmio ou metanol, são normalmente empregados. Nos métodos imunoquímicos, solventes clorados não são sensíveis para extração.

Vários métodos têm sido usados para análise de aflatoxinas, no entanto a análise individual de micotoxinas é um trabalho difícil, pois são conhecidos mais de 400 compostos (ZHENG; RICHARD; BINDER, 2006). As aflatoxinas podem ser detectadas tanto por técnicas físico-químicas quanto biológicas (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). Dentre as técnicas físico-químicas Oliveira, Prado e Junqueira (2000) citam a cromatografia (camada delgada, líquida de alta eficiência e gasosa) e as técnicas de fluorodensitometria e espectrofotometria. As técnicas biológicas incluem os bioensaios (cultura de tecidos, animais e micro-organismos) e imunoensaios (radioimunoensaio, cromatografia de afinidade e “*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*” - ELISA).

Os métodos imunológicos apresentam sensibilidade, especificidade, rapidez, simplicidade e baixo custo, razões essas que os fazem ser largamente utilizados na pesquisa das aflatoxinas. De acordo com Oliveira, Prado e Junqueira, (2000), o teste ELISA detecta e amplifica a reação antígeno-anticorpo pela ligação covalente entre enzima-anticorpo ou enzima-analito, cuja presença é determinada pela adição de enzima no substrato. Embora sejam amplamente utilizados para o rápido rastreio qualitativo e semi quantitativo de micotoxinas, Muscarella et al. (2009) indicaram que ELISA não são úteis para proporcionar uma determinação quantitativa precisa.

A detecção de micotoxinas por cromatografia é largamente utilizada (CAST, 2003). Collins, Braga e Bonato (2006) destacam a facilidade de separação, identificação e quantificação desse método, tanto quando empregada sozinha, quanto acoplada às técnicas instrumentais de análise, como a espectrometria de massa. Nas separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). A detecção é usualmente feita por UV ou fluorescência dependendo das características químicas da molécula (CAST, 2003).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica simples e econômica, usada quando se pretende uma rápida separação e identificação visual. Trata-se de um método qualitativo, mas pode ser utilizada como um método de análise quantitativo empregando-se densitometria da área e a intensidade da mancha ou fluorescência para as substâncias com essas características (TRUCKSESS, 2001).

Segundo Trucksess (2001), a cromatografia a gás (CG) não é uma técnica empregada usualmente para identificação de micotoxinas por possuir a necessidade de volatilização das substâncias analisadas a uma temperatura que decompõe ou degrada a amostra. As micotoxinas, no entanto, possuem um ponto de ebulição alto, restringindo a utilização direta desta técnica sem a utilização de derivatizações químicas prévias.

Espectrômetros de massa (EM) acompanham os sistemas de cromatografia a gás ou líquida de alta eficiência, permitindo a separação de componentes em misturas complexas. Essa técnica é amplamente aplicável, sendo capaz de fornecer informações sobre a composição quantitativa e qualitativa de amostras inorgânicas e orgânicas. (SKOOG; HOLLER e NIEMAN, 2002). Dessa forma pode ser empregada para identificação de micotoxinas.

As micotoxinas são substâncias tóxicas e, portanto, a manipulação deve ser efetuada com extremo cuidado, sempre que possível em capela, e devem ser tomadas precauções particulares, como o uso de luvas quando as toxinas estão em forma seca, devido a sua natureza eletrostática e tendência de dispersão. Em caso de derramamentos acidentais, a superfície deve ser limpa com hipoclorito de sódio 5%, assim como toda a vidraria

utilizada. Os resíduos gerados devem ser imersos na mesma solução, por 24 h (AOAC, 2006).

3.1.4. Legislação para micotoxinas

Fatores geográficos, sazonais e as condições que os produtos agrícolas são cultivados, colhidos e armazenados exerce grande influência na presença de micotoxinas em alimentos de acordo com Corrêa (2000). Regiões tropicais e subtropicais são mais propensas à contaminação do que as regiões temperadas, pois as condições ótimas para a produção de toxinas são as zonas de umidade e temperaturas elevadas (MARTINS, 2005). O Brasil possui características climáticas que promovem a alta incidência de ataque fúngico, necessitando de atenção e monitoramento quanto à contaminação por micotoxinas em produtos destinados à alimentação humana e animal.

Os alimentos comercializados no Brasil deverão respeitar um limite máximo para a presença de micotoxinas. A Resolução RDC 07/2011, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que prevê os limites máximos tolerados (LMT) de micotoxinas para implantação até o ano de 2016 (Tabela 2).

A UE (2006) introduziu medidas para minimizar a presença de aflatoxinas em diferentes alimentos. Os níveis máximos de aflatoxinas estão estabelecidos no Regulamento (CE) n ° 1881/2006 da Comissão de 19 de dezembro de 2006. Produtos que ultrapassem os níveis máximos não devem ser colocados no mercado da UE. Já a diretiva 2002/32/CE estabelece limites máximos para aflatoxinas B1 em matérias-primas.

Tabela 2. Limites para a presença de micotoxinas em alimentos, de acordo com a RDC 07/2011 da ANVISA.

MICOTOXINA	ALIMENTO	LMT ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
Aflatoxina M1*	Leite fluido/ leite em pó/ queijos	0,5/ 5/ 2,5
Aflatoxinas* (B1+B2+G1+G2)	Amendoim, milho, farinhas ou sêmolas de milho	20
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	1
	Feijões e demais cereais	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 de 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).	20
	Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	
	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 sêmolas de milho	20
Ocratoxina (OTA)	*Feijão, café, cereais e produtos de cereais	10
	*Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	2
	Cereais para posterior processamento	20
Deoxinevalenol (DON)	*Arroz	750
	*Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	200
	Trigo e milho em grãos para posterior processamento	3000
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1000
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de panificação, cereais e produtos exceto trigo incluindo cevada malteada.	750
Fumonisina (FUM)	*Alimentos à base de milho para alimentação	200
	Milho em grão para posterior processamento	5000
	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	1500
	Milho e derivados	1000
Zearalenona (ZEA)	*Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	20
	Milho em grão e trigo para posterior processamento	400
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos à base de milho	150
	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos cereais exceto trigo	100
	Arroz beneficiado e derivados	100
	Arroz integral	600
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farinha de trigo	200

*Limites já em vigor. A implantação dos demais LMT foi prorrogada pela Resolução – RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013.

3.1.1. Impactos econômicos

A contaminação por micotoxinas na produção de alimentos representa um grande impacto econômico. No entanto é difícil estimar a incidência e os custos da contaminação (CAST, 2003). A contaminação por aflatoxinas, conforme Whitaker (2006) gera perdas econômicas diretas, com danos às safras agrícolas e à pecuária e, indiretamente, quando a contaminação por aflatoxinas gera custos com programas regulatórios designados para reduzir os riscos à saúde humana e animal.

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) estima que 25% dos produtos agrícolas do mundo são afetados por micotoxinas, sendo as mais notórias as aflatoxinas. Perdas causadas por aflatoxinas na pecuária e criação de aves através de ração contaminada inclui morte, efeitos supressores no sistema imune, redução no crescimento e perdas na eficiência da ração.

3.1.2. Estratégias para prevenção da produção de micotoxinas

É sabido que micotoxinas podem contaminar produtos agrícolas ainda no campo ou durante o armazenamento. Muitas estratégias para evitar a contaminação por micotoxinas de alimentos e ração animal foram desenvolvidas (RUSTOM, 1997).

A secagem e o controle de umidade durante o armazenamento são cruciais para a prevenção da contaminação fúngica. Controle biológico através de biocompetição tem demonstrado potencial para evitar a contaminação por aflatoxinas na pré-colheita. Reid et al. (1994) descreveram que outra estratégia em desenvolvimento é a combinação de espécies fúngicas não micotoxigênicas capazes de inibir o crescimento de espécies produtoras de micotoxinas como prevenção da contaminação.

Sinha (1998) salientou que estratégias físico-químicas, como a separação física, extração com absorventes, e adsorção foram desenvolvidas para reduzir a contaminação por micotoxinas. Recentemente, com o objetivo de reduzir o problema com a contaminação por micotoxinas na ração animal, têm sido utilizados agentes de ligação que sequestram a

micotoxina no trato gastrointestinal, reduzindo assim a sua biodisponibilidade e por consequência os danos causados nos animais (MILIĆEVIĆ; ŠKRINJAR; BALTIĆ, 2010).

Bata e L'aszty (1999) citaram o uso de bissulfito de sódio e cloro como potenciais para a desintoxicação de micotoxinas, no entanto sua utilização diminui significativamente o valor nutritivo dos alimentos, além de produzir derivados tóxicos e características sensoriais indesejáveis. El-Glendy e Marth (1981) indicaram o uso de bactérias, leveduras e fungos para a prevenção da formação de micotoxinas. Juglal, Goviden e Odhay (2002) por sua vez, citaram que extratos de plantas, óleos essenciais e compostos químicos sintéticos podem evitar o crescimento de fungos e a formação de micotoxinas.

3.2. Óleos essenciais

Óleos essenciais são misturas complexas de compostos químicos aromáticos voláteis (BUCHBAUER, 2010) produzidos por plantas (HYLDGAARD et al., 2012). São concentrados naturais caracterizados por odor forte, sendo formados a partir de metabólitos secundários das plantas segundo Buchbauer (2010). Conhecidos há muito tempo pela ação antisséptica, bactericida, virucida e fungicida, além das propriedades medicinais e de fragrância, eram usados em embalsamentos, preservação de alimentos e como antimicrobianos, analgésicos, sedativos e anti-inflamatórios (ADORJABAM; BUCHEBAUER, 2010). De acordo com Hammer e Carson (2011), muitos óleos essenciais têm também uma ação antimicrobiana relativamente rápida, com morte celular significativa em concentrações equivalentes às concentrações mínimas bactericidas ou fungicidas. A maioria dos óleos é de largo espectro de atividade, sendo ativos contra uma ampla gama de bactérias e fungos.

Quanto à estabilidade, Grassmann e Elstner (2003), indicaram que a decomposição de óleos essenciais no armazenamento, através de reações de fotoisomerização e fotociclização geram peróxidos e ácidos livres, causando mudanças na cor e consistência. Sendo assim, é importante armazenar de forma segura os óleos essenciais, sob uma atmosfera de nitrogênio, ao abrigo da luz e do calor. Óleos essenciais são solúveis na maioria dos solventes orgânicos, com solubilidade muito limitada na água. A densidade dos

óleos essenciais é menor que a da água, com exceção dos óleos de sassafrás, cravo e canela (GRASSMANN; ELSTNER, 2003).

Embora as atividades biológicas dos óleos essenciais tenham sido bem estabelecidas, a relação entre sua composição química e a sua atividade ainda não está bem elucidada. Papachristos et al. (2004) afirmaram ser bem conhecido que a composição química varia qualitativamente e quantitativamente dependendo da estação do ano, da parte da planta usada e do seu genótipo.

Vários métodos de extração podem ser usados para obtenção de óleos essenciais (NIIR, 2003). O método de extração depende do tipo de material botânico usado e é um dos pontos chave que determina a qualidade final do óleo essencial. A escolha do método de extração determina a pureza do óleo e pode afetar sua composição. Grassmann e Elstner (2003) salientaram que a extração errada ou mal executada pode danificar o óleo, alterar a composição química e ter repercussão sobre as suas propriedades biológicas. Sakanrikutty e Narayanan (2003) citaram que o método físico mais empregado para o isolamento de óleo essencial é a hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger. Neste, o material vegetal é colocado em banho-maria, com aquecimento contínuo, procedendo-se à destilação durante cerca de 2 a 3 horas.

3.2.1. Emprego de óleos essenciais como antifúngicos

De acordo com Poppe et al. (2003), as doenças pós-colheita são controladas tradicionalmente por pulverização de fungicidas sintéticos, tais como thiabendazol, imazalilol e orto-fenil-fenato. Kotan, Dilbas e Bostan (2009), no entanto, propuseram que uma alternativa a esses métodos de controle é necessária, pois a pressão dos consumidores, a ineficiência dos compostos devido ao desenvolvimento de resistência aos fungicidas e os custos de desenvolvimento de novos produtos químicos aumentaram. Tripathy e Dubey (2004) destacaram que o uso de compostos químicos sintéticos para controle da deterioração de alimentos tem sido desencorajado devido a sua carcinogenicidade, teratogenicidade e toxicidade para humanos e animais. Assim, o uso de óleos essenciais como agentes antimicrobianos apresentam vantagens por serem de origem natural,

conforme enfatizado por Tian et al. (2011), indicando a tendência a serem mais seguros para os consumidores, e apresentando menor risco de desenvolvimento de resistência microbiana.

Empregando óleo essencial de orégano, Carmo et al. (2008) obtiveram inibição no crescimento de várias espécies de *Aspergillus* em concentrações de 2 a 8%. Já o óleo essencial de cravo inibiu parcialmente o crescimento de *A. flavus* a 0,05%, em cultura líquida (OMIDBEYGI et al., 2007).

Simic et al. (2004) encontraram que o óleo essencial da casca de canela apresentou concentração mínima inibitória entre 0,05 a 1 % (v/v) para fungos filamentosos, incluindo espécies de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium*. Em um estudo similar, Oliveira et al. (2008) obtiveram inibição de aproximadamente 90% no crescimento micelial de *A. niger*, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp, e *F. oxysporum* na presença do óleo essencial de *Lippia sidoides*.

Efeito fungitóxico no crescimento de *A. flavus* foi descrito por Pimentel et al. (2010), a partir da aplicação do óleo essencial de *Cinnamomum zeilanicum* Breyer, enquanto Soliman e Badea (2002) relataram que o mesmo óleo essencial também inibiu completamente o crescimento de *A. flavus* e *A. parasiticus* a $\leq 0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Para Nguefack et al. (2004), o uso de $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ de óleo essencial de *T. vulgaris* reduziu o crescimento radial de *A. flavus* em 81%, e inibiu completamente a germinação de esporos com $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Prakash et al. (2012) afirmaram que nos últimos anos o desenvolvimento de preservativos naturais tem sido visto como uma estratégia viável para aumentar a vida de prateleira de alimentos contra deterioração microbiana, produção de micotoxinas e peroxidação lipídica. Assim, além do crescimento, a produção de AFB1 por *A. flavus* foi inibida pelo óleo essencial de *C. citratus* em fase de vapor, em estudos realizados por Helal et al. (2007). No entanto, este autor descreve que o tratamento reduziu significativamente a produção de biomassa, indicando que a redução na produção de toxina decorreu em função da redução do crescimento.

Dentre os óleos essenciais que demonstraram inibição da produção de aflatoxinas por *Aspergillus* spp. estão a canela (*C. zeilannicum*) e o cravo (*E. caryophyllata*)

(BULLERMAN, LIEU; SEIER, 1977), o gerânio (*Pelargonium graveolens*) (SINGH et al., 2008) e o óleo essencial de tomilho (*T. vulgaris*) (RASOOLI; ABUANEH, 2004). Dentre as várias plantas testadas por Razzaghi-Abyaneh et al. (2009), o *T. vulgaris* inibiu o crescimento e a produção de aflatoxinas por *A. parasiticus*. Efeito semelhante foi observado para *A. flavus* por Kumar et al. (2008).

Por fim, alguns preservativos a base de óleo essenciais já são comercializados, como por exemplo o produto “DMC Base Natural” (DOMA, Espanha) formulado com 50% de óleo essencial de alecrim, sálvia e citrus e 50% de glicerol, é considerado um conservante alimentar seguro, com propriedades que impedem ainda o escurecimento de alface e escarola (BURT, 2004). Já o composto carvona foi introduzido comercialmente com o nome “TALENT” na Holanda (TRIPATHY; DUBEY, 2004). Formulações com óleo essencial de tomilho (*T. capitatus*), jojoba (*Simmondsia californica*) e alecrim (*Rosemarinus officianalis*) são frequentemente usados em conservantes à base de plantas (DAYAN et al., 2009). Cabe salientar que a Organização Mundial de Saúde (OMS) considera óleos essenciais como seguros (GRAS), podendo assim, ser aplicados como tratamentos de controle microbiano na pós-colheita de alimentos.

3.2.2. Mecanismos de ação de óleos essenciais

O conhecimento do modo de ação do óleo essencial é muito importante para uso e aplicação, especialmente em alimentos. De acordo com Burt (2004), o mecanismo de ação dos óleos essenciais como antibacterianos tem sido investigada e a maioria dos estudos concorda com o efeito de seus principais componentes na ruptura da membrana celular. Para Hammer e Carson (2011), a interação inicial entre um componente de óleo essencial e uma célula microbiana é provavelmente por difusão passiva de moléculas através da parede celular, em bactérias Gram-positivas e em fungos, ou através da membrana externa nas bactérias Gram-negativas. Os constituintes do óleo essencial também podem atravessar a membrana celular, penetrando o interior da célula e interagindo com sítios intracelulares críticos, agindo como antimicrobiano segundo Cristani et al. (2007) e Trombetta et al. (2005).

Hope et al. (2003) indicaram que óleos essenciais e compostos fenólicos podem controlar a taxa de crescimento e o tempo de germinação de esporos em fungos deteriorantes. Anteriormente, Nychas (1995) havia relatado que compostos fenólicos podem desnaturar enzimas ou interferir com aminoácidos envolvidos na germinação de esporos. Outros efeitos foram enfatizados por Davidson (1991), que estudou a ação do eugenol no crescimento de fungos e sugeriu que a atividade pode estar relacionada com distúrbios da membrana citoplasmática, desregulando a força motriz de prótons, o fluxo de elétrons, o transporte ativo e a coagulação do conteúdo celular.

Juglal, Govinden e Odhav (2002) em seu estudo empregaram o óleo essencial de canela com MIC de $0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$ para *A. parasiticus* e *F. moniliforme*, sugeriram que o grupo hidroxila do óleo essencial pode formar ligações de hidrogênio com enzimas ativas resultando na desativação destas e afetando a biossíntese de micotoxinas.

3.2.3. Plantas selecionadas para o presente estudo.

3.2.3.1. *Cymbopogon citratus*, *C. martinii* e *C. winterianus*

Os óleos essenciais de espécies do gênero *Cymbopogon*, da família Poaceae são conhecidos por sua atividade antimicrobiana, sendo ativos contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além de leveduras e fungos filamentosos (DELAQUIS et al, 2002).

C. citratus (DC) Stapf. é uma gramínea, conhecida popularmente como capim-cidró, capim-cheiroso, capim-limão, erva-cidreira, entre outros (SCHUCK et al., 2001). O óleo essencial desta planta mostrou atividade fungistática quando testado pelo método de contato direto e pela via fase de vapor (DELESPAUL et al., 2000). Em estudo de Fiori et al. (2000), *C. citratus* inibiu completamente a germinação de esporos e o crescimento micelial do fungo *Dydimella bryoniae*, que provoca danos às folhas e frutos de melão. Mahmoud (1994) observou a presença de citral, citronelol e eugenol no óleo essencial de *C. citratus*.

Cymbopogon martinii (Roxb) Jf. Watson é uma espécie de capim mais conhecido pelo nome popular palmarosa, e demonstrou propriedades antimicrobianas contra a

levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Em baixas concentrações de óleo (0,1%) inibiu completamente o crescimento da levedura (PRASHAR; VENESS; EVANS, 2003). Raoa et al. (2005) encontraram teores geraniol e acetato de geranila presentes nesse óleo essencial.

Cymbopogon winterianus Jowitt, popularmente conhecido como citronela, é uma planta que pode chegar até um metro de altura. Possui importância econômica, sendo muito empregada em formulações de repelentes e aromatizantes (QUITANS-JUNIOR et al., 2008). Em um estudo realizado por Oliveira (2011), o óleo essencial de citronela inibiu a germinação de conídios e o crescimento micelial radial de *A. flavus* e *A. fumigatus*, causando lise celular e se ligando ao ergosterol, indicando que o óleo essencial desta espécie é um agente potencial no controle do crescimento de fungos. Quanto a composição, Marco et al. (2007) indicaram importância aos componentes citronelal, citronelol, geraniol, limoneno presentes no óleo essencial de citronela.

3.2.3.2. *Origanum vulgare*

Popularmente chamado de orégano, *O. vulgare* L. é uma planta aromática da família Lamiaceae generalizada nos países mediterrânicos, usado como ingrediente de alimentos devido ao seu sabor agradável. Além disso, a ação antioxidante (KULISIC et al., 2004; FASSEAS et al., 2008) e antimicrobiana (SEYDIM; SARIKUS, 2006; GOVARIS et al., 2009) do óleo essencial de orégano torna este componente natural também uma boa alternativa como conservante de alimentos (GOULAS; KONTOMINAS, 2007). O óleo essencial de *O. vulgare* apresentou ação contra os fungos *Alternaria* sp., *Bipolaris oryzae*, *Curvularia* sp., *Gerlachia oryzae*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* (ZANANDREA et al., 2004). A ação inibitória é principalmente relacionada com a presença de compostos tais como o carvacrol e o timol (CLEFF et al., 2008).

3.2.3.3. *Aloysia gratissima*

Aloysia (Verbenaceae) é um gênero de arbustos aromáticos que compreendem cerca de 40 espécies difundidas principalmente em regiões tropicais e subtropicais. *A. gratissima*

Aff. Et Hook é uma planta utilizada na medicina popular, e cresce amplamente em todo o continente americano, dos EUA para o México, Brasil e Argentina (SILVA et al., 2006). A composição química desse óleo é principalmente formada por *iso*-pinocanfona, limoneno, guaiol (TROVATI et al., 2009), *trans*-pinocanfona e acetato de *trans*-pinocarveíla (SARTORATTO; AUGUSTO, 2003). A ação antimicrobiana do óleo essencial de *A. gratissima* foi comprovada por Santos et al. (2013), contra *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* e *C. albicans*.

3.2.3.4. *Cinnamomum burmannii*

Cinnamomum é um gênero da família Lauraceae utilizado como especiaria. *C. burmannii* (Nees e Th. Nees) Nees ex Blume tem origem na Indonésia, onde é chamada de cássia da Indonésia. Comercialmente é conhecida como pau de canela (SHAN et al., 2007). Demonstra ação analgésica, antibacteriana, antifúngica, antioxidante. Os componentes químicos são principalmente álcool de cinamilo, cumarina, ácido cinâmico e (E) - cinamaldeído (AL-DHUBIAB, 2012). Chan et al. (2007) encontraram significativa ação do óleo essencial de *C. burmanii* contra *B. cereus*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. anatum*.

3.2.3.5. *Cordia verbenácea*

Conhecida como erva baleeira, a *C. verbenacea* (Jacq.) Roem. e Shult. é uma espécie arbustiva nativa em ambientes de restinga ao longo da costa brasileira, e pertence à família Boraginaceae. As folhas aromáticas são utilizadas na medicina tradicional como agente anti-inflamatório, analgésico, anti-ulcerogênico, sob a forma de chás ou infusões para uso interno ou tópica (SOUZA et al., 2004). Estudos fitoquímicos das partes aéreas da *C. verbenaceae* identificaram a presença α -pinene, *trans*-cariofileno, aloaromadendreno, α -humulene, espatulenol, β -gurjuneno e epóxi cariofileno (CARVALHO et al., 2004). Em

estudo de Matias et al. (2012), foi identificada a ação do óleo essencial de *C. verbenacea* contra *E. coli* e *S. aureus*.

3.2.3.6. *Cyperus articulatus*

A pripioca (*C. articulatus* L.), da família *Cyperaceae* é uma espécie nativa do Brasil cultivada por comunidades rurais do Pará, e comercializada como planta aromática (CASTELLANI et al., 2011). Geralmente são cultivadas em quintais, para uso próprio, e em sistema de consórcio com outras culturas, para comercialização (ZOGHBI et al., 2006). Contém flavonóides, polifenóis, saponinas, taninos, terpenos e açúcares em sua composição. Duarte et al. (2005) relataram ação contra *C. albicans* do óleo essencial de pripioca. Os mesmos autores identificaram os compostos verbenona e *trans*-pinocarveol em maiores quantidades no óleo essencial de pripioca.

3.2.3.7. *Lippia sidoides*

Conhecida popularmente como alecrim-pimenta, a *L. sidoides* Cham. é um arbusto bastante aromático e próprio da vegetação nordestina, pertencente à família *Verbenaceae*. Além de ser considerado um poderoso antisséptico e germicida natural, devido à grande quantidade de timol presente em sua composição, esta planta apresenta um odor mais aprazível que aquelas ricas em ácido carbólico ou fenol comum (MENDONÇA, 1997). Os principais constituintes da *L. sidoides* são o timol e cravacol, que apresenta forte atividade contra bactérias e fungos (BERTINI et al., 2005). Fontanelle et al. (2007) mostram atividade bactericida e fungicida contra diferentes espécies microbianas e, Costa (2001) descreveu a ação de *L. sidoides* contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e os fungos *S. cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans* e *A. flavus*.

3.2.3.8. *Piper abutiloides*

Conhecida popularmente como caapeba, *P. abutiloides* Kunth pertence à família Piperaceae, sendo plantas tropicais conhecidas por terem propriedades antifúngicas e antibacterianas. Extratos e frações de partes aéreas de *P. abutiloides* foram ativos contra as espécies de fungos *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. neoformans* e *Sporothrix schenckii*, em estudo feito por Johann et al. (2009). Os mesmos autores identificaram que a ação do óleo essencial é devida principalmente pela presença compostos pseudodillapiol, eupomatenóide-6 e conocarpano.

3.2.3.9. *Thymus vulgaris*

Thymus é um gênero de cerca de 350 espécies de plantas aromáticas herbáceas da família Lamiaceae e nativa da Europa, norte da África e da Ásia e amplamente cultivada na Europa e nos Estados Unidos. *T. vulgaris* L. possui forte sabor devido ao seu conteúdo de timol (HUXLEY, 1992). Conhecido popularmente como tomilho é uma planta perene com 6 a 12 centímetros de altura. As folhas são pequenas, opostas, sésseis, e cinza-esverdeado com bordas levemente enroladas (ASHNAGAR; NASERU; RAMAZINI, 2011). Reddy et al. (1998) identificaram no óleo essencial de *T. vulgaris* os compostos p-cimeno, linalol, terpinen-4-ol e do timol e obtiveram atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer*. *T. vulgaris* foi capaz de controlar isolados clínicos de *Aspergillus* sp. em ensaios realizados por Tullio et al. (2007).

3.2.3.10. *Vetiveria zizanioides*

Popularmente conhecida como capim vetiver, *V. zizanioides* Stapf. é também classificada como *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty pertencente à família Poaceae. Entre suas espécies, a *V. zizanioides* é a mais valiosa em termos econômicos. O óleo essencial extraído da sua raiz tem sido, ao longo do tempo, utilizado por perfumistas, na medicina e outras áreas (ALMEIDA, 2011). Seu uso para fins de proteção ambiental tem

sido praticado em países tropicais e subtropicais devido às vantagens como baixo custo e eficácia na conservação dos solos (DANH et al., 2009). Pripdeevech et al. (2006) identificaram como componentes majoritários o 2-norzizaeno e seus derivados e o y-vetivereno no óleo essencial de vetiver. Atividade contra *S. aureus* pelo óleo essencial da raiz de *V. zizanioides* foi demonstrada por Hammer et al. (1999).

3.2.3.11. *Eugenia caryophyllata*

Eugenia caryophyllata Thunb. ou *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. e LM Perry, pertence à família Mirtaceae sendo popularmente conhecida como cravo. É uma árvore aromática, nativa da Indonésia e usada como tempero na culinária em várias partes do mundo (HEMA et al., 2010). O cravo é considerado um fármaco importante, por ter uma variedade de aplicações diferentes, tais como antioxidante, antifúngico, antiviral, antibacteriano, anti-inflamatório, analgésico, inseticida, entre outros. Seu principal constituinte é o eugenol, relatado como responsável por essas atividades (SINGH; BAGHOTIA; GOEL, 2012). Em estudo realizado por Omidbeygi et al. (2007), o óleo essencial de *E. caryophyllata* inibiu parcialmente o crescimento de *A. flavus*.

3.2.4. Métodos de avaliação da atividade antifúngica de óleos essenciais

Dentre os métodos mais utilizados para avaliação da atividade antifúngica de óleos essenciais estão os métodos de difusão em ágar e diluição em caldo.

3.2.4.1. Método de difusão em ágar

O teste de difusão em ágar é um método físico no qual o micro-organismo é testado com uma substância biologicamente ativa, em meio de cultura sólido, e os resultados são baseados na relação do tamanho da zona de inibição de crescimento com a concentração da substância empregada (PINTO; KANELO; OHARA, 2003). Quimioterápicos de ação já comprovada são utilizados como controle positivo e o solvente no qual a amostra a ser

testada é solubilizada é utilizado como controle negativo (KARAMAN et al., 2003; SPRINGFIELD et al., 2003). É feita uma avaliação comparativa entre um padrão biológico de referência e a zona ou halo de inibição do crescimento medido, partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de micro-organismo (BARRY; HORNSBERRY, 1991).

3.2.4.2. Método de difusão em disco

O teste de difusão em disco é aceito pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e estabelecido como padrão pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). É um método qualitativo utilizado para avaliar a atividade dos óleos essenciais. Neste, o óleo essencial é incorporado em discos de papel dispostos sobre o meio de cultura sólido, previamente inoculado com diferentes concentrações do micro-organismo a ser avaliado (CHATTOPADHYAY et al., 2002; KARAMAN et al., 2003). Os discos devem ser dispostos de maneira adequada, onde sua distância até a lateral da placa deve ser maior que 15 mm, para não sobrepor as zonas de inibição. Barry e Thornsberry (1991) recomendaram que o pH do meio de cultura deve estar entre pH 7,2 e pH 7,4 e sua profundidade deve ser de aproximadamente 4 mm.

3.2.4.3. Método de diluição em caldo

O método de diluição em caldo avalia a proporção entre a turbidez provocada pelo crescimento microbiano e a quantidade de óleo essencial testado (PINTO et al., 2003). É um método que fornece resultados quantitativos e não sofre influência da velocidade de crescimento dos micro-organismos. Apresenta como desvantagem a dificuldade na detecção de contaminação. O controle positivo é feito aplicando-se antimicrobiano padrão à suspensão padronizada de micro-organismo, e o controle negativo é o meio de cultura juntamente com o solvente utilizado na dissolução da amostra (SAHM; WASHINGTON, 1991).

O método de diluição em caldo pode ser realizado de duas maneiras distintas, através de macrodiluição ou microdiluição. De acordo com Zgoda e Porter (2001), na macrodiluição os testes são realizados em tubos de ensaio, com volume de meio de cultura variando de 1 a 10 mL. A desvantagem deste método citada pelo autor é utilizar grande quantidade de material, não permitindo muitas repetições. A microdiluição, por sua vez, é uma adaptação do método de macrodiluição em caldo, onde microplacas de cultura de células com 80 ou 96 compartimentos ou poços são utilizadas, com volume de meio de cultura variando entre 0,05 e 0,2 mL (CLSI, 2008). Eloff (1998) afirmou que o uso do método de microdiluição é mais barato do que o de macrodiluição, tem boa reprodutibilidade e é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, além de requerer pequena quantidade de amostra.

3.2.4.4. Fatores que afetam o resultado da atividade antifúngica

Os resultados dos métodos de difusão e de diluição podem ser afetados por vários fatores, dessa forma requerem conhecimento experimental e padronização na execução. Silva (2012) observa que esses métodos apresentam limitações para aplicação de óleos essenciais. Hood et al. (2003) apontaram que ao testar óleos essenciais pelo método de difusão em ágar, a volatilidade, insolubilidade, viscosidade e complexidade da estrutura devem ser levadas em consideração. A diluição desigual dos componentes lipofílicos dos óleos essenciais pode resultar em concentrações não uniformes do óleo no ágar, causando a formação de regiões com diferentes atividades antimicrobianas que podem levar a interpretações equivocadas, problemas também citados por Lambert et al. (2001).

No método de difusão em ágar, a atividade antimicrobiana do óleo pode ser influenciada pelo meio de cultura (concentração de ágar e origem), pelo pH, disponibilidade de oxigênio, quantidade de inóculo e modo de incubação (OSTROSKY et al., 2008). Além disso, o tipo de micro-organismo também exerce influência, sendo que micro-organismos de rápido crescimento, aeróbios ou aeróbios facultativos limitam o emprego do método de difusão em ágar (OSTROSKY et al., 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Foram escolhidas para o presente estudo, 13 plantas medicinais e aromáticas, sendo 12 pertencentes à Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) - UNICAMP. A espécie *Cinnamomum burmanii* foi coletada no Jardim Botânico de Paulínia, localizado em Paulínia-SP. A lista de plantas incluindo família, nome popular, parte empregada, origem e número de voucher está apresentada na Tabela 3.

A autorização de acesso ao Patrimônio Genético foi concedida pelo CNPq sob número 010063/2013-7.

4.2. Manutenção e cultivo das espécies na CPMA

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

4.3. Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE) foram obtidos por hidrodestilação empregando sistema do tipo Clevenger, por aproximadamente 2 h. Cerca de 2 Kg das plantas estudadas, conforme indicado na Tabela 3, foram colhidas, picadas e transferidas para balões de fundo redondo com capacidade para 6 L, adicionando-se água destilada suficiente para cobrir todo o material vegetal. Após a extração, os óleos foram acondicionados em frascos de vidro âmbar hermeticamente fechados e armazenados em freezer a -25 °C.

Tabela 3. Espécies medicinais da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do CPQBA/UNICAMP utilizadas no presente estudo.

Nome Científico	Família Botânica	Nome Popular	Partes Empregadas	Origem	Nº Herbário UEC
<i>Aloysia gratissima</i>	Verbenaceae	Alfazema do Brasil	Folhas	N	121393
<i>Cinnamomum burmani</i>	Lauraceae	Canela-da-índia	Folhas	E	*
<i>Cordia verbenaceae</i>	Borraginaceae	Erva-baleeira	Partes aéreas	N	162616
<i>Cyperus articulatus</i>	Cyperaceae	Piprioca	Bulbilhos	N	121396
<i>Cymbopogon citratus</i>	Poaceae	Capim-limão	Folhas	E	137022
<i>C. martinii</i>	Poaceae	Gerânio da Índia	Folhas	E	127115
<i>C. winterianus</i>	Poaceae	Citronela	Folhas	E	121414
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Mirtaceae	Cravo-da-índia	Inflorescência	E	455
<i>Lippia sidoides</i>	Verbenaceae	Alecrim pimenta	Folhas	N	1405
<i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae	Orégano	Partes aéreas	E	127122
<i>Piper abutiloides</i>	Piperaceae	Caapeba	Folha	N	121409
<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae	Tomilho	Partes aéreas	E	121405
<i>Vetiveria zizanoides</i>	Poaceae	Vetiver	Raiz	E	121415

N = Nativa; E = exótica; * aguardando depósito em herbário.

Após determinação da atividade antifúngica, amostras das plantas medicinais de maior atividade foram submetidas a secagem a 40 °C em estufa com circulação de ar, até que apresentassem peso constante, para posterior determinação do teor de umidade e cálculo do rendimento em óleo essencial

4.4. Equipamentos e vidraria

Foram utilizados os seguintes equipamentos: espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu mini 1240, incubadora rotatória com controle de temperatura, estufas de cultura, dispersor Ultra Turax IKA 13500 rpm; Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) com detector de fluorescência (FL) – Shimadzu, com coluna Zorbax SB-18 (150 mm x 4,6 mm,

3,5 µL de tamanho de partícula); Cromatógrafo a gás (CG) Agilent HP-6890, equipado com detector seletivo de massas Agilent HP-5975, injetor split/splitless, utilizando uma coluna capilar HP-5MS (30 x 0,25 x 0,25 mm). Foi utilizada vidraria usual de laboratórios de Química e de Microbiologia.

4.5. Reagentes, soluções e outros materiais

Clorofórmio P.A 99,8%; acetonitrila grau HPLC 99,9%; metanol grau HPLC 99,9%; diclorometano P.A 99,5%; dimetilsulfoxido (DMSO) P.A 99,9%; ácido trifluoracético (TFA) P.A 99,5%; ácido acético glacial P.A 99,7%; antifúngico Cercobin[®] 700WP (Iharabras S. A. Indústrias Químicas); sílica gel 60 – Merck; papel de filtro Whatman 40; Padrões de aflatoxina B1 e B2 Sigma.

A fase móvel empregada em CLAE foi composta por acetonitrila: água: metanol 1:3:1 (v/v). A solução derivatizante foi composta por de água: ácido acético: TFA 7:1:2 (v/v) e mantida em frasco âmbar.

4.6. Meios de cultura

4.6.1. Meio para determinação da atividade antifúngica

Meio RPMI-1640 (Cultilab), utilizado nos testes de determinação da concentração mínima inibitória (MIC). Trate-se uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular fúngico. O meio RPMI-1640 foi preparado dissolvendo-se o conteúdo de um envelope em 1L de água destilada esterilizada. Foram adicionados 20% de glicose anidra sob agitação, até a total dissolução. Em seguida, o meio foi filtrado em sistema de filtração a vácuo e membrana de 0,22 µm.

4.6.2. Meio para manutenção, crescimento e indução à esporulação.

O Meio CY20S (Agar Czapek extrato de levedura 20% sacarose) de acordo com Pitt e Hocking (2009) é constituído por (%m/v): Ágar ágar 2,0 %; Extrato de levedura 0,5 %; Sacarose 20 %; K_2HPO_4 0,1 %; Solução Czapeck 1% (v/v); Solução metálica traço 0,1 % (v/v). A Solução Czapek concentrada foi composta por (%m/v): $NaNO_3$ 3 %; KCl 5 %; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 %; $FeSO_4$ 0,1%. A Solução metálica traço foi constituída de (% m/v): $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1%; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,5%.

4.6.3. Meio para avaliação da produção de aflatoxinas

Meio YESa (Extrato de Levedura, Sacarose, Agar) foi constituído por (%m/v): Ágar-ágar 2,0%; Extrato de levedura 0,2 %; Sacarose 1,5 %; $MgSO_4$ 0,05 %.

4.7. Fracionamentos dos óleos essenciais com maior atividade antifúngica

Os OE de maior atividade antifúngica foram fracionados em colunas secas preparadas com sílica gel, utilizando membrana de acetato de celulose como suporte. As colunas foram empacotadas à seco e eluídas com diclorometano.

Em seguida, aproximadamente 8 mg dos OE de maior atividade antimicrobiana selecionados conforme item 4.9.5, foram adicionados na parte superior da coluna empacotada. A eluição foi realizada com diclorometano até que a corrida do solvente chegasse ao final da coluna. Em seguida, a coluna foi cortada em 4 partes ou frações e a sílica lavada e filtrada com diclorometano por 3 vezes, para total desprendimento e separação do OE presente em cada parte. A porção obtida em cada fração foi submetida à rotaevaporação até eliminação total do solvente. Em seguida, as frações foram avaliadas quanto à atividade antifúngica, seguindo a mesma metodologia utilizada para avaliação dos óleos essenciais brutos, conforme itens 4.9.5 e 4.9.6 e quanto à composição química, conforme item 4.8.

4.8. Análise química dos OE e frações por Cromatografia a Gás (CG)

A identificação dos constituintes voláteis dos OE de maior atividade antifúngica e suas frações foi realizada em Cromatógrafo a gás acoplado a Espectrometria de massas. As condições empregadas foram: Temperaturas: injetor = 220 °C, detector = 250 °C, coluna = 60 °C, 3 °C.min⁻¹, 240 °C. Vazão do gás de arraste (He super seco) = 1,0 mL.min⁻¹.

A análise cromatográfica dos OE foi realizada na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA/UNICAMP.

4.9. Determinação da Atividade Antifúngica

4.9.1. Micro-organismo

A atividade antifúngica dos óleos essenciais das espécies medicinais e aromáticas foi avaliada frente ao *Aspergillus flavus* CCT 0614 (<NRRL 3251 <ATCC 36061), produtor de aflatoxinas B1 e B2. A cepa foi adquirida junto à Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação André Tosello, Campinas, SP.

4.9.2. Preparo dos OE para os testes de atividade antifúngica

Para avaliação das concentrações mínima inibitória (MIC) e fungicida mínima (MFC), os OE foram solubilizados em meio RPMI-1640 contendo até 10% de DMSO. Quando necessário, foi adicionada solução de Tween 20 (0,5% v/v) como auxiliar na dissolução. A solução estoque de cada OE foi preparada na concentração de 8 mg.mL⁻¹, correspondendo a 4 vezes o valor da concentração máxima testada nos ensaios de determinação da MIC, ou seja, 2,0 mg.mL⁻¹.

Para avaliação do efeito dos OE no crescimento do fungo e na produção de aflatoxinas, os OE foram solubilizados em água destilada esterilizada e Tween 20 (0,5%

v/v). A solução estoque de OE foi preparada na concentração de 100 mg.mL^{-1} e posteriormente diluída, a fim de alcançar as concentrações utilizadas nos ensaios.

4.9.3. Preparo e padronização do inóculo fúngico

Para induzir a formação de conídios e esporangióforos a serem utilizados como inóculo nos testes de atividade antifúngica, os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo ágar CY20S e incubados a 25°C por 7 a 10 dias. Após crescimento e esporulação, as culturas foram cobertas com 1 mL de solução salina 0,85% esterilizada e 0,01 mL de solução Tween 20 a 0,5% (v/v). Após espalhamento e homogeneização da solução na superfície da cultura com o auxílio de uma alça, o líquido contendo esporos foi recolhido e filtrado em gaze esterilizada para retenção de hifas, obtendo-se assim uma suspensão de esporos. Em seguida, a absorbância da suspensão de esporos foi lida em espectrofotômetro a 530 nm e ajustada para uma densidade óptica (DO) de 0,09 a 0,11 (transmitância de 80 a 82%) pela adição de solução salina 0,85%. A suspensão padronizada foi então diluída 1:50 no meio RPMI-1640, e utilizada nos ensaios de determinação da MIC, correspondendo a 2 vezes a densidade necessária de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 esporos. mL^{-1} , aproximadamente. Nos ensaios referentes aos itens 4.9.7, 4.9.8 e 4.9.9, a suspensão de esporos foi diluída 1:50 em água destilada esterilizada.

4.9.4. Determinação da Concentração Mínima Inibitória dos OE e frações

A determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) OE e frações foi realizada pelo método da microdiluição (CLSI, 2008). Foram empregadas microplacas de 96 poços ou compartimentos. Foram depositados 100 μL de caldo RPMI-1640 em cada compartimento a partir da segunda coluna. Na primeira coluna da placa foram acrescentados 50 μL do OE previamente diluído (item 4.9.2) e 150 μL de caldo RPMI-1640 consistindo do controle do OE (sem inóculo). Na segunda coluna foram depositados 100 μL de cada OE diluído conforme indicado no item 4.9.3. Em seguida, o conteúdo do poço

foi homogeneizado com o meio e 100 μL transferidos para o poço da coluna seguinte, repetindo-se este procedimento até a coluna 12, de modo a obter concentrações entre 2,0 e 0,0016 mg.mL^{-1} . Os 100 μL finais foram desprezados. Em seguida foram adicionados 100 μL da suspensão de esporos (item 4.6.4) em cada poço. Além do controle do OE (sem inóculo), foram incluídos o controle do inóculo (sem OE) e controle de esterilidade do meio (sem inóculo e sem OE). Foi também incluído nos testes como fungicida padrão, o antifúngico Cercobin[®] 700WP (Iharabras S. A. Indústrias Químicas), nas concentrações de 2,0 a 0,00165 mg mL^{-1} . As placas foram incubadas a 25 °C, e observadas quanto ao crescimento após 72 h.

A MIC (Concentração Mínima Inibitória) foi definida como a menor concentração do OE capaz de inibir o crescimento do micro-organismo, visualmente detectado pela mudança de coloração do meio RPMI 1640 de rosa (original) para amarelo, indicação de mudança de pH pelo crescimento microbiano.

4.9.5. Determinação da Concentração mínima inibitória dos OE combinados

Os OE de maior atividade foram testados em combinação quanto à atividade antifúngica, seguindo o mesmo procedimento descrito no item 4.9.4. Após a diluição, conforme item 4.9.2, os OE foram combinados na proporção 1:1. Desta forma, a solução estoque consistiu na mistura de dois OE na concentração total de 8 mg.mL^{-1} . A concentração fungicida mínima (MFC) da mistura de OE não foi determinada.

4.9.6. Determinação da Concentração Fungicida Mínima dos OE e frações

A determinação da Concentração Fungicida Mínima (MFC) dos óleos essenciais e frações foi realizada pelo método CLSI (2008). Os OE foram avaliados através do plaqueamento de 10 μL do material contido no poço de MIC e dos poços subsequentes de maior concentração. As placas foram incubadas a 25 °C durante 5 dias e avaliadas quanto ao crescimento fúngico.

4.9.7. Produção de biomassa na presença dos OE

A produção de biomassa por *A. flavus* CCT 0614 na presença dos OE foi avaliada em caldo CY20S. O ensaio foi conduzido em frascos de Erlemmeyer contendo 20 mL do meio de cultura, onde foram adicionados 100 µL de inóculo padronizado (item 4.9.3) e o OE diluído em Tween 20 a 0,5% (v/v), nos valores correspondentes ao de MIC, e duas vezes o seu valor (2MIC). Um controle sem adição de OE foi incluído nos ensaios. Os frascos foram incubados a 25 °C sob agitação de 240 rpm, durante 120 h. Após este período a cultura foi submetida a filtração sob vácuo, e a biomassa produzida foi seca em estufa à 80 °C, até peso constante.

4.9.8. Efeito do OE de maior atividade sobre o crescimento fúngico em meio sólido

Antes dos testes, os OE foram diluídos em água destilada esterilizada e Tween 20 a 0,5% (v/v) conforme item 4.9.2. A concentração de cada OE foi definida em função da MIC obtida nos ensaios referentes ao item 4.9.4. O efeito da aplicação dos OEs de maior atividade sobre o crescimento fúngico foi avaliado de duas maneiras distintas: com o OE incorporado ao meio de cultura (IP) e, com o OE aplicado no papel de filtro (AV)

4.9.9.1. Ensaio com OE incorporado no meio de cultura (IP)

Nos ensaios IP, o OE na concentração definida como a de MIC foi adicionado ao meio de cultura CY20S liquefeito, antes que o mesmo atingisse sua temperatura de solidificação, isto é, em torno de 40 °C. Foram utilizados frascos de Erlemmeyer esterilizados contendo quantidade suficiente de meio para utilização em todas as placas do ensaio. Assim, após a adição e homogeneização do OE, 6 mL do meio foram distribuídos em cada placa. Após solidificação, um orifício de 2 mm foi aberto no centro da placa, e 5

μL do inóculo do fungo padronizado de acordo com o item 4.9.3 foram depositados no mesmo.

4.9.8.2. Ensaio com OE aplicado no papel filtro – ação dos voláteis (AV)

Nos ensaios AV (Ação dos Voláteis), o OE foi adicionado em discos de papel de filtro de 1,5 cm esterilizados e secos, que foram posicionados no centro da tampa da placa de Petri conforme ilustrado na Figura 2. No fundo da placa foram depositados 6 mL do meio de cultura CY20S e, após solidificação, foi feito um orifício de 2 mm no centro da placa. No orifício aberto foram aplicados 5 μL de solução de inóculo preparado conforme item 4.9.3.

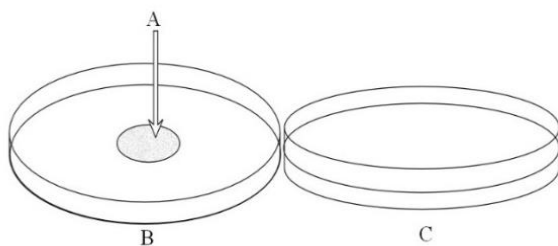


Figura 2. Método de aplicação do OE pela ação dos voláteis (AV). Onde: A – posição do papel filtro (1,5 cm) na tampa da placa de Petri (B) onde o OE foi aplicado; C – meio de cultura com orifício, onde foi inoculado o fungo.

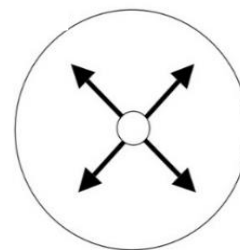


Figura 3. Direções perpendiculares utilizadas para medidas do raio de crescimento da colônia fúngica nos testes IP e AV.

Em ambos os ensaios, IP e AV, as placas foram incubadas a 25 °C e 98 UR%, em posição invertida. O crescimento fúngico foi acompanhado por medidas diárias do diâmetro das colônias, que foi medido em 4 direções perpendiculares entre si (Figura 3), de modo a se obter o raio médio de cada colônia para calcular a taxa média de crescimento. A taxa média de crescimento radial (mm.h⁻¹) foi calculada usando o modelo da regressão não linear (logarítmica) usando a equação:

$$r = \mu (t - \lambda)$$

Onde, r é o raio médio da colônia (mm), μ é a taxa de crescimento radial (mm.h^{-1}), t o tempo (h), λ a duração da fase lag (h). A duração da fase lag foi obtida pelo cálculo do tempo correspondente ao ponto de intersecção entre a reta obtida pelo modelo e a reta paralela ao eixo-X.

4.10. Efeito do OE de *C. citratus* sobre a produção de aflatoxinas por *A. flavus*

A produção de aflatoxinas por *A. flavus* CCT 0614 foi avaliada utilizando o meio YESa. Foram utilizadas placas de Petri de vidro (50 x 16 mm) previamente pesadas em balança analítica. O OE de *C. citratus* foi selecionado para os ensaios devido à ação inibitória de *A. flavus* constatada nos ensaios de triagem dos OE, além do fato deste OE ser facilmente disponível no mercado. A adição de OE no ensaio foi realizada na forma de incorporação ao meio (IP) e por ação dos voláteis (AV), conforme descrito anteriormente.

Em relação à concentração de OE empregada, no ensaio IP o OE foi adicionado na concentração equivalente à de MIC e à metade desta ($\frac{1}{2}$ MIC). Após adição do OE ao meio YESa, a mistura foi homogeneizada adequadamente, distribuindo-se 6 mL em cada placa. No ensaio AV, o OE foi adicionado em disco de papel de filtro de 1,5 cm de diâmetro, posicionado no centro da tampa da placa de Petri, também nas mesmas concentrações de MIC e $\frac{1}{2}$ MIC. Em seguida, 6 mL do meio YESa foram adicionados na parte correspondente ao fundo da placa. Em ambos os ensaios, 5 μL do inóculo fúngico padronizado conforme item 4.5.4 foram adicionados no orifício central feito no meio de cultura. As placas foram incubadas invertidas a 25 °C e UR% 98 durante 15 dias e o conteúdo total de cada placa foi utilizado para extração de aflatoxinas, conforme item 4.11.2.

4.11. Metodologia analítica para quantificação das aflatoxinas

4.11.1. Verificação do método

Foram realizados ensaios de fortificações concomitantes com as análises de quantificação de aflatoxinas. Nesses ensaios, foram adicionados à superfície do ágar YESa 1 mL da mistura de padrões de aflatoxinas em acetonitrila. Correspondendo aos níveis de concentrações de 15 ng.g^{-1} e 6 ng.g^{-1} de AFB1 e AFB2, respectivamente. Controles sem aplicação dessa mistura foram incluídos. Os ensaios foram realizados em triplicata. Essas fortificações foram mantidas nas mesmas condições de produção das aflatoxinas conforme item 4.10.

4.11.2. Extração

Após o período de incubação, as placas de Petri foram novamente pesadas a fim de se obter a massa final referente ao meio de cultura, juntamente com o micélio. Em seguida, o conteúdo total das placas foi transferido para tubos cônicos tipo *Falcon* com capacidade para 50 mL, onde foram adicionados 10 mL de clorofórmio. As amostras foram extraídas por 30 seg, em seguida submetidas à agitação em shaker a 240 rpm em temperatura ambiente, por 15 min. O extrato foi filtrado em papel de filtro e uma alíquota de 5 mL foi recolhida e seca sob fluxo de nitrogênio. Os extratos secos foram armazenados a temperatura de 4°C e protegidos da luz, até o momento das análises.

4.11.3. Reação de derivatização

Para a reação de derivatização, 700 μL da solução derivatizante (item 4.5) foi adicionada à amostra e agitada em vortex por 10 seg. Após aquecimento em banho-maria a

65 °C por 17 min, os tubos foram resfriados por 4 min, adicionando-se em seguida 300 µL de fase móvel (item 4.5). Após agitação, as análises cromatográficas foram iniciadas.

4.11.4. Quantificação por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE)

Para se obter a fluorescência da AFB1 o extrato foi submetido a uma reação de derivatização conforme item 4.11.3. Foi utilizada a técnica CLAE, com detector de fluorescência (FL), comprimentos de onda de 360 nm para excitação e 440 nm para emissão. As condições cromatográficas empregadas foram: fluxo 1 mL/min de fase móvel (item 4.5); volume de injeção, 50 µL; temperatura da coluna, 30 °C. Integração: Software LC Solutions.

A validação e quantificação das aflatoxinas foram realizadas pela equipe da Divisão de Química Analítica – DQA, do CPQBA-UNICAMP.

4.12. Análise estatística

Para a análise comparativa entre os tratamentos utilizados nos ensaios de crescimento radial, produção de biomassa e produção de aflatoxinas por *A. flavus* foi utilizado Teste Tukey com nível de significância $p < 0,05$ utilizando o programa *Statistica* versão 12.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade anti-*A. flavus* dos OE

No presente estudo, os OE de 13 espécies medicinais e aromáticas foram avaliados inicialmente quanto à atividade antifúngica contra *A. flavus* CCT 0614. A determinação foi realizada pelo método de microdiluição, utilizando concentração máxima de OE de 2,0 mg.mL⁻¹. Os resultados de MIC estão apresentados na Tabela 4.

Embora não exista uma padronização quanto ao nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, Duarte et al. (2005) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de MIC, considerando como: elevada inibição - MIC até 0,5 mg.mL⁻¹; moderada inibição - MIC entre 0,6 e 1,0 mg.mL⁻¹ e baixa inibição - MIC acima de 1,0 mg.mL⁻¹. Assim, o óleo que demonstrou maior atividade sobre *A. flavus* CCT 0614 foi o de *C. burmanii*, com MIC de 0,2 mg.mL⁻¹, podendo ser classificado como de forte ação inibitória (Tabela 4). Os OE de *E. caryophyllata*, *C. citratus*, *C. martinii*, *C. winterianus* e *T. vulgaris*, também apresentaram elevada ação antimicrobiana, com MIC de 0,5 mg.mL⁻¹, enquanto os OE de *L. sidoides* e *O. vulgare*, por sua vez, apresentaram valores de MIC de 2,0 e 1,0 mg.mL⁻¹, respectivamente, mostrando baixa ter ação antifúngica. Finalmente, os OE de *A. gratissima*, *C. verbenaceae*, *C. articulatus*, *P. abutiloides* e *V. zizanooides* não foram ativos na faixa de concentração estudada, ou seja, até 2 mg.mL⁻¹.

Considerando o fungicida padrão utilizado como controle da inibição fúngica, verifica-se que os OE mais ativos apresentaram atividade similar ao Cercobin[®] (Iharabras S/A Indústrias Químicas) – MIC 0,25 mg.mL⁻¹ (Tabela 4), o que demonstra o potencial antifúngico dos OE estudados. Em função dos resultados obtidos, os OE de *A. gratissima*, *C. verbenaceae*, *C. articulatus*, *P. abutiloides* e *V. zizanooides* foram excluídos das demais etapas deste estudo.

Os rendimentos em OE das espécies de maior atividade anti-*A. flavus* foram determinados. Os resultados (% em relação à massa de planta seca) estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 4. Concentração mínima inibitória (MIC) e concentração fungicida mínima (MFC) dos OE frente a *A. flavus*.

OE	MIC mg.mL ⁻¹	MFC mg.mL ⁻¹
<i>A. gratissima</i>	*	*
<i>C. burmanii</i>	0,2	0,6
<i>C. verbenaceae</i>	*	*
<i>C. articulatus</i>	*	*
<i>C. citratus</i>	0,5	1,0
<i>C. martinii</i>	0,5	2,0
<i>C. winterianus</i>	0,5	2,0
<i>E. caryophyllata</i>	0,5	1,0
<i>L. sidoides</i>	2,0	*
<i>O. vulgare</i>	1,0	*
<i>P. abutiloides</i>	*	*
<i>T. vulgaris</i>	0,5	2,0
<i>V. zizanooides</i>	*	*
Cercobin®	0,25	1,0

* MIC > 2,0 mg.mL⁻¹, não apresentou ação até a máxima concentração testada.

Tabela 5. Rendimento em OE das plantas medicinais e aromáticas de maior atividade anti-*A.flavus*.

Espécie Medicinal	Rendimento em OE (%)
<i>C. burmanni</i>	0,33
<i>C. citratus</i>	1,13
<i>C. martinii</i>	1,36
<i>C. winterianus</i>	1,48
<i>E. caryophyllata</i>	4,69
<i>T. vulgaris</i>	2,66

Os resultados da Tabela 5 indicam que o maior rendimento em OE foi observado para a espécie *E. caryophyllata* (4,69%), seguida do *T. vulgaris* (2,66%) e das espécies de *Cymbopogon*. O menor rendimento foi observado para *C. burmanii* (0,33%).

5.2. Determinação Concentração Mínima Inibitória dos OE combinados

Os OE de maior atividade anti - *A. flavus* CCT 0614 foram testados em combinações (1:1) visando verificar se a atividade antifúngica poderia ser potencializada, ou seja, se poderia ocorrer sinergismo entre os componentes presentes nos OE, responsáveis pela ação inibitória. Os valores de MIC obtidos para as combinações testadas estão apresentados na Tabela 6.

Com base nos resultados obtidos, as combinações de OE 1:1 não incorreram em melhoras na ação antifúngica dos mesmos, indicando indiferença, ou seja, não houve sinergismo nem antagonismo, nessas condições.

Tabela 6. MIC (mg.mL⁻¹) da mistura 1:1 dos OE de maior atividade frente a *A. flavus*.

OE	<i>T. vulgaris</i>	<i>E. caryophyllata</i>	<i>C. winterianus</i>	<i>C. martinii</i>	<i>C. citratus</i>
<i>C. burmanii</i>	0,5	0,5	0,5	2,0	0,5
<i>C. citratus</i>	1,0	0,5	2,0	1,0	
<i>C. martinii</i>	1,0	0,5	2,0		
<i>C. winterianus</i>	1,0	0,5			
<i>E. caryophyllata</i>	1,0				

5.3. Determinação da atividade antifúngica das frações dos OE

Os OE de maior atividade, isto é, de *C. citratus*, *C. winterianus*, *C. martinii*, *E. caryophyllata*, *T. vulgaris* e *C. burmanii* foram fracionados em coluna seca e as frações obtidas foram também avaliadas frente a *A. flavus* CCT 0614. Cabe ressaltar que cada óleo foi fracionado em 4 partes, mas que, somente as duas primeiras frações (F1 e F2) foram obtidas em quantidades suficientes para os ensaios de atividade. Os valores de MIC e MFC obtidos para as frações estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Rendimento (%), MIC e MFC (mg.mL⁻¹) das frações F1 e F2 dos OE de maior atividade contra *A. flavus*.

OE	Fração	Rendimento em Fração (%)	MIC	MFC
<i>C. burmanii</i>	F1	67,2	0,25	*
	F2	19,0	0,0625	*
<i>C. citratus</i>	F1	27,4	0,4	*
	F2	28,4	0,4	*
<i>C. martinii</i>	F1	6,0	1,0	*
	F2	11,1	0,5	*
<i>C. winterianus</i>	F1	28,6	*	*
	F2	27,4	1,0	*
<i>E. caryophyllata</i>	F1	20,5	0,5	2,0
	F2	44,3	0,5	*
<i>T. vulgaris</i>	F1	24,9	1,0	*
	F2	22,8	0,25	0,25

* MIC >2,0 mg/mL; não apresentou ação até a máxima concentração testada.

De acordo com os resultados de atividade antifúngica obtidos para as frações, destaca-se a ação da fração F2 de *C. burmanii*, de 0,0625 mg.mL⁻¹, bastante inferior à MIC do OE bruto (0,2 mg.mL⁻¹). Os compostos ativos presentes no OE de *T. vulgaris* também permaneceram na F2, que, do mesmo modo, apresentou menor concentração inibitória (MIC 0,25 mg.mL⁻¹) do que a verificada para o óleo essencial bruto (MIC 0,5 mg.mL⁻¹). As frações obtidas para os demais OE não mostraram efeito adicional quanto à atividade anti-*A. flavus*.

Os resultados mostraram que, de fato, o fracionamento do OE pode resultar, em alguns casos, no isolamento da fração mais ativa, incrementando a ação antifúngica. No entanto, o baixo rendimento obtido com o fracionamento (Tabela 7), impossibilitou o uso das frações para os demais ensaios deste estudo.

5.4. Produção de biomassa presença dos OE

A produção de biomassa por *A. flavus* CCT 0614 na presença dos OE de *C. burmanii*, *C. citratus*, *C. martinii*, *C. winterianus*, *E. caryophyllata* e *T. vulgaris* foi avaliada nas concentrações de MIC e 2MIC. Os valores obtidos (micélio seco) estão apresentados na Figura 4.

Os resultados experimentais referentes à produção de biomassa na presença dos óleos essenciais demonstram que, quando empregados na concentração de MIC e 2xMIC, os OE de *T. vulgaris*, *C. winterianus*, *C. martini* e *C. burmanii* reduziram a formação de micélio, proporcionalmente às concentrações empregadas (Figura 4). Isto foi confirmado pela análise estatística, uma vez que estas diferiram estatisticamente em relação ao controle ($p < 0,05$). Em contrapartida, os OE de *C. citratus* e *E. caryophyllata* inibiram totalmente o crescimento fúngico na concentração de 2MIC. Dessa forma, os OE de *E. caryophyllata* e *C. citratus* apresentaram efeito fungicida na concentração de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, o que corresponde também aos valores encontrados através dos ensaios de determinação da MFC – Concentração Fungicida Mínima (Tabela 4).

5.5. Efeito dos OE de maior atividade sobre o crescimento meio sólido

Os OE selecionados nas etapas anteriores foram avaliados quanto à ação sobre o desenvolvimento radial de *A. flavus* CCT 0614, em placas de Petri em meio sólido. Foram testados os óleos de *C. burmanii*, *C. citratus*, *C. martinii*, *C. winterianus*, *E. caryophyllata* e *T. vulgaris*, utilizando a metodologia descrita nos itens 4.9.8.1 e 4.9.8.1, nos tratamentos IP e AV. O crescimento radial foi medido diariamente e considerado como tempo final o momento em que o fungo atingiu o crescimento máximo na placa, ou quando não ocorreu alteração na medida do raio de crescimento por 48 h consecutivas.

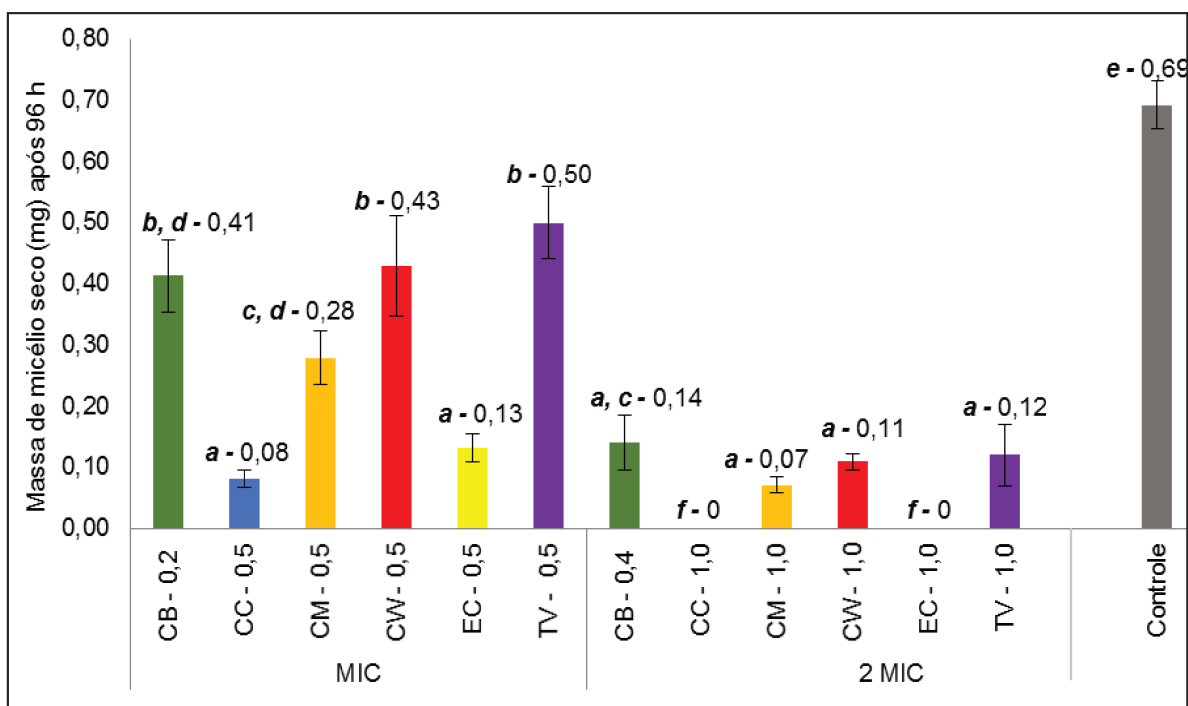


Figura 4. Produção de biomassa por *A. flavus* CCT 0614 após 96 horas na presença dos OE de maior atividade antifúngica.

Cultivo em meio líquido. MIC: OE na concentração (mg.mL^{-1}) mínima inibitória; 2MIC: OE na concentração (mg.mL^{-1}) de 2 vezes a MIC; OE: CB – *C. burmannii*; CC – *C. citratus*; CM – *C. martini*; CW – *C. winterianus*; EC – *E. caryophyllata*; TV – *T. vulgaris*; Controle – sem OE. Valores em cada coluna correspondem a média ($n=3$) e Teste Tukey, onde: letras iguais indicam que não há diferença estatística, $p<0,05$.

Em seguida, os valores de raio de crescimento (mm) foram convertidos em uma curva com regressão não-linear, devido a característica sigmoideal do crescimento observado e, a partir do modelo da equação da regressão foram determinados os tempos médios de fase *lag* (h) e a taxa média de crescimento (mm.h^{-1}), para cada OE. Os valores médios obtidos para esses parâmetros estão apresentados na Tabela 8.

Os resultados demonstraram que o único tratamento que não diferiu estatisticamente do controle no tempo médio de fase *lag* foi o referente ao OE de *C. burmannii* utilizado a 0,2 mg.mL^{-1} (IP) (Tabela 8).

Tabela 8. Taxa média de crescimento e tempo médio de fase *lag* de *A. flavus* em meio sólido, na presença de OE em teste incorporado (IP) e por ação dos voláteis (AV).

Tratamento	Concentração de EO (mg.mL ⁻¹)	Forma de aplicação	Tempo médio de fase <i>lag</i> (h) *	Taxa média de crescimento (mm.h ⁻¹) *
Controle	-	-	17,33 ± 3,86 ^a	0,21 ± 0,007 ^{E, F}
<i>C. citratus</i>	0,5	AV	182,8 ± 8,23 ^{d, e}	0,16 ± 0,012 ^{B, C}
<i>C. citratus</i>	0,5	IP	79,16 ± 21,4 ^b	0,16 ± 0,016 ^B
<i>C. winterianus</i>	0,5	AV	113,8 ± 7,12 ^c	0,20 ± 0,014 ^{D, E, F}
<i>C. winterianus</i>	0,5	IP	84,56 ± 17,2 ^b	0,19 ± 0,019 ^{D, E}
<i>T. vulgaris</i>	0,5	AV	113,0 ± 8,37 ^c	0,16 ± 0,016 ^{B, C}
<i>T. vulgaris</i>	0,5	IP	111,1 ± 12,6 ^c	0,15 ± 0,013 ^B
<i>C. martinii</i>	0,5	AV	165,1 ± 4,91 ^d	0,27 ± 0,016 ^G
<i>C. martinii</i>	0,5	IP	168,5 ± 24,5 ^d	0,18 ± 0,034 ^{C, D}
<i>E. caryophyllata</i>	0,5	AV	177,2 ± 22,9 ^{d, e}	0,15 ± 0,021 ^B
<i>E. caryophyllata</i>	0,5	IP	194,9 ± 9,17 ^e	0,15 ± 0,011 ^B
<i>C. burmanii</i>	0,2	IP	24,69 ± 3,80 ^a	0,22 ± 0,008 ^F
<i>C. burmanii</i>	0,2	AV	336,0 ^f	0 ^A

AV – ação dos voláteis do OE; IP – OE incorporado ao meio de cultura (IP); Controle – sem OE; * Valores apresentados como média (n = 10) ± desvio padrão; Teste *Tukey* - letras iguais indicam que não há diferença significativa, p < 0,05.

Por outro lado, quando a mesma concentração desse OE foi aplicada por AV, o crescimento fúngico não foi observado até o período máximo avaliado, ou seja, 336 h. Isso indica que os compostos voláteis presentes no óleo de *C. burmanii* podem ter sofrido volatilização no momento da incorporação ao meio de cultura (IP), reduzindo assim a ação do OE. Ainda, pode-se inferir que provavelmente os componentes de menor massa molecular, ou seja, os mais leves e mais voláteis presentes no OE de *C. burmanii* foram os responsáveis pela ação antimicrobiana, que formaram uma atmosfera mais saturada através do modo de aplicação por AV, impedindo o crescimento ou a germinação dos esporos inoculados. No caso da pretensão do uso de OE para tratamento de sementes, grãos ou

cereais visando inibir o desenvolvimento de fungos micotoxigênicos, principal objeto da investigação do presente estudo, o modo mais conveniente de aplicação seria, de fato, o AV. Isto porque evitaria o contato direto do OE com o alimento, e consequentemente modificações sensoriais do mesmo.

Investigações anteriores corroboram os resultados observados no presente trabalho para o OE de *C. burmanii*, e concordam na sugestão de que maior atividade antifúngica pode ser obtida através da ação dos componentes voláteis dos OE, do que quando os mesmos são aplicados através de solução aquosa impregnada ao meio sólido (INUOYE et al. 2000; NIELSEN; RÍOS, 2000; TULLIO et al. 2007). De acordo com Tyagi e Malik (2011a; 2011b) isto foi também observado para cepas de *A. flavus*, cuja inibição resultante da exposição aos compostos voláteis dos OE de *Mentha piperita* e *Eucalyptus globulus* foi significativamente maior do que quando os mesmos OE foram incorporados ao meio. Os OE de *E. caryophyllata* e *C. zeilanicum* também foram mais efetivos contra *A. flavus*, nas mesmas condições (LOPEZ et al., 2005).

Parece ser de consenso geral que a ação exercida pelos compostos voláteis dos OE apresenta vantagens em relação ao modo incorporado (IP). Matan e colaboradores (2006) verificaram ser necessário maior volume de OE quando aplicado através de seus voláteis, para garantir a mesma inibição do crescimento fúngico. No entanto, mesmo utilizando maior quantidade, os autores ressaltaram as vantagens da utilização do OE por AV para tratamento de produtos alimentícios, dentre essas a possibilidade de minimizar a influência sobre o sabor e aroma do produto, e também a de permitir sua utilização por liberação controlada.

Em relação ao tratamento utilizando o OE de *C. martinii* (Tabela 8), este diferiu do controle quanto ao tempo médio de fase *lag* e a taxa média de crescimento. Porém, ao contrário do observado para o OE de *C. burmanii*, os tratamentos IP e AV não interferiram na duração da fase *lag*. As taxas crescimento do OE de *C. martinii*, por sua vez, apresentaram valores estatisticamente distintos ($p < 0,05$), sendo de $0,18 \text{ mm.h}^{-1}$ (IP) e $0,27 \text{ mm.h}^{-1}$ (AV), indicando que a aplicação desse OE na forma IP exerceu maior influência na capacidade do fungo se desenvolver, retardando o crescimento. Através desse resultado fica evidenciado que mais do que a concentração do OE em si, a escolha do tratamento a ser

utilizado na prática dependerá das características do próprio OE, no que se refere à sua composição química e compostos voláteis presentes.

Os resultados referentes à taxa de crescimento de *A. flavus* na presença do OE de *C. winterianus* nos tratamentos IP e AV (0,19 e 0,20 mm.h⁻¹, respectivamente (Tabela 8) não diferiram estatisticamente do controle (0,21 mm.h⁻¹), apesar do atraso observado para a fase *lag* na presença do OE, indicando uma adaptação do fungo às condições do meio, uma vez que após este período o crescimento ocorreu sem alterações.

Dentre todos os OE estudados no presente trabalho, não houve diferenças entre os tratamentos IP e AV para *E. caryophyllata*, *C. citratus* e *T. vulgaris*. Entretanto, esses se destacaram em relação aos demais, uma vez que as menores taxas de crescimento de *A. flavus* foram observadas na presença destes OE, quando comparadas ao controle.

Diante do exposto, tanto em função dos resultados de inibição da taxa de crescimento, como pelo fato do *C. citratus* ser uma planta com bom rendimento em OE, além de ter baixo custo e ser facilmente adquirida comercialmente em grande quantidade, o OE de *C. citratus* foi selecionado para estudo de seu efeito sobre a produção de aflatoxina por *A. flavus*. Cabe salientar que, embora o OE de *C. burmanii* tenha demonstrado elevada inibição sobre *A. flavus* (Tabela 4), esta planta apresentou o mais baixo rendimento em óleo essencial (0,33%).

5.6. Efeito do OE de *C. citratus* na produção de aflatoxinas por *A. flavus*

O estudo do efeito do OE de *C. citratus* sobre a produção de aflatoxinas por *A. flavus* foi realizado conforme descrito anteriormente (itens 4.9.8.1 e 4.0.8.2. e 4.10), ou seja, através dos tratamentos IP e AV, nas concentrações correspondentes à de MIC (0,5 mg.mL⁻¹) e ½MIC (0,25 mg.mL⁻¹), após 15 dias da aplicação do OE. Não foram realizados ensaios na concentração correspondente à MFC (1,0 mg.mL⁻¹), pois a mesma causou completa inibição do micro-organismo, o que impediria a visualização dos efeitos sobre a produção de aflatoxinas, nessas condições. Foi incluído nos testes, controle sem óleo essencial. Os

valores médios obtidos para a produção de aflatoxinas na presença do OE de *C. citratus* estão apresentados na Tabela 9.

Com o objetivo de verificar a eficiência do método utilizado para extração das aflatoxinas produzidas pelo fungo a partir do meio de cultura, ensaios de fortificação com padrões das aflatoxinas AFB1 e AFB2 foram incluídos concomitantemente. Os valores médios de recuperação de AFB1 e AFB2 obtidos estão apresentados na Tabela 10.

O estudo dos efeitos do OE de *C. citratus* sobre a produção de aflatoxinas mostrou que houve diferença estatisticamente significativa quando o OE foi empregado por AV e IP ($p < 0,05$) (Tabela 9). No tratamento AV, as concentrações correspondentes à MIC ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) e $\frac{1}{2}$ MIC ($0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$) não diferiram entre si, mas reduziram cerca de 92% a produção de AFB1 em relação ao controle, no 15º dia. Quando o OE foi incorporado ao meio (IP), houve redução de 95% na produção de AFB1 na concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, enquanto houve um aumento de cerca de 53% na produção da micotoxina a $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$, após o mesmo período.

Em fungos aflatoxigênicos, a produção de aflatoxinas normalmente ocorre após a esporulação. Assim, determinados compostos que inibem o crescimento e a esporulação também foram relatados por inibir a produção de aflatoxinas (REIB, 1982). Jayashree e Subramanyam (1999) reportaram que o eugenol inibiu a produção de aflatoxinas sem efeito significativo no crescimento do micro-organismo até a concentração de 0.75 mg.mol^{-1} . Esses autores sugeriram que a ação anti-aflatoxigênica do eugenol pode estar relacionada com a inibição da etapa ternária da biossíntese de aflatoxinas, envolvendo peroxidação de lipídeos e oxigenação. Passone et al. (2012) descreveram também a habilidade do eugenol em inibir a peroxidação de lipídeos envolvida na produção de aflatoxinas, sem que diferenças significativas sobre o crescimento ou metabolismo primário ocorressem. Assim, a inibição do crescimento e da produção de toxinas não ocorre necessariamente em conjunto. Através desses relatos, há indícios que concentrações menores do que a concentração capaz de inibir o desenvolvimento fúngico podem afetar a produção de aflatoxinas, e dependendo do tempo de ensaio a produção pode aumentar ou diminuir.

A presença de AFB2 não foi detectada nesses ensaios, embora a cepa utilizada seja conhecida pela capacidade de produção da mesma, de acordo com o NRRL - *Northern Regional Research Laboratory*, USA.

Os efeitos do OE de *C. citratus* sobre a produção de aflatoxinas, observados no presente trabalho (IP) sugerem que concentrações sub-inibitórias do OE induziram a produção de AFB1 por *A. flavus*. A literatura relata que o OE de *C. citratus* a 3,0 mg.mL⁻¹ incorporado em meio sólido foi eficiente no controle de *A. flavus* (MISHRA; DUKEY, 1994). Também Mahmoud (1994) observou que citral, citronelol e eugenol, compostos encontrados no OE de *C. citratus* impediram o crescimento de *A. flavus* e a produção de aflatoxinas até o oitavo dia de incubação. De maneira similar a observada no presente trabalho, o autor relata que após 15 dias houve aumento da produção de micotoxinas, e sugere que em função do estresse causado pela presença de concentrações sub-inibitórias do OE, provavelmente tenha ocorrido uma mudança metabólica do fungo, que incorreu em acúmulo de micotoxinas.

Utilizando OE de *C. citratus* através da ação dos voláteis, Paranagama et al. (2003) demonstraram que a esporulação e o crescimento micelial de *A. flavus* foram inibidas em concentrações de 2,80 e 3,46 mg.mL⁻¹, respectivamente, e a produção de aflatoxinas inibida a 0,1 mg.mL⁻¹. Os autores relacionaram a atividade observada à presença dos compostos α -citral e β -citral no OE de *C. citratus*. Dikbas et al. (2008) estudaram o OE de *Satureja hortensis* e obtiveram inibição no crescimento de *A. flavus* na concentração de 25 μ L.mL⁻¹, enquanto a inibição total da produção da aflatoxina B1 foi observada em baixas concentrações de óleo (0,1 a 30 μ g.mL⁻¹), e inibições de 65 % e 48 % em concentrações extremamente baixas de OE (0,01 e 0,04 μ g.mL⁻¹, respectivamente).

Singh et al. (2010) constataram a atividade antifúngica e anti-aflatoxigênica do OE das espécies *Citrus maxima* e *C. sinensis*, e seu componente majoritário, o α -limoneno. Esses OE e suas combinações inibiram a produção de AFB1 com 0,5 mg.mL⁻¹, enquanto α -limoneno mostrou maior eficiência anti-aflatoxigênica a 0,25 mg.mL⁻¹.

Tabela 9. Efeito da aplicação do OE de *C. citratus* sobre a produção de aflatoxinas AFB1 e AFB2 por *A. flavus* CCT 0614.

Tratamento	Concentração de OE (mg.mL ⁻¹)	Forma de aplicação	Concentração de AFB1 (ng.g ⁻¹) *
Controle	-	AV	13,3 ± 6,3 ^{b, c}
<i>C. citratus</i>	0,25	AV	1,1 ± 0,6 ^a
	0,5	AV	1,3 ± 1,3 ^a
Controle	-	IP	7,8 ± 6,9 ^{a, b}
<i>C. citratus</i>	0,25	IP	14,7 ± 0,2 ^c
	0,5	IP	0,37 ± 0,7 ^a

AV: ação dos voláteis do OE; IP: OE incorporado ao meio de cultura.

*Valores apresentados como média (n =3) ± desvio padrão; Teste *Tukey* – letras iguais indicam que não há diferença estatística, p < 0,05.

Tabela 10. Valores de recuperação para níveis de fortificação com AFB1 e AFB2.

Padrão	Nível de fortificação (ng.g ⁻¹)	Tratamento	% Recuperação*	CV
AFB1	15,0	IP	46 ± 6,35	14
AFB2	6,0	IP	63 ± 10,78	17
AFB1	15,0	AV	61 ± 3,46	6
AFB2	6,0	AV	82 ± 5,77	7

IP – OE incorporado ao meio de cultura; AV – ação dos voláteis do OE;

* valores apresentados como % média de recuperação (n = 3) ± desvio padrão;

CV - % coeficiente de variação.

Tian et al. (2011) observaram que a inibição da produção de AFB1 em *A. flavus* pode não estar relacionada apenas à redução do crescimento fúngico, mas pode ser devido a inibição no catabolismo de carboidratos pela ação de algumas enzimas chaves, reduzindo sua habilidade em produzir aflatoxinas. Greene-McDowelle e coladores (1999) descreveram anteriormente, que em alguns casos, devido às alterações no desenvolvimento de conidióforos (redução radial do crescimento, perda de pigmentação micelial e

diminuição da esporulação) a biossíntese da aflatoxina pode ser afetada. Nesta etapa do presente trabalho, as culturas submetidas aos efeitos do OE de *C. citratus* foram observadas quanto a possíveis alterações morfológicas, após 15 dias. Nesses experimentos foi possível observar que ocorreu alteração na coloração do fungo na presença do OE, que sofreu alteração da cor original, de parcialmente verde claro (controle) para totalmente verde ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$), indicando que além das alterações observadas na produção de AFB1, ocorreram mudanças morfológicas na cultura de *A. flavus* (Figura 5 e 6).

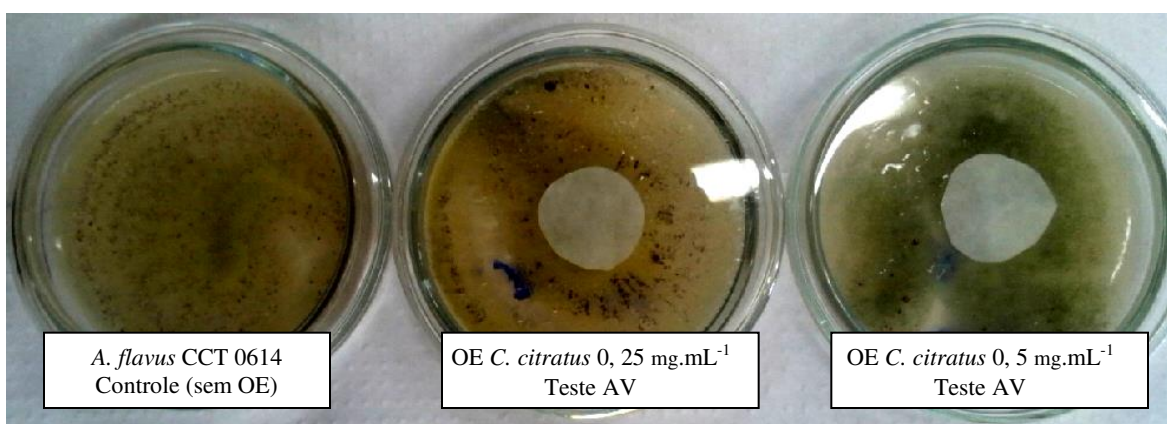


Figura 5. Ensaio de aplicação de OE de *C. citratus* na concentração de MIC ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) e $\frac{1}{2}$ MIC ($0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$) através da ação dos voláteis (AV).

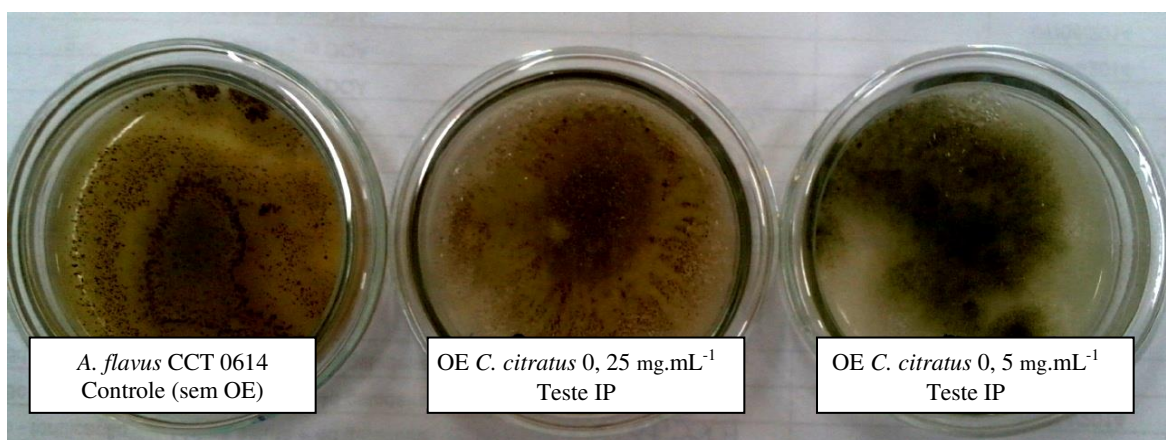


Figura 6. Ensaio de aplicação do OE de *C. citratus* na concentração de MIC ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) e $\frac{1}{2}$ MIC ($0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$) incorporado ao meio de cultura (IP).

5.7. Análise química dos OE e frações por Cromatografia a Gás (CG-EM)

Os óleos essenciais que apresentaram maior ação inibitória para *A. flavus* foram caracterizados quimicamente através de análise por CG-EM. Foram analisados os OE brutos, bem como as frações F1 e F2. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 11 a 16.

Através da análise química dos constituintes do OE de *C. burmanii* (Tabela 11), 99,6% dos constituintes foram identificados, sendo o (E) - cinamaldeído (37,9%) juntamente com o acetato de cinamila (35,5%) os compostos majoritários. Foi observada ainda a presença de borneol, terpineol, ácido benzoico e de outros compostos minoritários. Shan et al. (2007) também identificaram o (E) – cinamaldeído como composto majoritário e o relacionaram com a ação antimicrobiana exercida pelo OE de *C. burmanii*. Anteriormente, Li et al. (1987) encontraram a presença de d-borneol (70,8%) e outros 34 constituintes nas folhas de *C. burmanii*, enquanto Ji et al. (1991) analisaram o óleo essencial de folhas, ramos e casca desta espécie e encontraram 1,9 cineole, borneol, canfora, terpinen-4-ol e α -terpineol em maiores concentrações.

Em relação à análise química das frações de *C. burmanii*, foi observado na fração F1 o acetato de cinamila em maior concentração (48,4%) do que o (E) - cinamaldeído (16,5%). Na fração 2, o (E) - cinamaldeído (72,9%) foi identificado como majoritário, seguido do cinamil acetato (19,9%). Os resultados mostram que o fracionamento enriqueceu a F2 em cinamaldeído, condição em que foi observada maior atividade antifúngica (0,06 mg.mL⁻¹ – Tabela 4).

Através da análise cromatográfica foram identificados 99,6% dos compostos do OE de *E. caryophyllata* (Tabela 12), sendo possível observar que o composto majoritário desse OE foi o eugenol, que compreendeu 89,1% dos componentes presentes no OE. Outros compostos encontrados foram o acetato de eugenol, citronellal, citral, β -cariofileno e α -cariofileno, em menores proporções. Jirovetz et al. (2006) também identificaram o eugenol (89%), o acetato de eugenol (5-15%) e o β -cariofileno no OE de *E. caryophyllata*. Outros compostos importantes encontrados neste óleo podem ser o α -humuleno, β -pineno,

limoneno, farnesol, benzaldeído, 2-heptanona e hexanoato de etila (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014).

O fracionamento do OE de *E. caryophyllata* mostrou que a fração F1 ficou enriquecida do composto eugenol (76,3%), seguida do acetato de eugenol (10,8%). Cerca de 94% de eugenol foi identificado na fração F2.

Cerca de 96,3% dos compostos presentes no OE de *T. vulgaris* foram identificados (Tabela 13), verificando-se a predominância de timol (51,7%) e p-timol (24,0%), além de outros compostos em menor proporção, como o L- α -terpineol, o α -terpinoleno, o linalol, e o β -terpineol. Em um estudo realizado por Nikolić et al. (2014) foram encontrados no óleo de *T. vulgaris* 26 constituintes, representando 99,0% do total do óleo, sendo o timol o componente majoritário (49,1%) seguido do p-cimeno (20,0%).

No presente trabalho, o fracionamento do OE de *T. vulgaris* resultou na separação de p-timol e timol. Na fração F1, a concentração de p-timol foi maior (54,2%) do que timol (1,2%). Na fração F2 ocorreu o inverso, sendo o timol identificado em maior proporção (69,4%) e p-timol em menor (26,9%). A atividade antifúngica da F2 foi superior a da F1 e a do OE bruto, indicando uma possível ação do timol como composto ativo neste OE.

No óleo essencial de *C. martinii* (Tabela 14) empregado nesse estudo, foram identificados 96,9% dos componentes, onde o geraniol (60,2%) e acetato de geranila (24,1%) foram encontrados em maior porcentagem. Scherer et al. (2009) também identificaram o geraniol (80%) e o acetato de geranila (12%) em maiores concentrações neste OE. Em relação ao fracionamento, 69,1% de acetato de geranila e 12,6% de geraniol foram encontrados na fração F1, enquanto na fração F2 foi identificado o geraniol (87,2%).

Tabela 11. Composição química do OE bruto e frações de *C. burmanii*

I.R (min)	% Relativa			Composto químico
	Bruto	F1	F2	
13.507	0,38			Isopulegol
13.815	0,35	0,65	0,90	(R)-(+)- Citronelal
14.209	0,86	1,09	0,49	Benzenepropanal
14.350	1,39			Borneol
15.382	0,30			Tepineol
17.510	0,37	0,26	0,32	β -Citral
18.979	37,9	16,5	72,9	E - Cinamaldeído
22.426	0,33		0,18	Eugenol
22.977	1,69	2,12	1,26	Hidrocinamil isobutirato
25.013	0,19	0,24		Cariofileno
26.234	35,5	48,4	19,8	Acetato de cinamila
31.480	0,89	0,53	1,1	Oxido de cariofileno
38.151	16,5	27,5	8,3	Ácido benzóico
	99,6	97,3	76,1	TOTAL

IR– índice de retenção em minutos; % relativa – porcentagem relativa no OE bruto, fração 1 (F1) e fração 2 (F2).

Tabela 12. Composição química do OE bruto e frações de *E. caryophyllata*.

I.R (min)	% Relativa			Composto químico
	Bruto	F1	F2	
13.804	0,59	0,84	0,93	Citronelal
15.533	0,20	0,53		Salicilato de metila
17.505	0,20	0,37	0,36	<i>cis</i> - Citral
18.763	0,25	0,47	0,45	Citral
22.820	89,0	76,3	94	Eugenol
25.046	2,60	7,31		β - Cariofileno
26.402	0,39	1,22		α - Cariofileno
29.378	4,46	10,8	2,0	Acetato de eugenol
31.474	0,39	0,29	0,23	Óxido de cariofileno
	98,2	98,2	97,9	TOTAL

IR– índice de retenção em minutos; % relativa – porcentagem relativa no OE bruto, fração 1 (F1) e fração 2 (F2).

Tabela 13. Composição química do OE bruto e frações de *T. vulgaris*

I.R (min)	% Relativa			Composto químico
	Bruto	F1	F2	
11.643	1,89		0,15	Linalool
13.458	1,63			β -Terpineol
13.804	1,24	2,45	0,78	(R) – (+) Citronelal
14.258	0,76			Cis- β -Terpineol
14.825	0,94			Terpinen-4-ol
15.409	9,02			L- α -Terpineol
15.679	2,77			α -Terpinoleno
17.602	0,39		0,28	β -Citral
19.811	51,7	1,20	69,4	Timol
20.184	24,0	54,2	26,9	p-Timol
25.008	0,76	5,60		Cariofileno
31.463	0,37			Óxido de Cariofileno
38.016	0,74	5,58		Benzoato de benzenila
	96,2			TOTAL

IR– índice de retenção em minutos; % relativa – porcentagem relativa no OE bruto, fração 1 (F1) e fração 2 (F2).

Tabela 14. Composição química do OE bruto e frações de *C. martinii*.

I.R (min)	% Relativa			Composto químico
	Bruto	F1	F2	
11.654	2,28			β - Linalool
13.804	1,13			<i>trans</i> - Geraniol
17.505	0,56	0,91		α - Citral
18.380	60,1	12,6	87,2	Geraniol
18.844	2,06	3,73	0,68	Citral
22.437	0,27			Eugenol
23.663	24,0	69,1		Acetato de geraniol
25.030	1,27	0,21		Cariofileno
30.610	0,57	0,31	0,24	Butanoato de geranila
31.469	0,82	3,02		Óxido de Cariofileno
36.574	2,48	1,56	4,27	Nerolidol
37.714	0,99	0,18		Propanoato de nerila
40.706	0,29	0,42		Z,E-Nerolidol
	96,9			TOTAL

IR– índice de retenção em minutos; % relativa – porcentagem relativa no OE bruto, fração 1 (F1) e fração 2 (F2).

A análise do óleo essencial de *C. winterianus* mostrou (Tabela 15) a presença de (R)-(+)-citronelal (14,65%), β -citronelol (20,5%) e geraniol (10,1%) em maiores concentrações, e de δ -cadinene, elemol, γ -cadinene, τ -muurolol, e outros em menores porcentagens (Tabela CW). Foram identificados 94,3% dos componentes químicos deste OE. Os compostos presentes em maior proporção nas frações F1 e F2 foram (R)-(+)-citronelal e β -citronelol, respectivamente. Na literatura, esse OE é citado por ter mais de 80 substâncias, a partir do qual citronelal, citronelol, geraniol, limoneno e ésteres têm particular importância (MARCO et al., 2007).

Tabela 15. Composição química do OE bruto e frações de *C. winterianus*.

I.R (min)	% Relativa			Composto químico
	Bruto	F1	F2	
13.507	0,95			Isopulegol
13.896	14,6	31,5	1,27	(R)-(+)-Citronelal
17.110	20,5	0,41	27,3	β - Citronelol
18.185	10,1	0,68	13,5	Geraniol
18.785	0,66	0,62	0,41	α -Citral
22.291	3,23	11,5		2,6-Octadiene, 2,6-dimetil
22.442	1,56			Eugenol
23.549	1,10	3,73		Cis – Acetato de geranila
23.901	1,61	6,04		β -Elemeno
27.525	3,79	10,5		Germacreno D
28.039	0,36		0,34	Thujopseno
28.276	0,79	3,06		α -Muuroleno
28.816	0,79	2,40	0,36	7-epi- α -Cadineno
29.205	4,54	16,4		δ -Cadineno
30.243	9,86		18,9	Elemol
31.193	1,28			γ -Muuroleno
33.311	1,67	4,86	3,64	γ -Eudesmol
33.716	4,95	0,34	6,73	γ -Cadineno
33.862	0,81		1,43	α -Copaeno
34.002	1,24		2,47	β -Eudesmol
34.218	8,78		15,6	τ -Muurolol
34.694	0,61		1,25	γ -Selineno
37.281	0,20		0,70	<i>trans</i> -Farnesal
	94,9		93,9	TOTAL

IR– índice de retenção em minutos; % relativa – porcentagem relativa de OE bruto, fração 1 (F1) e fração 2 (F2).

A identificação dos compostos químicos presentes no OE das folhas de *C. citratus*, está descrita na Tabela 16. O OE apresentou como componentes majoritários o citral (47,3%) e o β – citral (28,9 %), além da presença de α -citral, eugenol, β -citronelal, óxido de cariofileno e outros compostos em menores percentagens. Ming et al. (1996) analisaram o óleo essencial de *C. citratus* proveniente do oeste da Índia, e verificaram como componente majoritário o citral. O citral é uma mistura de dois aldeídos monoterpênicos estereoisômeros: o isômero *trans*- geranial (40-62%) e o isômero *cis*-ceral (25-38%) (RAUBER; FIGUEIREDO; SCHAPOVAL, 2005).

No fracionamento do OE de *C. citratus* utilizado nesse estudo, tanto a fração F1 como a fração F2 apresentaram como majoritários os compostos citral e β – citral. O citral ocorreu em maior percentagem, sendo 44,3% na fração 1 e 55,2% na fração 2, e o β – citral em menor percentagem, de 34,9% e 31,6 % nas frações F1 e F2, respectivamente.

Tabela 16. Composição química do OE bruto e frações de *C. citratus*.

I.R (min)	% Relativa			Composto químico
	Bruto	F1	F2	
11.643	0,39			β -Linalool
13.810	1,70	1,85	0,94	β - Citronelal
14.285	2,0	1,55	0,34	Vinilciclooctano
15.041	1,90	2,61		Verbenol
15.997	0,43	0,83		Decanal
17.623	28,9	31,6	34,9	β - citral
18.110	2,85			α - Citral
18.947	47,3	44,3	55,2	Citral
22.426	2,26	1,61	1,61	Eugenol
23.177	2,25			Ciclohexeno – 3- propil
23.544	0,44	1,01		Acetato de geranila
25.008	0,64	1,54		Cariofileno
28.811	0,41	0,99		τ - Cadineno
31.474	2,44	3,96	1,13	Oxido de cariofileno
	93,5	91,9	94,2	TOTAL

IR– índice de retenção em minutos; % relativa – porcentagem relativa no OE bruto, fração 1 (F1) e fração 2 (F2).

Através da técnica de CG-EM é possível identificar grande número de compostos presentes nos OE. Os componentes majoritários podem, as vezes representar mais de 85% do total do óleo essencial, enquanto outros compostos aparecem em quantidades muito menores. No entanto, a proporção de cada componente pode não estar relacionada com a intensidade da atividade, sendo que, compostos traços podem ser fundamentais para a atividade biológica exercida pelo OE (GALINDO et al., 2010).

Os OE podem diferir na composição química em razão da variabilidade genética intraespecífica, condições ambientais, épocas de colheita, condições de cultivo, tipo de solo e parte da planta analisada (HAY et al., 1993). Estudos tem confirmado que algumas espécies têm genótipos distintos separados geograficamente (PASCUAL-VILLALOBOS; BALLESTA-ACOSTA, 2003; ANGIONI et al. 2004). De um modo geral, fatores genéticos parecem interferir mais na variação da composição química de OE, do que diferenças nas condições ambientais (NOVAK et al., 2006). Esses aspectos são importantes quando se pretende empregar OE como antifúngicos, uma vez que a composição química e a atividade dos OE estão intimamente relacionadas.

6. CONCLUSÕES

Através da avaliação do potencial antifúngico dos OE provenientes das 13 plantas medicinais e aromáticas estudadas no presente trabalho, podemos concluir que:

- Os OE de *C. burmanii*, *C. citratus*, *E. caryophyllata*, *C. martinii*, *C. winterianus*, *T. vulgaris* e *C. burmanii* apresentaram elevada atividade contra o fungo *A. flavus* CCT 0614;
- A combinação entre os OE mais ativos na proporção 1:1 não incorreu em melhoras na atividade antifúngica;
- As frações F2 dos OE de *C. burmanii* e *T. vulgaris* foram mais ativas do que os OE brutos, reduzindo a MIC de 0,2 para 0,065 mg.mL⁻¹ e 0,5 para 0,25 mg.mL⁻¹, respectivamente. No entanto, as frações apresentaram baixo rendimento;
- Em relação à produção de biomassa, os OE de *C. martinii*, *C. winterianus*, *T. vulgaris* e *C. burmanii* reduziram o crescimento de *A. flavus* nas concentrações referentes à MIC e 2MIC, redução que foi proporcional à concentração de óleo empregada, enquanto os OE de *E. caryophyllata* e *C. citratus* inibiram totalmente o desenvolvimento micelial à 2MIC;
- Os OE de *E. caryophyllata*, *T. vulgaris* e *C. citratus* reduziram o crescimento radial de *A. flavus* tanto quando incorporados ao meio de cultura (IP), como através da ação de seus compostos voláteis (AV), enquanto *C. martinii* apresentou maior efeito quando aplicado ao meio de cultura (IP);
- A aplicação do OE de *C. burmanii* por AV inibiu totalmente o crescimento de *A. flavus* no período avaliado (336 h), indicando ser a maior forma para aplicação desse óleo. No entanto, *C. burmanii* apresenta baixo rendimento em OE;
- O OE de *C. citratus* mostrou ser uma alternativa promissora tanto para controle do crescimento do fungo *A. flavus*, como da produção de AFB1 quando aplicado por AV, agindo mesmo em concentrações inferiores à de MIC.

7. REFERÊNCIAS

- AL-DHUBIAB, B. Pharmaceutical applications and phytochemical profile of *Cinnamomum burmannii*. *Pharmacognosy Revista*, v. 6, n. 12, p. 125-131, 2012.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.40, p.4168-70, 2001.
- ALMEIDA, E.A.P. Avaliação do potencial da espécie *Vetiveria Zizanioides* na fitorremediação de metais-traço presentes em ambientes aquáticos. 2011. 79p. Dissertação (Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Universidade Federal de Minas Gerais.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COISSON, J.D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 52, p. 3530-3535, 2004.
- AOAC, Association of Analytical Communities, Liquid Chromatographic Analysis of Aflatoxin Using Post-Column Photochemical Derivatization: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, v. 89, p. 678, 2006.
- ASHNAGAR, A.; GHARIB-NASERI, N.; RAMAZANI, M. Characterization of the major chemical compounds found in *Thymus vulgaris* plant grown wildly in Chahar Mahal and Bakhtiari province of Iran. *International Journal of PharmTech Research*, v.3, n. 1, p. 1-4, 2011.
- AZZIZ-BAUMGARTNER, E.; LINDBLADE, K.; GIESEKER, K.; ROGERS, HS.; KIESZAK, S.; NJAPAU, H.; SCHLEICHER, R.; MCCOY, L.F.; MISORE, A.; DE-COCK, K. et al. Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. *Environmental Health Perspectives*, v.113, p. 1779–1783, 2005.
- BANG, U. Screening of natural plant varieties to control the potato (*Solanum tuberosum*) pathogenes *Helminthosporium solani*, *Fusarium solani*, *Phoma foveata* and *Rhizoctonia solani*. *Potato Research*. V.50, p.185-203, 2007.
- BARRY, A.L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows A, Hauser WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shamody HJ. *Manual of clinical microbiology*. 5 ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991, p. 1117-1125.

BATA, A.; L'ASZTITY, R. Detoxification of mycotoxin contaminated food and feed by microorganisms. *Trends of Food Science and Technology*, v.10, p.223–228, 1999.

BATTILANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO, A. European research on ochratoxin A in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, v.11, S2- S4, 2006.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, v.13, n.3, p.497–516. 2003.

BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, C.L.L.; MENEZES, E.A.; MORAIS, S.M.; CUNHA, F.A.; CAVALCANTI, E.S.B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Revista Infarma*, v. 17, p. 80-83, 2005.

BUCHBAUER, G. Handbook of essential oils: Science, Technology and Applications. Baser, KHC e Buchbauer, G. *CRC Press*. Taylor e Francys: 2010, London, p. 235-280.

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

BULLERMAN, L. B.; LIEU, F. Y.; SEIER, S.A. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils. *Journal of Food Science*. v.42, n.4, p.1107–1109, 1977.

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

CALDAS, E.D.; SILVA S.C.; OLIVEIRA J.N. Aflatoxinas e ocratoxinas A em alimentos e riscos para a saúde humana. *Revista Saúde Pública*, v.36 n.3 p. 319-323, 2002.

CARMO, E.S.; LIMA, E.D.; SOUZA, E.L. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.39, p.362–367. 2008.

CARVALHO Jr.P.M de.; RODRIGUESA, R.F.O.; SAWAYAA, A.C.H.F.; MARQUESB, M.O.M.; SHIMIZUA, M.T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 95, p. 297–301, 2004.

CASEMG, Companhia de Armazéns e Silos do Estado De Minas Gerais. Disponível em: <http://www.casemg.gov.br/servicos/amost_index.htm> Acesso em 10 ago 2012.

CAST, Council for Agricultural Science and Technology. Mycotoxins: economics and health risks; Task Force Report 139. Ames, Iowa, USA, 2003.

CASTELLANI, D.C.; DOMENICO, C.; RONCOLETTA, L.M.A.; SILVA, A.C.; TOZAKI R.M.; OLIVEIRA, D.H. Technical coefficients of pripioca production (*Cyperus*

articulatus L.) in organic system at the region of Belém (PA). *Revista brasileira de plantas medicinais*, v.13. p. 606-611, 2011.

CHATTOTADHYAY, D.; ARUNACHALAM, G.; MANDAL, A.B.; SUR, T.K.; MANDAL, S.C.; BHATTACHARYA, S.K. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 82, p. 229-237, 2002.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; SCHUCHI, L.F.D.; RODRIGUES, M.R.A.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. In vitro activity of the essential oil of *Origanum vulgare* against *Sporothrix schenckii*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n.2, p. 513-516, 2008.

CLSI, M38 –A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: Approved standard M38- A2, 3rd. *National Committee Clinical*. 2008, Wayne, PA.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. e BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da Unicamp, 4ª edição, p. 17, 2006.

CORRÊA, B. Fungos toxigênicos: panorama nacional. Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos. Florianópolis: Vildes M. Scussel, 2000. p.162-168.

CORTÉS-ROJAS, D.F.; SOUZA, C.R.F de.; OLIVEIRA, W.P. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 4, n. 2, p.90–96, 2014.

COSTA, S. M. Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil *Lippia sidoides* Cham. 2001, 205p. Tese (doutorado em Química Orgânica). Universidade Federal do Ceará.

CRISTIANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; MICIELI, D. et al. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p.6300–6308, 2007.

DANH, L.T.; TRUONG P.; MAMMUCARI, R.; TRAN, T.; FOSTER, N. Vetiver grass, *Vetiveria zizanioides*: A choice plant for phytoremediation of heavy metals and organic wastes. *Internacional Journal of Phytoremediation*, v. 11, p. 664-691, 2009.

DANIEL, JH.; LEWIS, LW.; REDWOOD, YA.; KIESZAK, S.; BREIMAN, RF.; FLANDERS, WD.; BELL, C.; MWIHA, J.; OGANA, G.; LIKIMANI, S. et al. Comprehensive assessment of maize aflatoxin levels in Eastern Kenya, 2005–2007. *Environmental Health Perspectives*, v.119, p.1794–1799, 2011.

DAVIDSON, P.M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Food Microbiology: fundamentals and frontiers. Editors: Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; Montville, T.J. ASM Press, Washington, DC, 1997, p. 520-556.

DAYAN, F.E.; CANTRELL, C.L.; DUKE, S.O. Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medical Chemistry*, v. 17, p. 4022–4034, 2009.

DELAQUIS, P.J.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, v.74, p.101-109, 2002.

DELESPAUL, Q.; BILLERBECK, V.G; ROQUES, C.G; MICHEL, G; MARQUIER-VINUALES, C; BESSIERE, J.M. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. *Journal of Essential Oil Research*, v.12, p.256-266, 2000.

DIKBAS, N et al. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. *International journal of food microbiology*, v.124, n.2, p. 179-182., 2008.

DHINGRA, O.D.; COELHO NETTO, R.A. Micotoxinas em grãos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 6, p. 49-101, 1998.

D'MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C. Mycotoxins, v.69, n. 1–3, p. 155–166, 1997.

DOBSON, A. D. W. *Aspergillus flavus*. In.: Encyclopedia of Dairy Sciences 2nd ed. John W. Fuquay. *Editora Elsevier*. p. 785-791. 2011.

DUARTE, M. C., et al. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.97, n.2, p. 305-11, 2005.

EL-GENDY, S.M.; MARTH, E.H.; Growth of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of *Lactobacillus casei*. *Journal of Food Protection*, v.44, p.211–212, 1981.

ELLIS, W. O.; SMITH, J. P.; SIMPSON, B. K.; OLDHAM, J. H. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, v. 30, p. 403-439, 1991.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, v. 64. p. 711-713, 1998.

FASSEAS, M.K.; MOUNTZOURIS, K.C.; TARANTILIS, P.A.; POLISSIOU, M.; ZERVAS, G. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemistry*. v.106, n.3, p.1188–1194. 2008.

FDA: Food and Drug Administration. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition. Aflatoxin, p. 231. 2012.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C.; THRANE, U. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, v.33, p.85-102, 1996.

FIORI, A.C.G.; SCHWAN-ESTRATA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; VIDA, J.B.; SCAPIM, C.A.; CRUZ, M.E.S.; PASCHOLATI, S.F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. *Journal of Phytopathology*, v.148, p.483-487, 2000.

FONTENELLE, R.O.S.; MORAIS, S.M.; BRITO, E.H.S.; KERNTOPF, M.R.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; TOMÉ, A.R.; QUEIROZ, M.G.R.; NASCIMENTO, N.R.F.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Journal of Antimicrobial Chemistry*, v. 59, p. 934-940, 2007.

FOOD and INGREDIENTES BRASIL. Micotoxinas. *Revista FIB*. ed. 2, n 7, p. 32-40, 2009.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microbiologia de alimentos. São Paulo: Atheneu, 3ª edição, 2006, 186p.

FREIRE, F.C.O.; VIEIRA, I.G.P.; GUEDES, M.I.F.; MENDES, F.N.P. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, Documento n 110, 1ª edição, 2007. 48p.

GALINDO, L.A.; PULTRINI, A.M.; COSTA, M. Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. *Journal of Natural Medicines*, v.64, n.4, p. 436- 41, 2010.

GIBRIEL, Y.A.Y; HAMZA, A.S; GIBRIEL, A.Y; MOHSEN, S.M. In vivo effect of mint (*Mentha viridis*) essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* isolated from stored corn. *Journal of Food Safety*, v.31, p.445-451. 2011.

GISLASON, S.J. Food choice: a book about food chemistry, quality and safety. *Alpha nutrition*. Canadá, 2011, 73 p.

GONÇALEZ, E.; SOUZA, T.N.; ROSSI, M.H.; FELICIO, J.D.; CORRÊA, B. Avaliação da micoflora e ocorrência de micotoxinas em cascas de amendoim em diferentes estágios de maturação da vagem. *Ciência Agrotecnologia*, v.32, n.5, p.1380-1386, 2008.

GOULAS, A.E.; KONTOMINAS, M.G. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*. v.100, n.1, p. 287–296, 2007.

GOVARIS, A.; SOLOMAKOS, N.; PEXARA, A.; CHATZOPOULOU, P.S. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, v.137, n.2-3, 175-180. 2009.

GRANADA, G. et al. Caracterização de granolas comerciais. *Ciência e Tecnologia Alimentos*, Campinas, v. 23, n. 1, p. 87-91, 2003.

GRASSMANN, J.; ELSTNER, E.F. Essential oils - Properties and Uses. In.: Trugo, L.; Finglas, P. M., editors. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2nd Edition), Academic Press: 2003, p. 2177-2184.

GREENE-MCDOWELLE, D.M.; INGBER, B.; WRIGHT, M.S.; ZERINGUE, J.R. H. J. BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.E. The effects of selected cotton-leaf volatiles on growth, development and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*. *Toxicon*, New Orleans, v.37, p. 883-893, 1999.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, v. 86, p. 985-990, 1999.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F. Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils. In: *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. Halldor Thormar. Editora John Wiley. 2011, cap. 11, p. 270-293.

HAY, R. K. M.; SVOBODA, K. P. *Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production*; Hay, R. K. M.; Waterman, P. G., eds.; Longman Group: England, 1993, p. 5.

HELAL, G.A.; SARHAN, M.M.; ABU SHAHLA, A.N.K.; ABOU EL-KHAIR, E.K. Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* ML2-strain. *Journal of Basic Microbiology*, v.47, p.5-15. 2007.

HEMA, R.; KUMARAVEL, S.; SIVASUBRAMANIAN, C. GC-MS study on the potentials of *Syzygium aromaticum*. *Researcher*, v. 12, p.1-4, 2010.

HERMANN, G.; PINTO, F.T.; KITAZAWA, S.E.; NOLL, I.B. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 26, n. 1, p.7-10, 2006.

HOOD, J.R.; WILKINSON, J.M.; CAVANAGH, H.M.A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *Journal of Essential Oil Research*, v. 15, p. 428-433, 2003.

HOPE, R.; JESTOI, M.; MAGAN, N. Multitarget environmental approach for control of growth and toxin production by *Fusarium culmorum* using essential oil and antioxidant. In: *Advances in Stored Product Protection* ed. Credland, P.F., Armitage, D.M., Bell, C.H.,

Cogan, P.M. and Highley, E. 2002, p. 486–492. Proceedings of 8th International Working conference on Stored Product Protection (IWCSPP). York, UK: CABI publishing.

HUXLEY, A.J. New Royal Horticultural Society Dictionary of Gardening. 4 Vol. MacMillan Press, London, 1992.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.M. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*. v. 3, p.12. 2012.

IARC, International Agency for Research on Cancer. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, aflatoxins, v. 82, p. 1–556, 2002.

JAIMEZ, J.et al. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *Journal of Chromatography*, v. 882, p.1-10, 2000.

JAY, J.M. Microbiologia de alimentos. Trad. Tondo. E. C... [et al.].- ed.6.- Porto, Alegre: Artmed, 2005, p. 633.

JAYASHREE, T.; SUBRAMANYAM, C. Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Letters in Applied Microbiology*, v. 28, p. 179–183, 1999.

JEFF-AGBOOLA, Y.A.; ONIFADE, A.K.; AKINYELE, B.J; OSHO, I.B. In vitro antifungal activities of essential oil from Nigerian medicinal plants against toxigenic *Aspergillus flavus*. *Journal of Medicinal Plants Research*. v. 6, n.23, p.4048-4056, 2012.

Jl, X.; PU, Q.L.; GARRAFFO, H.M.; PANNELL, L.K. Essential oils of the leaf, bark and branch of *Cinnamomum burmannii* Blume. *Journal of Essential Oil Research*, v.3, p.373–5, 1991.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; STOILOVA, I. STOYANOVA, A.; KRASTANOV, A.; SCHMIDT, E. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 54, n.17, p.6303–6307, 2006.

JOHANN, S.; COTA, B.B.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.; PIZZOLATTI, M.G.; RESENDE, M.A.; ZANI, C.L.; KABAK, B; DOBSON, A.D.W; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.46, p. 593-619. 2006.

JUGLAL, S.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. *Journal of Food Protection*, v.65, n 4, p.683-7, 2002.

KABAK, B.; DOBSON, AD.; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 46, n.8, p.593-619, 2006.

KARAMAN, İ.; ŞAHİN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖĞÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 85, p. 231-235, 2003.

KAWASHIMA, L.M.; VALENTE, S.L.M. Effect of fumonisin B 1, aflatoxin B 1, B 2, G 1 and G2, ochratoxin A and zearalenone in corn products. *Ciencia e Tecnologia de alimentos*, v.26, p.516-521, 2006.

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.; MULLANEY, E.J.; DALY, C.B.; CARY, J.W. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamari* and *A. ochraceoroseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, p. 605–9, 2000.

KOTAN, R.; DIKBAS, N.; BOSTAN, H. Biological control of post-harvest disease caused by *Aspergillus flavus* on stored lemon fruits. *African Journal os Biotechnology*. v.8, v.2, p.209-214, 2009.

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULAMATSIS, A. Antimicrobial Activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the face of inoculated pathogens in chocolate. *LWT – Food Science and Technology*, v. 41, p.119 – 127, 2008.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. v.85, n.4, p. 633–640. 2004.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRASAD, C.S.; DUBEY, N.K. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post-harvest fungal infestation of food commodities. *Innovative Food Science and Emerging*, v.9, p.575-580, 2008.

LAKIĆEVIĆ, B. et al., Tempo® most probable number technique for the enumeration yeasts and moulds in Feed and food products. *Biotechnology in Animal Husbandry*, v.27, n.3, p.1329-1335, 2011.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, p.453–462, 2001.

LANCASTER, M.C.; JENKINS, F.P.; PHILP, J.M. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, v.192, p.1095-1096, 1961.

LEONI, L.A.B.; FURLANI, R.F.Z.; VALENTE, S.L.M.; OLIVEIRA, P.L.C. Ochratoxin A in Brazilian green coffee. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.21, n.1, p. 105-107, 2001.

LI, Y.; ZHU, L.; LU, B.; MEI, L.; LI, L.; JIA, L et al.; Studies of Mei Pian tree (*Cinnamomum burmanni* physiological type) as a new resource of natural d-borneol. *Plant Physiology Journal*, v.29, p. 527-31, 1987.

LOPEZ, P.; SANCHEZ, C.; BATTLE, R.; NERIAN, C. Solid and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 11, p. 6939-6946, 2005.

LOURENÇO, Alexandre (2006) Microbiologia. Disponível em: www.microbiologia.vet.br. Acessado em: 07 ago 2012.

MAGAN, N.; SANCHIS, V.; AKDRED, D. Role of spoilage fungi in seed deterioration. In: Aurora, D.K (Ed), *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental application*. Marcel Dekker, p.311-323, cap.28, ed 1, 2003.

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

MALELE, R.S. et al. Essential oil of *Cymbopogon winterianus* Jowitt from Tanzania: composition and antimicrobial activity. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, v.10, p.83-7, 2007.

MARCO, C.A.; INNECO, R.; MATTOS, S.H; BORGES, N.S.S.; NAGÃO, E.O. Características do óleo essencial de capim-citronela em função do espaçamento, altura e época de corte. *Horticultura Brasileira*, v. 23, n. 3, p. 429-432, 2007.

MARTINS, R. Amendoim: desafios da produção agrícola ao processamento industrial. Instituto de Economia Agrícola, São Paulo, 2005. Acesso em 20 jun 2012: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=3573>

MASHA, T. Immunoaffinity column clean-up techniques for detection aflatoxin M1 from Iranian milk in Guilan Province. Am. Euro. *Journal of Agricultural and Environmental*. v.8, n.6, p 662-665, 2010.

MATAN, N.; RIMKEEREE, H.; MAWSON, A.J.; CHOMPREEEDA, P.; HARUTHAITHANASAN, V.; PARKER, M. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 107, p. 180-185, 2006.

MATIAS, E.F.F; SANTOS, K. A.K.; ALMEIDA, T.S.; COSTA, J.G.M. da.; COUTINHO, H.D.M. Enhancement of antibiotic activity by *Cordia verbenacea* DC. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 29, n. 6, p. 1049-1052, 2010.

MENDONÇA, C.da S. Efeito do ácido indol butírico no enraizamento de estacas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). 1997, 43 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) -Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MILIĆEVIĆ, D. R.; ŠKRINJAR, M.; BALTIC, T. Real and Perceived Risks for Mycotoxin Contamination in Foods and Feeds: Challenges for Food Safety Control. *Toxins (Basel)*, v.2, n. 4, p.572–592, 2010.

MING, L.; FIGUEIREDO, R.; MACHADO, S.; ANDRADE, R. Yield of essential oil of and citral content in different parts of lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) *Poaceae*. In.: Proceedings of the International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. Mexico: Acta Horticulturae, Leiden: 1996, p. 555–559.

MISHRA, A.K.; DUBEY, N.K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Applied Environment of Microbiology*, v. 60, p. 1101–1105, 1994.

MOHAMADI SANI, A.; NIKPOOYAN, H.; MOSHIRI R. Aflatoxin M1 contamination and antibiotic residue in milk in Khorasan province, Iran. *Food and Chemical Toxicology*, v.48, p.2130–2132. 2010

MUSCARELLA, M.; IAMMARINO, M.; NARDIELLO, D.; MAGRO, D. L.; PALERMO, C.; CENTONZE, D., et al. Validation of a confirmatory analytical method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in foods and feed materials by HPLC with online photochemical derivatization and fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants Part A- Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, v. 26, p.1402 – 1410, 2009.

NGINDU, A.; JOHNSON, B.K.; KENYA, P.R.; NGIRA, J.A.; OCHENG, D.M.; NANDWA, H.; OMONDI, T.N.; JANSEN, A.J.; NGARE, W.; KAVITI, J.N et al. Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya. *Lancet*, v.1, p. 1346–1348, 1982.

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.

NIELSEN, P.V.; RIOS, R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology*, v. 60, n. 2, p. 219-229, 2000.

NIIR, Board. Processes for extraction of essential oils. The complete technology book of essential oils (aromatic chemicals), National Institute of Industrial Research, New Delhi, 2003, ed. 1, p. 550–565.

NIKOLIĆ, M.; GLAMOČLIJA, J.; FERREIRA, I.C.F.R.; CALHELHA, R. C.; FERNANDES, Â.; MARKOVIĆ, T.; MARKOVIĆ, D.; GIWELIE, A.; SOKOVIĆ, M. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *T. algeriensis* Boiss. and *T. vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, v. 52, p.183–190, 2014.

NOVAK, J.; BAHOO, L.; MITTEREGGER, U.; FRANZ, C. Composition of individual essential oil glands of savory (*Satureja hortensis* L., Lamiaceae) from Syria. *Flavour Fragrances Journal*, v.21, p.731–734, 2006.

NOVAK, J.; MARN, M.; FRANZ, C. An α -pinene chemotype in *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, v. 18, p. 239–241, 2006.

NUNES, I. L. et al. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 23, n. 2, p. 190-194, 2003.

NYCHAS G.J.E. Natural Antimicrobials from plants. In: *New Methods of Food Preservation*, Ed G.W. Gould, Blackie Academic, 1995, pp. 58-89, cap. 4.

OLIVEIRA, M.S.; PRADO, G.; JUNQUEIRA, R.G. Comparação das técnicas de cromatografia em camada delgada e ELISA na quantificação de aflatoxinas em amostras de milho. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.20 n.3, 2000.

OLIVEIRA, O.R.; TERAPO, 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, 2008.

OLIVEIRA, W.A. Atividade do óleo essencial de *C. winterianus* Jowitt ex Bor contra *Candida albicans*, *A. falvus* e *A. fumigatus*. 2011, 163f. Tese (Produtos naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

OMIDBEYGI, M.; BARZEGAR, M.; HAMIDI, Z.; NAGHDIBADI, H. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, v.18, p.1518–1523. 2007.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L. et al., Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana de determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PAPACHRISTOS, D.P.; KARAMANOLI, K.I.; STAMOPOULOS, D.C.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. The relationship between the chemical composition of three essential oils and their insecticidal activity against *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Pest management science*, v. 60, n. 5, p. 514-20, 2004.

PARDO, E.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolated on grapes. *Food Microbiology*, v.22, p.383-389, 2005

PASCUAL-VILLALOBOS, M.J.; BALLESTA-ACOSTA, M.C. Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. *Biochemistry of System Ecology*, v. 31, p. 673–679, 2003.

PASSONE, M.A.; GIRARDI, N.S.; FERRAND, C.A.; ETCHEVERRY, M. In vitro evaluation of five essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored peanuts from *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* contamination. *International Journal of Biodeterioration e Biodegradation*. v. 70, p. 82–88, 2012.

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.

PIECADE, F.S.; FONSECA, H.; GLÓRIA, E.M.; DOMINGUES, M.A.C.; PIECADE, S.M.S.; BARBIN, D. Distribution of aflatoxins in corn fraction visually segregated for defects. *Brazilian journal of microbiology*, n.33, p.250-254, 2002.

PIMENTEL, F.A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L.B.; 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 excelsa*). *Acta Amazonica*. v. 40, n. 1, p. 213-220, 2010.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325p.

PITT, J. I. Biocontrol of aflatoxins in peanuts. In: Meeting the mycotoxins menace. Barug et al. Wageningen Acad. Publ. *The Netherlands*. 1ª Edição, 2004. Pg 144.

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

- POPPE, L.; VANHOUTTE, S.; HÖFTE, M. Modes of action of *Phantoea agglomerans* CPA-2, an antagonist of postharvest pathogens on fruits. *European Journal of Plant Pathology*. v.109, 963-973, 2003.
- PRADO, M. R. Isolamento de *microsporum canis*, *Malassezia* spp. e *Candida tropicalis* em cães: um destaque para teste de sensibilidade de malassezia *Pachydermatis in vitro*. 2007, 143p. Tese (doutorado em ciências veterinárias) Universidade Estadual do Ceará.
- PRAKASH, B.; SINGH, P.; KEDIA, A.; DUBEY, N.K. Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system. *Food Research International*, v. 49, p. 201–208, 2012.
- PRASHAR, A.; HILI, P.; VENESS, R.G.; EVANS, C.S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*. v.63, n.5, p.569-75, 2003.
- PRIPDEEVECH, P.; WONGPORNCHAI, S.; PROMSIRI, A. Highly volatile constituents of *Vetiveria zizanioides* root grown under different cultivations. *Molecules*, v. 11, p. 817-826, 2006.
- QUITANS-JUNIOR, L.J.; SOUZA, T.T.; LEITE, B.S.; LESSA, N.M.N.; BONJARDIM, L.R.; SANTOS, M.R.V.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; ANTONIOLLI, A.R. Phytochemical screening and anticonvulsant os *C. winterianus* Jowit (Poaceae) leaf essential oils in Rodents. *Phytomedicine*, v.15, p.619-624, 2008.
- RAOA, B.R.R.; KAULA, P.N.; SYAMASUNDARB, K.V.; RAMESHB, S. Chemical profiles of primary and secondary essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. motia Burk.) *Industrial Crops and Products*. v. 21, n.1, p.121–127, 2005.
- RASOOLI, I.; ABYANEH, M.R. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, v.15, p.479–483. 2004.
- RAUBER, S.; GUTERRES, S.S.; SCHAPOVAL, E.E. LC determination of citral in *Cymbopogon citratus* volatile oil. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.37, p.597–601, 2005.
- RAZZAGHI-ABYANEH, M.M.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.B.; REZAEI, K.; JAIMAND, S.; ALINEZHAD, R.; SABERI, R.; YOSHINARI, T. Chemical composition and antiaflatoxinogenic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food Control*, v.20, p.1018-1024. 2009.
- REDDY, M.V.B.; ANGERS, P.; GOSSELIN, A.; ARUL, J. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*, v.47, n. 8, p.1515–1520, 1998.

REID, L.M.; MATHER, D.E.; BOLTON A.T.; HAMILTON R.I. Evidence for a gene for silk resistance to *Fusarium graminearum* ear rot of maize. *Journal of Heredity*, v.85, p.118–121, 1994.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Técnicas analíticas para micotoxinas. In: IV Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, 4-8 outubro, 1988, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 1989. p. 245-247.

RUSTOM, I.Y.S.; Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, v.59, p.57–67, 1997.

SAHM, D. F.; WASHINGTON, J. A.II. Antibacterial susceptibility tests: dilution methods. In: Manual of Clinical Microbiology. ed. A. Balows. Washington, DC: American Society for Microbiology. 5ªEdição, 1991, p. 1105-1116.

SANKARIKUTTY, B.; NARAYANAN, C.S. Essential Oils - Isolation and Production. In.: Trugo, L.; Finglas, P. M., editors. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2nd Edition), Academic Press: 2003, p. 2185–2189.

SANTOS, F.M.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; ALVARENGA, A.A.; ALVES, M.N.; DUARTE, M.C.T.; SARTORATTO, A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from the leaves and flowers of *Aloysia gratissima*. *Revista brasileira de plantas medicinais*, v.15, n.4, 2013.

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. *Revista Brasileira de Ciencia na Avicultura*, v. 2 n.1, 2000.

SARTORATTO A.; AUGUSTO, E. Application of headspace solid phase microextraction and gas chromatography to the screening of volatile compounds from some brazilian aromatic plants. *Chromatographia*, v.57, p.351-356, 2003.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composition and antioxidant and antimicrobial activities of clove, citronella and palmarosa essential oils. *Revista brasileira de plantas medicinais*, v.11 n.4, 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, jan./abr., 2001.

SCUDAMORE, A. K.; BANKS, J.N. The fate of mycotoxins during cereal processing. In: Meeting the mycotoxins menace. Barug et al. *Wageningen Acad. Publ.* The Netherlands, 2004. Pg 165.

SEYDIM, A.C.; SARIKUS, G.; Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, v. 39, n.5, p.639–644. 2006.

SHAN B.; CAI Y.Z.; BROOKS J.D.; CORKE, H. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): Activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. v.55, p 5484–90, 2007.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: *Editora Guanabara Koogan*, 1ª Edição, 2004. cap. 5, p. 41-49.

SILVA, F. C. da. Taxonomia polifásica de *Aspergillus* seção Flavi e aplicação de óleos essenciais para controle de fungos aflatoxigênicos. 2012. 115 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA, C.C; VANDRESEN, F; OLIVEIRA, C.M.A; KATO, L; TANAKA, C.M.A; FERREIRA, H.D. Chemical composition of *Aloysia gratissima* (Gill. et Hook) Tronc. (Verbenaceae). *Biochemistry System of Ecology*, v.34, p.593-595, 2006.

SIMIC, A.; SOKOVIC, M.D.; RISTIC, M. et al. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research*, v.18, p.713–717. 2004.

SINGH, J.; BAGHOTIA, A.; GOEL, S.P. *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family Myrtaceae): A Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. v.3, n.4, 2012.

SINGH, P.; SHUKLA, R.; PRAKASH, B.; KUMAR, A.; SINGH, S.; MISHRA, PK.; DUBEY, N.K. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 1734–1740, 2010.

SINGH, P.; SRIVASTAVA, B.; KUMAR, A. et al. Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.88, p.2421–2425. 2008.

SINHA K.K. Detoxification of mycotoxins and food safety. In.: Sinha, K.K.; Bhatnagar, D., editors. *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Marcel Dekker, Inc.: New York, NY, USA: 1998. pp. 381–405.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, T. A. Princípios de análise instrumental. Edi. Bookman, Porto Alegre, 5ª Edição, 2002, 836p.

SOLIMAN, K.M.; BADEA, B.I.; Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chemistry Toxicology*, v. 40, p.1669-1675. 2002.

SOUZA, G.C.; HAAS, A.P.; VON- POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, Jan. v. 90, n. 1, p.135-43, 2004.

- SPRINGFIELD, E.P.; AMABEOKU, G.; WEITZ, F.; MABUSELA, W.; JOHNSON, Q. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. *Phytomedicine*, v. 10, p. 434-439, 2003.
- TABATA, S. Mycotoxins: Aflatoxins and Related Compounds. In.: Encyclopedia of Dairy Sciences 2nd ed. John W. Fuquay. Editora Elsevier, 2011, p. 805-811,
- TAO, N.; OUYANG, Q.; JIA, L. Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism. *Food Control*, v. 41, p. 116-121, 2014.
- TIAN, J.; BAN, X.; ZENG, H.; HE, J.; HUANG, B.; YOUWEI, W. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *International Journal of Food Microbiology*, v. 145, p. 464-470, 2011.
- TIAN, J.; BAN, X.; ZENG, H.; HUANG, B.; HE, J.; WANG, Y. In vitro and in vivo activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. *Food control*, v.22, p.1991-1990. 2011.
- TOURNAS, V.; STACK, M.E.; MISLIVEC, P.B.; KOCH, H.A.; BANDLER, R. Yeasts, Molds and Mycotoxins. In: Bacteriological Analytical Manual, Editora: Revision A, 8ª Edição, 1998. cap.18.
- TRIPATHY, P.; DUBEY, N.K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables- a review. *Postharvest Biology and Technology*, v.32, p. 235-245, 2004.
- TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MOZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v.49, p. 2474-2478, 2005.
- TROVATI, G.; et al. Essential oil composition of *Aloysia gratissima* from Brazil. *Journal Essential Oil Research*, v.21, p.325-326, 2009.
- TRUCKSESS, M.W. Rapid analysis (thin layer chromatographic and immunochemical methods) for mycotoxins in foods and feeds. In.: Koe, W. J. De.; Samson, R. A.; Egmond, H. P. Van.; Gilbert, J.; Sabino, M. Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium. Proceedings of the Tenth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins Guarujá, Brazil, May 21-25, 2001.
- 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.

TUNLID, A.; TALBOT, N.J. Review: Genomics of parasitic and symbiotic fungi. *Current Opinion in Microbiology*, v. 5, n. 5, p. 513–519, 2002.

TYAGI, A.K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, v. 126, p. 228–235, 2011a.

TYAGI, A.K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food Control*, v. 22, p. 1707–1714, 2011b.

UE, Regulamento (CE) Nº 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, 5 – 24, 2006.

VIEGAS, E. de C. Emprego de Óleos Essenciais de Plantas Medicinais no Controle de *Aspergillus* spp. em Sementes de Amendoim (*Arachis hypogaea* L.). 2004. 78 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Seropédica: UFRRJ.

VIEGAS, E. C.; ROSSETTO, C. A. V. Contaminação por *Aspergillus* spp. em *Arachis hypogaea*. *Agronomia*, v.40, n. 1-2, p.73 - 82, 2006.

WHITAKER, T.B. Sampling foods for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, v.23, p.50–61, 2006.

WHITAKER, T.B; SLATE, A.B; JOHANSON, A.S; Sampling feeds for mycotoxin analisis In : DIAZ, D.E. The mycotoxin blue book, Nottingham: Nottingham University Press, 2005. p. 1-21

YU, J.; EHRLICH, K.C.; CARY, J.W.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.E.; PAYNE, G.A.; LINZ, J.E.; WOLOSHUK, C.P.; BENNETT, J.W. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. Contamination of crops. *Applied and Environmental Microbiology*. v.70, p.1253 - 1262, 2004.

ZANANDREA, I.; JULIANO D. S.; ANDRÉA, B. M.; JULIANE, L.; VERIDIANA K. B. Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimentos micelial em placas. *Revista brasileira de farmacognosia*, v. 14, p. 14-16, 2004.

ZGODA, J.R.; PORTER, J.R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharmaceutical Biology*. v. 39, p. 221-225, 2001.

ZHENG, M. Z.; RICHARD, J. L.; BINDER, J.; A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*, v. 161, p. 261, 2006.

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.*, v. 18, p. 10-12, 2006.

ANEXOS

ANEXO A. Quantidade de OE empregada e a quantidade (mg) obtida para cada fração (F) e total.

OE	Quantidade usada (mg)	OE obtido após o fracionamento (mg)				
		F1	F2	F3	F4	Total
<i>C. burmanii</i>	8,16	5,48	1,55	0,24	0,09	7,36
<i>E. caryophyllata</i>	8,75	1,8	3,87	0,11	0,03	5,81
<i>C. citratus</i>	8,01	2,19	2,28	0,27	0,13	4,87
<i>C. winterianus</i>	5,13	1,47	1,4	0,32	0,36	3,55
<i>C. martinii</i>	5,74	0,34	0,64	0,17	0,29	1,44
<i>T. vulgaris</i>	5,98	1,49	1,36	0,39	0,12	3,36

ANEXO B. Porcentagem de Rendimento (%) final de cada fração (F) de OE e rendimento total do processo de fracionamento.

OE	OE obtido após o fracionamento (%)				
	F1 %	F2 %	F3 %	F4 %	Total %
<i>C. burmanii</i>	67,2	19,0	2,9	1,1	90,2
<i>E. caryophyllata</i>	20,6	44,2	1,3	0,3	66,4
<i>C. citratus</i>	27,3	28,5	3,4	1,6	60,8
<i>C. winterianus</i>	28,7	27,3	6,2	7,0	69,2
<i>C. martinii</i>	5,9	11,1	3,0	5,1	25,1
<i>T. vulgaris</i>	24,9	22,7	6,5	2,0	56,2

ANEXO C. Tabelas com as medidas perpendiculares do raio (mm) das colônias de *A. flavus* no estudo de crescimento em meio sólido a partir do emprego dos OE de maior atividade incorporado (IP) e pela ação dos voláteis (AV) em todas as repetições (R).

Controle					
	Medidas de raio de crescimento (mm)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
R1	2	11,5	20	21,5	22
R2	2,5	12	19,5	21	22
R3	3,5	12,5	19	20,5	22
R4	6,5	15	21	21,5	22
R5	5	15,5	20,5	21	22
R6	6	15,5	21	21,5	22
R7	2	10,5	18	19,5	21,5
R8	2	10	14	19	21,5
R9	1	9,5	18,5	20	21,5
R10	2,5	11	18	19	22

<i>C. burmanii</i> 0,2 mg.L ⁻¹ IP					
	Medidas de raio de crescimento (mm)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
R1	1,5	8	16,5	20,5	21,5
R2	1,5	6,5	14	20	21
R3	1,5	7	14	19	20,5
R4	3	7	16,5	20,5	22
R5	3,5	8,25	18	21	22
R6	3	7,75	17	20,5	22
R7	0,5	3	9,5	17	21,5
R8	0	2,5	9	17,5	21,5
R9	0,5	3	9,5	17,5	21
R10	0,5	3,5	9,5	18	21

<i>C. citratus</i> 0,5 mg.L ⁻¹ IP					
	Medidas de raio de crescimento (mm)				
	96 h	120h	144h	168h	192 h
R1	3	6	9,5	14	18
R2	4	8,5	13	13	19
R3	5	9	14,5	14,5	20,5
R4	5	13	16	20,5	22
R5	4	11	17,5	18,5	22
R6	11,5	20,5	22	22	22
R7	1	4	8,5	14,5	17,5
R8	3,5	5	9	14,5	17
R9	2	4,5	8,5	14	17
R10	1	4,5	8	14	16,5

<i>C. citratus</i> 0,5 mg.L ⁻¹ AV						
	Medidas de raio de crescimento (mm)					
	192 h	216 h	240 h	264 h	288 h	312 h
R1	1,5	5	11,5	14,5	19	21
R2	2,5	8,5	14	16,5	21,5	21,5
R3	0,5	3,5	7,5	14	19,5	21
R4	4	7	10,5	14,5	18,5	21
R5	1,5	3,5	12	16,5	19	21,5
R6	4,5	8,5	12,5	15	19	21
R7	2,5	4,5	11,5	13,5	16,5	19
R8	3	5,5	11	13,5	17	20,5
R9	2,5	5	11,5	15	18	21
R10	0,5	4,5	10	14,5	18,5	21

<i>E. caryophyllata</i> 0,5 mg.L ⁻¹ IP							
	Medidas de raio de crescimento (mm)						
	192h	216h	240h	264h	288h	312h	336h
R1	1	2	4	6,5	9,5	16,5	21
R2	1	4	9,5	10	16,5	19,5	21,5
R3	1	2	3,5	6	11,5	18	22
R4	0	2	4,5	8	13	15,5	19
R5	0	0,5	3,5	6,5	11,5	15	19
R6	1	3	4,5	9,5	15,5	16,5	20
R7	0	4,5	8	9,5	14	16,5	19
R8	2	5	7	9	13,5	14,5	21
R9	1	5	8,5	11,5	13,5	14,5	20,5
R10	2,5	5,5	8,5	12	15	15	21,5

<i>E. caryophyllata</i> 0,5 mg.L ⁻¹ AV						
	Medidas de raio de crescimento (mm)					
	192h	216h	240h	264h	288h	312h
R1	3	4,5	11,5	14,5	18,5	21
R2	4	8,5	13	15,5	18,5	21,5
R3	1	4	10,5	14	17	20
R4	0	4	9,5	13,5	16,5	18
R5	3	9	11,5	14,5	17,5	19
R6	8,5	13	15	16,5	19	19
R7	6,5	8,5	12,5	19	20,5	20,5
R8	4	7	10,5	18,5	20	20
R9	0	4	10,5	17,5	19	19
R10	0	3,5	4	16,5	19	19

<i>C. winterianus</i> 0,5 mg.L⁻¹ IP					
Medidas de raio de crescimento (mm)					
	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h
R1	2,5	8,5	13,5	20,5	22
R2	4,5	11,5	14,5	21	22
R3	11,25	19	20,5	21,5	22
R4	2	7	10,5	16,5	20
R5	0	1,5	8,5	13	16,5
R6	3	8	12,5	18	21
R7	3	7,5	10	16	19,5
R8	2,5	6,5	9	15,5	19
R9	2	7	10	15	20
R10	3,5	6,5	9	14,5	21

<i>C. winterianus</i> 0,5 mg.L⁻¹ AV					
Medidas de raio de crescimento (mm)					
	120 h	144 h	168 h	96 h	216 h
R1	1,5	8	16,5	20,5	21,5
R2	1,5	6,5	14	20	21
R3	1,5	7	14	19	20,5
R4	3	7	16,5	20,5	22
R5	3,5	8,25	18	21	22
R6	3	7,75	17	20,5	22
R7	0,5	3	9,5	17	21,5
R8	0	2,5	9	17,5	21,5
R9	0,5	3	9,5	17,5	21
R10	0,5	3,5	9,5	18	21

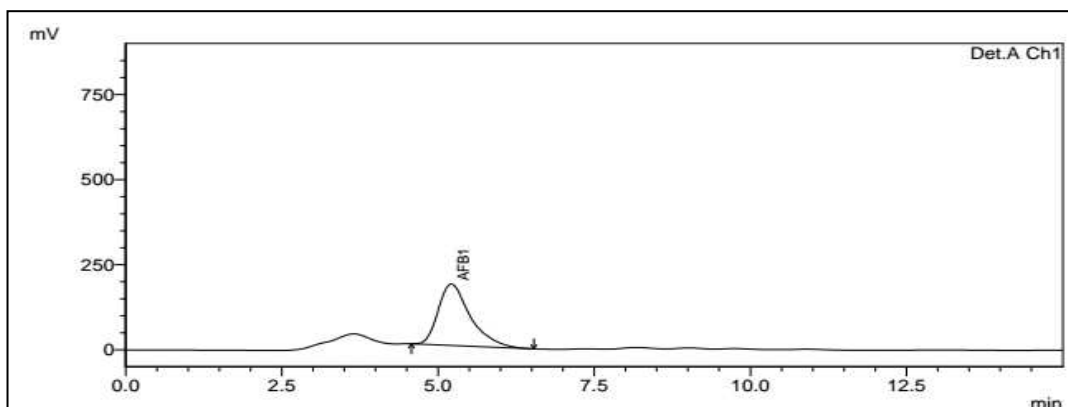
<i>C. martinii</i> 0,5 mg.L⁻¹ IP					
Medidas de raio de crescimento (mm)					
	192h	216h	240h	264h	288 h
R1	3	5	13,5	20,5	22
R2	1	1,5	5,5	16,5	19
R3	4	8	14	21,5	22
R4	8,5	19	20,5	21	22
R5	9,5	12,5	16,5	19	22
R6	8,25	14	17	19	19
R7	4	8,5	11	16,5	21
R8	4,5	8	9,5	15,5	19
R9	3	7	10	17	21,5
R10	2,5	8	11	14	21

<i>C. martinii</i> 0,5 mg.L⁻¹ AV				
Medidas de raio de crescimento (mm)				
	168 h	196 h	216 h	240h
R1	1,5	3,5	5	17,5
R2	3,5	8,5	15	20,5
R3	1	5,5	13,5	19
R4	0	8,5	12,5	19
R5	1	8	16,5	21,5
R6	3,5	10,5	22	22
R7	3,5	5	12	19
R8	0	5,5	13,5	19,5
R9	1	4,5	10,5	19
R10	3,5	5,5	11,5	22

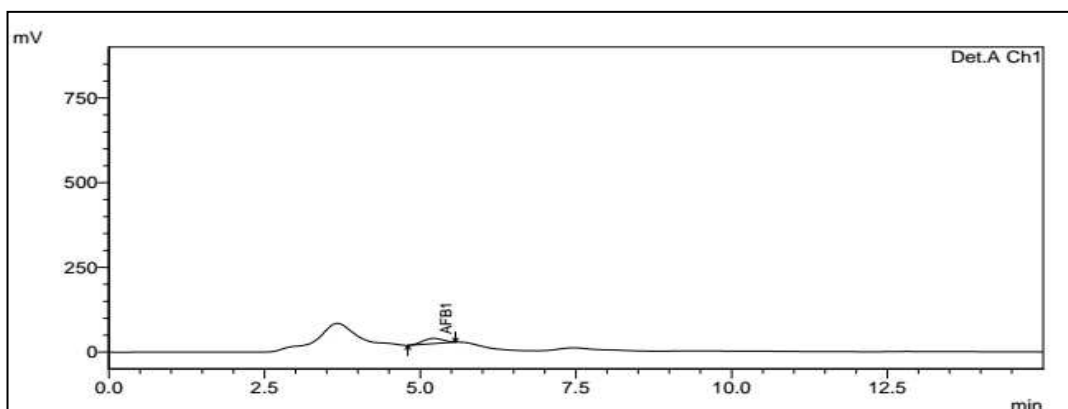
<i>T. vulgaris</i> 0,5 mg.L⁻¹ IP						
Medidas de raio de crescimento (mm)						
	120 h	144 h	168 h	196 h	216 h	240h
R1	1,5	7	10,5	14,5	20	20
R2	2	4,5	11,5	14	19	19
R3	0,1	2	2	4	10	19
R4	0,1	11	18,5	20	20	20
R5	4	10,5	17	19	19	19
R6	5	11	17	19	20,5	20,5
R7	1,5	4,5	8,5	12,5	18	19
R8	2,5	5,5	9	11,5	17	20,5
R9	2	5,5	9,5	11	16,5	19
R10	2	6	8,5	11,5	17	19

<i>T. vulgaris</i> 0,5 mg.L⁻¹ AV						
Medidas de raio de crescimento (mm)						
	120 h	144 h	168 h	196 h	216 h	240h
R1	2,5	6	9	13	16,5	20
R2	0	2,5	6,5	9	14	21,5
R3	2	6,5	9,5	14	17,5	22
R4	5	6,5	9,5	12	16,5	19
R5	3	4,5	11	13,5	18	20
R6	5,5	7,5	12	15	19	20,5
R7	1,5	4,5	8,5	12,5	18	19
R8	2,5	5,5	9	11,5	17	20,5
R9	2	5,5	9,5	11	16,5	19
R10	2	6	8,5	11,5	17	19

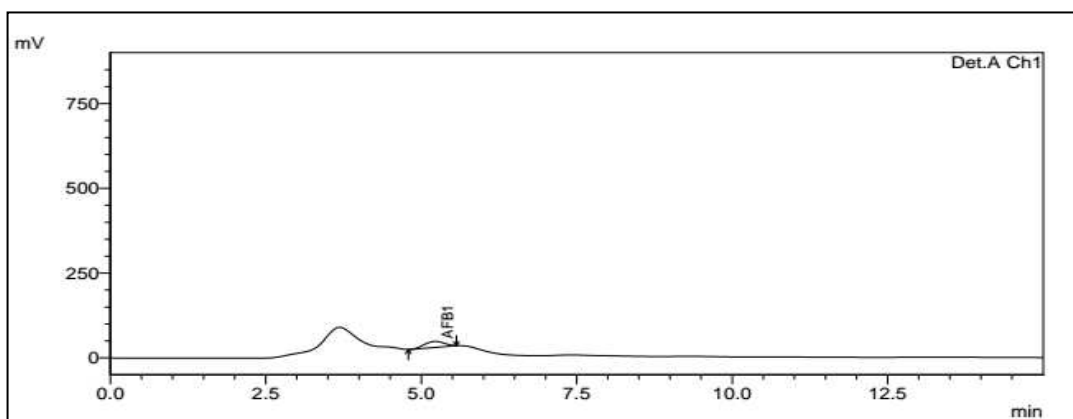
ANEXO D. Cromatogramas CLAE-FL correspondente aos ensaios de quantificação de aflatoxinas produzidas por *A. flavus*.



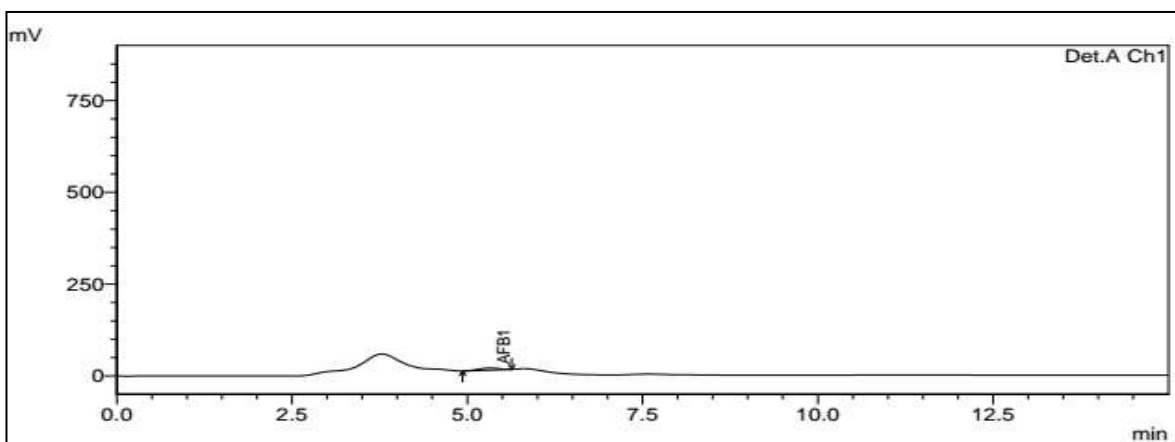
Cromatograma D.1: Controle do fungo (sem OE). AFB1 (5.208); Aflatoxina (tempo de retenção em min).



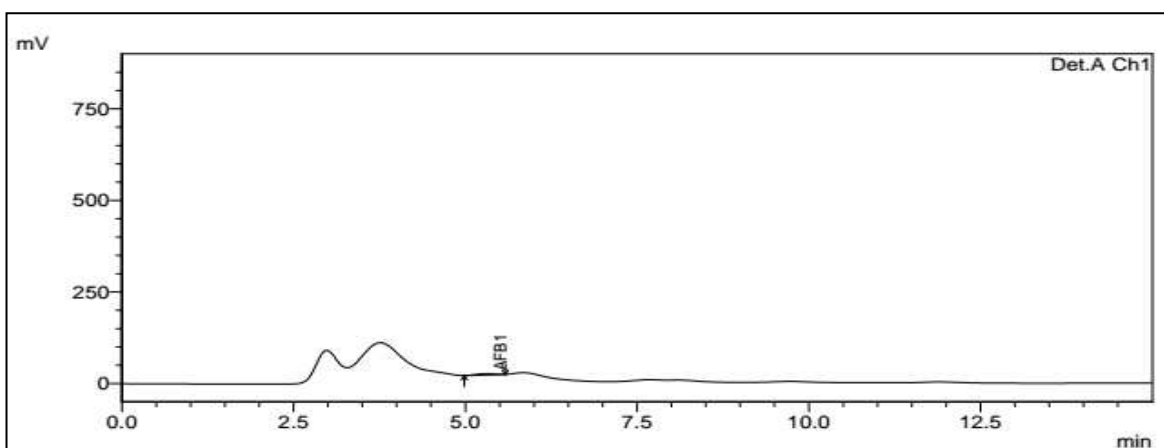
Cromatograma D.2: Ensaio AV: *A. flavus* + OE de *C. citratus* 0,25 mg. mL⁻¹. AFB1 (5.213); Aflatoxina (tempo de retenção em min).



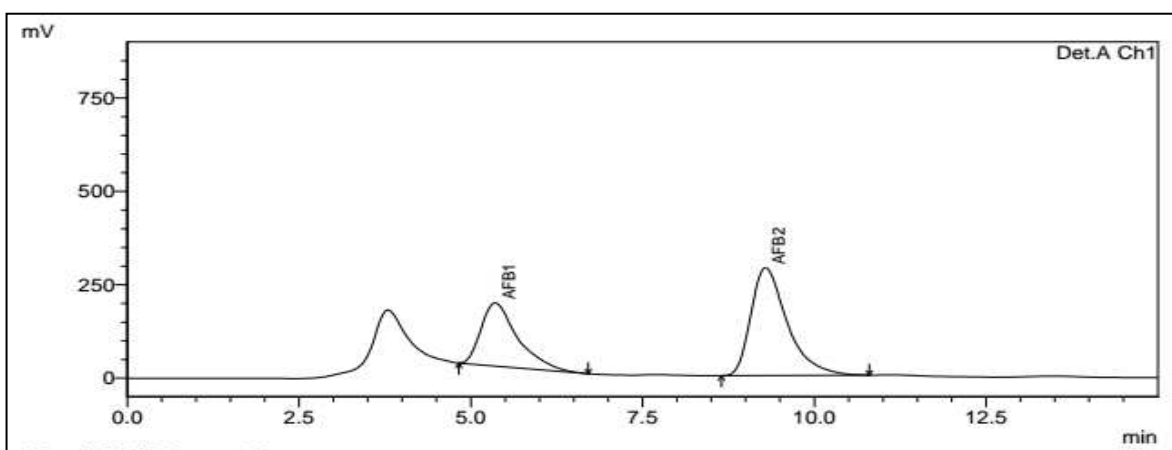
Cromatograma D.3: Ensaio AV: *A. flavus* + OE de *C. citratus* 0,5 mg. mL⁻¹. AFB1 (5.220); Aflatoxina (tempo de retenção em min).



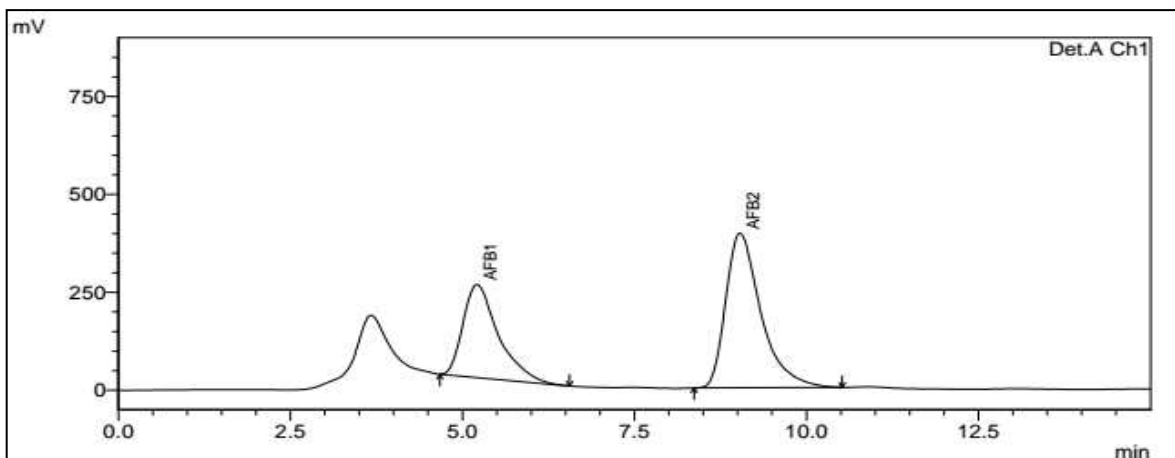
Cromatograma D.4: Ensaio IP: *A. flavus* + OE de *C. citratus* 0,25 mg. mL⁻¹. AFB1 (5.320). Aflatoxina (tempo de retenção em min).



Cromatograma D.5: Ensaio IP: *A. flavus* + OE de *C. citratus* 0,5 mg. mL⁻¹; AFB1 (5.315). Aflatoxina (tempo de retenção em min).

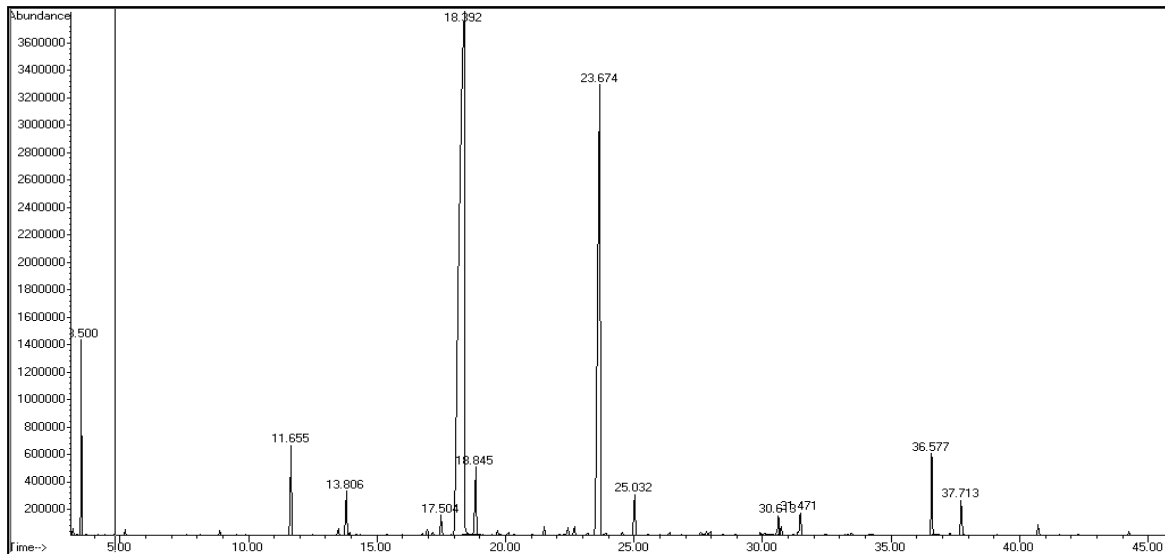


Cromatograma D.6: Ensaio de fortificação nível 3 com OE de *C. citratus* IP. AFB1 (5.350); AFB2 (9.287). Aflatoxina (tempo de retenção em min).

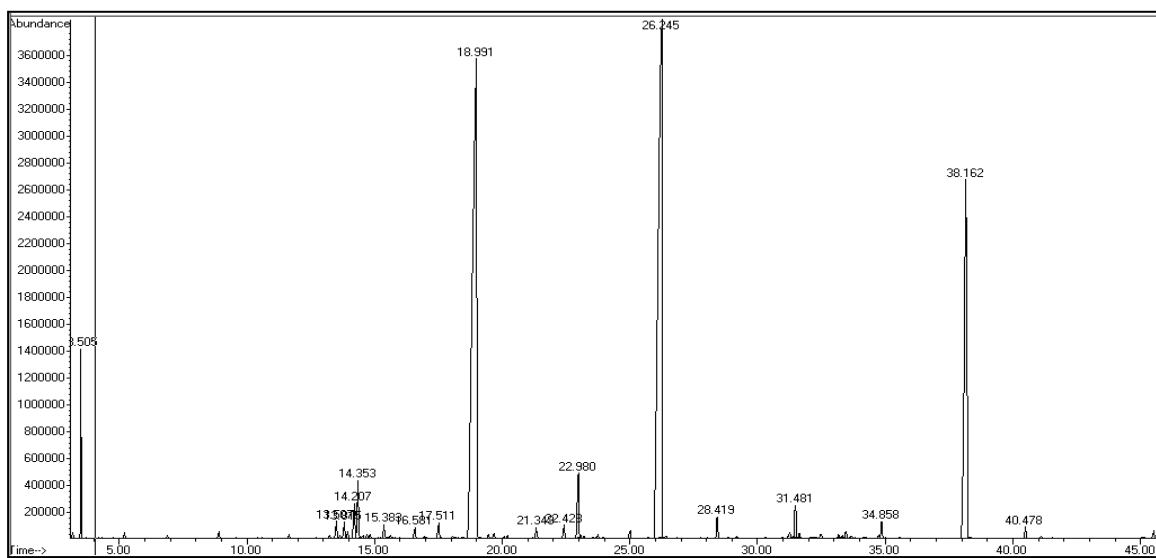


Cromatograma D.7: Ensaio de fortificação nível 3 com OE de *C. citratus* AV. AFB1 (5.206); AFB2 (9.030). Aflatoxina (tempo de retenção em min).

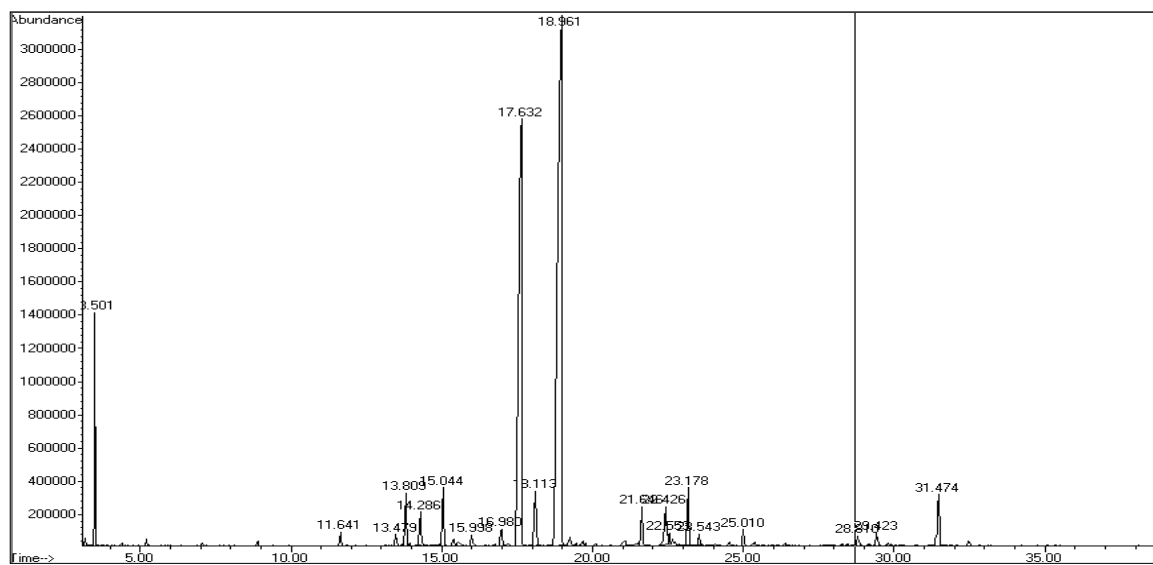
ANEXO E. Cromatogramas obtidos da análise por CG-EM dos óleos essenciais de maior atividade anti- *A. flavus* utilizados no presente estudo.



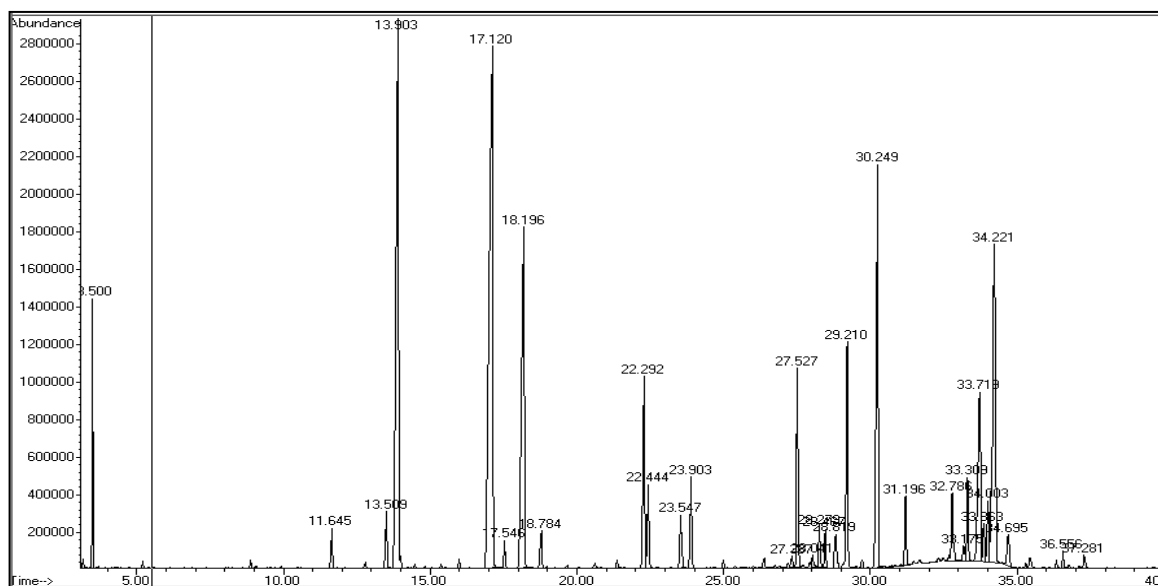
Cromatograma E.1: OE de *C. martinii*: β - Linalool (11.654); trans- Geraniol (13.804); α – Citral (17.505); Geraniol (18.380); Citral (18.844); Eugenol (22.437); Acetato de geraniol (23.663); Cariofileno (25.030); Butanoato de geranila (30.610); Óxido de Cariofileno (31.469); Nerolidol (36.574); Propanoato de nerila (37.714); Z, E-Nerolidol (40.706). Composto químico (Índice de retenção em min).



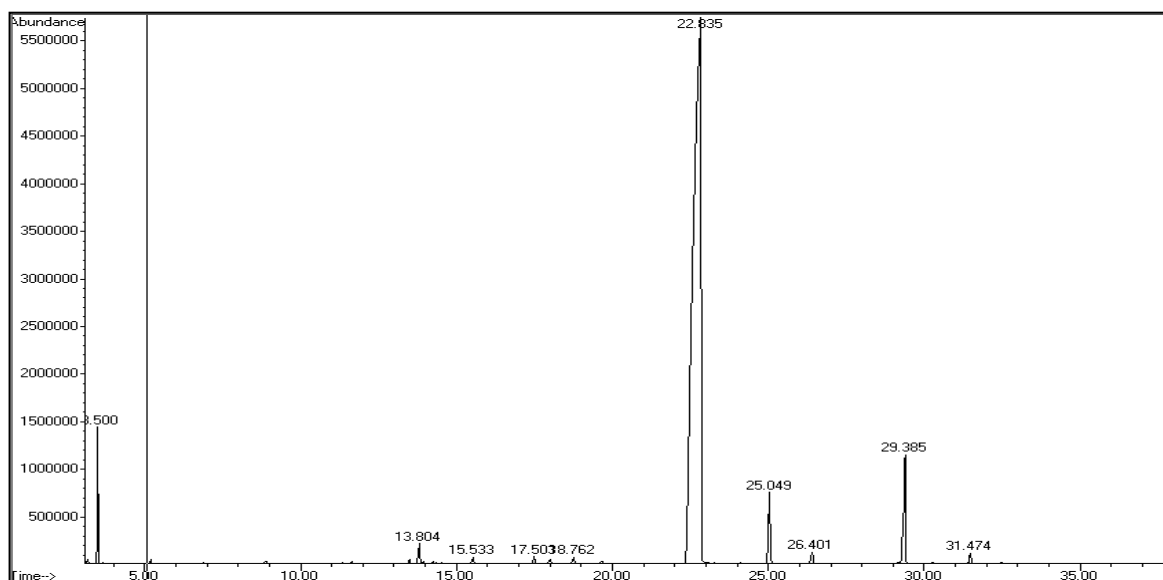
Cromatograma E.2: OE de *C. burmanii*: Isopulegol (13.507); (R)-(+)- Citronelal (13.815); Benzenepropanal (14.209); Borneol (14.350); Tepineol (15.382); β -Citral (17.510); E - Cinamaldeído (18.979); Eugenol (22.426); Hidrocinamil isobutirato (22.977); Cariofileno (25.013); Acetato de cinamila (26.234); Oxido de cariofileno (31.480); Ácido benzoico (38.151). Composto químico (Índice de retenção em min).



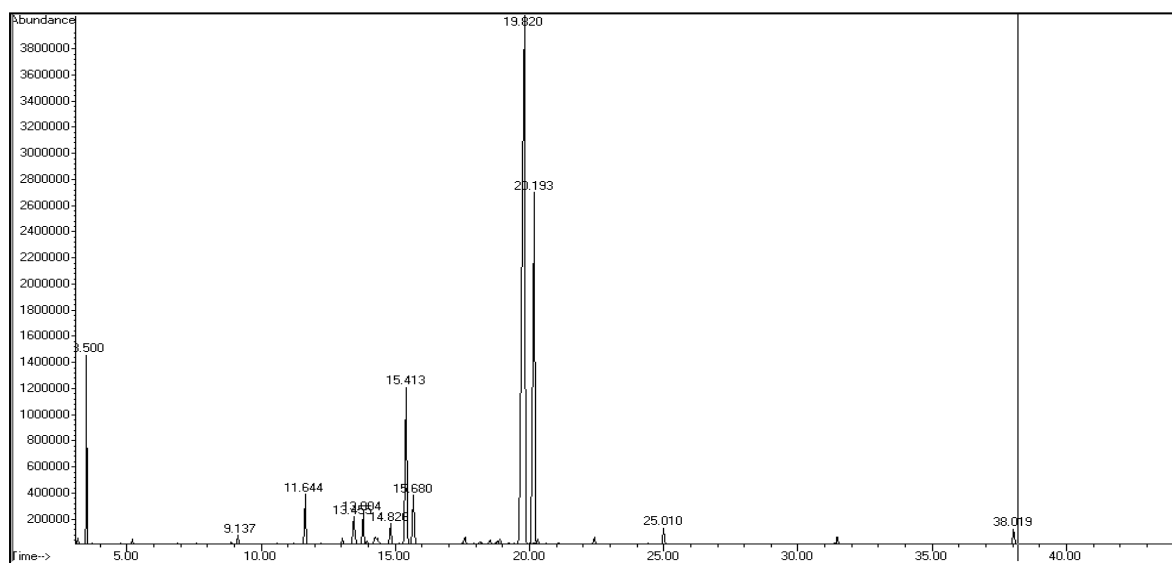
Cromatograma E.3: OE de *C. citratus*: β -Linalool (11.643); β - Citronelal (13.810); Vinilciclooctano (14.285); Verbenol (15.041); Decanal (15.997); β - citral (17.623); α - Citral (18.110); Citral (18.947); Eugenol (22.426); Ciclohexeno - 3- propil (23.177); Acetato de geranila (23.544); Cariofileno (25.008); τ -Cadineno (28.811); Oxido de cariofileno (31.474). Composto químico (Índice de retenção em min).



Cromatograma E.4: OE de *C. winterianus*: Isopulegol (13.507); (R)-(+)-Citronelal (13.896); β - Citronelol (17.110); Geraniol (18.185); α -Citral (18.785); 2,6- Octadiene, 2,6-dimetil (22.291); Eugenol (22.442); Cis – Acetato de geranila (23.549); β -Elemeno (23.901); Germacreno D (27.525); Thujopseno (28.039); α -Muuroleno (28.276); 7-epi- α -Cadineno (28.816); δ -Cadineno (29.205); Elemol (30.243); γ -Muuroleno (31.193); γ -Eudesmol (33.311); γ -Cadineno (33.716); α -Copaeno (33.862); β -Eudesmol (34.002); τ -Muurolol (34.218); γ -Selineno (34.694); *trans*-Farnesal (37.281). Composto químico (Índice de retenção em min).



Cromatograma E.5: OE de *E. caryophyllata*: Citronelal (13.804); Salicilato de metila (15.533); *cis*- Citral (17.505); Citral (18.763); Eugenol (22.820); β – Cariofileno (25.046); α - Cariofileno (26.402); Acetato de eugenol (29.378); Óxido de cariofileno (31.474). Composto químico (Índice de retenção em min).



Cromatograma E.6: OE de *T. vulgaris*: Linalool (11.643); β -Terpineol (13.458); (R) - (+) Citronelal (13.804); *cis*- β -Terpineol (14.258); Terpinen-4-ol (14.825); L- α -Terpineol (15.409); α -Terpinoleno (15.679); β -Citral (17.602); Timol (19.811); p-Timol (20.184); Cariofileno (25.008); Óxido de Cariofileno (31.463); Benzoato de benzenila (38.016). Composto químico (Índice de retenção em min).