



ABIAH NARUMY IDO DE ABREU E NERY

**EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE *ASPERGILLUS
OCHRACEUS* E *ASPERGILLUS CARBONARIUS*
E NA SÍNTESE DE OCRATOXINA A**

LAVRAS – MG

2015

ABIAH NARUMY IDO DE ABREU E NERY

**EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE
ASPERGILLUS OCHRACEUS E *ASPERGILLUS CARBONARIUS* E NA
SÍNTESE DE OCRATOXINA A**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Luis Roberto Batista

LAVRAS – MG

2015

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

Abreu e Nery, Abiah Narumy Ido de.

Efeito de óleos essenciais sobre o desenvolvimento de
Aspergillus ochraceus e *Aspergillus carbonarius* e na síntese de
ocratoxina A / Abiah Narumy Ido de Abreu e Nery. – Lavras :
UFLA, 2015.

91 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Luis Roberto Batista.

Bibliografia.

1. Micotoxina. 2. *Aspergillus*. 3. Potencial antiocratoxigênico.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

ABIAH NARUMY IDO DE ABREU E NERY

**EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE
Aspergillus ochraceus E *Aspergillus carbonarius* E NA SÍNTESE DE
OCRATOXINA A**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 16 de julho de 2015.

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza	Epamig
Dra. Maragarete Marin Lordelo Volpato	Epamig
Dra. Carolina Valeriano de Carvalho	UFLA
Dr. Luiz Carlos de Oliveira Lima	UFLA

Dr. Luis Roberto Batista
Orientador

LAVRAS – MG

2015

*A minha amada mãe Inez,
pelo apoio, amor e incentivos contínuos.
Aos meus amados irmãos, por sempre
acreditarem em minhas escolhas.
Ao meu amor, amigo e parceiro André
por todo carinho, apoio e paciência.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus passos, iluminar meu caminho e me permitir a conclusão de mais uma etapa.

Ao Dr. Luis Roberto Batista pelas orientações, ensinamentos, oportunidades e pela paciência no andamento deste trabalho.

Ao professor PhD Luiz Ronaldo de Abreu por acreditar na minha capacidade, pela amizade, apoio e ensinamentos.

À professora PhD Glaucia Amorim Faria pela amizade e apoio excepcional nas análises estatísticas.

À professora Dra. Maria das Graças Cardoso, por fornecer os óleos e permitir e apoiar as análises de cromatografia em seu laboratório.

À Lucilene, por sempre nos auxiliar, principalmente nos detalhes burocráticos.

À Adriana, que está sempre pronta a nos auxiliar na secretaria.

Ao Laboratório de Química Orgânica- Óleos Essenciais da UFLA pela extração dos óleos e apoio sempre que necessário, em especial à Juliana Valério e ao Leonardo.

À equipe do Laboratório de Micologia da UFLA pelo apoio material, técnico e pessoal.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade concedida para a realização desta pesquisa.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

À querida Natasha, pois sem seu apoio, auxílio e dedicação imensurável este trabalho não seria possível.

Às amigas do Laboratório de Micologia e Micotoxinas em Alimentos, em especial à Fabiana Passamani, Michelle, Gislaine, Priscilla e Luiza pela amizade e apoio no trabalho e fora dele!

Às amigas Leilane, Luciana, Thaís, Priscila, Nayane, e amigos Paulo Siriano e Fausto por todo apoio, risos, choros e amizade sincera. Muito obrigada!

Às novas e especiais amigas de Porto Velho, Flávia, Leila e Dejanira, pelo carinho apoio e orações.

À Cleusinha, por tantos conselhos cafés e broas que acalmam nossos corações.

A minha família por entender minhas ausências, por me compreender nos momentos de estresse, e principalmente por me apoiarem sempre que necessário.

Ao meu amado esposo André, que acompanhou cada passo desde a graduação, e mesmo com tantas dificuldades e ausências esteve sempre me apoiando, me incentivando e principalmente por nunca me deixar desistir!

Por fim, a todos que caminharam ao meu lado e fizeram parte desta etapa tão importante.

Obrigada!

RESUMO

A presença de ocratoxina A em alimentos é considerada bastante preocupante por seus efeitos, principalmente, nefrotóxicos e potencialmente carcinogênicos. Alguns fungos como *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* são capazes de produzir essa micotoxina, principalmente, no período de estocagem. Para controlar essas contaminações, o uso de fungicidas é bastante comum, porém os consumidores têm demonstrado preocupação com o uso excessivo destes compostos; sendo assim o uso de substâncias naturais como os óleos essenciais como alternativa tem sido bastante estudado. O objetivo deste trabalho foi avaliar a inibição da produção de OTA, por fungos *Aspergillus carbonarius* e *A. ochraceus*, com a utilização de diferentes óleos essenciais sob diferentes formas de exposição e em diferentes temperaturas. Foram utilizados seis fungos obtidos da coleção de cultura de microrganismos do DCA/UFLA, sendo três *A. carbonarius* (CCDCA 01144, CCDCA 01120, CCDCA 0128) e três *Aspergillus Ochraceus* (CCDCA 0167, CCDCA 0151, CCDCA 0153). Foi feita uma avaliação da concentração mínima inibitória com os 5 óleos (*Cymbopogon citratus*; *Syzygium aromaticum*; *Siparuna guianensis*; *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris*), a partir dessas análises foram selecionados três óleos e quatro fungos para as etapas seguintes. Em seguida o crescimento micelial foi medido por 10 dias em temperaturas de 15,25 e 35°C, foi feito um tratamento com difusão em ágar e outro com compostos voláteis. As amostras que apresentaram crescimento foram submetidas a HPLC para quantificação da OTA. O uso dos óleos se mostrou bastante eficiente na redução do crescimento micelial (90,23% difusão em ágar, 83,33% compostos voláteis). A temperatura influenciou tanto no crescimento quanto na produção de OTA. As concentrações mínimas inibitórias avaliadas foram insuficientes para a inibição total da produção da OTA, principalmente na exposição aos compostos voláteis, e foi observado que a exposição a essas baixas concentrações dos óleos essenciais, houve aumento significativo da produção da OTA.

Palavras-chave: Micotoxina. *Aspergillus*. Inibição. Potencial antiocrotaxigênico.

ABSTRACT

The presence of ochratoxin A in foods is considered quite disturbing by its effects, especially the nephrotoxic effects, and is potentially carcinogenic. Some fungi, such as *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*, are capable of producing this mycotoxin, mainly during storage period. To control these contaminants, the use of fungicides is quite common. However, consumers concern has risen regarding the excessive use of these compounds. Therefore, the use of natural substances, such as essential oils, as an alternative, has been extensively studied. The objective of this study was to evaluate the inhibition of OTA production by *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus*, using different essential oils, in different forms of exposure and at different temperatures. We used six fungi, obtained from the culture collection of microorganisms from the Department of Food Science at the Universidade Federal de Lavras (UFLA), three *A. carbonarius* (CCDCA 01144, 01120 CCDCA, CCDCA 0128) and three *Aspergillus Ochraceus* (CCDCA 0167, CCDCA 0151, CCDCA 0153). An assessment of the minimum inhibitory concentration (MIC) was performed with five oils (*Cymbopogon citratus*; *Syzygium aromaticum*; *Siparuna guianensis*; *Origanum vulgare*, and *Thymus vulgaris*). From these analyzes, we selected three oils and four fungi for the next stages. Subsequently, mycelial growth was measured for 10 days at temperatures of 15.25 and 35°C. A test was conducted with agar diffusion and other volatile compounds. Samples that showed growth were subjected to HPLC to quantify OTA. Temperature influenced both growth and production of OTA. The MIC evaluated were insufficient for total inhibition of OTA production, mainly due to the exposure to volatile compounds. We also observed that exposure to low concentrations of these essential oils causes a significant increase in the production of OTA.

Keywords: Mycotoxin. *Aspergillus*. Inhibition. Antiochratoxigenic potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fenótipos de conidióforos, que filogeneticamente pertencem ao gênero <i>Aspergillus</i> . A e D: <i>Aspergillus solanii</i> ; B e C: <i>Aspergillus ochraceus</i> 18
Figura 2	Estrutura química da ocratoxina A.....26
Figura 3	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....34
Figura 4	Processo de extração do óleo essencial (hidrodestilação)45
Figura 5	Teste dos óleos essenciais com papel filtro (A) Negramina e fungo <i>A. ochraceus</i> ; (B) Cravo e fungo <i>A. carbonarius</i>55
Figura 6	Plugs retirados da área interna, meio e borda de cada colônia no 10º dia do período de incubação para a extração da OTA66
Figura 7	Cromatograma padrão de Ocratoxina A.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais características dos óleos essenciais selecionados	45
Tabela 2	Espécies e origem dos fungos utilizados	46
Tabela 3	Valores da concentração mínima inibitória obtida para os isolados de <i>Aspergillus carbonarius</i> (CCDCA 01144; CCDCA 01120; CCDCA 0128) e <i>A. ochraceus</i> (CCDCA 0167; CCDCA 0151; CCDCA 0153), através da técnica de difusão em disco.....	54
Tabela 4	Crescimento fúngico em função dos óleos essenciais.....	57
Tabela 5	Crescimento fúngico em função dos óleos essenciais sob diferentes temperaturas.....	58
Tabela 6	Crescimento fúngico em função da temperatura, com óleos em contato	58
Tabela 7	Crescimento fúngico em função dos compostos voláteis dos óleos essenciais	62
Tabela 8	Crescimento fúngico em função da temperatura	63
Tabela 9	Crescimento fúngico em função do tempo	64
Tabela 10	Concentração de OTA ($\mu\text{g.g}^{-1}$) produzida por fungos sob ação dos óleos essenciais em contato, em três temperaturas	67
Tabela 11	Concentração de OTA ($\mu\text{g.g}^{-1}$) produzida por dos fungos sob ação dos compostos voláteis em três temperaturas	68
Tabela 12	Redução de OTA nas técnicas de difusão em ágar e compostos voláteis dos óleos essências	70
Tabela 13	Aumento de OTA nas técnicas de difusão em ágar e compostos voláteis dos óleos essências	72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Fungos produtores de micotoxinas	15
2.1.1	Gênero <i>Aspergillus</i>	17
2.1.1.1	<i>Aspergillus ochraceus</i>	20
2.1.1.2	<i>Aspergillus carbonarius</i>	21
2.2	Micotoxinas	22
2.2.1	Ocratoxina A	24
2.3	Óleos essenciais	29
2.3.1	Biossíntese dos óleos essenciais	32
2.3.2	Óleo de capim limão (<i>Cymbopogon citratus</i>)	35
2.3.3	Óleo de cravo da índia (<i>Syzygium aromaticum</i>)	35
2.3.4	Óleo de negramina (<i>Siparuna guianensis</i> Aublet)	36
2.3.5	Óleo de orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	37
2.3.6	Óleo de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	39
2.3.7	Principais aplicações dos óleos essenciais	39
2.3.7.1	Ação antifúngica dos óleos essenciais	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1	Local e condução do experimento	44
3.2	Óleos essenciais	44
3.3	Seleção dos fungos	46
3.4	Determinação da concentração mínima inibitória dos óleos essenciais	47
3.5	Determinação da inibição do crescimento micelial dos isolados fúngicos sob ação dos óleos essenciais	48
3.5.1	Avaliação da inibição de crescimento micelial dos fungos por contato com os óleos essenciais	48
3.5.2	Avaliação da inibição de crescimento micelial dos fungos pelos compostos voláteis dos óleos essenciais	49
3.5.3	Análise estatística	49
3.6	Avaliação da atividade antiocratoxigênica dos óleos essenciais	50
3.6.1	Extração da ocratoxina das culturas fúngicas	50
3.6.2	Determinação da concentração da solução-estoque e preparo da curva analítica para a OTA	51
3.6.3	Condições cromatográficas utilizadas na quantificação da OTA por CLAE	51
3.6.4	Quantificação da OTA	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1	Concentração mínima inibitória dos óleos essenciais	54

4.2	Inibição dos óleos essenciais no crescimento micelial dos isolados fúngicos	56
4.2.1	Inibição por difusão em ágar	56
4.2.2	Inibição por compostos voláteis.....	62
4.3	Produção de OTA	65
5	CONCLUSÕES.....	73
6	CONSIDERAÇÕES GERAIS	74
	REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a preocupação com a qualidade dos alimentos não está mais voltada apenas ao valor nutricional e às características sensoriais, mas principalmente a possíveis contaminações microbiológicas. A contaminação microbiológica, ocasionada por bactérias patogênicas, deteriorantes, vírus e fungos toxigênicos, é classificada como o principal problema para a saúde pública.

A ocorrência de ocratoxina A (OTA) em alimentos vem sendo reportada, principalmente em cereais e produtos derivados de cereais, café, cacau, cerveja, uvas, suco de uvas, frutas desidratadas, plantas medicinais e vinho, sendo este último considerado a segunda fonte mais importante de OTA para humanos. Conhecer a influência das condições ambientais, como a temperatura, no crescimento dos fungos potencialmente produtores e na produção de OTA é de extrema relevância, auxiliando não só no conhecimento do comportamento de fungos produtores de micotoxinas, como também no desenvolvimento de técnicas que ajudam a evitar ou a reduzir as perdas de produção e os riscos para a saúde humana.

As plantas aromáticas, condimentares e medicinais têm sido utilizadas por um público cada vez maior e vêm recebendo incentivo da Organização Mundial de Saúde (OMS), que recomenda o desenvolvimento de pesquisas visando à utilização da flora. Esses elementos que antes se apresentavam, principalmente, como agentes vetores de aromas e sabores característicos aos alimentos, apresentam agora uma nova perspectiva nas pesquisas. Pesquisas evidenciam a potencialidade destes constituintes vegetais como agentes antimicrobianos e antifúngicos capazes de serem aproveitados como fonte de compostos alternativos, eficientes e viáveis, para o alcance do controle do crescimento e da sobrevivência de microrganismos nas várias áreas da

microbiologia. Os óleos essenciais apresentam atividade biológica e servem como uma fonte alternativa de agentes antimicrobianos contra patógenos causadores de doenças alimentares ou deteriorantes de alimentos.

Desta forma, este estudo foi realizado com o intuito de avaliar a inibição da produção de OTA, por fungos *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*, com a utilização de diferentes óleos essenciais e diferentes formas de exposição, em diferentes temperaturas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fungos produtores de micotoxinas

Os fungos são os microrganismos eucarióticos, numericamente, mais abundantes da biosfera terrestre, colonizando diferentes ecossistemas (FISCHER, 2007; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Eles apresentam uma grande versatilidade para crescer em substratos e condições que outros microrganismos não são capazes de utilizar, como o crescimento em condições de atividade de água (*aw*) reduzida, dentro do limite de 0,65 até 0,99; crescimento em condições de pH reduzido; crescimento em uma ampla faixa de temperatura, variando de 0 °C a 40 °C; utilização de uma grande versatilidade de substrato como fontes de carbono, nitrogênio e energia; capacidade de esporulação e disseminação em diferentes condições. Esses atributos tornam os fungos potencialmente capazes de causar deterioração em alimentos com diferentes níveis de umidade e em condições climáticas que vão desde o subártico até o tropical (MEDINA et al., 2006).

Parte do seu processo evolutivo está relacionada com o desenvolvimento da capacidade do fungo de produzir uma diversidade de produtos químicos extracelulares, conhecidos como metabólitos secundários (MUELLER; SCHMIT, 2007). Os metabólitos secundários podem ser definidos como um conjunto de compostos químicos que não aparentam ter função definida no crescimento celular. Este conceito é considerado contrário ao estabelecido para o metabolismo primário, o qual fornece energia e precursores químicos às células, que são essenciais para o crescimento e a reprodução dos organismos (BRAKHAGE; SCHROEKHE, 2010).

Ainda não existe um consenso sobre a origem, a finalidade e a importância dos produtos do metabolismo secundário. Sabe-se que as enzimas

envolvidas na produção dos metabólitos secundários são exclusivas desse processo e dos substratos, diferindo das do metabolismo primário, e que a síntese desses compostos apresenta um elevado gasto energético para o organismo, sendo fisiologicamente regulada em resposta a fatores ambientais. Além disso, a produção é ordenada por um conjunto de genes associados com mecanismos reguladores especiais que controlam o sincronismo e o nível de expressão gênica (MAGAN; ALDRED, 2005).

Nas últimas décadas, muitos fungos foram identificados como produtores de metabólitos secundários com aplicação em diferentes áreas da indústria (penicilina, estatina, ciclosporina) (BENNET, 1998; MEYER, 2008); no entanto, outros metabólitos secundários são considerados tóxicos e, por serem produzidos por fungos, são conhecidos como micotoxinas. Duas micotoxinas importantes são a ocratoxina A (OTA), que é um possível carcinogênico e pertencente ao Grupo 2B, e a aflatoxina, classificada como carcinogênica e pertencente ao grupo 1A, segundo a Agência Internacional do Câncer (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993). Outras, micotoxinas como tricotecenos, zearalenona, patulina e fumonisina, são agentes importantes na contaminação de alimentos destinados ao consumo humano e à alimentação animal.

O conhecimento sobre esse grupo de compostos químicos é especialmente importante por causa dos riscos envolvidos com as contaminações na cadeia produtiva dos alimentos. Em estudos anteriores consideravam-se esses metabólitos secundários como substâncias produzidas por fungos deteriorantes de alimentos e utilizados, com sucesso, para auxiliar na identificação e na diferenciação das espécies relacionadas (FRISVAD; FILTENBORG, 1989, 1993). Atualmente, os estudos evidenciam que centenas de metabólitos secundários já foram descritos e, com muitos mais, sem dúvida, ainda a serem descobertos. Na verdade, cada espécie de fungo pode ser capaz de produzir um

grande número de metabólitos e o perfil de produção pode ser alterado sob diferentes condições de cultivo, tais como disponibilidade de água, nutrientes, pH e temperatura (MAGAN; MEDINA; ALDRED, 2011).

2.1.1 Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* pertence à família *Trichocomaceae*, Ordem *Eurotiales*, grupo dos *Hyphomycetos* e se caracterizam pela formação de conidióforos, ou seja, hifas especializadas e produtoras de conídios com formas e estruturas variáveis. Esse gênero é de particular importância por conter muitas espécies capazes de crescer em condições de baixa atividade de água (a_w), sendo então associados com a deterioração de alimentos de baixa a_w . Pode ser encontrado no solo, em matérias orgânicas em decomposição, grãos estocados, alimentos, rações e outros materiais. São mais comumente encontrados em regiões de clima quente e algumas espécies podem produzir metabólitos secundários tóxicos, as micotoxinas, altamente nocivas para a saúde do homem e de animais, como a aflatoxina e a ocratoxina A (CHALFOUN; BATISTA, 2003; MOSS, 2002).

Existem espécies capazes de realizar reprodução sexuada e fazem parte de pelo menos 8 diferentes gêneros caracterizados pela formação de ascos que contêm ascósporos. Destes, apenas 3 gêneros, *Eurotium*, *Neosartorya* e *Emericella*, ocorrem em alimentos. As espécies de *Eurotium* são as mais comuns e importantes dentre os gêneros que possuem *Aspergillus* como anamorfo. Todas as espécies são xerofílicas e apresentam importância na deterioração de alimentos com baixa atividade de água e commodities agrícolas estocadas (HOCKING, 2006).

Sua temperatura ótima de crescimento varia de 30 a 40°C para a maioria dos fungos do gênero *Aspergillus*. É um gênero anamórfico e compreende

aproximadamente 250 espécies conhecidas (SAMSON; VARGA, 2007). Estes fungos crescem rapidamente, produzindo hifas aéreas que exibem estruturas características de conídios: longos conidióforos com vesículas terminais, geralmente esféricas, de onde surgem métulas ou métulas e fiáides que originarão esporos fúngicos, neste caso, conídios (Figura 1). São identificados de acordo com as diferenças morfológicas observadas nessas estruturas, incluindo tamanho, forma, textura e cor dos conídeos (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000; KLICH; PITT, 1988).

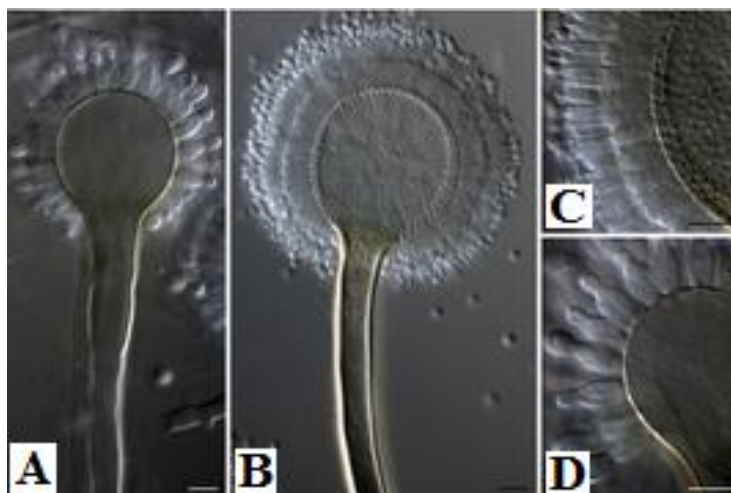


Figura 1 Fenótipos de conidióforos, que filogeneticamente pertencem ao gênero *Aspergillus*. A e D: *Aspergillus solanii*; B e C: *Aspergillus ochraceus*

Fonte: (Adaptado de Samson, Visagie e Houbraken, 2014).

Existem guias de identificação de espécies comuns de *Aspergillus* baseados em morfologia e nas características das colônias que vêm sendo publicados por Klich e Pitt (1988), Pitt e Hocking (1997a, 1999), Samson et al. (2000, 2002). O gênero *Aspergillus* é dividido em seções: *Flavi*, *Circumdati*,

Nigri, Restricti, Fumigati, Cervini, Clavati, Nidulantes, Flavipedes, Versicolores, Usti, Terrei, Candidi, Cremei, Sparsi e Wentii (KLICH, 2002).

De acordo com Samson et al. (2000), entre os principais gêneros toxigênicos, o *Aspergillus* possui espécies de ocorrência mais frequente, dentre as quais destacam-se *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius*.

Alguns fungos são responsáveis pela produção de metabólitos secundários, compostos químicos produzidos por um número limitado de espécies em um gênero e que possui um alto poder de diferenciação. Em um perfil de metabólitos secundários incide todos os compostos que um fungo pode produzir em um determinado substrato, incluindo antibióticos e micotoxinas (FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008).

Muitas espécies deste gênero têm grande utilização na indústria como, por exemplo, na produção de ácido cítrico e enzimas amilases por *A. niger* e milho de soja por *A. oryzae*. Porém o *A. flavus* é um tóxico deteriorante de alimentos e rações e existem, também, algumas espécies patogênicas para o homem e animais, como o *A. fumigatus* (PITT; HOCKING, 1997a).

Espécies de *Aspergillus* possuem perfis altamente específicos de metabólitos secundários que remetem à mesma espécie indicada através da morfologia, fisiologia e dados de sequência de DNA. Por exemplo, isolados de *Aspergillus* das Seções *Flavi*, *Nigri* e *Circumdati*, no qual se encontram as principais espécies produtoras de ocratoxina A e aflatoxinas, produzem um grande número de metabólitos, o que permite a identificação correta ao nível de espécie (FRISVAD et al., 2004; FRISVAD; SAMSON; SMEDSGAARD, 2004).

Juntamente com as espécies de *Penicillium* e *Fusarium*, *Aspergillus* estão presentes em alimentos e culturas agrícolas, porém cada um com suas particularidades. *Aspergillus* sp. crescem em temperaturas mais elevadas e em

atividades de água mais baixas que as espécies do *Penicillium* sp, que necessitam de maior tempo para esporular e produzem esporos mais resistentes à luz e substâncias químicas (HOCKING, 2006). Desta forma as espécies do gênero *Aspergillus* são mais comumente encontradas deteriorando alimentos nos trópicos e as espécies de *Penicillium* estão mais relacionadas com zonas temperadas (SAMSON et al., 2002).

2.1.1.1 *Aspergillus ochraceus*

A. ochraceus pertence à Seção *Circumdati*, cresce em temperaturas moderadas e com atividade de água superior a 0,8, seu melhor crescimento é entre 25 e 30°C, morfológicamente se caracteriza por possuir conídios e vesícula globosos, seu conidióforo é liso e não septado (KLICH, 2002; KLICH; PITT, 1988; PALACIOS-CABRERA et al., 2005). Segundo Pardo, Ramos e Marín (2005) o *A. ochraceus* tem maior produção de OTA em aw de 0,98-0,99 e na faixa de temperatura de 20 a 30°C. Sendo que a aw abaixo de 0,85 é fator limitante à produção de OTA.

Este fungo é reportado com maior frequência em áreas de clima tropical. É encontrado no solo e em vários alimentos, principalmente os que são armazenados, como os cereais e especiarias e frutas secas. É fonte de OTA em grãos de café verde e pode infectar também grãos de café durante a secagem ao sol, devido ao contato com o solo (KLICH, 2002; KLICH; PITT, 1988; PALACIOS-CABRERA et al., 2005).

2.1.1.2 *Aspergillus carbonarius*

Aspergillus carbonarius pertence ao subgênero *Circumdati*, Seção Nigri, sendo reportado inicialmente como isolado a partir do solo e águas poluídas; tem sido encontrado em alimentos de origem vegetal, com importância para a produção de OTA (ABARCA et al., 2004).

Aspergillus carbonarius se caracteriza morfológicamente por apresentar conídios pretos com paredes rugosas, estipes longas e largas. Devido às suas características morfológicas microscópicas, pode ser facilmente distinguível de outras espécies bisseriadas pertencentes à Seção *Nigri*. A germinação dos esporos de *A. carbonarius* é muito rápida e ocorre num período de 24 horas à temperatura entre 25 °C e 35 °C, e atividade de água entre 0,90 a 0,99. A temperatura ótima para o crescimento é de 25 °C a 30 °C, com temperatura mínima de 10 °C e máxima de 42 °C, e atividade de água ótima entre 0,95 e 0,99 (PERRONE et al., 2008). Entretanto, as condições ótimas para a produção de OTA por *A. carbonarius* diferem das condições ótimas para o crescimento do fungo e ocorrem a 15 °C e 20°C, e a 0,95-0,99 de atividade de água (BELLI et al., 2007; LEONG et al., 2006). Não foi observada produção de OTA a 0,90 de atividade de água (MITCHELL et al., 2003).

De modo geral, *A. carbonarius* tem um crescimento ótimo a 30-35 °C e não cresce a temperaturas inferiores a 25 °C. O ótimo de atividade de água para o crescimento varia de 0,93 a 0,98, dependendo da cepa, com uma maior tolerância a 25-30 °C (MITCHELL et al., 2003). O maior diferencial do *A. carbonarius* para o *A. niger* é a produção de esporos maiores *A. carbonarius* (KLICH; PITT, 1988) além da capacidade de o *A. carbonarius* produzir maior quantidade de OTA que a de o *A. niger*.

2.2 Micotoxinas

O termo micotoxina é resultante das palavras grega “mykes”, que significa fungo e “toxicum”, que significa veneno ou toxina. A contaminação de alimentos por micotoxinas representa perdas econômicas bastante significativas, além de representar riscos à saúde humana e animal (AYCICEK, et al., 2005; FLORES-FLORES et al., 2015; HUSSEIN; BRASEL, 2001; MARROQUÍN-CARDONA et al., 2014).

As micotoxinas compreendem um conjunto complexo de substâncias tóxicas produzidas por fungos, diferenciando-se das toxinas bacterianas por não terem natureza proteica nem serem imunogênicas. Os problemas provocados pelas micotoxinas são muito antigos. São metabólitos secundários de algumas espécies de fungos, capazes de produzir efeitos tóxicos em animais e no homem, dependendo dos níveis de consumo. São metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de fungos filamentosos, que podem ser produzidas em alimentos, como resultado do crescimento do fungo. A estrutura química varia consideravelmente, sendo compostos biológicos naturais de baixo peso molecular, normalmente tóxicos, e as estruturas orgânicas são caracterizadas pelas variedades de heteroátomos presentes em seus grupos funcionais. Os gêneros mais frequentemente envolvidos na produção são: *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (BULLERMAN; SCHOEREDER; PARK, 1984; MARROQUÍN-CARDONA, et al., 2014; MOSS, 2002).

Nem todos os fungos são toxigênicos, assim a simples presença de fungos em um alimento não implica que toxinas tenham sido ou venham a ser produzidas. Porém, há um risco implícito e que deve ser afastado. Ainda é importante lembrar que a simples ausência de sinais visíveis de contaminação também não pode ser interpretada como ausência de toxinas, pois as toxinas podem permanecer em um alimento mesmo depois que o fungo que a produziu

tenha desaparecido do produto processado. Isso porque a maioria das micotoxinas é termoestável, resistindo a determinados tratamentos térmicos ou processos de desidratação que são suficientes para destruir o micélio vegetativo dos fungos que as produziram (NOGUEIRA, 2009).

A ingestão de alimentos que contenham micotoxinas pode causar graves efeitos sobre a saúde animal e humana. Tais efeitos são conhecidos como micotoxicoses, cuja gravidade depende da toxicidade da micotoxina, grau de exposição, idade e estado nutricional do indivíduo, e dos possíveis efeitos sinérgicos de outros agentes químicos, ou cocorrência de micotoxinas, aos quais está exposto. Sua entrada no organismo comumente se dá pela via digestiva e seus principais efeitos estão relacionados à imunossupressão, potencialidade carcinogênica. Muitas dessas toxinas têm afinidade por determinado órgão ou tecido, sendo o fígado, os rins e o sistema nervoso frequentemente os mais atingidos (BHATNAGAR; EHRLICH, 2002; SHEPHARD, 2008).

O efeito de uma micotoxina depende da dose e da frequência com que é ingerida e pode ser agudo (letal ou não) ou crônico. O efeito agudo é de manifestação e percepção rápidas, podendo levar à morte, porque causa alterações irreversíveis, e é resultante da ingestão de doses geralmente elevadas. O efeito crônico é o resultado de doses menores, que provocam distúrbios e alterações nos órgãos dos humanos e dos animais (SHEPHARD, 2008).

A produção de micotoxinas em grãos depende de inúmeros fatores físicos, como temperatura, luminosidade, aeração, danos mecânicos, longo período de armazenagem, além de fatores químicos, como composição do substrato, pH, teor de oxigênio e gás carbônico do ambiente, atividade de água, presença de fungistáticos e fatores biológicos, como, por exemplo, a linhagem fúngica toxigênica e a quantidade de esporos viáveis, a competição e a degradação microbianas e a presença de insetos. Outros fatores podem

influenciar a produção de micotoxinas, tais como a resistência genética da variedade plantada e quaisquer fatores estressantes exercidos sobre o alimento (BULLERMAN; SCHOEREDER; PARK, 1984; SCUSSEL, 1998), sendo temperatura, umidade e tipo de substrato os mais importantes (MALLOZZI; CORRÊA, 1998).

As micotoxinas mais importantes envolvidas com a segurança alimentar são produzidas pelos gêneros *Alternaria* (ácido tenuazônico, alternariol e alternariol metil éter), *Aspergillus* (aflatoxina B1, G1 e M1, ocratoxina A, esterigmatocistina e ácido clicopiazônico), *Claviceps* (ergo-alcalóides), *Penicillium* (patulina, ocratoxina A, citrinina, penitrinina A e ácido clicopiazônico) e *Fusarium* (desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T-2, diacetoxiscirpenol, fumonisinas e moniliformina) (HUSSAIN; BRASSEL, 2001; RODRIGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002; STEYN, 1995). Os principais produtos alimentícios susceptíveis ao desenvolvimento de micotoxinas incluem amendoim, milho, trigo, arroz, oleaginosas, frutas secas, especiarias, semente de algodão, café, uva, cacau, entre outros que, normalmente, são utilizados na composição de alimentos e rações (FLORES-FLORES et al., 2015; MARROQUÍN-CARDONA et al., 2014).

2.2.1 Ocratoxina A

As ocratoxinas são compostas, basicamente, por: uma di-hidroxi isocumarina, ligada através do seu grupo 7-carboxi à amida do grupamento L-β-fenilalanina (essa ligação é muito estável em relação à hidrólise e temperatura), com exceção da OTα em que o grupamento fenilalanina está ausente. Essas micotinas formam um grupo estruturalmente relacionado e, dentro deste grupo, a ocratoxina A é considerada a mais tóxica, devido à presença do átomo de cloro na posição C5, adicionado à presença de um OH fenólico. O grupo também

inclui ocratoxina C (OTC), 4- hidroxiocratoxina A (4-OH OTA), ocratoxina B (não contém o átomo de cloro no 5C da di-idro-metil-isocumarina) e a ocratoxina α (OT α , em que a fenilalanina está ausente) (DUARTE; PENA; LINO, 2010; RINGOT et al., 2006).

A ocratoxina A [7-(L- β -fenilalanilcarbonil)-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4- dihidro-3R-metilisocumarina] é um pentaquetídeo, derivado de uma dihidro-isocumarina unida pelo carbono 7 carboxílico a uma I- β -fenilalanina, por meio de uma ligação amídica. É um composto branco cristalino, pouco solúvel em água e altamente solúvel em solventes orgânicos apolares. Sua fórmula empírica é C₂₀H₁₈O₆NCl (Figura 2) e o peso molecular é de 403,82 g mol⁻¹. Sua temperatura de fusão é de 169 °C, possui absorção no comprimento de onda 333 nm (λ) e emissão no comprimento de onda entre 440-475 nm, com coeficiente de absorção molar de 5440 m²/mol, quando solubilizada em solução de tolueno- ácido acético 99:1 (v/v) (ANLI; ALKIS, 2010; DUARTE; PENA; LINO, 2010; FURLANI; SOARES, 1999; RINGOT et al., 2006; VALERO; FARRE; SANCHIS, 2008).

Ela foi descoberta em 1965, como um metabólito produzido pelo *Aspergillus ochraceus*, durante estudos que objetivavam descobrir novas micotoxinas. É importante ressaltar que nem todos os isolados de *Aspergillus ochraceus* são capazes de produzir OTA. Além dessa espécie, também *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus carbonarius*, e *Aspergillus niger*, além de *Penicillium nordicum* e *Penicillium verrucosum* são produtores de OTA (BAYMAN et al., 2002; RINGOT et al., 2006).

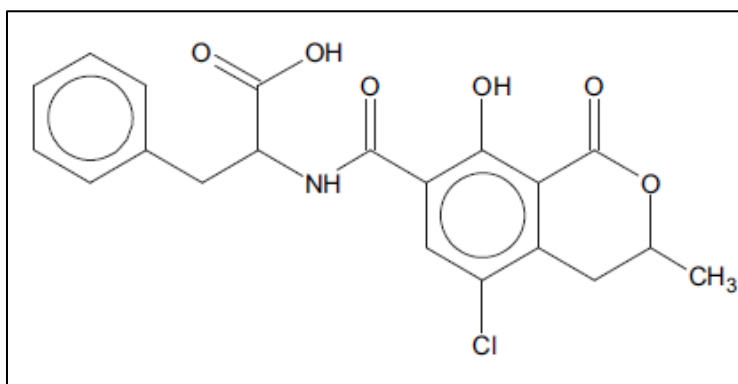


Figura 2 Estrutura química da ocratoxina A

Fonte: Duarte, Pena e Lino (2010).

A OTA está associada, principalmente, a nefropatias em todos os animais estudados até o momento. É no ser humano, entretanto, que essa substância tem a mais longa meia-vida para sua eliminação. Além de ser reconhecidamente nefrotóxica, a OTA comporta-se, também, como hepatóxica, imunossupressora, teratogênica e cancerígena. A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer classificou a OTA como um possível cancerígeno humano (grupo 2B) (CREPPY, 2004; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993).

Estudos realizados na Europa apontam efeitos carcinogênicos e hepatotóxicos em animais não ruminantes, principalmente em aves e suínos. Nas regiões de criação, os sintomas mais aparentes são o de nefropatia com atrofia tubular e fibrose intersticial nos animais. Um dos relatos mais conhecidos da toxicidade da OTA para humanos é a Nefropatia Endêmica dos Balcãs (NEB), onde diversos casos de câncer do trato urinário foram associados à presença da OTA, quando comparados a outras regiões onde a micotoxina não está presente com tanta frequência (MARROQUÍN-CARDONA et al., 2014; RINGOT et al., 2006).

A OTA é facilmente absorvida pelo sistema gastrointestinal e sua toxicidade pode variar conforme a concentração e o organismo. Uma vez ingerida e absorvida pelo trato intestinal, a OTA se distribui rapidamente pelo organismo por formar adutos com proteínas sanguíneas e, posteriormente, ligar-se com os tecidos. Essa ligação é reversível e ocorre em sítios que podem competir com alguns fármacos comumente utilizados. Os grupamentos carboxílicos e fenólicos em sua estrutura química fazem o maior papel na absorção, uma vez que a OTA age como um ácido fraco e passa através das membranas celulares por difusão simples (TURNER; SUBRAHMANYAMB; PILETSKIB, 2009).

A OTA pode ser encontrada em diversos alimentos, incluindo nozes, amendoins secos, feijão, temperos, grãos de café e frutas secas, como também em carne processada, cereais, sementes oleaginosas, uvas, vinho, uvas passas e café (KAPETANAKOU et al., 2009). Aproximadamente 50% das amostras de arroz, feijão, milho e trigo analisadas no Brasil apresentaram níveis detectáveis de OTA, além de ter sua presença também confirmada em café torrado e moído, e em café solúvel (CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002; PRADO et al., 2000).

A avaliação de risco da Ocratoxina A em alimentos ocorre oficialmente por uma junta de especialistas da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS), que se reúnem regularmente para as reavaliações pertinentes. Desde 1970 os contaminantes de alimentos têm sido avaliados pelos comitês dos órgãos mundiais, entre eles o Codex Alimentarius. São as resoluções tomadas a partir desses encontros que estabelecem os níveis a serem seguidos pela comunidade internacional para o comércio dos seus produtos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

Desde 2005, os países da Comunidade Europeia estabeleceram limites para micotoxinas em diversos produtos. As autoridades da União fixaram um

limite de tolerância para a presença de OTA em vinhos, sucos de uva, concentrados e néctar de uvas em 2 µg/kg e 10 µg/kg para uvas passas e sultanas, estabelecido na EC Nº 123 de janeiro de 2005 (EC 123/2005) (EUROPEAN COMMISSION, 2005). Os produtos importados também devem seguir essa legislação e caso não estejam de acordo com as normas fixadas pela União, os produtos serão bloqueados para o comércio na Europa (DUARTE; PENA; LINO, 2010).

No Brasil, devido a vários fatores, como a exigência de alguns países para exportação, e aos vários efeitos tóxicos da Ocratoxina A à saúde humana, foi aprovada em 2011 a Legislação Nacional (Resolução RDC nº 7 de 18 de fevereiro de 2011), que fixa os Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, ficando estabelecido o Limite Máximo de 2 µg/kg para suco de uva, polpa de uva, vinho e seus derivados e 10 µg/kg para frutas secas e desidratadas (BRASIL, 2011).

Os fatores abióticos, como temperatura e atividade de água, afetam o crescimento e a produção da OTA pelo fungo. Esses organismos requerem temperatura ótima para o seu crescimento, que pode ser diferente da temperatura para a produção da toxina. Este mesmo comportamento já foi observado para a atividade de água (BELLI et al., 2007; PATEKI et al., 2007; QUINTELA et al., 2011; SELOUANE et al., 2009). Por isso, a presença do fungo ocratoxigênico não significa presença da OTA em um determinado alimento. Para melhor avaliar a influência desses dois fatores sobre a produção de OTA, alguns estudos foram realizados em escala laboratorial, utilizando o meio de cultura como substrato para o crescimento do fungo. Os resultados obtidos mostraram que a atividade de água (a_w), a temperatura e o tempo de incubação influenciam tanto o crescimento do fungo como a produção de OTA, e isso difere entre as espécies analisadas e dentro da mesma espécie estudada.

A contaminação por micotoxinas em produtos agrícolas é difícil de ser prevista devido ao fato de essa contaminação depender de uma complexa interação de fatores, como umidade, temperatura, tipo de produto, condições e tempo de armazenamento (GARCIA et al., 2011; POSE et al., 2010). No entanto, avaliar o efeito de cada fator e a interação entre os mesmos com a produção da toxina, mesmo que em escala laboratorial, é fundamental para garantir o consumo de alimentos seguros por homem e animais (KHALESIA; KHATIB, 2011).

2.3 Óleos essenciais

O controle alternativo de fungos fitopatogênicos e micotoxigênicos tem sido discutido amplamente no contexto atual. Muitos produtos naturais, entre os quais os extratos e os óleos essenciais de plantas medicinais, condimentares e aromáticas, apresentam potencial para o manejo de doenças de plantas. As substâncias bioativas presentes nessas plantas são os metabólitos secundários (SILVA; RANGEL, 2010).

Desde os primórdios da humanidade o homem depende das plantas para a sua existência, utilizando-as como alimento, medicamento, construção de abrigo, no aquecimento, dentre outros. As primeiras referências históricas importantes sobre a utilização dos óleos essenciais provêm do Oriente, especialmente do Egito, onde eram usados em rituais religiosos, para tratamento farmacológico e conservação de alimentos. Conforme a International Standard Organization (ISO), os óleos essenciais são produtos dos metabolismos secundários das plantas definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. São definidos como um produto obtido por destilação em água ou vapor ou por prensagem de pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae) (SIMÕES et al., 2007). Apresentam como

características volatilidade, instabilidade na presença de luz, oxigênio, substâncias oxidantes, redutoras, meios com pH extremos, ou meios com traços de metais que podem catalisar reações de decomposição e transformação, uma vez que dada a sua complexa composição, apresentam alta probabilidade de sofrer modificações físico-químicas devido às reações entre seus próprios constituintes ou entre eles e o meio (BANDONI; CZEPAK, 2008).

Os óleos essenciais são produzidos e armazenados pelas plantas em estruturas especializadas, como idioblastos, cavidades, canais e tricomas glandulares. As plantas podem produzir óleos essenciais em várias regiões em quantidades e composições diferentes. Entre as partes das plantas nas quais se podem encontrar óleos essenciais, citam-se as pétalas, cascas, rizomas, raízes, folhas, galhos, pequenos frutos, cascas e lenho (SIMÕES et al., 2007).

Nos processos de extração do óleo essencial de plantas frescas ou secas, o material vegetal entra em contato com vapor (destilação a vapor) ou água em ebulição (hidrodestilação), resultando na ruptura dos tricomas glandulares e, conseqüentemente, na liberação das substâncias voláteis nele contidas; ou ainda, terminada a fase de secreção, as células glandulares sofrem, de um modo geral, degenerescência celular, o que leva ao colapso da cabeça glandular do tricoma e à perda de sua funcionalidade (ASCENSÃO, 2007).

A ocorrência de óleos essenciais em angiospermas monocotiledôneas e gimnospermas é relativamente rara, ao passo que plantas ricas em óleos essenciais são abundantes em angiospermas dicotiledôneas, tais como nas famílias *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Myristicaceae*, *Piperaceae*, *Rutaceae*, entre outras (SAITO; LUCCHINI, 1998; SIMÕES et al., 2007).

Diversas funções biológicas da planta são atribuídas aos óleos voláteis, como a atração de polinizadores, defesa contra o ataque de predadores, proteção contra perda de água e aumento de temperatura e a inibição de germinação. A

sua constituição varia desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos estão presentes em diferentes concentrações, normalmente variando de acordo com as características de cada planta (SIMÕES et al., 2007).

A composição dos óleos essenciais se transforma constantemente, mudando as proporções de seus constituintes ou transformando-se uns constituintes em outros, segundo a parte da planta, o momento do seu desenvolvimento ou o momento do dia, podendo também ser determinada geneticamente, variando de acordo com a origem botânica, o quimiotipo, fatores da natureza e o procedimento de cultivo das plantas e de obtenção. Ela varia conforme a origem geográfica, secagem, época de colheita, tipo de adubação, mas os principais constituintes responsáveis pelo aroma parecem permanecer constantes (GOBBO-NETO; LOPES, PEPORINE, 2007)

Segundo a Resolução – RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação à pressão reduzida ou outro método adequado) (BRASIL, 2007). Estas substâncias são conhecidas como essência, óleo essencial ou óleo etéreo. Entretanto, sua principal característica é a volatilidade, diferindo, assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas obtidos, geralmente, de sementes. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos essenciais, os quais são solúveis em solventes orgânicos apolares, geralmente são incolores ou ligeiramente amarelados e instáveis, principalmente em presença de ar, luz, calor, umidade e metais; a maioria dos óleos voláteis possui índice de refração e é opticamente ativo, cujas propriedades são usadas na sua identificação e controle da qualidade (SIMÕES et al., 2007).

Estes óleos são constituídos, em sua maioria, de derivados de fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo esse último predominante. Apresentam-se como uma mistura de diferentes concentrações de hidrocarbonetos terpênicos, alcóois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos de enxofre. Normalmente, um deles é o composto majoritário, havendo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços). São produzidos no metabolismo secundário das plantas, variando a intensidade e a composição de acordo com a espécie, fatores ambientais e o estágio de desenvolvimento da planta (OUSSALAH et al., 2007).

2.3.1 Biossíntese dos óleos essenciais

Os óleos essenciais podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pelos glandulares (*Lamiaceae*), células parenquimáticas diferenciadas (*Lauraceae*, *Piperaceae*, *Poaceae*), canais oleíferos (*Apiaceae*) ou em bolsas lisígenas ou esquisolisígenas (*Pinaceae*, *Rutaceae*). Os óleos essenciais podem estar estocados em certos órgãos, tais como flores (laranjeira e bergamoteira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro) ou ainda nas cascas do caule (canelas), madeira (sândalo, pau-rosa), raízes, rizomas (cúrcuma, gengibre), frutos (anis-estrelado, funcho, erva-doce) ou sementes (noz-moscada). Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar segundo a localização (OUSSALAH et al., 2007).

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo, geralmente, específica para um determinado órgão e característica para seu estágio de desenvolvimento. Entretanto, as condições ambientais são capazes de causar variações significativas (WILLIANS;

STOCKLEY, 1998). Temperatura, umidade relativa, período de exposição ao sol e regime de ventos exercem uma influência direta, sobretudo sobre as espécies que possuem estruturas de estocagem de óleo essencial em sua superfície (SALGADO, 2005).

A origem de todos os metabolitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dos intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (Figura 3). O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabolitos secundários aromáticos, tais como: taninos hidrolisáveis, alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos (triptofano e fenilalanina/tirosina) e os fenilpropanóides. A combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato originam as antraquinonas, flavonóides e os taninos condensados. Os derivados do acetato podem ser produzidos pela via ciclo do ácido cítrico, dando origem aos alcalóides derivados dos aminoácidos alifáticos, ornitina e lisina, e aos glicosídeos e glicosinolatos; pela via do mevalonato, originam os derivados do isopreno e, pela condensação da acetilCoA, formam-se os ácidos graxos e acetogeninas (SIMÕES et al., 2007).

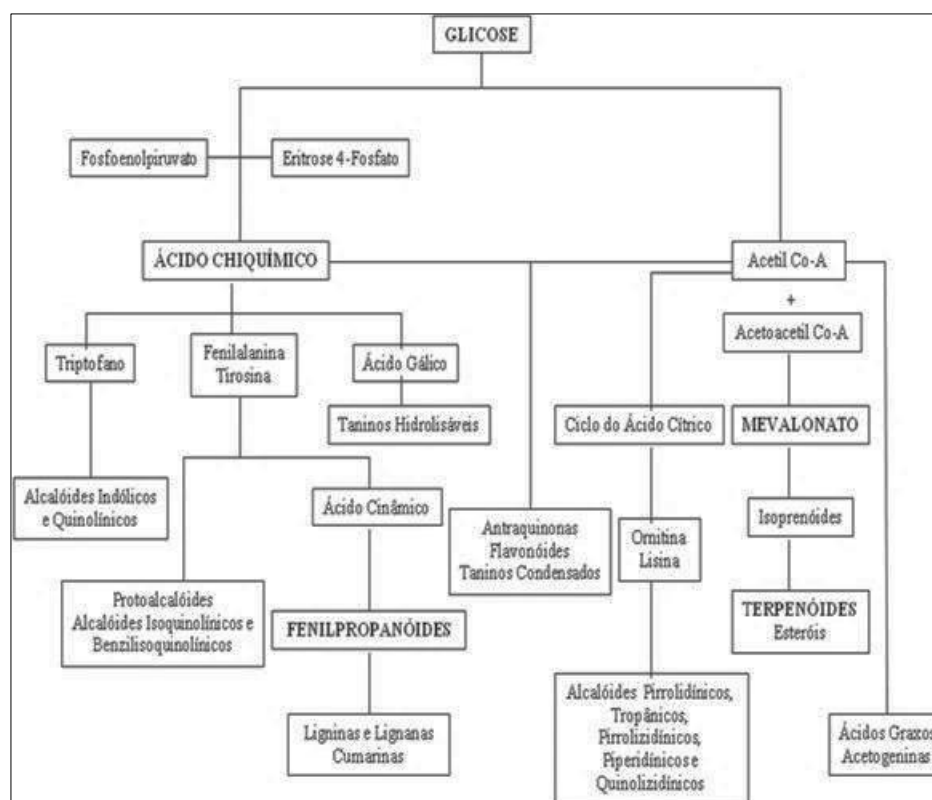


Figura 3 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários

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

Logo, os constituintes químicos dos óleos essenciais estão distribuídos em duas classes químicas distintas: terpenóides e fenilpropanóides, sendo os terpenóides produzidos com maior abundância e mais frequentemente, enquanto que os fenilpropanóides são indispensáveis para características flavorizantes e odorizantes (SANGWAN et al., 2001). Outros compostos como álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre também são encontrados nos óleos essenciais (SIMÕES et al., 2007).

2.3.2 Óleo de capim limão (*Cymbopogon citratus*)

A espécie *Cymbopogon citratus* é conhecida nacionalmente como capim-cidreira, capim-limão, capim-santo ou capim-cidrão, e internacionalmente como lemongrass. Pertence à família *Poaceae*, com longas folhas aromáticas, estreitas, agudas e ásperas com nervura central proeminente (LEAL et al., 2003). Geralmente apresenta como constituintes majoritários os monoterpenos citral (mistura isomérica de neral e geranial) e o mirceno (GUIMARÃES et al., 2011). Apresenta atividade farmacológica para vários distúrbios, tais como: insônia, nervosismo, má-digestão, flatulência, além de, antiespasmódico de tecidos uterinos e intestinais, antitérmico, diurético, antialérgico e analgésico, também há propriedades inseticidas (AKISUE et al., 1996).

É largamente empregado como aromatizante em perfumaria e cosmética, na preparação de colônias, sabonetes e desodorantes. Porém, seu maior emprego tem sido na indústria farmacêutica, servindo de material de partida para síntese de importantes compostos como iononas, metil-iononas e vitamina A (PRINS et al., 2008), tendo como principal componente o citral, composto pela mistura dos isômeros geranial e neral (65-80%), além de limoneno, citronelal, mirceno e geraniol (LEAL et al., 2003).

As atividades antibacterianas e antifúngicas do óleo essencial de *C. citratus* foram atribuídas ao citral (GUERRA et al., 2000). O mirceno não apresentou atividade antimicrobiana, mas, quando associado ao citral potencializou seu efeito (ONAWUNMI; YISAK; OGUNLANA, 1984).

2.3.3 Óleo de cravo da índia (*Syzygium aromaticum*)

O cravo-da-índia, espécie *Syzygium aromaticum*, da família *Myrtaceae*, tem seu óleo essencial obtido dos botões florais dessecados, que contém mais de 85%, por volume, de substâncias fenólicas totais, preponderando eugenol (70% a 95%), acetato de eugenila e β -cariofileno. É caracterizado como um líquido incolor ou amarelo-claro, classificado como aromatizante, e utilizado nos casos de dispepsia, bronquite e tratamentos dentários (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Entre os usos do eugenol destaca-se o emprego como antisséptico em odontologia e na fabricação de pastas dentais, em perfumaria, saboaria e como clarificador em histologia. O eugenol é também usado como matéria-prima para a obtenção de vanilina, empregada na aromatização de doces, chocolates, sorvetes e tabacos (AMORIN, 1989).

2.3.4 Óleo de negramina (*Siparuna guianensis* Aublet)

A espécie *Siparuna guianensis* Aublet, conhecida popularmente como “negramina”, pertencente à família *Siparunaceae*, é caracterizada por arbustos monóicos, 5-15 metros altura, de casca cinza e lisa (RENNER; HAUSNER, 2005).

O uso dessa espécie como recurso medicinal é bem difundido entre a população mato-grossense, a qual utiliza o decocto de suas folhas principalmente na forma de banho tópico para sintomas de sinusite, febre, reumatismo, enxaqueca, gripe, dores no corpo e “malina”, que é descrita como uma dor de cabeça causada pela exposição demasiada ao sol, provocando corrimento de sangue nasal. Com relação à composição química do óleo essencial, estudos têm mostrado que a composição dos óleos de folhas frescas e secas, assim como do caule e frutos se altera em diferentes países, até mesmo entre diferentes regiões geográficas no mesmo país, e dentro da mesma região de

acordo com as estações do ano (VALENTINI; RODRÍGUEZ-ORTÍZ; COELHO 2010).

Viana et al. (2002) analisaram o óleo essencial de folhas e caule, cascas do tronco, raízes e frutos de *S. guianensis* coletados em diversos locais da região Amazônica. Na maioria das plantas, foram identificados monoterpenos, sesquiterpenos, álcoois sesquiterpenos e duas cetonas alifáticas, 2-undecanona e 2-tridecanona. O α -pineno, mirceno, γ -cadineno, epi- α -cadinol estavam presentes em todas as amostras, mas o epi- α -cadinol (11,9 - 39,9%) foi sempre o maior componente, exceto para óleos das cascas e frutos, cujos maiores componentes foram respectivamente terpinoleno (33,4%) e 2-undecanona (52,7%).

A ocorrência de variabilidade de produção de óleos essenciais da *S. guianensis*, visando ao manejo sustentável da espécie, bem como ao controle da matéria-prima, foi também estudada por meio de análises da produção de óleo essencial em função das partes vegetais (folhas e galhos) e da época de colheita (primavera, verão, outono e inverno) por Castellani et al. (2006). Os resultados mostraram que a espécie apresentou pequena variação, em razão da sazonalidade na produção de óleo essencial. Contudo, houve diferença significativa entre as partes vegetais analisadas; nas folhas, ocorreu sempre maior produção de óleos essenciais. Os autores observaram que, no outono, ocorreu aumento de óleo essencial tanto nas folhas como nos galhos, estação em que a espécie começou a emitir botões florais, e, na primavera, fase de frutificação e brotação, os valores de rendimento de óleo essencial foram menores.

2.3.5 Óleo de orégano (*Origanum vulgare*)

O gênero *Origanum* é uma erva anual, perene, nativa de regiões do mediterrâneo, Euro-Sibéria e Irano-Sibéria. Um total de 38 espécies de

Origanum é reconhecido no mundo, sendo a maioria destas espécies, mais de 75%, concentradas na sub-região Leste-mediterrânea. As espécies de *Origanum* crescem abundantemente em encostas e montanhas rochosas numa ampla faixa de altitudes (0–4.000 m). Devido à variabilidade de características químicas e aroma, plantas de *Origanum*, pertencentes a diferentes espécies e ecotipos (biotipos), são amplamente utilizados na agricultura, indústria farmacêutica e cosmética, como erva culinária, aromatizando produtos alimentícios, bebidas alcoólicas e perfumaria devido à fragrância picante. Também tem sido usado como um remédio tradicional para tratar distúrbios convulsivos, digestivos e problemas menstruais (SAHIN et al., 2004).

A espécie *O. vulgare* é uma planta perene, aromática e condimentar conhecida como orégano, orégão, manjerona-silvestre ou manjerona-rasteira (SILVA JÚNIOR; VERONA, 1997). O orégano emana um perfume fresco, intenso, herbáceo, sendo utilizado para fins aromáticos e condimentares. Seu óleo essencial é reconhecido cientificamente como potente bactericida e fungicida (CASTRO et al., 2004).

A atividade antimicrobiana do orégano é atribuída aos seus óleos essenciais que contêm terpenos como o carvacrol e timol, o γ -terpinene e o p-cimeno são precursores do timol e carvacrol, respectivamente; portanto, sua concentração no produto é proporcional aos teores de seus precursores (BURT, 2004).

Além da atividade antimicrobiana, os terpenos presentes no óleo essencial de orégano possuem também importante atividade antioxidante (ZHENG; WANG, 2001), pois são capazes de doar elétrons aos radicais livres reativos, tornando as moléculas mais estáveis ou não reativas (DORMAN et al., 2003).

2.3.6 Óleo de tomilho (*Thymus vulgaris*)

A espécie *Thymus vulgaris*, pertencente à família Lamiaceae, é uma planta semiarbustiva, de ciclo perene, que atinge até 50 cm de altura. Desenvolve-se formando touceiras com caules lenhosos, rasteiros e tortuosos. As folhas são pequenas, opostas, sésseis, de formato linear-lanceolado ou oblongo e com bordos enrolados para baixo. As flores são pequenas de coloração rosada, branca e agrupadas em inflorescência, em formato tipo espiga. O aroma é herbáceo e o sabor levemente picante, sendo amplamente empregado na culinária como condimento (NAGRAES, 2003).

As folhas e flores são usadas como condimento. Já a planta, sem a raiz, é utilizada para a extração do óleo essencial, que corresponde a um líquido vermelho amarelado, com ricos aromas doces, quentes e pungentes. Seu óleo essencial é rico em timol, apresentando traços de carvacrol, potentes bactericidas e fungicidas (ESSAWI; SROUR, 2000). Outros compostos fenólicos, como taninos e flavonóides, foram encontrados em extratos da planta, responsáveis pelas atividades antioxidantes, expectorantes, digestivas e anti-inflamatórias (SHAN, 2002).

Os óleos essenciais retirados de diferentes partes do *T. vulgaris* mostraram presença considerável de flavonóides e vitamina E, compostos de grande interesse na indústria alimentícia por sua atividade antioxidante (GUILLÉN; MANZANOS, 1998).

2.3.7 Principais aplicações dos óleos essenciais

Estima-se que aproximadamente 3.000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são comercialmente importantes, especialmente para a indústria

de alimentos, farmacêutica, cosméticos e agricultura (NEDOROSTOVA et al., 2009).

Os óleos essenciais têm atraído a atenção de pesquisadores, devido ao potencial antioxidante, antimicrobiano, flavorizante, aromático, antisséptico, carminativo, antiespasmódico e expectorante (JAKIEMIU, 2008). Os óleos essenciais ou seus componentes são utilizados como produtos de perfumaria, higiene pessoal, na agricultura, aditivos em alimentos, como remédios naturais, dentre várias outras aplicações, com um mercado apresentando crescimento acima de 11% ao ano (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). São empregados também para mascarar odores desagradáveis em ambientes de trabalho e instalações sanitárias, além de serem usados como insumos em diversos produtos das indústrias de plásticos, tintas, borrachas, inseticidas e dentre outros (CAVICCHIOLI, 1986).

Alguns componentes dos óleos essenciais têm sido registrados pela Comissão Europeia para utilização como aromatizante em gêneros alimentícios, estes são caracterizados por não apresentarem qualquer risco à saúde do consumidor e incluem o carvacrol, carvona, cinamaldeído, citrato, p-cimeno, eugenol, mentol e timol (COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION, 2003).

Entretanto, alguns autores afirmam que a ingestão oral de doses elevadas de alguns compostos naturais pode promover graves problemas de toxicidade, sendo necessário encontrar um equilíbrio entre a dose efetiva e a que pode causar toxicidade (DUSAN et al., 2006). Alguns óleos essenciais podem induzir problemas alérgicos e dermatite de contato estando este problema relacionado com a natureza lipofílica e a sua capacidade de penetrar na pele (CARSON; RILEY, 2001).

Existe a perspectiva de substituir aditivos sintéticos por conservantes naturais presentes em condimentos (BARA, 1992). Deans e Ritchie (1987)

afirmam que a substituição de aditivos sintéticos por naturais, dependerá fundamentalmente da determinação de uma concentração ideal, porém, segundo Shelef (1984), as concentrações normalmente empregadas para realçar o aroma e sabor variam de 0,5 a 1%; contudo, não inibem o desenvolvimento microbiano que depende de concentrações superiores a 1%.

O crescente interesse em compostos antimicrobianos naturais tem aumentado devido a mudanças no comportamento dos consumidores em relação ao uso de agentes sintéticos de preservação de alimentos, detergentes e sanificantes que possuem impacto negativo no ambiente (LEBERT; LEROY; TALON, 2007). Espera-se elevação do consumo de produtos contendo óleos essenciais no futuro, devido ao aumento do “consumismo verde”, o qual estimula o uso e desenvolvimento de produtos derivados de plantas (TULEY, 1996), podendo ser aplicado ao setor de alimentos, cosméticos e produtos medicinais.

O mercado de óleos essenciais é próspero para países que dispõem de grande biodiversidade, como o Brasil, e condições de agregar valor às suas matérias-primas. Os principais óleos essenciais produzidos e exportados pelo Brasil são por ordem de importância: Laranja, limão, eucalipto, pau-rosa, lima e capim-limão.

2.3.7.1 Ação antifúngica dos óleos essenciais

Uma das aplicações dos óleos essenciais ocorre como agentes antimicrobianos. Essa capacidade, presente na maioria desses compostos, de certa maneira representa uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as das bactérias e fungos fitopatogênicos (BAKKALI et al., 2008).

As propriedades antibacterianas e antifúngicas dos óleos essenciais têm sido extensivamente estudadas, devido à crescente necessidade de alternativas no tratamento contra microrganismos resistentes a antibióticos. Geralmente, os óleos essenciais estudados apresentam propriedade antimicrobiana, sendo que alguns com maior e outros com menor grau de efeito (ANDRADE et al., 2012, 2015; BURT, 2004; FREIRE et al., 2011a, 2011b; LIMA et al., 2012; SEIXAS et al., 2011).

Outros estudos propõem o desenvolvimento de produtos contendo óleos essenciais como, o trabalho realizado por Giviziez (2010), que desenvolveu um antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *Syzygium aromaticum*. Esse avaliou o perfil de sensibilidade do mesmo, frente a bactérias patogênicas e fungos *in vitro* e na redução da contaminação bacteriana natural das mãos, demonstrando que o antisséptico à base desse óleo essencial mostrou-se eficaz contra todos os microrganismos testados. Outro exemplo, são os estudos de Busatta et al. (2007) que avaliando a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum vulgare* em linguiça fresca, verificaram que a adição desse à linguiça pode ser uma alternativa promissora, pois observaram efeitos bacteriostáticos do óleo diante de *Escherichia coli* em concentrações inferiores à concentração mínima inibitória (CMI). Devido à composição complexa dos óleos essenciais, o seu modo de ação, que provoca a inibição e/morte dos microrganismos, envolve diferentes mecanismos, onde todos os componentes da célula tornam-se possíveis alvos de atuação desses óleos e em geral, depende dos componentes majoritários do mesmo. Porém uma das mais importantes características dos óleos essenciais é a lipofilicidade, o que permite que os componentes dos óleos passem através da membrana citoplasmática, rompendo a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios e, assim, alterando a permeabilidade de organelas celulares, o que permite a saída de íons e do conteúdo celular, modificando o equilíbrio celular, provocando a liberação de

macromoléculas, coagulação do citoplasma e a lise celular (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004; CARSON; RILEY, 2001; SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e condução do experimento

As análises foram realizadas no Laboratório de Micologia de Alimentos DCA/UFLA; os óleos essenciais foram obtidos no Laboratório de Química orgânica - Óleos Essenciais do Departamento de Química (DQI) da UFLA e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) foi realizada no Laboratório de Análises Físico-Químicas de Aguardente de Cana DQI/UFLA. Os fungos utilizados neste estudo fazem parte da coleção de cultura de microrganismos do Departamento de Ciências dos alimentos, e estão armazenados a -80°C .

O experimento foi conduzido em quatro etapas. Na primeira etapa, avaliou-se o efeito antifúngico em concentração mínima inibitória (CMI) dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Syzygium aromaticum*, *Siparuna guianensis*, *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris* sobre os fungos *Aspergillus carbonarius* (CCDCA 01144, CCDCA 01120, CCDCA 0128) e *Aspergillus ochraceus* (CCDCA 0167, CCDCA 0151, CCDCA 0153). Em seguida foram selecionados os fungos e os óleos com melhores resultados de CMI e estes foram submetidos à avaliação de inibição de crescimento por contato direto com os óleos e posteriormente foi avaliada a inibição por seus compostos voláteis. Na última etapa foi a análise do potencial antiocrotogênico dos óleos essenciais por HPLC.

3.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Syzygium aromaticum*, *Siparuna guianensis*, *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris* (Tabela 1) foram

extraídos, caracterizados e fornecidos pelo Laboratório de Química Orgânica – Óleos essenciais. O método de extração foi o de hidrodestilação (Figura 4), utilizando o aparelho de Clevenger modificado (FARMACOPÉIA..., 2000).



Figura 4 Processo de extração do óleo essencial (hidrodestilação)

Tabela 1 Principais características dos óleos essenciais selecionados

Nome popular	Nome científico	Família	Composto majoritário
Capim limão	<i>Cymbopogon citratus</i>	Poaceae	Citral (69%); Mirceno (24%).
Cravo da Índia	<i>Syzygium aromaticum</i>	Myrtaceae	Eugenol (84%); B-cariofileno (11%).
Negramina	<i>Siparuna guianensis</i>	Siparunaceae	δ -elemeno (12%); Germacreno (11%); Biclogermacreno (11%).
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae	Timol (40%); Carvacrol (25%); p-cimeno (17%).
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae	Carvacrol (45%) Timol (25%)

3.3 Seleção dos fungos

Os fungos utilizados (Tabela 2) foram obtidos da Coleção de Cultura de Microrganismos do DCA/UFLA, selecionando isolados comprovadamente produtores de ocratoxina.

Tabela 2 Espécies e origem dos fungos utilizados

CCDCA	Espécie	Substrato	Localização geográfica
0144	<i>A. carbonarius</i>	Uva	Vale do São Francisco – PE/ Brasil.
01120	<i>A. carbonarius</i>	Uva	Vale do São Francisco – PE/ Brasil.
0128	<i>A. carbonarius</i>	Uva	Vale do São Francisco – PE/ Brasil.
0167	<i>A. ochraceus</i>	Amêndoa de cacau	Rondônia/Brasil
0151	<i>A. ochraceus</i>	Amêndoa de cacau	Rondônia/Brasil
0153	<i>A. ochraceus</i>	Amêndoa de cacau	Rondônia/Brasil

A reativação dos fungos foi realizada inoculando-se uma alíquota de cada cultura estoque em placas contendo 20 mL de meio de cultura Agar Czapeck Levedura (CYA) e incubados a 25°C por 7 dias. Após esse procedimento foi obtida uma suspensão de esporos, adicionando-se 40 mL de água destilada estéril com 0,5% de Tween 80 e filtrada em gaze estéril. A determinação da concentração final de esporos da suspensão foi realizada em câmara de Neubauer. Foi padronizada para todos os tratamentos a concentração de 10⁶ esporos/mL.

3.4 Determinação da concentração mínima inibitória dos óleos essenciais

A determinação da CMI dos óleos essenciais foi realizada por teste de difusão em disco aceito pelo Food and Drug Administration (FDA) e aceito pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2003). Foi utilizado o inóculo em concentração de 10^6 esporos/mL, com contagem em câmara de Neubauer. Esta solução foi transferida para uma placa de Petri contendo meio CYA, por técnica de espalhamento em superfície.

Os discos de papel filtro de 6mm embebidos com 10 μ L de óleos essenciais em concentrações de 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8; e 3,9 μ g.mL⁻¹, foram colocados sob o meio de cultura como sugerido por Karaman et al. (2003) (Figura 4). Como controle positivo foi utilizado o fungicida Maxim[®] (Syngenta Crop Protection AG) em diluição de acordo com a recomendação do fabricante, e como controle negativo, foram utilizados discos embebidos com 10 μ L da solução diluente dos óleos essenciais, o dimetilsulfóxido (DMSO).

As placas foram incubadas invertidas em estufas BOD a 25°C, por 72 horas, sendo então realizadas medições dos diâmetros dos halos de inibição formados. As placas com controle positivo permaneceram incubadas por um período de 7 dias, afim de comprovar sua eficácia.

A partir dos diâmetros obtidos, pôde-se avaliar o perfil de inibição dos fungos filamentosos em diferentes concentrações dos óleos. O teste foi realizado em triplicata. E com isso definiu-se a CMI como a menor concentração de óleo essencial em que ocorreu a formação do halo de inibição.

3.5 Determinação da inibição do crescimento micelial dos isolados fúngicos sob ação dos óleos essenciais

Após a obtenção das concentrações mínimas inibitórias, foram escolhidos os fungos e os óleos com melhores resultados para as etapas seguintes.

Para a obtenção do inóculo, os fungos foram incubados a 25 °C por 7 dias em meio CYA. Após esse período, foi preparada a suspensão de esporos em água destilada estéril contendo 0,5% de Tween 80. A concentração final de esporos foi determinada em câmara de Neubauer (10^6 esporos/mL).

3.5.1 Avaliação da inibição de crescimento micelial dos fungos por contato com os óleos essenciais

O plaqueamento foi realizado inoculando-se 10 µL da suspensão de esporos no centro da placa contendo o meio Ágar Czapeck (CYA) com as concentrações mínimas inibitórias de cada óleo essencial, diluído em DMSO.

Como controle negativo, 10 µL da suspensão de esporos foram adicionados à placa contendo apenas o meio CYA, e como controle positivo foi utilizado o fungicida Maxim[®] (Syngenta Crop Protection AG), onde 10 µL da suspensão de esporos foram adicionados à placa contendo o meio CYA e o fungicida na diluição sugerida pelo fabricante. Todas as placas foram incubadas por 10 dias em BOD a 15 °C, 25 °C e 35 °C, no escuro, e foi medido o crescimento a cada 48 horas. Essas análises foram realizadas em triplicata.

3.5.2 Avaliação da inibição de crescimento micelial dos fungos pelos compostos voláteis dos óleos essenciais

O plaqueamento foi realizado inoculando-se 10 µL da suspensão de esporos em três pontos equidistantes em placa contendo apenas o meio CYA. Na tampa da placa foi aderido um disco de algodão contendo 10 µL de óleo essencial na sua concentração mínima inibitória específica para cada fungo, de modo a impedir o contato direto do óleo com o fungo, possibilitando apenas a possível atuação dos compostos voláteis.

A incubação foi feita em estufa BOD em temperaturas de 15°C, 25°C e 35°C, por um período de 10 dias e o crescimento dos fungos filamentosos foi medido a cada 48 horas. Como controle, foram incubadas placas contendo apenas o DMSO e outra com o fungicida MAXIM® (Syngenta Crop Protection AG). O experimento foi realizado em triplicata.

A concentração mínima inibitória foi definida como sendo a menor concentração do óleo essencial capaz de formar halo de inibição visível do microrganismo testado.

3.5.3 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial com parcela subdividida no tempo, utilizando teste de Tukey com a probabilidade $p < 0,05$. Os dados foram avaliados pelo programa SAS.

3.6 Avaliação da atividade antiocrotogênica dos óleos essenciais

A atividade antiocrotogênica dos óleos essenciais foi avaliada pela inibição da produção de ocratoxina A (OTA), adaptando o método descrito por Wang et al. (2012).

3.6.1 Extração da ocratoxina das culturas fúngicas

A extração da OTA foi realizada no 10º dia do período de incubação dos esporos fúngicos, de acordo com a metodologia descrita por Bragulat, Abarca e Cabanes (2001), com algumas modificações.

Para a realização desta etapa, apenas as placas em que houve crescimento micelial foram selecionadas. Foram retirados três fragmentos do micélio do fungo com o ágar. Para a remoção dos plugs, foram feitos cortes circulares de aproximadamente 10 mm de diâmetro, com auxílio de ponteiros estéreis de 1000 µL. Esses pedaços foram pesados e colocados em tubos de ensaio envolvidos por papel-alumínio, para evitar a degradação da OTA. Foi, então, adicionado 1 mL de metanol nos tubos de ensaio, os quais foram, então, homogeneizados por 5 segundos e incubados a 25 °C por 60 minutos. Os extratos foram filtrados em unidades filtrantes de PTFE (0,22 µm) (Millipore) e, então, analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) no Laboratório de Análises Físico-Químicas de Aguardente de Cana do Departamento de Química da UFLA.

3.6.2 Determinação da concentração da solução-estoque e preparo da curva analítica para a OTA

A curva analítica foi preparada baseando-se no método descrito pelo comitê de normalização para a análise de OTA em vinho e cerveja (COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION, 2003). Utilizou-se uma solução-estoque previamente preparada, dissolvendo-se o padrão comercial de OTA (O1877, Sigma) em tolueno/ácido acético (99:1, v/v). A concentração da solução-estoque foi determinada por medição da absorbância UV a 333 nm e calculada segundo Association of Official Agricultural Chemists (2002) em 136% de OTA.

Após a determinação da concentração da solução-estoque, foram preparadas, por diluição, soluções-padrão com concentrações de 0,001; 0,01; 0,025; 0,1 e 0,15 $\mu\text{g/g}$, que foram analisadas por CLAE em simultâneo com as amostras. Regularmente, novos padrões foram preparados e injetados, de forma a verificar e ajustar a curva analítica.

3.6.3 Condições cromatográficas utilizadas na quantificação da OTA por CLAE

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 A_{XL}. 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 12,5mm, 5 μm).

Foram seguidas as condições cromatográficas de comprimentos de onda: excitação de 332 nm e emissão de 476 nm. O fluxo utilizado em toda a análise

foi de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e o volume injetado das amostras e do padrão foi de $20 \mu\text{L}$. 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 $11 \pm 0,1 \text{ min}$ (Figura 6). A quantificação da OTA nas amostras foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear ($y = 1,11756 \times 10^7$; $x = 2592,1485$; onde, y = área do pico e x = concentração de OTA), correlacionando a área do pico versus a concentração da respectiva solução padrão, sendo que o coeficiente de determinação (r^2) obtido foi 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: $\text{LD} = 3\text{DP}/m$ e $\text{LQ} = 10\text{DP}/m$ (onde, DP = estimativa do desvio padrão da linha de regressão e m = coeficiente angular da linha de calibração) (HARRIS, 2008). Para estes, foram encontrados os valores de 0,0004 e 0,0016 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, enquanto as soluções padrão de OTA foram injetadas em triplicata.

3.6.4 Quantificação da OTA

A quantificação da OTA nas amostras foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear correlacionando a área do pico versus a concentração da respectiva solução padrão. Durante a realização dos testes outras curvas foram feitas para a verificação do coeficiente de correlação (r^2) aceitável de 0,99, recomendados pela ANVISA.

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: $\text{LD} = 3\text{DP}/m$ e $\text{LQ} = 10\text{DP}/m$ (onde, DP

= estimativa do desvio padrão da linha de regressão e m = coeficiente angular da linha de calibração) (HARRIS, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Concentração mínima inibitória dos óleos essenciais

As concentrações mínimas inibitórias (CMI) obtidas para cada óleo essencial sobre os fungos das espécies de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* estão expressas na Tabela 3, e os testes podem ser visualizados na Figura 5.

Tabela 3 Valores da concentração mínima inibitória obtida para os isolados de *Aspergillus carbonarius* (CCDCA 01144; CCDCA 01120; CCDCA 0128) e *A. ochraceus* (CCDCA 0167; CCDCA 0151; CCDCA 0153), através da técnica de difusão em disco

	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					DMSO	Fungicida
	<i>C.</i> <i>citratius</i>	<i>S.</i> <i>aromaticum</i>	<i>S.</i> <i>guianensis</i>	<i>O.</i> <i>vulgare</i>	<i>T.</i> <i>vulgaris</i>		
CCDCA 01144	62,5	15,6	12,5	31,2	31,2	NS	S
CCDCA 01120	62,5	15,6	62,5	62,5	31,2	NS	S
CCDCA 0128	250	31,2	62,5	62,5	62,5	NS	S
CCDCA 0167	62,5	31,2	NI	1,56	31,2	NS	S
CCDCA 0151	12,5	31,2	500	1,56	62,5	NS	S
CCDCA 0153	62,5	62,5	NI	3,12	62,5	NS	S

*NS: não sensível; S: sensível; DMSO: dimetilsulfóxido; Fungicida: Maxim[®]

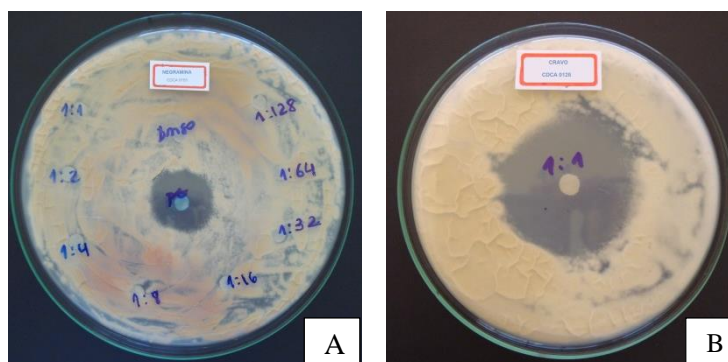


Figura 5 Teste dos óleos essenciais com papel filtro (A) Negramina e fungo *A. ochraceus*; (B) Cravo e fungo *A. carbonarius*.

É possível observar que todos os óleos foram ativos para todos os fungos avaliados apresentando efeito inibitório satisfatório ($12,5 - 250 \mu\text{g mL}^{-1}$), sendo que o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* mostrou-se mais eficiente, apresentando menores valores de CMI. E o óleo de *Cymbopogon citratus* foi o menos eficiente, apresentando os maiores valores de CMI. O fungo CCDCA 01144 apresentou maior sensibilidade frente aos óleos testados e o CCDCA 0128 mostrou menor sensibilidade. Todos os microrganismos apresentam sensibilidade frente ao fungicida, e o DMSO não inibiu nenhum dos fungos. Para os fungos *Aspergillus ochraceus* é possível notar que o óleo de *Siparuna guianensis* não inibiu o crescimento de 2 fungos, e para o CCDCA 0151 sua CMI foi de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os outros quatro óleos foram ativos para todos os fungos, apresentando efeito inibitório bastante satisfatório ($1,56 - 62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), sendo que o óleo essencial de *Origanum vulgare* mostrou-se como o mais eficiente, apresentando menores valores de CMI. O fungo CCDCA 0153 apresentou a menor sensibilidade frente aos óleos testados e o CCDCA 0151 mostrou maior sensibilidade. Todos os microrganismos apresentam sensibilidade frente ao fungicida, e o DMSO não inibiu nenhum dos fungos.

Ainda não existe um consenso sobre qual seria um nível de inibição aceitável para produtos naturais. Em trabalho realizado por Aligianis et al. (2001), foi estabelecida uma classificação para esses produtos, com base nos resultados de CMI; inibição forte (CMI até $500 \mu\text{g mL}^{-1}$), inibição moderada (CMI entre 600 e $1.500 \mu\text{g mL}^{-1}$) e inibição fraca (CMI acima de $1.600 \mu\text{g mL}^{-1}$). De acordo com os resultados da Tabela 3, os óleos de *Cymbopogon citratus*, *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare* e de *Thymus vulgaris* podem ser considerados fortes inibidores, uma vez que apresentaram ação inibitória em todos os fungos testados, com valores abaixo de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, resultado diferente foi obtido para o óleo de *Siparuna guianensis* que obteve inibição em $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o CCDCA 0151 e não inibiu duas cepas de *A. ochraceus*.

4.2 Inibição dos óleos essenciais no crescimento micelial dos isolados fúngicos

A partir dos dados obtidos pela análise de CMI foram selecionados 2 isolados de cada espécie de *A. carbonarius* (CCDCA 01144 e CCDCA 01120) e de *A. ochraceus* (CCDCA 0167 e CCDCA 0151) e três óleos essenciais: *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare* e de *Thymus vulgaris*.

4.2.1 Inibição por difusão em ágar

As propriedades fungicidas dos óleos de *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare* e de *Thymus vulgaris* foram testadas sobre o crescimento micelial dos fungos selecionados, quando em contato direto com os isolados.

A interação fungo/óleo ($p < 0,0001$) afetou o crescimento, como pode ser observado na Tabela 4. Os óleos *Syzygium aromaticum* e *Thymus vulgaris* foram

similares entre si, inibindo o crescimento micelial de todos os fungos avaliados. Para o óleo de *Origanum vulgare*, foi observada a inibição para os isolados de *A. carbonarius*. O controle, quando comparada aos demais tratamentos, apresentou crescimento médio do 1,91cm. Desta forma é possível perceber que os óleos de *Syzygium aromaticum* e *Thymus vulgaris* foram igualmente eficientes, diferentemente dos tratamentos feitos com o óleo *Origanum vulgare*.

Tabela 4 Crescimento fúngico em função dos óleos essenciais

Fungo	Óleo			Sem óleo
	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	
<i>A. carbonarius</i>	0,00 aB	0,00 cB	0,00 aB	1,92 bA
<i>A. carbonarius</i>	0,00 aB	0,00 cB	0,00 aB	2,21 aA
<i>A. ochraceus</i>	0,00 aC	0,52 bB	0,00 aC	1,72 cA
<i>A. ochraceus</i>	0,00 aC	0,91 aB	0,00 aC	1,79 abA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O crescimento dos fungos sofreu interação do efeito temperatura/óleo ($p < 0,0001$). Na Tabela 5 é possível observar que os óleos *Syzygium aromaticum* e *Thymus vulgaris* obtiveram respostas similares (se comportaram de forma semelhante), inibindo o crescimento em todas as temperaturas. Nas temperaturas de 15 °C e 25 °C o resultado foi semelhante, onde em *Syzygium aromaticum* e *Thymus vulgaris* houve inibição e no tratamento com o óleo *Origanum vulgare* e sem óleos houve crescimento; porém, apresentando redução de 90,05%. Para a temperatura de 35°C houve inibição com todos os óleos. A partir destes dados é possível verificar a inibição para 2 óleos (*Syzygium aromaticum* e *Thymus vulgaris*) e 1 temperatura (35°C).

Tabela 5 Crescimento fúngico em função dos óleos essenciais sob diferentes temperaturas

Óleo	Temperatura		
	15 °C	25 °C	35 °C
<i>Syzygium aromaticum</i>	0,00 cA	0,00 cA	0,00 bA
<i>Origanum vulgare</i>	0,19 bB	0,88 bA	0,00 bC
<i>Thymus vulgaris</i>	0,00 cA	0,00 cA	0,00 bA
Sem óleo	1,51 aB	3,27 aA	0,95 aC

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A interação fungo/temperatura ($p < 0,001$) afetou o crescimento. Para todos os fungos houve diferença no crescimento dentro das temperaturas. Sendo que na temperatura de 25°C os *Aspergillus carbonarius* cresceram de forma semelhante, e para *Aspergillus ochraceus* a inibição foi semelhante à 35°C. A melhor temperatura de crescimento foi a de 25°C para todos os fungos, e o menor crescimento para os *Aspergillus carbonarius* foi em 15°C e para os *Aspergillus ochraceus* foi a 35°C (Tabela 6). Assim podemos perceber que a temperatura influi diretamente no crescimento micelial dos fungos testados.

Tabela 6 Crescimento fúngico em função da temperatura, com óleos em contato

Fungo	Temperatura		
	15 °C	25 °C	35 °C
<i>A. carbonarius</i>	0,37 cC	0,66 cA	0,41 bB
<i>A. carbonarius</i>	0,42 bC	0,69 cA	0,54 aB
<i>A. ochraceus</i>	0,39 bcB	1,29 bA	0,00 cC
<i>A. ochraceus</i>	0,52 aB	1,51 aA	0,00 cC
Média	0,41 B	1,04 A	0,24 C

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A atividade antifúngica dos óleos essenciais é bastante documentada. Em trabalho realizado por Montanari (2010) foi demonstrado que o óleo de *S. guianensis* inibiu o crescimento de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trychophyton rubrum* e *Aspergillus fumigatus* em concentrações reduzidas, principalmente para o fungo *C. neoformans* ($16 \mu\text{g mL}^{-1}$). Andrade et al. (2015) analisaram os óleos de *S. guianensis* e de *Cinnamodendron dinisii* sobre fungos da espécie *A. flavus*, *A. carbonarius*, *A. niger* e *Penicillium comune*, encontrando CMI variando de $7,81\text{-}125 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo de *S. guianensis*, resultado diferente do encontrado neste trabalho para o *A. carbonarius*. Guimarães et al. (2011) verificaram que o óleo essencial de *C. citratus* e seu constituinte majoritário, o citral, apresentaram uma maior atividade sobre o fitopatógeno *Alternaria alternata* e pouca atividade sobre *Fusarium oxysporum cubensis*. Rana, Rana e Rajak (2011), avaliou o óleo de *Syzygium aromaticum* para fungos do gênero *Aspergillus* demonstrando redução considerável em seu crescimento micelial. O *Origanum vulgare* mostrou-se bastante eficiente para *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. terreus* e *A. ochraceus*, apresentando CMI de $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MITCHELL et al., 2010). Para *Thymus vulgaris* Sokolić-Mihalak et al. (2012) relatou inibição do crescimento de *Aspergillus* sp. Para o óleo de *Origanum vulgare* Carmo, Lima e Souza (2008) encontrou $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ como CMI par *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. terreus* and *A. fumigatus*. Zambonelli et al. (2004) estudaram o efeito do óleo essencial comercial de *Thymus vulgaris* L. e timol na citomorfologia das hifas de fungos fitopatógenos e verificaram um aumento da vacuolização do citoplasma e acúmulo de corpos lipídicos, ondulações da membrana citoplasmática e alterações do retículo endoplasmático e mitocôndrias. Alterações semelhantes foram observadas, por meio da microscopia eletrônica de transmissão, por Rasooli, Rezaei e Allameh (2006), ao avaliarem o efeito de *Thymus ericolyx* e *Thymus x-porlock* sobre *Aspergillus niger* e por Zuzarte et al. (2011), ao observarem lesões da membrana

citoplasmática de isolados de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspegillus* e dermatófitos sob efeito do óleo essencial de *Lavandula multifida* L. Pinto et al. (2009), para esclarecer o mecanismo de ação de *Thymus pulegioides* sobre leveduras, fungos filamentosos e dermatófitos, avaliaram, por citometria de fluxo, a integridade da membrana citoplasmática e o efeito do óleo sobre a quantidade de ergosterol. Como resultados, observou-se que o óleo essencial causou lesões na membrana plasmática e reduziu o conteúdo de ergosterol.

O mecanismo de ação inibitória dos óleos essenciais sobre fungos, assim como sobre bactérias, está baseado na sua lipofilicidade, uma vez que qualquer ação que interfira na composição ou arranjo tridimensional na membrana plasmática celular microbiana estará tornando-a desprovida de uma estrutura essencial ao equilíbrio homeostático, condição fundamental para o seu ótimo funcionamento fisiológico. Assim, qualquer alteração na estrutura celular pode vir a tornar o ambiente microbiano intracelular incompatível com a sua sobrevivência. Além disso, nas membranas dos fungos está presente o ergosterol, que se apresenta como modulador de fluidez da membrana fúngica. Quimicamente, classifica-se como um esteroide de membrana, é altamente lipofílico, e qualquer ação sobre esse elemento por parte dos óleos essenciais desencadeia um desequilíbrio na fluidez da membrana plasmática dos fungos, levando a alterações na homeostase intracelular (SOUZA et al., 2003). O timol e carvacrol têm sido referidos como sendo os compostos fenólicos mais ativos contra uma ampla gama de microrganismos; este efeito inibitório pode ser devido à sua elevada hidrofobicidade (DAMBOLENA et al., 2008; GUTIÉRRES-LARAÍNZZAR et al., 2012), que está correlacionada com o log P (a taxa de concentração dos compostos lipofílicos em octanol / água) (BEN-ARFA et al., 2006). No entanto, isoeugenol, um composto menos lipofílico do que o timol e carvacrol, mostrou uma maior atividade anti-fúngica (PIZZOLITO et al., 2015). Por outro lado, a vanilina, o composto mais hidrofílico utilizado no

presente estudo foi mais ativo contra *A. parasiticus* do que o m-cresol e fenol. Desta forma Pizzolito et al. (2015) sugerem que não são somente as propriedades hidrofóbicas que estão associadas com a eficácia dos compostos fenólicos, mas também outras propriedades parecem estar envolvidas na atividade inibidora.

O crescimento dos fungos demonstrou sofrer influência do tempo, da temperatura e da presença dos óleos em contato direto. Pôde-se observar, como era esperado, maior crescimento no último dia (dia 10) para todos os fungos que apresentaram crescimento micelial. E em relação à temperatura em função do tempo (Tabelas 4, 5 e 6), tanto para os *A. carbonarius* quanto para os *A. ochraceus*, a melhor temperatura de crescimento foi obtida em 25°C, sendo que as amostras de *A. ochraceus* não cresceram a 35°C. Uma faixa de 20 a 33°C, considerada ótima para o crescimento de o *A. carbonarius*, foi encontrada por Passamani et al. (2014), e para o *A. ochraceus*, Pardo, Ramos e Marín (2005) encontraram como temperatura ótima de crescimento uma faixa de 20 a 30°C, corroborando com os dados deste trabalho. Sobre o crescimento em função dos óleos (considerando as temperaturas e o tempo) podemos observar que os óleos de *Syzygium aromaticum* e de *Thymus vulgaris* inibiram o crescimento dos fungos (Tabelas 3, 4 e 5). Sokolic-Mihalak, et al. (2012) avaliaram o óleo de *Thymus serpyllum* para *A. ochraceus* e *A. carbonarius*, encontrando inibição de 1,56 µg mL⁻¹, que é uma inibição considerada forte, assim como a encontrada neste trabalho. Assim como neste trabalho, Mitchell et al. (2010) também encontraram inibição de crescimento micelial e redução do crescimento para espécies de *Aspegillus* sp tratados com *Origanum vulgare*.

4.2.2 Inibição por compostos voláteis

As propriedades dos compostos voláteis dos óleos de *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare* e de *Thymus vulgaris* foram testadas sobre o crescimento micelial dos fungos selecionados.

A interação fungo/compostos voláteis ($p < 0,0001$) afetou o crescimento. (Tabela 7). Comparando-se as médias de crescimento com a testemunha, houve redução pelo menos 49,48% para os isolados de *A. carbonarius* e de 52,88% para *A. ochraceus*. Com a observação dos dados é possível perceber que os compostos voláteis inibiram efetivamente o crescimento dos fungos.

Tabela 7 Crescimento fúngico em função dos compostos voláteis dos óleos essenciais

Fungo	Compostos voláteis			
	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	sem óleo
<i>A. carbonarius</i>	0,97 bB	0,04 cC	0,85 bB	1,92 bA
<i>A. carbonarius</i>	1,30 aB	0,03 cD	0,19 cB	2,21 aA
<i>A. ochraceus</i>	0,03 cC	1,25 aB	1,16 aB	1,72 cA
<i>A. ochraceus</i>	0,00 cC	0,90 bB	0,00 dC	1,79 abA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O crescimento dos fungos sofreu interação do efeito fungos*temperatura ($p < 0,0001$). Para todos os fungos houve diferença no crescimento dentro das temperaturas. A melhor temperatura de crescimento foi a de 25°C para todos os fungos, e o menor crescimento para os *Aspergillus carbonarius* foi em 15°C e para os *Aspergillus ochraceus* foi a 35°C (Tabela 8). Assim podemos perceber

que a temperatura influi diretamente no crescimento micelial dos fungos testados.

Tabela 8 Crescimento fúngico em função da temperatura

Fungo	Temperatura			Média
	15 °C	25 °C	35 °C	
<i>A. carbonarius</i>	0,51 bC	1,65 bA	0,67 aB	0,48 c
<i>A. carbonarius</i>	0,60 abC	1,45 cB	0,75 aB	0,55 b
<i>A. ochraceus</i>	0,69 aB	2,40 aB	0,02 bC	0,56 b
<i>A. ochraceus</i>	0,55 bB	1,46 cA	0,00 bC	0,67 a

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A interação fungo/compostos voláteis ($p < 0,0001$) afetou o crescimento. (Tabela 9). Comparando-se as médias de crescimento com a testemunha, houve redução de pelo menos 49,48% para os isolados de *A. carbonarius* e de até 52,88% para *A. ochraceus*. Com a observação dos dados é possível perceber que os compostos voláteis inibiram o crescimento dos fungos. A interação tempo/fungo ($p < 0,0001$) também afetou o crescimento. Em relação ao tempo (Tabela 9), em média, o crescimento foi diferente para todos os fungos, aumentando gradativamente.

Tabela 9 Crescimento fúngico em função do tempo

Fungo	Tempo (dias)				
	2	4	6	8	10
<i>A. carbonarius</i>	0,65 aC	0,72 aC	0,97 aA	1,14 bB	1,24 bcA
<i>A. carbonarius</i>	0,59 aC	0,78 aB	1,02 aA	1,11 bA	1,15 bcA
<i>A. ochraceus</i>	0,20 bE	0,64 aD	1,13 aC	1,51 aB	1,69 aA
<i>A. ochraceus</i>	0,12 bD	0,44 bC	0,80 bB	0,94 cAB	1,04 cA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Para os compostos voláteis, apesar de menor redução de crescimento micelial, quando comparado ao tratamento por óleos em contato, também apresentou redução no crescimento (Tabelas 7, 8 e 9). Outros trabalhos empregando componentes voláteis no controle de patógenos também demonstraram o efeito fungicida de compostos voláteis de óleos essenciais. Componentes voláteis presentes nos óleos essenciais de tomilho, orégano e capim-limão mostraram inibição total do crescimento de *Botrytis cinerea* e *Alternaria arborescens* (PLOTTO; ROBERTS; ROBERTS, 2003). Os compostos voláteis trans-2-hexenal, carvacrol, trans-cinamaldeído e citral (componente do óleo de capim limão) apresentam expressiva atividade antifúngica sobre o crescimento micelial, germinação e esporulação de *Penicillium expansum* (NERI et al., 2006). Componentes voláteis do óleo essencial de capim limão proporcionaram redução significativa no desenvolvimento das colônias de *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus Níger*, entre 25 e 500 ppm (TZORTZAKIS; ECONOMAKIS, 2007).

Vários grupos de pesquisa reportaram a oscilação da biossíntese do ergosterol (LUCINI et al., 2006; SCUDAMORE; MACDONALD, 1998; YAMAMOTO-RIBEIRO et al., 2013). Yamamoto-Ribeiro et al. (2013)

verificaram que o óleo essencial de *Zingiber officinale* aumenta a biossíntese do ergosterol de *F. verticillioides* a 0,1 µg / mL quando comparado com o grupo controle e reduz ou inibe completamente a biossíntese de ergosterol em concentrações mais elevadas. Lucini et al. (2006) verificaram que baixas concentrações de monoterpenos levam à peroxidação lipídica em fungos, induzindo uma resposta adaptativa e a reprogramação de expressão genômica de proteção da estrutura da parede celular, e, conseqüentemente, aumentando a biossíntese do ergosterol. Dambolena et al. (2008) verificaram que o limoneno, mentol, mentona, e timol a 75 µg mL⁻¹ poderiam aumentar a produção de ergosterol em *F. verticillioides*. Essas variações de produção do ergosterol podem justificar o crescimento micelial dos fungos que estão em contato com os compostos voláteis dos óleos essenciais, pois a concentração que entra em contato com o fungo é bem menor do que quando tratado em contato direto.

4.3 Produção de OTA

Para a avaliação de produção da OTA, somente os fungos que apresentaram crescimento no décimo dia foram utilizados (Figura 6), totalizando 37 amostras, e o dados estão apresentados nas Tabelas 10 e 11.

A quantificação da ocratoxina A (OTA) nas amostras foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear, sendo 1,0 o coeficiente de determinação (r^2) obtido. 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: $LD = 3DP/m$ e $LQ = 10DP/m$ (onde, DP = estimativa do desvio padrão da linha de regressão e m=coeficiente angular da linha de calibração) (HARRIS, 2008).



Figura 6 Plugs retirados da área interna, meio e borda de cada colônia no 10º dia do período de incubação para a extração da OTA

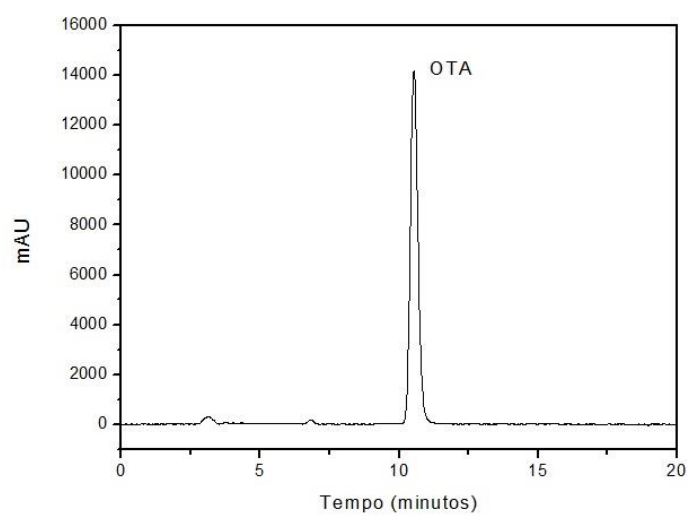


Figura 7 Cromatograma padrão de Ocratoxina A

Tabela 10 Concentração de OTA ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) produzida por fungos sob ação dos óleos essenciais em contato, em três temperaturas

Amostra	óleo	Temperatura		
		15°C	25°C	35°C
<i>A. carbonarius</i>	-	0,18	0,02	0,47
<i>A. carbonarius</i>	-	1,86	0,54	1,01
<i>A. ochraceus</i>	-	0,9	1,04	scm
<i>A. ochraceus</i>	-	1,08	1,04	scm
<i>A. ochraceus</i> *	<i>O. vulgare</i>	0,21	0,94	scm
<i>A. ochraceus</i> **	<i>O. vulgare</i>	0,15	2,59	scm
Média		0,73	1,02	0,76

* CCDCA 0151; ** CCDCA 0167. scm: sem crescimento micelial.

Analisando os dados (Tabela 16) é possível observar que a menor média de produção de OTA, para os óleos em contato, foi na temperatura de 15°C, onde se pode observar também que a produção de OTA ocorreu em todos os fungos. E a maior média de produção foi a 35°C.

Nos *Aspergillus ochraceus* em temperatura de 15°C sob a ação do óleo essencial de *Origanum vulgare*, a redução observada variou de 76,67% a 86,11%. E para os *A. carbonarius* não houve crescimento micelial suficiente para os fungos tratados com o óleo, não sendo possível fazer comparações de produção.

Na temperatura de 25°C também houve produção de OTA em todas as testemunhas e nos *Aspergillus ochraceus* sob ação do óleo essencial de *Origanum vulgare* (Tabela 10). Sendo que a produção de OTA pelo *A. ochraceus* (CCDCA 0151) tratado com o óleo de *Origanum vulgare* foi um pouco menor ($0,10\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) quando comparada à testemunha, e para o *A. ochraceus* (CCDCA 0167) tratado com o óleo houve um aumento de 249,03%.

Para a temperatura de 35°C (Tabela 10), foi observada a produção de OTA para as duas testemunhas de *A. carbonarius* que apresentaram crescimento micelial.

Tabela 11 Concentração de OTA ($\mu\text{g.g}^{-1}$) produzida por dos fungos sob ação dos compostos voláteis em três temperaturas

Amostra	Temperatura			
	óleo	15°C	25°C	35°C
<i>A. carbonarius</i>	-	0,18	0,02	0,47
<i>A. carbonarius</i>	-	1,86	0,54	1,01
<i>A. ochraceus</i>	-	0,9	1,04	scm
<i>A. ochraceus</i>	-	1,08	1,04	scm
<i>A. ochraceus</i>	<i>O. vulgare</i>	1,11	11,53	scm
<i>A. ochraceus</i>	<i>O. vulgare</i>	1,55	9,67	scm
<i>A. carbonarius</i>	<i>T. vulgaris</i>	scm	scm	0,08
<i>A. carbonarius</i>	<i>T. vulgaris</i>	scm	scm	0,11
<i>A. ochraceus</i>	<i>T. vulgaris</i>	3,92	0,38	scm
<i>A. carbonarius</i>	<i>S. aromaticum</i>	0,29	1,57	0,03
<i>A. carbonarius</i>	<i>S. aromaticum</i>	0,02	0,1	0
Média		1,21	2,86	0,28

**A. carbonarius*; ** *A. ochraceus*. scm: sem crescimento micelial.

Observando a Tabela 11, é possível perceber a produção de OTA ocorreu em todas as amostras testadas, destacando a temperatura de 25° C com a maior média de produção de OTA. Em 15°C destaca-se o isolado de *A. ochraceus* tratado com o óleo de *Thymus vulgaris* ($3,92\mu\text{g.g}^{-1}$), e a menor produção foi apresentada por *A. carbonarius* tratado com o óleo de *Syzygium aromaticum* ($0,02\mu\text{g.g}^{-1}$). Para os *A. ochraceus*, houve aumento de quase 50% quando tratado com *Origanum vulgare* e de mais de 360% para o tratamento com o *Thymus vulgaris*.

Para a temperatura de 25°C foi possível detectar a produção de OTA em todas as amostras avaliadas (Tabela 11). Quando comparadas às testemunhas, as amostras de *Aspergillus carbonarius* tratadas com óleo de *Syzygium aromaticum* se comportaram de maneiras diferentes, uma teve um aumento de mais de 78 x, e a outra, apresentou redução de 81%. O que pode ser explicado pela variabilidade genética das espécies e comportamento individualizado dos organismos. As amostras de *A. ochraceus* sob ação do óleo essencial de

Origanum vulgare apresentaram elevada produção de OTA, e um isolado apresentou redução da produção de OTA quando tratado com os compostos voláteis do óleo de *Thymus vulgaris*.

Na temperatura de 35°C, foi observada a produção de OTA para as duas testemunhas de *Aspergillus carbonarius*. Quando comparamos a produção de OTA de um dos isolados de *A. carbonarius* tratado com os compostos voláteis de *Syzygium aromaticum*, é possível observar uma redução de pelo menos 82,98%, e quando tratado com *Thymus vulgaris* a redução foi de 76,6%. Para o outro isolado, quando tratado com *Thymus vulgaris* a redução foi de 97,03% (Tabela 11).

Sabe-se que a produção de micotoxinas ocorre via metabolismo secundário dos fungos, à medida que atingem a maturidade. Vários autores relatam que a produção da OTA pelo fungo ocorre mediante condições adequadas de temperatura, pH e atividade de água. Mitchell et al. (2004) descrevem que as condições ótimas para a produção de OTA por *A. carbonarius* são de 15-20 °C e de 0,95-0,98 aw. Em trabalho realizado por Passamani et al. (2014) a maior produção de OTA, para *A. carbonarius*, também foi encontrada em temperatura de 15°C (8-10µg g⁻¹), e em 25°C a produção foi reduzida (1-3µg g⁻¹). Neste trabalho a produção de OTA pelos *Aspergillus carbonarius* obteve média de 1,02; 0,28 e 0,74 para as temperaturas de 15, 25 e 35°C, respectivamente, com maior produção a 15°C como já foi documentado em outros trabalhos. Para *A. ochraceus* a melhor faixa de crescimento está entre 25 e 30°C e a maior produção de OTA acontece em aw de 0,98-0,99 e na faixa de temperatura de 20 a 30°C (KLICH, 2002; PARDO; RAMOS; MARÍN, 2005). Para este trabalho as médias de produção foram 0,99 e 1,04 µg g⁻¹ para 15 e 25°C, respectivamente, e para 35°C não houve crescimento.

Na Tabela 12 estão agrupados os fungos onde foi observada a redução da produção da OTA. Resultados semelhantes são relatados em diferentes

trabalhos como o de Hua et al. (2014), onde foi avaliada a produção de ergosterol e de OTA para *A. ochraceus* tratados com diversos óleos. Em trabalho realizado por Yamamoto-Ribeiro et al. (2013) e outro por Dambolena et al. (2008), foi demonstrada a inibição da produção de fumonisina com os óleos essenciais de *Zingiber officinale*, *Ocimum basilicum* L. e *Ocimum gratissimum* L. por *F. verticillioides* e a inibição foi proporcional à diminuição da biomassa fúngica. Rao, Girisham e Reddy (2015) também demonstraram redução de OTA para os óleos *Brassica oleracea*, *Ricinus communis*, *Cocos nucifera*, *Eucalyptus globulus*, *Arachis hypogaea*, *Azadirachta indica*, *Elaeis guineensis* e *Helianthus annuus* para os fungos *Penicillium verrucosum* e *P. nordicum*. Estes estudos relacionam a redução da produção de micotoxinas, principalmente com o efeito dos componentes dos óleos essenciais com a membrana celular, principalmente relacionado ao ergosterol, aos danos causados aos componentes celulares, como danos às mitocôndrias e aos conidióforos.

Tabela 12 Redução de OTA nas técnicas de difusão em ágar e compostos voláteis dos óleos essenciais

Fungos	Temp. °C	Óleo essencial	% de redução	Técnica*
<i>A. ochraceus</i>	15	<i>Origanum vulgare</i>	86,11	DA
<i>A. carbonarius</i>	15	<i>Syzygium aromaticum</i>	98,92	CV
<i>A. carbonarius</i>	25	<i>Syzygium aromaticum</i>	81,48	CV
<i>A. ochraceus</i>	25	<i>Thymus vulgaris</i>	63,46	CV
<i>A. carbonarius</i>	35	<i>Thymus vulgaris</i>	82,98	CV
<i>A. carbonarius</i>	35	<i>Syzygium aromaticum</i>	93,62	CV
<i>A. carbonarius</i>	35	<i>Thymus vulgaris</i>	89,11	CV
<i>A. carbonarius</i>	35	<i>Syzygium aromaticum</i>	100,00	CV

*DA: Difusão em ágar; CV: compostos voláteis.

Estudos demonstram que alguns fatores abióticos podem afetar positivamente a produção de micotoxinas. Reverberi et al. (2010) demonstraram

que a ação lipoperoxidativa de substâncias como o resveratrol está diretamente relacionada à biossíntese das micotoxinas e da conidiogênese. Seu estudo demonstrou que o efeito da oxidação dos lipídios está relacionado à expressão de genes específicos para a produção de OTA em *A. ochraceus*, e suas alterações podem levar a um aumento da expressão desses genes e conseqüentemente na produção de OTA. Crespo-Sempere et al. (2015) demonstraram que o estresse oxidativo causado pelos radicais superóxidos da menadiona em baixas concentrações está relacionado ao aumento da produção de OTA em *A. carbonarius*. e que estes mesmos compostos quando em altas concentrações inibem o crescimento micelial e conseqüentemente a produção de OTA. Barberis et al. (2009) observaram o aumento da produção de OTA e a redução do crescimento micelial de *A. carbonarius*, quando tratado com o antioxidante BHA (butil hidroxianisol). A compreensão de trabalhos como estes auxiliam no entendimento do aumento da produção de OTA nos fungos tratados com os óleos essenciais encontrados neste trabalho (Tabela 13), principalmente os dados de compostos voláteis, pois a exposição dos fungos se apresenta em concentrações muito baixas. Estes resultados aparentemente contraditórios, para a produção de OTA, podem ser justificados pelo fato de a regulação da produção de OTA ter respostas diferentes aos diferentes agentes oxidantes e antioxidantes e suas concentrações e os efeitos citotóxicos destes metabólitos, como apontado por Barberis et al. (2009), Crespo-Sempere et al. (2015) e Palumbo, O'Keeffe e Mahoney (2007)

Tabela 13 Aumento de OTA nas técnicas de difusão em ágar e compostos voláteis dos óleos essenciais

Fungos	Temp. °C	Óleo essencial	% de aumento	Técnica*
<i>A. ochraceus</i>	15	<i>Origanum vulgare</i>	133%	DA
<i>A. carbonarius</i>	15	<i>Syzygium aromaticum</i>	61%	CV
<i>A. ochraceus</i>	15	<i>Origanum vulgare</i>	23%	CV
<i>A. ochraceus</i>	15	<i>Origanum vulgare</i>	43%	CV
<i>A. ochraceus</i>	15	<i>Thymus vulgaris</i>	263%	CV
<i>A. carbonarius</i>	25	<i>Origanum vulgare</i>	7750%	CV
<i>A. ochraceus</i>	25	<i>Origanum vulgare</i>	1008%	CV
<i>A. ochraceus</i>	25	<i>Origanum vulgare</i>	829%	CV

*DA: Difusão em ágar; CV: compostos voláteis.

5 CONCLUSÕES

O efeito dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris* na inibição do crescimento micelial demonstrou ser eficiente, principalmente quando usados em contato direto com os fungos. A temperatura está relacionada ao crescimento micelial e também demonstrou que sua ação é inversamente proporcional à produção de OTA. As concentrações mínimas inibitórias avaliadas foram insuficientes para a inibição total da produção da OTA, principalmente na exposição aos compostos voláteis, e foi observado que a exposição a essas baixas concentrações dos óleos essenciais provocou aumento significativo da produção da OTA.

Com isso é possível concluir que o uso destes óleos essenciais em contato pode ser utilizado no controle da contaminação fúngica e na produção de OTA, e para os compostos voláteis é necessária a realização de estudos com maiores concentrações a fim de avaliar o potencial de redução, evitando o aumento indesejado da produção de OTA.

6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O uso de compostos como os óleos essenciais tem sido bastante estudado para aplicações em alimentos, principalmente, com a finalidade de reduzir a contaminação de microrganismos patogênicos, deteriorantes e toxigênicos. Por estes compostos serem naturais, seguros (GRAS) e não poluentes, eles se tornam uma boa opção, uma vez que, os consumidores preferem alimentos tratados com substâncias naturais aos tratados com compostos sintéticos.

Estudos realizados a fim de compreender os mecanismos de ação dos óleos essenciais, seus compostos voláteis e agentes antioxidantes sobre fungos toxigênicos e produção de micotoxinas, têm auxiliado na consolidação do uso destes compostos como ingredientes de alimentos, uso em embalagens e uso no armazenamento, podendo ser aplicado diretamente ou por fumigação.

Desta o presente trabalho contribui para evidenciar que, apesar dos benefícios trazidos pelo uso dos óleos essenciais como a significativa inibição e redução de crescimento micelial, o uso destes compostos em baixas concentrações pode acarretar em um aumento da produção da OTA, tendo, desta forma, um efeito inverso ao desejado.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L. et al. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 33-49, July 2004.
- ABEN-ARFA, S. et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 149–154, Aug. 2006.
- AKISUE, G. et al. Padronização da droga e do extrato fluido de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. Lecta. **Revista de Biologia e Farmácia**, Pernambuco, v. 14, n. 2, p. 109-119, jan. 1996.
- ALIGIANIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, Aug. 2001.
- AMORIM, M. B. **Estudo da reatividade de derivados do safrol frente ao cloreto de alumínio**. 1989. 120 p. Dissertação (Mestrado em Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1989.
- ANDRADE, M. A. et al. Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 46, n. 1, p. 189-194, maio 2015.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr./jun. 2012.
- ANLI, E.; ALKIS, I. M. Ochratoxin A and brewing technology: a review. **Journal of Institute Brewing**, London, v. 116, n. 1, p. 23-32, Jan. 2010.
- ASCENSÃO, L. Estruturas secretoras em plantas: uma abordagem morfo-anatômica. In: FIGUEIREDO, A. C. S. et al. **Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais**. 3. ed. Lisboa: Universidade de Lisboa, 2007. (Curso teórico-prático).
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 17. ed. Washington: AOAC, 2002. 771 p.

AYCICEK, H.; AKSOY, A.; SAYGI, S. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. **Food Control**, Guildford, v. 16, n. 3, p. 263-266, June 2005.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BANDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores**. Vitória: EDUFES, 2008. 623 p.

BARA, M. T. F. **Avaliação do efeito inibidor de condimentos no desenvolvimento de *Yersinia enterocolitica***. 1992. 73 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.

BARBERIS, C. et al. In vitro control of growth and ochratoxin A production by butylated hydroxyanisole in *Aspergillus* section *Nigri* species. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 8, p. 709-715, Aug. 2009.

BAYMAN, P. et al. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2326-2329, May 2002.

BELLI, N. et al. Skin damage, high temperature and relative humidity as detrimental factors for *Aspergillus carbonarius* infection and ochratoxina A production in grapes. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 11, p. 1343-1349, Nov. 2007.

BENNET, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 66, n. 2-3, p. 101-107, Dec. 1998.

BHATNAGAR, D.; YU, J.; EHRLICH, K. C. Toxins of filamentous fungi. **Chemical Immunology**, Basel, v. 81, p. 167-206, 2002.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 588-594, 2009.

BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CABANES, F. J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in purê culture. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, n. 2-3, p. 139-144, Dec. 2001.

BRAKHAGE, A. A.; SCHROEKHE, V. Fungal secondary metabolites: strategies to active silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 48, n. 1, p. 16-22, Jan. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília (DF), 19 fev. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 2, de 15 de janeiro de 2007. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes. **Diário Oficial da União**, Brasília (DF), 17 jan. 2007.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Microbiologia médica. In: JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 142-143.

BULLERMAN, L. B.; SCHOEREDER, L. L.; PARK, K. Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 47, n. 8, p. 637-646, Aug. 1984.

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

BUSATTA, C. et al. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 610-616, out./dez. 2007.

CABAÑES, F. J.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G. Characterization of nonochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from grapes. **Food Microbiology**, London, v. 36, n. 2, p. 135–141, Dec. 2013.

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

CARMO, E. S.; LIMA, E. de O.; SOUZA, E. L. de. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 362-367, jun. 2008.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Safety, efficacy, and provenance of tea tree (Melaleuca alternifolia) oil. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 45, n. 2, p. 65-67, Aug. 2001.

CASTELLANI, D. C. et al. Produção de óleo essencial em catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss) e negramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) em função da época de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 62-65, 2006.

CASTRO, H. G. et al. **Metabólitos secundários**: contribuição ao estudo de plantas medicinais. 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2004. 113 p.

CAVICCHIOLI, M. **Análise de óleos essenciais de frutas cítricas por cromatografia gasosa de alta resolução (colunas capilares)**. 1986. 38 p. Monografia (Graduação em Química) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 1986.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. **Fungos associados a frutos e grãos do café: aspergillus e penicillium**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 67 p.

COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION. **Foodstuffs-determination of ochratoxin A in wine and beer-HPLC method with immunoaffinity column clean-up**. Brussels; [s.n.], 2003.

CREPPY, E. E. et al. Synergistic effects of fumonisin B1 and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity? **Toxicology**, Limerick, v. 201, n. 1-3, p. 115-123, Sept. 2004.

CRESPO-SEMPERE, A. et al. Effect of oxidant stressors and phenolic antioxidants on the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. **Journal of the Science Food and Agriculture**, London, p. 7077, Jan. 2015.

DAMBOLENA, J. S. "Inhibitory effect of 10 natural phenolic compounds on *Fusarium verticillioides*: a structure-property activity relationship study." **Food Control**, Guildford, v. 28, n. 1, p. 163-170, Nov. 2012.

DAMBOLENA, J. S. et al. Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and thymol) on *Fusarium verticillioides* MRC 826 growth and fumonisin B1 biosynthesis. **Toxicon**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 37-44, Jan. 2008.

DEANS, S. G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 165-180, Nov. 1987.

DORMAN, H. J. D. et al. Characterization of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. **Food Chemistry**, London, v. 83, n. 2, p. 255-262, Nov. 2003.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 2, p. 187-198, Apr. 2010.

DUSAN, F. et al. Essential oils-their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 20, n. 8, p. 1435-1445, Dec. 2006.

ESSAWI, T.; SROUR, M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Oxford, v. 70, n. 3, p. 343-349, June 2000.

ESTEBAN, A. et al. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 155, n. 10, p. 861-866, Dec. 2004.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC), N° 123/2005 of 26. Amending Regulation (EC) N° 466/2001, as regards ochratoxin A. **Official Journal of the European Union**, Washington, p. L25/3-L25/5, 2005.

FARMACOPÉIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Ateneu, 2000. 36 p.

FISCHER, G. **Biodiversity of soil fungi in biodiversity in agricultural production systems**. New York: CRC Press, 2007. 429 p.

FLORES-FLORES, M. E. et al. Presence of mycotoxins in animal milk: a review. **Food Control**, Guildford, v. 53, p. 163-176, July 2015.

FREIRE, J. M. et al. Controle microbiológico de alimentos utilizando óleo essencial de *Pimpinella anisum* (erva doce). **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 25, n. 196-197, p. 154-158, maio/jun. 2011a.

FREIRE, J. M. et al. Essential oil of *Origanum majorana* L., *Illicium verum* Hook. f. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume: chemical and antimicrobial

characterization. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 209-214, 2011b.

FRISVAD, J. C. et al. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**, Oxford, v. 50, p. 23–43, 2004a.

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

FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. Classification of terverticillate penicillia based on profiles of mycotoxin and other secondary metabolites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 46, n. 6, p. 1301-1310, Dec. 1993.

FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. Terverticillate penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. **Micologia**, Buenos Aires, v. 81, n. 6, p. 836-861, Nov./Dec. 1989.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A.; SMEDSGAARD, J. *Emericella astellata*, a new producer of aflatoxin B 1, B 2 and sterigmatocystin. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 440–445, 2004b.

FURLANI, R. P. Z.; SOARES, L. M. V. Ocratoxina A em café: diferenças com relação a espécie. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 9., SIMPÓSIO EM ARMAZENAGEM QUALITATIVA DE GRÃOS DO MERCOSUL, 1., 1999. Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: [s.n.], 1999. p. 19.

GARCIA, D. et al. Is intraspecific variability of growth and mycotoxin production dependent on environmental conditions? A study with *Aspergillus carbonarius* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, n. 3, p. 432–439, Jan. 2011.

GIVIZIEZ, C. R. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* e desenvolvimento de um antisséptico com princípio ativo natural**. 2010. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, PEPORINE, N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, mar./abr. 2007.

GUERRA, M. J. M. et al. Evaluación toxicológica aguda de los extractos fluidos al 30 y 80% de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Caña Santa). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Habana, v. 5, n. 3, p. 97-101, Dec. 2000.

GUILLEN, M. D.; MANZANOS, M. J. Study of the composition of the different parts of Spanish *Thymus vulgaris* L. plants. **Food Chemistry**, London, v. 63, n. 3, p. 373-383, Nov. 1998.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 464-472, abr./jun. 2011.

GUTIÉRREZ-LARRAÍNZA, M. et al. "Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria." **Food Control**, Guildford, v. 26, n. 2, p. 555–563, Aug. 2012.

GUTIÉRREZ-LARRAÍNZA, M. et al. "Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria." **Food Control**, Guildford, v. 26, n. 2, p. 555–563, Aug. 2012.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 862 p.

HOCKING, D. *Aspergillus* and related teleomorphs. In: BLACKBURN, C. de W. **Food spoilage microorganisms**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006. Chap. 17, p. 451–477.

HUA, H. et al. Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. e108285, Sept. 2014.

HUSSEIN, S. H.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Limerick, v. 167, n. 8, p. 101-134, Aug. 2001.

HUSSEIN, S. H.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Limerick, v. 167, n. 8, p. 101-134, Aug. 2001.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some naturally occurring substances:** food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins: volume 56. Lyon: World Health Organization, 1993. 599 p.

JAKIEMIU, E. A. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.).** 2008. 90 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

KAPETANAKOU, A. E. et al. Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 8, p. 725-732, Aug. 2009.

KARAMAN, I. et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 85, n. 2-3, p. 231-235, Apr. 2003.

KHALESIA, M.; KHATIB, N. The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 113-121, Sept. 2011.

KLICH, M. A. **Identification of common aspergillus species.** Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 2002. 116 p.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to common aspergillus species and their teleomorphs.** Sydney: Commonweal, 1988. 116 p.

LEAL, T. C. A. B. et al. Produção de biomassa e óleo essencial em plantas de capim-cidreira [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf] em diferentes idades. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 5, n. 1, p. 61-64, nov. 2003.

LEBERT, I.; LEROY, S.; TALON, R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. **Food Microbiology**, Washington, v. 24, n. 3, p. 281-287, May 2007.

LEONG, S. L. et al. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, supl. 1, p. 10-17, Sept. 2006.

LIMA, R. K. et al. Bactericidal and antioxidant activity of essential oils from *myristica fragrans* houtt and *salvia microphylla* H.B.K. **Journal of the**

American Oil Chemists' Society, Amsterdam, v. 89, n. 3, p. 523-528, Mar. 2012.

LUCINI, E. I. et al. Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, n. 7-8, p. 441-446, Aug. 2006.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 22, supl. 1, p. 10-16, 2005.

MAGAN, N.; MEDINA, A.; ALDRED, D. Possible climate-change effects on mycotoxin contaminant of food crops pre and postharvest. **Plant Pathology**. Oxford, v. 60, n. 1, p. 150-163, Feb. 2011.

MALLOZZI, A. B.; CORRÊA, B. Fungos toxigênicos e micotoxinas. **Boletim Técnico do Instituto de Biologia**, São Paulo, n. 12, p. 5-26, dez. 1998.

MARROQUÍN-CARDONA, A. G. et al. Mycotoxins in a changing global environment: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 69, p. 220-230, July 2014.

MEDINA, A. et al. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 8, p. 4696-4702, Aug. 2006.

MEYER, G. Genetic engineering of filamentous fungi: progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 177-185, Mar./Apr. 2008.

MITCHELL, D. et al. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 439-445, 2003.

MITCHELL, D. et al. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 439-445, Jan. 2004.

MITCHELL, T. C. et al. Origanum vulgare L. essential oil as inhibitor of potentially toxigenic Aspergilli. **Ciência Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 755-760, set. 2010.

MONTANARI, R. M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardi, Siparunaceae e Verbenaceae**. 2010. 173 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. atual. e ampl. Lavras: Editora da UFLA, 2006. 626 p.

MOSS, M. O. Mycotoxin review -1. Aspergillus and penicillium. **Mycologist**, Cambridge, v. 16, n. 3, p. 116-119, 2002.

MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? **Biodiversity and Conservation**, London, v. 16, n. 1, p. 1-5, Jan. 2007.

NAGRAES, P. **Guia A-Z de plantas: condimentos**. 4. ed. São Paulo: Bei Comunicação, 2003. 267 p.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard: volume 23. 6. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standard institute, 2003. 88 p. (Replaces M7-A6, 2).

NEDOROSTOVA, L. et al. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 2, p. 157-160, Feb. 2009.

NERI, F. et al. Control of Penicillium expansum in pears and apples by trans-2-hexenal vapours. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 101-108, July 2006.

NOGUEIRA, J. H. de C. **Quimioprevenção pelo óleo essencial de mentrasto (Ageratum conyzoides) no crescimento de Aspergillus flavus e da produção de aflatoxina**. 2009. 73 p. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo, 2009.

ONAWUNMI, G. O.; YISAK, W.; OGUNLANA, E. O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 12, n. 3, p. 279–286, Dec. 1984.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157H7, salmonella typhimurium, staphylococcus aureus and listeria monocytogenes. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2007.

PALACIOS-CABRERA, H. et al. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 24-28, Mar. 2005.

PALUMBO, J. D.; O'KEEFFE, T. L.; MAHONEY, N. E. Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 164, n. 5, p. 241–248, Nov. 2007.

PARDO, A. J.; RAMOS, V. S.; MARÍN, S. Effect of water activity and temperature on mycelial growth and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus ochraceus* on irradiated green coffee beans. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 1, p. 133–138, Jan. 2005.

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

PATEKI, M. et al. Influence of sulphur dioxide, controlled atmospheres and water availability on in vitro germination, growth and ochratoxin A production by strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p. 141-149, May 2007.

PERRONE, G. et al. *Aspergillus* in grapes: ecology, biodiversity and genomics. In: VARGA, J.; SAMSOM, R. **Aspergillus in the genomic era**. Wageningen: Wageningen Academic, 2008. p. 179-203.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* (*Eugenia caryophyllus*) on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 58, n. 11, p. 1454-1462, Nov. 2009.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997a. 593 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. London: Blackie Academic & Professional, 1997b. 519 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. Maryland: Aspen Publication, 1999. 519 p.

PIZZOLITTO, R. P. et al. “Inhibitory effect of natural phenolic compounds on *Aspergillus parasiticus* growth.” **Journal of Chemistry**, Cairo, v. 2015, p. 1-7, 2015.

PLOTTO, A.; ROBERTS, D. D.; ROBERTS, R. G. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 628, p. 737-45, 2003.

POSE, G. et al. Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 142, n. 3, p. 348–353, Sept. 2010.

PRADO, G. et al. Incidência de ochratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 192-196, maio/ago. 2000.

PRAKASH, B. et al. Dubey plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – potentials and challenges. **Food Control**, Guildiford, v. 47, p. 381–391, 2015.

PRINS, C. L. et al. Efeitos de confinamento do sistema radicular sobre capim-limão (*Cymbopogon citratus*). **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 39, n. 3, p. 416-421, 2008.

QUINTELA, F. M. et al. Mammalia, Chiroptera, Rio Grande, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Check List: journal of species lists and distribution**, Rio Grande do Sul, v. 7, n. 4, p. 443-447, 2011.

RANA, I. S.; RANA, A. S.; RAJAK, R. C. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and

analysis of its main component eugenol. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 1269-1277, dez. 2011.

RAO, V. K.; GIRISHAM, S.; REDDY, S. M. Inhibitory Effect of essential oils on growth and ochratoxin a production by penicillium species. **Research Journal of Microbiology**, Amsterdam, v. 10, n. 5, p. 222-229, 2015.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, Guildiford, v. 17, n. 5, p. 359-364, May 2006.

RENNER, S. S.; HAUSNER, G. **Monograph of siparunaceae: flora neotropica** 95. New York: New York Botanical Garden, 2005. 256 p.

REVERBERI, M. et al. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, n. 3, p. 899–911, July 2010.

RINGOT, D. et al. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 159, n. 1, p. 18-46, Jan. 2006.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372 p.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Pesquisa em micotoxinas no Brasil: a última década em foco. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 1-11, jan. 2002.

ROMINA, P. et al., “Inhibitory effect of natural phenolic compounds on *aspergillus parasiticus* growth.” **Journal of Chemistry**, Cairo, v. 2015, p. 1-7, 2015.

SABINO, M. et al. Avaliação da eficiência de dois kits comerciais para detecção de AFB1 em amostras de milho, ração e amendoim e seus produtos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 6, p. 107-110, nov./dez. 1997.

SAHIN, F. et al. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, Guildiford, v. 15, n. 7, p. 549-557, Oct. 2004.

SAITO, M. L.; LUCCHINI, F. **Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente**. Jaguariúna, Embrapa-CNPMA, 1998. 46 p.

SALGADO, A. P. S. **Efeito da luz na planta e no óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)**. 2005. 49 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food and airborne fungi**. 4. ed. Netherlands: ACM Press, 2000. 389 p.

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food and airborne fungi**. Netherlands: CBS, 2002. 389 p.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. **Aspergillus systematics in the genomics era**. Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre, 2007. 206 p.

SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 78, p. 141–173, June 2014.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. 3-21, Mar. 2001.

SCUDAMORE, K. A.; MACDONALD, S. J. A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up. **Food Additives & Contaminants**, London, v. 15, n. 4, p. 401–410, 1998.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144 p.

SEIXAS, P. T. L. et al. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Braileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, nesp., p. 513-517, 2011.

SELOUANE, A. et al. Impact of some environmental factors on growth and production of ochratoxin A of/by *Aspergillus tubingensis*, *A. niger*, and *A. carbonarius* isolated from Moroccan grapes. **Journal Microbiology**, London, v. 47, n. 4, p.411–419, Aug. 2009.

SHAN, A. Y. K. V. **Constituição química e atividade fungitóxica de extratos de *Thymus vulgaris* L.** 2002. 58 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

SHAN, A. Y. V. **Constituição química e atividade fungitóxica de extratos de *Thymus vulgaris* L.** 2002. 58 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, 2002.

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 6, n. 1, p. 29-44, Mar. 1984.

SHEPHARD, G. S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Additives & Contaminantes**, London, v. 25, n. 2, p. 146–151, Feb. 2008.

SILVA JUNIOR, A. A. S.; VERONA, M. L. F. **Plantas medicinais e aromáticas**. 2. ed. Itajaí: Ministério do Meio Ambiente, 1997. 456 p.

SILVA, T. B.; RANGEL, E. T. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico do tomilho (*Thymus vulgaris* L.) in vitro. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 7, n. 2, p. 48-58, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC, 2007. 1104 p.

SOKOLIĆ-MIHALAK, D. et al. The effects of wild Thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oil components against ochratoxin-producing *Aspergilli*. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, Zagreb, v. 63, n. 4, p. 457-462, Dec. 2012.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 23, n. 2, p. 136-141, Apr. 2012.

SOUZA, M. A. A. et al. Atividade biológica de óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf.) avaliada através da inibição miscelial de fungos fitopatogênicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2003, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: [s.n.], 2003.

STEYN, P. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 82-83, p. 843–851, Dec. 1995.

- TASSOU, C. C. et al. Impact of water activity and temperature on growth and ochratoxin A production of two *Aspergillus carbonarius* isolates from wine grapes in Greece. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 70, n. 12, p. 2884-2888, Dec. 2007.
- TULEY, S. K. **A manual on the essential oil industry**. 2. ed. Vienna: United Nations Industrial Development Organization, 1996. 150 p.
- TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAMB, S.; PILETSKIB, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 632, n. 2, p. 168-180, Jan. 2009.
- TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 8, n. 2, p. 253-258, 2007.
- VALENTINI, C. M. A.; RODRÍGUEZ-ORTÍZ, C. E.; COELHO, M. F. B. Siparuna guianensis Aublet (negramina): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 96-104, 2010.
- VALERO, A.; FARRE, J. R.; SANCHIS, V. Survey: ochratoxin A in European special wines. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 2, p. 593-599, May 2008.
- VIANA, F. A. et al. Essential oil of siparuna guianensis aublet from the Amazon Region of Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 14, n. 1, p. 60-62, 2002.
- 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**, Netherlands, v. 36, n. 1, p. 229-237, Mar. 2012.
- WILLIAMS, L. R.; STOCKLEY, W. Essential oils with high antimicrobial activity for therapeutic use. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 8, n. 4, p. 30-40, Oct./Dec. 1998.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food safety and foodborne illness**. Washington: WHO, 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>. Acesso em: 3 fev. 2015.

YAMAMOTO-RIBEIRO, M. M. G. et al. Effect of *Zingiber officinale* essential oil on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. **Food Chemistry**, Barking, v. 141, n. 3, p. 3147–3152, Dec. 2013.

ZAMBONELLI, A. et al. Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *Thymus vulgaris* L. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 16, n. 1, p. 69-74, 2004.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, Jan. 2001.

ZUZARTE, M. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Her. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 60, n. 5, p. 612–618, May 2011.