



**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Backhousia citriodora* e *Lippia origanoides* Kunth.:**  
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE FUNGICIDA E ANTIOCRATOXIGÊNICA SOBRE  
OS FUNGOS *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*

**LAVRAS – MG**

**2019**

**LUANA ISAC SOARES**

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Backhousia citriodora* e *Lippia origanoides* Kunth.:**  
**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE FUNGICIDA E ANTIOCRATOXIGÊNICA SOBRE**  
**OS FUNGOS *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

**Orientadora**

**Lavras-MG**

**2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Soares, Luana Isac.

Óleos essenciais de *Backhousia citriodora* e *Lippia origanoides*  
*Kunth*. : composição química, atividade fungicida e  
antiocrotogênica sobre os fungos *Aspergillus carbonarius* e  
*Aspergillus ochraceus* / Luana Isac Soares. - 2019.

82 p. : il.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Compostos voláteis. 2. Café. 3. Ocratoxina. I. Cardoso,  
Maria das Graças. II. Título.

**LUANA ISAC SOARES**

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Backhousia citriodora* e *Lippia origanoides* Kunth.:**  
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE FUNGICIDA E ANTIOCRATOXIGÊNICA SOBRE  
OS FUNGOS *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*

**ESSENTIAL OILS OF *Backhousia citriodora* AND *Lippia origanoides* Kunth.:**  
CHEMICAL COMPOSITION, FUNGICIDE ACTIVITY AND ANTIOCRATOXIGENIC  
ACTIVITY ON FUNGUS *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 8 de março de 2019

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza	Epamig/URES
Dr. David Lee Nelson	UFVJM
Dr. Fabiano Guimarães Silva	IF-Goiano

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

**Orientadora**

**Lavras-MG**

**2019**

*A Deus, pelo dom da vida e por me conceder mais esta conquista.  
Aos meus Pais, Genivaldo e Vanilda, pelo amor incondicional.  
Ao meu namorado, Paulo, pelo amor, companheirismo e paciência!  
À minha mãe científica, Profa. Dra. Maria das Graças, pelas orientações e amizade!  
Aos cafeicultores, em especial ao meu pai e aos amantes de um bom café!*

***DEDICO...***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu força e coragem durante esta caminhada.

A Jesus Cristo, meu companheiro diário, a Nossa Senhora do Café e Nossa Senhora Aparecida, por estarem sempre ao meu lado e sendo luz e graça durante o mestrado.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Química, pela oportunidade em desenvolver esta dissertação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a e Fapemig pelo suporte financeiro.

À Dra. Maria das Graças Cardoso, o meu profundo agradecimento, pela orientação, confiança e amizade. Também pelos ensinamentos e orientações diárias, sendo mais que orientadora, uma amiga.

À Dra. Sara Maria Chalfoun, pela coorientação, receptividade, dedicação, disponibilidade para todas as minhas dúvidas e pela amizade.

Ao Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – Epamig/URESM, na pessoa da Dra. Sara e a Agência de Inovação do Café – UFLA (Inovacafé) na pessoa do Dr. Mario Lúcio Vilela Resende, por disponibilizar condições para a realização do trabalho.

Ao Mauro, Felipe, Alexandre e Mateus, pela ajuda durante a secagem e beneficiamento do café.

À laboratorista Vicentina, à Carol e à Grasiela, pelo auxílio nas análises microbiológicas e toda a ajuda durante o experimento. Suas amigas foram imprescindíveis.

À técnica do Centro de Análise e Prospecção e Química – CAPQ, Dra. Lidiany Zacaroni, pelas cromatográficas dos óleos essenciais.

Às técnicas do Laboratório de Análise Foliar, em especial à Maria Luísa Teixeira e à Anelise Dessimoni, pela disponibilidade do moinho.

Ao Dr. Wilder Douglas Santiago e ao Richard Bispo Barbosa, pelas análises cromatográficas das amostras.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Qualidade de Aguardente e do Laboratório de Química Orgânica, Alex, Allan, Cleusa, Danubia, Gustavo, Jéssica, Letícia, Maísa, Manuel, Rafaela Brandão, Rafaela Zanitti, Renan e Nathália, pelo carinho, compreensão e convivência diária.

Aos meus avós, tios e tias, pelas orações, ensinamentos, carinho e cuidado. Ainda que a distância, vocês estiveram sempre ao meu lado.

Às amigadas de Lavras, Juliana, Rafaela Vieira, Bárbara, Michele, Sibeles e Talita e às amigas de Piumhi, Aline, Bruna, Carol, Karen e Wainy, pelas diversas circunstâncias vividas.

Aos funcionários do DQI (Departamento de Química), pela disponibilidade em sempre me atender.

E a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte deste trabalho!

## RESUMO

Os frutos de cafeeiro apresentam substâncias orgânicas favoráveis para o desenvolvimento de fungos do gênero *Aspergillus*, que são um dos responsáveis pela deterioração da bebida e ocorrência de ocratoxina A. Dessa forma, estudos por meio dos quais se aplicam produtos naturais ou metabólitos, têm se, como os óleos essenciais para o controle dos patógenos e inibição da toxina liberada, tem-se intensificado. Objetivou-se neste estudo analisar a composição química dos óleos essenciais extraídos das folhas de *Backhousia citriodora* e *Lippia origanoides Kunth.*, bem como avaliar o seu potencial fungicida e antiocratoxigênico por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* em frutos de café. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, caracterizados e quantificados por CG/MS e CG/FID. A avaliação antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais foi realizada sobre as espécies *A. carbonarius*, e *A. ochraceus*; a inibição da produção da ocratoxina A, por *A. carbonarius* e *A. ochraceus* foi avaliada em diferentes concentrações; a atividade antifúngica dos óleos essenciais nos frutos de café, foi estudada empregando o plaqueamento dos pericarpos e dos grãos; e a inibição da síntese de ocratoxina A nos pericarpos e grãos de café, foi quantificada por HPLC. No óleo essencial de *Backhousia citriodora*, os isômeros neral e geranial foram os compostos majoritários, já no óleo essencial de *L. origanoides Kunth.*, os compostos *p*-cimeno, timol, carvacrol foram os mais abundantes. Ambos os óleos essenciais apresentaram atividade antifúngica *in vitro* sobre as espécies de *Aspergillus* estudadas, em uma relação dose-dependente. Esses, nas concentrações estudadas, inibiram a síntese de ocratoxina A no meio de cultura, tanto para *A. carbonarius* para *A. ochraceus*. Na avaliação antifúngica dos pericarpos de café, os óleos essenciais promoveram a redução dos microrganismos. Foi verificado nos grãos que os fungos, em nenhum tratamento, atingiu o grão. Os óleos essenciais apresentaram baixo efeito antitoxigênico nos frutos de café. No pericarpo, foi verificada a maior concentração de ocratoxina A para ambos os fungos, sendo nos grãos quantificada apenas para *A. ochraceus*; os resultados obtidos estão abaixo do estabelecido pelas legislações.

**Palavras-chave:** Compostos voláteis. Monoterpenos. Patógenos. Café. Ocratoxina A.

## ABSTRACT

The fruits of coffee plants present favorable organic substances for the development of fungus of the genus *Aspergillus*, which are responsible for the deterioration of the beverage and occurrence of ochratoxin A. Therefore, studies applying natural products or metabolites of these, like the essential oils for the control of the pathogens and inhibition of the released toxin has intensified. The objective of this study, was to analyze the chemical composition of the essential oils extracted from the leaves of *Backhousia citriodora* and *Lippia origanoides Kunth.*, as well as to evaluate their fungicidal and ochratoxigenic potential by means of *in vitro* and *in vivo* tests on coffee fruits. The essential oils were extracted by hydrodistillation, characterized and quantified by CG / MS and CG / FID. The *in vitro* antifungal evaluation of the essential oils was carried out on the species *A. carbonarius* and *A. ochraceus*; the inhibition of ochratoxin A production, by *A. carbonarius* and *A. ochraceus* was evaluated at different concentrations of the oils; the antifungal activity of the essential oils in the coffee fruits, was studied using the plating of the pericarp and the beans; and the inhibition of ochratoxin A synthesis in the coffee bean pericarp and beans was quantified by HPLC. In the essential oil from *Backhousia citriodora*, the neral and geranial isomers were the principal compounds, whereas the compounds *p*-cymene, thymol, and carvacrol were the most abundant in the essential oil from *L. origanoides* Kunth. *In vitro* antifungal activity against the *Aspergillus* species studied was observed for both the essential oils in a dose-dependent relationship. These oils inhibited the synthesis of ochratoxin A in the culture medium by both *A. carbonarius* and *A. ochraceus* at the concentrations studied. In the evaluation of the antifungal activity of the coffee pericarp, the reduction in the quantity of microorganisms was observed in the presence of the essential oils. In no treatment did the fungi affect the bean. The essential oils had a low antitoxigenic effect on coffee fruits. In the pericarp, the highest concentration of ochratoxin A was verified for both fungi, but it was only quantified in the bean for *A. ochraceus*. The results obtained were below the limit established by the legislation.

**Keywords:** Volatile compounds. Monoterpenes. Pathogens. Coffee. Ochratoxin A.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da Ocratoxina A. ....	20
Figura 2 – Biossíntese de metabólitos secundários. ....	23
Figura 3 – Estrutura básica do isopentenilpirofosfato e dimetilalilpirofosfato. ....	24
Figura 4 - Biossíntese dos terpenos pela via do mevalonato. ....	25
Figura 5 - Biossíntese dos terpenos pela via DXPS. ....	27
Figura 6 – Biossíntese dos Fenilpropanoides. ....	28
<i>Figura 7 - Aspecto geral da espécie <i>Backhousia citriodora</i>. ....</i>	<i>32</i>
Figura 8 - Estrutura química dos monoterpenos Geranial (A) e Neral (B) ....	33
Figura 9 - Biossíntese do monoterpeno geranial.. ....	33
Figura 10 - Biossíntese do monoterpeno neral. ....	35
Figura 11 - Aspecto geral da espécie <i>Lippia origanoides</i> Kunth. ....	36
Figura 12 - Estrutura química dos monoterpenos Carvacrol (A), Timol (B) e <i>p</i> -Cimeno (C). ....	37
Figura 13 - Biossíntese dos monoterpenos cíclicos <i>p</i> -cimeno, carvacrol e timol. ....	37
Figura 14 – Consenso da via biosintética da ocratoxina. . ....	55

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Limites máximos ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) de Ocratoxina A em alguns alimentos estabelecidos no Brasil.....	21
Quadro 2 – Concentrações obtidas por testes preliminares e utilizadas nos posteriores experimentos.....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de umidade e rendimento dos óleos essenciais de <i>B. citriodora</i> e <i>L. origanoides</i> Kunth. ....	48
Tabela 2 – Composição química do óleo essencial de <i>B. citriodora</i> .....	49
Tabela 3 – Composição química do óleo essencial de <i>L. origanoides</i> Kunth. ....	50
Tabela 4 – Porcentagem de inibição micelial dos óleos essenciais de <i>B. citriodora</i> e <i>L. origanoides</i> Kunth. em <i>A. carbonarius</i> . ....	51
Tabela 5 - Porcentagem de inibição micelial dos óleos essenciais de <i>B. citriodora</i> e <i>L. origanoides</i> Kunth. em <i>A. ochraceus</i> . ....	52
Tabela 6 – Efeitos dos óleos essenciais de <i>B. citriodora</i> e <i>L. origanoides</i> Kunth. sobre a síntese de ocratoxina A em <i>A. carbonarius</i> . ....	54
Tabela 7- Efeitos dos óleos essenciais de <i>B. citriodora</i> e <i>L. origanoides</i> Kunth. sobre a síntese de ocratoxina A em <i>A. ochraceus</i> . ....	54
Tabela 8 - Efeitos dos óleos essenciais de <i>B. citriodora</i> e <i>L. origanoides</i> Kunth. na esporulação crescimento do <i>A. carbonarius</i> nos pericarpos.....	57
Tabela 9 - Efeitos dos óleos essenciais de <i>B. citriodora</i> e <i>L. origanoides</i> Kunth. no crescimento do <i>A. ochraceus</i> . nos pericarpos.....	57
Tabela 10 - Efeitos dos óleos essenciais de <i>B. citriodora</i> e <i>L. origanoides</i> Kunth. sobre a síntese de ocratoxina A pelo <i>A. carbonarius</i> nos pericarpos de café.. ....	59
Tabela 11 - Efeitos dos óleos essenciais de <i>B. citriodora</i> e <i>L. origanoides</i> Kunth. sobre a síntese de ocratoxina A pelo <i>A. carbonarius</i> nos grãos de café. ....	60
Tabela 12 – Efeitos dos óleos essenciais de <i>B. citriodora</i> e <i>L. origanoides</i> Kunth. sobre a síntese de ocratoxina A pelo <i>A. ochraceus</i> nos pericarpos de café. ....	61

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>Anova</b>	Análise de variância
<b>Anvisa</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BDA</b>	Batata, Dextrose, Ágar
<b>BLU</b>	Base livre de umidade
<b>BOD</b>	Biochemical Oxygen Demand
<b>Camag</b>	Cromatovisor
<b>CAPQ</b>	Central de Análise e Prospecção Química
<b>CG-EM</b>	Cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massas
<b>CYA</b>	Czapek, Yeast Extract, Ágar
<b>DIC</b>	Detector por ionização de chamas
<b>DMAPP</b>	Dimetilalilpirofosfato
<b>DQI</b>	Departamento de Química
<b>DXPS</b>	1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase
<b>Epamig/URES</b>	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
<b>GPP</b>	Geranyl difosfato
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Câncer
<b>Inovacafé</b>	Agência de Inovação do Café – UFLA
<b>IPP</b>	Isopentenilpirofosfato
<b>ISO</b>	International Standard Organization
<b>LD</b>	Limites de detecção
<b>LPP</b>	Linalil difosfato
<b>LQ</b>	Limites de quantificação
<b>MA</b>	Malt Agar
<b>Mapa</b>	Ministério da Agricultura e Pecuária
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada com fosfato).
<b>UFLA</b>	Universidade Federal de Lavras
<b>YES</b>	Yeast Extract Sucrose Agar

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Café.....	17
2.2 Microrganismos presentes no café.....	18
2.2.1 <i>Aspergillus carbonarius</i> .....	19
2.2.2 <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	20
2.3 Ocratoxina A.....	20
2.4 Metabólitos secundários de plantas.....	22
2.5 Óleos essenciais.....	23
2.5.1 Biossíntese de Terpenos.....	24
2.5.2 Biossíntese de Fenilpropanoides.....	27
2.5.3 Potencial biológico dos óleos essenciais.....	31
2.6 <i>Backhousia citriodora</i> .....	32
2.6.1 Biossíntese dos isômeros geranial e neral.....	33
2.7 <i>Lippia origanoides</i> Kunth.....	36
2.7.1 Biossíntese dos terpenos monocíclicos <i>p</i> -cimeno, carvacrol e timol.....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Coleta do material vegetal.....	39
3.2 Extração dos óleos essenciais.....	39
3.3 Determinação da umidade e rendimento dos óleos essenciais.....	39
3.4 Caracterização química dos óleos essenciais.....	40
3.5 Obtenção e identificação dos microrganismos.....	41
3.6 Atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos óleos essenciais.....	42
3.7 Influência dos óleos essenciais sobre a síntese de Ocratoxina A <i>in vitro</i> .....	42
3.7.1 Extração da ocratoxina A.....	43

3.7.2 Condições cromatográficas utilizadas na quantificação da ocratoxina A ....	43
3.7.3 Quantificação da Ocratoxina A .....	44
3.8 Atividade <i>in vivo</i> .....	44
3.8.1 Atividade antifúngica dos óleos essenciais em frutos de <i>Coffea arabica</i> ....	45
3.8.2 Atividade ocratoxigênica em pericarpos e grãos de <i>Coffea arabica</i> .....	46
3.9 Análises estatística .....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
4.1 Determinação da umidade e do rendimento dos óleos essenciais.....	48
4.2 Caracterização química e quantificação dos óleos essenciais.....	48
4.3 Atividade antifúngica <i>in vitro</i> .....	50
4.4 Atividade antiocratoxigênica <i>in vitro</i> .....	53
4.5 Atividade antifúngica em frutos de <i>Coffea arabica</i> .....	56
4.6 Ocratoxina A em pericarpos e grãos de <i>Coffea arabica</i> .....	59
5 CONCLUSÃO.....	63
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	64
REFERÊNCIAS .....	65
APÊNDICE .....	74

## 1 INTRODUÇÃO

O café é uma das principais commodities da economia brasileira, sendo o país o maior produtor e exportador das espécies *Coffea arabica* (Café Arábica), seguido de *Coffea canéfora* (Café Conilon) (Conab, 2018).

Os grãos verdes de café, após a torrefação e a moagem, se transformam-se em uma bebida de aroma e sabor únicos. Apresenta características benéficas à saúde, como a estimulação digestiva. Em sua composição, apresenta substâncias orgânicas como minerais, açúcares, aminoácidos e compostos fenólicos. No entanto, durante a fase pós-colheita do café, o fruto, por possuir açúcares em sua composição, mostra-se um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de microrganismos, podendo comprometer tanto o aspecto visual dos grãos, quanto o sabor e o aroma da bebida. Dentre esses microrganismos deterioradores, estão os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, produtores de algumas micotoxinas (BATISTA et al., 2016).

As micotoxinas, como a ocratoxina A, são alguns dos metabólitos secundários sintetizados pelos fungos com propriedades tóxicas que causam problemas agudos e crônicos na saúde humana e de animais. Isso impulsiona estudos que busquem compostos químicos que sejam capazes de minimizarem os efeitos provocados pela combinação da deterioração da qualidade do café advinda dos fungos com os problemas de saúde causados pelas toxinas.

A busca por produtos naturais ou derivados deles vem impulsionando a pesquisa, visando a encontrar substâncias com largo espectro de ação, que não impactam o meio ambiente e os seres vivos. Nesse sentido, citam-se os óleos essenciais metabólitos secundários de plantas que apresentam em sua composição química compostos que os tornam capazes de inibir o desenvolvimento de fungos e bactérias.

Os óleos essenciais das espécies em estudo neste trabalho, *Backhousia citriodora* e *Lippia origanoides* Kunth., apresentam evidências científicas promissoras com testes *in vitro* contra fungos do gênero *Aspergillus*.

Objetivou-se, neste estudo, analisar a composição química dos óleos essenciais extraídos das folhas de *Backhousia citriodora* e *Lippia origanoides* Kunth., bem como avaliar o seu potencial fungicida e ocratoxigênico por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* em frutos de café.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Café

O Brasil é o maior exportador de café, representando grande importância socioeconômica para o desenvolvimento do país, garantindo a geração de postos de trabalhos, tributos e contribuição na receita brasileira (Conab, 2018).

O café tem origem na Etiópia, África. No Brasil, foi introduzido com mudas vindas da Guiana Francesa e plantadas na Região Norte do país, mas não foi difundida. A cultura passou a ser cultivada no Rio de Janeiro e expandiu-se para o interior do Brasil, chegando ao estado de São Paulo. Com o declínio das exportações de algodão, açúcar e cacau, aliado ao crescimento do consumo de café na Europa e nos Estados Unidos, os produtores investiram na cafeicultura, obtendo altos lucros, o chamado de “ouro negro” (ABIC, 2018).

A cafeicultura desencadeou uma revolução econômica no Brasil, sendo responsável pela construção de ferrovias para escoamento da produção do interior de São Paulo, atraiu os imigrantes europeus e asiáticos para as lavouras, alavancou o desenvolvimento das indústrias na região do Sudeste, deslocando o poder político e econômico para a região (FASSIO E SILVA, 2007).

O parque cafeeiro abrange os estados do Acre, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rondônia e São Paulo. Os maiores produtores da cultura são os estados de Minas Gerais para a espécie *Coffea arabica* L. (café arábica) e o Espírito Santo para a espécie *Coffea canephora* P. (café robusta ou conilon); Minas Gerais detém a maior parcela da produção (Conab, 2018).

A safra brasileira 2017/2018 foi estimada em 61,7 milhões de sacas beneficiadas. Em comparação com a safra anterior, houve um crescimento de 37,1%, devido ao ciclo de bialidade positiva. A espécie arábica teve a produção estimada em 47,5 milhões de sacas, já o café conilon em 14,2 milhões (CONAB, 2018).

O café é uma cultura perene e arbustiva, com ramos dimórficos, ortotrópicos e plagiotrópicos. O plantio das mudas ocorre em período chuvoso, com solo úmido nos meses de dezembro a fevereiro e as plantas devem estar com 4 a 6 pares de folhas. A primeira colheita dos frutos ocorre com 24-36 meses após o plantio.

O fruto do cafeeiro é estruturado com pericarpo e semente, classificado como drupa, apresentando duas sementes no endocarpo. O pericarpo pode ser dividido em três tecidos, o mais externo do fruto é o exocarpo, comumente denominado de casca. Na porção intermediária, encontra-se o mesocarpo, camada viscosa, rica em açúcares, denominado

mucilagem. Mais internamente encontra-se o endocarpo ou pergaminho, responsável pelo tamanho final dos grãos. A semente é envolvida pela película prateada, endosperma e o embrião (BORÉM; SILVA; SILVA, 2007).

O ciclo do cafeeiro é bienal, ocorrendo no primeiro ano fenológico, o desenvolvimento e a formação das gemas vegetativas, indução, crescimento e dormência das gemas florais. No segundo ano, há o período reprodutivo, o cafezal floresce, forma o chumbinho, expansão, granação e maturação dos frutos e o repouso e senescência dos ramos. A fase de maturação dos frutos inicia-se com os frutos verdes, seguido por verde-cana, cereja, passa e, por fim, seco (MORAIS et al., 2008).

Os métodos para o processamento dos frutos seguem duas vias. No preparo pela via seca, os frutos com casca são secos em terreiros ou secadores. E são conhecidos como café em coco ou café natural. Nesse tipo de processamento, há elevada exposição de microrganismos produtores de toxinas, viabilizado pela presença deles na casca, sendo hospedeira para os fungos e fonte de toxinas para o grão (BORÉM; SILVA; SILVA, 2007).

Com o preparo do café pela via úmida são originados três tipos de café: o descascado retirando apenas a casca; o despulpado, em que são retiradas a casca e a mucilagem por fermentação biológica da mucilagem e, por fim, o desmucilado, sendo removidas a casca e a mucilagem, ambas mecanicamente, mantidas as estruturas como a mucilagem e o pergaminho (BORÉM; SILVA; SILVA, 2007).

Recomenda-se para frutos com umidade entre 14 e 16%, o descanso em tulhas de armazenamento por até 7 dias, em seguida, retornam aos secadores chegando a umidade entre 10,8 a 11,2% e havendo disponibilidade de tulhas, eles podem ser descansados. O processo de descanso dos frutos irá melhorar a qualidade e a uniformidade do café. Posteriormente, os frutos são beneficiados e armazenados para a comercialização (BORÉM; SILVA; SILVA, 2007).

## **2.2 Microrganismos presente no café**

Os frutos do café possuem substâncias químicas atuantes como substrato para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras. Há a predominância de bactérias nas fases iniciais da maturação do fruto, as fases verde-cana e cereja; porém, com o avanço do amadurecimento, ocorre a redução da atividade de água e modificações físico-químicas nos frutos, favorecendo o surgimento (ou desenvolvimento) dos fungos e leveduras (IAMANAKA et al., 2014).

Em alguns casos, associa-se a qualidade inferior da bebida do grão à presença de microrganismos deteriorantes, os quais promovem a fermentação do açúcar presente na mucilagem, produzindo ácidos orgânicos indesejáveis, podendo citar a produção do ácido butírico, que prejudica a qualidade sensorial da bebida. Dentre esses fungos, encontram-se os fungos filamentosos, destacando os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (BATISTA et al., 2016).

### 2.2.1 *Aspergillus carbonarius*

A espécie *Aspergillus carbonarius* pertence ao gênero *Aspergillus* seção *Nigri*; morfológicamente, é caracterizado pela produção de conídios, grandes e rugosos, com coloração preta e/ou marrom-escuro (CHALFOUN; PARIZZI, 2007).

Os microrganismos da seção *Nigri* oferecem resistência sobre os demais devido à capacidade de os conídios pretos exercerem ação protetora contra os raios solares e UV, tendo o seu desenvolvimento estimulado na fase de pós-colheita do café. Além do café, a espécie *A. carbonarius* está presente em uvas, vinhos e cereais, sendo capaz de produzir micotoxina tóxica para o homem, a da ocratoxina A (CHALFOUN; PARIZZI, 2007).

A temperatura para o desenvolvimento do fungo varia de 10 a 40°C, sendo a ótima entre 25 e 32 °C, com atividade de água, variando de 0,935-0,965. Para a síntese da ocratoxina A, a temperatura é entre 22 e 32 °C e a atividade de água entre 0,95 e 0,99 (OLIVEIRA et al., 2019a).

Dammak et al. (2019) estudaram a ação antifúngica dos óleos essenciais das espécies *Salvia officinalis*, *Lavandula dentata* e *Laurus nobilis* sobre o fungo *A. carbonarius*. Encontraram como constituintes majoritários  $\alpha$ -tujona e cânfora (*Salvia*), 1,8-cineol e cânfora (*Lavandula*) e 1,8-cineol (*Laurus*). Os autores verificaram que no ensaio de contato os óleos *Lavandula dentata* e *Laurus nobilis* apresentaram maior atividade antifúngica, tendo a concentração mínima inibitória de aproximadamente 0,3%.

Andrade et al. (2015) pesquisaram os óleos essenciais *Cinnamodendron dinisii* (pimenteira), rico em monoterpenos e *Siparuna guianensis* (negramina), composto por sesquiterpenos, e observaram que o óleo essencial de negramina apresentou maior capacidade de controlar o crescimento do fungo filamentoso *A. carbonarius*, na concentração de 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Nesse óleo essencial, observaram que o composto majoritário encontrado foi biciclogermacreno.

### 2.2.2 *Aspergillus ochraceus*

A espécie *Aspergillus ochraceus* pertence ao gênero *Aspergillus* seção *Circundati*; morfológicamente caracterizado pela produção de conídios de tamanhos variados, com coloração amarelada, laranja, amarronzada e também incolor. É um fungo isolado dos cereais: arroz, trigo, aveia, cevada; e também do café, sendo a principal fonte de contaminação da toxina de ocratoxina A (CHALFOUN; PARIZZI, 2007).

A temperatura para o desenvolvimento ótimo do fungo varia de 21 a 30 °C, com atividade de água variando de 0,940-0,990. Para a síntese da ocratoxina A, a temperatura é entre 25 e 30 °C, e atividade de água, entre 0,97 e 0,99 (OLIVEIRA et al., 2019a).

Sonker, Pandey e Singh (2015) avaliaram o efeito dos óleos essenciais de 20 espécies vegetais sobre o crescimento do *A. ochraceus* e produção de ocratoxina A em uvas de mesa. Os autores concluíram que o óleo de *Artemisia nilagirica*, apresentando os compostos majoritários cânfora (22,8%), *trans*-cariofileno (16,7%), pode ser utilizado como um fungicida alternativo para o controle de fungos, pois registraram a inibição do crescimento fúngico a 0,58  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e a produção de toxina a 1,6  $\mu\text{L mL}^{-1}$ .

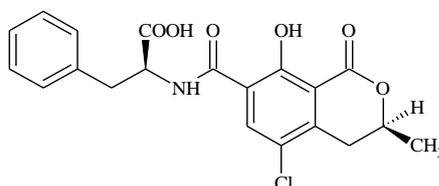
### 2.3 Ocratoxina A

Os fungos filamentosos, durante o processo de crescimento e desenvolvimento, produzem metabólitos tóxicos aos animais e seres humanos. Esses metabólitos são substâncias orgânicas chamadas de micotoxinas.

Dentre as micotoxinas sintetizadas pelos microrganismos, tem-se a ocratoxina A, presente em grãos de cereais como a cevada, trigo, aveia milho e feijão, amendoim, frutos secos, uvas, queijo, café e também em ração animal (CHALFOUN; PARIZZI, 2007; GUPTA et al., 2018).

A estrutura da ocratoxina A (FIGURA 1) é formada pela ligação amida di-hidroisocumarina penta-cetona com a fenilalanina. A ocratoxina A foi isolada pela primeira vez do microrganismo *A. ochraceus*; porém, estudiosos relatam a produção da toxina em fungos do gênero *Penicillium* e outras espécies (BAYMAN; BAKER, 2006).

Figura 1 - Estrutura química da Ocratoxina A.



A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer – IARC) classifica a ocratoxina A no grupo 2B devido ao potencial carcinogênico limitado em seres humanos, mas suficiente pelas evidências em experimentos com animais. A ocratoxina A apresenta efeito nefrotóxico, podendo causar hepatotoxicidade, imunotoxicidade, neurotoxicidade, teratogenicidade e carcinogenicidade.

Devido aos vários danos toxicológicos que a ocratoxina A expõe a saúde humana, obrigaram os órgãos públicos responsáveis pela segurança alimentar a estabelecerem limites máximos da toxina nos alimentos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) determinou, por meio da Resolução RDC nº7, de 18 de fevereiro de 2011, os níveis de ocratoxina A em alimentos, descritos no Quadro 1. A concentração de ocratoxina A estabelecidos pela União Europeia para grãos de café torrado e moído é limitada em até  $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$  e para café solúvel  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , valores menores, comparados aos estabelecidos pela Anvisa (EC, 2006).

Quadro 1 - Limites máximos ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) de Ocratoxina A em alguns alimentos estabelecidos no Brasil.

Alimentos	Ocratoxina A ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )
Cereais e produtos de cereais	10
Feijão	10
Café (grão torrado ou moído) ou café solúvel	10
Vinho, suco de uva e polpa de uva	2
Especiarias	30
Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	2
Produtos de cacau e chocolate	5,0
Amêndoa de cacau	10
Frutas secas e desidratadas	10

Fonte: Anvisa, 2011

Batista e Chalfoun (2007) avaliaram a incidência de ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.) (boia, mistura e varrição) após a secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. Não foi detectada a presença de ocratoxina A em 40% das amostras analisadas, e foram detectadas a presença de ocratoxina A em níveis que variaram de 0,1 a  $5,0 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de café em 31% das amostras. Os autores observaram que os níveis de contaminação foram maiores na fração varrição secas em terreiro de terra do que nas frações

boia e mistura. Dessa forma, concluíram que esse ambiente aumenta o risco de contaminação de ocratoxina A.

Santiago *et al.* (2018), estudando os óleos essenciais *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca quinquenervia* e *Backhousia citriodora*, observaram que os óleos essenciais foram ativos contra síntese de ocratoxina A por fungos filamentosos (*A. niger* e *A. carbonarius*) em meio de cultura. A redução da produção da ocratoxina A variou de 17,94 a 98,68%, indicando que os óleos essenciais podem ser bons agentes biocontroladores contra a contaminação dessa micotoxina nos alimentos.

## 2.4 Metabólitos secundários de plantas

Desde a antiguidade, o homem sempre buscou utilizar as plantas para a sua sobrevivência, tanto na alimentação quanto na prevenção e/ou tratamento de doenças. De fato, as propriedades presentes nas plantas medicinais aumentam o interesse da pesquisa; sobretudo, pelos compostos bioativos capazes de proporcionar atividades terapêuticas, permitindo a elaboração de medicamentos de maior eficácia.

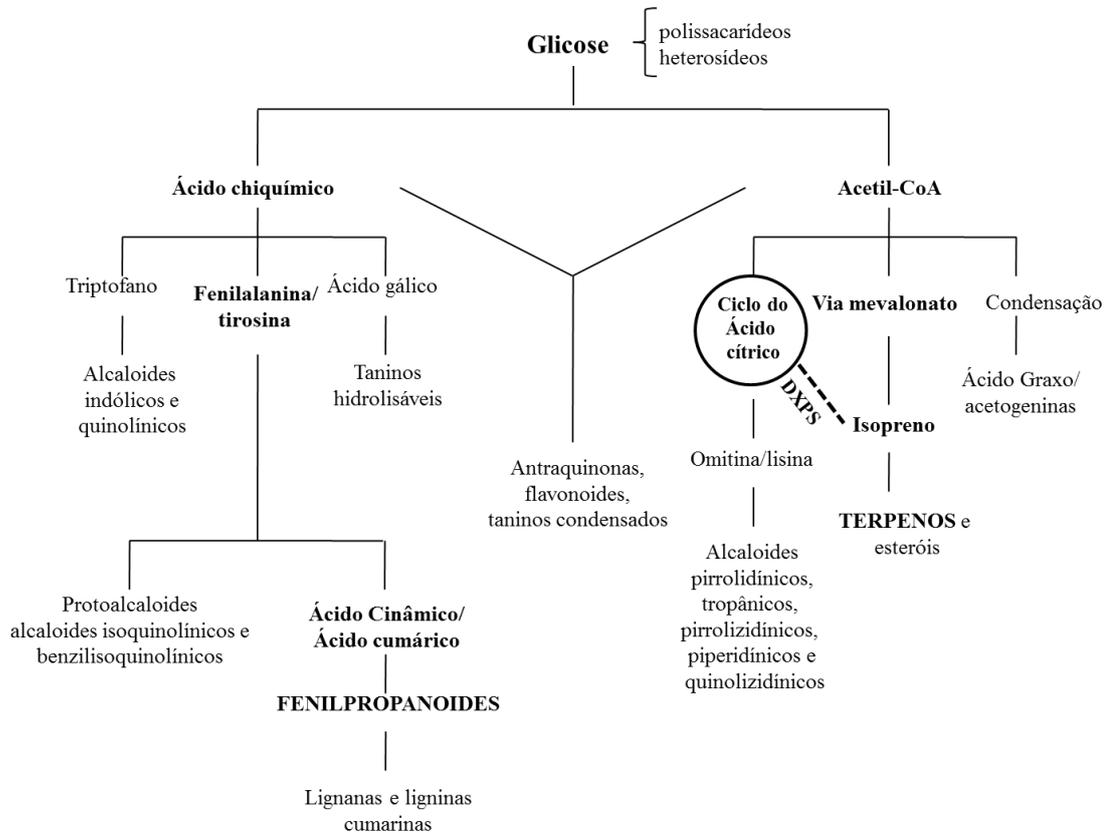
Esses compostos são substâncias orgânicas, com estrutura complexa, formados pelo metabolismo secundário das plantas, as quais são responsáveis por diversas atividades biológicas (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

O metabolismo caracteriza-se por um conjunto de reações químicas presentes nas células dos seres vivos, podendo ser dividido em primário (conjunto de reações essenciais para a vida) e secundário (conjunto de reações não essenciais para a vida) (SIMÕES *et al.*, 2007).

A presença dos metabólitos secundários desempenha função decisiva durante a comunicação química praticada entre as plantas e o ambiente. A quantidade e a qualidade desses metabolitos é influenciada por diversos fatores como: períodos de estresse hídrico, ataques de predadores, variações climáticas, sazonalidade, exposição à radiação UV, composição química do solo e poluição atmosférica (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

A biossíntese desses metabólitos ocorre a partir da glicose, via dois precursores básicos: o ácido chiquímico e o acetato, conforme mostrado na Figura 2 (SIMÕES *et al.*, 2007). Os alcaloides aromáticos, os fenilpropanoides, as cumarinas e os taninos hidrolisáveis são sintetizados pela via do ácido chiquímico. Já os ácidos graxos, terpenos, esteróis e alcaloides alifáticos são oriundos da via do acetato (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Figura 2 – Biossíntese de metabólitos secundários.



Fonte: Adaptado de Simões et al., 2007.

## 2.5 Óleos essenciais

A ISO (International Standard Organization) define “óleos essenciais como produtos obtidos a partir de matéria-prima de origem vegetal, por meio de hidrodestilação, destilação a vapor ou por processo mecânico, como a expressão de pericarpos de frutos cítricos” (SIMÕES et al., 2007).

São misturas de compostos orgânicos derivados de fenilpropanoides e/ou terpenos, sua composição química é constituída de substâncias de baixo peso molecular, basicamente dos elementos hidrogênio e carbono, e alguns grupos funcionais como: álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis e outros. Essas substâncias em conjunto se apresentam em proporções diferentes; porém, uma ou duas apresentam em maiores proporções, denominados de compostos majoritários, outros em proporções moderadas, e os compostos minoritários são aqueles cujas concentrações são mínimas (SIMÕES et al., 2007).

São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. A maioria dos óleos

essenciais são incolores ou ligeiramente amarelados, com exceção dos óleos que apresentam altos teores de azulenos, como o óleo essencial extraído da camomila. Podem receber outras intitulações como óleos voláteis ou óleos etéreos (RÍOS, 2016).

Nas plantas, os óleos essenciais apresentam funções de atração de insetos para polinização, assegurando a reprodução e sobrevivência das espécies; outra função é a proteção contra predadores e redução da desidratação em períodos de elevada exposição a temperaturas altas (POLATOĞLU E KARAKOÇ, 2016).

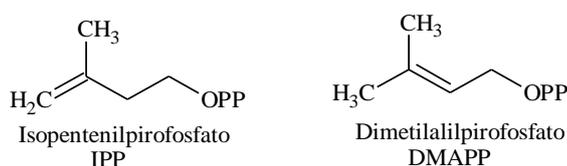
Os óleos essenciais são armazenados em diferentes órgãos das plantas, tais como folhas (eucalipto), sementes (noz-moscada), frutos (anis-estrelado), rizomas (gingibre), madeira (candeia) ou flores (laranjeira), podendo ser encontrados em diferentes estruturas secretoras especializadas, como em pelos glandulares, células parenquimáticas, bolsas lisígenas e canais oleíferos (EL ASBAHANI et al., 2015).

O potencial biológico que os óleos essenciais desempenham nas plantas e no meio ambiente vem despertando o interesse das indústrias agroquímicas, farmacêuticas, alimentícia, dentre outras, para a exploração desses metabólitos, devido à suas propriedades antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, inseticidas, alelopáticas (EL ASBAHANI et al., 2015).

### 2.5.1 Biossíntese de Terpenos

Os terpenos são substâncias químicas de grande abundância nos vegetais. Quando há elementos adicionais como o oxigênio, podem ser chamados de terpenoides, apresentando os diferentes grupos funcionais: ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis ou epóxidos terpênicos. São originados da junção dos intermediários isopentenilpirofosfato, IPP e o dimetilalilpirofosfato, DMAPP (Figura 3).

Figura 3 – Estrutura básica do isopentenilpirofosfato e dimetilalilpirofosfato.



A condensação de duas unidades isoprênicas resulta nos monoterpenos ( $C_{10}H_{16}$ ), substâncias voláteis, incolores e lipofílicas, demonstrando grande importância comercial, conferindo sabor e cheiro aos alimentos, bebidas, perfumes, cosméticos e em ampla gama de produtos de limpeza; nas plantas, estão envolvidos na atração de polinizadores, agem como

repelentes, além de outras funções ecológicas. Em relação à atividade biológica, sua interação consiste na interação com a membrana dos microrganismos. Os sesquiterpenos são formados a partir de três unidades isoprênicas e possuem a fórmula  $C_{15}H_{24}$ , e os diterpenos por quatro unidades isoprênicas e têm a fórmula  $C_{20}H_{32}$  (LÜCKER, 2002; KÜLHEIM et al. 2015; TURINA et al., 2006)

A biossíntese dos terpenos deriva-se de duas vias distintas: a via citosólica ou via do mevalonato (MVA) no citosol e a via do 1-deoxi-D-xilose-5-fosfato (DXPS) no cloroplasto, originando os diferentes terpenos (KÜLHEIM et al. 2015).

A via do mevalonato (Figura 4) inicia-se por meio da condensação de três moléculas de acetil-CoA pelas enzimas tiolase e hidroximetilglutaril-CoA sintase (HMG-CoA) para formar o  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA, o qual sofre redução pela ação da HMG-CoA redutase, produzindo ácido mevárdico hemitioacetal levando à formação do ácido mevalônico; esse, por meio de duas fosforilações e uma descarboxilação, é convertido a IPP. A enzima isomerase interconverte o IPP em DMAPP. (DEWICK, 2009).

Figura 4 - Biossíntese dos terpenos pela via do mevalonato. (Continuação).

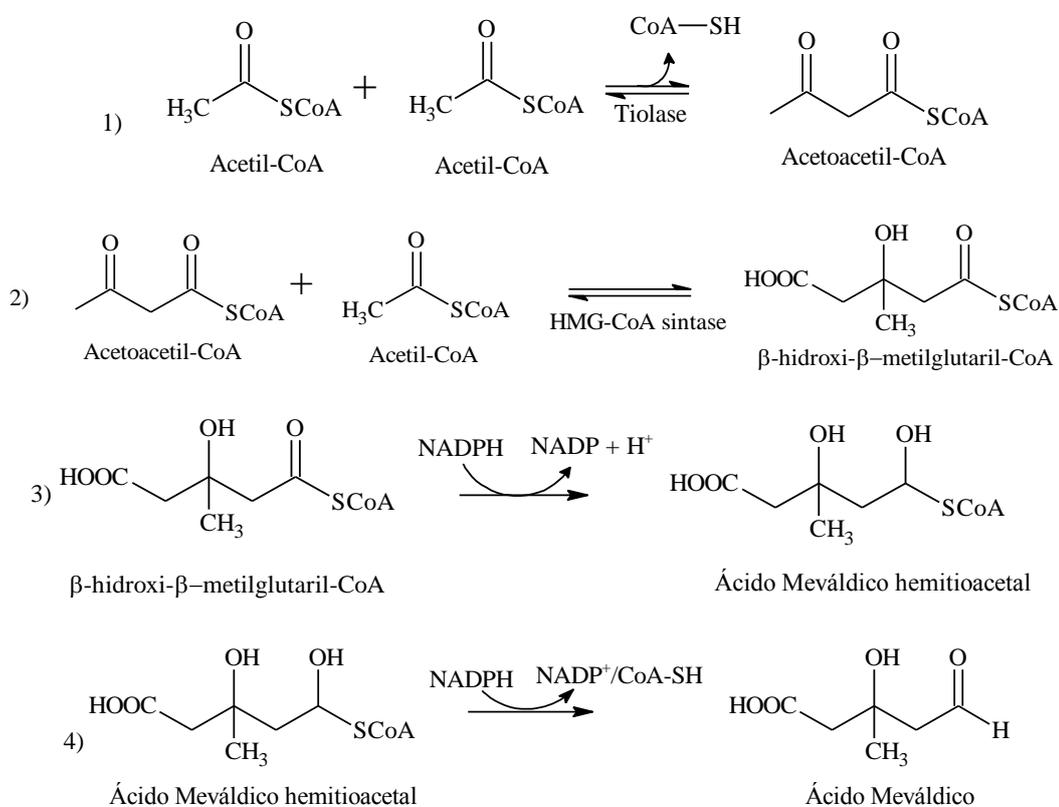


Figura 4 - Biossíntese dos terpenos pela via do mevalonato. (Continuação).

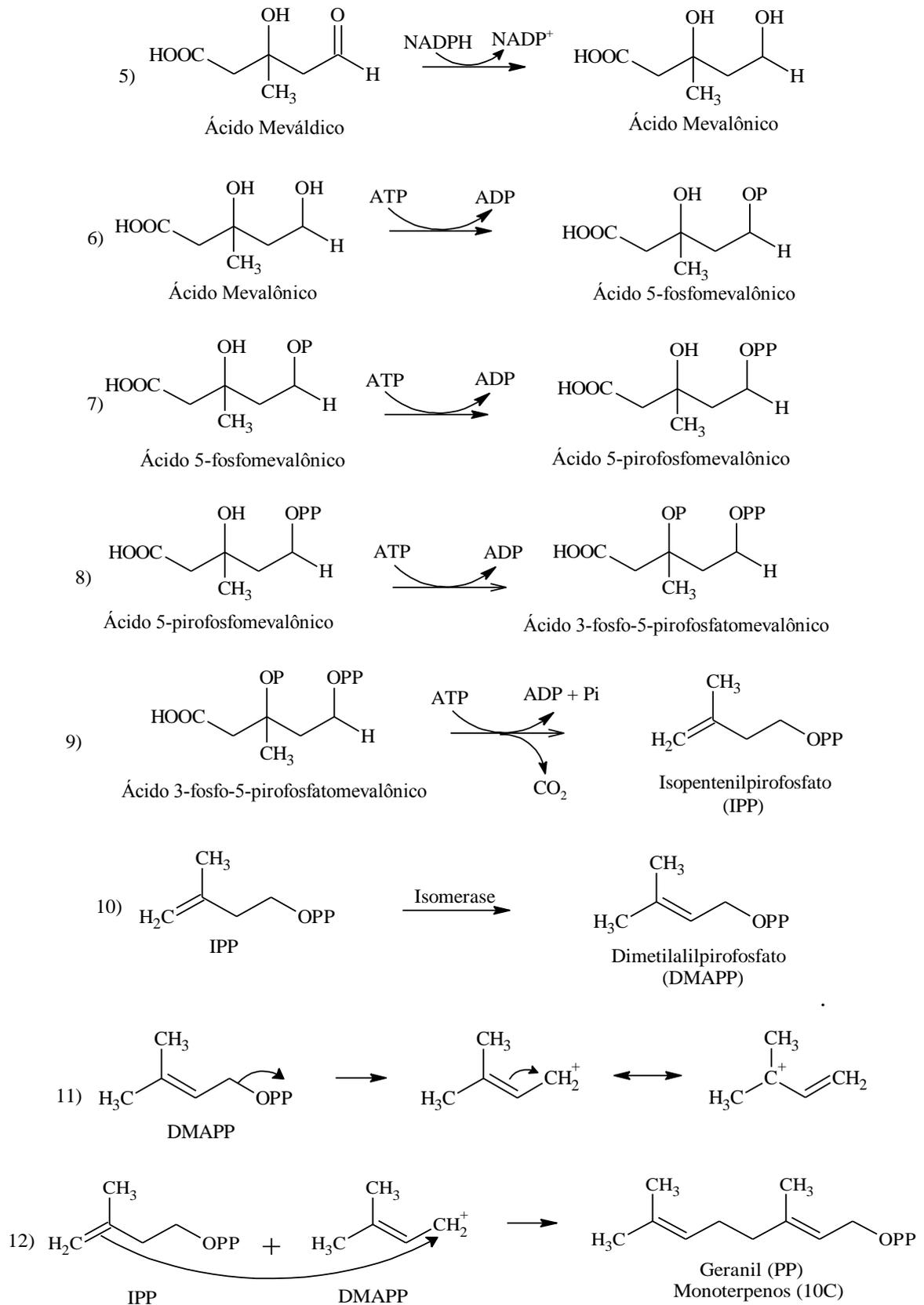
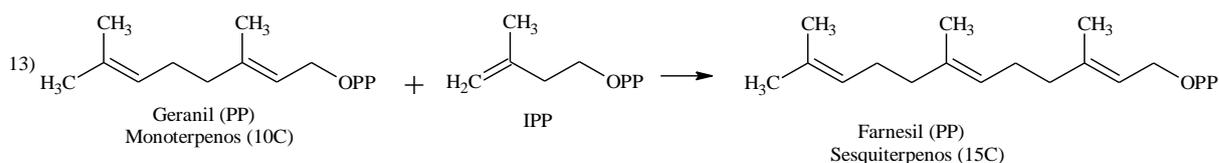


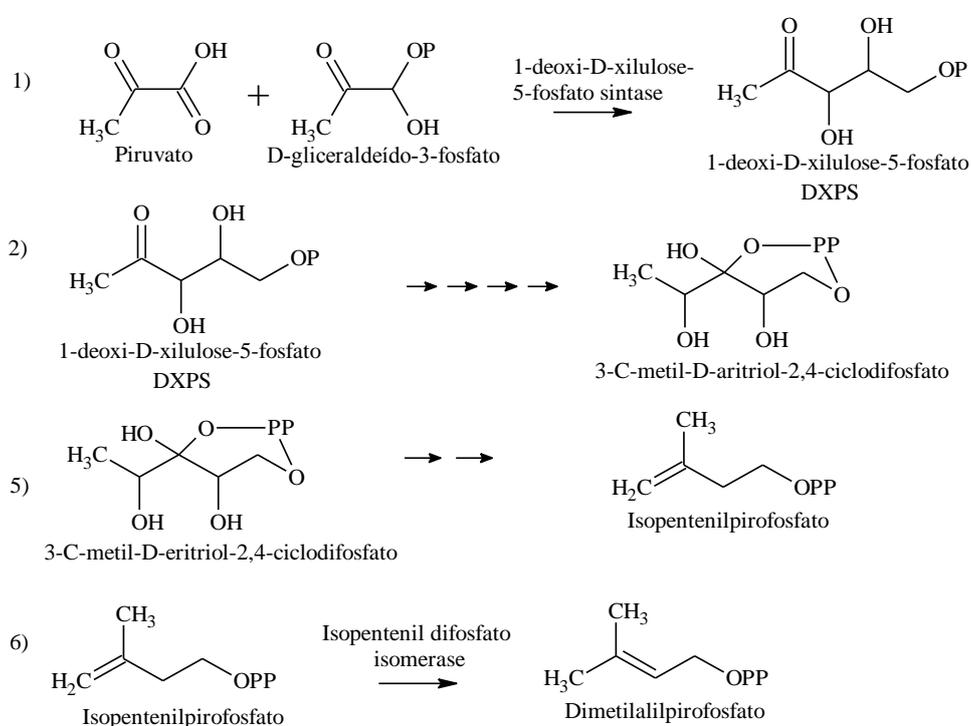
Figura 4 - Biossíntese dos terpenos pela via do mevalonato. (Conclusão)



Fonte: Teixeira (2016).

Já a via DXPS (Figura 5) inicia-se com síntese do DXPS partindo da condensação de piruvato e D-gliceraldeído-3-fosfato, que após sucessivas reações, é convertido em IPP e DMAPP, precursores básicos dos terpenos (LÜCKER, 2002).

Figura 5 - Biossíntese dos terpenos pela via DXPS.



Fonte: Adaptado de Lücker (2002).

### 2.5.2 Biossíntese de Fenilpropanoides

O fenilpropanoides são formados pela via do chiquimato (Figura 6), tendo como precursor o ácido chiquímico (SIMÕES et al., 2007). A síntese do ácido chiquímico ocorre pela condensação aldólica entre os intermediários fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato. Uma vez formado o ácido chiquímico, ele é fosforilado e, na presença de outra molécula de PEP, metaboliza-se no ácido corísmico que, por ação da enzima corismato mutase, sofre um rearranjo intramolecular (tautomerismo) para produzir o ácido prefênico (TEIXEIRA, 2016).

Esse ácido, em virtude da enzima prefenato desidrogenase e da coenzima na forma oxidada da difosfopiridina nucleotídeo ( $\text{NAD}^+$ ), libera uma molécula de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) e de  $\text{NADH}$  na forma reduzida com  $\text{H}^+$ , que originará o aminoácido tirosina. Na ausência da coenzima  $\text{NAD}^+$ , ocorre a liberação de uma molécula de  $\text{CO}_2$  e o grupamento hidroxila para formação do aminoácido fenilalanina (TEIXEIRA, 2016).

Em consequência, a enzima fenilalanina amonilase retira uma molécula de amônia resultando na síntese das unidades básicas dos ácidos p-cumárico e cinâmico, que por sua vez, originam os diferentes fenilpropanoides por intermédio de reações de redução, oxidação e ciclização (TEIXEIRA, 2016).

Figura 6 – Biossíntese dos Fenilpropanoides. (Continuação).

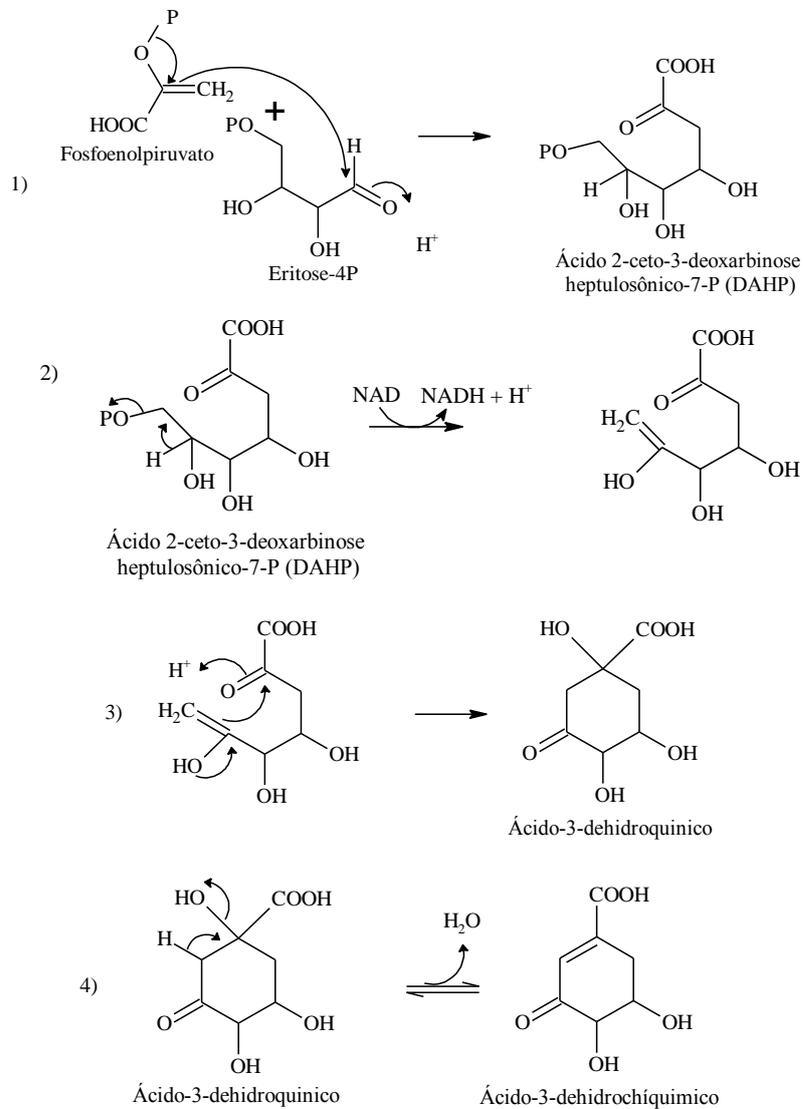


Figura 6 – Biossíntese dos Fenilpropanoídes. (Continuação).

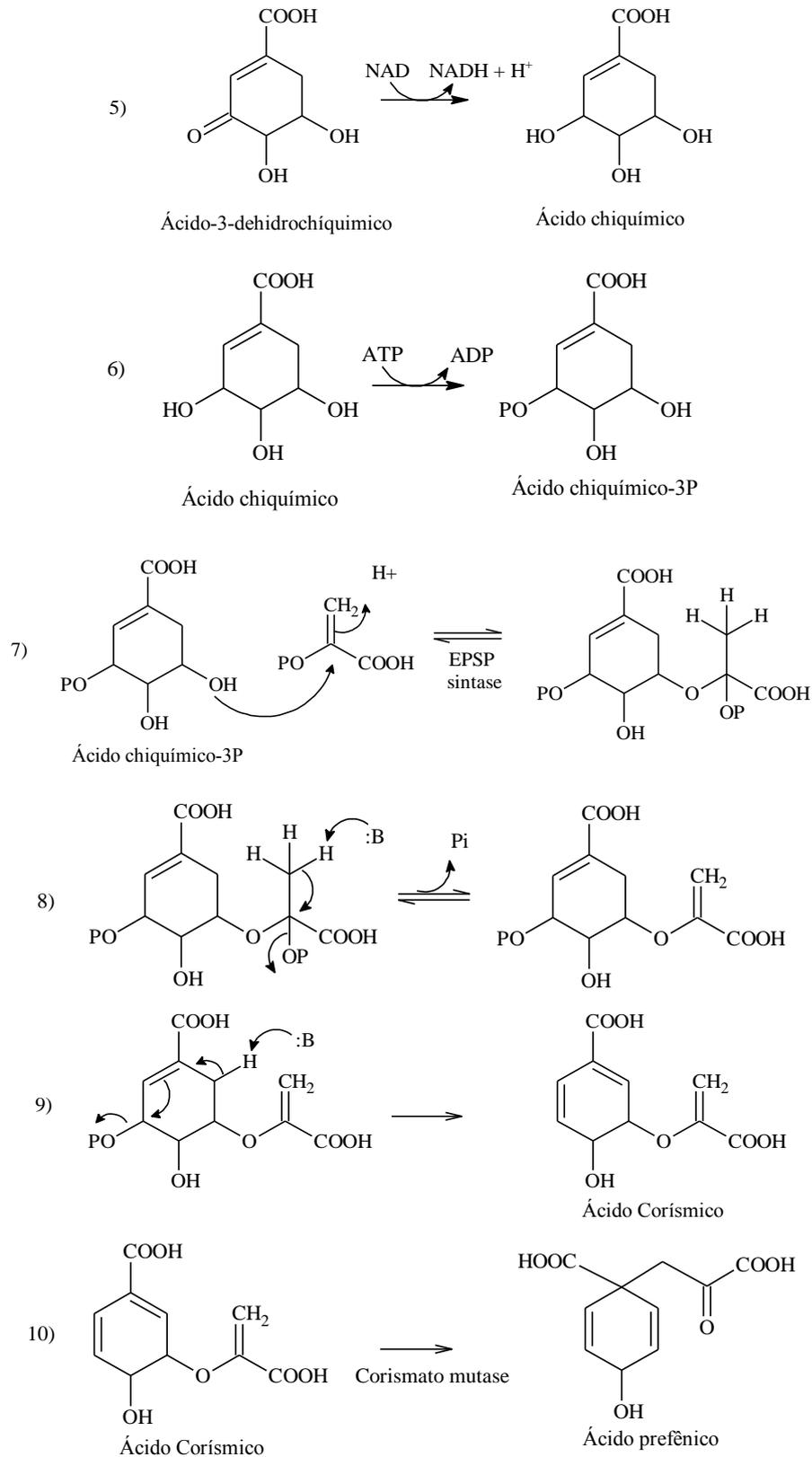


Figura 6 – Biossíntese dos Fenilpropanoídes. (Continuação).

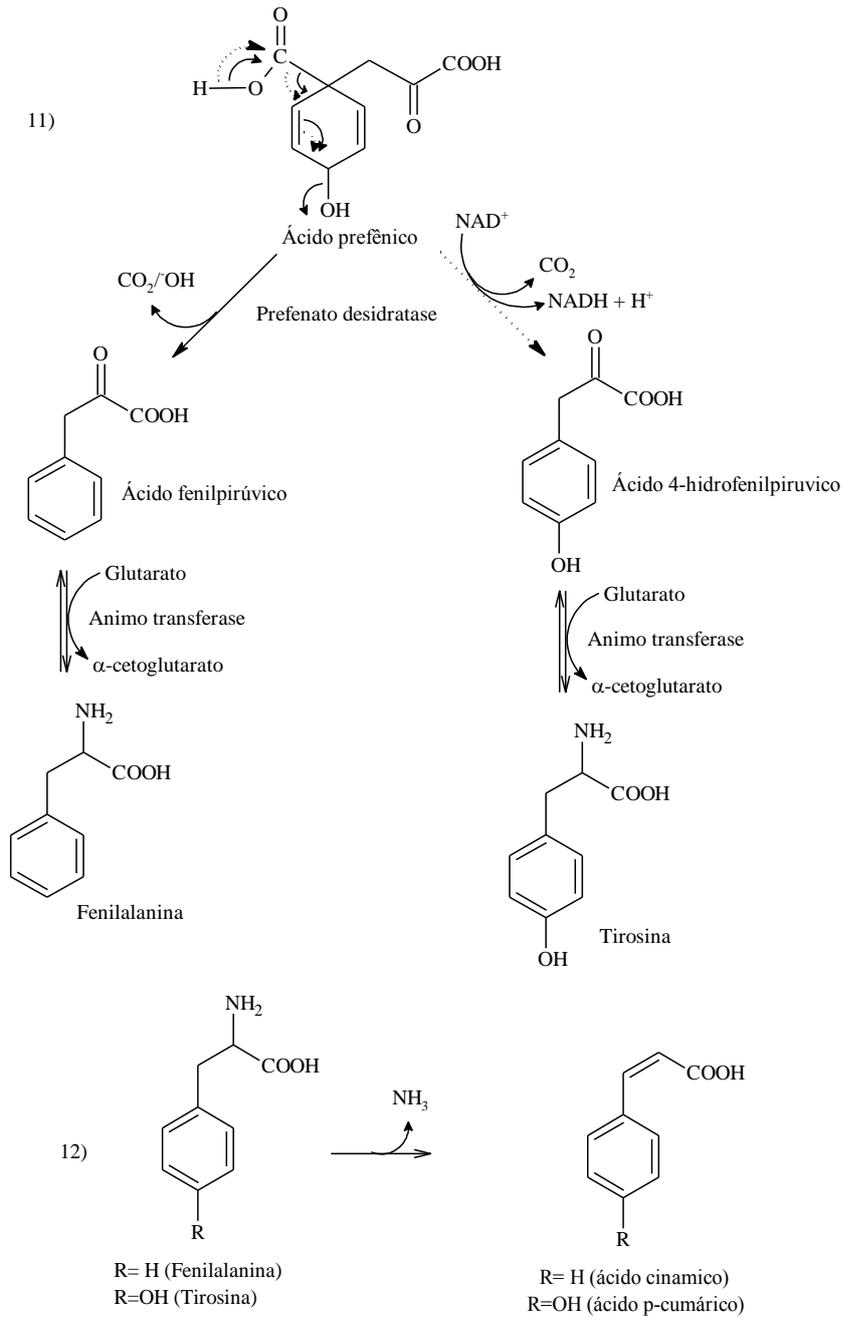
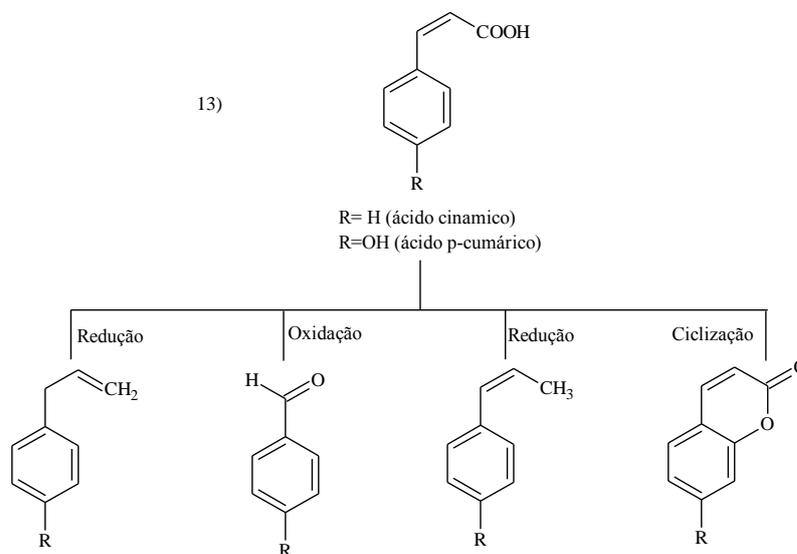


Figura 6 – Biossíntese dos Fenilpropanoides. (Conclusão).



Fonte: Teixeira (2016).

### 2.5.3 Potencial biológico dos óleos essenciais

A complexa composição química dos óleos essenciais possibilita inúmeras atividades biológicas, como antibacteriana (GOMES et al., 2014; SILVA et al., 2015), antifúngica (CAMARGO et al., 2017), antioxidante (ANDRADE et al., 2013), inseticida (CASTILLO et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2014), citotóxica (DA SILVA, 2017a) alelopática (MIRANDA et al., 2015) e entre outras. Vários estudiosos ressaltam as propriedades dos óleos essenciais.

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais das espécies do gênero *Citrus*: limão galego (*Citrus aurantifolia*), limão-verdadeiro (*Citrus limon*) e laranja (*Citrus sinensis*), juntamente com os componentes majoritários limoneno, citral e a mistura de deles sobre as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Cholerasuis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* foi avaliada por Gomes et al. (2014). De acordo com os autores, os óleos e os padrões testados apresentaram atividade antibacteriana, exceto para a bactéria *P. aeruginosa*. De toda a avaliação, o citral mostrou-se mais eficiente que o limoneno.

Camargo et al. (2017), estudando o óleo essencial de *Hyptis carpinifolia* sobre os fungos *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum*, verificaram que o óleo inibiu o crescimento micelial de *B. cinerea* e *A. alternata*, em 67% e 33%, respectivamente, na diluição de 750  $\mu\text{L L}^{-1}$ , enquanto o fungo *F. oxysporum* apresentou inibição micelial de 48%, na diluição de 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Houicher et al. (2018) determinaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *Anacyclus Valentinus* sobre 7 espécies toxigênicas e verificaram que o óleo essencial na concentração de 1,25  $\mu\text{L mL}^{-1}$  inibiu o crescimento dos microrganismos *A.*

*flavus* e *F. moniliforme*; já os fungos, *A. ochraceus* e *P. citrinum* a concentração capaz de inibir o crescimento foi  $10 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ , evidenciando o potencial antifúngico dos óleos essenciais.

A atividade inseticida e repelente dos óleos essenciais de *L. alba*, *L. origanoides*, *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon flexuosus*, *Citrus sinensis*, *Cananga Odorata*, *Swinglea glutinosa*, e *lucida Tagetes* sobre *Aedes aegypti* foi investigada por Castillo e colaboradores (2017). Os autores encontraram efeito tóxico e repelente sobre o mosquito em estudo e sugeriram a utilização de tais óleos como possíveis agentes inseticidas. Os óleos essenciais são uteis no controle de várias pragas, como o pulgão *Myzus persicae*, conforme estudos realizados por Teixeira et al. (2014). De acordo com os autores, os óleos essenciais de *L. origanoides* Kunth. e *Mentha spicata* L., apresentando carvacrol e a piperitona, respectivamente, como majoritários, exibiram atividade biológica sendo considerados inseticidas naturais capazes de controlar o desenvolvimento do pulgão *Myzus*.

Miranda *et al.* (2015) estudaram a atividade alelopática sobre a germinação de sementes e vigor de plântulas de alface dos óleos essenciais das folhas e rizomas de *Hedychium coronarium*, e atribuíram ao constituinte majoritário presente, o 1,8-cineol, a melhor atividade do óleo essencial dos rizomas.

## 2.6 *Backhousia citriodora*

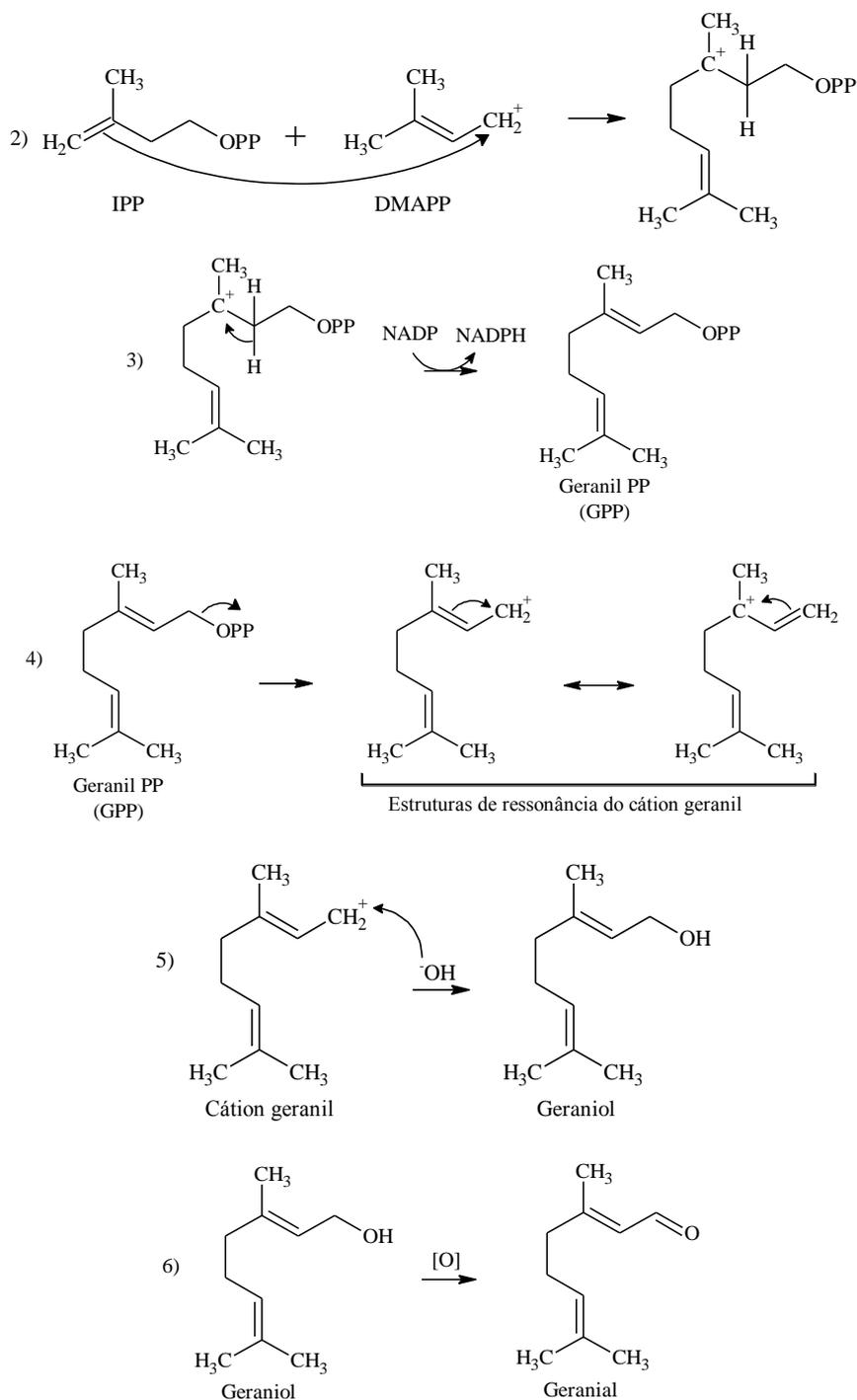
*Backhousia citriodora* (FIGURA 7), conhecida como murta-limão ou limão-australiano e pertencente à família Myrtaceae, é uma planta com ocorrência desde arbusto grande a árvore de tamanho médio (3 – 30 m de altura). Essa espécie é originária das florestas tropicais da região sudeste de Queensland, na Austrália (BUCHAILLOT et al., 2009; ALDEREES et al., 2018).

Figura 7 - Aspecto geral da espécie *Backhousia citriodora*.





Figura 9 - Biossíntese do monoterpene geranial. (Conclusão).

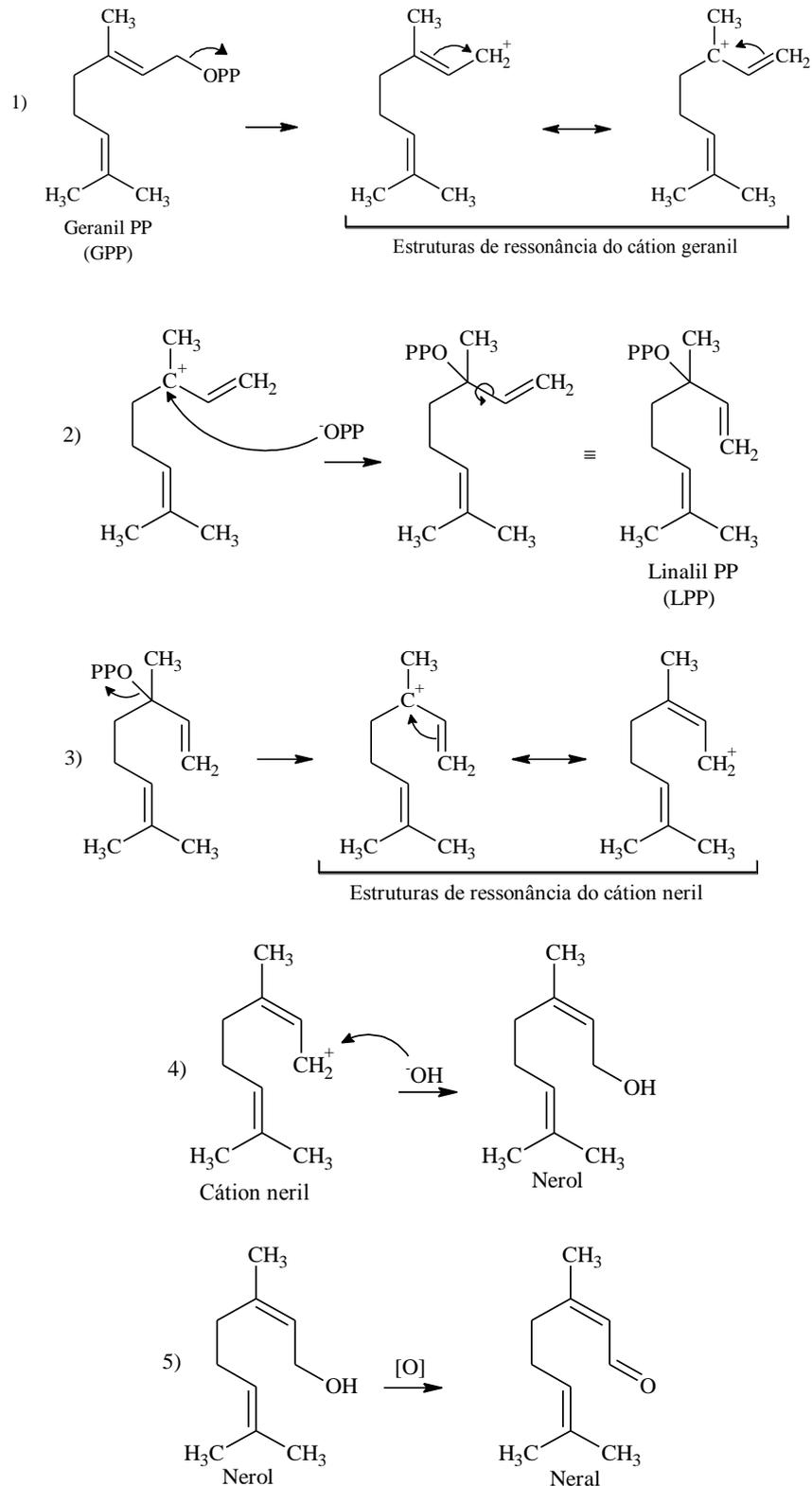


Fonte: Adaptado de Dewick (2009).

Os isômeros geranial e neral apresentam em suas formações o intermediário GPP, comum a ambos. Assim, o precursor para a biossíntese do neral é o GPP, conforme apresentado na biossíntese seguinte (FIGURA 10). O GPP, após sofrer uma ionização no cátion alílico, possibilita ao grupo difosfato uma mudança para o carbono terciário; em seguida, modifica-se a estereoquímica da ligação dupla, fornecendo o linalil difosfato (LPP),

que elimina o grupo difosfato e estabiliza-se por ressonância. Então, o cátion neril sofre hidratação e, por último, oxidação, originando o neral (DEWICK, 2009).

Figura 10 - Biossíntese do monoterpene neral.



Fonte: Adaptado de Dewick (2009).

## 2.7 *Lippia origanoides* Kunth

*Lippia origanoides* Kunth. (FIGURA 11), conhecida popularmente como alecrim-d'angola, ou “salva-do-marajó”, é um arbusto da família Verbenaceae. Pode ser encontrada em regiões de solos rochosos, como o cerrado e a caatinga, em uma altitude entre 160 e 1800 m. Está distribuída na América do Sul, presente na Bolívia, Brasil, Guiana, Paraguai e norte da Argentina (O'LEARY et al., 2012)

Figura 11 - Aspecto geral da espécie *Lippia origanoides* Kunth.



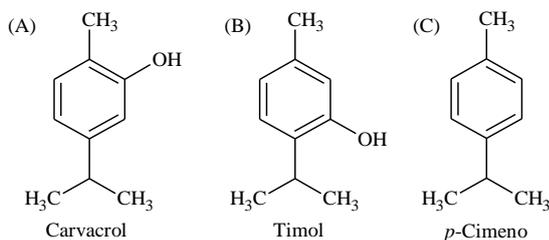
A espécie *Lippia* possui odor bem agradável, suas folhas são utilizadas como tempero culinário pela população da Região Norte do Brasil, em substituição ao orégano; na medicina popular, é empregada no tratamento de resfriados, gripes, bronquites, doenças gastrointestinais, respiratórias e tosses (O'LEARY et al., 2012; SARRAZIN et al., 2015a)

O potencial biológico e farmacológico do óleo essencial das partes aéreas de *L. origanoides* tem motivado diversas pesquisas científicas nas quais se ressaltam as diferentes bioatividades desse óleo. Podem-se citar o efeito pró-coagulante no plasma humano (TEIXEIRA et al., 2018), a atividade antimicrobiana (SARRAZIN et al., 2015a), antioxidante (DA SILVA et al. 2017b), larvicida (MAR et al., 2018) e inseticida (TEIXEIRA et al., 2014).

A ampla atividade biológica evidenciada por esse óleo está relacionada com a sua composição química. Os constituintes majoritários, monoterpenos com características fenólicas e hidrocarbonetos monoterpenos, são apontados como os responsáveis pelas atividades (TEIXEIRA et al., 2014; DE MEDEIROS et al. 2016; SOARES et al., 2017).

Diferentes quimiotipos de *L. origanoides* são relatados na literatura e os compostos majoritários voláteis frequentemente encontrados são carvacrol, timol e *p*-cimeno (FIGURA 12) (ALMEIDA et al., 2018).

Figura 12 - Estrutura química dos monoterpênos Carvacrol (A), Timol (B) e *p*-Cimeno (C).



BEDOYA et al. (2015), analisando o óleo essencial de *L. origanoides* na Bolívia, relataram que os constituintes majoritários presentes foram os já citados timol (73,7%) e *p*-cimeno (10,5%); esses pesquisadores obtiveram também o monoterpêno mirceno (3,1%).

### 2.7.1 Biossíntese dos terpenos monocíclicos *p*-cimeno, carvacrol e timol

A biossíntese dos monoterpênos cíclicos *p*-cimeno, carvacrol e timol (FIGURA 13), ocorre a partir do cátion neril, por apresentar estereoquímica (*Z*) favorável, permitindo a formação de compostos cíclicos ocasionados pela proximidade dos elétrons  $\pi$  da dupla ligação com a carga positiva do carbocátion, fornecendo o cátion  $\alpha$ -terpinil, que possibilita um arranjo Wagner-Meerwein, formando o  $\gamma$ -terpineno (DEWICK, 2009).

Pressupõe-se que o  $\gamma$ -terpineno sofre aromatização, levando à produção do *p*-cimeno, o qual pode ser hidrolisado para forma os isômeros carvacrol e timol (ALIZADEH et al., 2013).

Figura 13 - Biossíntese dos monoterpênos cíclicos *p*-cimeno, carvacrol e timol. (Continuação)

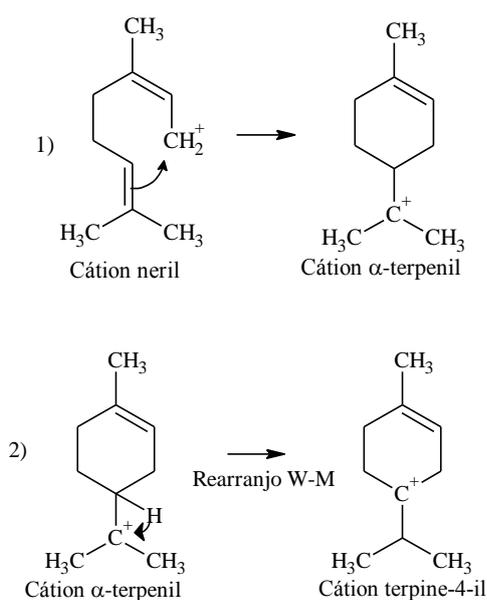
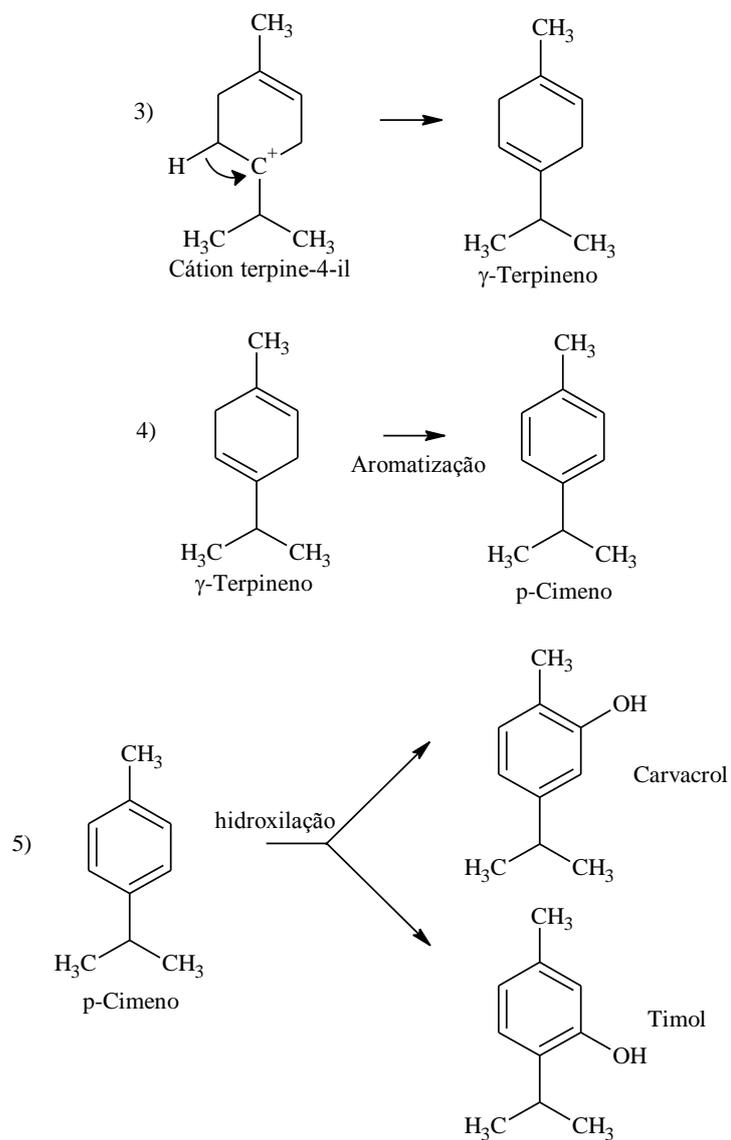


Figura 13 - Biossíntese dos monoterpênos cíclicos *p*-cimeno, carvacrol e timol. (Conclusão)



Fonte: Adaptado de Dewick (2009) e Alizadeh *et al.* (2013).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta do material vegetal

As espécies *Backousia citriodora* e *Lippia origanoides* foram coletadas no Horto de Plantas Medicinas da Universidade Federal de Lavras (UFLA) (21°13' de latitude sul e 44°58' longitude oeste) no mês de março de 2018, em dia sem precipitação. As folhas das plantas foram limpas, selecionadas quanto ao grau de imperfeição, picadas e pesadas, sendo imediatamente utilizadas para a extração do óleo essencial.

A identificação das espécies vegetais estudadas foi realizada pela doutora Mariana Esteves Mansanares, do Departamento de Biologia da UFLA, e a exsicata da *Lippia origanoides* foi depositada no Herbário ESAL, sob registro de número 23660 (BRANDÃO, 2017) e a exsicata da *Backousia citriodora*, sob registro de número 30300.

#### 3.2 Extração dos óleos essenciais

O óleo essencial foi extraído no Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais do Departamento de Química (DQI) da UFLA. O método de extração aplicado foi o de hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado (BRASIL, 2010). Foram pesados 300 gramas do material vegetal em um balão com capacidade de 5 L com aproximadamente 2,5 L de água. A mistura (material vegetal e água) permaneceu em processo de extração por 2 horas. Em sequência, foi coletado o hidrolato e centrifugado em centrífuga Excelsa Baby II Modelo 206-R, por 15 minutos. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, o óleo essencial foi pipetado e acondicionado em um vidro âmbar sob refrigeração. Foram realizadas três extrações de óleo essencial para cada planta.

#### 3.3 Determinação da umidade e rendimento dos óleos essenciais

Paralelamente às extrações, foi determinado o teor de umidade dos óleos essenciais, conforme metodologia descrita por Pimentel et al. (2006). Foram adicionados 5 g do material vegetal fresco a 80 mL de ciclohexano em um balão de fundo redondo, acoplado ao aparelho Dean stark. A mistura permaneceu em aquecimento por 2 horas; em seguida foi medido o volume de água presente no material vegetal.

O rendimento das extrações dos óleos essenciais foi determinado em porcentagem peso/peso (%p/p) em base livre de umidade (BLU), utilizando a equação 1.

$$\%R = \frac{100 \cdot \text{peso do óleo essencial}}{\text{peso da amostra} - \frac{(\text{peso da amostra} \cdot \text{umidade})}{5}}$$

Equação 1

### 3.4 Caracterização química dos óleos essenciais

A caracterização química do óleo essencial foi realizada na Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ) do DQI da UFLA.

Os compostos químicos foram identificados por cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), utilizando-se um aparelho Shimadzu, modelo QP 5050A, nas seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase ligada DB5 (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano) (0,25 µm de espessura de filme); gás de arraste, hélio, fluxo de saída 1,0 mL min<sup>-1</sup>; volume da amostra injetada de 0,1 µL, diluída em hexano; taxa de partição do volume injetado de 1:20 e pressão na coluna de 71,0 kPa; temperatura do forno foi programada para 60 °C, 1min, aumentando até 246 °C (3 °C min<sup>-1</sup>), em seguida a 10 °C até atingir 300 °C, mantendo-se constante por 7 min; temperatura do injetor e detector, 220 °C e 240 °C, respectivamente. As condições do espectrômetro de massas foram: detector de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos e fragmentos detectados na faixa de 45 a 500 Da.

Os compostos foram identificados por comparação com as bibliotecas do equipamento, NIST107 e NIST21, sendo a quantificação de cada constituinte obtida por meio de normalização de áreas (%), por meio de um cromatógrafo gasoso Shimadzu CG-17A, equipado com detector por ionização de chamas (DIC), nas mesmas condições experimentais usadas para identificação dos constituintes do óleo essencial.

O índice de retenção foi calculado empregando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963) (Equação 2) em relação à série homóloga de n-alcenos (nC<sub>8</sub>-nC<sub>18</sub>):

$$IR = 100n + \frac{100 \cdot tR(i) - tR(n)}{tR(n+1) - tR(n)}$$

Equação 2

Em que:

tR = o tempo de retenção do composto avaliado;

i = composto avaliado; n = número de carbonos do padrão antecessor ao composto avaliado;

n + 1 = número de carbonos do padrão sucessor ao composto avaliado.

### 3.5 Obtenção e identificação dos microrganismos

Os ensaios biológicos realizados no presente estudo foram realizados em parceria com o Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – Epamig/URESM e na Agência de Inovação do Café – UFLA (Inovacafé).

Os isolados fúngicos dos gêneros *Aspergillus* Seção Niger e Seção Circumdati foram obtidos pela técnica de plaqueamento direto, pelo método Blotter Test, em grão de café (ANGÉLICO, 2012 citado por TEMPE, 1963).

As análises foram realizadas sem desinfestação para a observação da microbiota total presente no exterior e interior dos grãos. Foram utilizadas 4 placas de Petri de 13 cm de diâmetro, contendo papel-filtro de germinação, sendo colocados 25 grãos de café, totalizando 100 frutos. As placas foram incubadas em estufa do tipo Biochemical Oxygen Demand (BOD), à temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas por 10 dias. Após o período de incubação, foi observada a ocorrência das colônias fúngicas de interesse e providenciada a repicagem aleatória de 20 colônias de cada seção para a avaliação do melhor isolado a ser utilizado nas análises.

Posteriormente, os isolados foram purificados em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Ágar) a 25°C, para a avaliação do índice de velocidade de crescimento micelial, determinado segundo a fórmula descrita por Oliveira (1991). Procedeu-se à avaliação do potencial toxigênico por meio do plaqueamento direto dos isolados, em meio de cultura CEA (Coconut Extract Agar). Os microrganismos foram incubados em estufa do tipo BOD à temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas por 10 dias. Após o período, observou-se com o auxílio de um cromatovisor (CAMAG), no comprimento de onda de 366 nm, a formação de fluorescência devido à produção de micotoxinas pelos isolados testados (LIN E DIANESE, 1976).

A identificação quanto à espécie dos isolados selecionados foi realizada conforme o isolamento dos microrganismos em meio de cultura CYA (Czapek, Yeast Extract, Ágar), incubados a 25°C e 37°C, por um período de 7 dias, de acordo com as chaves de identificação propostas por Chalfoun e Batista (2003), Klich (2002) e Samson, Visagie e Houbraken, (2014).

Foram selecionados os isolados que apresentaram o conjunto de características favoráveis, ou seja, maior velocidade de crescimento micelial e elevado potencial de produção de ocratoxina A. Os isolados selecionados foram identificados como *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*.

### 3.6 Atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais

A atividade antifúngica *in vitro* foi avaliada conforme metodologia descrita por Singh et al. (2008) com modificações, verificando-se a porcentagem de inibição micelial e determinando-se a concentração mínima inibitória.

Os isolados foram reativados em placas de cultura contendo meio de cultura Malte Agar (MA) a 25°C por 10 dias. Após esse período, realizou-se o plaqueamento, replicando-se o fungo ao centro da placa contendo 20 mL de meio MA adicionado de óleos essenciais, nas concentrações 50, 100 250, 500, 1000, 2000 e 3000  $\mu\text{L.L}^{-1}$ . Como padrão de comparação, a uma placa adicionaram-se apenas o meio de cultura e o microrganismo. Todas as placas foram incubadas em BOD a 25 °C, no escuro, por 15 dias, sendo realizadas as medições ortogonais do diâmetro do crescimento micelial no último dia de incubação. Essas análises foram realizadas em triplicata. A porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo pelo óleo essencial foi calculada utilizando a equação 3.

$$\text{Porcentagem de inibição micelial (\%)} = \frac{(d_c - d_t)}{d_c} \times 100$$

Equação 3

Em que,

$d_c$  = diâmetro do crescimento micelial do controle;

$d_t$  = diâmetro do crescimento micelial do tratamento.

### 3.7 Influência dos óleos essenciais sobre a síntese de Ocratoxina A *in vitro*

A inibição da produção de ocratoxina A pelos fungos *A. carbonarius* e *A. ochraceus* em meio de cultura foi realizada seguindo a metodologia descrita por Wang et al. (2012).

Os isolados foram reativados em placas de cultura contendo meio de cultura Malt Agar (MA) a 25 °C por 7 dias. Posteriormente, preparou-se a solução de esporos em água destilada contendo 1% de Tween 80, na concentração de  $10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  determinados em câmara de Newbauer.

O plaqueamento foi realizado inoculando-se 10  $\mu\text{L}$  da suspensão de esporos no centro da placa contendo 20 mL de meio de cultura Czapeck Yeast Agar (CYA) e Yeast Extract Sucrose Agar (YES), para os fungos *A. carbonarius* e *A. ochraceus*, respectivamente, adicionado de óleos essenciais diluídos em solução de leite em pó 10% para obter as concentrações utilizadas. As concentrações testadas foram a concentração mínima inibitória e

duas acima dela, determinada em testes preliminares e utilizada nos testes in vivo (QUADRO 2).

Quadro 2 – Concentrações obtidas por testes preliminares e utilizadas nos posteriores experimentos.

Microrganismos	Concentração ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	
	<i>B. citriodora</i>	<i>L. origanoides Kunth</i>
<i>A. carbonarius</i>	500	250
	1000	500
	2000	1000
<i>A. ochraceus</i>	250	500
	500	1000
	1000	2000

Como padrão de comparação, 10  $\mu\text{L}$  da suspensão de esporos foram adicionados à placa contendo apenas o meio de cultura. Todas as placas foram incubadas em BOD a 25°C, por um período de 10 dias. Essas análises foram realizadas em triplicata.

### 3.7.1 Extração da ocratoxina A

A extração da ocratoxina A foi realizada no 10º dia do período de incubação dos esporos fúngicos, de acordo com o método de Passamani et al. (2014). Inicialmente três “plugs” da colônia foram removidos da área interna do meio e da borda de cada colônia. Na remoção dos “plugs”, foram feitos cortes circulares de aproximadamente 10 mm de diâmetro. Esses “plugs” foram pesados em balança analítica e depositados em tubos de ensaio envolvidos por papel-alumínio, para evitar a degradação da ocratoxina A. Adicionou-se 1 mL de metanol em cada tubo de ensaio, agitando-se vigorosamente por 5 segundos. Em seguida, esses tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 60 minutos. Os extratos foram filtrados por unidades filtrantes de PTFE (politetrafluoretileno) (0,22  $\mu\text{m}$ ) (Millipore) e analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

### 3.7.2 Condições cromatográficas utilizadas na quantificação da ocratoxina A

O equipamento utilizado foi um HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão, modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU 20A3, interface modelo CBM-20A, injetor automático modelo SIL-10AF e detector de fluorescência RF-10 AXL. A coluna

usada foi a Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) conectada a uma pré-coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x 12, 5 mm, 5 µm).

Os comprimentos de onda utilizados foram: excitação de 332 nm e emissão de 476 nm. O fluxo utilizado em toda a análise foi de 0,8 mL min<sup>-1</sup> e o volume injetado nas amostras e do padrão foi de 20 µL. A eluição foi realizada em sistema isocrático de 35:35:29:1 (metanol:acetonitrila: água: ácido acético).

### 3.7.3 Quantificação da Ocratoxina A

A quantificação da ocratoxina A nas amostras foi realizada por meio da padronização externa, a partir da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear ( $y = 9.10^6x - 18171$ , em que  $y$  é a área do pico e  $x$  é a concentração de ocratoxina A). O cálculo definiu a área do pico *versus* a concentração da respectiva solução-padrão obtida pela determinação do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9994.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados por meio dos parâmetros obtidos para a curva analítica construída, sendo calculados, pelas respectivas relações matemáticas:  $LD = 3 \times (s/S)$  e  $LQ = 10 \times (s/S)$  (em que  $s$  = estimativa do desvio padrão da linha de regressão e  $S$  = coeficiente angular da linha de calibração) (HARRIS, 2008). Para esses, foram encontrados os valores de 0,0004 e 0,0016 µg g<sup>-1</sup>, respectivamente. Todas as amostras e as soluções-padrão de ocratoxina A foram analisadas em triplicata.

### 3.8 Atividade *in vivo*

Foram utilizados grãos de *Coffe arábica* L. cv Catuaí Amarelo, safra de 2017/2018, obtidos em campos de produção da Fazenda Pântano, a 850 metros de altitude, localizada no município de Piumhi-MG, das seguintes coordenadas geográficas: 20° 24' de latitude sul e 46° 15' de latitude oeste. Os frutos foram colhidos no estágio de maturação cereja, por meio de colheita seletiva. Posteriormente, realizou-se a desinfestação dos frutos com solução de hipoclorito 1% e lavando-os em água corrente.

Os cafés foram secos em telas de polietileno de 1,00 mm<sup>2</sup> de malha montadas em suporte de madeira e dispostas de forma suspensa, de modo que não ocorresse contato dos grãos com o solo, minimizando possíveis riscos de contaminação. Os frutos foram distribuídos uniformemente sobre as telas e revolvidos, durante o período de secagem, que foi de 30 dias.

A partir do estado de meia-seca, com 18-20% de umidade, inoculou-se a solução de esporos do fungo na concentração de  $10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ , juntamente com a suspensão de leite em pó 10% e óleo essencial na concentração mínima inibitória de cada fungo e também nas duas concentrações superiores.

Os frutos, ao atingirem 12% de umidades, foram submetidos ao beneficiamento mecânico para retirada do pericarpo. O beneficiamento mecânico foi realizado coletando separadamente pericarpos e grãos.

### **3.8.1 Atividade antifúngica dos óleos essenciais em frutos de *Coffea arabica***

O potencial antifúngico dos óleos essenciais foi avaliado pelo plaqueamento das frações de pericarpos e dos grãos de café, por meio do método de Blotter Test (ANGÉLICO, 2012 citado por TEMPE, 1963). Os pericarpos foram plaqueados sem desinfestação; já nos grãos, realizou-se a desinfestação para a observação da microbiota presente em seu interior.

A desinfestação dos grãos foi realizada com álcool 70% por 1 minuto, seguido do hipoclorito de sódio 1% por 30 segundos e lavados por três vezes com água destilada e esterilizada.

Foram utilizadas placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo duas folhas de papel-filtro previamente esterilizados, e umedecidas com 10 mL de água destilada esterilizada. Para cada repetição dos tratamentos *in vivo* (triplicata) foram plaqueadas 50 frações de pericarpos ou grãos divididos em duas placas, sendo colocadas 25 frações de pericarpos ou grãos por placa. Essas foram incubadas em BOD a  $25^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas de luminosidade, alternadas com 12 horas de escuro, durante 10 dias.

Utilizou-se como controle positivo a solução de hipoclorito de sódio 1%, tomando como base o seu uso em laboratórios, uma vez que não há produto comercial disponível no mercado com tal indicação. Paralelamente foi empregada como reação-controle a solução de leite em pó, apenas para demonstrar que ela não exerceu nenhuma atividade quando utilizada juntamente dos óleos essenciais.

Os resultados para o microrganismo *A. carbonarius* (pericarpos e grãos) foram expressos por meio da contagem de esporos  $\text{mL}^{-1}$  em câmara de Newbauer, a partir da adição de 10 mL de água destilada contendo 1% de Tween 80 à placa.

Os resultados para o fungo *A. ochraceus* foram expressos por meio da identificação dos principais gêneros fúngicos provenientes das amostras, com o auxílio de um microscópio estereoscópio Phoenix CP 608, sendo a incidência do fungo *A. ochraceus* determinada pela equação (4) de Mckinney (1925), citada por Angélico, (2012), empregada usualmente no

cálculo do índice de doenças em plantas. Foram estimadas notas (0,1,2,3,4) de acordo com a área ocupada no pericarpo ou fruto pelo fungo e representada pela média ponderada das notas atribuídas a essa ocorrência.

$$IO(\%) = \frac{(f.n_0) + (f.n_1) + (f.n_2) + (f.n_3) + (f.n_4)}{F.N} . 100$$

Equação 4

Em que;

f = número de indivíduos referente a cada nota;

$n_0$  = 0 (nota para ausência de fungo na região);

$n_1$  = 1 (nota para 1% a 25% da região ocupada pelo fungo);

$n_2$  = 2 (nota para 25% a 50% da região ocupada pelo fungo);

$n_3$  = 3 (nota para 50% a 75% da região ocupada pelo fungo);

$n_4$  = 4 (nota para 75% a 100% da região ocupada pelo fungo);

F = 25 (número de total de indivíduos);

N = 4 (nota máxima atribuível).

### 3.8.2 Atividade ocratoxigênica em pericarpos e grãos de *Coffea arabica*

A atividade ocratoxigênica dos óleos essenciais sobre as amostras de pericarpos e grãos foi analisada de acordo com metodologia oficial do Mapa (Ministério da Agricultura e Pecuária), publicado no Diário Oficial da União por meio da Instrução Normativa SDA nº 09, de 24 de março de 2000 (DUO, 2000).

#### Extração da ocratoxina A

Uma amostragem representativa e homogênea dos pericarpos e grãos foi obtida entre os tratamentos, e a partir dela, as amostras foram moídas separadamente, na sua totalidade, para obtenção de granulometria de 20 mesh. Em seguida, 25,00 g do pó foram submetidas à extração da ocratoxina A. As amostras foram agitadas por 10 minutos em 200 mL de solução metanol:bicarbonato de sódio 3% (1:1, v/v), à velocidade de 254 rpm. Posteriormente, o extrato foi filtrado a vácuo.

Alíquotas de 10 mL do filtrado foram diluídos para 100 mL com tampão PBS (solução salina tamponada com fosfato). A amostra diluída passou pela coluna de imunoafinidade (Ochratest™ WB – Vicam, Watertown. USA) a um fluxo de 2 - 3 mL por minuto, utilizando-se uma seringa de 60 mL. Após a passagem da amostra, sem deixar secar, lavou-se a coluna com 10 mL de água ultrapura, a um fluxo de 5 mL por minuto. Posteriormente, secou-se a coluna ao passar ar por ela, pressionando o êmbolo da seringa, permitindo remover o máximo

do vestígio de líquido. Adicionaram-se 4 mL de metanol grau HPLC na coluna de imunoafinidade, deixando o metanol em contato com os anticorpos por 3 minutos. Em seguida, a ocratoxina A presente na amostra foi eluída da coluna de imunoafinidade, mantendo o fluxo de 2- 3 mL minuto<sup>-1</sup>. O eluato foi evaporado em banho-maria e redissolvido com 400 µL fase móvel metanol/ acetonitrila/água/ ácido acético (35:35:29:1, v/v/v/v). Injetou-se uma alíquota de 20 µL no cromatógrafo líquido de alta eficiência, com fase móvel metanol/ acetonitrila/ água/ ácido acético (35 35:29:1, v/v/v/v).

As injeções das amostras foram realizadas em triplicata, sendo a identidade do analito confirmada pelo tempo de retenção, e o perfil dos picos da amostra comparado ao do padrão.

### **Quantificação da Ocratoxina A**

A quantificação da ocratoxina A nas amostras foi realizada por meio de padronização externa, a partir da injeção dos padrões de ocratoxina A preparados para a curva de calibração no HPLC, a fim de se obter a curva analítica, uma regressão linear ( $y = 3799,6x - 3149$ ), em que  $y$  é a área do pico e  $x$  é a concentração de ocratoxina A, e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,999.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados por meio dos parâmetros obtidos para a curva analítica construída, sendo calculados pelas respectivas relações matemáticas:  $LD = 3 \times (s/S)$  e  $LQ = 10 \times (s/S)$  (em que  $s$  = estimativa do desvio-padrão da linha de regressão e  $S$  = coeficiente angular da linha de calibração) (HARRIS, 2008). Para esses, foram encontrados os valores de 0,24 e 0,8 µg Kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Todas as amostras e as soluções-padrão de ocratoxina A foram analisadas em triplicata.

O equipamento utilizado foi um HPLC Shimadzu, empregando-se as mesmas condições descritas no item 3.7.2

### **3.9 Análises estatística**

Para comparar as concentrações em cada tipo de óleo, foi utilizada a Anova (Montgomery et al., 2012), ao passo que, nas comparações múltiplas, foi utilizado o teste de Tukey (Tukey, 1949). O software utilizado nas análises foi o R (versão 3.5.1).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Determinação da umidade e do rendimento dos óleos essenciais

Os resultados obtidos para o teor de umidade e o rendimento das extrações dos óleos essenciais das folhas das espécies *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Teor de umidade e rendimento dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth.

Planta	Umidade (%)	Rendimento do óleo essencial (% p/p BLU)
<i>B. citriodora</i>	50	2,83
<i>L. origanoides</i> Kunth.	60	1,21

Legenda: BLU – Base Livre de Umidade

Pelos dados descritos na Tabela 1, observa-se que os rendimentos dos óleos essenciais extraídos das folhas das espécies *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. foram, respectivamente, 2,83% e 1,21%.

De acordo com Sultanbawa, (2016), o teor de óleo nas folhas de *B. citriodora* varia de 1,1 - 3,2%, valores esses compreendidos ao obtido neste estudo.

Sarrazin et al. (2015b), avaliando o rendimento do óleo essencial de *L. origanoides* Kunth. coletada em diferentes sazonalidades, observaram média de 1,6% (p/p) no período seco e 1,7 % (p/p) no período chuvoso, valores superiores ao encontrado neste estudo. Oliveira et al. (2007), estudando o óleo essencial dessa espécie coletada no estado do Pará, obtiveram um rendimento de 1% (em BLU). Essas diferenças encontradas podem estar relacionadas a diferentes fatores edafoclimáticos e genéticos. Para Gobbo-Neto e Lopes (2007), os óleos essenciais por serem compostos voláteis e atuarem em defesa da espécie vegetal, apresentam variações na taxa de produção dos seus componentes, decorrentes de fatores abióticos, como a sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, altitude, idade da planta e ataque de patógenos, resultando em diferentes compostos e interferindo no seu rendimento.

### 4.2 Caracterização química e quantificação dos óleos essenciais

Os constituintes químicos presentes no óleo essencial extraídos das folhas de *B. citriodora* encontram-se na Tabela 2. O cromatograma correspondente encontra-se em anexo

(Figura 1A, APÊNDICE A) e as estruturas química dos compostos estão apresentadas na Figura 8.

A mistura dos isômeros neral (42,44%) e geranial (57,55%) representam o citral como o composto majoritário.

Tabela 2 – Composição química do óleo essencial de *B. citriodora*

Pico	Compostos	TR (min)	IR <sub>tab</sub>	IR <sub>cal</sub>	N. Área (%)
1	Neral	17,192	1235	1240	42,44
2	Geranial	18,492	1264	1270	57,55
<b>Total identificado</b>					99,99%
Compostos agrupados					
<b>Monoterpenos oxigenados</b>					99,99%

Legenda: TR – tempo de retenção; IR<sub>tab</sub> – índice de retenção da literatura; IR<sub>cal</sub> – índice de retenção calculado; N. Área – Normalização da área.

Os resultados corroboram com aqueles encontrados por Santiago et al. (2018), que, analisando o óleo essencial da *B. citriodora* coletada no mesmo local desse estudo, encontraram como constituinte majoritário o citral, na proporção 39,82% de neral e 51,37% de geranial.

Southwell et al. (2004), estudando a composição química do óleo das folhas de murta-limão obtidas de plantações comerciais na Austrália, encontraram os monoterpenos oxigenados neral e geranial (citral) como os componentes majoritários; os compostos mirceno, 6-metil-5-hepten-2-ona, linalol, citronelal também foram identificados, porém, em proporções baixas. Os resultados encontrados por Southwell et al. (2004) corroboram parcialmente com os encontrados neste estudo.

O óleo essencial da espécie *L. origanoides* Kunth., conhecida por alecrim-d'Angola, é constituído principalmente por monoterpenos oxigenados, sendo identificados 12 constituintes. A caracterização química do óleo essencial está apresentada na Tabela 3. O cromatograma correspondente encontra-se em anexo (Figura 2A, APÊNDICE A) e as estruturas química dos compostos estão apresentadas na Figura 12.

Os compostos majoritários do óleo essencial de *L. origanoides* Kunth. foram carvacrol (65,53%), *p*-cimeno (12,13%) e timol (7,04%). Os resultados corroboram parcialmente com aqueles encontrados por Sarrazin et al. (2015a), que, analisando a composição do óleo essencial de *L. origanoides* Kunth coletado no Pará, encontraram os componentes majoritários carvacrol (47,2%), timol (12,8%) e *p*-cimeno (9,7%) e *p*-metoxitimol (7,4%).

Tabela 3 – Composição química do óleo essencial de *L. origanoides* Kunth.

Pico	Compostos	TR (min)	IR <sub>tab</sub>	IR <sub>cal</sub>	N. Área (%)
1	$\alpha$ -Tujeno	5,582	924	926	0,6346
2	$\alpha$ -Pinoeno	5,795	932	934	0,1753
3	Mirceno	7,367	988	991	1,3542
4	$\alpha$ -Felandreno	7,940	1002	1009	0,3046
5	$\alpha$ -Terpineno	8,292	1014	1018	0,8335
6	<b><i>p</i>-Cimeno</b>	8,543	1020	1025	<b>12,1347</b>
7	$\gamma$ -Terpinene	9,750	1054	1058	5,5796
8	Terpine-4-ol	14,786	1174	1184	0,4647
9	<b>Timol</b>	19,770	1289	1299	<b>7,0471</b>
10	<b>Carvacrol</b>	20,077	1298	1307	<b>65,5307</b>
11	Trans- $\beta$ -Cariofileno	24,808	1417	1418	4,0466
12	Óxido de Cariofileno	31,359	1582	1582	1,5621
<b>Total identificado</b>					99,6677
Compostos agrupados					
<b>Hidrocarbonetos monoterpênicos</b>					21,0165
<b>Monoterpenos oxigenados</b>					73,0425
<b>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</b>					4,0466
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>					1,5621

Legenda: TR – tempo de retenção; IR<sub>tab</sub> – índice de retenção da literatura; IR<sub>cal</sub> – índice de retenção calculado; N. Área – Normalização da área.

Teixeira *et al.*, (2014), analisando o óleo essencial da mesma planta em estudo, obtiveram os compostos majoritários: carvacrol (41,5%), *p*-cimeno (18,36%) e  $\gamma$ -terpineno (17,03%) e timol (4,86%), dados esses que divergem parcialmente daqueles encontrados neste trabalho.

A variação da composição dos óleos essenciais pode ser relacionada por fatores intrínsecos e extrínsecos, como estação do ano, localidade, fator hídrico que as plantas se encontram, causando modificações qualitativamente e quantitativamente dos metabólitos secundários (DHOUIOUI *et al.*, 2016).

### 4.3 Atividade antifúngica *in vitro*

Os valores da porcentagem da inibição micelial dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth., em relação às suas concentrações sobre o fungo *A. carbonarius*, estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Porcentagem de inibição micelial dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. em *A. carbonarius*.

Óleo Essencial	Concentração $\mu\text{L L}^{-1}$	Porcentagem de inibição micelial	Valor-p <sup>2</sup>						
			0	50	100	250	500	1000	2000
<i>B. citriodora</i>	0	0.00	0	50	100	250	500	1000	2000
	50	1.20	0.482	-	-	-	-	-	-
	100	2.80	<b>0.004</b>	0.184	-	-	-	-	-
	250	3.20	<b>0.001</b>	0.996	0.057	-	-	-	-
	500	100.00	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	-	-	-
	1000	100.00	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	-	-
	2000	100.00	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	1.000	-
	3000	100.00	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	1.000	1.000
<i>L. origanoides</i> Kunth.	0	0.00	-	-	-	-	-	-	-
	50	19.20	<b>0.000</b>	-	-	-	-	-	-
	100	77.60	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	-	-	-	-	-
	250	100.00	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	-	-	-	-
	500	100.00	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	-	-	-
	1000	100.00	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	1.000	-	-
	2000	100.00	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	1.000	1.000	-
	3000	100.00	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	1.000	1.000	1.000

Legenda: Valores de  $p^2 < 0,05$  diferem pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Observa-se que os óleos essenciais apresentaram uma notável atividade antifúngica sobre o microrganismo *A. carbonarius* de maneira dose-dependente; o óleo essencial de *L. origanoides* Kunth. proporcionou a inibição micelial do patógeno com concentração menor ( $250 \mu\text{L L}^{-1}$ ), quando comparado com o óleo essencial de *B. citriodora* ( $500 \mu\text{L L}^{-1}$ ).

O tratamento contendo somente o fungo apresentou diferenças significativa em relação a todas as concentrações do óleo essencial de *B. citriodora*, com exceção da concentração de  $50 \mu\text{L L}^{-1}$  ( $p > 0,05$ ). Estatisticamente, a concentração de  $50 \mu\text{L L}^{-1}$  é igual à concentração de  $100 \mu\text{L L}^{-1}$  e  $250 \mu\text{L L}^{-1}$ , sendo diferente a partir da concentração de  $500 \mu\text{L L}^{-1}$ . Analisando a concentração de  $250 \mu\text{L L}^{-1}$ , essa possui diferença significativa das demais ( $500$ ,  $1000$ ,  $2000$  e  $3000 \mu\text{L L}^{-1}$ ). Em relação à concentração de  $500 \mu\text{L L}^{-1}$ , que inibiu 100% do microrganismo e as concentrações acima, não houve diferença significativas. Em comparação, o óleo essencial de *L. origanoides* Kunth apresentou diferença significativa, exceto a partir da concentração de  $250 \mu\text{L L}^{-1}$ .

De acordo com o percentual de inibição micelial dos óleos de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. em relação as concentrações avaliadas sobre o fungo *A. ochraceus*, pôde-se observar pelos dados descritos na Tabela 5 que os óleos essenciais apresentaram uma

relação dose-dependente. Analisando os óleos essenciais, observa-se que o óleo essencial de *B. citriodora* inibiu o crescimento micelial em concentração menor ( $250 \mu\text{L L}^{-1}$ ) que o óleo essencial de *L. origanoides* Kunth. ( $500 \mu\text{L L}^{-1}$ ).

Tabela 5 - Porcentagem de inibição micelial dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. em *A. ochraceus*.

Óleo Essencial	Concentração $\mu\text{L L}^{-1}$	Porcentagem de inibição micelial	Valor-p <sup>2</sup>						
			0	50	100	250	500	1000	2000
<i>B. citriodora</i>	0	0.00	0	50	100	250	500	1000	2000
	50	2.19	0.140	-	-	-	-	-	-
	100	10.22	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	-	-	-	-	-
	250	100.00	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	-	-	-	-
	500	100.00	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	-	-	-
	1000	100.00	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	1.000	-	-
	2000	100.00	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	1.000	1.000	-
	3000	100.00	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>L. origanoides</i> Kunth.	0	0.00	-	-	-	-	-	-	-
	50	35.04	<b>0.000</b>	-	-	-	-	-	-
	100	67.88	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	-	-	-	-	-
	250	90.51	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	-	-	-	-
	500	100.00	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.211	-	-	-
	1000	100.00	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.126	1.000	-	-
	2000	100.00	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.126	1.000	1.000	-
	3000	100.00	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.126	1.000	1.000	1.000

Legenda: Valores de  $p^2 < 0,05$  diferem pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O óleo essencial de *B. citriodora* não apresentou diferença significativa, exceto a concentração de  $100 \mu\text{L L}^{-1}$ . O óleo essencial de *L. origanoides* Kunth. mostrou diferença significativa na testemunha água com às concentrações de 100 e  $250 \mu\text{L L}^{-1}$ ; estatisticamente, a concentração de  $250 \mu\text{L L}^{-1}$  foi igual as concentrações de 500, 1000, 2000 e  $3000 \mu\text{L L}^{-1}$ .

Analisando os óleos essenciais, observa-se que o óleo essencial de *B. citriodora* inibiu o crescimento micelial em concentração menor ( $250 \mu\text{L L}^{-1}$ ) que o óleo essencial de *L. origanoides* Kunth. ( $500 \mu\text{L L}^{-1}$ ).

Santiago et al. (2018), estudando a influência do óleo essencial de *B. citriodora* sobre o fungo *A. carbonarius*, determinaram, em testes preliminares, a concentração mínima inibitória do microrganismo em  $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Anteriormente, Brandão (2017), avaliando a atividade antifúngica do óleo essencial de *L. origanoides* Kunth., verificaram que o óleo inibiu 100% do crescimento micelial nas concentrações de  $15,62 \mu\text{L mL}^{-1}$  e

31,25  $\mu\text{L mL}^{-1}$  sobre os fungos *A. carbonarius* e *A. ochraceus*, respectivamente. Esses resultados diferem dos encontrados no presente trabalho.

Estudos de Oliveira et al. (2019b) indicam que as atividades biológicas apresentadas pelos óleos essenciais são decorrentes do efeito sinérgico entre os compostos majoritários e os outros existentes em menores porcentagens. Dammak et al. (2019) avaliaram os óleos essenciais de *Lavandula dentata* e *Laurus nobilis* e do majoritário, 1,8-cineol, sobre o fungo *A. carbonarius*. Os autores observaram que a concentração mínima inibitória do padrão de aproximadamente (0,5%) foi maior que a dos óleos essenciais (0,3%), evidenciando o efeito do sinergismo que ocorre nos constituintes dos óleos essenciais sobre a atividade antifúngica.

Os óleos essenciais atuam sobre microrganismos por diversos mecanismos de ação, que cada vez mais, vêm sendo estudados e elucidados. Uma das formas reportadas na literatura diz respeito à sua capacidade em alterar a permeabilidade e integridade das membranas celulares de fungos e bactérias, afetando seu crescimento e forma (ADELAKUN; OYELADE; OLANIPEKUN, 2016; GUO et al., 2017). Pawar e Thaker (2006), pesquisando o mecanismo de ação dos óleos essenciais com potencial fungicida, consideraram que ele compreende da associação de características lipofílicas e baixo peso molecular dos óleos, que atingem mais rapidamente a membrana celular. Para An et al. (2019), monoterpenos oxigenados, por serem moléculas de baixo peso e alta lipofilicidade, podem interagir com as membranas, bloqueando sínteses em paredes celulares, citomembranas, citoplasma e organelas, ocasionando modificações no crescimento e morfologia dos micélios e esporos, influenciando as vias metabólicas e energéticas, interferindo, assim, no desenvolvimento dos fungos.

#### **4.4 Atividade antiocratoxigênica *in vitro***

Os efeitos dos óleos essenciais na síntese de ocratoxina A pelos fungos *A. carbonarius* e *A. ochraceus* estão apresentados nas Tabela 6 e 7, respectivamente.

Em relação à produção da ocratoxina A, observa-se que, nas concentrações avaliadas, os óleos essenciais interferiram na síntese da toxina nos microrganismos *A. carbonarius* e *A. ochraceus*. Em ambos os fungos, o controle positivo (solução de hipoclorito de sódio 1%) e as concentrações dos óleos essenciais utilizadas na pesquisa não apresentaram diferenças significativas,  $p > 0,05$ .

Tabela 6 – Efeitos dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. sobre a síntese de ocratoxina A em *A. carbonarius*.

Tratamentos	Concentração	Porcentagem de inibição	Valor-p <sup>2</sup>				
			H <sub>2</sub> O	LPO	HP	500	1000
H <sub>2</sub> O	-	0.00	H <sub>2</sub> O	LPO	HP	500	1000
Solução de leite em pó (LPO)	10%	1.60	<b>0.000</b>	-	-	-	-
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	99.93	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	-	-	-
Óleo essencial <i>B. citriodora</i>	500 µL L <sup>-1</sup>	99.93	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	-	-
	1000 µL L <sup>-1</sup>	99.94	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	1.000	-
	2000 µL L <sup>-1</sup>	99.95	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.999	1.000	1.000
H <sub>2</sub> O	-	0.00	H <sub>2</sub> O	LPO	HP	250	500
Solução de leite em pó (LPO)	10%	1.60	<b>0.000</b>	-	-	-	-
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	99.93	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	-	-	-
Óleo essencial <i>L. origanoides</i> Kunth.	250 µL L <sup>-1</sup>	99.94	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	-	-
	500 µL L <sup>-1</sup>	99.93	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	1.000	-
	1000 µL L <sup>-1</sup>	99.94	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	1.000	1.000

Legenda: Valores de  $p^2 < 0,05$  diferem pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 7- Efeitos dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. sobre a síntese de ocratoxina A em *A. ochraceus*.

Tratamentos	Concentração	Porcentagem de inibição	Valor-p <sup>2</sup>				
			H <sub>2</sub> O	LPO	HP	250	500
H <sub>2</sub> O	-	0.00	H <sub>2</sub> O	LPO	HP	250	500
Solução de leite em pó (LPO)	10%	0.99	<b>0.000</b>	-	-	-	-
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	99.76	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	-	-	-
Óleo essencial <i>B. citriodora</i>	250 µL L <sup>-1</sup>	99.72	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	-	-
	500 µL L <sup>-1</sup>	99.70	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.999	1.000	-
	1000 µL L <sup>-1</sup>	99.80	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	0.993	0.986
H <sub>2</sub> O	-	0.00	H <sub>2</sub> O	LPO	HP	500	1000
Solução de leite em pó (LPO)	10%	0.99	<b>0.000</b>	-	-	-	-
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	99.76	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	-	-	-
Óleo essencial <i>L. origanoides</i> Kunth.	500 µL L <sup>-1</sup>	99.71	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.999	-	-
	1000 µL L <sup>-1</sup>	99.73	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	1.000	-
	2000 µL L <sup>-1</sup>	99.72	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	1.000	1.000	1.000

Legenda: Valores de  $p^2 < 0,05$  diferem pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Passone, Girardi e Etcheverry (2012) estudaram o efeito de cinco óleos essenciais sobre o crescimento dos fungos *A. niger* e *A. carbonarius* e o acúmulo de ocratoxina A. Observaram que os óleos essenciais de *Lippia turbinata*, espécie pertencente ao mesmo gênero das plantas estudadas deste trabalho, impediu totalmente a síntese de ocratoxina A no *A. carbonarius*, na concentração de 3000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Os autores propõem que o óleo essencial pode ter influenciado a via biosintética da ocratoxina A.

Wang et al. (2018a) demonstraram um consenso da via biosintética da ocratoxina A produzida por alguns fungos. A biossíntese da ocratoxina A inicia-se com quatro moléculas de malonil-CoA que são ligadas a uma molécula de acetil-CoA na presença da enzima policetídeo sintase (PKS), junto ao gene *OtaA*, para formar a 7-metil melleína. Essa é oxidada a ocratoxina  $\beta$  pela monoxigenase do citocromo P450 associado ao gene *OtaC*. A molécula de ocratoxina  $\beta$  e L- $\beta$ -fenilalanina unem-se por meio da ligação amida pela enzima peptídeo sintase não ribossômica (NRPS) com o gene *OtaB*, fornecendo a ocratoxina B. Por último, na presença da enzima halogenase e do gene *OtaD*, a ocratoxina B é clorada, levando à produção da ocratoxina A (FIGURA 16). Além dos genes citados anteriormente, os genes *VelB*, *VeA* e *LaeA* codificadores das proteínas reguladoras de veludo são fatores transcricionais, podendo regular o desenvolvimento fúngico e a produção de metabólitos secundários, como a ocratoxina A (GALLO et al., 2012; WANG et al., 2018a; WANG et al., 2018b).

Figura 14 – Consenso da via biosintética da ocratoxina. (Continuação).

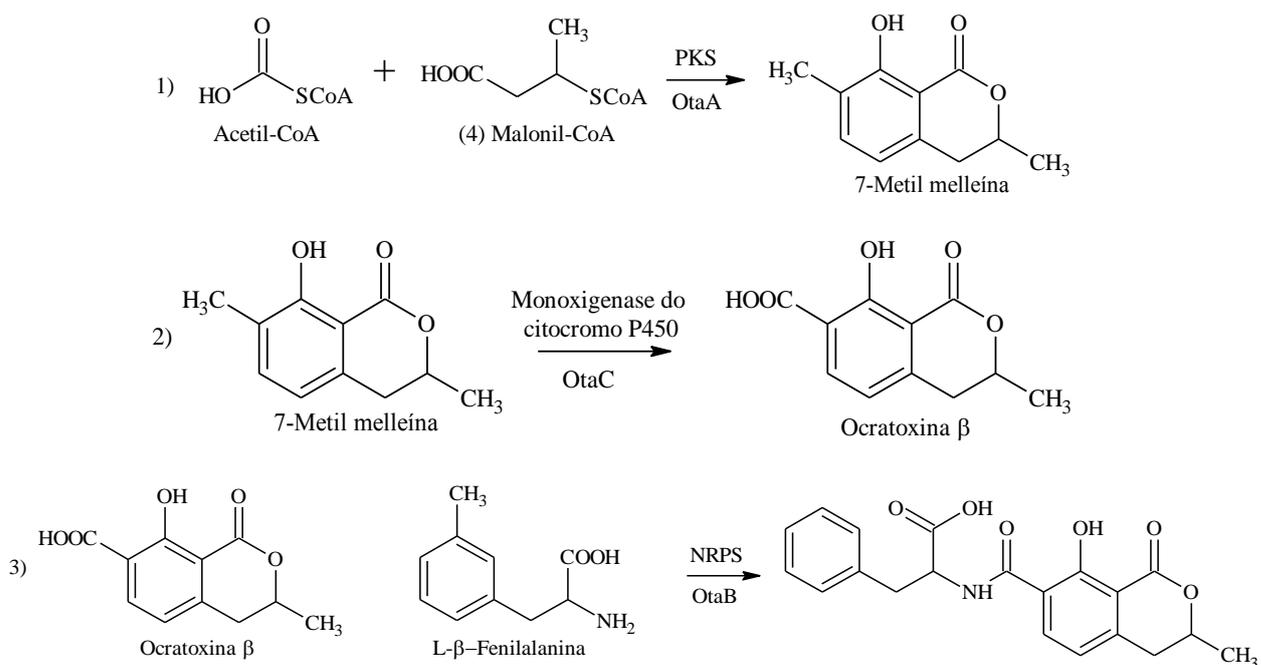
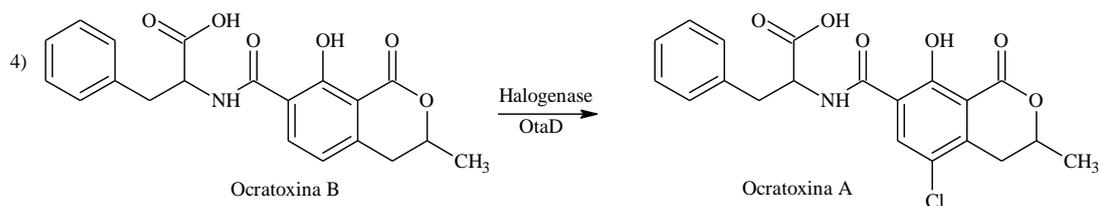


Figura 14 – Consenso da via biosintética da ocratoxina. (Conclusão).



Legenda: (PKS) Polipeptídeo sintase; (OtaA) gene OtaA; (OtaC) gene OtaC; (NRPS) Sintase não ribossomal; (OtaB) gene (OtaB); (OtaD) gene OtaD.

Fonte: Adaptado de Gallo et al. (2012); Wang et al. (2018a)

Wang et al. (2018b) afirmam que a redução da produção de ocratoxina A pelo composto majoritário do óleo essencial de canela, o cinamaldeído, é consequência da desregulação na expressão de genes (PKS, NRPS, VeA, LaeA e VelB) envolvidos na biossíntese da ocratoxina A. Os autores, estudando o efeito antifúngico e antitoxigênico do cinamaldeído aos níveis morfológicos e estrutural, junto com a inibição da ocratoxina A ao nível transcricional, ressaltam que o cinamaldeído pode ser agente natural seguro e eficaz contra a contaminação de ocratoxina A e sugerem que vários compostos naturais inibem a produção de toxinas, influenciando negativamente os genes da biossíntese.

O efeito inibitório do citral, presente no óleo essencial de *Litsea citrate* sobre o crescimento do microrganismo *A. ochraceus* e na produção da ocratoxina A, foi relatado por HUA et al. (2014). Os autores descrevem que o citral é capaz de suprimir a transcrição dos genes pks da biossíntese da ocratoxina A. Anteriormente, Tian et al. (2012) sugeriram que compostos ricos em terpenos e terpenoides atravessam facilmente as membranas celulares para induzir respostas biológicas. O mesmo princípio pode ajudar a compreender o efeito de monoterpenos aromáticos, como o carvacrol majoritário do óleo essencial de *L. origanoides*, sobre fungos toxigênicos. A hidroxila fenólica da molécula possibilitam a formação de ligações de hidrogênio com enzimas modificando suas atividades e, como consequência, o comportamento do microrganismo e a produção de metabólitos secundários (GONÇALVES; ROMANO, 2017).

#### 4.5 Atividade antifúngica em frutos de *Coffea arabica*

Os valores referentes ao plaqueamento dos pericarpos de café com as avaliações das concentrações dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. sobre os microrganismos *A. carbonarius* e *A. ochraceus* estão apresentados nas Tabela 8 e 9

respectivamente. De maneira geral, os óleos essenciais proporcionaram redução dos patógenos nos pericarpos.

Tabela 8 - Efeitos dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. na esporulação crescimento do *A. carbonarius* nos pericarpos

Tratamento	Concentração	Concentração de esporos (mL <sup>-1</sup> )		Valor-p <sup>2</sup>			
H <sub>2</sub> O	-	1,4 . 10 <sup>7</sup>	H <sub>2</sub> O	LPO	HP	500	1000
Solução de leite em pó (LPO)	10%	1,1. 10 <sup>7</sup>	0.883	-	-	-	-
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	0,6. 10 <sup>7</sup>	<b>0.035</b>	0.309	-	-	-
Óleo essencial <i>B. citriodora</i>	500 µL L <sup>-1</sup>	0,8. 10 <sup>7</sup>	0.150	0.707	0.983	-	-
	1000 µL L <sup>-1</sup>	0,7. 10 <sup>7</sup>	0.055	0.415	1.000	0.997	-
	2000 µL L <sup>-1</sup>	0,4. 10 <sup>7</sup>	<b>0.002</b>	<b>0.033</b>	0.874	0.488	0.778
H <sub>2</sub> O	-	1,4. 10 <sup>7</sup>	H <sub>2</sub> O	LPO	HP	250	500
Solução de leite em pó (LPO)	10%	1,1. 10 <sup>7</sup>	0.700	-	-	-	-
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	0,6. 10 <sup>7</sup>	<b>0.002</b>	0.083	-	-	-
Óleo essencial <i>L. origanoides</i> Kunth.	250 µL L <sup>-1</sup>	0,6. 10 <sup>7</sup>	<b>0.003</b>	0.091	1.000	-	-
	500 µL L <sup>-1</sup>	0,5. 10 <sup>7</sup>	<b>0.000</b>	<b>0.012</b>	0.958	0.949	-
	1000 µL L <sup>-1</sup>	0,4. 10 <sup>7</sup>	<b>0.000</b>	<b>0.002</b>	0.700	0.675	0.990

Legenda: Valores de p<sup>2</sup><0,05 diferem pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O óleo essencial de *B. citriodora* apresentou diferença significativa na concentração de 2000 µL L<sup>-1</sup>, em relação ao tratamento contendo água e a solução de leite em pó. Já o óleo essencial *L. origanoides* Kunth. apresentou diferença significativa em todas as concentrações testadas, em relação à testemunha água.

Tabela 9 - Efeitos dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. no crescimento do *A. ochraceus*. nos pericarpos. (Continuação).

Tratamento	Concentração	Porcentagem do índice de ocorrência		Valor-p <sup>2</sup>			
H <sub>2</sub> O	-	19.17	H <sub>2</sub> O	LPO	HP	250	500
Solução de leite em pó (LPO)	10%	15.17	0.887	-	-	-	-
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	4.50	<b>0.005</b>	0.073	-	-	-
Óleo essencial <i>B. citriodora</i>	250 µL L <sup>-1</sup>	12.33	0.458	0.972	0.310	-	-
	500 µL L <sup>-1</sup>	8.50	0.073	0.484	0.887	0.903	-
	1000 µL L <sup>-1</sup>	5.83	<b>0.013</b>	0.153	0.999	0.512	0.978

Tabela 9 - Efeitos dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. no crescimento do *A. ochraceus*. nos pericarpos. (Conclusão).

Tratamento	Concentração	Porcentagem do índice de ocorrência	Valor-p <sup>2</sup>				
			H <sub>2</sub> O	LPO	HP	500	1000
H <sub>2</sub> O	-	19.17	H <sub>2</sub> O	LPO	HP	500	1000
Solução de leite em pó (LPO)	10%	15.17	0.870	-	-	-	-
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	4.50	<b>0.004</b>	0.057	-	-	-
Óleo essencial <i>L. origanoides</i> Kunth.	500 µL L <sup>-1</sup>	14.67	0.805	1.000	0.078	-	-
	1000 µL L <sup>-1</sup>	12.33	0.416	0.967	0.273	0.986	-
	2000 µL L <sup>-1</sup>	9.33	0.095	0.586	0.755	0.673	0.958

Legenda: Valores de  $p^2 < 0,05$  diferem pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação ao fungo *A. ochraceus*, o óleo essencial de *B. citriodora*, na maior concentração testada (1000 µL L<sup>-1</sup>), e a solução de hipoclorito de sódio apresentaram diferenças significativas, quando comparados com a testemunha.

Durante o plaqueamento dos grãos, não foi observada a presença dos fungos inoculados nos frutos, visto que o período de descanso não foi proporcionado, etapa que favorece a penetração de microrganismos presentes no pericarpo no grão verde. Assim, observa-se que o período de descanso pode contribuir para a contaminação dos grãos, pelos fungos presentes nos frutos.

Os óleos essenciais nos frutos de café apresentaram atividade antifúngica inferior, quando comparada com as atividades *in vitro*, provavelmente devido à volatilidade dos óleos essenciais, visto que os frutos de café ficaram expostos à radiação solar e variação de temperatura durante secagem. Apesar da atividade inferior dos óleos essenciais, eles ainda promoveram a redução do número de esporos para o *A. carbonarius* e o índice de ocorrência para o *A. ochraceus*.

Não há relatos na literatura de trabalhos por meio dos quais se avalia o potencial biológico dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth., sobre os microrganismos *A. carbonarius* e *A. ochraceus* em frutos de café. Sonker, Pandey e Singh (2015) avaliaram o efeito antifúngico de vinte óleos essenciais na concentração de 0,33 µL L<sup>-1</sup> sobre fungos deteriorantes de uvas, como *A. ochraceus*. Os autores selecionaram o óleo essencial mais eficaz no controle do microrganismo, juntamente com a avaliação organoléptica e, posteriormente, aplicaram em uvas. Os autores observaram que o óleo essencial de *Artemisia nilagirica* aumentou a vida útil das uvas por até 9 dias, não havendo efeito fitotóxico nem modificações das propriedades sensoriais dos frutos. Recentemente,

Oliveira et al. (2019b), estudando o óleo essencial de *L. sidoides*, associado ao revestimento de carboximetilcelulose sobre *Colletotrichum acutatum* em morangos, verificaram que associação do revestimento com o óleo essencial reduziu severamente a doença nos morangos, revelando ser uma alternativa para o controle desse patógeno.

#### 4.6 Ocratoxina A em pericarpos e grãos de *Coffea arabica*

Os valores da produção da ocratoxina A pelo fungo *A. carbonarius* nos pericarpos e grãos de café tratados com os óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. estão apresentados na Tabela 9 e 10.

Os cromatogramas referentes ao padrão de ocratoxina A, controles de ocratoxina A dos fungos *A. carbonarius* e *A. ochraceus* pericarpos e grão estão em anexo (APÊNDICE E).

Pode-se verificar que os óleos essenciais apresentaram baixo efeito antitoxigênico nos pericarpos de café; o óleo essencial de *B. citriodora* apresentou diferenças significativas das concentrações estudadas em comparação com o tratamento água; entretanto, o óleo essencial de *L. origanoides* Kunth. teve maior eficiência na concentração de 2000  $\mu\text{L L}^{-1}$ .

Tabela 10 - Efeitos dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. sobre a síntese de ocratoxina A pelo *A. carbonarius* nos pericarpos de café. (Continuação).

Tratamentos	Concentração	Produção de		Valor-p <sup>2</sup>				
		Ocratoxina A ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )		H <sub>2</sub> O	LPO	HP	500	1000
H <sub>2</sub> O	-	1.64		H <sub>2</sub> O	LPO	HP	500	1000
Solução de leite em pó (LPO)	10%	1.60	0.876	-	-	-	-	-
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	1.42	<b>0.001</b>	<b>0.007</b>	-	-	-	-
Óleo essencial <i>B. citriodora</i>	500 $\mu\text{L L}^{-1}$	1.48	<b>0.014</b>	0.088	0.667	-	-	-
	1000 $\mu\text{L L}^{-1}$	1.42	<b>0.001</b>	<b>0.007</b>	1.000	0.653	-	-
	2000 $\mu\text{L L}^{-1}$	1.42	<b>0.001</b>	<b>0.006</b>	1.000	0.638	1.000	-
H <sub>2</sub> O	-	1.64		H <sub>2</sub> O	LPO	HP	250	500
Solução de leite em pó (LPO)	10%	1.60	0.907	-	-	-	-	-
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	1.42	<b>0.002</b>	0.013	-	-	-	-
Óleo essencial <i>L. origanoides</i> Kunth.	250 $\mu\text{L L}^{-1}$	1.65	1.000	0.834	0.002	-	-	-
	500 $\mu\text{L L}^{-1}$	1.61	0.982	0.999	0.007	0.951	-	-
	1000 $\mu\text{L L}^{-1}$	1.47	<b>0.015</b>	0.079	0.876	0.011	0.045	-

Legenda: Valores de  $p^2 < 0,05$  diferem pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados descritos na Tabela 11 evidenciam que os tratamentos com os óleos essenciais apresentaram redução na síntese de ocratoxina A nos grãos de café, em comparação com a testemunha absoluta.

Tabela 11 - Efeitos dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. sobre a síntese de ocratoxina A pelo *A. carbonarius* nos grãos de café.

Tratamentos	Concentração	Produção de		Valor-p <sup>2</sup>			
		Ocratoxina A	( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	H <sub>2</sub> O	LPO	HP	500
H <sub>2</sub> O	-	0.91	H <sub>2</sub> O	LPO	HP	500	1000
Solução de leite em pó (LPO)	10%	0.90	0.989	-	-	-	-
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	0.70	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	-	-	-
Óleo essencial <i>B.citriodora</i>	500 $\mu\text{L L}^{-1}$	0.86	<b>0.025</b>	0.068	<b>0.000</b>	-	-
	1000 $\mu\text{L L}^{-1}$	0.76	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.004</b>	<b>0.000</b>	-
	2000 $\mu\text{L L}^{-1}$	0.74	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.075	<b>0.000</b>	0.510
H <sub>2</sub> O	-	0.91	H <sub>2</sub> O	LPO	HP	250	500
Solução de leite em pó (LPO)	10%	0.90	0.996	-	-	-	-
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	0.70	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	-	-	-
Óleo essencial <i>L. origanoides</i> Kunth.	250 $\mu\text{L L}^{-1}$	0.81	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>	-	-
	500 $\mu\text{L L}^{-1}$	0.76	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.035	0.071	-
	1000 $\mu\text{L L}^{-1}$	0.74	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.187	0.013	0.898

Legenda: Valores de  $p^2 < 0,05$  diferem pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Se considerar que a via de contaminação dos grãos é pela casca, independentemente da eficácia dos tratamentos, observa-se que o elevado potencial da ocratoxina A nos pericarpos encontram-se também nos grãos, potencializando o risco à saúde pela mistura da casca, prática usual entre as torrefadoras.

Os efeitos dos óleos essenciais sobre a inibição da síntese de ocratoxina A por *A. ochraceus* estão apresentados na Tabela 12.

Observa-se que a concentração de ocratoxina A produzida pelo fungo *A. ochraceus* nos pericarpos de café é inversamente proporcional à concentração dos óleos essenciais. Comparando as concentrações dos óleos essenciais com a solução de hipoclorito de sódio, observa-se que eles são estatisticamente diferentes, ou seja, os óleos nas concentrações estudadas ocasionaram baixa interferência na produção da toxina nos pericarpos.

Tabela 12 – Efeitos dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. sobre a síntese de ocratoxina A pelo *A. ochraceus* nos pericarpos de café.

Tratamentos	Concentração	Produção de		Valor-p <sup>2</sup>			
		Ocratoxina A ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )		H <sub>2</sub> O	LPO	HP	250
H <sub>2</sub> O	-	1.16	H <sub>2</sub> O	LPO	HP	250	500
Solução de leite em pó (LPO)	10%	1.17	1.000	-	-	-	-
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	0.79	0.000	0.000	-	-	-
Óleo essencial <i>B. citriodora</i>	250 $\mu\text{L L}^{-1}$	1.12	0.962	0.950	<b>0.000</b>	-	-
	500 $\mu\text{L L}^{-1}$	1.12	0.935	0.919	<b>0.000</b>	1.000	-
	1000 $\mu\text{L L}^{-1}$	1.04	0.197	0.182	<b>0.003</b>	0.554	0.620
H <sub>2</sub> O	-	1.16	H <sub>2</sub> O	LPO	HP	500	1000
Solução de leite em pó (LPO)	10%	1.17	1.000				
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	0.79	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>			
Óleo essencial <i>L. origanoides</i> Kunth.	500 $\mu\text{L L}^{-1}$	1.11	0.160	0.131	<b>0.000</b>		
	1000 $\mu\text{L L}^{-1}$	1.06	0.005	0.004	<b>0.000</b>	0.344	
	2000 $\mu\text{L L}^{-1}$	0.99	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.002</b>	0.059

Legenda: Valores de  $p^2 < 0,05$  diferem pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Pode-se observar que o fungo *A. carbonarius* sem tratamento produziu, em média,  $1,64 \mu\text{g Kg}^{-1}$  e  $0,91 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de ocratoxina A no pericarpo e no grão respectivamente, e o patógeno *A. ochraceus*, sem a presença dos óleos essenciais, apresentou, em média, valores de ocratoxina A  $1,16 \mu\text{g Kg}^{-1}$  no pericarpo e não sendo detectado no grão. Menções de Chalfoun e Parizzi (2007) destacam o fato de que os esporos negros do *A. carbonarius* promovem proteção contra os raios solares e UV, possibilitando vantagens ao seu desenvolvimento; consequentemente, podem favorecer a produção da ocratoxina A.

Independentemente dos fungos não atingirem os grãos de café, a ocratoxina A sintetizada pelo *A. ochraceus* não foi detectada nos grãos, diferentemente do *A. carbonarius* encontrada nos grãos, com valores inferiores àqueles encontrados nos pericarpos.

Com base nos resultados apresentados dos níveis de ocratoxina A nos pericarpos em ambos fungos e óleos essenciais, salienta-se que os pericarpos possuem condições favoráveis

à elevada incidência da toxina, demonstrando que a adulteração de café com adição de pericarpos é um procedimento praticado por algumas torrefadoras, propiciando influência na segurança do produto (CHALFOUN; PARIZZI, 2007). Baseando-se nos efeitos deletérios sobre a saúde causados pelas micotoxinas e comprovado o risco tal adulteração, configura-se um crime contra o consumidor.

Mesmo os óleos de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth não influenciando na síntese da ocratoxina A pelo isolados estudados neste estudo, as concentrações da toxina obtida evidencia baixo nível de contaminação. Os valores obtidos encontram-se bem abaixo dos limites estabelecidos pela legislação europeia e brasileira de  $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$  e  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , respectivamente.

Os dados obtidos neste trabalho corroboram com os resultados obtidos anteriormente por Aldred et al. (2008), que investigaram a eficácia dos óleos essenciais de canela, cravo, louro e o antioxidante resveratrol na produção de ocratoxina A por *Penicillium verrucosum* e *A. westerdijkiae* em grãos de trigo. Os autores observaram que os óleos essenciais não foram eficazes no controle da síntese de toxina, em comparação com o resveratrol.

Assim, contata-se que a redução do número de esporos, a redução do índice de ocorrência e a produção de toxina nem sempre ocorrem mutuamente. Os resultados obtidos neste estudo fornecem informação sobre o comportamento dos óleos essenciais no controle dos fungos *A. carbonarius* e *A. ochraceus* e da produção da ocratoxina A em modelos reais, e demonstram a necessidade do desenvolvimento de formulações para que as respostas observadas em condições *in vitro* se repitam nas condições *in vivo*.

## 5 CONCLUSÃO

O óleo essencial de *B. citriodora* apresentou os constituintes majoritários neral (42,44%) e geranial (57,55%) e o óleo essencial de *L. origanoides* Kunth. foi carvacrol (65,63%),

*p*-cimeno (12,13%), timol (7,04%).

Os óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. proporcionaram atividade antifúngica e antiocratoxingênica aos patógenos *A. carbonarius* e *A. ochraceus* no meio de cultura.

Os óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. possibilitaram a redução dos esporos de *A. carbonarius* e redução do índice de ocorrência de *A. ochraceus* nos pericarpos de café e esses não atingiram os grãos de café.

O óleo essencial das espécies vegetais estudadas não inibiu a produção da ocratoxina A nos pericarpos e grãos de café.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo indicam que aplicações diretas dos óleos essenciais de *Backhousia citriodora* e *Lippia origanoides* Kunth. em frutos de café não são viáveis para o controle dos patógenos *A. carbonarius* e *A. ochraceus* e da ocratoxina A. Entretanto, sugere-se novos estudos sobre a volatilização desses óleos e posterior aplicação deles na forma de microencapsulados, possibilitando a liberação lenta, um maior efeito residual dos tratamentos.

## REFERÊNCIAS

ADELAKUN, O. E.; OYELADE, O. J.; OLANIPEKUN, B. F. Chapter 7 - Use of Essential Oils in Food Preservation. In: PREEDY, V. R. (Ed.). **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. San Diego: Academic Press, p.71-84, 2016.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Diário Oficial da União. Resolução - RDC No - 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**, 2011.

ALDEREES, F. et al. Mechanism of Action against Food Spoilage Yeasts and Bioactivity of *Tasmania lanceolata*, *Backhousia citriodora* and *Syzygium anisatum* Plant Solvent Extracts. **Foods**, v. 7, n. 11, p. 179, 2018. ISSN 2304-8158.

ALDRED, D.; CAIRNS-FULLER, V.; MAGAN, N. Environmental factors affect efficacy of some essential oils and resveratrol to control growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus westerdijkiae* on wheat grain. **Journal of Stored Products Research**, v. 44, n. 4, p. 341-346, 2008.

ALIZADEH, A. et al. Essential oil composition, total phenolic content, antioxidant activity and antifungal properties of Iranian *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. as influenced by ontogenetical variation. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 16, n. 1, p. 59-70, 2013.

ALMEIDA, M. C. et al. Genetic diversity and chemical variability of *Lippia* spp. (Verbenaceae). **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 725, October, 12 2018.

AN, P. et al.  $\alpha$ -terpineol and terpen-4-ol, the critical components of tea tree oil, exert antifungal activities in vitro and in vivo against *Aspergillus niger* in grapes by inducing morphous damage and metabolic changes of fungus. **Food Control**, v. 98, p. 42-53, 2019.

ANDRADE, M. A. et al. Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 189-194, 2015.

ANDRADE, M. A. et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. **Antioxidants**, v. 2, p. 384-397, 2013.

ANGÉLICO, Caroline Lima. **Aplicação do agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries “Cladosporin” como bioprotetor da qualidade do café (*Coffea arabica* L.)**. 2012. 320 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC). **História**: a expansão do café no Brasil. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/cafe-com/historia/>>. Acesso em: 20 jan. 2019.

BATISTA, L. R. et al. Coffee: Types and Production. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M., et al (Ed.). **Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Academic Press, 2016. p.244-251.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de Ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.) Boia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 3, p. 804-813, 2007.

BAYMAN, P.; BAKER, J. L. Ochratoxins: a global perspective. **Mycopathologia**, v. 162, n. 3, p. 215-223, 2006.

BEDOYA, O. A. et al. Actividad inhibitoria del aceite esencial de *Lippia origanoides* HBK sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans*. **Acta Agronómica**, v. 64, n. 2, p. 116-124, 2015.

BORÉM, F. M.; SILVA, T. J. G., SILVA, E. A. A. Anatomia e composição química do fruto e da semente do cafeeiro. In: **Pós-colheita do café**. Lavras: Editora UFLA, p. 19-40, 2007.

BRANDÃO, R. M.. **Óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish**: quantificação do ergosterol sobre os fungos *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*, atividade antiocratoxigênica e antiaflatoxigênica. 2017. p. 108 Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras 2017.

BUCHAILLOT, A.; CAFFIN, N.; BHANDARI, B. Drying of lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) leaves: retention of volatiles and color. **Drying Technology**, v. 27, n. 3, p. 445-450, 2009.

CAMARGO, K. C. et al. (2017) Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Hyptis carpinifolia* Benth. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, p. 2871-2877, 2017.

CASTILLO, R. M. et al. Insecticidal and Repellent Activity of Several Plant-Derived Essential Oils Against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 33, n. 1, p. 25-35, 2017.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. **Fungos associados a frutos e grãos do café: *Aspergillus* e *Penicillium***. Brasília: Embrapa, 2003. 69 p.

CHALFOUN, S.; PARIZZI, F. Fungos toxigênicos e micotoxinas em café. In: **Pós-colheita do café**. Lavras: Editora UFLA, p. 513-543, 2007.

Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). Acom.da safra brasileira: café v. 5– Safra 2018, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-84, dezembro de 2018.

DA SILVA J. K. R. et al. Chemical Composition of Four Essential Oils of *Eugenia* from the Brazilian Amazon and Their Cytotoxic and Antioxidant Activity. **Medicines**, v. 4, n. 3, 2017a.

DA SILVA, A. P. et al. Tyrosinase inhibitory activity, molecular docking studies and antioxidant potential of chemotypes of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) essential oils. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, 2017b.

DAMMAK, I. et al. Evaluation of antifungal and anti-ochratoxigenic activities of *Salvia officinalis*, *Lavandula dentata* and *Laurus nobilis* essential oils and a major monoterpene constituent 1,8-cineole against *Aspergillus carbonarius*. **Industrial Crops and Products**, v. 128, p. 85-93, 2019.

DE MEDEIROS, F. C. M. et al. Fungicidal activity of essential oils from Brazilian Cerrado species against wood decay fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 114, p. 87-93, 2016.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. Chichester: J. Wiley, 2009. 539 p.

DHOUIOUI, M. et al. Seasonal changes in essential oil composition of *Aristolochia longa* L. ssp. *paucinervis* Batt. (*Aristolochiaceae*) roots and its antimicrobial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 301-306, 2016.

DOU - Métodos de Referência para Análise de Ocratoxina A em Café Verde, DOU, Diário Oficial da União, Instrução Normativa SDA, no. 09, 24/03/2000, seção 1, 35-41.

EL ASBAHANI, A. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International journal of pharmaceutics**, 483 (1), 220-243, 2015.

EUROPEAN COMMISSION – EC. Commission Regulation (EC) n° 1881/2006, of 19 December 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, Brussels v. 364, p. 5-24, 2006

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ed; Anvisa: Brasília, Brasil, v. 1, p. 198-199. 2010.

FASSIO, L.; SILVA, A. D. **Importância econômica e social do café conilon**. Café conilon. Vitória: Incaper, p. 37-49, 2007.

GALLO, A. et al. New insight into the ochratoxin A biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius*. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 23, p. 8208-8218, 2012.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

GOMES, et al. Use of essential oils of the genus *Citrus* as biocidal agentes. **American Journal of Plant Science**, v. 5, n. 3, p. 299-305, 2014.

GONÇALVES S.; ROMANO A. Inhibitory Properties of Phenolic Compounds Against Enzymes Linked with Human Diseases. In *Phenolic Compounds-Biological Activity 2017*. InTech.

GUO, N. et al. The preservative potential of *Amomum tsaoko* essential oil against *E. coil*, its antibacterial property and mode of action. **Food Control**, v. 75, p. 236-245, 2017

GUO, Y.; SAKULNARMRAT, K.; KONCZAK, I. Anti-inflammatory potential of native Australian herbs polyphenols. **Toxicology reports**, v. 1, p. 385-390, 2014.

GUPTA, R. C.; SRIVASTAVA, A.; LALL, R. Ochratoxins and Citrinin. In: (Ed.). **Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles: Third Edition**, 2018. p.1019-1027.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7nd ed. Tradução de Jairo Bordinhão et al. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

HAYES, A. J.; MARKOVIC, B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (lemon myrtle). Part 2. Absorption and histopathology following application to human skin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 10, p. 1409-1416, 2003.

HAYES, A.; MARKOVIC, B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 4, p. 535-543, 2002.

HOUICHER, A. et al. Chemical composition and antifungal activity of *Anacyclus valentinus* essential oil from Algeria. **Food Bioscience**, v. 25, p. 28-31, 2018.

HUA, H. et al. Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e108285, 2014

IAMANAKA, B. T. et al. The mycobiota of coffee beans and its influence on the coffee beverage. **Food Research International**, v. 62, p. 353-358, 2014.

Internacional Agency for Research on Cancer. (IARC) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 56, 1993. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsGroupOrder.pdf>>

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116 p.

KÜLHEIM, C. et al. The Eucalyptus terpene synthase gene family. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 450, 2015.

LAZAR-BAKER, E. et al. Evaluation of commercial essential oil samples on the growth of postharvest pathogen *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey. **Letters in applied microbiology**, v. 52, n. 3, p. 227-232, 2011.

LIN, M. T., DIANESE, J. C. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, 66, 1466 – 1469, 1976

LÜCKER, J. **Metabolic engineering of monoterpene biosynthesis in plants**.sn, 2002.

MAR, J. M. et al. *Lippia origanoides* essential oil: An efficient alternative to control *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 292-297, 2018.

MCKINNEY, H. H.; DAVIS, R. Influence of soil temperature and moisture on infection of young wheat plants by *Ophiobolus graminis*. **Journal of Agricultural Research**, v. 31, n. 9, 1925.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Chemical characterisation and allelopathic potential of essential oils from leaves and rhizomes of white ginger. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, p. 555-562, 2015.

MONTGOMERY, D. C., Peck, E. A., & Vining, G. G. Introduction to linear regression analysis (Vol. 821). John Wiley & Sons, 2012.

MORAIS, H. et al. Escala fenológica detalhada da fase reprodutiva de *Coffea arabica*. **Bragantia**, v. 67, n. 1, 2008.

O'LEARY, N. et al. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 170, n. 2, p. 197-219, 2012.

OLIVEIRA, D. R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 236-240, 2007

OLIVEIRA, G. et al. Influence of temperature and water activity on Ochratoxin A production by *Aspergillus* strain in coffee south of Minas Gerais/Brazil. **LWT**, v. 102, p. 1-7, 2019a.

OLIVEIRA, J. et al. Antifungal activity of essential oils associated with carboxymethylcellulose against *Colletotrichum acutatum* in strawberries. **Scientia Horticulturae**, v. 243, p. 261-267, 2019b.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991, 111p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

PASSAMANI, F. R. F. et al. Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes. **Journal of food protection**, v. 77, n. 11, p. 1947-1952, 2014.

PASSONE, M. A.; GIRARDI, N. S.; ETCHEVERRY, M. Evaluation of the control ability of five essential oils against *Aspergillus* section Nigri growth and ochratoxin A accumulation in peanut meal extract agar conditioned at different water activities levels. **International journal of food microbiology**, v. 159, n. 3, p. 198-206, 2012.

PAWAR, V.; THAKER, V. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. **Mycoses**, v. 49, n. 4, p. 316-323, 2006.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PIMENTEL, F. A. et al. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 373-375, 2006.

POLATOĞLU, K.; KARAKOÇ, Ö. C. Chapter 5 - Biologically Active Essential Oils against Stored Product Pests. In: PREEDY, V. R. (Ed.). **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. San Diego: Academic Press, 2016. p.39-59.

RÍOS, J.-L. Chapter 1 - Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. In: PREEDY, V. R. (Ed.). **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. San Diego: Academic Press, 2016. p.3-10.

SAMSON RA, VISAGIE CM, HOUBRAKEN J, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p.141–73, 2014.

SANTIAGO, J. de A. **Óleos essenciais de três espécies de myrtaceae: composição química, atividades antioxidante, hemolítica, antitumoral, antiocrotogênica e citogenotóxica** 2015. 222 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

SARRAZIN, S. L. F. et al. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, p. 8, Nov 2015a.

SARRAZIN, S. L. F. et al. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* kunth. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 1860-1871, 2015b.

SILVA, L. F. et al. Chemical Characterization, Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils of *Mentha viridis* L. and *Mentha pulegium* L. (L). **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 666-675, 2015.

SIMÕES, C. M. D. O. et al. (2007) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS.

SINGH, P. 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, n. 14, p. 2421-2425, 2008.

SOARES, B. V. et al. Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, v. 469, p. 72-78, 2017.

SOLIMAN, K. M.; BADEAA, R. I. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 11, p. 1669-1675, 2002.

SONKER, N.; PANDEY, A. K.; SINGH, P. Efficiency of *Artemisia nilagirica* (Clarke) Pamp. essential oil as a mycotoxicant against postharvest mycobiota of table grapes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 9, p. 1932-1939, 2015.

SOUTHWELL, I. A.; RUSSELL, M. F.; SMITH, R. L. Chemical composition of some novel aromatic oils from the Australian flora. **Acta Horticulturae**. v.59 p. 79-89, 2004.

SULTANBAWA, Y. Lemon Myrtle (*Backhousia citriodora*) Oils. In: **Essential oils in food preservation flavor and safety** , p.517-521, 2016.

TEIXEIRA, M. et al. Essential oil from *Lippia origanoides* (Verbenaceae): haemostasis and enzymes activity alterations. **Medicinal chemistry** (Sharjah (United Arab Emirates)), 2018.

TEIXEIRA, M. L. **Óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) e *Lippia origanoides* Kunth.:** composição química, atividade antioxidante e potencial farmacológico. 2016. 191 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

TEIXEIRA, M. L., et al. Essential Oils from *Lippia origanoides* Kunth. and *Mentha spicata* L.:Chemical Composition, Insecticidal and Antioxidant Activities. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 1181-1190, 2014.

TEMPE, J. The blotter method for seed health testing. **Proc. Int. Seed Test. Assoc**, v. 28, n. 1, p. 133-151, 1963.

TIAN, J. et al. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. **Food Chemistry**, v. 130, n. 3, p. 520-527, 2012.

TUKEY, J. Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. **Biometrics**. 5 (2): 99–114, 1949.

TURINA, A. D. V. et al. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, n. 2, p. 101-113, 2006.

VAN DEN DOOL; KRATZ, P. D. J. A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, n. 11, p. 463-471,1963.

WANG, H. et al. Comparative seasonal variation and chemical composition of essential oils from the leaves and stems of *Schefflera heptaphylla* using microwave-assisted and conventional hydrodistillation. **Industrial Crops and Products**, Philadelphia, v. 36, n. 1, p. 229- 237, Mar. 2012.

WANG, L. et al. Effect of Cinnamaldehyde on Morphological Alterations of *Aspergillus ochraceus* and Expression of Key Genes Involved in Ochratoxin A Biosynthesis. **Toxins**, v. 10, n. 9, p. 340, 2018b.

WANG, Y. et al. A consensus ochratoxin A biosynthetic pathway: Insights from the genome sequence of *Aspergillus ochraceus* and a comparative genomic analysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 84, n. 19, p. 1009-1018, 2018a.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A – Cromatogramas dos óleos essenciais

Figura 1A – Cromatograma do óleo essencial de *Backhousia citriodora*.

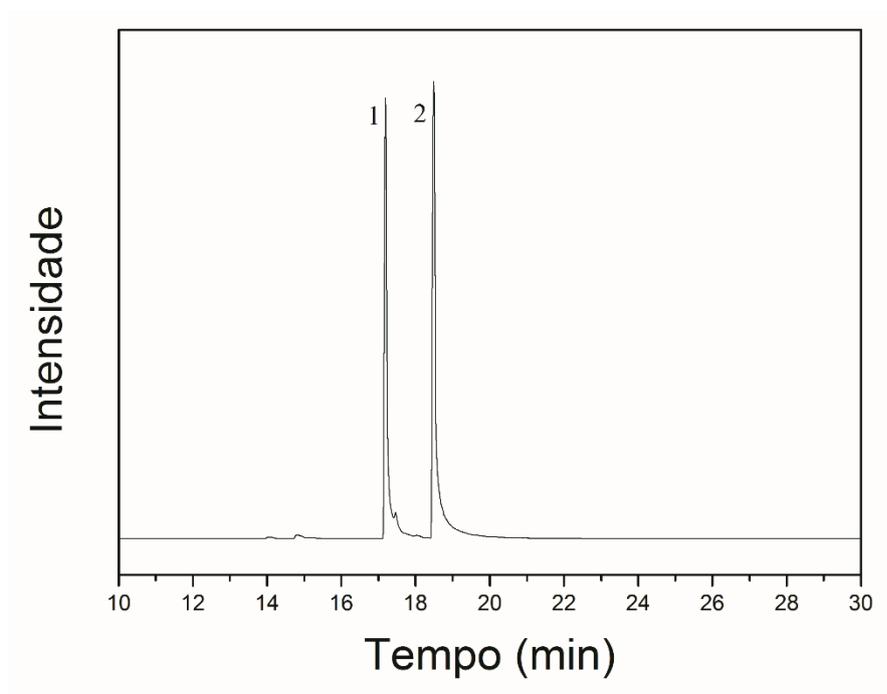
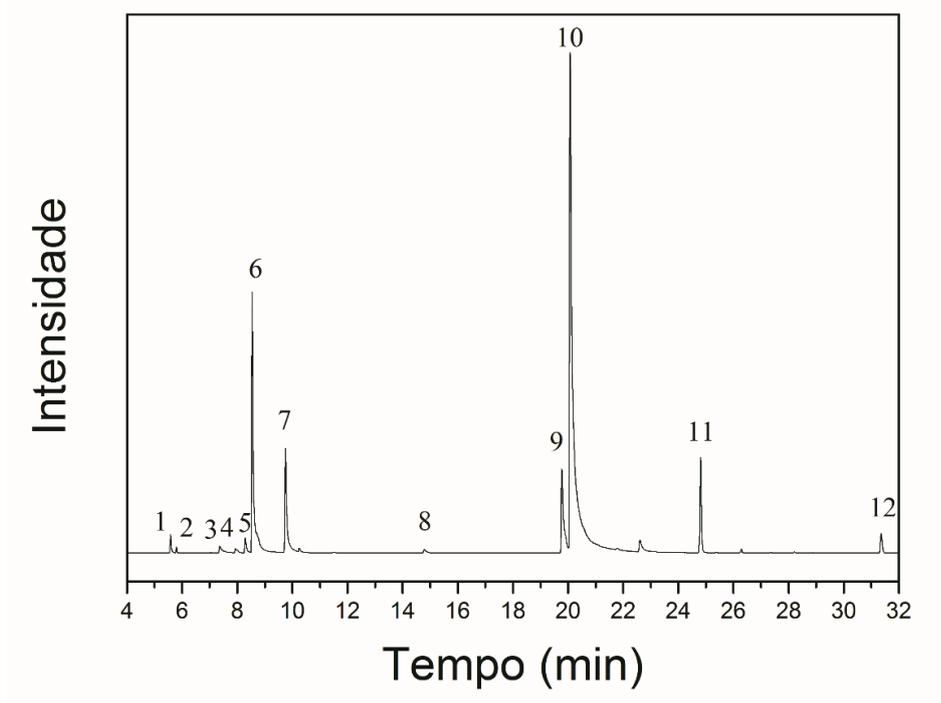


Figura 2A – Cromatograma do óleo essencial de *Lippia organoides* Kunth.



### APÊNDICE B – Tabelas de análises de variância da porcentagem de inibição do crescimento micelial

Tabela 1B – Análise de variância para a porcentagem de inibição do crescimento micelial dos óleos essenciais de *Backhousia citriodora* e *L. origanoides* Kunth. em *A. carbonarius*.

Óleo Essencial	Concentração $\mu\text{L L}^{-1}$	N	E.P	1° Q.	2° Q.	3° Q.	Valor-p <sup>1</sup>
<i>B. citriodora</i>	0	3	0.00	0.00	0.00	0.00	<0,001
	50	3	0.40	1.00	1.60	1.60	
	100	3	0.69	2.20	2.80	3.40	
	250	3	0.80	2.80	4.00	4.00	
	500	3	0.00	100.00	100.00	100.00	
	1000	3	0.00	100.00	100.00	100.00	
	2000	3	0.00	100.00	100.00	100.00	
	3000	3	0.00	100.00	100.00	100.00	
<i>L. origanoides</i> Kunth.	0	3	0.00	0.00	0.00	0.00	<0,001
	50	3	0.80	18.40	18.40	19.60	
	100	3	0.80	77.20	78.40	78.40	
	250	3	0.00	100.00	100.00	100.00	
	500	3	0.00	100.00	100.00	100.00	
	1000	3	0.00	100.00	100.00	100.00	
	2000	3	0.00	100.00	100.00	100.00	
	3000	3	0.00	100.00	100.00	100.00	

Tabela 2B – Análise de variância para a porcentagem de inibição do crescimento micelial dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. em *A. ochraceus*.

Óleo Essencial	Concentração $\mu\text{L L}^{-1}$	N	E.P	1° Q.	2° Q.	3° Q.	Valor-p
<i>B. citriodora</i>	0	3	0.00	0.00	0.00	0.00	<0,001
	50	3	0.73	1.46	1.46	2.56	
	100	3	1.26	9.12	10.22	11.31	
	250	3	0.00	100.00	100.00	100.00	
	500	3	0.00	100.00	100.00	100.00	
	1000	3	0.00	100.00	100.00	100.00	
	2000	3	0.00	100.00	100.00	100.00	
	3000	3	0.00	100.00	100.00	100.00	
<i>L. origanoides</i> Kunth.	0	3	0.00	0.00	0.00	0.00	<0,001
	50	3	5.11	29.93	29.93	37.59	
	100	3	3.18	64.96	67.15	70.44	
	250	3	1.46	89.05	89.05	91.24	
	500	3	0.00	100.00	100.00	100.00	
	1000	3	0.00	100.00	100.00	100.00	
	2000	3	0.00	100.00	100.00	100.00	
	3000	3	0.00	100.00	100.00	100.00	

## APÊNDICE C – Tabelas de análises de variância da inibição da produção da ocratoxina A

Tabela 1C – Análise de variância para a porcentagem de inibição da produção de ocratoxina A dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. em *A. carbonarius*.

Tratamentos	Concentração	N	E.P.	1° Q.	2° Q.	3° Q.	Valor-p <sup>1</sup>	
H <sub>2</sub> O	-	3	0.00	0.00	0.00	0.00	<0,001	
Solução de leite em pó (LPO)	10%	3	0.13	1.53	1.70	1.73		
Solução de hipoclorito de sódio	1%	3	0.00	99.93	99.93	99.93		
Óleo essencial <i>B. citriodora</i>	500 $\mu\text{L L}^{-1}$	3	0.00	99.93	99.94	99.94		
	1000 $\mu\text{L L}^{-1}$	3	0.01	99.93	99.94	99.94		
	2000 $\mu\text{L L}^{-1}$	3	0.00	99.95	99.95	99.96		
H <sub>2</sub> O	-	3	0.00	0.00	0.00	0.00		<0,001
Solução de leite em pó (LPO)	10%	3	1.60	0.13	1.53	1.70		
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	3	99.93	0.00	99.93	99.93		
Óleo essencial <i>L. origanoides</i> Kunth.	250 $\mu\text{L L}^{-1}$	3	99.94	0.01	99.93	99.95		
	500 $\mu\text{L L}^{-1}$	3	99.93	0.01	99.92	99.93		
	1000 $\mu\text{L L}^{-1}$	3	99.94	0.01	99.93	99.94		

Tabela 2C – Análise de variância para a porcentagem de inibição da produção de ocratoxina A dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *Lippia origanoides* Kunth. em *A. ochraceus*.

Tratamentos	Concentração	N	E.P.	1° Q.	2° Q.	3° Q.	Valor-p <sup>1</sup>
H <sub>2</sub> O	-	3	0.00	0.00	0.00	0.00	
Solução de leite em pó (LPO)	10%	3	0.23	0.85	1.16	1.22	
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	3	0.08	99.69	99.72	99.82	<0,001
Óleo essencial <i>B. citriodora</i>	250 µL L <sup>-1</sup>	3	0.01	99.71	99.71	99.72	
	500 µL L <sup>-1</sup>	3	0.02	99.69	99.71	99.72	
	1000 µL L <sup>-1</sup>	3	0.10	99.70	99.73	99.86	
H <sub>2</sub> O	-	3	0.00	0.00	0.00	0.00	
Solução de leite em pó (LPO)	10%	3	0.23	0.85	1.16	1.22	
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	3	0.08	99.69	99.72	99.82	<0,001
Óleo essencial <i>L. organoides</i> Kunth.	500 µL L <sup>-1</sup>	3	0.02	99.69	99.70	99.73	
	1000 µL L <sup>-1</sup>	3	0.01	99.72	99.72	99.74	
	2000 µL L <sup>-1</sup>	3	0.01	99.72	99.72	99.73	

#### APÊNDICE D – Tabelas de análises de variância do crescimento dos microrganismos nos pericarpos de café

Tabela 1D – Análise de variância da concentração de esporos 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. organoides* Kunth. em *A. carbonarius*.

Tratamento	Concentração	N	E.P.	1°Q.	2°Q.	3°Q.	Valor p <sup>1</sup>
H <sub>2</sub> O	-	6	1.69	12.64	15.52	17.18	
Solução de leite em pó (LPO)	10%	6	1.63	9.80	11.44	14.24	
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	6	1.68	2.83	5.84	11.44	0.002
Óleo essencial <i>B. citriodora</i>	500 µL L <sup>-1</sup>	6	2.33	3.52	5.90	14.28	
	1000 µL L <sup>-1</sup>	6	1.72	3.20	6.50	9.40	
	2000 µL L <sup>-1</sup>	6	0.49	2.79	3.98	4.76	
H <sub>2</sub> O	-	6	1.69	12.64	15.52	17.18	
Solução de leite em pó (LPO)	10%	6	1.63	9.80	11.44	14.24	
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	6	1.68	2.83	5.84	11.44	<0,001
Óleo essencial <i>L. organoides</i> Kunth.	500 µL L <sup>-1</sup>	6	0.79	5.28	7.22	7.96	
	1000 µL L <sup>-1</sup>	6	0.60	4.40	4.84	5.48	
	2000 µL L <sup>-1</sup>	6	0.52	2.91	4.28	4.44	

Tabela 2D – Análise de variância para a porcentagem do índice de ocorrência dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. em *A. ochraceus*.

Tratamento	Concentração	N	E.P.	1°Q.	2°Q.	3°Q.	Valor p <sup>1</sup>
H <sub>2</sub> O	-	6	3.82	13.00	14.50	29.00	
Solução de leite em pó (LPO)	10%	6	2.69	12.00	12.50	16.00	
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	6	0.89	3.00	4.00	6.00	0.003
Óleo essencial <i>B. citriodora</i>	250 µL L <sup>-1</sup>	6	3.77	6.00	11.00	12.00	
	500 µL L <sup>-1</sup>	6	1.61	7.00	7.50	12.00	
	1000 µL L <sup>-1</sup>	6	1.42	2.00	6.00	8.00	
H <sub>2</sub> O	-	6	3.82	13.00	14.50	29.00	
Solução de leite em pó (LPO)	10%	6	2.69	12.00	12.50	16.00	
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	6	0.89	3.00	4.00	6.00	0.006
Óleo essencial <i>L. origanoides</i> Kunth.	500 µL L <sup>-1</sup>	6	2.79	8.00	14.00	21.00	
	1000 µL L <sup>-1</sup>	6	2.67	8.00	10.50	15.00	
	2000 µL L <sup>-1</sup>	6	0.99	7.00	10.00	11.00	

## APÊNDICE E – Cromatogramas da ocratoxina A

Figura 1E – Cromatograma da ocratoxina A (Padrão)

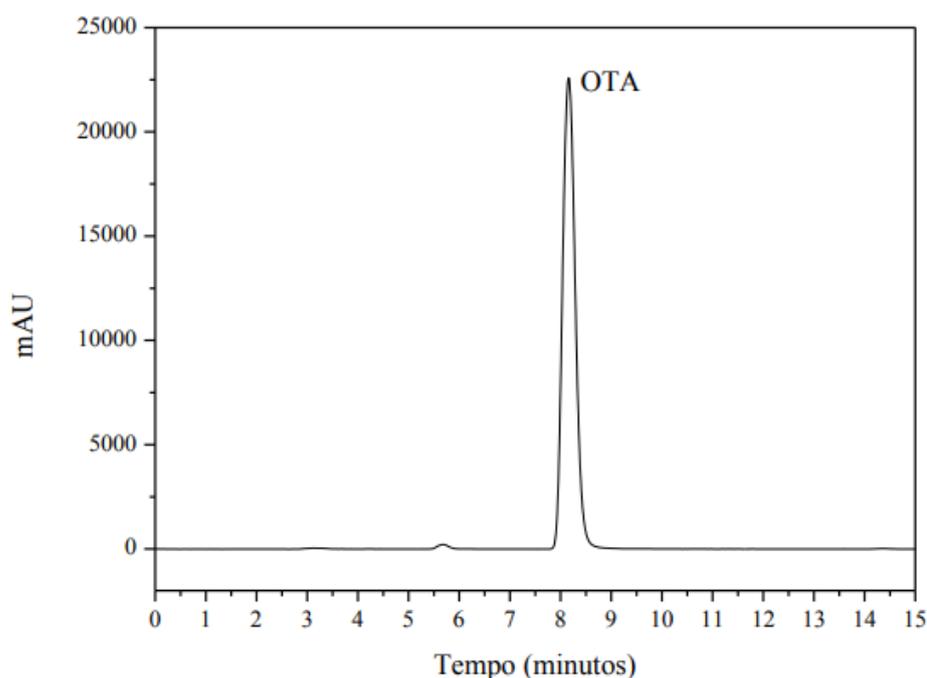


Figura 2E – Cromatograma da ocratoxina A (Testemunha *A. carbonarius* dos pericarpos de café)

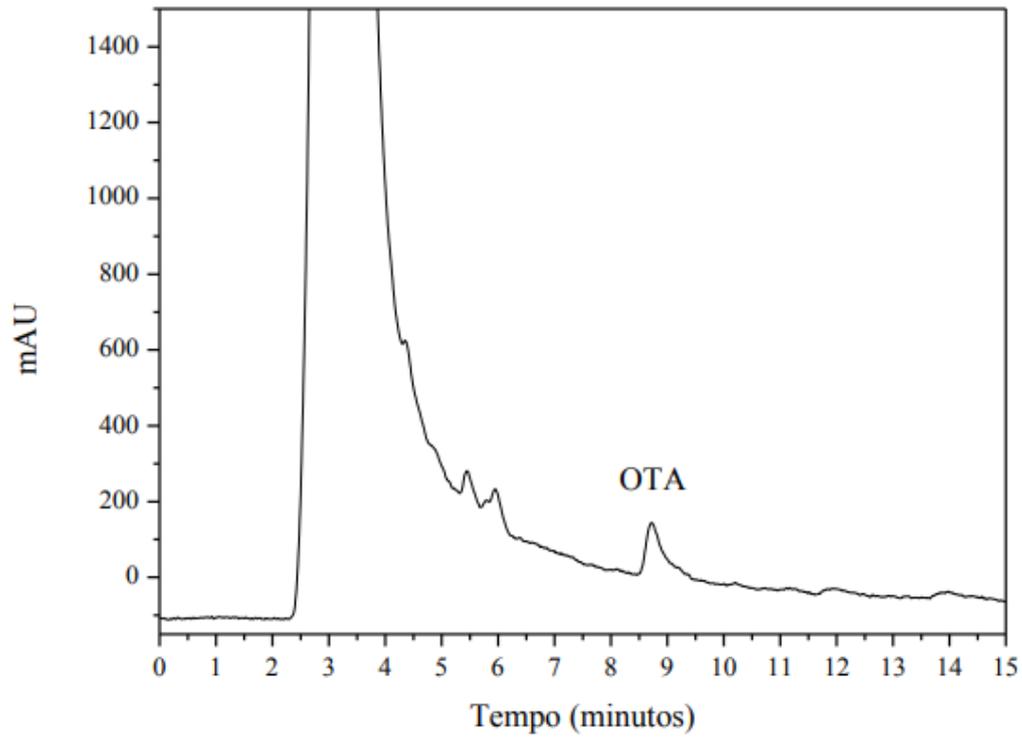


Figura 3E – Cromatograma da ocratoxina A Testemunha *A. ochraceus* dos pericarpos de café)

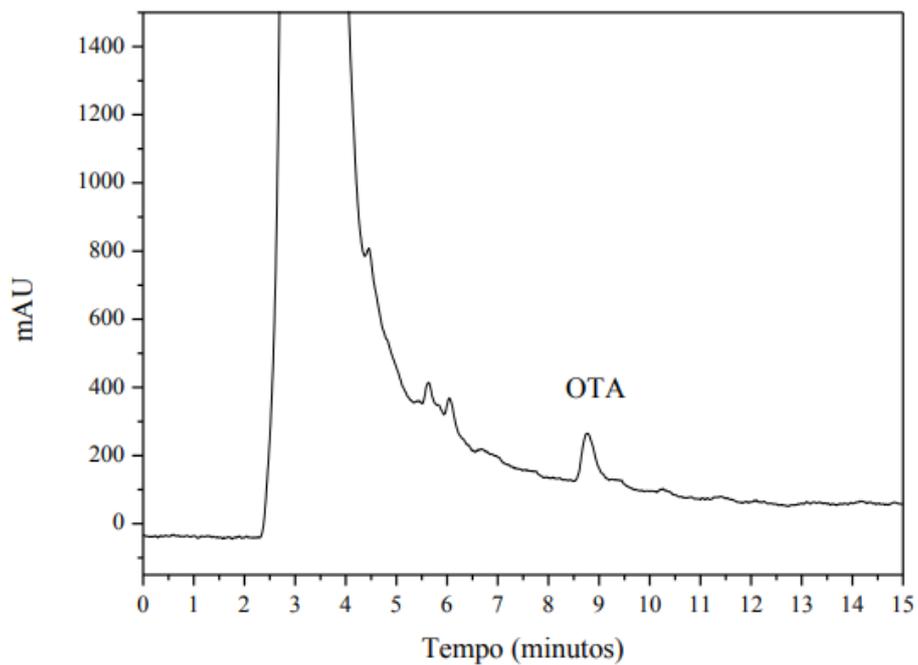


Figura 4E – Cromatograma da ocratoxina A (Testemunha *A. carbonarius* dos grãos de café)

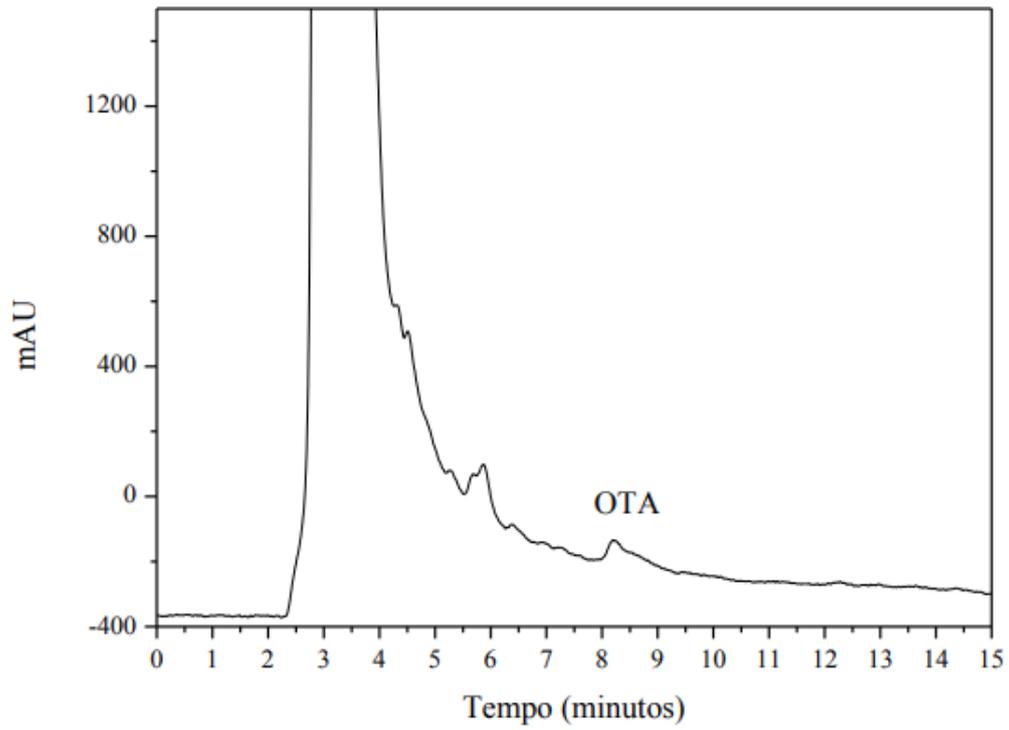
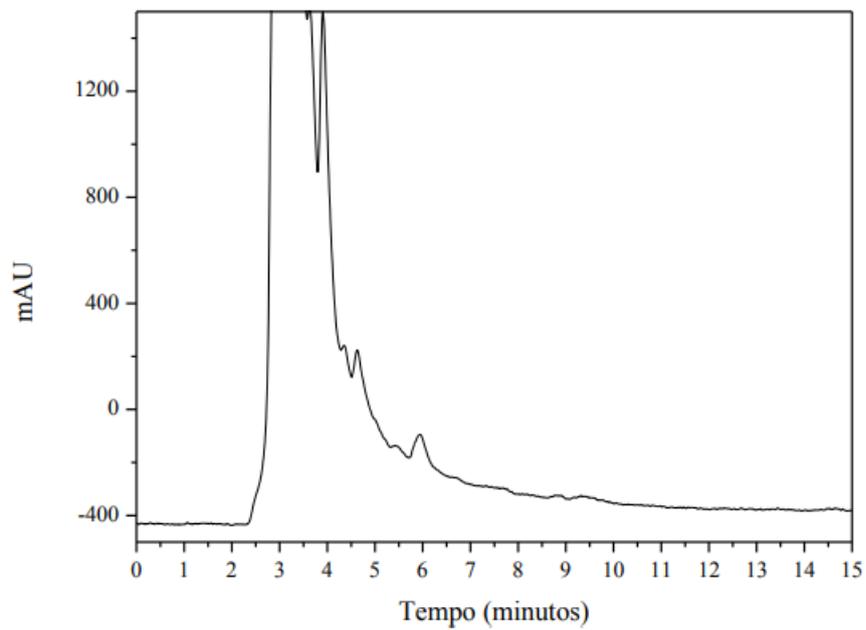


Figura 5E – Cromatograma da ocratoxina A (Testemunha *A. ochraceus* dos grãos de café)



**APÊNDICE F – Tabelas de análises de variância da inibição da produção da ocratoxina A nos pericarpos e grãos de café**

Tabela 1F – Análise de variância para a porcentagem de inibição da produção de ocratoxina A dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. em *A. carbonarius* nos pericarpos.

Tratamentos	Concentração	N	E.P.	1º Q.	2º Q.	3º Q.	Valor-p <sup>1</sup>
H <sub>2</sub> O	-	3	0.05	1.60	1.62	1.68	
Solução de leite em pó (LPO)	10%	3	0.05	1.56	1.61	1.64	
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	3	0.01	1.41	1.42	1.43	<0,001
Óleo essencial <i>B. citriodora</i>	250 µL L <sup>-1</sup>	3	0.01	1.47	1.48	1.49	
	500 µL L <sup>-1</sup>	3	0.00	1.42	1.42	1.42	
	1000 µL L <sup>-1</sup>	3	0.00	1.42	1.42	1.42	
H <sub>2</sub> O	-	1.64	0.05	1.60	1.62	1.68	
Solução de leite em pó (LPO)	10%	1.60	0.05	1.56	1.61	1.64	
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	1.42	0.01	1.41	1.42	1.43	0.001
Óleo essencial <i>L. origanoides</i> Kunth.	500 µL L <sup>-1</sup>	1.65	0.01	1.65	1.65	1.66	
	1000 µL L <sup>-1</sup>	1.61	0.02	1.60	1.61	1.63	
	2000 µL L <sup>-1</sup>	1.47	0.02	1.46	1.49	1.49	

Tabela 2F – Análise de variância para a porcentagem de inibição da produção de ocratoxina A dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. em *A. carbonarius* nos grãos.

Tratamentos	Concentração	N	E.P.	1º Q.	2º Q.	3º Q.	Valor-p <sup>1</sup>
H <sub>2</sub> O	-	3	0.01	0.90	0.90	0.91	
Solução de leite em pó (LPO)	10%	3	0.00	0.90	0.90	0.90	
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	3	0.01	0.70	0.70	0.71	<0,001
Óleo essencial <i>B. citriodora</i>	250 µL L <sup>-1</sup>	3	0.00	0.86	0.86	0.86	
	500 µL L <sup>-1</sup>	3	0.01	0.76	0.77	0.77	
	1000 µL L <sup>-1</sup>	3	0.02	0.73	0.75	0.76	
H <sub>2</sub> O	-	3	0.01	0.90	0.90	0.91	
Solução de leite em pó (LPO)	10%	3	0.00	0.90	0.90	0.90	
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	3	0.01	0.70	0.70	0.71	<0,001
Óleo essencial <i>L. origanoides</i> Kunth.	500 µL L <sup>-1</sup>	3	0.02	0.79	0.83	0.83	
	1000 µL L <sup>-1</sup>	3	0.01	0.75	0.76	0.76	
	2000 µL L <sup>-1</sup>	3	0.00	0.74	0.74	0.74	

Tabela 3F – Análise de variância para a porcentagem de inibição da produção de ocratoxina A dos óleos essenciais de *B. citriodora* e *L. origanoides* Kunth. em *A. ochraceus* nos pericarpos.

Tratamentos	Concentração	N	E.P.	1° Q.	2° Q.	3° Q.	Valor-p <sup>1</sup>
H <sub>2</sub> O	-	3	0.01	1.16	1.16	1.17	
Solução de leite em pó (LPO)	10%	3	0.00	1.16	1.16	1.17	
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	3	0.04	0.75	0.75	0.81	<0,001
Óleo essencial <i>B. citriodora</i>	250 µL L <sup>-1</sup>	3	0.08	1.07	1.18	1.20	
	500 µL L <sup>-1</sup>	3	0.01	1.11	1.12	1.12	
	1000 µL L <sup>-1</sup>	3	0.01	1.03	1.05	1.05	
H <sub>2</sub> O	-	3	0.01	1.16	1.16	1.17	
Solução de leite em pó (LPO)	10%	3	0.01	1.16	1.16	1.17	
Solução de hipoclorito de sódio (HP)	1%	3	0.00	1.16	1.16	1.17	<0,001
Óleo essencial <i>L. origanoides</i> Kunth.	500 µL L <sup>-1</sup>	3	0.04	0.75	0.75	0.81	
	1000 µL L <sup>-1</sup>	3	0.01	1.10	1.10	1.11	
	2000 µL L <sup>-1</sup>	3	0.01	1.05	1.06	1.07	