



RAFAELA MAGALHÃES BRANDÃO

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia organoides* Kunth. e
Eremanthus erythropappus (DC.) MacLeish: QUANTIFICAÇÃO
DO ERGOSTEROL SOBRE OS FUNGOS *Aspergillus carbonarius*,
Aspergillus flavus e *Aspergillus ochraceus*, ATIVIDADE
ANTIOCRATOXIGÊNICA E ANTIAFLATOXIGÊNICA**

**LAVRAS – MG
2017**

RAFAELA MAGALHÃES BRANDÃO

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

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.

Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

**LAVRAS – MG
2017**

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

Brandão, Rafaela Magalhães.

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 antiocrotogênica e antiaflatoxigênica / Rafaela Magalhães Brandão. - 2017.

108 p. : il.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Ocratoxina A. 2. Aflatoxina B1. 3. Aflatoxina B2. I. Cardoso, Maria das Graças. . II. Título.

RAFAELA MAGALHÃES BRANDÃO

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia origanoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.)
MacLeish: QUATIFICAÇÃO DO ERGOSTEROL SOBRE OS FUNGOS *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*, ATIVIDADE ANTIOCRATOXIGÊNICA E ANTIAFLATOXIGÊNICA**

**ESSENTIAL OILS OF *Lippia origanoides* Kunth. and *Eremanthus erythropappus* (DC.)
MacLeish: QUALIFICATION OF ERGOSTEROL ON FUNGI *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*, ANTI-OCRATOXIGENIC AND ANTI-AFLATOXIGENIC ACTIVITY**

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 17 de fevereiro de 2017

Dr. Eduardo Alves UFLA

Dr. Luís Roberto Batista UFLA

Dr. Luiz Gustavo de Lima Guimarães UFSJ

Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

**LAVRAS – MG
2017**

Aos meus Pais, Dario e Joseani, pelo amor incondicional, pelo carinho, apoio, por acreditar em mim e por não ter medido nenhum esforço para que mais uma etapa de minha vida se realizasse!!!

A minha irmã, Renata, pelo carinho, amor, amizade, paciência, pelo incentivo e por me aguentar todos os dias morando juntas!!!

A minha avó, Marlene, por estar sempre me apoiando e ajudando, pelo seu carinho e amor!!!

Ao meu namorado, Lucas, pela paciência, por sempre me apoiar e acreditar em mim, pelo amor, carinho, respeito, amizade!!!

Á minha orientadora, Profa. Dra. Maria das Graças, pelos ensinamentos, pela amizade e por ser um exemplo de Professora!!!

DEDICO...

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus pela vida, pelas oportunidades, pela esperança, pela insistência e pela fé. Agradeço também pelas pessoas que o Senhor colocou em meu caminho. Algumas delas me inspiram, me ajudam, me desafiam e me encorajam a ser cada dia melhor.

À professora Dra. Maria das Graças Cardoso, por ter aberto as portas do laboratório, pela oportunidade, pelos ensinamentos, amizade, pelos puxões de orelha e confiança. Por dedicar o seu tempo, orientando-me não só profissionalmente, mas também para a vida.

Aos meus pais, irmã, avó e ao meu namorado, pelo amor incondicional, pelo carinho, incentivo, apoio, persistência, paciência, respeito e amizade. Por acreditar em mim e tornar realidade meus sonhos.

À segunda família que ganhei em Lavras, Dona Eura, Laerte, Patrícia, Lara, Raphael, Marina, pelo carinho, pela amizade, por me acolher como se fosse uma filha e pelas orações.

Aos demais familiares e amigos pela amizade e apoio.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, que me permitiram desenvolver esta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo suporte financeiro.

Ao Professor Luís Roberto Batista, pela dedicação e disponibilidade em contribuir com a nossa pesquisa. Por ceder os fungos da coleção e o laboratório para que as análises fossem realizadas.

À Dra. Lidiany Zacaroni, pelas análises cromatográficas dos óleos essenciais que foram realizadas no Centro de Análise e Prospecção e Química - CAPQ.

Ao Dr. Wilder Douglas Santiago e ao Richard Bispo Barbosa, pela ajuda na padronização do método e pelas análises cromatográficas das minhas amostras.

À Dra. Maria Luisa Teixeira, por ter me ajudado na análise estatística dos dados do trabalho.

À Professora Dra. Mariana Mansanares, coordenadora do Herbário ESAL e ao funcionário Antônio, pela atenção e pela gentileza na identificação das espécies em estudo.

Aos amigos do Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais e de Análise de Qualidade de Aguardente, Danúbia, Lucilene, Gabriel, Francielli, Maísa, Gustavo Paiva, Alex, Manuel e Cleusa. Em especial, Luana, Eduarda, Jéssica, Karen, Vanúzia, Rafaela Vieira, Allan,

Gustavo Gonçalves, pelo companheirismo, auxílio na execução do experimento, pelo carinho, pela boa convivência e pela amizade.

Ao LEMAF (Laboratório de Estudos e Projetos em Manejo Florestal), em especial ao Professor Dr. José Roberto Scolforo e a Dra. Thiza Falqueto, por ceder o cerne da madeira.

Ao pessoal do Departamento de Alimentos, em especial as meninas do Laboratório de Micologia, Nathasha, Sirlei, Larissa, Fabiana, Michelle Terra, Lorena, Michele Aragão, Anielli, pelo auxílio nas atividades, pela amizade e pela ajuda imprescindível.

Ao pessoal do Horto de Plantas Medicinais da UFLA, pelo auxílio na coleta do material vegetal.

Aos meus colegas de Mestrado, pela convivência, amizade, pelos estudos em grupo, em especial à Mayara Miranda e à Anni Silvestre.

Aos professores do programa de pós-graduação em Agroquímica, em especial à Profa. Dra. Josefina Aparecida de Sousa, pelo exemplo profissional, amizade e apoio durante esse período de convivência.

Aos funcionários do Departamento de Química, por toda a atenção e pela ajuda prestada.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização de mais uma etapa de minha vida!

RESUMO

A busca por produtos naturais se constitui em uma possível alternativa para a preservação da qualidade dos alimentos e produção de novos fármacos em relação ao tratamento tradicional, em decorrência de a maioria dos produtos sintéticos apresentarem toxicidade e resistência. Atualmente, tem sido estudado o potencial biológico apresentado pelos constituintes dos óleos essenciais. Neste trabalho, objetivou-se caracterizar os constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas de *Lippia origanoides* Kunth. e do cerne da madeira de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, avaliar a atividade fungicida, ocratoxigênica, aflatoxigênica e identificar/ quantificar o ergosterol nos fungos toxigênicos testados com os óleos. A extração do óleo essencial foi realizada pelo método de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado, sendo posteriormente analisado por CG/MS e CG/DIC. A avaliação do efeito inibitório dos óleos essenciais, a interferência dos óleos no crescimento micelial e na inibição da síntese de ergosterol foram testadas sobre as espécies *Aspergillus carbonarius* (CCDCA 10507), *Aspergillus flavus* (CCDCA 10508) e *Aspergillus ochraceus* (CCDCA 10506). A atividade antiocratoxigênica dos óleos essenciais foi avaliada por meio da inibição da biossíntese de OTA pelos fungos *A. carbonarius* e *A. ochraceus*. A atividade antiaflatoxigênica dos óleos essenciais foi avaliada por meio da inibição da biossíntese de AFB1 e AFB2 em meio de cultura contendo diferentes concentrações de cada óleo essencial. Os compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth. foram o carvacrol, p-cimeno, γ -terpineno e *trans*- β -cariofileno, e no óleo de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, foi o α -bisabolol. A atividade antifúngica dos óleos essenciais foi observada para todos os fungos testados. Os óleos essenciais das espécies utilizadas apresentaram nas concentrações testadas uma relação dose-dependente nas porcentagens de inibição do crescimento micelial, inibição da produção de ocratoxina A e aflatoxinas B1 e B2 e na síntese do ergosterol. As atividades antiocratoxigênica e antiaflatoxigênica sobre os fungos foram evidenciadas, visto que os óleos proporcionaram a diminuição da biossíntese de OTA, AFB1 e AFB2 em todas as concentrações testadas. Foi verificada uma redução no crescimento micelial, assim como no teor de ergosterol, mostrando a ação dos óleos essenciais sobre a membrana plasmática do fungo. Os resultados são promissores para fármacos, pois atuam na biossíntese de ergosterol.

Palavras-chave: Verbenaceae. Asteraceae. Ocratoxina A. Aflatoxina B1. Aflatoxina B2.

ABSTRACT

The use of natural products constitutes a possible alternative for the preservation of food quality and the production of new drugs in relation to traditional treatments, because most synthetic products present toxicity and resistance. Currently, the biological potential presented by the constituents of the essential oils has been studied. In this work, the objective was to characterize the chemical constituents of the essential oils from the leaves of *Lippia origanoides* Kunth and from the core of the *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish wood to evaluate the fungicidal, ochratoxigenic, and aflatoxigenic activities and to identify and quantify ergosterol in the toxigenic fungi tested with the oils. The extraction of the essential oil was accomplished by the hydrodistillation method, using the modified Clevenger apparatus, and the oil was analyzed by CG-MS and CG-DIC. The evaluation of the inhibitory effect of the essential oils, the interference of the oils in the mycelial growth and the inhibition of the ergosterol synthesis were tested on *Aspergillus carbonarius* (CCDCA 10507), *Aspergillus flavus* (CCDCA 10508) and *Aspergillus ochraceus* (CCDCA 10506) species. The anti-ochratoxigenic activity of the essential oils was evaluated through the inhibition of OTA biosynthesis by *A. carbonarius* and *A. ochraceus* fungi. The anti-aflatoxigenic activity of the essential oils was evaluated by inhibiting the biosynthesis of AFB1 and AFB2 in culture medium containing different concentrations of each essential oil. The major compounds found in the essential oil of *Lippia origanoides* Kunth. were carvacrol, p -cimene, γ -terpinene and *trans*- β -caryophyllene. The only compound found in the oil from *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish was α -bisabolol. The antifungal activity of the essential oils was observed for all fungi tested. The essential oils of the species used presented a dose-dependent relationship in the inhibition of mycelial growth, inhibition of ochratoxin A and aflatoxin B1 and B2, and ergosterol synthesis. Anti-ochratoxigenic and anti-aflatoxigenic activities against fungi were observed. A decrease in the biosynthesis of OTA, AFB1 and AFB2 was observed at all concentrations of the oils tested. A reduction in mycelial growth, as well as ergosterol content, was observed, which demonstrated the effect of the essential oils on the plasma membrane of the fungus. The results are promising for drugs because they act on ergosterol biosynthesis.

Keywords: Verbenaceae. Asteraceae. Ochratoxin A. Aflatoxin B1. Aflatoxin B2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Rota biossintética dos metabólitos secundários.....	19
Figura 2	Estrutura química do isopreno (unidade básica).....	21
Figura 3	Via do mevalonato para a formação do isopentenil difosfato.....	22
Figura 4	Via DXPS para a formação do isopentenil difosfato.....	24
Figura 5	Biossíntese dos terpenos.....	25
Figura 6	Estrutura química de um fenilpropanoide.....	26
Figura 7	Biossíntese de fenilpropanoides.....	27
Figura 8	Aspecto geral da espécie <i>Lippia origanoides</i> Kunth.....	29
Figura 9	Aspecto geral da espécie <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish.....	30
Figura 10	Estrutura química da Ocratoxina A.....	35
Figura 11	Estrutura química da Aflatoxina B1.....	38
Figura 12	Estrutura química da Aflatoxina B2.....	38
Figura 13	Estrutura química do ergosterol.....	41
Figura 14	Via de biossíntese de ergosterol a partir de farnesil pirofosfato.....	42
Figura 15	Aspecto geral do processo para determinação de umidade com o aparelho Dean stark.....	49
Figura 16	Esquema da fase estacionária da CCD.....	56
Figura 17	Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> Kunth.....	65
Figura 18	Estrutura química do composto majoritário presente no óleo essencial de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish.....	66
Figura 19	Teste do crescimento e/ou inibição micelial realizados com os óleos essenciais de <i>L. origanoides</i> Kunth e <i>E. erythropappus</i> (DC.) MacLeish nas concentrações de 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,90 $\mu\text{L mL}^{-1}$ sobre o fungo <i>A. carbonarius</i>	70
Figura 20	Teste do crescimento e/ou inibição micelial realizados com os óleos essenciais de <i>L. origanoides</i> Kunth e <i>E. erythropappus</i> (DC.) MacLeish nas concentrações de 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,90 $\mu\text{L mL}^{-1}$ sobre o fungo <i>A. flavus</i>	72
Figura 21	Teste do crescimento e/ou inibição micelial realizados com os óleos essenciais de <i>L. origanoides</i> Kunth e <i>E. erythropappus</i> (DC.) MacLeish nas concentrações de 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,90 $\mu\text{L mL}^{-1}$ sobre o fungo <i>A. ochraceus</i>	73
Figura 22	Efeito dos óleos essenciais de <i>Lippia origanoides</i> Kunth. e <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish na síntese de aflatoxinas B1 e B2 em <i>Aspergillus flavus</i>	79
Figura 23	Cromatograma da solução padrão do ergosterol.....	82
Figura 24	Cromatograma do ergosterol presente no fungo <i>Aspergillus carbonarius</i>	83
Figura 25	Cromatograma do ergosterol presente no fungo <i>Aspergillus flavus</i>	83
Figura 26	Cromatograma do ergosterol presente no fungo <i>Aspergillus ochraceus</i>	84
Figura 27	Cromatograma da amostra isenta de ergosterol e da amostra adicionada do padrão ergosterol numa concentração de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$	84
Figura 28	Cromatogramas da amostra na presença do analito estudado, do padrão ergosterol e da amostra fortificada.....	85

Figura 29	Curva analítica da amostra fortificada com o padrão em diferentes concentrações e curva analítica do padrão em diferentes concentrações.....	85
Figura 30	Contorno esquemático do modo de ação dos óleos essenciais em fungos.....	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação das micotoxinas.....	35
Quadro 2	Ocratoxina A em diferentes gêneros alimentícios.....	36
Quadro 3	Limites máximos ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) de Ocratoxina A em alguns alimentos estabelecidos no Brasil.....	37
Quadro 4	Limites máximos ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) de Aflatoxinas em alguns alimentos estabelecidos no Brasil.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Teor de umidade e rendimento dos óleos essenciais de <i>Lippia origanoides</i> Kunth. e <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish.....	63
Tabela 2	Composição química do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> Kunth.....	64
Tabela 3	Composição química do óleo essencial de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish.....	66
Tabela 4	Concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de <i>Lippia origanoides</i> Kunth. e <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish sobre os fungos <i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus ochraceus</i>	67
Tabela 5	Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos óleos essenciais de <i>Lippia origanoides</i> Kunth. e <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish em <i>Aspergillus carbonarius</i> no décimo dia de incubação.....	69
Tabela 6	Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos óleos essenciais de <i>Lippia origanoides</i> Kunth. e <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish em <i>Aspergillus flavus</i> no décimo dia de incubação.....	71
Tabela 7	Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos óleos essenciais de <i>Lippia origanoides</i> Kunth. e <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish em <i>Aspergillus ochraceus</i> no décimo dia de incubação.....	73
Tabela 8	Efeitos dos óleos essenciais de <i>Lippia origanoides</i> Kunth. e <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish na síntese de ocratoxina A em <i>Aspergillus carbonarius</i>	75
Tabela 9	Efeito dos óleos essenciais de <i>Lippia origanoides</i> Kunth. e <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish na síntese de ocratoxina A em <i>Aspergillus ochraceus</i>	76
Tabela 10	Parâmetros e coeficiente de determinação (R^2) da curva analítica.....	86
Tabela 11	Médias das áreas dos picos e coeficientes de variação (CV) obtida para o ergosterol na avaliação da repetitividade do método.....	86
Tabela 12	Médias das áreas dos picos e coeficientes de variação (CV) obtidos para o ergosterol na avaliação da precisão intermediária do método.....	86
Tabela 13	Recuperação do ergosterol em amostras de fungos.....	87
Tabela 14	Efeito dos óleos essenciais de <i>Lippia origanoides</i> Kunth. e de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish na síntese de ergosterol em <i>Aspergillus carbonarius</i>	88
Tabela 15	Efeito dos óleos essenciais de <i>Lippia origanoides</i> Kunth. e <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish na síntese de ergosterol em <i>Aspergillus flavus</i>	89
Tabela 16	Efeito dos óleos essenciais de <i>Lippia origanoides</i> Kunth. e de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish na síntese de ergosterol em <i>Aspergillus ochraceus</i>	90

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BLU	Base livre de umidade
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CMI	Concentração Mínima Inibitória
GC/ MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
GC/ DIC	Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama
CYA	Czapeck Yeast Agar
DAD	Detector de arranjos de diodos
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DMAPP	Isômero dimetilalil difosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
HPLC	High performance liquid chromatography
IARC	International Agency for Research on Câncer
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IPP	Isopentenil difosfato
ISO	International Organization for Standardization
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MEA	Malt Extract Agar
OTA	Ocratoxina A
OE	Óleo essencial
Sisvar	Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados
UFLA	Universidade Federal de Lavras
YES	Yeast Extract Sucrose Agar
a_w	Atividade de água

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	Metabolismo primário e secundário.....	18
2.2	<i>Lippia origanoides</i> Kunth (Alecrim-d'Angola).....	27
2.3	<i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish (Candeia).....	29
2.4	Fungos.....	30
2.4.1	<i>Aspergillus carbonarius</i>	32
2.4.2	<i>Aspergillus flavus</i>	32
2.4.3	<i>Aspergillus ochraceus</i>	33
2.5	Micotoxinas.....	34
2.5.1	Ocratoxina A.....	35
2.5.2	Aflatoxinas.....	37
2.6	Ergosterol.....	40
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1	Obtenção das plantas.....	48
3.2	Extração do óleo essencial.....	48
3.3	Determinação da umidade e do rendimento do óleo essencial.....	49
3.4	Identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial.....	50
3.5	Atividade antifúngica do óleo essencial.....	51
3.5.1	Efeito inibitório do óleo essencial sobre as espécies fúngicas.....	51
3.5.2	Efeito do óleo essencial sobre o crescimento micelial.....	51
3.5.3	Análise estatística.....	52
3.6	Influência dos óleos essenciais sobre a síntese de Ocratoxina A.....	52
3.6.1	Extração da Ocratoxina A.....	53
3.6.2	Condições cromatográficas utilizadas na quantificação da Ocratoxina A.....	53
3.6.3	Quantificação da Ocratoxina A.....	54
3.6.4	Análise estatística.....	54
3.7	Atividade dos óleos essenciais na síntese de Aflatoxinas B1 e B2.....	54
3.7.1	Extração das Aflatoxinas B1 e B2.....	55
3.7.2	Análise de produção de Aflatoxinas B1 e B2 por Cromatografia em Camada Delgada.....	55
3.8	Atividade dos óleos essenciais na síntese de Ergosterol.....	56
3.8.1	Condições de micro-organismos e cultura para a análise do ergosterol.....	57
3.8.2	Extração do ergosterol.....	57
3.8.3	Padrão de ergosterol.....	58
3.8.4	Condições cromatográficas.....	58
3.8.5	Quantificação do ergosterol.....	58
3.8.6	Análise estatística.....	59
3.8.7	Validação do método.....	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
4.1	Determinação da umidade e do rendimento dos óleos essenciais.....	63
4.2	Caracterização química dos óleos essenciais.....	64
4.3	Efeito inibitório dos óleos essenciais sobre os fungos filamentosos.....	67
4.4	Efeito dos óleos essenciais sobre o crescimento micelial dos fungos filamentosos.....	69
4.5	Atividade antiocratoxigênica.....	75
4.6	Efeito antiaflatoxigênico.....	79

4.7	Ergosterol.....	82
4.7.1	Validação do método analítico.....	84
4.7.2	Quantificação do ergosterol nas amostras de fungos.....	88
5	CONCLUSÃO.....	94
	REFERÊNCIAS.....	95
	APÊNDICE.....	102

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a preocupação com a qualidade dos alimentos não está mais voltada apenas aos pré-requisitos exigidos, como aparência, sabor, aroma, textura, valor nutritivo, segurança e conveniência do produto, mas principalmente as possíveis contaminações químicas e microbiológicas. A contaminação vem sendo o principal problema para a saúde humana, ocasionada por bactérias patogênicas, parasitas, vírus e fungos toxigênicos.

A contaminação microbiológica dos alimentos além de promover alterações inadequadas no produto, mudando as características sensoriais, tais como odores desagradáveis e alterações na cor e textura, também causa diversas patologias e, em casos mais graves, até a morte, quando há o consumo de alimento contaminado e conseqüentemente exposição humana a micotoxinas.

Muitas espécies fúngicas do gênero *Aspergillus* são produtoras de micotoxinas, metabólitos secundários de algumas espécies de fungos filamentosos, que estão associadas à deterioração e contaminação dos alimentos. As micotoxinas apresentam propriedades tóxicas, causando problemas agudos e crônicos para a saúde humana e de animais, além de eminentes perdas econômicas.

Alguns agentes antifúngicos apresentam ação na rota biossintética do ergosterol, que é um esterol considerado o principal componente da bicamada fosfolípida da membrana celular fúngica, apresentando uma importante função na manutenção do crescimento micelial e no desenvolvimento fisiológico da célula do fungo. Mas muitos desses agentes apresentam na maioria das vezes uma alta toxicidade em seres humanos e animais e podem causar alta taxa de resistência nos fungos.

Para evitarem os danos causados pelos fungos e o uso intensivo de aditivos químicos sintéticos em alimentos, o uso de produtos naturais se constitui em uma possível alternativa em relação ao tratamento tradicional, por apresentarem importantes atividades biológicas. Entre esses produtos, destacam-se os óleos essenciais, que são misturas complexas de constituintes químicos de origem vegetal que apresenta uma aplicabilidade como matéria-prima para a indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética. Vários estudos demonstram os efeitos dos óleos essenciais como agentes antifúngicos (SIMÕES et al., 2007).

Na indústria alimentícia, os óleos essenciais conferem aroma e sabor aos produtos, mas também podem ser usados como importantes antioxidantes e antifúngicos. Assim, para promover a conservação dos alimentos, a utilização dos óleos essenciais vem sendo estudada,

proporcionando o desenvolvimento de técnicas que procuram minimizar os efeitos negativos de oxidantes sintéticos, radicais e micro-organismos patogênicos.

A flora brasileira é bastante rica e diversificada, e muitas das espécies de plantas produtoras de óleos essenciais são pouco exploradas; o estudo das atividades biológicas e da toxicidade presentes nos óleos essenciais tornam-se ferramentas viáveis e instigantes para os pesquisadores. As espécies de *Lippia origanoides* Kunth. (Verbenaceae) e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (Asteraceae) são importantes fontes de constituintes biologicamente ativos que estão presentes em seus óleos essenciais.

Objetivou-se neste trabalho caracterizar os constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas de *Lippia origanoides* Kunth. e do cerne da madeira de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, avaliar a atividade fungicida, antiocrotogênica e antiaflatoxigênica e quantificar e caracterizar o ergosterol nas células de fungos toxigênicos testadas com os óleos essenciais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metabolismo primário e secundário

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde a antiguidade, buscando o alívio e ou a cura de doenças, por meio da ingestão de ervas e folhas. A utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa procede desde o desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental, merecendo destaque as culturas Egípcia, Greco-romana e Chinesa (JR; BOLZANI, 2006).

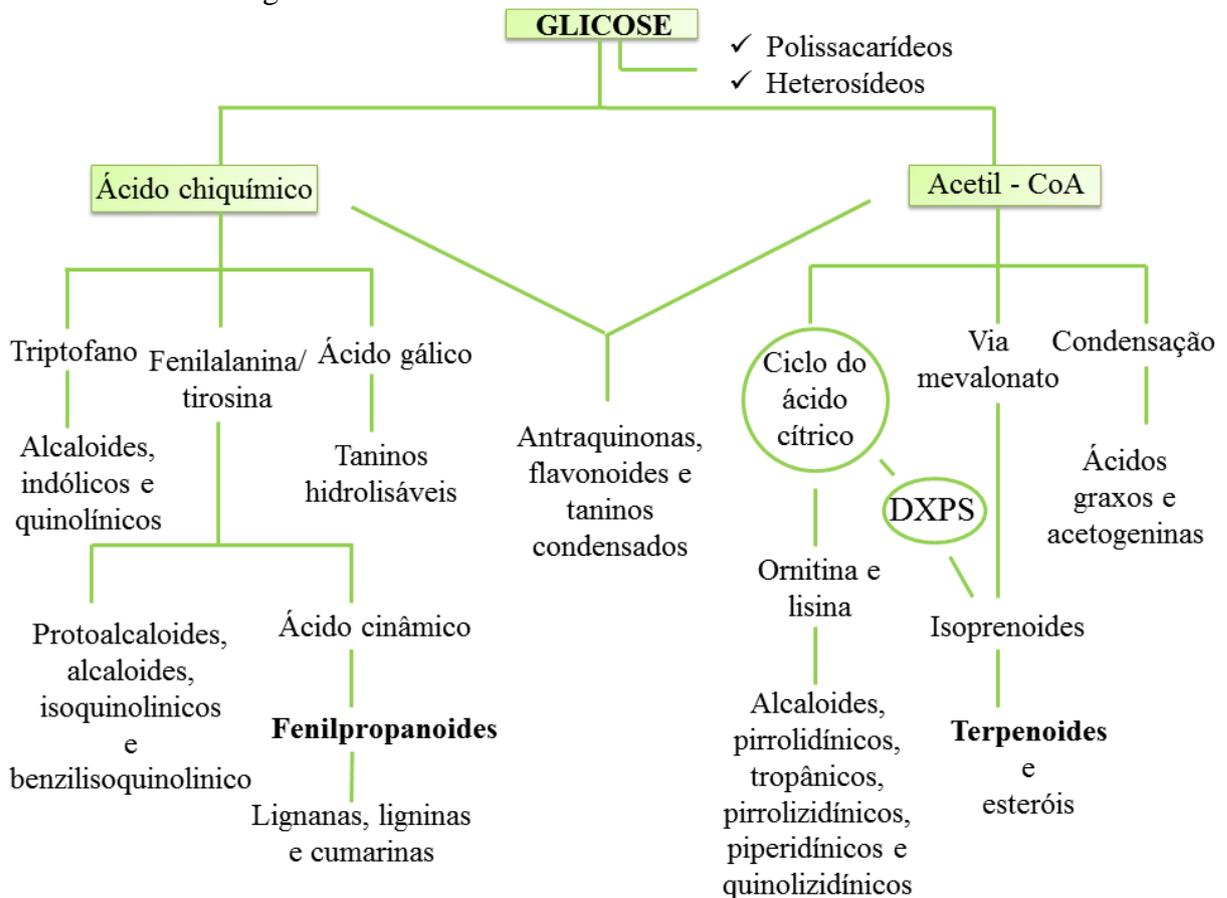
As necessidades da espécie humana são supridas principalmente pela diversidade da flora que constitui o planeta, pois permitem uma alimentação balanceada de produtos agrícolas distintos e com importância tanto para a manutenção da vida quanto para o comércio desses produtos.

Em geral, as plantas são fontes de vitaminas, carboidratos, lipídios, proteínas e outras micromoléculas e macromoléculas essenciais aos organismos, considerados metabólitos primários. A partir deles são formados os metabólitos secundários, que são definidos como uma larga escala de substâncias com função de proteção contra predadores e patógenos devido às suas propriedades biológicas contra micro-organismos ou repelência para os herbívoros. Alguns metabólitos também estão relacionados aos mecanismos de defesa abióticos, como o estresse (exposição à radiação UV-B, solo desprovido de nutrientes, irrigação deficiente entre outros

fatores) e são importantes na interação das plantas com outros organismos, como é o caso da polinização (SIMÕES et al., 2007).

Entre os metabólitos secundários, citam-se os alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais. Esses podem ser divididos em três grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados, sendo todos eles originados do metabolismo da glicose, a partir de dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetil-coA, conforme apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Rota biossintética dos metabólitos secundários.



Fonte: Adaptado de Simões et al. (2007).

O ácido chiquímico é precursor de cumarinas, alcaloides (derivados dos aminoácidos aromáticos), lignanas, ligninas e fenilpropanoides; compostos que possuem em comum a presença de um anel aromático na sua constituição; ao passo que os derivados do acetato são os aminoácidos alifáticos e os alcaloides derivados desses, terpenoides e esteroides (BRAZ-FILHO, 2010).

Os óleos essenciais podem ser formados via chiquimato ou acetato, são misturas complexas de compostos químicos de origem vegetal, voláteis, lipofílicos, geralmente

odoríferos e líquidos e raramente coloridos, variando em intensidade e composição, de acordo com a espécie, variabilidade genética e fatores ambientais. Podem ser sintetizados por todos os órgãos das plantas, entre eles, botões florais, flores, folhas, caule, galhos finos, sementes, frutos, raízes e cascas, e são estocados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. De acordo com a ISO (International Organization for Standardization), são definidos como “um produto obtido por destilação em água ou por arraste com vapor d’água, bem como produtos obtidos por expressão de pericarpos frutos cítricos” (BAKKALI et al., 2008; SIMÕES et al., 2007).

Possuem propriedades antissépticas, medicinais e aromáticas, e podem ser usados na conservação de alimentos e também como agentes antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, espasmolíticos e analgésicos locais. Na natureza, os óleos essenciais possuem um importante papel no sistema de defesa químico das plantas devido às interações com predadores (BAKKALI et al., 2008).

Também são chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, são princípios ativos presentes em plantas aromáticas. Apresentam insolubilidade ou pouca solubilidade em água e solubilidade em solventes apolares. Em geral, são instáveis na presença de luz, calor, umidade, oxigênio, substâncias oxidantes, redutoras e metais, sofrendo inúmeras reações de degradação (SOUZA et al., 2012).

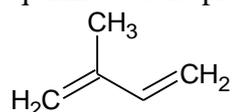
A estrutura química das moléculas dos óleos essenciais é composta basicamente por carbono, oxigênio e hidrogênio, sendo formados por uma mistura de diversas moléculas orgânicas, como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos sulfurados. Apesar da complexidade da composição, os constituintes dos óleos essenciais são formados por fenilpropanoides e terpenos. Os principais terpenos encontrados nos óleos essenciais podem ser divididos em monoterpenos e sesquiterpenos. Os fenilpropanoides são encontrados em menor quantidade e apresentam diferentes propriedades biológicas (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais podem conter de 20-60 componentes em diferentes concentrações entre eles, sendo geralmente caracterizados por dois ou três principais componentes possuindo concentrações bastante elevadas entre 20-70%, comparados aos outros componentes que estão presentes em quantidades mínimas. Esses compostos em maiores quantidades são denominados de constituintes majoritários. Na literatura, foram registradas várias pesquisas em que esses constituintes determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais, mas também há

relatos em que a ação do óleo essencial pode ser atribuída ao sinergismo dos vários componentes (BAKKALI et al., 2008).

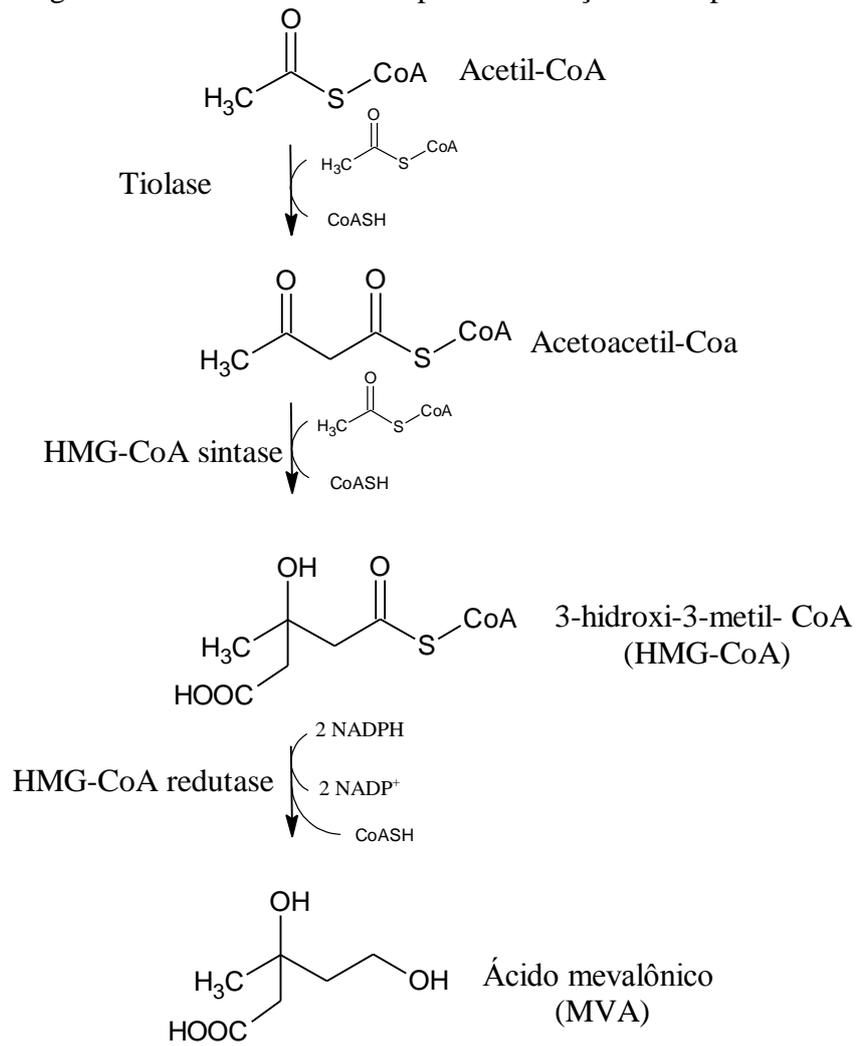
Os compostos terpênicos ocorrem em uma grande variedade de espécies vegetais e compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural. São biossintetizados a partir do isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP) (SIMÕES et al., 2007). Os terpenos são formados a partir de combinações de duas ou mais moléculas de 2-metil-1,3-butadieno, conhecido como isopreno (unidade de cinco átomos de carbono (C5)) (Figura 2) e são classificados pelo número de unidade isoprênica que possuem. Um monoterpene (C10) é constituído por duas unidades de isopreno, um sesquiterpene (C15) é constituído por três unidades de isopreno, um diterpene (C20) tem quatro unidades de isopreno, e assim por diante. As unidades de isopreno podem ser ligadas de forma a originar cadeias lineares ou moléculas cíclicas (SIMÕES et al., 2007).

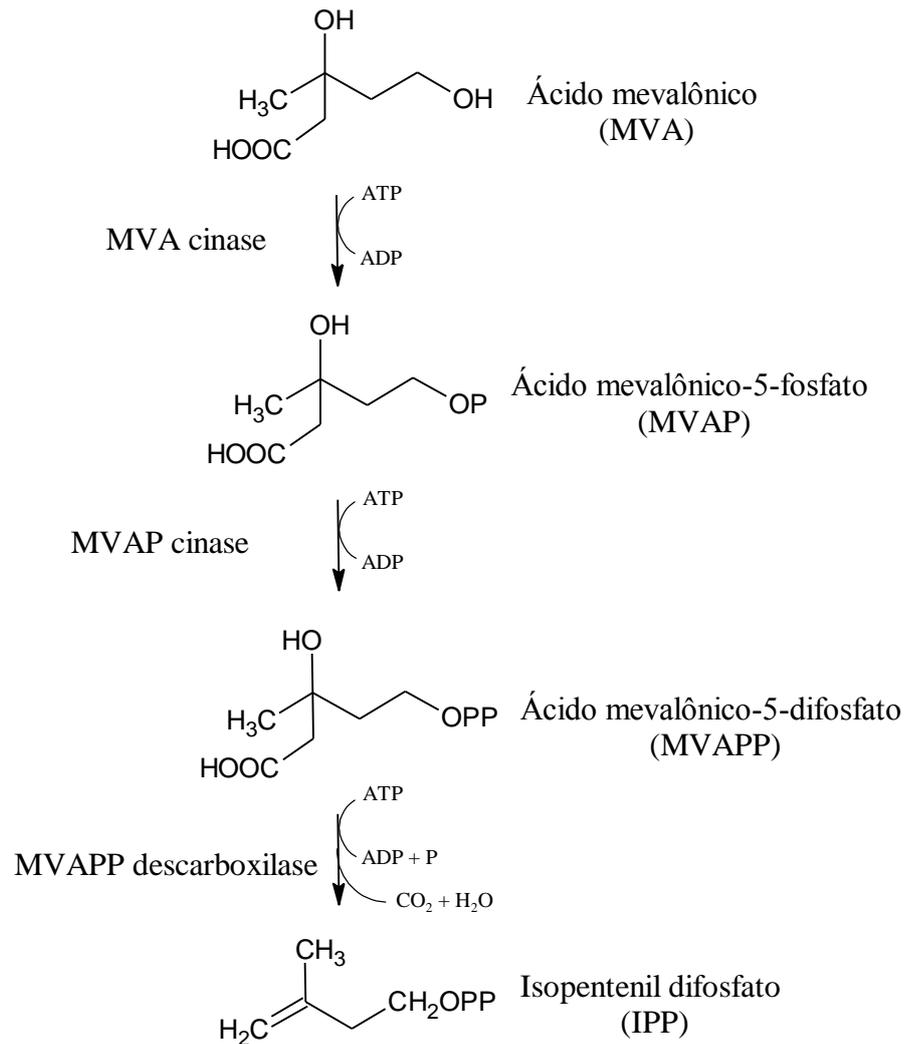
Figura 2 – Estrutura química do isopreno (unidade básica)



O IPP, precursor fundamental para a formação dos terpenos, é biossintetizado a partir de duas vias, a via do mevalonato, sendo ativa no citosol e no retículo endoplasmático e a via DXPS, ocorrendo nos plastídios. A rota do ácido mevalônico (Figura 3) envolve a condensação de três moléculas de acetil-CoA em dois passos, acetil-CoA catalisada por tiolase e hidroximetilglutaril-CoA sintase, resultando no 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que é subsequentemente reduzido por HMG-CoA redutase em duas reações acopladas obtendo o ácido mevalônico. Duas fosforilações sequenciais do ácido mevalônico dependem de ATP e uma subsequente fosforilação/des-carboxilação seguida por eliminação obtém-se então o IPP (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

Figura 3 – Via do mevalonato para a formação do isopentenil difosfato.

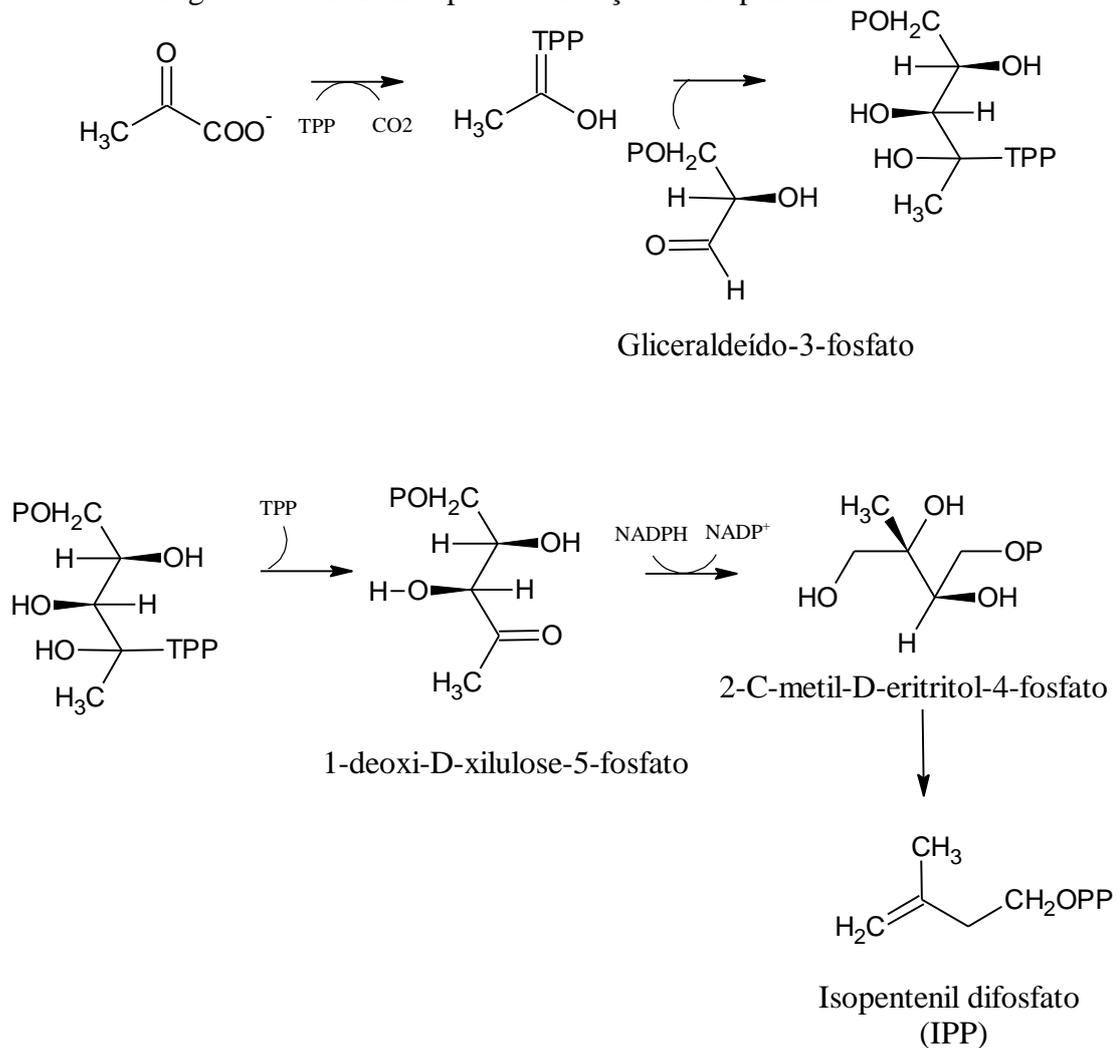




Fonte: Buchanan, Gruissem e Jones (2015).

Na rota biossintética para a formação do IPP pela via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS) (Figura 4), o piruvato reage com tiamina pirofosfato (TPP), dando origem a um fragmento de dois carbonos, hidroxietil-TPP, que se condensa com gliceraldeído 3- fosfato por transferências C2 da TPP catalisada pela transcetolase. TPP é liberado para formar um composto de cinco átomos de carbono intermediário, 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato, o qual é rearranjado e reduzido para formar 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato e, subsequentemente, transformado para se obter o IPP (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

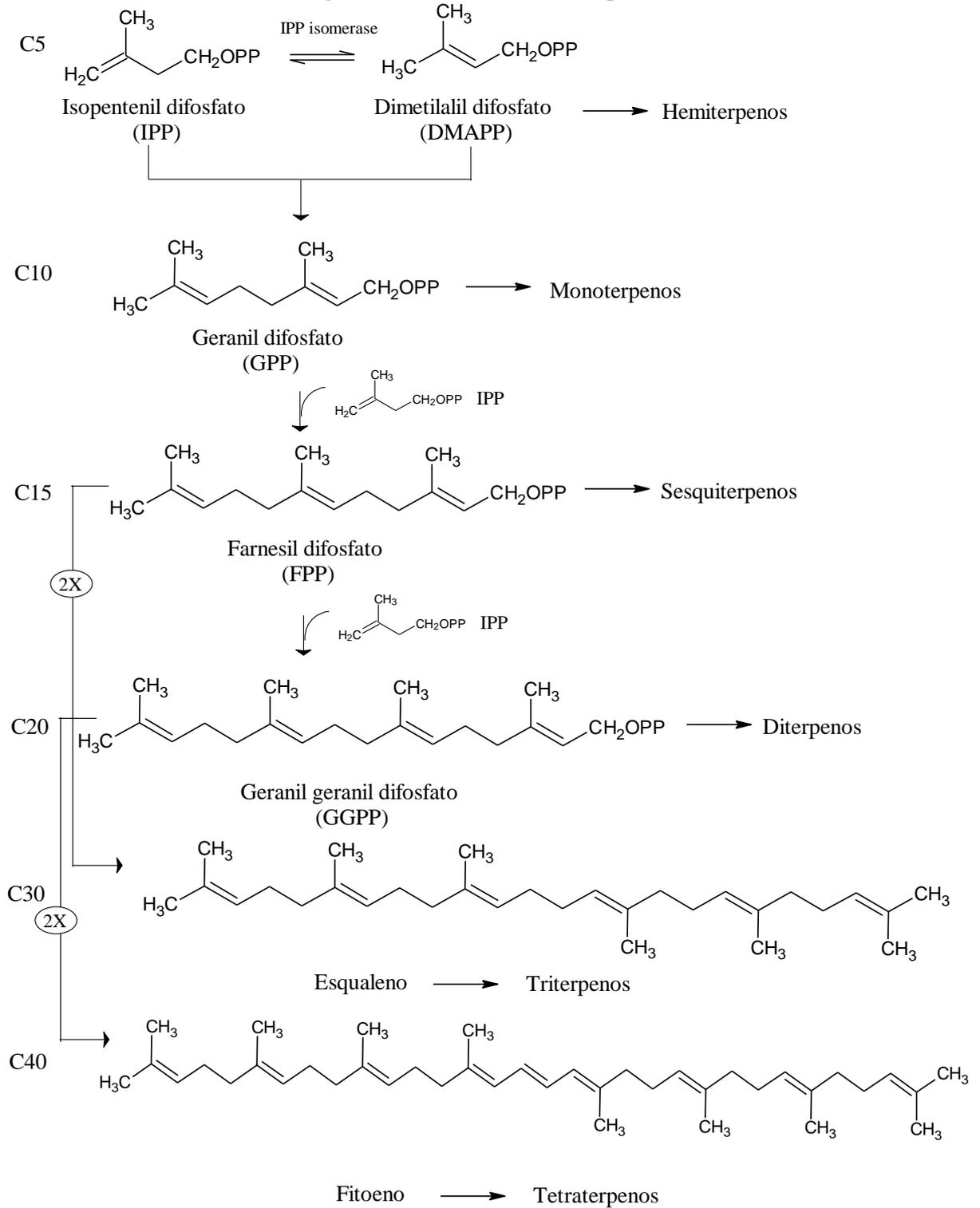
Figura 4 – Via DXPS para a formação do isopentenil difosfato.



Fonte: Buchanan, Gruissem e Jones (2015).

As diferentes classes de terpenos são formadas por adições repetitivas do isopentenil difosfato (Figura 5). O isopentenil difosfato e seu isômero, o dimetialil difosfato (DMAPP), são as unidades penta carbonadas ativas na biossíntese dos terpenos que se unem para formar moléculas maiores. Primeiro o IPP e o DMAPP reagem para formar o *trans*-geranildifosfato (GPP), uma molécula que possui 10 carbonos, onde são formados os monoterpênicos. O GPP pode se ligar a outra molécula de IPP, formando um composto de 15 carbonos, farnesil difosfato (FPP), precursor da maioria dos sesquiterpenos. A adição de outra molécula de IPP forma o geranyl geranyl difosfato (GGPP), composto que contém 20 carbonos precursores dos diterpenos. Assim, as moléculas de FPP e GGPP podem dimerizar para formar triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40), respectivamente (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

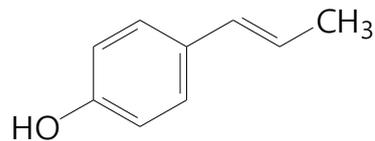
Figura 5 – Biossíntese dos terpenos



Fonte: Buchanan, Gruissem e Jones (2015).

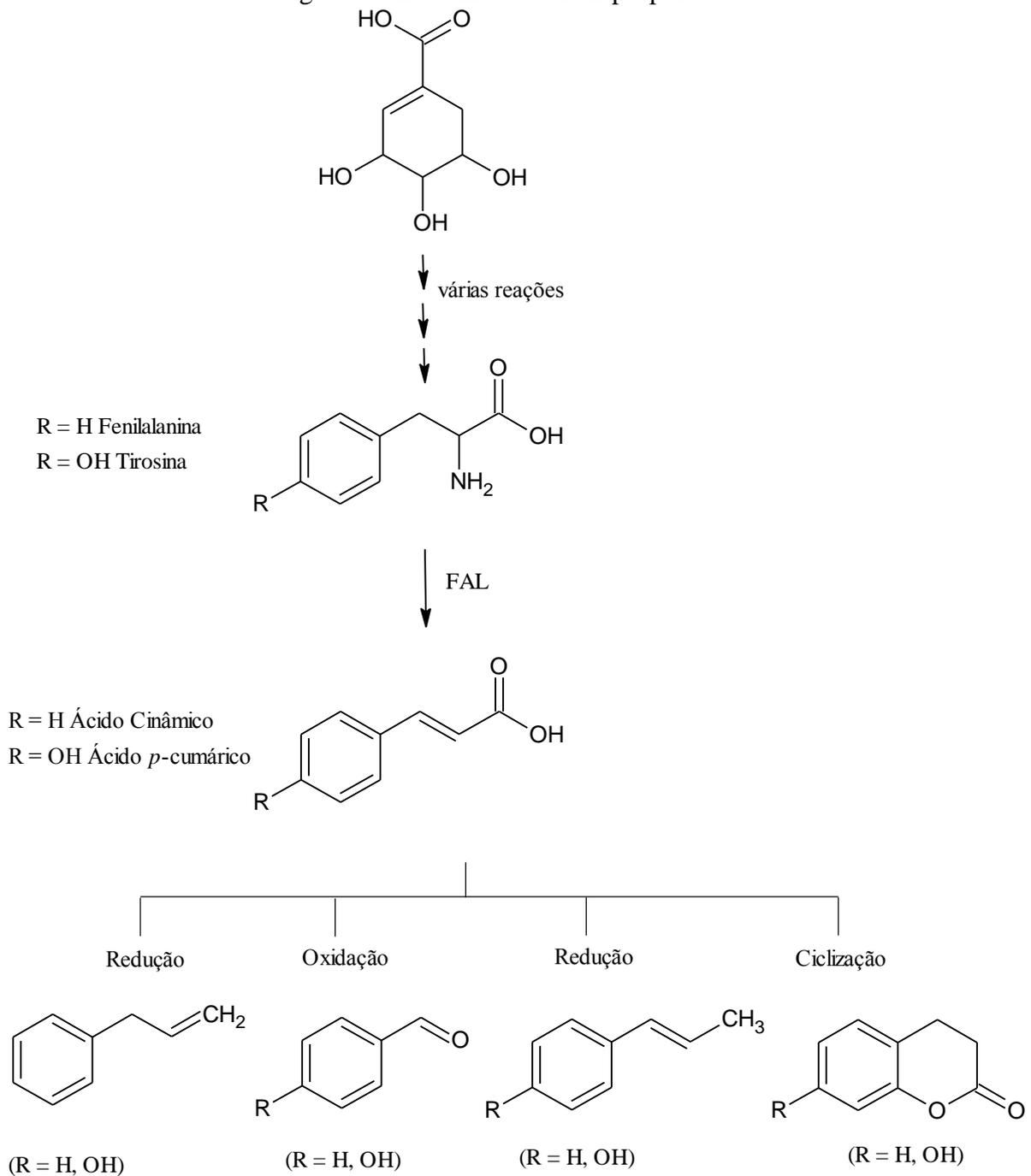
Os fenilpropanoides são substâncias naturais amplamente distribuídas nos vegetais e são caracterizados estruturalmente por apresentarem um anel benzênico unido a uma cadeia lateral de três carbonos, sendo derivados biossinteticamente do ácido chiquímico (Figura 6) (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

Figura 6 – Estrutura química de um fenilpropanoide.



O ácido chiquímico é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose, o fosfoenopiruvato e a eritrose-4-fosfato. Por meio da reação do ácido chiquímico e de uma molécula de fosfoenolpiruvato, ocorre a formação do ácido corísmico. Que é responsável por gerar aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina e a tirosina que, por sua vez, com a ação da enzima fenilalanina amonialiase (FAL), perde uma molécula de amônia, resultando na formação dos ácidos cinâmicos e p-cumárico (Figura 7). Por meio de redução enzimática, os ácidos cinâmicos e p-cumárico formam propenilbenzenos e/ou alilbenzenos, que por meio de reações de oxidação com degradação das cadeias laterais e ciclização, geram diversos compostos presentes nos óleos essenciais, entre eles os fenilpropanoides (SIMÕES et al., 2007).

Figura 7 – Biossíntese de fenilpropanoides.



Fonte: Simões et al. (2007).

2.2 *Lippia organoides* Kunth (Alecrim-d'Angola)

O gênero *Lippia* pertence à família Verbenaceae e compreende cerca de 240 espécies com diferentes hábitos como ervas, arbustos e pequenas árvores. Esse gênero é bastante atrativo no período de floração e apresenta um aroma forte, geralmente agradável. A espécie *Lippia organoides* Kunth. é encontrada na América do Sul, geralmente na Bolívia, Brasil, Guiana, Paraguai e norte da Argentina. São também encontradas em países da Mesoamérica como Costa

Rica, México e Venezuela. Essa espécie pode desenvolver em cerrado e regiões de caatinga, em solos rochosos, a 160-1800 metros de elevação (O'LEARY et al., 2012).

As espécies de *Lippia* são consideradas plantas aromáticas, empregadas na medicina popular para o tratamento de resfriados, gripes, bronquites, doenças gastrointestinais, respiratórias e tosses, e também utilizadas como tempero culinário. As folhas secas são vendidas no mercado e, na maioria das vezes, são empregadas na forma de infusão administradas oralmente ou através de emplastos, o mesmo se refere para as flores (O'LEARY et al., 2012).

Morfologicamente, *Lippia* é caracterizada por inflorescência em forma de capítulos, normalmente axilares, com flores de cálice bilobado e fruto seco separado em duas unidades (Figura 8). A espécie *Lippia origanoides* Kunth. é um arbusto ou pequena árvore até 3 metros de altura conhecida popularmente por alecrim-d'angola. É caracterizada por pubescência em órgãos vegetativos e reprodutivos, havendo relatos de tricomas não glandulares retos, rígidos e pontiagudos, e tricomas glandulares. Apresenta inflorescência frondosa, livre e com brácteas apicais (O'LEARY et al., 2012; VICUÑA; STANSHENCO; FUENTES, 2010).

Vários estudos provaram que os óleos essenciais de várias espécies de *Lippia* apresentam potenciais antibacterianos, analgésicos, antivirais, antioxidante, acaricida, antimaláricos, sedativos, hipotensivos e atividades anti-inflamatórias. Estas atividades biológicas dependem de sua composição química, que pode diversificar de uma espécie para outra. Os principais constituintes voláteis frequentemente encontrados são o timol, carvacrol, 1,8-cineol, limoneno, p-cimeno, linalol, α -pineno e β -cariofileno (GOMES et al., 2012; VERAS et al., 2013).

Estudos de Stashenco et al. (2010) indicam que a espécie de *Lippia origanoides* Kunth. apresenta três quimiotipos registrados na Amazônia brasileira e colombiana e apresentam como constituintes majoritários o carvacrol, p-cimeno, γ -terpineno, trans- β -cariofileno, timol, α - e β -falandreno, limoneno, 1,8-cineol, α -humuleno, oxido cariofileno, α - e β -eudesmol, dados que corroboram com os estudos de Teixeira et al., (2014). Neste, os autores extraíram e caracterizaram o óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth. coletado na região de Lavras, MG, Brasil. Encontraram como constituintes majoritários o carvacrol, p-cimeno e γ -terpineno.

Figura 8 – Aspecto geral da espécie *Lippia origanoides* Kunth.



Fonte: Do autor (2017).

2.3 *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (Candeia)

O gênero *Eremanthus* pertence à família Asteraceae, composto por 18 espécies, sendo a espécie *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish considerada uma das espécies que apresentam maior interesse econômico. Essa espécie ocorre em altitudes de 900 a 1700 metros, colonizam campos abertos e áreas desmatadas, exigente de luz, heliófila, tem ampla distribuição geográfica, com sementes pequenas e abundantes (SCOLFORO et al., 2016).

A espécie *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish, conhecida vulgarmente como candeia, apresenta uma gama atividade de usos econômicos, porém sua madeira é mais utilizada como moirão de cerca, pela sua durabilidade, e para a produção de óleo essencial, cuja principal componente, o α -bisabolol, possui propriedades antiflogísticas, antibacterianas, antimicóticas, dermatológicas e espasmódicas, além de propriedades farmacológicas, utilizando principalmente na indústria farmacêutica e de cosméticos para a produção de pomadas, géis, loções, cicatrizantes e hidratantes (SCOLFORO et al., 2016).

É uma espécie endêmica do Brasil, encontra-se na Mata Atlântica e no Cerrado, nos estados da Região Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro) e na região do centro-oeste, no estado de Goiás e no Distrito Federal. Em Minas Gerais, atingindo uma ampla faixa que vai do nordeste ao sul do estado e segue em sentido oeste (LOEUILLE, 2016).

A espécie apresenta árvores pequenas, com altura que pode atingir até 6 metros, folhas com características alternas ou fasciculadas, papiráceas a coriáceas, inteiras, oblongo-elípticas a ovaladas, de ápice abtusado ou acuminado. Na face abaxial são observados tricomas tectores do tipo ramificado em profusão, o que justifica o aspecto esbranquiçado das folhas a olho nu devido à reflexão da luz. As flores são hermafroditas e se apresentam em inflorescências de cor púrpura nas extremidades dos ramos (Figura 9). As características das folhas e de inflorescência facilitam a identificação da espécie mesmo a distância (DUTRA et al., 2010).

Figura 9 – Aspecto geral da espécie *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish



Fonte: Do autor (2017).

2.4 Fungos

Os fungos são micro-organismos que se encontram no solo, na água, nos vegetais, no ar, nos animais e em resíduos em geral. São eucarióticos, heterotróficos e possuem parede celular. Quando apresentam apenas um núcleo, são considerados leveduras, e se apresentam vários, são fungos filamentosos e formam micélios. Os fungos podem ter morfologia diferente de acordo com as condições de temperatura e nutrientes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são considerados anamorfos de ascomicetos pertencentes ao Reino *Fungi*, divisão *Ascomycota*, ordem *Eurotiales* e família *Trichocomaceae*.

São encontrados em regiões de clima quente e suportam baixa atividade água (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

A contaminação e a deterioração dos alimentos causados por fungos são mais evidenciadas do que aquelas originadas por qualquer outro grupo de micro-organismos. O controle da contaminação por fungos é importante não apenas no que está relacionado com a qualidade dos alimentos, mas também pelo perigo à saúde humana, pois alguns fungos são capazes de produzir substâncias tóxicas denominadas micotoxinas, que são altamente nocivas à saúde do homem (FILHO; CALDAS; MURATORI, 2015).

Entre os vários patógenos fúngicos, uma das principais espécies, de conhecida capacidade de produzir micotoxinas, pertence ao gênero *Aspergillus*. São fungos que, geralmente, contaminam os produtos agrícolas no campo durante o transporte e armazenagem, sendo suas micotoxinas responsáveis por doenças em animais e humanos e quando ingeridas, podem resultar em doenças crônicas e agudas (MILICEVIC; SKRINJAR; BALTIC 2010).

Os produtos sintéticos são muito comercializados no intuito de diminuir os danos provocados por micro-organismos tanto na qualidade do produto, quanto para a saúde humana, contudo tem-se tornado alvo de crítica e desconfiança por parte da população, pois estudos vêm demonstrando que esses produtos podem deixar alguns micro-organismos resistentes e também podem causar alguns problemas à saúde se utilizados de maneira incorreta e em concentrações elevadas (DJENANE et al., 2012). Assim, avanços com a intenção de explorar novos biocidas de características naturais bem como o desenvolvimento dos processos têm se mostrado promissores quando combinados, aprimorando a eficácia dos biocidas (SINGH; SINGH, 2012).

Para evitar os danos causados pelos fungos e o uso intensivo de fungicidas químicos sintéticos, a utilização de produtos naturais se constitui em uma alternativa em relação ao tratamento tradicional, principalmente em razão de não deixarem substâncias tóxicas ao homem nos alimentos tratados.

Nesse contexto, diferentes pesquisas vêm sendo realizadas em relação aos mecanismos de ação dos óleos essenciais e seus efeitos sobre o organismo humano, tendo em vista sua complexa constituição. O desenvolvimento de novos produtos à base de substâncias naturais com ação seletiva contra micro-organismos tem-se tornado alvo dos pesquisadores (DJENANE et al., 2012).

2.4.1 *Aspergillus carbonarius*

A espécie *Aspergillus carbonarius* pertencente ao gênero *Aspergillus*, seção *Nigri*, apresenta como característica conídeos pretos e/ou marrom-escuros, paredes rugosas, estipes longas e largas. A germinação dessa espécie é muito rápida e ocorre em um período de 24 horas a uma temperatura entre 10-37 °C. A temperatura ótima para o crescimento é de 32-35 °C, com temperatura mínima de 10 °C e máxima de 42 °C (IOANNIDS et al., 2015).

Aspergillus carbonarius pode ser encontrado em diversos produtos vegetais, como os cereais, café, cacau, especiarias, frutos secos, amendoim e uva. A principal micotoxina relacionada às cepas pertencentes a essa espécie é a ocratoxina A, produzida na maioria das vezes em altas concentrações. Essa espécie vem sendo considerada a principal fonte de contaminação de ocratoxina A em uvas e vinhos (OLIVEIRA; OLIVEIRA; MENEGHELLO, 2013).

Andrade et al. (2015), estudando os óleos essenciais *Cinnamodendron dinisii* (pimenteira) e *Siparuna guianensis* (negramina), observaram que ambos os óleos essenciais foram ativos contra o fungo filamento *Aspergillus carbonarius*. O fungo apresentou mais resistência ao óleo essencial de pimenteira, sendo que as concentrações mínimas inibitórias foram de 125 e 250 µg mL⁻¹ para os óleos essenciais de negramina e pimenteira, respectivamente.

Kocic-Tanackov et al. (2016), utilizando o óleo essencial de *Allium cepa* L. (cebola), observaram que o óleo apresentou atividade antifúngica significativa frente à espécie de *Aspergillus carbonarius* a partir da concentração de 14 µL 100 mL⁻¹ (MIC). Sugerem que o óleo essencial de cebola pode ser utilizado para a proteção de alimentos contra o crescimento desse fungo.

2.4.2 *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus é uma espécie que pertence ao gênero *Aspergillus*, seção *Flavi*, podendo ser encontrada em vários alimentos, entre eles, nozes, amendoim, temperos, sementes oleaginosas, milho, sementes de algodão, cereais e às vezes em frutas secas. Esse fungo cresce em uma temperatura entre 7 a 42 °C, sendo sua temperatura ótima de crescimento de 25 °C (MOTTA et al., 2015).

A espécie de *Aspergillus flavus* é capaz de produzir micotoxinas potentes, como as aflatoxinas B1 e B2. Essas micotoxinas são consideradas o segundo maior causador de

aspergilose invasiva e não invasiva, além de apresentarem efeitos carcinogênicos e tóxicos que podem provocar em animais e seres humanos (ROCHA et al., 2014). Esses metabólitos secundários, como a aflatoxina, além de alterarem as condições físicas dos produtos, reduzem o valor nutritivo, alteram também o aspecto externo e favorecem a ação de outros agentes de deterioração, como leveduras, bactérias e insetos.

Pimentel et al. (2010), estudando a ação antifúngica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum (cipó-carimbó) frente ao fungo *Aspergillus flavus*, verificaram que com cinco e dez dias de incubação, houve uma redução do crescimento micelial com o aumento da concentração do óleo essencial.

Andrade et al. (2015), estudando os óleos essenciais *Cinnamodendron dinisii* (pimenteira) e *Siparuna guianensis* (negramina), observaram-se que ambos os óleos essenciais foram ativos contra o fungo filamento *Aspergillus flavus*. O óleo essencial de negramina foi mais eficiente frente ao fungo estudado, apresentando uma concentração mínima inibitória de apenas 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o óleo essencial de pimenteira foi ativo em uma concentração de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.4.3 *Aspergillus ochraceus*

A espécie *Aspergillus ochraceus*, pertencente ao gênero *Aspergillus*, seção Circundati, pode ser encontrada em vários alimentos, entre eles, arroz, trigo, aveia, cevada, vinho, cereais, café e bebida. A principal micotoxina relacionada às cepas pertencentes a essa espécie é a Ocratoxina A. É considerada a principal fonte de contaminação de OTA em café (REZENDE et al., 2013).

Esse fungo cresce a uma temperatura entre 8 a 37°C, sendo sua temperatura ótima de crescimento de 31°C. *A. ochraceus* pode causar sintomas alérgicos crônicos como rinite e aspergilose pulmonar (HASHIMOTO et al., 2012).

Hua et al. (2014) avaliaram o efeito de óleos essenciais de canela (85% de cinamaldeído), *Litsea citrate* (verbena-tropical) (85% citral), eucalipto (80% cineol), hortelã-pimenta (50% mentol) e cânfora (55% borneol) e os padrões cinamaldeído (95% e 99%), citral (96%) e eugenol (99%) sobre o crescimento micelial de *Aspergillus ochraceus* e na produção de OTA, concluindo que os compostos cinamaldeído, citral e eugenol podem ser utilizados no biocontrole da contaminação por micotoxinas no armazenamento de grãos.

2.5 Micotoxinas

As toxinas produzidas por fungos filamentosos são chamadas de micotoxinas. Este termo é geralmente utilizado exclusivamente para fungos que estão associados aos produtos alimentícios e as rações para animais. As micotoxinas são moléculas orgânicas produzidas como metabólitos secundários dos fungos, sem função aparente em seus metabolismos. São produzidas principalmente quando os fungos atingem a maturidade, sendo tóxicas para animais e seres humanos. Estudos têm revelado a existência de pelo menos cerca de 400 micotoxinas diferentes (ROCHA et al., 2014; RUYCK et al., 2015).

As micotoxinas geralmente ocorrem em derivados de alimentos para humanos e animais e podem aparecer no campo antes da colheita, pós-colheita ou durante o processamento e armazenamento, afetando negativamente a qualidade do alimento (ANDRADE; LANÇAS, 2015).

As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar humana pela contaminação direta ou indireta. A contaminação direta ocorre quando há o consumo de alimento infectado por um fungo toxigênico, com a subsequente formação das micotoxinas, como o consumo de cereais, oleaginosas e derivados contaminados. Os animais se alimentam com rações previamente contaminadas, podendo excretar micotoxinas no leite e seus derivados, carne e ovos e, conseqüentemente, considerados como fonte de contaminação indireta para os humanos. Sabe-se que a maioria dos alimentos destinados ao homem e ao animal pode permitir o crescimento e o desenvolvimento de fungos toxigênicos durante as etapas de produção, processamento, transporte e armazenamento, sendo que 25% dos grãos produzidos no mundo são contaminados por fungos. A ingestão de micotoxinas por seres humanos ocorre principalmente através do consumo de produtos vegetais contaminados, bem como através de produtos como leite, carne e seus derivados (ROCHA et al., 2014).

Micotoxicose é o termo usado para a intoxicação associado com exposições às micotoxinas. Os sintomas da micototoxicose dependem do tipo de micotoxina, da concentração e da duração da exposição, bem como da idade, saúde e sexo do indivíduo exposto. Como todas as síndromes toxicológicas, as micototoxicoses podem ser classificadas como agudas ou crônicas. A toxicidade aguda geralmente tem um início rápido e uma resposta tóxica óbvia, ao passo que a toxicidade crônica é caracterizada por exposição a baixas doses durante um longo período de tempo, resultando em cânceres e outros efeitos geralmente irreversíveis (RUYCK et al., 2015).

A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Câncer – IARC) criou um programa que analisa a evidência de câncer a partir de diversos

agentes biológicos, químicos e físicos. Assim, algumas micotoxinas foram divididas em grupos de acordo com o processo de carcinogênese gerado (Quadro 1).

Quadro 1 – Classificação das micotoxinas.

Classificação	Micotoxinas
Carcinógenos do grupo 1	Aflatoxinas
Carcinógenos do grupo 2B	Fumonisina Ocratoxina
Carcinógenos do grupo 3	Tricoteceno Zearalenona Patulina

Legenda: Grupo 1: cancerígeno para o homem; Grupo 2B: Possivelmente carcinogênico para o homem; Grupo 3: Não classificável quanto a sua carcinogenicidade em seres humanos

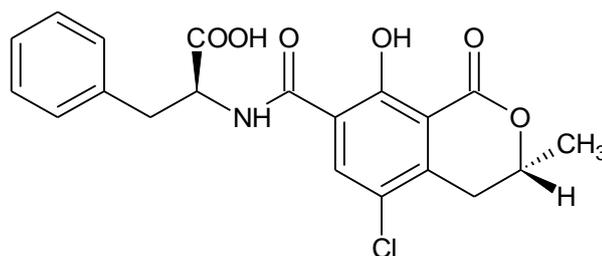
Fonte: Iarc (1993).

De acordo com a IARC, a classificação do grupo 1 é utilizada quando existe evidência suficiente de que a substância é carcinogênica para seres humanos. A classificação do grupo 2B é utilizada para agentes que apresentam evidências limitadas de carcinogenicidade em seres humanos, mas evidência suficiente em animais experimentais. O grupo 3 é mais utilizado para substâncias de exposição que apresenta evidência de carcinogenicidade inadequada em humanos e inadequada ou limitada em animais experimentais.

2.5.1 Ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA) ou 7-(L-β-fenilalanilcarbonil)-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3R-metilisocumarina (Figura 10) é uma micotoxina que contamina os produtos alimentícios. Foi descoberta em 1965 como um metabólito secundário da espécie *Aspergillus ochraceus*, por um estudo que visava à identificação de novas moléculas de micotoxinas (MERWE et al., 1965). Alguns fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente as espécies *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. alliaceus*, *A. auricomus* e raramente o *A. niger* são produtores de ocratoxina A.

Figura 10 – Estrutura química da Ocratoxina A.



A OTA pode ser encontrada em diversos alimentos, na cevada, aveia, centeio, trigo, grãos de café, nozes, amendoim seco, feijão, temperos e frutas secas. Há também a preocupação de contaminação de vinhos por ocratoxina, especialmente os provenientes de uvas contaminadas por *A. carbonarius* e *A. niger* (PEREIRA; SANTOS, 2011)

Estudos realizados na União Europeia entre os anos de 1999 e 2000 indicam que a contaminação por OTA foi de 48% das amostras analisadas, sendo que os alimentos com maior grau de contaminação e que contribuíram a exposição a OTA na Europa estão apresentados no Quadro 2 (NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2006).

Quadro 2 – Ocratoxina A em diferentes gêneros alimentícios

Cereais e produtos a base de cereais	50%
Vinho	13%
Especiarias	8%
Cerveja	5%
Cacau	4%
Frutas secas	3%
Carnes	1%

Fonte: Nogueira e Oliveira (2006).

O principal efeito que a exposição por ingestão de OTA pode causar é o desenvolvimento de doenças nos rins, que é considerado um fator contribuinte para uma doença crônica, em que os rins são diminuídos de tamanho e peso, com difusa fibrose e tumores no trato urinário (IARC, 1993).

Vários estudos demonstram que a OTA causa câncer no fígado, rins, nas glândulas mamárias e testículos em animais. Apresenta propriedades nefrotóxicas, afetando várias áreas do sistema nervoso, teratogênica e imunotóxica, o que representa um sério risco para a saúde humana e animal. Krüger et al. (2015) analisaram 87 amostras de soro sanguíneo de suínos e seus respectivos rins e fígados. Foi detectada ocratoxina A em quatro amostras (4,6%), sendo que as outras amostras apresentaram níveis inferiores ao limite de quantificação. Dos quatro animais com níveis quantificáveis de OTA no soro sanguíneo, dois apresentaram infiltrados inflamatórios nos rins e no fígado. Nos 83 animais que não apresentaram níveis de OTA detectáveis, 60 apresentaram alguma lesão, sendo que 45 apenas nos rins, 6 apenas no fígado e 9 nos dois órgãos. Os casos de nefropatia suína por micotoxinas podem ser identificadas por degeneração e atrofia tubular, fibrose periglomerular e intersticial, descamação e necrose das células epiteliais dos túbulos contornados proximais.

Vários países têm estabelecido níveis máximos para a OTA presentes em alimentos, incluindo Brasil, Israel, Suíça, Uruguai e União Europeia. 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 OTA em alimentos, descritos no Quadro 3.

Quadro 3 – Limites máximos ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) de Ocratoxina A em alguns alimentos estabelecidos no Brasil.

Fungos	Alimentos	Ocratoxina A ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada	10
	Feijão	10
	Especiarias	10
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	2
<i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	Grão de café e café torrado	10
	Café solúvel	10
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Amêndoa de cacau	10
<i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Aspergillus niger</i>	Vinho e suco de uva	2
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Frutas secas e desidratadas	10

Fonte: Anvisa (2011).

Lappa et al., 2017 estudaram os óleos essenciais de *Eugenia Cariophyllus* (óleo de cravo, 87% de eugenol), *Citrus reticulata* (mandarina, 89% de limoneno), *Cinnanomum cassia* (canela, 78% de e-cinamaldeído) e *Cymbopogon citratus* (capim-limão, 45% geranial, 25% neral) no controle de fungos e na produção de ocratoxina A. Observaram que os óleos estudados apresentaram uma redução de OTA entre 72 a 97% em diferentes isolados da espécie *A. carbonarius*. Conclui que os óleos essenciais poderiam se tornar atraentes antifúngicos contra o risco de OTA, uma vez que a inibição do crescimento fúngico em algumas concentrações desses OEs podem resultar na prevenção de micotoxinas.

2.5.2 Aflatoxinas

As aflatoxinas foram isoladas e caracterizadas, após a morte de muitos perus na Inglaterra, que foi atribuída à ingestão de farelo de amendoim contaminado com bolor. As principais aflatoxinas são as B1 (AFB1) (Figura 11) e B2 (AFB2) (Figura 12), G1 (AFG1) e G2 (AFG2), que apresentam fluorescência azul-violeta e fluorescência azul-esverdeada, respectivamente, quando analisadas em cromatografia de camada delgada à luz ultravioleta a 365 nm (IAMANAKA, OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010). As aflatoxinas têm propriedades tóxicas, carcinogênicas e imunossupressoras, induzindo infecções nas pessoas que são contaminadas. Pessoas que são cronicamente infectadas com hepatite B (VHB), quando

expostas às aflatoxinas aumentam o risco de câncer no fígado. As doenças causadas pela exposição às aflatoxinas são chamadas de aflatoxicoses, sendo que a aguda resulta em morte e a crônica em câncer, supressão imunológica e outras condições patológicas mais lentas. O fígado é o principal órgão-alvo, com dano hepático quando aves, peixes e roedores ingerem alimentos contaminados por AFB1. A suscetibilidade relativa de várias espécies de animais à aflatoxina depende da idade, sexo, peso, dieta e exposição a agentes infecciosos. A aflatoxina B1 é a mais tóxica entre elas, causando efeitos diversos e, em alguns casos, podem ser letais para seres humanos e animais (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

Figura 11 – Estrutura química da Aflatoxina B1.

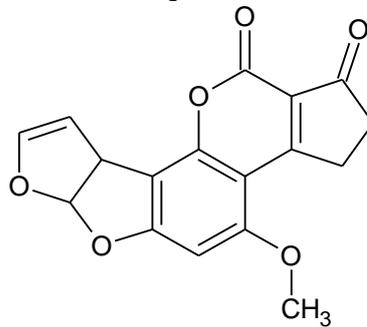
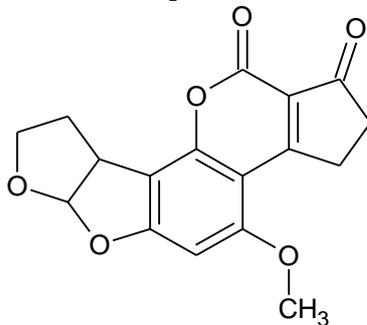


Figura 12 – Estrutura química da Aflatoxina B2.



As aflatoxinas podem ser encontradas em diferentes alimentos, como cereais, sementes oleaginosas, especiarias, figos, ração animal, milho, algodão. Imamura et al. (2014), analisando um total de 966 amostras de amendoim cru, detectaram a presença de aflatoxinas em 169 amostras. A faixa de contaminação por essa toxina foi de 21-260 $\mu\text{g Kg}^{-1}$.

Essas aflatoxinas são produzidas pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, *Aspergillus bombycis*, sendo que o primeiro fungo produz apenas as aflatoxinas B1 e B2 (ROCHA et al., 2014).

No Brasil, a Anvisa determinou por meio da Resolução RDC n°7, de 18 de fevereiro de 2011, os níveis de aflatoxinas em alimentos. Descritos no Quadro 4.

Quadro 4 – Limites máximos ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) de aflatoxinas em alguns alimentos estabelecidos no Brasil.

Fungos	Alimentos	Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)
<i>Aspergillus flavus</i>	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	5
	Feijão	5
	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	10
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1
	Especiarias	20
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus nomius</i>	Frutas desidratadas e secas	10
	Castanha-do-brasil com casca para consumo direto	20
	Castanha-do-brasil sem casca para consumo direto	10
	Castanha-do-brasil sem casca para processamento posterior	15
	Amêndoas de cacau	10
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20	

Fonte: Anvisa (2011).

Medeiros et al. (2011), pesquisando o óleo essencial *Pittosporum undulatum* (árvore do incenso), encontraram como constituintes majoritários a 2-heptanona (25,64%), heptan-1-ol (19,92%) e 3-metil-4-heptanona (17,47%). Observaram que todas as concentrações do óleo reduziram significativamente o crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* em 50,5%; 70,46% e 97,4% nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente. Esse óleo essencial também mostrou que todas as concentrações testadas inibiram completamente a produção de aflatoxinas.

2.6 Ergosterol

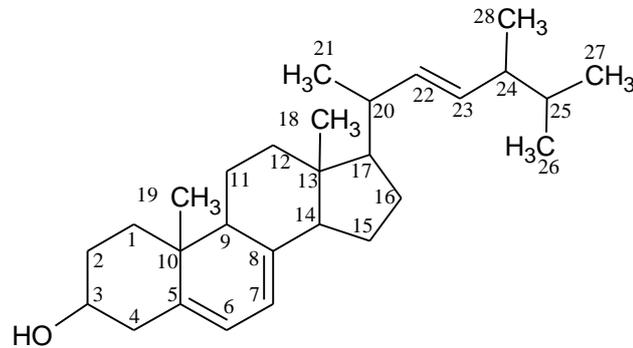
Os esteróis são os principais componentes da membrana plasmática que separa o citoplasma do ambiente, agindo como moduladores de estado físico em massa e integridade. Cada organismo apresenta seus próprios esteróis que são biossintetizados naturalmente, sendo que cada célula tem um sistema de reconhecimento de acordo com os efeitos biológicos. Embora outros lipídios da membrana também apresentam um papel na definição dessas propriedades, as células eucarióticas são incapazes de manter a viabilidade sem esteróis (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

O principal esterol que está presente nas células ou membranas miceliais de várias espécies de fungos é o ergosterol. Os maiores níveis desse composto encontram-se na bicamada fosfolipoproteica da membrana fúngica, onde o ergosterol desempenha uma importante função em relação à manutenção de um crescimento normal e o desenvolvimento fisiológico da célula fúngica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

O ergosterol está presente em duas formas, como ergosterol livre e ergosterol esterificado, sendo que a quantidade relativa de cada forma é diferente entre as várias espécies de fungos. Tanto um quanto outro desempenham funções diferentes. O primeiro é mais importante para a integridade das células e contribui para uma variedade de funções celulares. Já os ésteres do ergosterol, captado pelas partículas lipídicas e citosólicas, constituem uma forma de armazenamento inerte de esteróis e podem servir de intermediários para o fornecimento de ergosterol (YUAN et al., 2007).

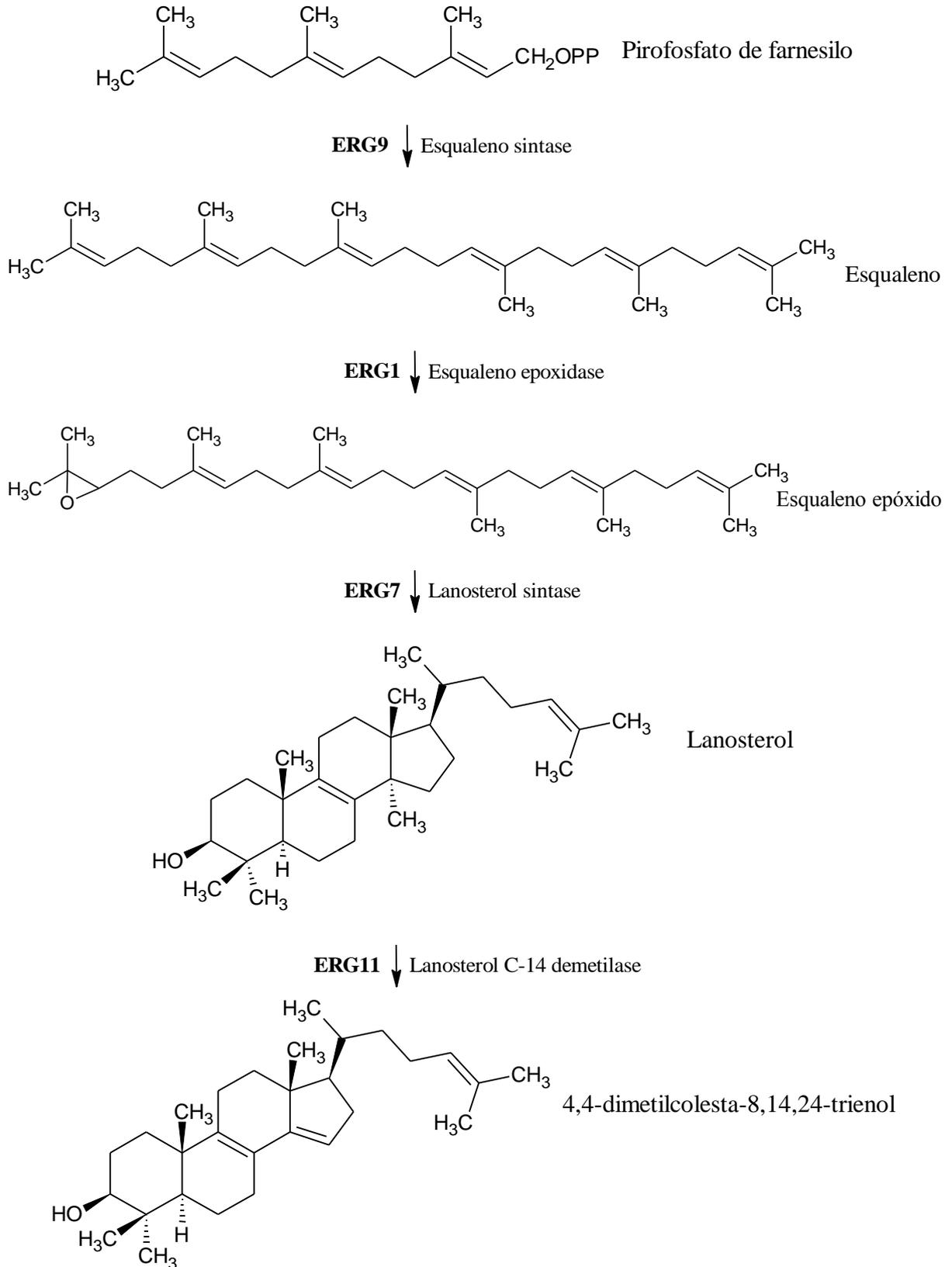
O ergosterol (Figura 13) possui uma cadeia lateral com uma dupla ligação em C22 e duas ligações duplas nas posições C5 e C7, sendo responsáveis pelo máximo de absorção no UV entre 300 a 240 nm. Vários métodos são relatados para a determinação do ergosterol. A maioria deles é baseada na sua absorção de UV específica com um máximo a 282 nm, provenientes da ligação dupla nas posições 5 e 7 (VARGA; BARTÓK; MESTERHÁZY, 2006).

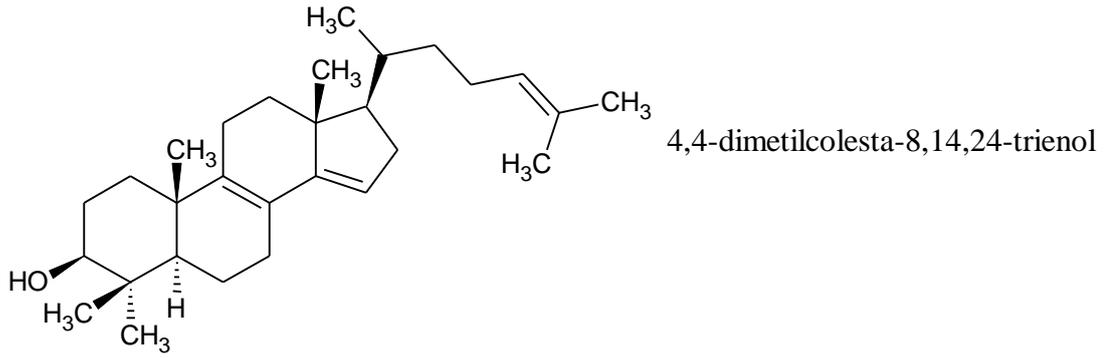
Figura 13 – Estrutura química do ergosterol.



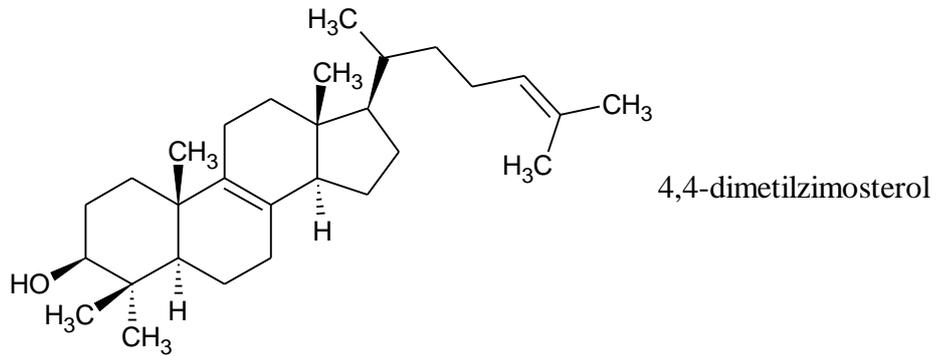
O principal intermediário para a biossíntese de ergosterol é o Acetil- CoA, sendo que os esteróis são produzidos pela via do ácido mevalônico condensado a unidades de isopreno, essas, por sua vez, vão unindo-se até a formação do farnesil pirofosfato, que sofre ciclização e substituições por meio de 11 etapas (Figura 14) (DAUM et al., 1998).

Figura 14 –Via de biossíntese de ergosterol a partir de fanesil pirofosfato





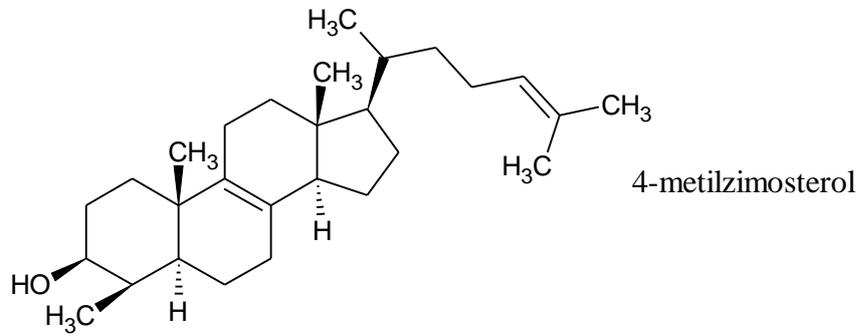
ERG24 ↓ Esterol C-14 redutase



ERG25 ↓ Esterol C-4 metiloxidase

ERG26 ↓ Esterol C-3 desidrogenase (C-4 descarboxilase)

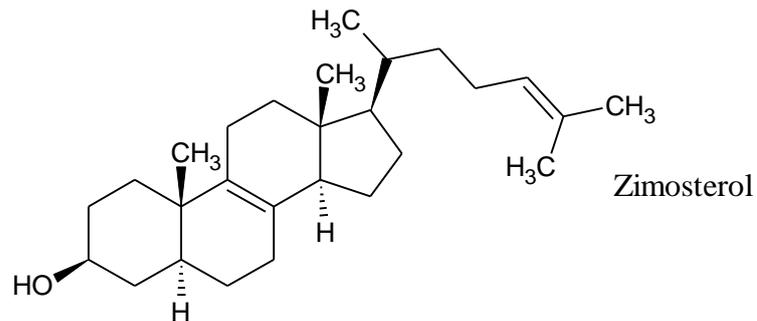
ERG? ↓ Esterol C-3 ceto redutase

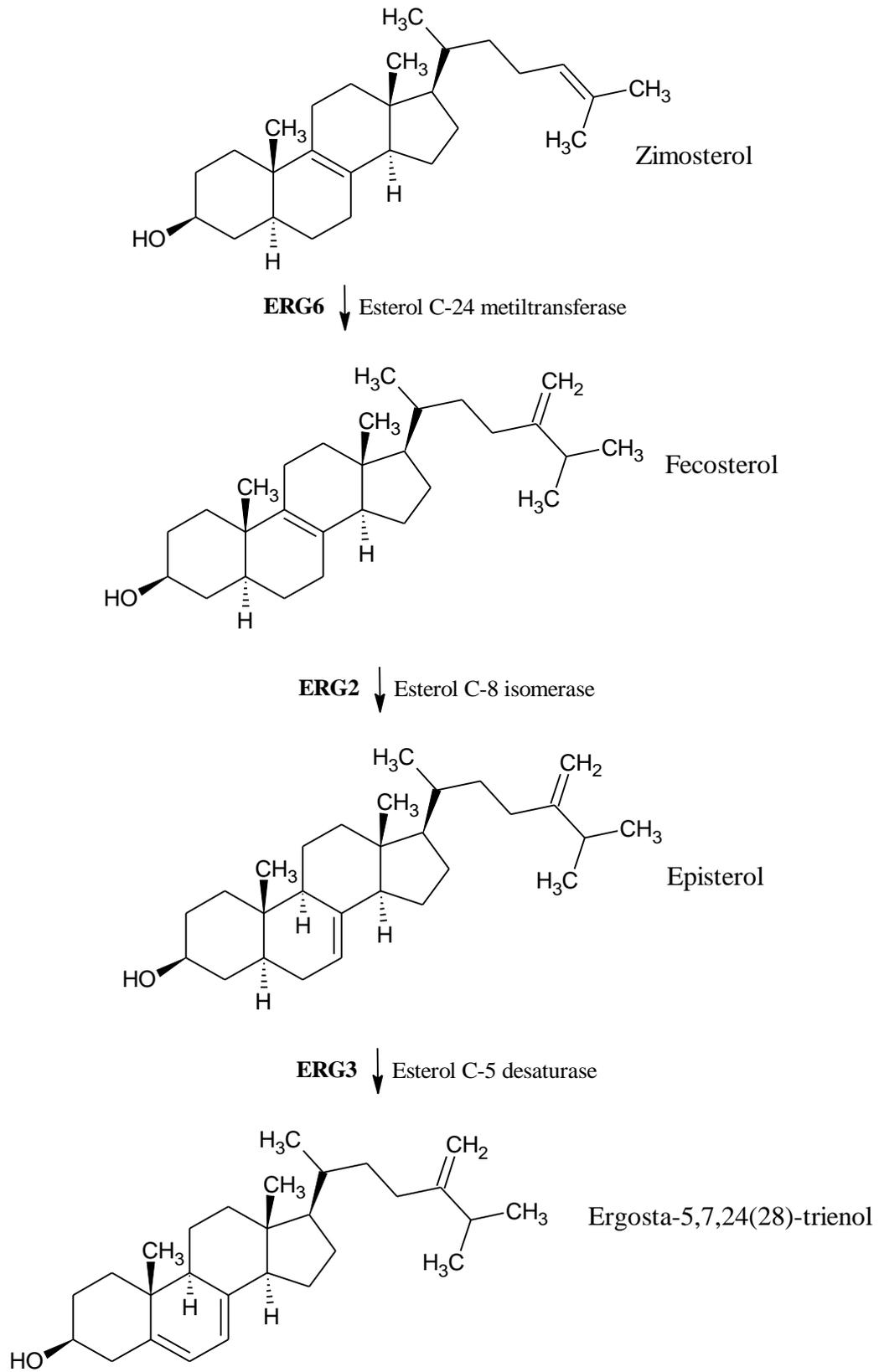


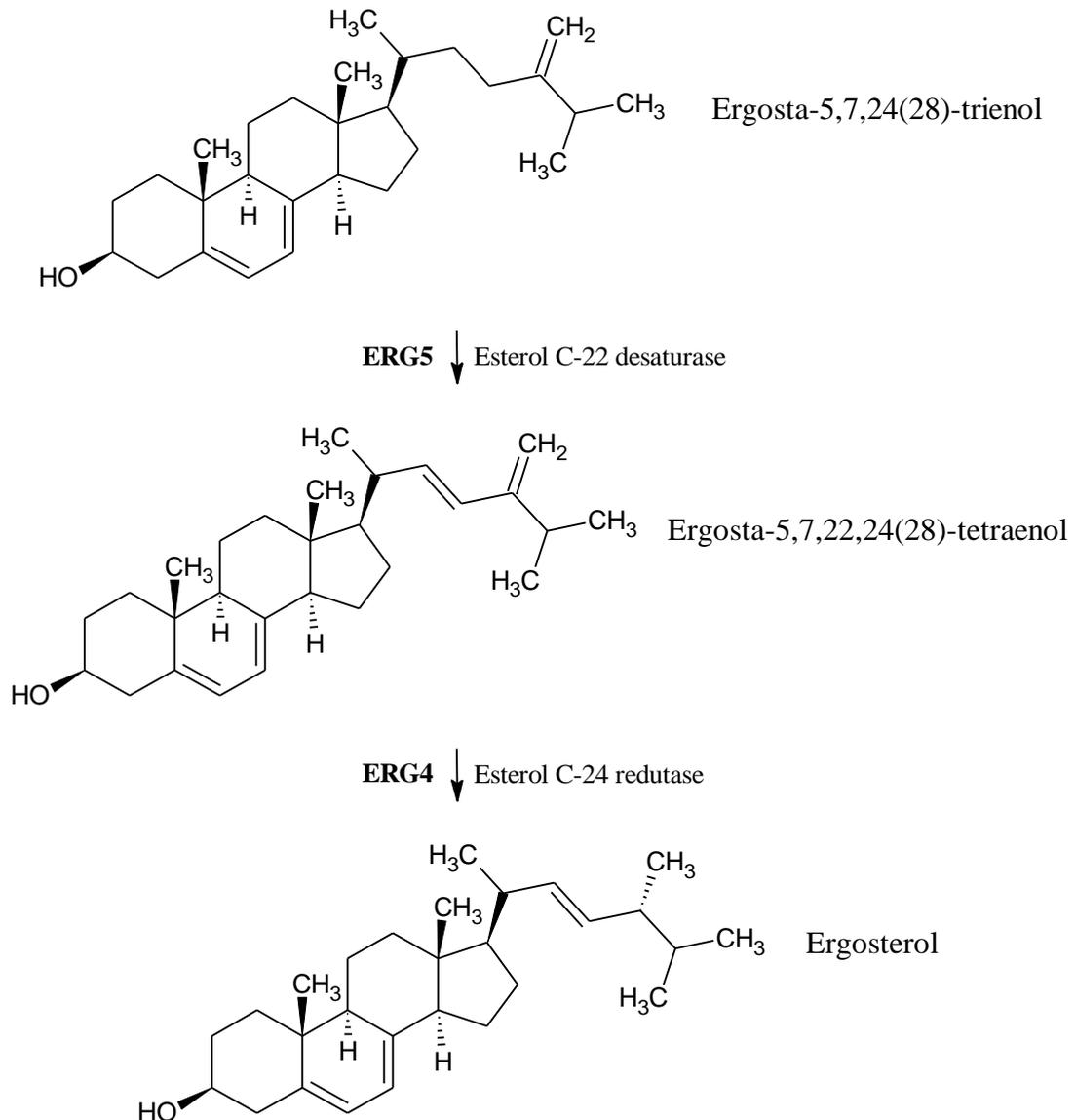
ERG25 ↓ Esterol C-4 metiloxidase

ERG26 ↓ Esterol C-3 desidrogenase (C-4 descarboxilase)

ERG? ↓ Esterol C-3 ceto redutase







Fonte: Daum et al. (1998).

Em comparação com as infecções bacterianas, há poucas drogas disponíveis no tratamento de infecções causadas por fungos. Muitas terapias vêm sendo estudadas no tratamento de infecções fúngicas, sendo o alvo as enzimas da via biossintética do ergosterol, ou o seu produto final, o ergosterol.

Os antifúngicos frequentemente utilizados pertencem a quatro classes de compostos: azóis (fluconazol, cetoconazol, itraconazol, miconazol), polienos (anfotericina B e nistatina), fluopirimidina (5-fluorocitosina) e alilaminas (terbinafina).

Os derivados azólicos inibem a via biossintética de ergosterol, interferindo na enzima essencial ERG11, lanosterol 14- α -demetilase, o que causa dano à função da membrana celular. Contudo, essa classe é fungistática, contribuindo para o desenvolvimento de resistência em

isolados clínicos de pacientes imunocomprometidos, fazendo uma seleção positiva dos mutantes resistentes. Sua toxicidade deve-se ao seu mecanismo de ação, sendo hepatóxicos nos seres humanos e nos animais (PILMIS, et al., 2015).

Novos antifúngicos azólicos vêm sendo desenvolvidos e estudados para o uso clínico, alguns já estão aprovados e em uso. Entre eles, citam-se o voriconazol, ravuconazo, efinaconazol e posaconazol. O efeito do efinaconazol é a inibição da enzima 14- α -demetilase e, conseqüentemente, o bloqueio da síntese de ergosterol. A acumulação de esteróis precursores e a degradação do ergosterol podem afetar a permeabilidade e integridade da membrana celular, perdendo sua função e levando a alterações morfológicas degenerativas (PILMIS et al., 2015; TATSUMI et al., 2013).

Há vários mecanismos de resistência aos derivados azólicos, mas os principais são a diminuição da permeabilidade da membrana aos antifúngicos, mutações ou aumento da expressão da lanosterol 14- α -dimetilase e a diminuição do acúmulo das drogas devido ao sistema de efluxo (PILMIS et al., 2015).

Os polienos alteram a permeabilidade da membrana celular e têm conseqüente perda de componentes citoplasmáticos devido a vazamento de íons em conseqüência da ligação direta ao ergosterol presente na membrana dos fungos formando poros, resultando na morte dos fungos. O efeito fungicida por essa classe também causa danos oxidativos na célula. Apesar de os polienos terem maior afinidade ao ergosterol, eles também se ligam ao colesterol da membrana celular humana. Um exemplo é a anfotericina B que não é absorvida via oral ou intramuscular, causando problemas renais. (PILMIS et al., 2015).

O antifúngico flucitosina (antimetabólito) gera na célula fúngica a 5-fluorouracil, inibindo a síntese proteica, levando à inibição da enzima timidilato-sintase e, conseqüentemente, a síntese de DNA. Apresentam efeitos secundários, toxicidade e não é administrada isoladamente, já que o fungo desenvolve resistência rapidamente. Geralmente essa droga é empregada em associação com a anfotericina B. Os antimetabólitos são agentes considerados carcinogênicos em humanos, que podem causar toxicidade hepática, da medula óssea e do gastrointestinal (PILMIS et al., 2015; STYLIANOU et al., 2014).

Alilaminas também atuam na biossíntese de ergosterol que inibem a enzima esqualeno epoxidase (ERG1), atuando na via pela inibição de formação do precursor de lanosterol. As morfolininas são um exemplo. Essas inibem duas etapas da via bioquímica da síntese de ergosterol bloqueando as enzimas sterol C-14 redutase (ERG24) e sterol C-8 redutase (ERG2)

São consideradas tóxicas e podem interferir na síntese de DNA/RNA (PILMIS et al., 2015; STYLIANOU et al., 2014).

As equinocandinas são moléculas fúngicas lipopeptídeos que inibem a síntese de 1,3- β -glicano, um polímero de glicose que é necessário para manter a estrutura das paredes celulares fúngicas. Com a perda desse polímero, as células fúngicas perdem a integridade, sofrendo lise celular. O surgimento de isolados resistentes a esse medicamento é motivo de preocupação clínica. Seus derivados caspofungina e micafungina estão em uso, mas ainda são alvos de estudo (PILMIS et al., 2015; STYLIANOU et al., 2014).

De modo geral, o tratamento para as infecções causadas por fungos é limitado devido à toxicidade dos fármacos atualmente utilizados, à baixa eficiência de alguns e ao aumento do desenvolvimento de resistência aos antifúngicos. Portanto, há necessidade de novos agentes antifúngicos que apresentam menor toxicidade, com ampla faixa de ação fungicida e poucos efeitos colaterais que limitam a dose e com menor número de cepas resistentes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das plantas

Os materiais vegetais empregados foram as espécies de *Lippia origanoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish. As folhas de *Lippia origanoides* Kunth foram coletadas no dia 30 de março de 2016, no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na cidade de Lavras, sul de Minas Gerais, nas coordenadas 21°13' de latitude Sul e 44°58' longitude oeste, com altitude média de 915 m. O cerne da madeira de *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish foi coletado dia 26 de abril de 2016 no município de Carrancas, sul de Minas Gerais, nas coordenadas 21°33' de latitude Sul e 44°42' longitude oeste. O município apresenta altitude entre 896 a 1590 metros.

Os materiais coletados foram encaminhados para o Laboratório de Química Orgânica-Óleos Essenciais do Departamento de Química da UFLA. As folhas de *Lippia* foram limpas e separadas quanto ao grau de imperfeições e o cerne da madeira da espécie de *Eremanthus* foi cortado e triturado.

Os galhos floridos foram encaminhados para o Herbário ESAL, localizado no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. A espécie de *Lippia origanoides* Kunth. foi identificada pela especialista Dra. Fátima Salimena, da Universidade Federal de Juiz de Fora, e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário ESAL com o número de registro 23660. A espécie *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish foi identificada pela Dra. Mariana Esteves Mansaranes, do Departamento de Biologia da UFLA e um exsicata encontra-se depositada com o número de registro 16228.

3.2 Extração do óleo essencial

A extração dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Química Orgânica – Óleos essenciais do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, utilizando o método de hidrodestilação com aparelho de Clevenger modificado acoplado a um balão de fundo redondo com capacidade de 5 litros (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Os materiais vegetais (250 g de folhas frescas de *Lippia origanoides* Kunth. e 500 g de cerne da madeira triturado de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish foram colocados em balão de fundo redondo com 2,5 litros de água. O processo de destilação foi realizado por um período de 2 horas, para a obtenção do hidrolato. A extração foi realizada em triplicata. Decorrido esse tempo, o óleo essencial foi separado do hidrolato por centrifugação, utilizando uma centrífuga

de cruzeta horizontal (Fanem Baby I Modelo 206 BL), a 965,36 x g por 5 minutos. O óleo foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, acondicionado em frasco de vidro, envolto com papel-alumínio e armazenado sob refrigeração.

3.3 Determinação da umidade e do rendimento do óleo essencial

A determinação da umidade do material vegetal foi realizada utilizando o sistema de Dean e Stark (Figura 15), que se baseia no princípio da imiscibilidade de solventes, no caso cicloexano e água. Foram pesados 5 g de material vegetal picado, juntamente com 80 mL de cicloexano. Após 2 horas, o volume de água presente no material vegetal foi quantificado. A determinação da umidade foi realizada em triplicata seguindo a metodologia descrita por Pimentel et al. (2006).

O rendimento da extração do óleo essencial de cada planta foi determinado em porcentagem de peso/peso (%p/p) em Base Livre de Umidade (BLU), utilizando a seguinte equação1:

$$\%R = \frac{100 \times \text{peso do óleo}}{\text{peso da amostra} - (\text{peso da amostra} \times \text{umidade})} \quad (1)$$

Em que R = rendimento do óleo essencial (base livre de umidade).

Figura 15 – Aspecto geral do processo para determinação de umidade com o aparelho Dean stark



Fonte: Do autor (2017).

3.4 Identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial

Os constituintes dos óleos essenciais foram caracterizados, qualitativamente e quantitativamente, no Centro de Análises e Prospecção Química – CAPQ, no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras.

A identificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada utilizando-se um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (GC/MS- Shimadzu, modelo QP 2010 Plus), sob as seguintes condições experimentais: 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); He como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL min⁻¹, a temperatura foi programada, iniciando-se em 60 °C, seguindo de um aumento de 3 °C min⁻¹ até atingir 240 °C, depois a 10 °C até atingir 300 °C, mantendo-se constante essa temperatura por 7 min; temperatura do injetor: 220 °C e temperatura do detector (ou interface) de 240 °C; o volume da amostra injetada foi de 0,5 µL, diluída em hexano; taxa de partição do volume injetado de 1:100 e pressão na coluna de 71,0 kPa.

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.

Para o cálculo do índice de retenção, foi utilizada a equação de Van den Dool e Kratz (1963) (Equação 2), onde $t_{R(i)}$, $t_{R(n)}$ e $t_{R(n+1)}$ correspondem aos tempos de retenção do composto analisado, e do padrão, respectivamente, em relação à série homóloga de n-alcenos (nC₈-nC₁₈).

$$IR = 100n + 100 \frac{t_{R(i)} - t_{R(n)}}{t_{R(n+1)} - t_{R(n)}} \quad (2)$$

Os constituintes foram identificados com base na comparação dos índices de retenção da literatura (ADAMS, 2007). Também foram utilizadas duas bibliotecas do equipamento NIST107 e NIST21, que permitem a comparação dos dados dos espectros com aqueles existentes nas bibliotecas.

Na avaliação quantitativa, que foi realizada por meio de normalização de áreas (%), utilizou-se um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010, equipado com detector por ionização de chamas (DIC) e as condições experimentais foram as mesmas empregadas na identificação dos constituintes dos óleos, realizada por GC/MS.

3.5 Atividade antifúngica do óleo essencial

A atividade antifúngica de cada óleo essencial foi realizada no Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

Foram utilizadas três espécies de fungos filamentosos: *A. carbonarius* (CCDCA 10507), *A. flavus* (CCDCA 10508) e *A. ochraceus* (CCDCA 10506). As espécies utilizadas foram adquiridas da Coleção de Cultura de Micro-organismos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA.

3.5.1 Efeito inibitório do óleo essencial sobre as espécies fúngicas

A análise do efeito inibitório do óleo essencial de cada planta sobre fungos filamentosos foi realizada utilizando o teste de difusão em disco aceito pelo Food and Drug Administration (FDA) e estabelecido pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Foi utilizado um inóculo na concentração de 10^6 esporos mL^{-1} , com contagem em Câmara de Neubauer. O inóculo foi transferido para a placa contendo meio de Agar Extract Malt (MEA), pela técnica de espalhamento em superfície.

Discos de papel-filtro de 5 mm estéreis de diâmetro embebidos com 10 μL dos óleos diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90 e 0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ foram colocados sobre o meio de cultura, como sugerido por Andrade et al. (2015). Como controle relativo, foi utilizado disco de papel-filtro de 5 mm de diâmetro embebido com 10 μL de DMSO, e como padrão de comparação, foi utilizado o fungicida sintético fluodioxonil (2 $\mu\text{L mL}^{-1}$). As placas foram incubadas em BOD, a 25 °C, por um período de 72 horas e foram realizadas medições diametralmente opostas dos halos de inibição formados.

A partir dos diâmetros obtidos, avaliou-se o perfil de susceptibilidade dos fungos filamentosos nas diferentes concentrações do óleo essencial de cada planta. O teste foi realizado em triplicata. Foi definida como a concentração inibitória mínima (CMI) a menor concentração de óleo essencial em que ocorre a presença do halo de inibição.

3.5.2 Efeito do óleo essencial sobre o crescimento micelial

O crescimento micelial dos fungos foi avaliado de acordo com Singh et al. (2008) com algumas modificações. Foi utilizado um inóculo na concentração de 10^6 esporos mL^{-1} , com

contagem em câmara de Newbauer. O plaqueamento foi realizado inoculando-se 10 µL da suspensão de esporos no centro da placa contendo 20 mL de meio Yeast Extract Sucrose Agar (YES) para os fungos *A. ochraceus* e *A. flavus* e para o fungo *A. carbonarius* contendo 20 mL de meio Czapeck Yeast Agar (CYA), com o óleo essencial diluído em DMSO, para obter as concentrações utilizadas. As concentrações testadas foram 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,90 µL mL⁻¹. Como padrão de comparação, 10 µL da suspensão de esporos foram adicionados à placa contendo apenas o meio. Todas as placas foram incubadas a BOD a 25 °C, no escuro por 10 dias, sendo realizadas as medições nos dois lados 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 abaixo:

$$\text{Porcentagem de inibição micelial (\%)} = \frac{(d_c - d_t)}{d_c} \times 100 \quad (3)$$

Em que, d_c é o diâmetro do crescimento micelial do controle e d_t é o diâmetro do crescimento micelial do tratamento.

3.5.3 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com um esquema fatorial de 2 x 6 (óleos essenciais x concentrações), com três repetições. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (FERREIRA, 2011).

Os dados foram submetidos à análise de variância para a verificação dos tratamentos com os óleos essenciais sobre os resultados da redução do crescimento micelial e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.6 Influência dos óleos essenciais sobre a síntese de Ocratoxina A

A atividade ocratoxigênica dos óleos essenciais foi realizada de acordo com o método descrito por Wanget al. (2012), avaliando-se a inibição da produção de Ocratoxina A (OTA) por fungos *A. carbonarius* (CCDCA 10507) e *A. ochraceus* (CCDCA 10506) em meio de cultura Czapeck Yeast Agar (CYA) e Yeast Extract Sucrose Agar (YES), respectivamente. Foram utilizados meios diferentes para poder estimular a produção das respectivas micotoxinas. O inóculo foi obtido a partir de isolados fúngicos, adquiridos do acervo da Coleção de Cultura de Micro-organismos do Departamento de Ciências dos Alimentos (UFLA). Esses foram transferidos para as placas contendo o meio de cultura a 25°C por 7 dias. Após esse período, preparou-se a suspensão de esporos em água destilada contendo 1% de Tween 80. A câmara de

Newbauer foi utilizada para a determinação da concentração final de esporos (10^6 esporos mL⁻¹).

O plaqueamento foi realizado inoculando-se 10 µL 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 DMSO para obter as concentrações utilizadas. As concentrações testadas foram a concentração mínima inibitória e duas abaixo dela, determinada em testes preliminares.

Como padrão de comparação, 10 µL da suspensão de esporos foram adicionados à placa contendo apenas o meio de cultura. Todas as placas foram incubadas em BOD a 25°C, no escuro, por um período de 10 dias. Essas análises foram realizadas em triplicata.

3.6.1 Extração da Ocratoxina A

A extração da OTA foi realizada no 10º dia do período de incubação dos esporos fúngicos de acordo com o método de Passamani et al. (2014). Para a realização do procedimento, 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 OTA. Adicionou-se 1 mL de metanol em cada tubo de ensaio, e procedeu a agitação vigorosa por 5 segundos, posteriormente foram mantidos à temperatura ambiente por 60 minutos. Os extratos foram filtrados por unidades filtrantes de PTFE (politetrafluoretileno) (0,22 µm) (Millipore) e, então analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

3.6.2 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⁻¹ 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). O tempo de retenção médio obtido para OTA foi de $11 \pm 0,1$ min.

3.6.3 Quantificação da Ocratoxina A

A quantificação da OTA nas amostras foi realizada por meio de padronização externa, a partir da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear ($y = 1,11756 \times 10^7 x - 2592,1485$, em que y é a área do pico e x é a concentração de OTA). O cálculo definiu a área do pico versus a concentração da respectiva solução-padrão obtida pela determinação do coeficiente de determinação (r^2) de 0,9999.

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 estes, foram encontrados os valores de 0,0004 e 0,0016 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Todas as amostras e as soluções padrão de OTA foram analisadas em triplicata.

3.6.4 Análise estatística

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (FERREIRA et al., 2011)

Os dados foram submetidos à análise de variância para a verificação dos tratamentos com os óleos essenciais sobre os resultados da redução da síntese de OTA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.7 Atividade dos óleos essenciais na síntese de Aflatoxinas B1 e B2

O efeito aflatoxigênico dos óleos essenciais foi avaliado por meio da inibição da produção de Aflatoxina B1 e Aflatoxina B2 pelo fungo *Aspergillus flavus* (CCDCA 10508) em meio de cultura. Para a obtenção do inóculo, os isolados fúngicos obtidos do acervo da Coleção de Cultura de Micro-organismos do DCA/ UFLA foram transferidos para placas contendo meio de cultura Yeast Extract Sucrose Agar (YES) e incubados a 25°C por 7 dias. Após esse período, preparou-se uma suspensão de esporos em água destilada estéril contendo 1% de Tween 80. Utilizou-se a câmara de Neubauer para determinar a concentração final de esporos (10^6 esporos mL^{-1}).

O plaqueamento foi realizado inoculando-se 10 µL da suspensão de esporos no centro da placa contendo 20 mL do meio YES adicionado de óleos essenciais diluídos em DMSO para obter as concentrações utilizadas. As concentrações testadas foram três concentrações abaixo da CMI, determinada em testes preliminares.

Como padrão de comparação, 10 µL da suspensão de esporos foram adicionados à placa contendo meio YES. Todas as placas foram incubadas em BOD a 25°C, no escuro por um período de 10 dias. Essas análises foram realizadas em triplicata.

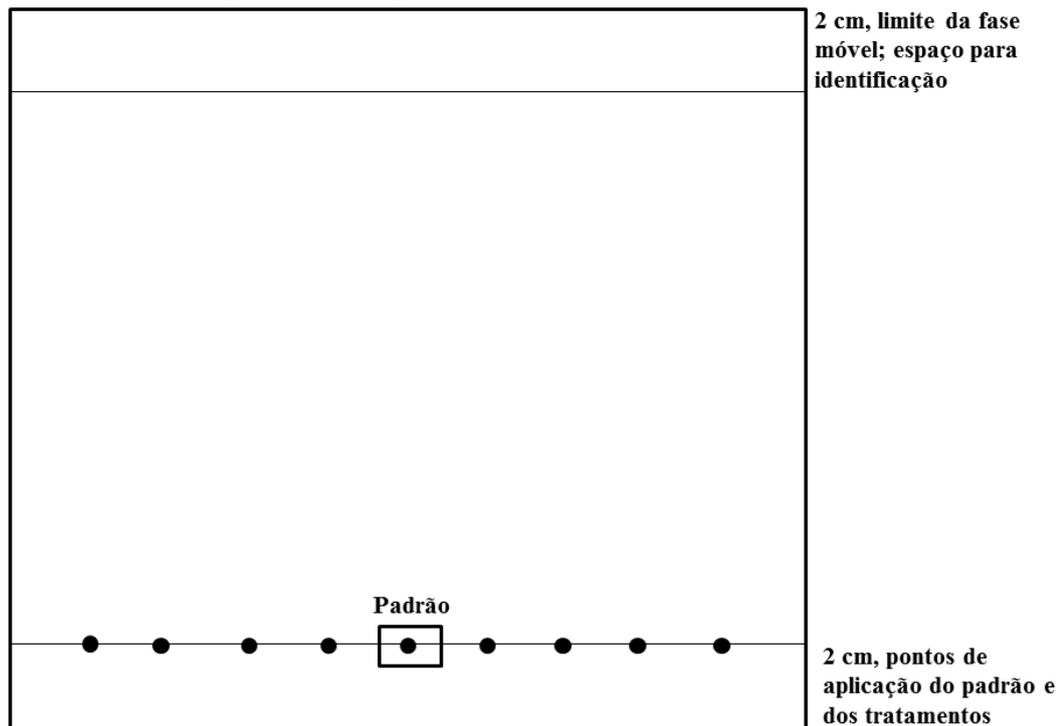
3.7.1 Extração das Aflatoxinas B1 e B2

A Aflatoxina B1 e a Aflatoxina B2 foram extraídas de acordo com o método de Passamani et al. (2014). Inicialmente, três “plugs” foram removidos da área interna, meio e borda de cada colônia, no décimo dia do período de incubação. Esses “plugs” foram depositados em tubos de ensaio envolvidos por papel-alumínio, com posterior adição de 1 mL de metanol. Os tubos foram agitados vigorosamente por 5 segundos e mantidos à temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida tiraram-se os “plugs” e secou-se o extrato com nitrogênio líquido, para poder concentrar a amostra. Suspenderam-se com 50 µL de metanol os extratos, e então, foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

3.7.2 Análise de produção de Aflatoxinas B1 e B2 por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os materiais utilizados nesse procedimento foram fase estacionária (placa metálica com cobertura de sílica em uma das fases, de dimensão 20 x 20 cm), fase móvel composta por tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (60:30:10). Inicialmente a placa foi marcada (a lápis) da seguinte maneira (Figura 16).

Figura 16 – Esquema da fase estacionária da CCD



Após a marcação necessária, indicado na Figura 16, deve-se proceder com a aplicação das amostras que, geralmente, distanciam-se 2 cm entre si. No ponto central foram aplicados 10 μL dos padrões, Aflatoxina B1 ($11,1060 \mu\text{g mL}^{-1}$) e Aflatoxina B2 ($11,9271 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Nos demais pontos, foram aplicados 10 μL dos tratamentos e 10 μL do controle (fungo *A. flavus*). Depois dessa aplicação, a placa foi colocada em uma cuba de vidro contendo 200 mL de fase móvel. Aguardou-se até que a eluição da fase móvel percorresse toda a placa e atingisse a linha superior que delimita a faixa de identificação. Retirou-se a placa da cuba para a evaporação da fase móvel na capela de exaustão. Aguardaram-se alguns instantes e levou-se ao Cromotovisor para a observação do resultado sob a luz ultravioleta.

3.8 Atividade dos óleos essenciais na síntese de ergosterol

A avaliação da atividade dos óleos essenciais na síntese do ergosterol foi realizada no Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos do DCA/ UFLA e no Laboratório de Química Orgânica – Óleos essenciais do DQI/ UFLA.

A avaliação do ergosterol em fungos filamentosos utilizando como tratamento os óleos essenciais foi testada sobre as espécies *A. carbonarius* (CCDCA 10507), *A. flavus* (CCDCA 10508) e *A. ochraceus* (CCDCA 10506). As espécies utilizadas foram adquiridas da Coleção de Cultura de Micro-organismos do DCA/ UFLA. A metodologia usada para a análise de

determinação e quantificação do ergosterol foi realizada baseando-se em metodologias propostas por Bomfim et al. (2015), Kohiyama et al. (2015) e Yamamoto-Ribeiro et al. (2013).

3.8.1 Condições de micro-organismos e cultura para a análise do ergosterol

Para obtenção do inóculo, o isolado do fungo *A. carbonarius* foi transferido para placas contendo o meio de cultura Czapeck Yeast Agar (CYA) e os isolados dos fungos *A. flavus* e *A. ochraceus* foram transferidos para placas contendo meio de cultura Yeast Extract Sucrose Agar (YES) e foram incubados em BOD a 25 °C, no escuro por 7 dias. Após esse período, foi preparada a suspensão de esporos em água destilada estéril contendo 1% de Tween 80. A câmara de Neubauer foi utilizada para a determinação da concentração final de esporos (10^6 esporos mL^{-1}).

O óleo essencial foi previamente diluído em DMSO e adicionado a 20mL de meio líquido Czapeck Yeast Agar (CYA) para o fungo *A. carbonarius* e meio líquido Yeast Extract Sucrose Agar (YES) para os fungos *A. flavus* e *A. ochraceus* em um erlemneyer, a fim de obter concentrações finais, que foram a concentração mínima inibitória e três abaixo da CMI, determinada em teste preliminar. Em cada meio foram adicionados 10 μL da suspensão de esporos para que os fungos fossem inoculados. Para a testemunha, o crescimento de fungos foi realizado utilizando um meio que contenha apenas o inóculo. Como testemunha positiva, foi usado o antifúngico sintético fluodioxonil (2 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Os erlemneyers foram incubados em BOD, a 25 °C, no escuro, durante 10 dias.

Após o período de incubação, o meio foi filtrado utilizando papel-filtro comum e o micélio foi usado para a determinação do ergosterol. Três repetições foram realizadas para cada teste experimental.

3.8.2 Extração do ergosterol

A extração do ergosterol foi realizada de acordo com Silva, Corso e Matheus (2010), com algumas modificações. Uma porção de 300 mg de micélio úmido foi transferido para um tubo de ensaio envolvido por papel-alumínio, para evitar a degradação do ergosterol, contendo 20 ml de metanol, 5 mL de etanol e 2,0 g de hidróxido de potássio. Os tubos foram fechados, agitados num agitador magnético durante 5 minutos e submetidos a um banho-maria a 70 °C por 40 minutos. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, 5mL de água destilada foram adicionados em cada tubo e, em seguida, centrifugados a 965,36 x g por 30 minutos. Os sobrenadantes foram removidos, adicionando-se 15 mL de hexano em cada tubo, agitando

durante 2 minutos e, em seguida, deixou-se em repouso durante 10 minutos. A fração de hexano (fração orgânica) foi recuperada e evaporou-se o solvente em temperatura ambiente. O resíduo obtido foi armazenado em tubo âmbar sobre refrigeração, protegido da luz durante o desenvolvimento de todo o trabalho. Para a análise, o resíduo foi solubilizado em 2mL de metanol, filtrado em membrana de polietileno de 0,45 μm (Millipore) e injetado diretamente no sistema cromatográfico.

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

3.8.3 Padrão de ergosterol

Foi preparada uma solução-estoque com concentração de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, solubilizados em metanol de grau HPLC. O método utilizado para a quantificação do composto foi o de padronização externa. A partir da solução-estoque, foram preparadas 10 soluções do padrão com concentrações diferentes em um intervalo de 0,1 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a construção da respectiva curva analítica. A curva analítica foi obtida por regressão linear, considerando o coeficiente de determinação (r^2) de 0,9999.

As soluções foram preparadas devidamente protegidas da luz, filtradas em membrana de polietileno de 0,45 μm (Millipore) e injetadas diretamente no sistema cromatográfico. As soluções do padrão foram injetadas em triplicata.

3.8.4 Condições cromatográficas

A análise do ergosterol foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC Shimatzu, equipados com duas bombas de alta pressão, modelo LC-6AD, um detector de arranjos de diodos (DAD) modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU-20A3 e injetor automático com autoamostrador modelo SIL-10AF. As separações foram realizadas empregando-se uma coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 μm) conectada a uma pré-coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Parck (4,6 x 12,5 mm, 5 μm).

O solvente utilizado como fase móvel foi o metanol de grau HPLC. O comprimento de onda utilizado foi de 282 nm, fluxo de 1mL min^{-1} e volume de injeção de 20 μL .

3.8.5 Quantificação do ergosterol

A identificação do composto foi realizada por comparação do tempo de retenção das amostras em relação ao padrão e à quantificação do ergosterol foi realizada pela construção de

uma curva analítica obtida por regressão linear, correlacionando a área do pico versus a concentração da respectiva solução-padrão.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados por meio dos parâmetros obtidos pela curva analítica construída, sendo calculados pelas respectivas soluções matemáticas: $LD = 3 \times (s/S)$ e $LQ = 10 \times (s/S)$, em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica (HARRIS, 2008).

3.8.6 Análise estatística

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado, com três repetições. O programa estatístico SISVAR foi utilizado (FERREIRA, 2011).

Os dados foram submetidos à análise de variância para a verificação dos tratamentos com os óleos essenciais sobre os resultados de inibição da síntese de ergosterol e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Foram ajustadas equações de regressão para avaliar o efeito do óleo essencial na inibição da síntese de ergosterol para cada concentração, considerando 5% de probabilidade.

3.8.7 Validação do método

Para garantir a qualidade analítica dos resultados, foram realizados procedimentos para a validação do método, sendo avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão.

Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade que esse possui de avaliar exatamente a substância em estudo na presença de outros componentes que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Esse procedimento permite distinguir o analito de todo o resto que possa estar presente na amostra. A seletividade pode ser obtida de diversas maneiras: comparando a matriz isenta do composto de interesse e a matriz adicionada com esse composto (padrão); comparando o perfil cromatográfico do pico obtido na separação com o de um padrão, por meio da utilização de detectores modernos; por meio do método de adição padrão, quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse; coletando o composto de interesse e realizando nova análise por outro método ou técnica que são específicos para a

estrutura do composto de interesse (ANVISA, 2003; HARRIS, 2008; INMETRO, 2011; RIBANI et al., 2004).

Para a avaliação da seletividade do método proposto, foi realizado o procedimento de comparação da matriz isenta da substância de interesse (ergosterol) e a matriz adicionada com o padrão do analito. E também foi utilizado o método de adição padrão.

Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico. É obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

A correlação entre o sinal medido (área do pico) e a concentração da espécie de interesse foi expressa por meio da equação da reta (curva analítica) e o respectivo coeficiente de correlação (r^2). Como evidência de um ajuste dos dados para a linha de regressão, foi considerado um coeficiente de correlação maior que 0,99, recomendado pela Anvisa. O Inmetro recomenda um coeficiente de correlação com valor acima de 0,90 (ANVISA, 2003; HARRIS, 2008; INMETRO, 2011; RIBANI et al., 2004).

Precisão

A precisão é a avaliação das proximidades dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Pode ser avaliada por meio do desvio-padrão absoluto (σ) ou pela estimativa do desvio-padrão absoluto (s), quando o número de determinações é pequeno, pelo intervalo de confiança médio, ou mesmo pela estimativa do desvio-padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV).

Neste estudo, para estimativas da precisão do método, foram determinados os coeficientes de variação (CV) de uma série de medidas, por meio da utilização da seguinte relação matemática, $CV (\%) = DP/CMD$, em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. Segundo a Anvisa, o valor máximo deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%. Ribani et al. (2004) afirmam que métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um CV de 1 a 2%, atestando, assim, a precisão do método analítico proposto.

A precisão, em validação de métodos, é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações de concentrações (baixa, média e alta) e é, algumas vezes, denominada precisão intraensaio ou intracorrida. Para a avaliação da repetitividade do método, foi realizada a análise de solução-padrão, correspondente a três níveis de concentração, submetidas a sete diferentes preparações, sendo, então, estimado o CV correspondente para cada nível de concentração.

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório em razão de algumas situações, dias diferentes, analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório, o método fornecerá o mesmo resultado. Para isso, foi realizada a análise, em 3 dias diferentes, de soluções-padrão referentes a três níveis de concentração, sendo estimado o valor de CV ao final das sucessivas repetições.

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados obtidos de uma mesma amostra em laboratórios diferentes. Deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopeias, procedimentos do Codex, e por isso, não foi considerada neste estudo (ANVISA, 2003; HARRIS, 2008; INMETRO, 2011; RIBANI et al., 2004).

Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade da substância presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. É estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível que pode ser detectado.

O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método de relação sinal-ruído e método baseado nos parâmetros da curva analítica.

Para a determinação do LD, foram considerados os parâmetros da curva analítica construída, utilizando a seguinte relação matemática, $LD = 3 \times (s/S)$, em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica (ANVISA, 2003; HARRIS, 2008; INMETRO, 2011; RIBANI et al., 2004).

Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de uma substância em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. É estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível que pode ser medido com precisão e exatidão.

Os mesmos critérios adotados para a determinação do LD podem ser adotados para o LQ, porém, utiliza-se a relação 10:1.

Para a determinação do LQ, foi considerado o parâmetro relativo à curva analítica construída, utilizando a seguinte relação matemática $LQ = 10 \times (s/S)$, em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica (ANVISA, 2003; HARRIS, 2008; INMETRO, 2011; RIBANI et al., 2004).

Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

Os procedimentos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: comparação com materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo. O número de ensaios varia de acordo com a legislação, diretriz adotada e, também, com as características da pesquisa; alguns órgãos estabelecem um mínimo de três diferentes níveis de concentração (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004)

Assim, a exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação utilizando 3 amostras, escolhidas aleatoriamente, sendo essas fortificadas com o padrão do analito em 3 níveis de concentrações diferentes. A recuperação foi determinada considerando os resultados obtidos para o analito estudado, utilizando a seguinte relação matemática,

$$\% \text{Recuperação} = [(\text{Concentração observada}) / (\text{Concentração esperada})] \times 100.$$

De acordo com Ribani et al. (2004), os valores de recuperação que são aceitos para análise de resíduos estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, esse valor pode variar de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$.

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 (OEs) das folhas da espécie *Lippia origanoides* Kunth. e do cerne da madeira da espécie *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Teor de umidade e rendimento dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish.

Planta	Massa (g)	Umidade (%)	Rendimento do óleo essencial (% p/p BLU)
<i>Lippia origanoides</i> Kunth.	250	70	1,06 (±0,10)
<i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish	500	24	0,14 (±0,04)

Legenda: BLU - Base Livre de Umidade

Pelos dados descritos na Tabela 1, observa-se que os rendimentos dos óleos essenciais foram de 1,06% das folhas frescas de *Lippia origanoides* Kunth. e de 0,14% do cerne da madeira de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish.

Oliveira et al. (2007), estudando o óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth. cultivado sem Oriximiná – Pará (Brasil), obtiveram um rendimento de 1% (em BLU), valor próximo ao encontrado neste estudo. Já Stashenko et al. (2010), avaliando o rendimento do óleo essencial dessa espécie coletadas em diferentes locais, observaram uma variação de 1,0 a 4,4% (p/p), sendo que os maiores rendimentos foram a partir de plantas cultivadas em baixas altitudes.

Silvério et al. (2013), estudando o óleo essencial de diferentes partes da espécie *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish encontraram 0,2%; 0,2%; 0,3%; 0,4% de rendimento para inflorescências, folhas frescas, folhas secas e cerne da madeira, respectivamente, valores superiores ao encontrado neste trabalho. Mori et al. (2009) estudando o óleo essencial da mesma espécie na região de Aiuruoca – MG (Brasil) em duas áreas diferentes observaram um valor de rendimento igual a 0,67% para uma altitude de 1000m e 0,37% para a área de 1100 m de altitude.

Os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, resultando em diferentes compostos, e interferir no rendimento do óleo essencial e na sua composição. Entre esses fatores abióticos, podem-se ressaltar estágio de

desenvolvimento da planta, horário de coleta, água e nutrição do solo, tempo de secagem e sazonalidade (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

4.2 Caracterização química dos óleos essenciais

Os resultados obtidos para a caracterização química do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth. estão apresentados na Tabela 2 e o cromatograma correspondente encontra-se em anexo (Figura 1A, APÊNDICE A). Foram identificados 13 constituintes no óleo essencial.

Tabela 2 – Composição química do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth.

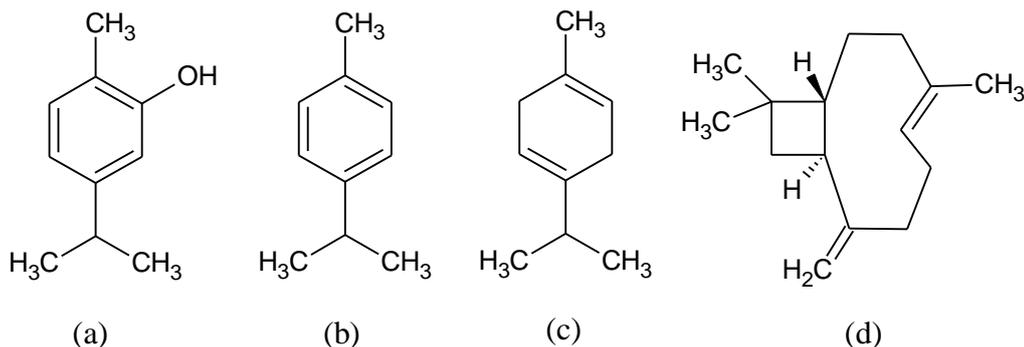
Pico	Compostos	TR (min)	IR _{tab}	IR _{cal}	N. Área (%)
1	α -Tujeno	6,632	924	925	0,963
2	α -Pineno	6,854	932	933	0,451
3	Mirceno	8,702	988	989	1,189
4	α -Felandreno	9,156	1002	1008	1,088
5	α -Terpineno	9,587	1014	1018	1,501
6	ρ -Cimeno	9,854	1020	1025	15,375
7	Limoneno	10,038	1024	1030	0,111
8	γ -Terpineno	11,179	1054	1058	12,730
9	Terpinen-4-ol	16,513	1174	1183	0,128
10	Carvacrol	21,936	1298	1299	58,722
11	<i>trans</i> - β -Cariofileno	27,183	1417	1419	4,882
12	D-Germancreno	29,864	1484	1481	0,207
13	Óxido de Cariofileno	30,528	1582	1583	0,100
Total identificado					97,447%
Componentes agrupados					
Hidrocarbonetos monoterpênicos					33,408%
Monoterpenos oxigenados					58,850%
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos					5,089%
Sesquiterpenos oxigenados					0,100%

Legenda: TR – tempo de retenção; IR_{lit} – índice de retenção da literatura; IR_{cal} – índice de retenção calculado; N. Área – Normalização da área

Pelos dados apresentados na Tabela 2, observa-se que o componente majoritário do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth. foi carvacrol (58,722%), um monoterpreno com

característica fenólica. Outros constituintes majoritários encontrados foram os hidrocarbonetos monoterpênicos, *p*-cimeno (15,375%) e γ -terpineno (12,730%) e hidrocarboneto sesquiterpênico *trans*- β -cariofileno (4,882%) (Figura 17). Constatou-se a predominância de monoterpênicos oxigenados (58,850%), seguidos de hidrocarbonetos monoterpênicos (33,408%), hidrocarbonetos sesquiterpênicos (5,089%) e sesquiterpenos oxigenados (0,100%).

Figura 17 – Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth.



Legenda: (a) Carvacrol, (b) *p*-Cimeno, (c) γ -Terpineno e (d) *trans*- β -Cariofileno.

Os dados corroboram parcialmente com aqueles encontrados por Teixeira et al. (2014) que, analisando o óleo essencial da planta coletada no Horto de Plantas Medicinais da UFPA, encontraram como constituintes majoritários o carvacrol (41,51%), *p*-cimeno (18,36%), γ -terpineno (17,03%) e timol (4,86%). Vicuña, Stanshenko e Fuentes (2010) analisando dois exemplares de *Lippia origanoides* coletadas no Canyon do rio Chicamocha (Santander, Colômbia) observaram alta porcentagem de monoterpênicos (36,1 – 39,4%) seguidos de monoterpênicos oxigenados (27,3 – 30,6%) e sesquiterpenos (22,2 – 27,2%), sendo que um exemplar apresentou como constituintes majoritários o timol (59,6%), *p*-cimeno (8,4%), γ -terpineno (7,3%) e (*E*)-cariofileno (4,3%), e a outro exemplar apresentou como constituintes majoritários timol (34,5%), carvacrol (25,8%), *p*-cimeno (9,3%) e γ -terpineno (9,1%), dados que divergem daqueles encontrados neste trabalho.

Betancur-Galvis et al. (2011) coletaram 9 amostras de *Lippia origanoides* de quatro regiões da Colômbia e encontraram como constituintes majoritários carvacrol (12,2 – 46,2%), *p*-cimeno (8,8 – 15,7%), γ -terpineno (4,5 – 13,2%), timol (9,2 – 54,5%), *trans*- β -cariofileno (9,4 – 11,3%), α -felandreno (8,7 – 9,9%).

A composição química dos óleos essenciais pode ser determinada por fatores genéticos, mas outros fatores podem causar alterações significativas na composição dos metabólitos secundários. Dentre eles podemos citar as estações do ano, idade e o estágio de

desenvolvimento da planta, horário de coleta, fator hídrico, temperatura, nutrição do solo, processos de colheita e a pós-colheita (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

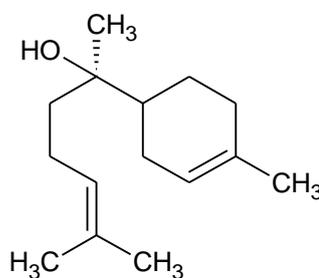
De acordo com os dados descritos na Tabela 3 e com o cromatograma em anexo (Figura 2A, APÊNDICE A), o óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish apresentou como constituinte majoritário o α -bisabolol (98, 853%) (Figura 18). Observou-se também a presença do óxido de α -bisabol B, ambos são sesquiterpenos oxigenados.

Tabela 3 – Composição química do óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish.

Pico	Compostos	TR (min)	IR _{lit}	IR _{cal}	N. Área (%)
1	Óxido de α -Bisabolol B	36,918	1656	1657	1,147
2	α -Bisabolol	38,012	1689	1689	98,853
Total identificado					100%
Componentes agrupados					
Sesquiterpenos oxigenados					100%

Legenda: TR – tempo de retenção; IR_{lit} – índice de retenção da literatura; IR_{cal} – índice de retenção calculado; N. Área – Normalização da área

Figura 18 – Estrutura química do composto majoritário presente no óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish.



Legenda: α -Bisabolol

Silvério et al. (2013) analisando o óleo essencial de *Eremanthus erythropappus*, relataram que os constituintes presentes no óleo foram α -bisabolol (93,1%) e β -elemeno (5,6%), resultados divergentes para o β -elemeno e o óxido de α -bisabolol que foram encontrados neste trabalho.

Mori et al. (2009) estudando óleo essencial do material adquirido em Aiuroca – MG (Brasil), onde as plantas de *Eremanthus* foram coletadas em duas áreas diferentes (1000 m e 1100 m, área 1 e 2, respectivamente) que diferiram quanto às condições do terreno, obtiveram como constituinte majoritário o α -bisabolol, diferindo apenas na porcentagem, sendo 58,88% para a área 1 e 67,23% para a área 2. Os autores notaram que nas árvores de candeia estudadas,

a idade apresentou uma correlação significativa com o rendimento do óleo essencial e a porcentagem de α -bisabolol, sendo que o teor de α -bisabolol apresentou uma correlação negativa com a idade, indicando que quanto mais antiga a árvore, menor o teor de α -bisabolol no óleo essencial. Isto pode ser explicado pela fisiologia vegetal, as árvores mais jovens têm uma maior proporção metabólica e conseqüentemente maior capacidade de produzir e armazenar metabólitos secundários para proteção e crescimento da planta, enquanto que nas plantas mais velhas esse metabolismo tende a se estabilizar.

4.3 Efeito inibitório dos óleos essenciais sobre os fungos filamentosos

Foi avaliada para cada óleo essencial a menor concentração que apresenta um halo de inibição, ou seja, a concentração mínima inibitória (CMI). Essa concentração é aquela necessária para causar 100% de inibição do crescimento de fungos.

Os valores referentes às concentrações mínimas inibitórias (CMIs) dos óleos essenciais obtidos para a avaliação da atividade antifúngica sobre os fungos *A. carbonarius*, *A. flavus* e *A. ochraceus*, utilizando a metodologia de difusão em disco, estão representadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish sobre os fungos *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*.

Fungo	CMI ($\mu\text{L mL}^{-1}$)			
	<i>Lippia origanoides</i> Kunth.	<i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) MacLeish	DMSO	Fluodioxonil
<i>A. carbonarius</i>	15,62	31,25	NI	2
<i>A. flavus</i>	31,25	125	NI	2
<i>A. ochraceus</i>	31,25	125	NI	2

Legenda: NI - não ocorreu inibição, DMSO - dimetilsulfóxido

Os valores da CMI indicam que os fungos *A. flavus* e *A. ochraceus* apresentam sensibilidade em uma concentração de 31,25 e 125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ frente aos óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, respectivamente, mostrando que o *A. carbonarius* é mais sensível, com a CMI de 15,62 e 31,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente.

Pode-se observar que o óleo essencial de *Lippia* é mais eficiente que o óleo essencial de *Eremanthus*, inibindo os fungos em concentrações menores. Essa eficiência da ação do óleo essencial de alecrim d'angola pode ser atribuída aos constituintes monoterpênicos presentes no mesmo. De acordo com a constituição química, o óleo essencial de alecrim d'angola possui

aproximadamente 92% de monoterpenos e o óleo essencial de candeia possui 100% de constituintes sesquiterpênicos. Isto pode estar relacionado a penetração dos óleos na camada lipídica, aonde os compostos com cadeia menor, provavelmente atravessam a mesma com mais rapidez.

De acordo com Trombeta et al. (2005), muitos terpenos são considerados antimicrobianos por terem atividade contra uma gama de micro-organismos, dentre eles, os fungos. Essas substâncias proporcionam efeitos tóxicos na estrutura e na função das membranas das células dos micro-organismos, podendo alterar a fluidez e a permeabilidade, interagindo com os componentes internos da célula fúngica. A característica lipofílica que os óleos essenciais apresentam podem explicar essas ações frente aos micro-organismos.

Pinto et al. (2006) estudando óleo essencial de *Thymus pulegioides* sobre os fungos do gênero *Aspergillus* atribuíram as propriedades fungistática e fungicida do óleo de estarem associadas com o elevado teor dos monoterpenos, carvacrol e timol. Observaram que o óleo atua por lesão primária da membrana, ou seja, mecanismo primário de ação pelo qual os fármacos antifúngicos inibem o crescimento de células de levedura através da ruptura das vias de biossíntese de esteróis normais, levando a uma redução na biossíntese do ergosterol, que é o principal componente da membrana celular fúngica e responsável pela manutenção da função e integridade celular.

Um estudo de vários óleos essenciais sobre fungos isolados do gênero *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* foi realizado por Stevíc et al. (2014). Os autores observaram que os óleos essenciais de *Satureja hortensis*, *Origanum heracleoticum*, *Thymus vulgaris* e *Rosa damascena* que apresentam como constituintes majoritários carvacrol (50%), carvacrol (75,8%), timol (43,7%) e citrionelol (51,3%), respectivamente, representam uma boa formulação de produtos com potencial ação no controle de fungos. Contudo combinando esses óleos observaram uma redução nos valores das concentrações mínimas inibitórias. Este sinergismo teria uma vantagem na proteção pré e pós-colheita porque os patógenos não podem adquirir resistência a múltiplos componentes de dois óleos essenciais, sendo que o uso de menor quantidade de óleos para proteger na aplicação em grandes escalas poderia ter efeitos econômicos consideráveis.

Tian et al. (2012a) estudando o óleo essencial de *Anethum graveolens* L. observaram que a atividade antifúngica apresentada resulta na capacidade de romper a barreira de permeabilidade da membrana plasmática e da acumulação de espécies reativas de oxigênio induzidas pela disfunção mitocondrial no fungo da espécie *Aspergillus flavus*.

4.4 Efeito dos óleos essenciais sobre o crescimento micelial dos fungos filamentosos

Os valores das atividades antifúngicas dos óleos essenciais de *Lippia organoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish sobre a inibição do crescimento micelial dos fungos filamentosos *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos óleos essenciais de *Lippia organoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish em *Aspergillus carbonarius* no décimo dia de incubação.

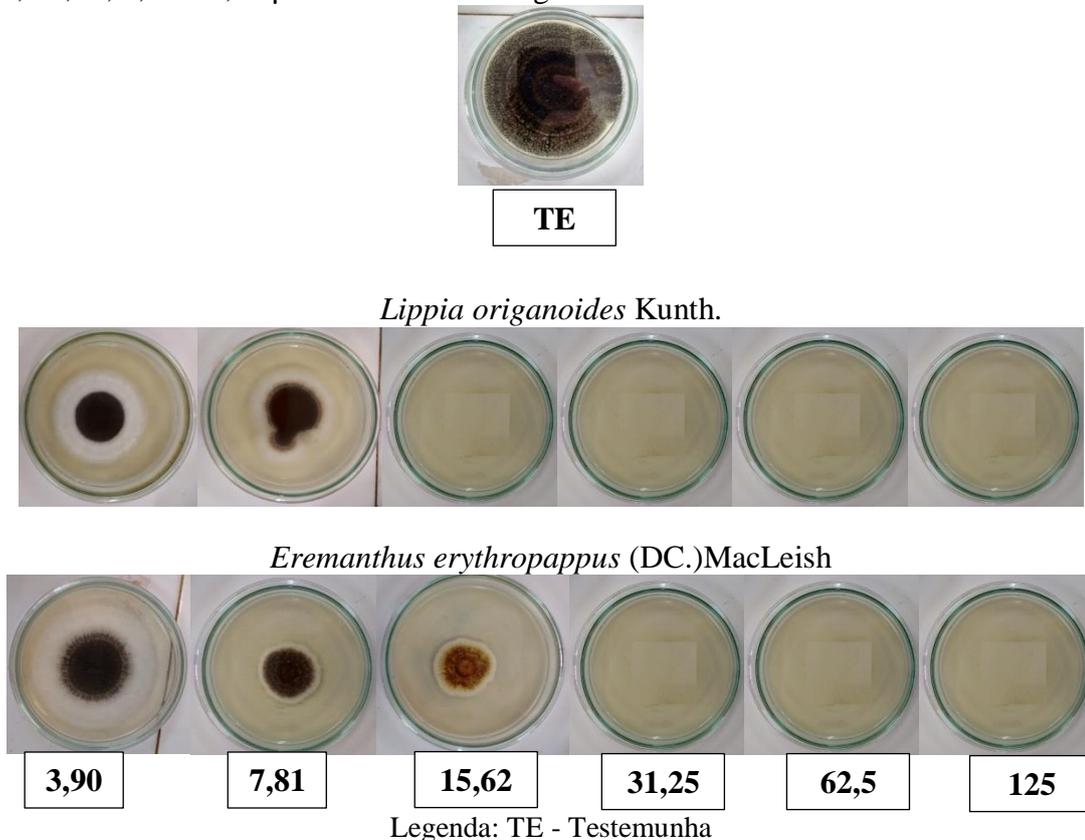
Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Porcentagem de inibição micelial	
	<i>Eremanthus erythropappus</i>	<i>Lippia organoides</i>
3,91	20,37 dB	33,70 cA
7,81	41,48 cB	55,56 bA
15,62	62,04 bB	100,00 aA
31,25	100,00 aA	100,00 aA
62,50	100,00 aA	100,00 aA
125,00	100,00 aA	100,00 aA

Legenda: As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e pela mesma letra maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Observou-se que o efeito dos óleos essenciais sobre o fungo *A. carbonarius* apresentou por meio da análise de variância diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 1B, APÊNDICE B). Os dois óleos essenciais apresentaram inibição sobre o crescimento micelial do fungo (Figura 19). O teste de médias apontou variação na inibição tanto entre os óleos essenciais e as concentrações utilizadas de cada óleo.

Foi observado um aumento na atividade de inibição do crescimento micelial com o aumento da concentração dos óleos essenciais, ou seja, os resultados apresentaram uma relação de dose-dependente sobre a atividade antifúngica dos óleos essenciais.

Figura 19 – Teste do crescimento e/ou inibição micelial realizados com os óleos essenciais de *L. origanoides* Kunth e *E. erythropappus* (DC.) MacLeish nas concentrações de 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,90 $\mu\text{L mL}^{-1}$ sobre o fungo *A. carbonarius*.



O óleo essencial de *Lippia* proporcionou uma inibição total do crescimento micelial a partir da concentração de 15,62 $\mu\text{L mL}^{-1}$, mas o óleo essencial de *Eremanthus* apresentou uma inibição de 100% na concentração a partir de 31,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$, visto que já era esperado para essas concentrações proporcionarem 100% de inibição, pois foram consideradas as concentrações mínimas inibitórias no teste anterior. Comparando-se os óleos essenciais nas mesmas concentrações percebe-se que o óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth. apresentou uma atividade melhor na porcentagem de inibição do crescimento micelial. Na concentração de 31,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e nas concentrações acima, os dois óleos essenciais apresentaram o mesmo efeito frente o fungo *A. carbonarius*, entretanto nas concentrações abaixo os óleos passaram a ter efeitos diferentes, visto que no óleo de alecrim d'angola proporcionou uma melhor atividade.

Observou-se também uma diferença significativa do fator óleo essencial, concentração e também da interação desses fatores sobre as porcentagens de inibição do crescimento micelial apresentado pelos óleos essenciais, de acordo com a análise de variância para o fungo filamentosso *Aspergillus flavus*, quando se fez o teste do crescimento micelial (Tabela 2B,

APÊNDICE B). Todos os dois óleos essenciais também apresentaram atividade sobre o fungo (Figura 20). Essa inibição variou significativamente entre os dois óleos essenciais e também entre as concentrações de cada óleo (Tabela 6).

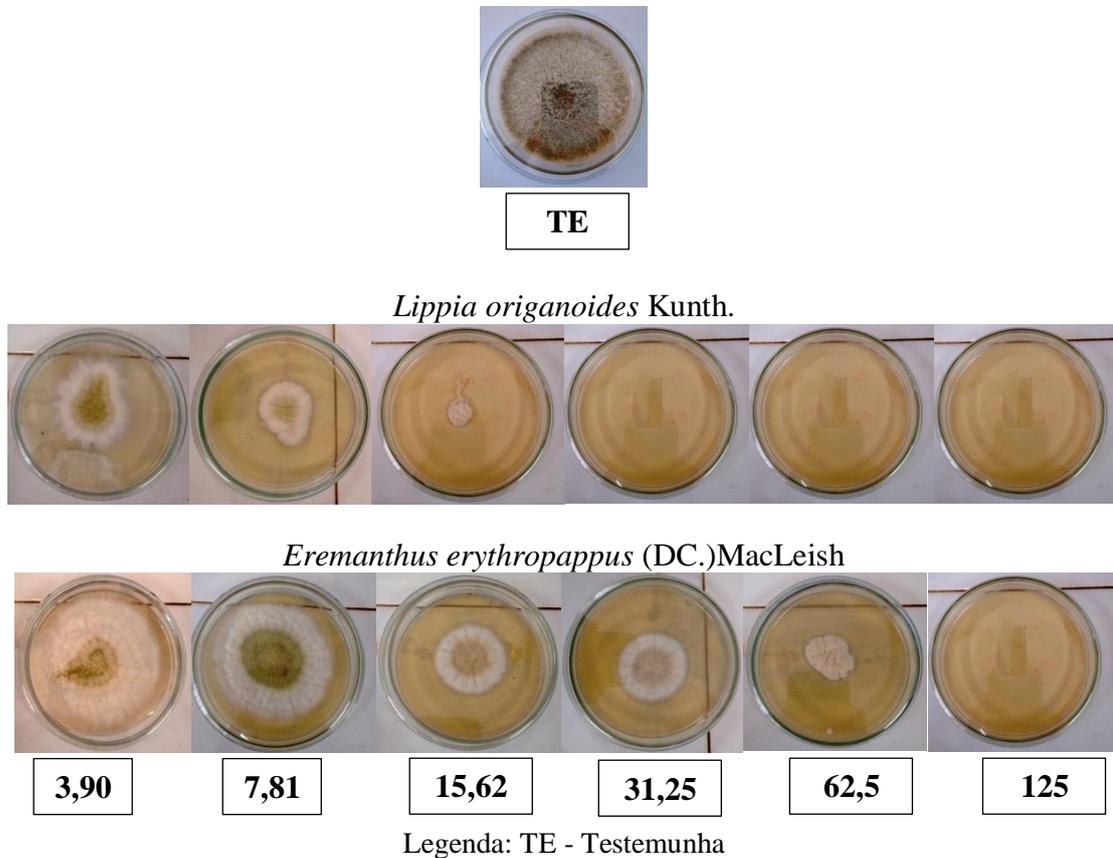
Tabela 6 – Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish em *Aspergillus flavus* no décimo dia de incubação.

Concentração ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Porcentagem de inibição micelial	
	<i>Eremanthus erythropappus</i>	<i>Lippia origanoides</i>
3,91	11,67 fB	31,48 dA
7,81	28,33 eB	44,44 cA
15,62	47,41 dB	76,48 bA
31,25	57,04 cB	100,00 aA
62,50	74,63 bB	100,00 aA
125,00	100,00 aA	100,00 aA

Legenda: As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e pela mesma letra maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A inibição do crescimento micelial foi proporcional ao aumento das concentrações dos óleos essenciais, ou seja, foi observado também um efeito de dose-dependência. Verifica-se que apenas na concentração de $125 \mu\text{L mL}^{-1}$ os dois óleos apresentaram o mesmo efeito de ação no crescimento micelial do fungo *A. flavus*. E nas concentrações abaixo a atividade foi diferente, sendo que o óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth. proporcionou um maior atividade antifúngica quando comparado com o de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, considerando as mesmas concentrações.

Figura 20 – Teste do crescimento e/ou inibição micelial realizados com os óleos essenciais de *L. origanoides* Kunth e *E. erythropappus* (DC.) MacLeish nas concentrações de 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,90 $\mu\text{L mL}^{-1}$ sobre o fungo *A. flavus*.



Nota-se que a inibição total do crescimento micelial do fungo filamentoso *Aspergillus flavus* ocorreu a partir da concentração de 31,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para o tratamento com o óleo essencial de *Lippia origanoides* e na concentração de 125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para o óleo essencial de *Eremanthus erythropappus*, concentrações consideradas no teste de difusão em disco como concentração mínima inibitória.

No teste de inibição do crescimento micelial para o fungo filamentoso *Aspergillus ochraceus* pode-se observar que por meio da análise de variância houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 3B, APÊNDICE B). Os dois óleos essenciais também proporcionaram uma inibição do crescimento micelial do fungo *A. ochraceus* (Figura 21). Observa-se que há variação na inibição, de acordo com o teste de médias, entre os óleos essenciais e as concentrações utilizadas no tratamento (Tabela 7).

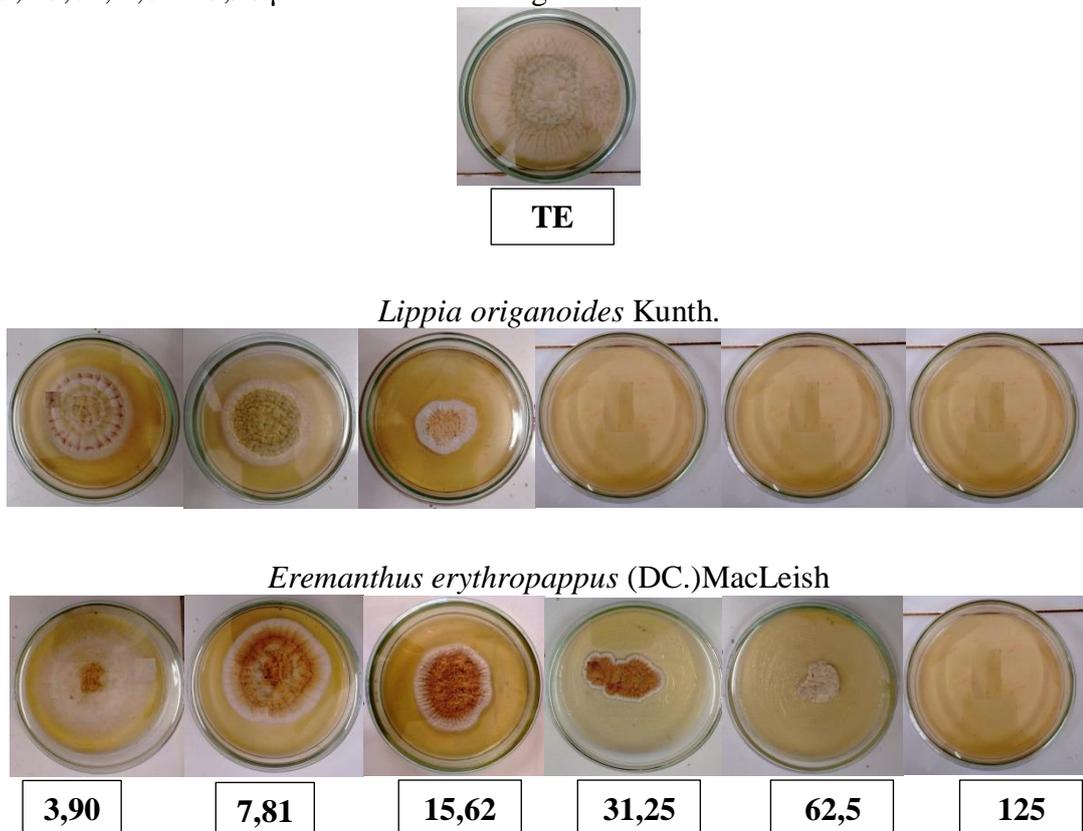
Tabela 7 – Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish em *Aspergillus ochraceus* no décimo dia de incubação.

Concentração ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Porcentagem de inibição micelial	
	<i>Eremanthus erythropappus</i>	<i>Lippia origanoides</i>
3,91	16,48 fB	26,85 dA
7,81	27,96 eB	37,22 cA
15,62	42,78 dB	63,15 bA
31,25	57,41 cB	100,00 aA
62,50	74,07 bB	100,00 aA
125,00	100,00 aA	100,00 aA

Legenda: As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e pela mesma letra maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A inibição do fungo *A. ochraceus* aumentou com o aumento das concentrações dos óleos essenciais, resultando também uma relação de dose-dependência sobre a atividade antifúngica dos óleos essenciais.

Figura 21 – Teste do crescimento e/ou inibição micelial realizados com os óleos essenciais de *L. origanoides* Kunth e *E. erythropappus* (DC.) MacLeish nas concentrações de 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,90 $\mu\text{L mL}^{-1}$ sobre o fungo *A. ochraceus*.



Legenda: TE – Testemunha

O óleo essencial de alecrim d'angola proporcionou uma inibição total do crescimento micelial do fungo *A. ochraceus* a partir da concentração de 31,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$, mas o óleo essencial de candeia apresentou inibição de 100% apenas na concentração de 125 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Essas concentrações confirmam o teste realizado anteriormente que avaliou a concentração mínima inibitória, ou seja, concentração necessária para proporcionar um efeito de total redução do crescimento do fungo. Comparando-se os óleos essenciais nas mesmas concentrações, percebe-se que na concentração de 125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ os dois óleos essenciais apresentaram o mesmo efeito sobre o fungo *A. ochraceus* e nas concentrações menores proporcionam efeitos diferentes, visto que o de alecrim d'angola proporcionou uma atividade melhor no crescimento micelial sobre esse fungo filamentoso.

Sonker et al. (2014) avaliando a atividade antifúngica de 15 óleos essenciais sobre os fungos *A. flavus*, *A. niger* e *A. ochraceus* dominantes em grãos de trigo em conserva utilizando uma concentração de 0,33 $\mu\text{L mL}^{-1}$ observaram que o óleo de *C. citratus* inibiu 100% do crescimento micelial em todos os fungos, seguido do óleo essencial de *Agerantum conyzoides* que proporcionou uma inibição (*A. flavus* 94%, *A. niger* 94,39% e *A. ochraceus* 95,76%), do óleo essencial de *Ocimum canum* (*A. flavus* 76,80%, *A. niger* 74,06%, *A. ochraceus* 72,88%) e dos demais óleos que apresentaram uma porcentagem de inibição inferior.

A atividade biológica dos óleos essenciais pode ser atribuída aos seus principais componentes ou devido ao sinergismo entre os seus diferentes constituintes. Mishra et al. (2013) estudando 14 componentes individuais de OEs e cinco combinações destes, observaram que os constituintes que apresentaram um grupo hidroxila ligado ao anel aromático apresentaram uma eficiência maior como inibidores do crescimento fúngico, danificando a integridade da membrana. E as combinações realizadas entre os constituintes mostraram um maior efeito, sendo que o sinergismo significa que a ação dos constituintes é maior do que os seus efeitos separados nas mesmas doses.

Romero et al. (2012) observaram que o óleo essencial de *Origanum vulgare* inibiu totalmente o crescimento micelial dos fungos a partir da concentração de 500 ppm. Os autores atribuíram esse potencial de ação aos constituintes monoterpênicos fenólicos, timol e carvacrol, relatando que eles podem perturbar as proteínas constituintes de membranas celulares e inibir a respiração celular.

De acordo com dados deste trabalho pode-se atribuir a eficiência dos óleos essenciais de alecrim d'angola e candeia ao sinergismo dos seus constituintes ou aos principais componentes que apresentam grupo OH frente à inibição do crescimento micelial de fungos

filamentosos. Entretanto verificou-se que o óleo de alecrim d'angola proporcionou um melhor efeito no crescimento em todos os fungos testados, que pode ser atribuído ao constituinte majoritário carvacrol presente no mesmo.

4.5 Atividade antiocratoxigênica

Os cromatogramas referentes ao padrão, dos controles de fungos *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* encontram-se em anexo (Figura 1C, Figura 2C e Figura 3C, respectivamente APÊNDICE C).

Os efeitos dos óleos essenciais sobre a inibição da síntese de ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius* estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Efeitos dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish na síntese de ocratoxina A em *Aspergillus carbonarius*.

Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Porcentagem de inibição	
	<i>Eremanthus erythropappus</i>	<i>Lippia origanoides</i>
3,91	-	92,03 c
7,81	62,06 c	98,05 b
15,62	84,27 b	100,00 a
31,25	100,00 a	-

Legenda: As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os dados foram convertidos em porcentagem de inibição, considerando o controle negativo contendo apenas fungo como 100%.

Pelos dados descritos na Tabela 8 observa-se que o aumento das concentrações dos óleos essenciais ocasionou a diminuição da produção de OTA, ou seja, apresentou uma relação de dose-dependente sobre a atividade dos óleos essenciais. Verificou-se pela análise de variância que em todas as concentrações dos óleos essenciais testadas houve diferença significativa entre a porcentagem de inibição da síntese de OTA (Tabela 1D, Tabela 2D, APÊNDICE D).

Observa-se que com o óleo essencial de alecrim d'angola foi necessário uma concentração de $15,62 \mu\text{L mL}^{-1}$ para inibir 100% da OTA produzida pelo fungo *A. carbonarius*, mas para o óleo de candeia foi necessária uma concentração de $31,25 \mu\text{L mL}^{-1}$, visto que essas concentrações são iguais as concentrações mínimas inibitórias de cada óleo essencial. Nas concentrações de $15,62$ e $7,81 \mu\text{L mL}^{-1}$, o óleo essencial de *Lippia* apresentou uma porcentagem de inibição de 100 e 98,05%, respectivamente. Entretanto o óleo essencial de candeia apresentou uma porcentagem de inibição mais baixa de 84,27 e 62,06%, respectivamente. Assim, observa-se que o óleo essencial de *Lippia* foi mais eficiente que o de candeia em relação

à inibição da síntese de OTA produzida pelo fungo *A. carbonarius*, pois suas menores concentrações inibiram mais que 90% da toxina.

Os efeitos dos óleos essenciais sobre a inibição da síntese de OTA por *Aspergillus ochraceus* estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Efeito dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish na síntese de ocratoxina A em *Aspergillus ochraceus*.

Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Porcentagem de inibição	
	<i>Eremanthus erythropappus</i>	<i>Lippia origanoides</i>
7,81	-	94,18 c
15,62	-	96,92 b
31,25	96,74 c	100,00 a
62,50	98,44 b	-
125,00	100,00 a	-

Legenda: As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os dados foram convertidos em porcentagem de inibição, considerando o controle negativo contendo apenas fungo como 100%.

Pelos dados descritos na Tabela 9 observa-se que a concentração de OTA produzida pelo fungo *Aspergillus ochraceus* foi inversamente proporcional às concentrações dos óleos essenciais, ou seja, o aumento das concentrações dos óleos essenciais ocasionou a diminuição da síntese de OTA revelando uma relação de dose-dependente sobre a atividade de inibição de OTA. Verificou-se que em todas as concentrações dos óleos essenciais testadas houve diferença significativa entre a porcentagem de inibição da síntese de OTA (Tabela 3D, Tabela 4D, APÊNDICE D).

Verifica-se que para o óleo essencial de *Lippia* foi necessária uma concentração de 31,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para inibir 100% da OTA produzida pelo fungo *A. ochraceus*, mas para o de candeia foi necessário uma concentração de 125 $\mu\text{L mL}^{-1}$, visto que essas concentrações já eram o esperado para a inibição de 100%, pois são as CMI de cada óleo. Pode-se observar que o óleo essencial de *Lippia* apresentou menores concentrações de inibição da síntese de OTA, entretanto o de candeia apresentou concentrações maiores para a inibição da síntese de OTA produzida pelo fungo *A. ochraceus*, sendo que as menores concentrações do óleo de alecrim d'angola inibiu a produção de OTA mais que 90%.

O fungo *Aspergillus carbonarius* sem adição de óleo produziu em média 39,15 $\mu\text{g g}^{-1}$ de OTA, ocorrendo uma redução de aproximadamente de 3,12 a 0 $\mu\text{g g}^{-1}$ com os tratamentos do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth. e 14,85 a 0 $\mu\text{g g}^{-1}$ com o óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish. O fungo *Aspergillus ochraceus* sem tratamento com óleo essencial produziu em média 0,270 $\mu\text{g g}^{-1}$ de OTA, apresentando uma redução de

aproximadamente de 0,016 a 0 $\mu\text{g g}^{-1}$ com os tratamentos do óleo essencial de alecrim d'angola e 0,009 a 0 $\mu\text{g g}^{-1}$ com o óleo de candeia. Geralmente a produção de OTA por *A. carbonarius* é maior do que *A. ochraceus*, o que é justificado pelo comportamento dos isolados tratados no estudo.

Passone, Girardi e Etcheverry (2012) estudaram a eficácia de cinco óleos essenciais que foram testados contra o crescimento e a produção de ocratoxina A em *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius*, levando em conta os níveis de atividade da água (a_w 0,98, 0,95 e 0,93). Os autores observaram que os fungos produziram uma maior quantidade de OTA quando a atividade da água foi de 0,95 a_w . O óleo essencial de *Lippia turbinata* var. inibiu 100 % a síntese de OTA produzida pelo *A. carbonarius* em uma concentração de 3000 $\mu\text{L L}^{-1}$ em todos os níveis de atividade de água. Eles sugeriram que o óleo essencial pode afetar a via biossintética da OTA.

A OTA é produzida por espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* sendo um contaminante em alimentos, induzindo quando ingeridas, citotoxicidade em células de mamíferos, carcinogenicidade e nefrotoxicidade em animais e humanos. Sabe-se que a produção de micotoxinas ocorre via metabolismo secundário dos fungos à medida que atinge a maturidade. Estudos relatam que a síntese da OTA ocorre mediante condições adequadas de temperatura, pH e atividade de água (RUYCK et al., 2015).

O aumento na produção de OTA pode ocorrer também em consequência do estresse ao qual o fungo pode ser submetido durante seu ciclo de vida, variando bruscamente as condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento. Passamani et al. (2014), avaliando o efeito da temperatura na produção de OTA, observaram maiores concentrações de micotoxinas em *A. carbonarius* e *A. niger* (10 e 7,0 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente), a 15°C em condições de stress, e a 25°C os níveis foram reduzidos.

Estudos de Jersek et al. (2014) afirmaram que a combinação de mono e sesquiterpenos, classes de constituintes encontrados nos óleos essenciais favorecem a inibição do crescimento e da produção de micotoxinas pelos fungos. Os autores estudando as atividades dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L., *Mentha piperita* L., *Foeniculum vulgare* Mill., *Abies alba* Mill. e os padrões timol e carvacrol observaram que eles podem ser utilizados como substitutos dos aditivos químicos nos alimentos para a inibição parcial ou completa do crescimento de *Penicillium verrucosum* e para a inibição da síntese de OTA.

Comparando os dados obtidos neste trabalho com aqueles que encontrados por Jersek et al. (2014), sugere-se que os compostos monoterpênicos, principalmente o carvacrol, podem

ser os responsáveis pela atividade antiocratogênica de *Lippia origanoides* Kunth. e os compostos sesquiterpênicos, α -bisabolol e óxido de α -bisabolol B, responsáveis pela a atividade de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish.

Sonker et al. (2014) avaliando a atividade do óleo essencial de *C. citratus* nas concentrações de 0,2 e 0,4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ sobre os fungos, observaram que a produção de micotoxinas foi significativa, reduzindo a quantidade de OTA de 0,20 a 0,09 $\mu\text{g L}^{-1}$ para *A. niger* e 0,29 a 0,14 $\mu\text{g L}^{-1}$ para *A. ochraceus*, respectivamente. Na concentração de 0,8 $\mu\text{L mL}^{-1}$, o óleo apresentou uma inibição de 100% de OTA para todos os dois fungos.

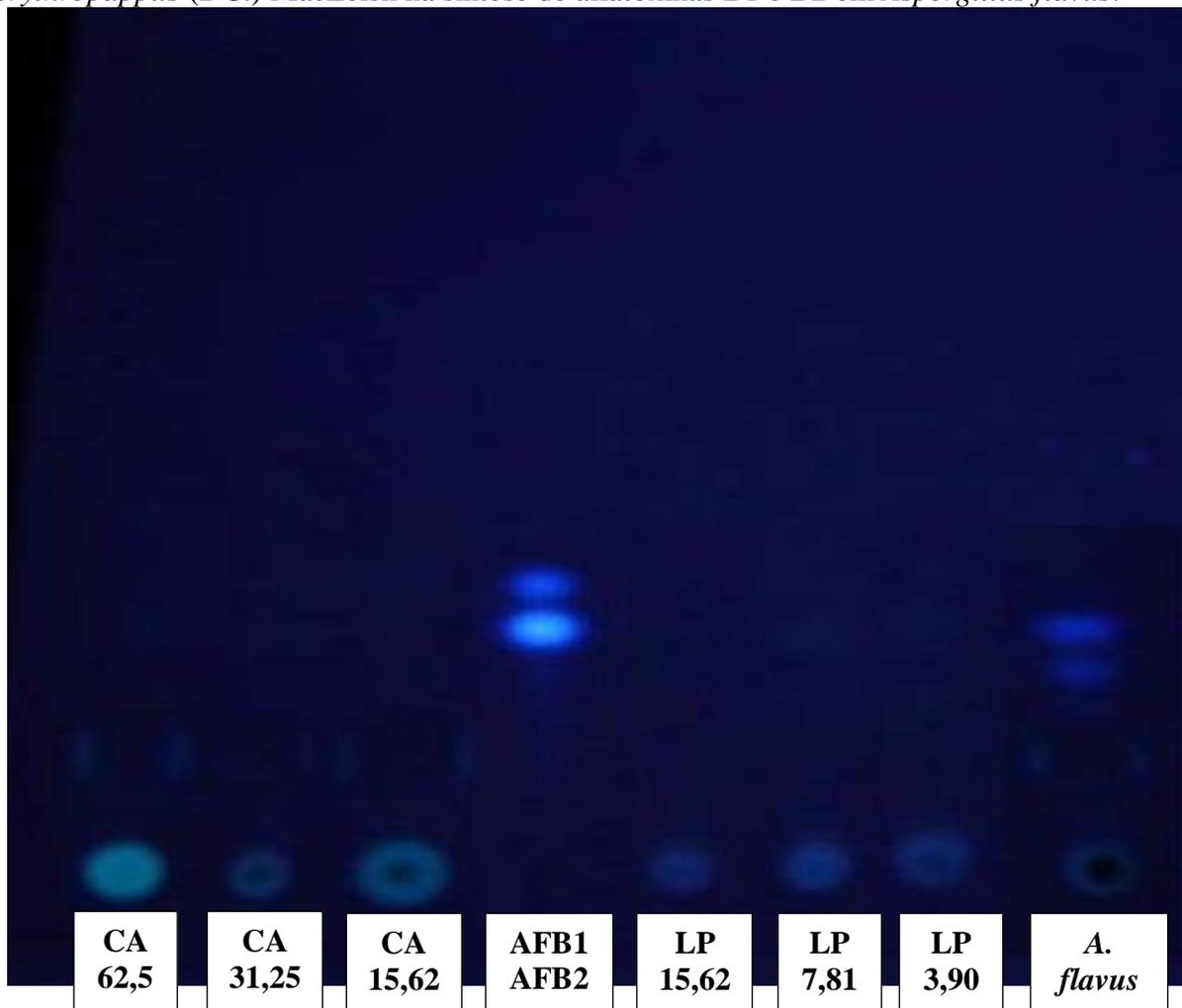
Segundo Hua et al. (2014) os mecanismos de ação dos óleos essenciais sobre os fungos não estão totalmente elucidados. Alguns agentes antifúngicos sintéticos atuam na biossíntese do ergosterol dos fungos, componente da membrana plasmática do fungo. A lise da célula fúngica (micélio) e a suspensão do crescimento micelial (corpo fúngico) é consequência da inibição da síntese do ergosterol. A interferência do óleo essencial na produção de micotoxinas é consequência da diminuição do número de micélios, visto que, as micotoxinas são produzidas principalmente pela estrutura de micélios que os fungos filamentosos são constituídos. Isto foi confirmado pelos autores que pesquisaram a influência do cinamaldeído sobre a produção do ergosterol. Estes observaram que o cinamaldeído causou uma pequena redução na produção de ergosterol em *A. ochraceus* nas concentrações de 25-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e inibiu significativamente quando utilizado nas concentrações de 75-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em relação à produção de OTA, houve uma inibição significativa em concentrações mais baixas (50-75 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e inibição quase total em concentrações mais altas (100-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Assim, correlacionaram a inibição do ergosterol com a redução da síntese de OTA, ou seja, a diminuição da produção de OTA foi proporcional à diminuição da biomassa fúngica.

Estes dados corroboram com os dados deste trabalho visto que a inibição da síntese de ocratoxina A correspondeu com a inibição do crescimento micelial. Ambos os testes proporcionaram uma diminuição na porcentagem do crescimento micelial e na porcentagem da ocratoxina A nas concentrações testadas dos óleos essenciais, sendo que com o aumento da concentração houve um aumento na porcentagem de inibição revelando uma relação de dose-dependente sobre as duas atividades dos óleos essenciais. Como as micotoxinas são produzidas em maior quantidade pela estrutura micelial, pode-se afirmar que a influência do óleo essencial no crescimento micelial, ou seja, no número de micélios reflete na produção de micotoxinas.

4.6 Efeito antiaflatoxigênico

Os efeitos dos óleos essenciais sobre a inibição da síntese de aflatoxinas B1 e B2 por *Aspergillus flavus* estão representados na Figura 22. Comparando-se os tratamentos utilizados com os padrões de Aflatoxinas B1 e B2 e o controle que foi apenas o inóculo de fungo *Aspergillus flavus*.

Figura 22 – Efeito dos óleos essenciais de *Lippia organoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish na síntese de aflatoxinas B1 e B2 em *Aspergillus flavus*.



Legenda: CA – *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, LP – *Lippia organoides* Kunth., AFB1 – Aflatoxina B1, AFB2 – Aflatoxina B2.

De acordo com a Figura 22, pode-se observar a presença de aflatoxinas B1 e B2 para o inóculo do fungo *Aspergillus flavus* sem o tratamento, comparando-se com os padrões AFB1 e AFB2. Utilizando-se os tratamentos com os óleos essenciais que foram três concentrações abaixo da concentração mínima inibitória, visualizou-se qualitativamente que estes foram

eficientes na inibição da síntese de aflatoxinas B1 e B2, visto que o óleo essencial de *Lippia* inibiu em concentrações menores quando comparado com o óleo de *Eremanthus*.

Considerando a quantidade de constituintes de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, pode-se dizer que sua atividade não seja atribuída apenas a um mecanismo específico, mas a existências de vários alvos que podem atacar a célula fúngica. Com isto pode-se atribuir o efeito positivo na inibição da síntese de aflatoxinas dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* e *Eremanthus erythropappus*, ao sinergismo dos diferentes compostos principais e secundários presentes nos mesmos ou a bioatividade dos constituintes em maior proporção. Esses estudos podem indicar que os óleos essenciais tem aplicação prática como inibidor da produção de micotoxinas.

Sabe-se que a produção de micotoxinas ocorre via metabolismo secundário dos fungos à medida que atinge a maturidade. Pesquisas de Bluma e Etcheverry (2008) relataram que a síntese das micotoxinas ocorre mediante condições adequadas de temperatura, pH e atividade de água. Os autores estudando o efeito de cinco óleos essenciais na produção de AFB1 de quatro isolados aflatoxigênicos, com três valores de atividade de água (a_w) e dois períodos de incubação, observaram que ocorreu a influência dos fatores isolados (concentração do OE, a_w , período de incubação e isolados) bem como a interação entre eles. Todos tiveram um resultado significativo na produção de AFB1. Para todos os óleos estudados, a produção de AFB1 foi dependente da a_w , concentração e período de incubação, sendo que nos isolados sem tratamento, a produção de micotoxina foi maior em 0,982 a_w elevando seu nível de produção em 35 dias de incubação.

Os óleos essenciais pesquisados por Bluma e Etcheverry (2008) foram de boldo, poleo, tomilho, cravo e anis. Encontraram como compostos majoritários o α -terpinoleno (73,8%), α -terpineno (15,30%) e p -cimeno (12,30%) são os constituintes majoritários do óleo essencial de boldo, óxido de pepiritona (48,60%) e limoneno (24,50%) são do óleo essencial de poleo, eugenol (75,4%) e β -cariofileno (14,70%) de cravo, anetol (97,60%) de anis e carvacrol (49,20%), p -cimeno (17,50%), α -terpinoleno (15,60%) de tomilho de montanha. Os autores observaram que os óleos essenciais são capazes de reduzir a produção de AFB1 nas concentrações de 500, 1000, 2000 e 3000 $\mu\text{g g}^{-1}$ a 11 dias de incubação e apresentam uma inibição um pouco menor com 35 dias. Os óleos essenciais de boldo, poleo e tomilho inibiram 100% nas concentrações de 2000 e 3000 $\mu\text{g g}^{-1}$ (0,982 a_w), e em todas as concentrações quando as atividades da água foram de 0,955 e 0,900. O óleo de cravo inibiu mais de 98% e o de anis apresentou um menor efeito na produção de AFB1 em todas as concentrações, sendo que ambos

aumentaram seu efeito de acordo com a redução da atividade da água. Essa atividade dos óleos essenciais frente aos fungos aflatoxigênicos pode estar relacionada com as estruturas químicas mais abundantes presente nos óleos ou até mesmo o sinergismo dos compostos minoritários com os majoritários. Os autores atribuíram à propriedade antimicrobiana dos óleos essenciais aos constituintes majoritários, visto que esses resultados corroboram com o presente trabalho, tendo alguns constituintes majoritários iguais e sendo eficientes na inibição da síntese de aflatoxinas.

Para Passone, Girardi e Etcheverry (2013) que também estudaram os óleos essenciais de poleo e cravo, observaram que teve um efeito significativo na inibição da síntese de AFB1. Os autores afirmam que a produção de AFB1 depende significativamente do isolamento fúngico e das suas interações. A disponibilidade média de água afeta a acumulação de AFB1 no fungo *Aspergillus flavus*, sendo que os níveis mais altos dessa micotoxina foram em 0,98 de atividade de água, reduzindo 56,3 e 73,1% em 0,95 e 0,93 a_w , respectivamente. Esse metabólito foi completamente inibido por doses de 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$, independente do meio de a_w . O óleo essencial de poleo reduziu a micotoxina entre 23,1-94% e 43,4-100% em atividade de água 0,98 e 0,95, respectivamente. E o óleo essencial de cravo foi o menos eficaz, inibindo a produção de AFB1 na concentração de 5000 $\mu\text{L L}^{-1}$ em 21,4, 78,7 e 78,2% a 0,98, 0,95 e 0,93 a_w , respectivamente. Os autores relataram que os efeitos dos fatores ambientais sobre os óleos essenciais demonstraram que a capacidade de inibir o crescimento fúngico e a síntese de micotoxinas dos mesmos estão sujeitos as alterações ou variações devido a diferentes fatores relacionados ao sistema de tipos e tempo de armazenamento. Observaram que a capacidade inibitória dos óleos essenciais permaneceu estável em relação às mudanças de temperatura, enquanto eles perderam a sua atividade no sexto mês de armazenamento e quando expostos a outras variáveis ambientais testadas. Assim a atividade antifúngica dos óleos essenciais diminui à medida que envelhecem e quando expostos à luz devido à oxidação sofrida pelos constituintes.

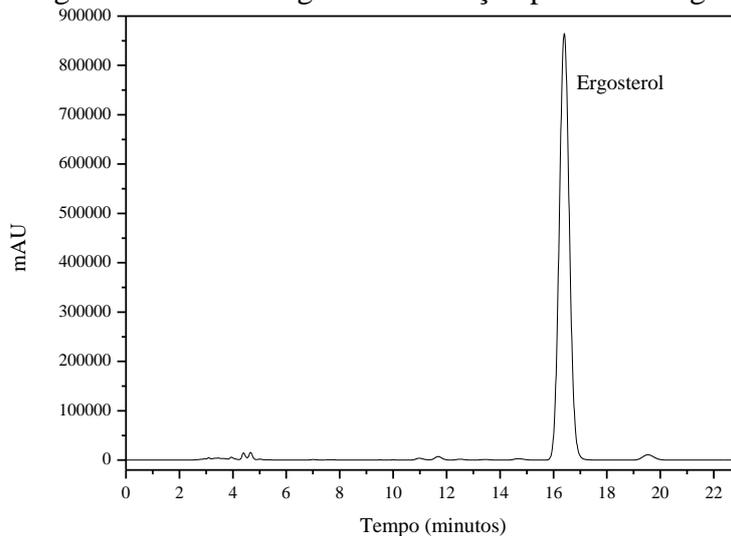
Nogueira et al. (2010) estudando o óleo essencial de *A. conyzoides* em diferentes concentrações observaram que o óleo atravessa não só a parede celular, mas também a membrana plasmática, interagindo com as organelas citoplasmáticas. Esse óleo essencial apresentou atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus* causando danos celulares e alterações morfológicas irreversíveis inibindo a síntese de aflatoxinas. Segundo os autores essa diminuição na produção de aflatoxina está associada ao aumento da rigidez da membrana e a diminuição da sua flexibilidade.

Sonker et al. (2014) detectaram o potencial de aflatoxinas por cromatografia em camada delgada quantificando-as por um espectrofotômetro a 360 nm. Durante a detecção das micotoxinas formaram-se manchas fluorescentes azuis e a cepa de *Aspergillus flavus* produziu $0,49 \mu\text{g L}^{-1}$ de micotoxinas. Observaram que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* nas concentrações de 0,2 e $0,4 \mu\text{L mL}^{-1}$ reduziu a produção de micotoxina de 0,27 a $0,12 \mu\text{g L}^{-1}$ e na concentração de $0,8 \mu\text{L mL}^{-1}$ o óleo essencial inibiu 100% a produção de AFB1.

4.7 Ergosterol

A Figura 23 ilustra o perfil cromatográfico da solução padrão do ergosterol, podendo observar a separação do composto. O tempo de retenção médio obtido para o composto analisado foi de 16,358.

Figura 23 – Cromatograma da solução padrão do ergosterol.



Legenda: Concentração do padrão $1000 \mu\text{g L}^{-1}$.

As Figuras 24, 25 e 26 apresentaram os perfis cromatográficos do ergosterol presente nos fungos *A. carbonarius*, *A. flavus* e *A. ochraceus*, respectivamente. Pode-se observar que houve a separação do composto nas amostras estudadas.

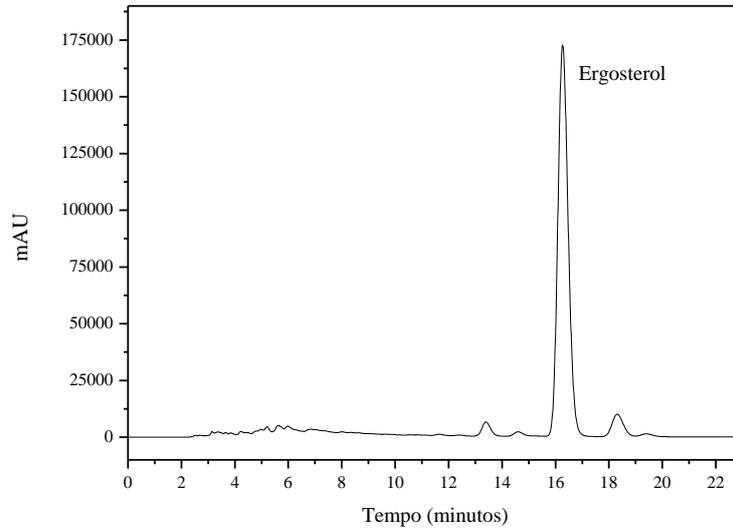
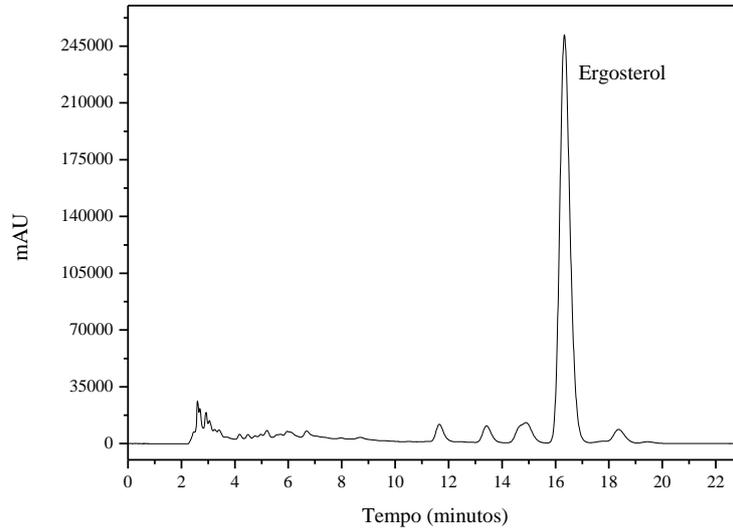
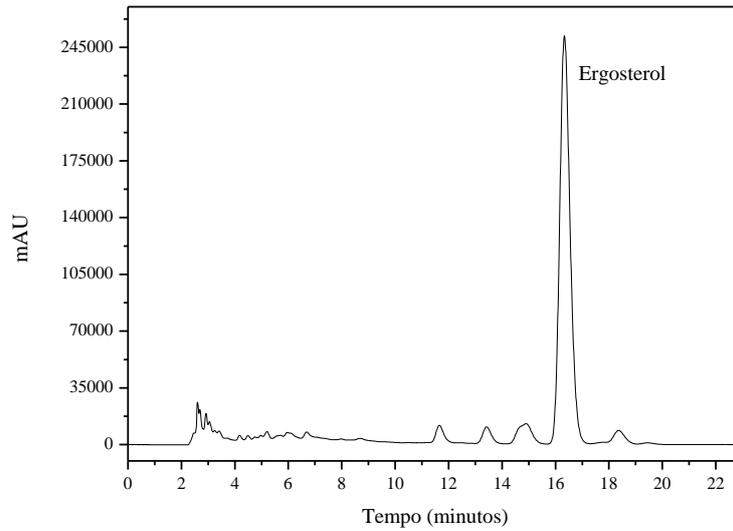
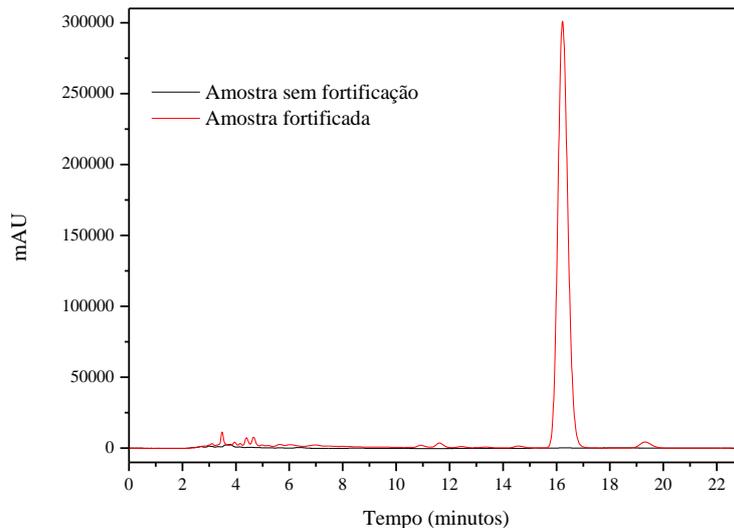
Figura 24 – Cromatograma do ergosterol presente no fungo *Aspergillus carbonarius*.Figura 25 – Cromatograma do ergosterol presente no fungo *Aspergillus flavus*.

Figura 26 – Cromatograma do ergosterol presente no fungo *Aspergillus ochraceus*.

4.7.1 Validação do método analítico

Os parâmetros analisados na validação do método proposto foram seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

Nas condições cromatográficas empregadas, constatou-se que as amostras não apresentaram substâncias interferentes no tempo de retenção do ergosterol analisado, o qual pode ser observado por meio do cromatograma da amostra isenta do composto analisado e dessa mesma amostra fortificada com o padrão do analito analisado, numa concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 27), atestando assim a seletividade do método.

Figura 27 – Cromatograma da amostra isenta de ergosterol e da amostra adicionada do padrão ergosterol numa concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$.

Para a confirmação da seletividade foi utilizado o método de adição padrão, fortificando a amostra com o padrão do analito estudado (Figura 28). Comparou-se a curva da amostra na presença do analito estudado sendo fortificada adicionando-se o padrão em várias concentrações com a curva do padrão nas mesmas concentrações utilizadas para fortificar a amostra (Figura 29).

Figura 28 – Cromatogramas da amostra na presença do analito estudado, do padrão ergosterol e da amostra fortificada.

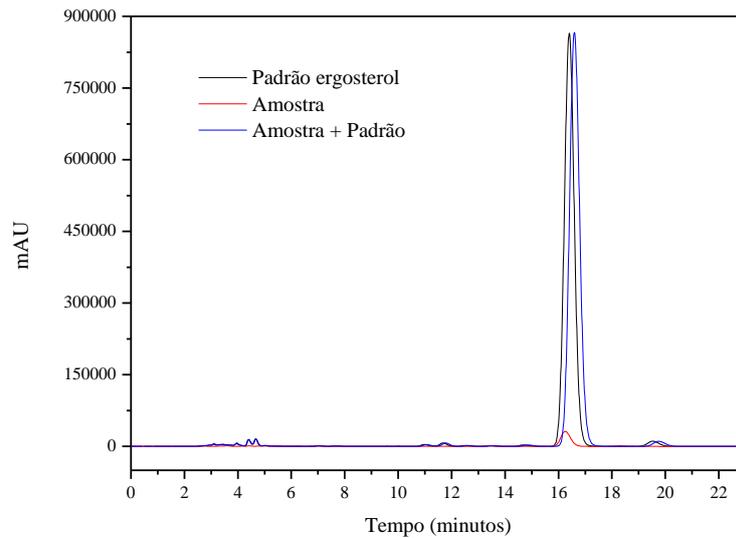
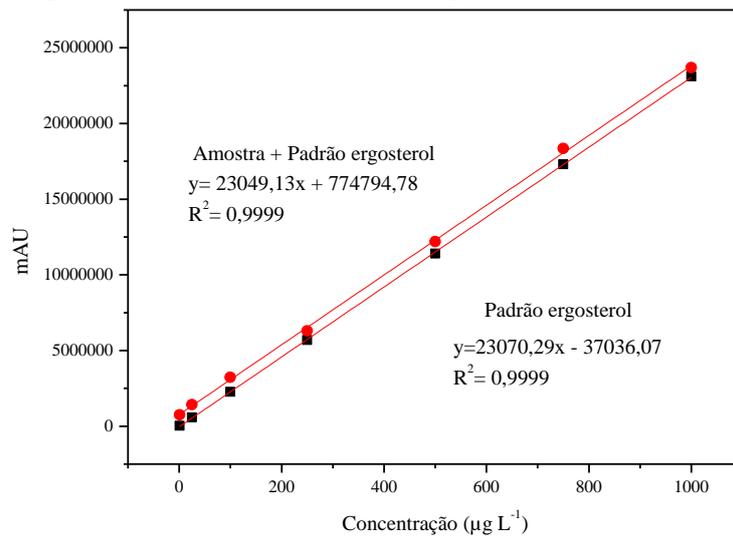


Figura 29 – Curva analítica da amostra fortificada com o padrão em diferentes concentrações e curva analítica do padrão em diferentes concentrações.



Por meio da construção da curva analítica, foi possível avaliar a linearidade do método pela estimativa do coeficiente de determinação referente à equação da curva, obtida por regressão linear. Foi obtido um coeficiente de determinação de 0,9999, mostrando a forte

correlação linear entre a concentração do composto analisado e a área do pico, com valores acima de 0,99 para coeficientes de correlação, conforme recomendado na literatura (ANVISA, 2003) (Tabela 10).

Tabela 10 – Parâmetros e coeficiente de determinação (R^2) da curva analítica

Composto	B	A	R^2
Ergosterol	23070,29	-37036,07	0,9999

Legenda: Regressão linear – $y = bx + a$

A precisão do método analítico foi avaliada em relação ao grau de repetitividade e precisão intermediária, estimando o coeficiente de variação (CV) para o composto analisado, a partir de sucessivas medições, para três concentrações diferentes.

Pelos resultados obtidos mediante os testes de repetitividade, obtiveram-se os CV para a análise do ergosterol, de 1,84% na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, de 1,17% na concentração de $250 \mu\text{g L}^{-1}$ e de 1,49% na concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 11).

Para o teste realizado na avaliação da precisão intermediária, foram obtidos valores para o coeficiente de variação (CV) na análise de ergosterol de 2,44% na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, de 2,03% na concentração de $250 \mu\text{g L}^{-1}$ e de 0,64% na concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 12).

Tabela 11 – Médias das áreas dos picos e coeficientes de variação (CV) obtida para o ergosterol na avaliação da repetitividade do método.

Ergosterol			
Áreas	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Desvio	CV (%)
237593,3	11,904	0,219	1,84
6295818,0	274,503	3,223	1,17
23107533,7	1003,219	14,938	1,49

Tabela 12 – Médias das áreas dos picos e coeficientes de variação (CV) obtidos para o ergosterol na avaliação da precisão intermediária do método.

Ergosterol			
Áreas	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Desvio	CV (%)
238864,7	11,959	0,292	2,44
6297274,1	274,566	5,578	2,03
22840909,4	991,663	6,327	0,64

Pode-se observar que tanto para o teste de repetitividade quanto para a precisão intermediária, os valores encontrados para o CV estão abaixo do limite de 5% para o composto analisado, conforme é recomendado pela ANVISA, mostrando que o método apresenta precisão para o ergosterol analisado em amostras de fungos.

Ribani et al. (2004), afirmam que métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um CV de 1 a 2%, atestando assim, a precisão do método analítico proposto. Apesar do composto ter apresentado um CV abaixo de 1% na maior concentração para o teste de precisão intermediária, o método apresenta precisão analisado nas amostras, devendo-se considerar a complexidade das amostras de fungo contendo os tratamentos.

Os limites de detecção e quantificação encontrados para o ergosterol pelo método analítico foram de 1,461 e 3,523 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os valores obtidos apresentaram-se inferiores aos encontrados por Yuan et al (2007) (LD - 0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LQ – 0,07 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e Kohiyama et al. (2015) (LD - 0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LQ – 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), o que demonstra a boa sensibilidade do método para a análise do ergosterol em amostras de fungos com os tratamentos dos óleos essenciais. Ribani et al. (2004) atribuem essas diferenças nos parâmetros às diferentes condições cromatográficas, como a aparelhagem e/ ou metodologias adotadas para a quantificação do composto.

A exatidão do método analítico foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, em que a concentração do ergosterol foi calculada pelo aumento das áreas dos picos, obtida após a adição de uma quantidade conhecida dos padrões a três amostras obtidas aleatoriamente dos três fungos utilizados (*Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*). Os resultados referentes à porcentagem de recuperação estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Recuperação do ergosterol em amostras de fungos.

Ergosterol					
Fungos	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)				%
	Amostra	Adicionado	Encontrado	Esperado	Recuperação
<i>Aspergillus carbonarius</i>	37,53	11,66	46,05	47,59	96,76
	37,53	268,91	274,52	304,84	90,05
	37,53	985,06	1020,06	1020,98	99,91
<i>Aspergillus flavus</i>	16,33	11,66	24,78	26,39	93,89
	16,33	268,91	298,74	283,64	105,32
	16,33	985,06	852,98	999,78	85,32
<i>Aspergillus ochraceus</i>	15,17	11,66	23,99	25,23	95,08
	15,17	268,91	282,09	282,48	99,86
	15,17	985,06	856,75	998,62	85,79
				Média	94,66

Com base nos limites aceitáveis para a porcentagem de recuperação (70 a 120%), observa-se que o método apresentou boa recuperação para o composto ergosterol, sendo que os valores parciais e o valor médio incluíram-se dentro do intervalo de limite aceitável. Para amostras mais complexas o limite aceitável pode ser considerado uma faixa de 50 a 120%.

Yuan et al. (2008) apresentaram porcentagem de recuperação similar para o ergosterol analisado numa faixa de 99,1 e 101,4%. Kohiyama et al. (2015) apresentaram porcentagem de recuperação mais baixa que neste estudo (77,4%).

4.7.2 Quantificação do ergosterol nas amostras de fungos

Os resultados obtidos para a quantificação do ergosterol nos fungos estudados (*A. carbonarius*, *A. flavus* e *A. ochraceus*) com os tratamentos realizados com óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish estão apresentados nas Tabelas 14, 15, 16.

Os valores da porcentagem dos óleos essenciais sobre a inibição da síntese de ergosterol por *Aspergillus carbonarius* em relação às suas concentrações estão apresentados na Tabela 14. Verifica-se um efeito significativo do fator óleo essencial, concentração e também da interação desses fatores sobre as porcentagens de inibição do ergosterol apresentadas pelos óleos essenciais. Nota-se que há um aumento da porcentagem de inibição do ergosterol de acordo com o aumento da concentração dos óleos essenciais, ou seja, observando uma relação dose-dependente em relação aos tratamentos testados dos óleos e a atividade de inibição da síntese do ergosterol. (Tabela 1E, Tabela 2E, APÊNDICE E).

Tabela 14 – Efeito dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish na síntese de ergosterol em *Aspergillus carbonarius*.

Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Porcentagem de inibição	
	<i>Eremanthus erythropappus</i>	<i>Lippia origanoides</i>
1,95	-	77,52 c
3,91	76,56 d	84,08 b
7,81	88,18 c	87,19 b
15,62	92,06 b	100,00 a
31,25	100,00 a	-
Fluodioxonil	100,00 a	100,00 a

Legenda: As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os dados foram convertidos em porcentagem de inibição, considerando o controle negativo, contendo apenas fungo, como 100%.

Pode-se observar que cada concentração dos óleos essenciais, 15,62 e 31,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para o óleo de *Lippia* e *Eremanthus*, respectivamente são iguais quando comparadas com o antifúngico sintético fluodioxonil pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, frente a porcentagem de inibição da síntese de ergosterol, ou seja, o potencial de inibição da produção de ergosterol foi semelhante para ambos os tratamentos quando comparados separadamente com o controle positivo. Essas concentrações apresentaram uma inibição total do ergosterol que

são as concentrações referentes aos seus valores de CMI, confirmando que o primeiro óleo essencial apresenta uma maior atividade em concentrações menores em relação ao segundo.

Para o fitopatógeno *Aspergillus flavus*, quando se fez o teste de quantificação do analito estudado, observou-se também diferença significativa entre os tratamentos, de acordo com a análise de variância (Tabela 3E, Tabela 4E, APÊNDICE E). Os óleos essenciais apresentaram inibição da síntese de ergosterol por *A. flavus*. O teste de média acusou a variação na inibição de acordo com as diferentes doses de cada óleo utilizado (Tabela 15).

Tabela 15 – Efeito dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish na síntese de ergosterol em *Aspergillus flavus*.

Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Porcentagem de inibição	
	<i>Eremanthus erythropappus</i>	<i>Lippia origanoides</i>
3,91	-	73,34 d
7,81	-	84,64 c
15,62	81,28 c	90,19 b
31,25	89,47 b	100,00 a
62,50	97,74 a	-
125,00	100,00 a	-
Fluodioxonil	100,00 a	100,00 a

Legenda: As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os dados foram convertidos em porcentagem de inibição, considerando o controle negativo, contendo apenas fungo, como 100%.

Comparando-se o antifúngico sintético fluodioxonil com cada tratamento na porcentagem de inibição da síntese de ergosterol, pode-se observar que as concentrações testadas que não diferem do controle positivo pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, são de 31,25 e 125 $\mu\text{L mL}^{-1}$, para os óleos essenciais de *Lippia* e *Eremanthus*, respectivamente. Assim tanto o controle positivo quanto esses tratamentos têm o mesmo efeito na inibição da produção de ergosterol quando se compara cada concentração do tratamento com o controle.

A inibição da síntese de ergosterol por *Aspergillus flavus* aumentou proporcionalmente com o aumento das concentrações dos óleos essenciais, observando-se também um efeito dose-dependente. A inibição total da síntese de ergosterol no fungo *Aspergillus flavus* ocorreu nas concentrações de 31,25 e 125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para os óleos essenciais de alecrim d'angola e candeia, respectivamente, que também são as concentrações iguais aos seus valores de CMI.

Verifica-se que o óleo essencial de alecrim d'angola inibiu a síntese de ergosterol em concentrações bem menores que o óleo de candeia, sendo que as menores concentrações do primeiro óleo inibiram mais de 70% do metabólito secundário produzido pelo *A. flavus*.

Comparando as duas concentrações comuns aos dois óleos (15, 62 e 31,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$), observa-se que o óleo essencial de *Lippia* apresentou uma inibição maior (90,19 e 100%, respectivamente) e o óleo essencial de *Eremanthus* uma atividade menor (81,28 e 89,47%, respectivamente).

Observou-se por meio da análise de variância, que houve diferença significativa entre as concentrações dos óleos essenciais sobre as porcentagens de inibição da síntese de ergosterol apresentado pelos óleos essenciais diante do método utilizado sobre o fungo filamentoso *Aspergillus ochraceus*, (Tabela 5E, Tabela 6E, APÊNDICE E). Os óleos essenciais estudados apresentaram inibição da síntese de ergosterol por *A. flavus*. O teste de média acusou a variação na inibição de acordo com as diferentes doses de cada óleo utilizado (Tabela 16).

Tabela 16 – Efeito dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish na síntese de ergosterol em *Aspergillus ochraceus*.

Concentração ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Porcentagem de inibição	
	<i>Eremanthus erythropappus</i>	<i>Lippia origanoides</i>
3,91	-	62,82 c
7,81	-	70,08 b
15,62	47,61 d	73,55 b
31,25	79,40 c	100,00 a
62,50	85,56 b	-
125,00	100,00 a	-
Fluodioxonil	97,38 a	97,38 a

Legenda: As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os dados foram convertidos em porcentagem de inibição, considerando o controle negativo, contendo apenas fungo, como 100%.

Pelos dados descritos na Tabela 16, observa-se que o antifúngico sintético fluodioxonil comparado com as concentrações de cada óleo essencial (31,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para o de *Lippia* e 125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para o de *Eremanthus*) possuem o mesmo efeito em relação a atividade na porcentagem de inibição da produção de ergosterol. A inibição do ergosterol produzido pelo fungo *Aspergillus ochraceus* aumentou com o aumento das concentrações dos óleos essenciais, ou seja, observou-se também um efeito de dose-dependente em relação aos tratamentos testados.

As concentrações de 31,25 e 125 $\mu\text{L mL}^{-1}$, para os óleos essenciais de alecrim d'angola e candeia, respectivamente, foram as que tiveram uma porcentagem de 100% de inibição da síntese de ergosterol produzida pelo fungo *A. flavus*. Observa-se que o óleo essencial de alecrim d'angola inibiu a síntese de ergosterol em concentrações bem menores que o óleo de candeia, sendo que as menores concentrações do primeiro óleo inibiram mais de 60% do metabólito secundário produzido pelo *A. flavus*. Comparando duas concentrações comuns aos dois óleos

(15, 62 e 31,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$), verifica-se que o óleo essencial de *Lippia* apresentou uma inibição maior (73,55 e 100%, respectivamente) e o óleo essencial de *Eremanthus* uma atividade bem mais baixa (47,61 e 79,40%, respectivamente).

Para os óleos essenciais de *Lippia origanoides* e *Eremanthus erythropappus* nos testes de quantificação da porcentagem de inibição do ergosterol frente aos fungos *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*, as análises de regressão de primeira ordem foram significativas e os coeficientes de correlação apresentados pelas equações de primeira ordem confirmaram que ela ajusta-se ao comportamento da relação de dose-dependência entre a concentração e a atividade de inibição do ergosterol (Figura 1F, Figura 2F, Figura 3F, APÊNDICE F).

O ergosterol é um esteroide que está presente na constituição da membrana dos fungos. Esse composto participa como modulador de fluidez da membrana fúngica, qualquer efeito nesse metabólito secundário proporciona um desequilíbrio nessa fluidez promovendo alterações homeostáticas intracelulares, sendo um composto fundamental na sobrevivência do micro-organismo. Assim, uma alteração nessa estrutura celular pode vir a tornar o ambiente fúngico intracelular incompatível com a sua sobrevivência (SOUZA et al., 2011).

Estudos de Pinto et al. (2009) demonstraram que os óleos essenciais possuem um potencial para proporcionar uma redução na síntese de ergosterol na membrana celular de fungos. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode estar relacionada à sua característica hidrofóbica e lipofílica, em consequência disso eles passam através da parede celular e da membrana citoplasmática, interrompem a estrutura das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, conseqüentemente há uma alteração na permeabilidade que reflete a um vazamento do conteúdo celular.

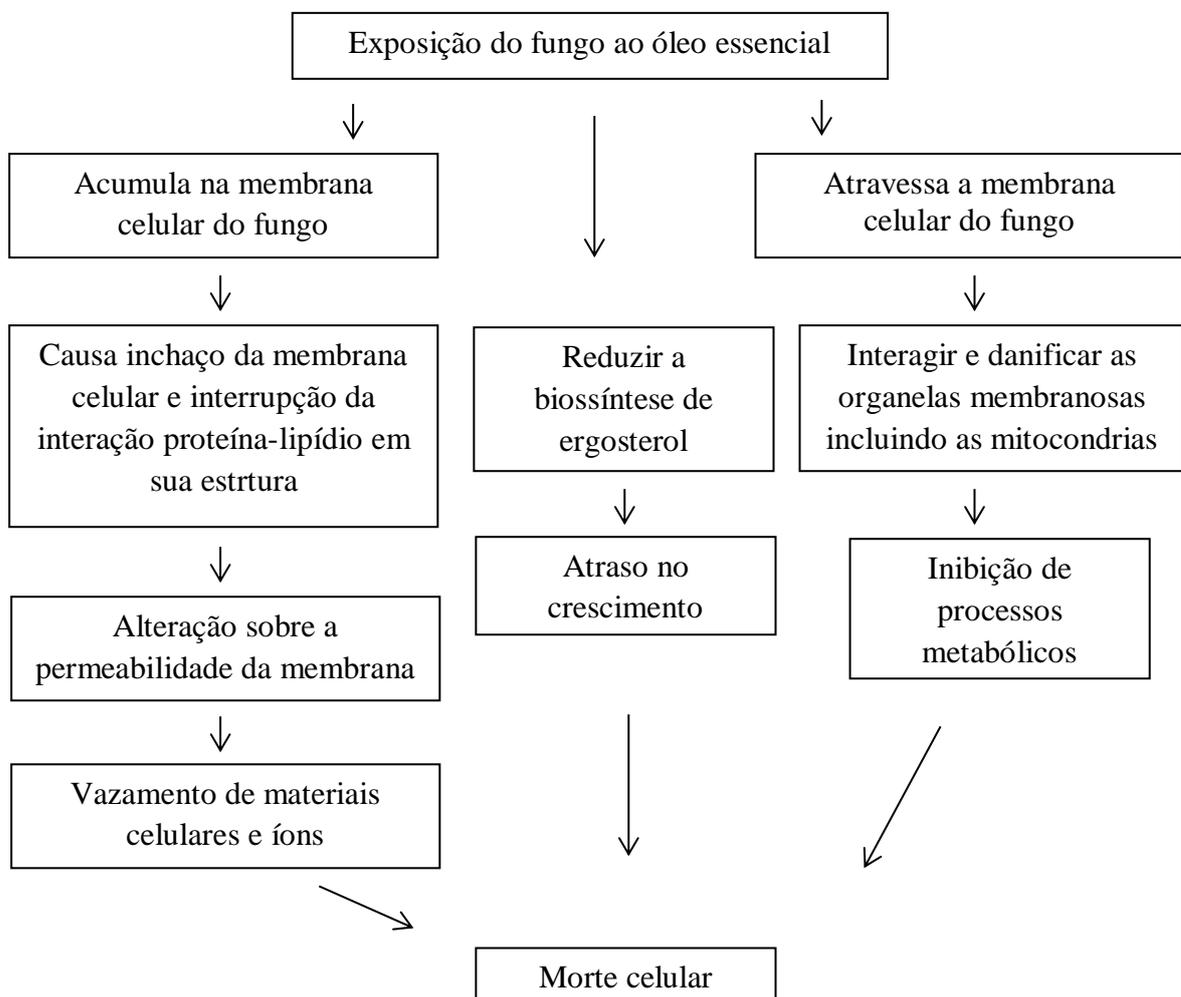
Os estudos de Kedia et al. (2014a), Kedia et al. (2014b), Kedia et al. (2015) e Tian et al. (2012b) com os óleos essenciais de *Cuminum cyminum* (L.), *Mentha spicata* L., *Trachyspermum ammi* L. e *Cinnamomum jensenianum* Hand-Mazz, respectivamente, resultaram-se em uma redução de 100% do teor de ergosterol nas concentrações de 0,6 $\mu\text{L mL}^{-1}$, 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$, 0,8 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e 6 $\mu\text{L mL}^{-1}$, para cada respectivo óleo essencial, frente ao fungo *Aspergillus flavus*.

Os autores verificaram que houve uma redução no crescimento micelial, assim como no teor de ergosterol, sugerindo uma forte ação do óleo essencial sobre a membrana plasmática do fungo. Ressalta-se que os constituintes dos óleos essenciais que apresentam atividade antimicrobiana atravessam a membrana celular, interagem com as enzimas e proteínas da

membrana responsáveis pela biossíntese do ergosterol, produzindo um fluxo de prótons para o exterior da célula que, em consequência rompe a sua organização, ocasionando um desequilíbrio na permeabilidade celular, culminando na morte do fungo. Esses estudos revelaram que os óleos podem induzir uma interferência na biossíntese de ergosterol e uma diminuição subsequente na biomassa do fungo, com o aumento das concentrações.

O esquema abaixo (Figura 30) descrito pelos autores Kedia, Jha e Dubey (2015) representa algumas rotas dos óleos essenciais sobre os fungos.

Figura 30 – Contorno esquemático do modo de ação dos óleos essenciais em fungos.



Fonte: Kedia, Jha e Dubey (2015)

A presente pesquisa corrobora com esses trabalhos citados, com o aumento das concentrações dos óleos essenciais estudados, houve um aumento na inibição do crescimento micelial visto no teste anterior e também na inibição da biossíntese de ergosterol, confirmando a ação que os óleos essenciais proporcionam sobre a membrana plasmática do fungo. De acordo com a metodologia utilizada neste trabalho, a rota de ação dos óleos essenciais de *Lippia*

origanoides e *Eremanthus erythropappus* sobre os fungos filamentosos *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus* ocorreu através da redução da biossíntese de ergosterol atrasando o crescimento micelial e conseqüentemente a morte do fungo.

Farag et al. (1989) relatam em trabalhos que existe uma relação entre a atividade antimicrobiana e as estruturas químicas dos compostos mais abundantes nos óleos essenciais. Geralmente, a expansão do efeito inibitório dos óleos pode ser atribuída à presença de composto com a presença de uma fração aromática contendo um grupo funcional polar. De acordo com os autores, grupos OH em compostos fenólicos são bastante reativos e capazes de formar ligações de hidrogênio com os locais ativos das enzimas-alvo da biossíntese do ergosterol e das micotoxinas, aumentando a atividade antimicrobiana. Além da aromaticidade da molécula, o efeito indutivo da ramificação isopropil deve ser levado em consideração.

A presença de grupos OH nos compostos majoritários (carvacrol e α -bisabolol, respectivamente) e em compostos minoritários dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e de *Eremathus erythropappus* (DC.) MacLeish podem ser os responsáveis pela atividade antifúngica, inibição do crescimento micelial, inibição da produção de micotoxinas e inibição da síntese de ergosterol. Pode-se observar que, em todos os testes, o óleo essencial de *Lippia origanoides* apresentou uma atividade melhor, respondendo em concentrações mais baixas quando comparadas com o óleo essencial de *Eremathus erythropappus*. Isso pode ser explicado pela presença de aproximadamente 59% do carvacrol como constituinte majoritário do óleo de alecrim-d'angola. O carvacrol é um monoterpreno oxigenado com características fenólicas, sendo reativo e apresentando capacidade de ligar a partir de ligações de hidrogênio com as enzimas ativas da rota de biossíntese do ergosterol e das micotoxinas nos fungos filamentosos.

5 CONCLUSÃO

Os constituintes majoritários identificados e quantificados no óleo essencial das folhas frescas de *Lippia origanoides* Kunth. foram carvacrol (58,72%), ρ -cimeno (15,37%), γ -terpineno (12,73%) e *trans*- β -cariofileno (4,88%). No óleo essencial do cerne da madeira de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, foi o α -bisabolol (98,85%).

Os óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish apresentaram atividade antifúngica, inibição do crescimento micelial, inibição da síntese de ocratoxina A produzida pelos fungos *A. carbonarius* e *A. ochraceus*, de aflatoxinas B1 e B2 produzidas pelo *A. flavus* e de inibição da biossíntese de ergosterol nos fungos filamentosos *A. carbonarius*, *A. flavus* e *A. ochraceus*. Sendo o óleo essencial de alecrim-d'angola o que proporcionou um melhor resultado em relação a essas atividades em concentrações mais baixas, quando comparado com o óleo de candeia.

A espécie *Aspergillus carbonarius* foi mais sensível aos óleos essenciais de *Lippia origanoides* e *Eremanthus erythropappus* que as espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*.

Os óleos essenciais ocasionaram alterações no desenvolvimento dos fungos estudados, proporcionando uma redução no número de micélios, inibindo a síntese de ergosterol e, conseqüentemente, diminuindo a produção de ocratoxina A e aflatoxinas B1 e B2. A diminuição da produção das micotoxinas foi proporcional à diminuição da biomassa fúngica.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oils componentes by gas chromatography/ mass spectroscopy**. 4th ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804p.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para a avaliação de métodos analíticos e bioanalíticos**. RE n° 899, 29 de maio de 2003.
- 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.
- 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, Jan./ Mar. 2015.
- ANDRADE, M. A.; LANÇAS, F. M. Estado-da-arte na análise cromatográfica de Ocratoxina A em amostras de alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 1, p. 31-52, 2015.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb, 2008.
- BETANCUR-GALVIS, L. et al. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K grown in Colombia. **Revista de la Universidad de Santander. Salud**, Bucaramanga, v. 43, n. 2, p. 141-148, May./ Aug. 2011.
- BOMFIM, N. S. et al. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. **Food Chemistry**, v. 166, p. 330-336, Jan. 2015.
- BLUMA, R. V.; ETCHEVERRY, M. G. Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. **Food Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 324-334, Feb. 2008.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 229-239, jul. 2010.
- BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. **American Society of Plant Physiologists**. 2 ed., Editora: John Wiley & Sons, 2015. 1280 p.
- DAUM, G. et al. Biochemistry, Cell Biology and Molecular Biology of Lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, n. 16, p. 1471-1510, Aug. 1998.
- DJENANE, D. et al. Antioxidant and antibacterial effects of Lavandula and Mentha essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. **Meat Science** v. 92, n. 4, p. 667-674, Dec. 2012.
- DUTRA, R. C. et al. Caracterização morfoanatômica das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 6, p. 818-824, 2010.

- FARAG, R. S. et al. Antimicrobial activity of some egyptian spice essential oils. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 9, p 665-667, Sep. 1989.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ed.; Anvisa: Brasília, Brasil, v. 1, p. 198-199. 2010.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./ Dez. 2011.
- FILHO, F. C. C.; CALDAS, M. L.; MURATORI, M. C. S. Fungos e aflatoxinas em cereais: uma revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 2, n. 2, p. 122-130, 2015.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL. As micotoxinas. **Revista Oficial da Food Ingredients South America**, n 7, p. 32-40, 2009.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, Out. 2007.
- GOMES, G. A. et al. Chemical composition and acaricidal activity os essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and ergorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 111, n. 6, p. 2423-2430, Sep, 2012.
- HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7nd ed. Tradução de Jairo Bordinhão et al. Rio de Janeiro: LTC, 2008.
- HASHIMOTO, K. et al. Mycotoxin production of some *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus fumigatus* isolated from the air. **Micotoxyns**, v. 62, n. 1, p. 1-6, 2012.
- HUA, H. et al. Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production. **Journal PLOS One**, v. 9, n. 9, p. e108285, Sep. 2014.
- IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 7, p. 138-161, 2010.
- IMAMURA, K. B. et al. Incidência de aflatoxinas no amendoim (*Arachis hypogaea* L) cru em casca da região da Alta Paulista-SP, durante o período de 2011 a 2012. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 73, n.2, p.178-187, 2014.
- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos analíticos. **DOQ-CGCRE-008**, jul. 2011.
- Internacional Agency for Research on Cancer. (IARC) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 56, 1993. Disponível em:
<<https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56-18.pdf>>;
<<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsGroupOrder.pdf>>
<<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>> Acesso em: 26 de janeiro de 1993.
- IOANNIDS, A-G et al. Modelling the influence of temperature, water activity and sodium metabisulphite on the growth and OTA production of *Aspergillus carbonarius* isolated from Greek wine grapes. **Food Microbiology**, v. 49, p. 12-22, Aug. 2015.

JERSEK, B. et al. Effects of selected essential oils on the growth and production of ochratoxin A by *Penicillium verrucosum*. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, Zagreb, v. 65, n. 2, p. 199–208, June 2014.

JR, C. V.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

KEDIA, A.; JHA, D. K.; DUBEY, N. K. Plant essential oils as natural fungicides against stored product fungi. **Microbiology Book Series**, n. 5, v. 1, p. 208-214, 2015.

KEDIA, A. et al. Antifungal and antiaflatoxic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 168-169, p. 1-7, Jan. 2014a.

KEDIA, A. et al. Antifungal, antiaflatoxic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.89, p. 29-36, April 2014b.

KEDIA, A. et al. *Trachyspermum ammi* L. essential oil as plant based preservative in food system. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 104-109, July 2015.

KOCIC-TANACKOV, S. et al. Antifungal activity of the onion (*Allium cepa* L.) Essential oil against *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species isolated from food. **Journal of Food Processing and Preservation**, July 2016.

KOHIYAMA, C. Y. et al. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1006-1010, April 2015.

KRÜGER, C. D. et al. Níveis séricos de ocratoxina A e lesões em suínos no Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 37, n. 3, p. 198-202, Jul./ Set. 2015.

LAPPA, I. K. et al. In vitro evaluation of essential oils against *Aspergillus carbonarius* isolates and their effects on Ochratoxin A related gene expression in synthetic grape médium. **Food Control**, v. 73, part A, p. 71-80, Mar. 2017.

LOEUILLE, B. **Eremanthus in lista de espécies da flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB005312>>. Acesso em: 11 março 2016.

MEDEIROS, R. T. S. et al. Evaluation of antifungal activity of *Pittosporum undulatum* L. essential oil against *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p.71-76, Jan./ Feb. 2011.

MERWE, K. J. VAN der et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, London, v. 205, n. 4976, p. 1112-1113, Mar. 1965.

MILICEVIC, D. R.; SKRINJAR, M.; BALTIC, T. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 4, p. 572-592, Apr. 2010.

- MISHRA, P. K. et al. Assessing essential oil components as plant-based preservatives against fungi that deteriorate herbal raw materials. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 80, p. 16-21, May 2013.
- MORI, C. L. S de O. et al. Influence of altitude, age and diameter on yield and alpha-bisabolol content of candeia trees (*Eremanthus erythropappus*). **Cerne**, Lavras, v. 15, n. 3, p. 339-345, Jul./Set. 2009.
- MOTTA, T. P. et al. Estudo sobre a ocorrência de fungos e aflatoxina B1 na dieta de bovinos leiteiros em São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n.1, p.23-28, Jan. 2015.
- NOGUEIRA, J. H. C. *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n.1, p. 55-60, Jan. 2010.
- NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, M. B. B. P. Prevalência de ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. **Revista da Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição e Alimentação**, v. 12, n. 2, p. 69-75, 2006.
- 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, Oct. 2012.
- OLIVEIRA, D. R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 236-240, 2007.
- OLIVEIRA, J. N.; OLIVEIRA, A. V.; MENEGHELLO, E. R. Análise molecular de espécies de *Aspergillus* contaminantes de uvas vendidas no comércio de maringá-pr. **Iniciação Científica Cesumar**, v. 15, n. 2, p. 157-163, Jul./ Dez. 2013.
- PASSAMANI, F. R. 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**, Des Moines, v. 77, n. 11, p. 1947-1952, Nov. 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, Oct. 2012.
- PASSONE, M. A.; GIRARDI, N. S.; ETCHEVERRY, M. Antifungal and antiaflatoxigenic activity by vapor contact of three essential oils, and effects of environmental factors on their efficacy. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 434-444, 2013.
- PEREIRA, K. C.; SANTOS, C. F. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 15, n. 4, 2011.
- PILMIS, B. et al. Antifungal drugs during pregnancy: an updated review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 1, p. 14-22, Jan. 2015.
- PIMENTEL, F.A. et al. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, Jan. 2006.

- PIMENTEL, F. A. et al. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 213-220, 2010.
- PINTO, E. et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 1367-1373, Oct. 2006.
- PINTO, E. et al. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 1454-1462, Nov. 2009.
- REZENDE, E. F. Potencial enzimático e toxigênico de fungos isolados de grãos de café. **Coffe Science**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 69-77, Jan./ Mar. 2013.
- RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- ROCHA, M. E. B. et al. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, n.1, p. 159-165, Feb. 2014.
- ROMERO, A. L et al. Composição química e atividade do óleo essencial de *Origanum vulgare* sobre fungos fitopatogênicos. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 231-235, 2012.
- RUYCK, K. D. et al. Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. **Mutation Research**, v. 766, p. 32-41, Oct./Dec. 2015.
- SCOLFORO, J. R. et al. Manejo sustentado das candeias: *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish e *Eremanthus incanus* (Less.) Less. **NEMAF-Núcleo de estudos em Manejo Florestal**. Disponível em: <www.nucleoestudo.ufla.br/nemaf/candeia/manual_completo.pdf>. Acesso em: 11 março de 2016.
- SILVA, R. R.; CORSO, C. R.; MATHEUS, D. R. Effect of culture conditions on the biomass determination by ergosterol of *Lentinus crinitus* and *Psilocybe castanella*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 841-846, May 2010.
- SILVÉRIO, M. S. et al. Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish (Asteraceae). **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9785-9796, Aug. 2013.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta a medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: UFSC/ UFRGS, 2007. 1104p.
- SINGH.T.; SINGH, A. P. A review on natural products as wood protectant. **Wood Science and Technology**, v. 46, n. 5, p. 851-870, Sep. 2012.
- 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, Nov. 2008.
- SOUZA, A. B. et al. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera longsdorffi* Desf. Against cariogenic bacteria. **Phytotherapy research**, London, v. 25, n.2, p. 215-220, 2011.

- SOUZA, G. H. B. et al. **Farmacognosia**: coletânea científica. Ouro Preto: UFOP, 2012. 376p.
- SONKER, N. et al. Assessment of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oil as herbal preservatives based of antifungal, antiaflatoxin, and antiochratoxin activities and *in vivo* efficacy during storage. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 4, p. M628-M634, April 2014.
- STASHENKO, E. E et al. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 1, p. 93-103, Jan. 2010.
- STEVÍČ, T. et al. Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 116-122, Apr. 2014.
- STYLIANOU, M. et al. Antifungal application of nonantifungal drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.58, n.2, p.1055-1062, Feb, 2014.
- TATSUMI, Y. et al. Mechanism of Action of Efinaconazole, a Novel Triazole Antifungal Agent. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2405-2409, May 2013.
- 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 Science**, v. 5, n. 9, p. 1181-1190, 2014.
- TIAN, J. et al. The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. **Plos One**, v. 7, n. 1, p. e30147, Jan. 2012a.
- 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, Feb. 2012b.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12 ed., Editora: Artmed, 2017, 964 p.
- TROMBETA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, June 2005.
- VARGA, M; BARTÓK, T.; MESTERHÁZY, Á. Determination of ergosterol in *Fusarium*-infected wheat by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, n. 2, p. 278-283, Jan. 2006.
- VERAS, H. N. H. et al. Topical antiinflammatory activity os essential oil of *Lippia sidoides* Cham: possible mechanism of action. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 2, p. 179-185, Feb. 2013.
- VICUÑA, G. C.; STANSHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v. 81, n.5, p. 343-349, July 2010.
- YAMAMOTO-RIBEIRO, M. M. G et al. Effect of *Zingiber officinale* essential oil on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 3147-3152, Dec. 2013.

YUAN, J et al. Evaluation of ergosterol and its esters in the pileus, gill, and stipe tissues of agaric fungi and their relative changes in the comminuted fungal tissues. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 459-465, July 2008.

YUAN, J. et al. Simultaneous determination of free ergosterol and ergosteryl esters in *Cordyceps sinensis* by HPLC. **Food Chemistry**, v. 105, n. 4, p. 1755-1759, April 2007

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.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Cromatogramas dos óleos essenciais

Figura 1A – Cromatograma do óleo essencial de *Lippia organoides* Kunth.

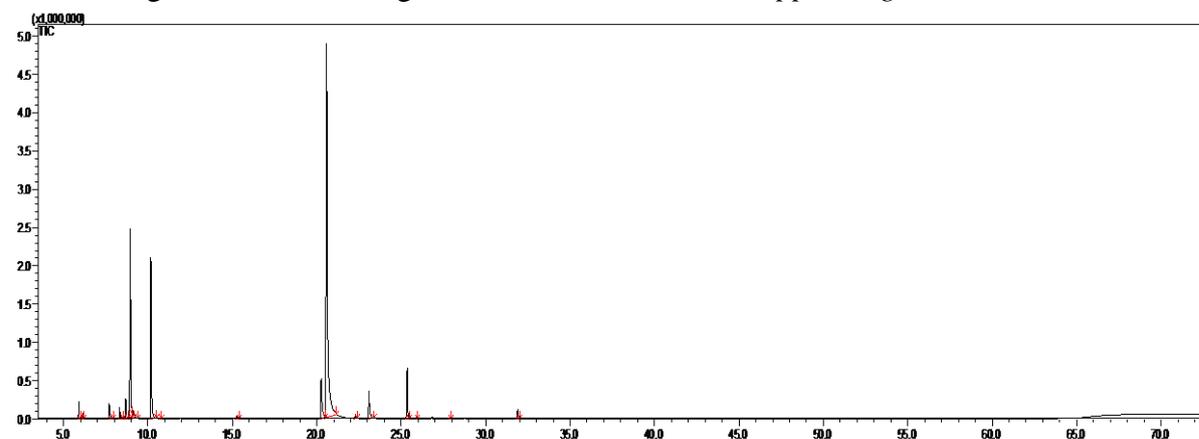
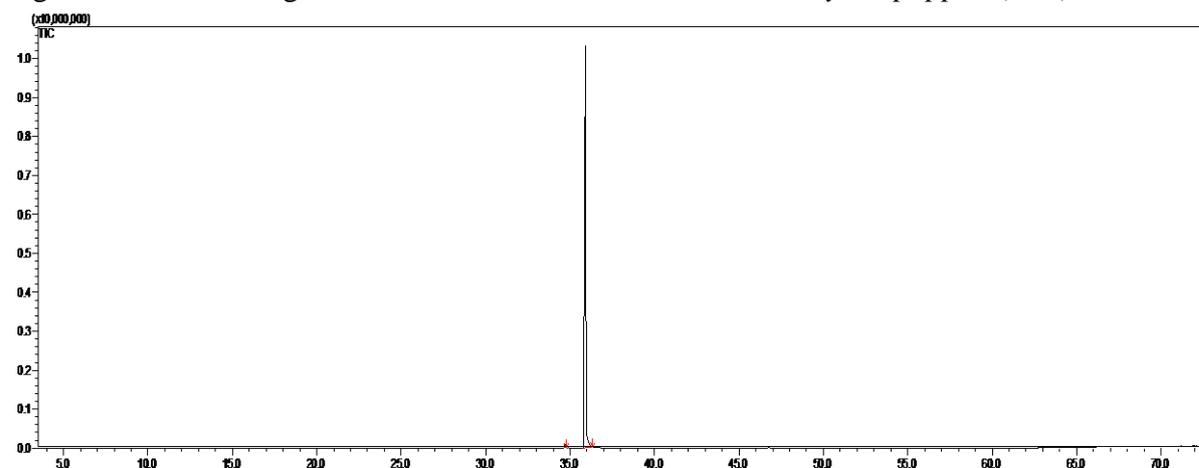


Figura 2A – Cromatograma do óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish



APÊNDICE B – Tabelas de análises de variância do crescimento micelial

Tabela 1B – Análise de variância para a porcentagem de inibição do crescimento micelial dos óleos essenciais de *Lippia organoides* e *Eremanthus erythropappus* em *A. carbonarius*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Valor de p
Concentração	5	28613,38	5722,67	1423,32	0,00
Óleo	1	6,25	6,25	1,55	0,02
Conc. x Óleo	5	3540,37	708,07	176,11	0,00
Erro	24	96,49	4,02		
Total	35	32256,49			

CV = 2,64%

Tabela 2B – Análise de variância para a porcentagem de inibição do crescimento micelial dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* e *Eremanthus erythropappus* em *A. flavus*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Valor de p
Concentração	5	27698,64	5539,73	781,32	0,00
Óleo	1	4444,49	4444,49	626,85	0,00
Conc. x Óleo	5	1536,00	307,20	43,33	0,00
Erro	24	170,16	7,09		
Total	35	33849,29			

CV = 4,14%

Tabela 3B – Análise de variância para a porcentagem de inibição do crescimento micelial dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* e *eremanthus erythropappus* em *A. ochraceus*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Valor de p
Concentração	5	29537,70	5907,54	2050,71	0,00
Óleo	1	2944,04	2944,04	1021,98	0,00
Conc. x Óleo	5	1697,69	339,54	117,86	0,00
Erro	24	69,14	2,88		
Total	35	34248,57			

CV = 2,73%

APÊNDICE C – Cromatogramas da Ocratoxina A

Figura 1C – Cromatograma da OTA (Padrão)

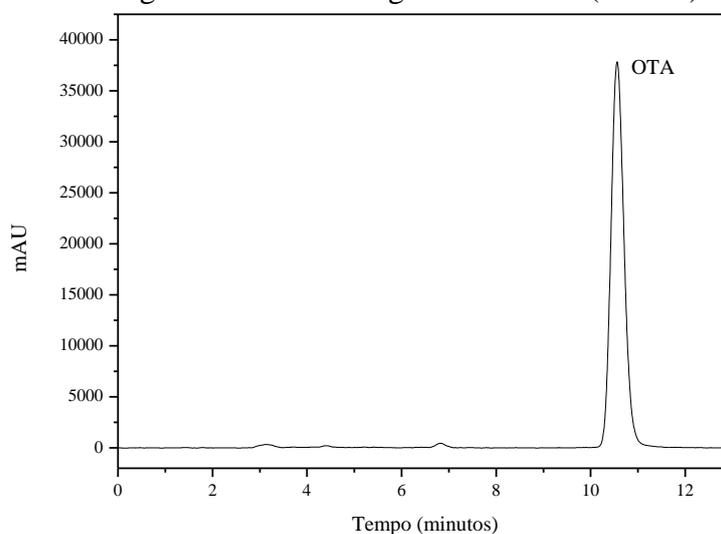
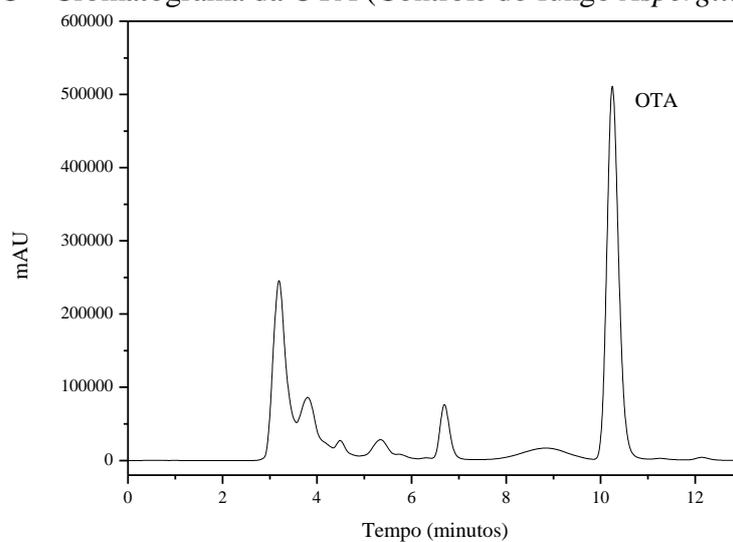
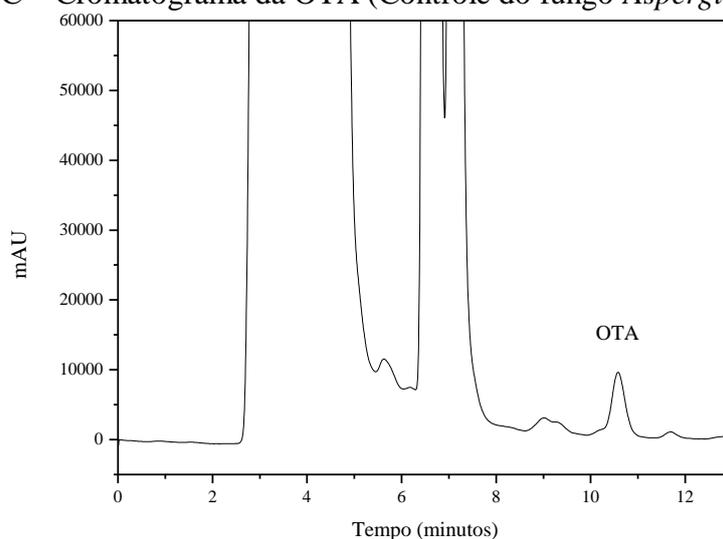


Figura 2C – Cromatograma da OTA (Controle do fungo *Aspergillus carbonarius*)Figura 3C – Cromatograma da OTA (Controle do fungo *Aspergillus ochraceus*)

APÊNDICE D – Tabelas de análises de variância da inibição da ocratoxina A

Tabela 1D – Análise de variância para a porcentagem de inibição da síntese de ocratoxina A do óleo essencial de *Lippia origanoides* em *A. carbonarius*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Valor de p
Concentração	2	103,60	51,80	4860,70	0,00
Erro	6	0,06	0,01		
Total	8	103,66			

CV: 0,11%

Tabela 2D – Análise de variância para a porcentagem de inibição da síntese de ocratoxina A do óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* em *A. carbonarius*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Valor de p
Concentração	2	2180,20	1090,10	146,85	0,00
Erro	6	44,54	7,42		
Total	8	2224,74			

CV: 3,32%

Tabela 3D – Análise de variância para a porcentagem de inibição da síntese de ocratoxina A do óleo essencial de *Lippia origanoides* em *A. ochraceus*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Valor de p
Concentração	2	50,91	25,46	294,91	0,00
Erro	6	0,52	0,09		
Total	8	51,43			

CV: 0,30%

Tabela 4D – Análise de variância para a porcentagem de inibição da síntese de ocratoxina A do óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* em *A. ochraceus*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Valor de p
Concentração	2	15,95	7,97	80,07	0,00
Erro	6	0,60	0,09		
Total	8	16,55			

CV: 0,32%

APÊNDICE E – Tabelas de análises de variância da inibição de ergosterol

Tabela 1E – Análise de variância para a porcentagem de inibição da síntese de ergosterol do óleo essencial de *Lippia origanoides* em *A. carbonarius*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Valor de p
Concentração	4	1195,27	298,82	126,21	0,00
Erro	10	23,68	2,37		
Total	14	1218,95			

CV: 1,71%

Tabela 2E – Análise de variância para a porcentagem de inibição da síntese de ergosterol do óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* em *A. carbonarius*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Valor de p
Concentração	4	1137,14	284,29	414,93	0,00
Erro	10	6,85	0,68		
Total	14	1143,99			

CV: 0,91%

Tabela 3E – Análise de variância para a porcentagem de inibição da síntese de ergosterol do óleo essencial de *Lippia origanoides* em *A. flavus*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Valor de p
Concentração	4	1516,99	379,25	188,42	0,00
Erro	10	20,13	2,01		
Total	14	1537,12			

CV: 1,58%

Tabela 4E – Análise de variância para a porcentagem de inibição da síntese de ergosterol do óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* em *A. flavus*.

.FV	GL	SQ	QM	Fc	Valor de p
Concentração	4	803,97	200,99	215,47	0,00
Erro	10	9,33	0,93		
Total	14	813,29			

CV: 1,03%

Tabela 5E – Análise de variância para a porcentagem de inibição da síntese de ergosterol do óleo essencial de *Lippia origanoides* em *A. ochraceus*.

.FV	GL	SQ	QM	Fc	Valor de p
Concentração	4	3402,98	850,74	246,53	0,00
Erro	10	34,51	3,45		
Total	14	3437,49			

CV: 2,30%

Tabela 6E – Análise de variância para a porcentagem de inibição da síntese de ergosterol do óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* em *A. ochraceus*.

.FV	GL	SQ	QM	Fc	Valor de p
Concentração	4	5288,64	1322,16	289,91	0,00
Erro	10	45,60	4,56		
Total	14	5334,24			

CV: 2,60%

APÊNDICE F – Gráfico de regressão da inibição do ergosterol

Figura 1F – Equação de regressão para concentração e para porcentagem de inibição dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish na síntese de ergosterol por *Aspergillus carbonarius*.

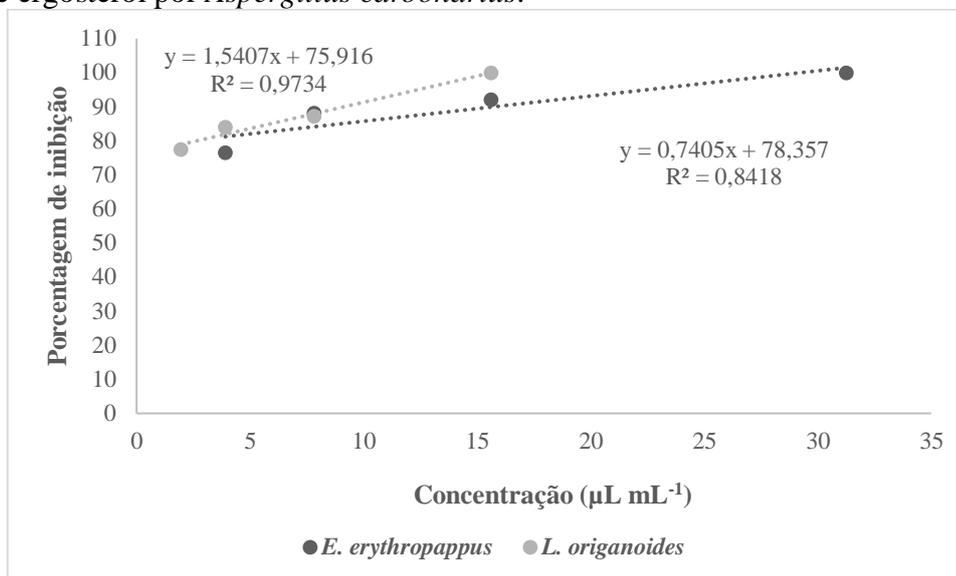


Figura 2F – Equação de regressão para concentração e para porcentagem de inibição dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish na síntese de ergosterol por *Aspergillus flavus*.

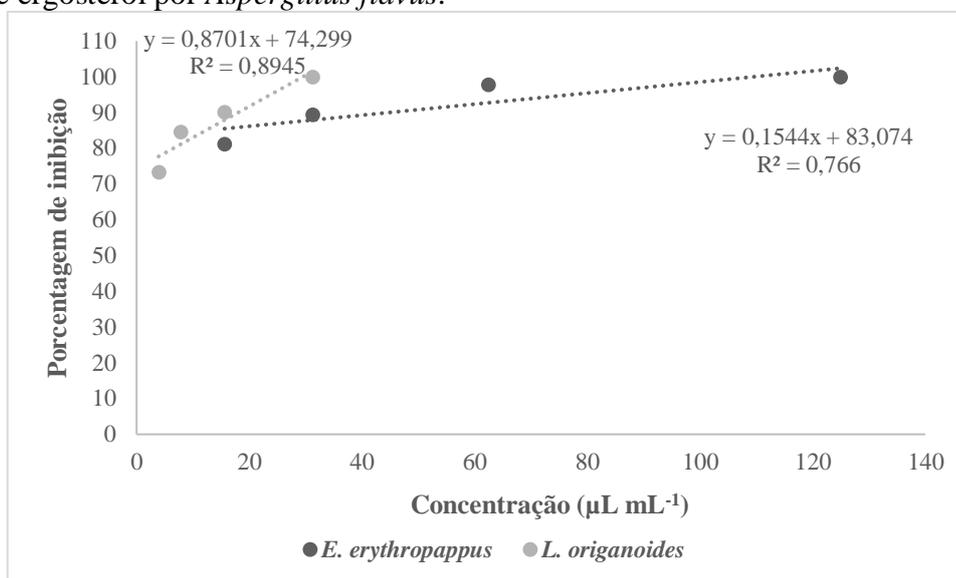


Figura 3F – Equação de regressão para concentração e para porcentagem de inibição dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish na síntese de ergosterol por *Aspergillus ochraceus*.

