



FERNANDA CHAVES DA SILVA

**TAXONOMIA POLIFÁSICA DE *Aspergillus*
SEÇÃO *Flavi* E APLICAÇÃO DE ÓLEOS
ESSENCIAIS PARA CONTROLE DE FUNGOS
AFLATOXIGÊNICOS**

LAVRAS – MG

2012

FERNANDA CHAVES DA SILVA

**TAXONOMIA POLIFÁSICA DE *Aspergillus* SEÇÃO *Flavi* E APLICAÇÃO
DE ÓLEOS ESSENCIAIS PARA CONTROLE DE FUNGOS
AFLATOXIGÊNICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Qualidade e Segurança Microbiológica de Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Sara Maria Chalfoun

Coorientadores

Dr. Luís Roberto Batista

Dr. Nelson Lima

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Silva, Fernanda Chaves da.

Taxonomia polifásica de *Aspergillus* seção *Flavi* e aplicação de óleos essenciais para controle de fungos aflatoxigênicos / Fernanda Chaves da Silva. – Lavras : UFLA, 2012.

115 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Sara Maria Chalfoun.

Bibliografia.

1. Micologia. 2. Taxonomia. 3. Micotoxinas. 4. Segurança alimentar. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.163

FERNANDA CHAVES DA SILVA

**TAXONOMIA POLIFÁSICA DE *Aspergillus* SEÇÃO *Flavi* E APLICAÇÃO
DE ÓLEOS ESSENCIAIS PARA CONTROLE DE FUNGOS
AFLATOXIGÊNICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Qualidade e Segurança Microbiológica de Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 29 de fevereiro de 2012.

Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dr. Luís Roberto Batista	UFLA
Dr. Cledir Santos	UMINHO/PT
Dr. Nelson Lima	UMINHO/PT

Dra. Sara Maria Chalfoun
Orientadora

LAVRAS – MG

2012

A Deus, por me abençoar, iluminar e proteger meus caminhos.

A minha melhor amiga, MÃE, pelo amor incondicional, admiração e ensinamentos.

Ao meu exemplo de caráter, respeito e perseverança, PAI.

Aos meus irmãos, Bruno e Daniel, pelo apoio, amizade e cumplicidade.

A minha madrinha, Maria José Carvalho Pôncio de Oliveira, pelo legado do saber educar (em memória).

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à Nossa Senhora de Fátima, pela presença constante em minha vida, proteção, amparo e força para seguir em frente.

À pesquisadora Dra. Sara Maria Chalfoun, pela orientação, incentivo, confiança na minha capacidade em conduzir este estudo e amizade durante todos estes anos de pós-graduação.

Aos professores Luís Roberto Batista e Nelson Lima, pela coorientação, ensinamentos, apoio e constante motivação.

Ao pesquisador Cleidir do Santos, pelos conhecimentos transmitidos e colaboração na execução do trabalho.

À Dra. Deila Magna dos Santos Botelho, pela valiosa contribuição nas análises estatísticas, estruturação dos artigos científicos, disponibilidade de sempre me escutar e aconselhar e pela grata amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela cooperação e ensinamentos.

Aos funcionários e técnicos dos Laboratórios de Microbiologia Agrícola, da EPAMIG e da UMINHO, pessoas muito prestativas, das quais sempre recebi apoio.

Aos colegas e amigos do Departamento de Microbiologia Agrícola, da EPAMIG, do Laboratório de Micologia e Micotoxinas/DCA e da UMINHO, pela agradável convivência, ajuda e momentos de descontração.

Às AMIGAS de república, durante todos esses anos em Lavras, pela amizade, consideração, compreensão e apoio incondicional durante toda essa caminhada.

A minha querida família portuguesa, Delfina e Hugo, pelo total apoio e acolhida carinhosa em minha chegada a Portugal, aigna do melhor bacalhau de Braga. Saudades!

A Márcia, Clovis, Michel e Virgínia, grandes amizades construídas em Portugal e que serão levadas por toda minha vida. Vocês fizeram total diferença e tornaram-se indispensáveis no meu dia a dia.

Aos demais colegas brasileiros sediados em Braga, que me proporcionaram momentos divertidos e viagens inesquecíveis.

Aos meus queridos amigos, que mesmo distante sempre torceram pelo meu sucesso e felicidade.

A todos os meus familiares que sempre vibraram com as minhas conquistas.

Ao Murilo, pelo seu otimismo e positividade, paciência, respeito, compreensão e carinho, essenciais para a concretização desta etapa e por me fazer acreditar que, mesmo distante, tudo é possível.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola/UFLA e à Universidade do Minho/UMINHO, pela oportunidade de realizar o doutorado.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG, por conceder toda a estrutura e os materiais necessários para a execução do trabalho.

À FAPEMIG e à Micoteca da Universidade do Minho, pelo apoio financeiro ao projeto.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, no Brasil e no exterior.

RESUMO

A caracterização e a identificação de fungos deterioradores e toxigênicos em alimentos são essenciais para a garantia da segurança microbiológica alimentar. O estudo teve por objetivo caracterizar e identificar fungos do gênero *Aspergillus* seção *Flavi*, isolados de alimentos, bem como avaliar o efeito de óleos essenciais de plantas sobre o desenvolvimento de fungos aflatoxigênicos. Trinta e cinco fungos, isolados de alimentos, foram caracterizados em termos de macro e micromorfologia, padrão de micotoxinas e espectros de *fingerprint* proteicos - MALDI-TOF ICMS. Três isolados tiveram suas sequências da região ITS e do gene calmodulina analisados. Para cada abordagem, dendrogramas foram criados e os resultados foram comparados. Um isolado de *Aspergillus flavus* e de *A. parasiticus* aflatoxigênicos foram selecionados para os testes com os óleos essenciais. Os óleos essenciais utilizados foram: *Foeniculum vulgare*, *Zingiber officinale*, *Mentha piperita* e *Thymus vulgaris*. Cromatografia gasosa em alta resolução foi realizada para analisar constituintes químicos dos óleos essenciais. O efeito de diferentes concentrações de óleos essenciais sobre os fungos foi determinado pela formação de halo visível ao redor do disco de papel filtro, em ensaio por difusão em meio sólido. Crescimento micelial e esporulação foram determinados para cada óleo essencial, nas concentrações previamente estabelecidas, no 5º, 7º e 9º dia. Coloração FUN-1 foi realizada para avaliar a viabilidade celular das hifas dos fungos. Os dados das análises fenotípica e espectral dividiram os isolados em três grupos correspondentes a táxons intimamente relacionados ao *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. tamarii*. Entretanto, as análises molecular e espectral não foram capazes de distinguir a espécie correspondente ao isolado 32. O principal componente dos óleos essenciais de *Foeniculum vulgare*, *Zingiber officinale*, *Mentha piperita* e *Thymus vulgaris* foram transanetole, zingibereno, mentol e timol, respectivamente. Considerando a técnica de avaliação *in vitro* utilizada, difusão em ágar 50%, 80%, 50% e 50% (óleo / DMSO; v / v) foram as concentrações eficazes para *Foeniculum vulgare*, *Zingiber officinale*, *Mentha piperita* e *Thymus vulgaris*, a serem utilizadas nos testes de sensibilidade fúngica. Os quatro óleos essenciais analisados apresentaram efeito antifúngico. Destaque para o óleo essencial de *Thymus vulgaris*, com melhor efeito inibitório sobre os fungos. Além disso, coloração FUN-1 mostrou ser um método adequado para avaliar a viabilidade das células dos fungos *A. flavus* e *A. parasiticus*, após o tratamento com os óleos essenciais.

Palavras-chave: Abordagem polifásica. *Aspergillus*. Aflatoxinas. Óleos essenciais.

ABSTRACT

The characterization and identification of spoilage and toxigenic fungi in foods are essential to ensuring the Microbiological Food Safety. The study aimed to characterize and identify fungi of the genus *Aspergillus* section *Flavi* isolated from foods and to evaluate the effect of essential oils from plants on the development of aflatoxigenic fungi. Thirty-five isolated from different food commodities were characterized in terms of macro- and micro-morphologies, mycotoxin pattern and MALDI-TOF ICMS protein fingerprint spectra. Three isolates were further analysed using the ITS region and calmodulin gene sequences. For each approach, dendrograms were created and results were compared. An isolate of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* aflatoxigenic were selected for testing with essential oils. Essential oils were used: *Foeniculum vulgare*, *Zingiber officinale*, *Mentha piperita* and *Thymus vulgaris*. High Resolution Gas Chromatography was used to analyze the chemical constituents of essential oils. The effect of different concentrations of essential oils to the fungi was determined by the formation of visible halo around the disc of filter paper by solid medium diffusion assay. Mycelial growth and sporulation were determined for each essential oil at concentrations previously established in the 5th, 7th and 9th day. FUN-1 staining was performed to assess cell viability of fungal hyphae. The data obtained from the phenotypic and spectral analyses divide the isolates into three groups, corresponding to taxa closely related to *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus tamari*. Molecular and spectral analyses were not able to distinguish the isolate 32. The main component of essential oils of *Foeniculum vulgare*, *Zingiber officinale*, *Thymus vulgaris* and *Mentha piperita* were trans-anethole, zingiberene, menthol and thymol, respectively. Considering the evaluation technique used in vitro, agar diffusion, 50%, 80%, 50% and 50% (oil/DMSO, v/v) were effective concentrations for *Foeniculum vulgare*, *Zingiber officinale*, *Mentha piperita*, *Thymus vulgaris*, to be used in susceptibility testing of fungi. The four essential oils analyzed showed an antifungal effect. Emphasis on the essential oil of *Thymus vulgaris* with better inhibitory effect on fungi. Additionally, FUN-1 staining showed to be a suitable method to evaluate cell viability of potential mycotoxigenic fungi *A. flavus* and *A. parasiticus* after treatment with essential oils.

Keywords: Polyphasic Approach. *Aspergillus*. Aflatoxins. Essential Oils.

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1	Importantes tratamentos taxonômicos e manuais de identificação para o gênero <i>Aspergillus</i>	17
Tabela 2	Produção de aflatoxinas e outros extólitos de espécies <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i> (SAMSON; HONG; FRISVAD, 2006), adaptado	25

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Table 1	Species of the genus <i>Aspergillus</i> used in this study.....	88
Table 2	Morphological and chemical characterization of isolates of <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	89
Table 3	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> identification and data from sampling, isolation and accession numbers.....	95

ARTIGO 2

Table 1	Essential oils and their major constituents used in this work	112
Table 2	Size of inhibition zone (Ø mm) of mycelial growth of <i>A. flavus</i> and <i>A. parasiticus</i> at different EOs concentrations	112
Table 3	Diameter of colony (Ø mm) and sporulation (10^6 spores/mL) of <i>A. parasiticus</i> at 5 th , 7 th , and 9 th days after inoculation	113

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Macro e microfotografias das espécies <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus sojae</i> e <i>Aspergillus tamaritii</i>	22
Figura 2	Esquema mostrando a integração de diferentes características que podem ser combinadas para uma classificação taxonômica polifásica de uma espécie de <i>Aspergillus</i> (SAMSON; HONG; FRISVAD, 2006), adaptado e atualizado	23
Figura 3	Estrutura química das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	32
Figura 4	Aspecto geral da planta de funcho-doce (A), gengibre (B), menta (C) e tomilho (D).....	41

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Figure 1	Dendrogram of relatedness between isolates of <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> based on the analysis of: seriation, colony colour on CYA; conidia ornamentation; reverse on AFPA; AFB production; AFG production; cyclopiazonic acid (CPA) production; AFPA, <i>Aspergillus flavus</i> and <i>Aspergillus parasiticus</i> agar, origin of the isolate	92
Figure 2	Dendrogram of relatedness between the isolates of <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> based on MALDI-TOF ICMS. Distances are measured as percentage of similarity	93
Figure 3	Phylogenetic tree based on calmodulin gene analyses showing closest relatives of strains isolated (Kimura two-parameter model; neighbor-joining algorithm and 1000 replicate bootstrap)	94

ARTIGO 2

Figure 1	Images of epifluorescence microscope showing <i>Aspergillus flavus</i> after FUN-1 (left column) and CW (right column) staining. Positive control (A) and ginger EO treatment (B) show CIVS. Mint, fennel and thyme EOs treatments (C-E) show only yellow/green diffuse hyphae	114
Figure 2	Images of epifluorescence microscope showing <i>Aspergillus parasiticus</i> after FUN-1 (left column) and CW (right column) staining. Positive control (A) and ginger EO treatment (B) show	

CIVS. Mint, fennel and thyme EOs treatment (C-E) show only
yellow/green diffuse hyphae 115

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Gênero <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>	16
2.2	Identificação de espécies do gênero <i>Aspergillus</i> - abordagem polifásica	22
2.2.1	Características morfológicas e fisiológicas	23
2.2.2	Características moleculares	25
2.2.3	Análise proteômica – MALDI-TOF ICMS	27
2.3	Desenvolvimento de fungos toxigênicos e síntese de micotoxinas ...	29
2.4	Plantas condimentares	35
2.5	Óleos essenciais	41
2.6	Métodos para avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais	46
2.6.1	Métodos de difusão	47
2.6.2	Métodos de diluição em caldo	48
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	51
	REFERÊNCIAS	52
	SEGUNDA PARTE	69
	ARTIGO 1 Use of polyphasic approach for identification of strains of <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> isolated from food commodities	69
	ARTIGO 2 Evaluation of antifungal activity of essential oils against potentially Mycotoxigenic <i>Aspergillus flavus</i> AND <i>Aspergillus parasiticus</i>	96

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos economicamente importantes, amplamente distribuídos na natureza. São empregados na produção de alimentos, fármacos, enzimas e ácidos orgânicos (PATERSON, 2008). Entretanto, existem fungos na natureza considerados patógenos de plantas e deterioradores de alimentos. Os problemas causados pelo desenvolvimento desses últimos em alimentos e em suas matérias-primas são motivos de preocupação para a indústria de alimentos e a saúde pública, não apenas pelo fato de reduzir consideravelmente o valor nutritivo dos alimentos mas também, mas também pela produção de metabólitos secundários tóxicos denominados micotoxinas, que podem provocar intoxicações em seres humanos e animais (RODRIGUES et al., 2009).

Dentre as micotoxinas encontradas em alimentos, as aflatoxinas são as mais importantes. Tais substâncias são sintetizadas por várias espécies do gênero *Aspergillus*, mantendo-se como representantes mais importantes os fungos *Aspergillus flavus*, produtores das aflatoxinas do grupo B e *Aspergillus nomius* e *Aspergillus parasiticus*, produtores das aflatoxinas dos grupos B e G (KLICH, 2007). As aflatoxinas são conhecidas por serem compostos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos. A exposição por ingestão de aflatoxinas pode levar ao desenvolvimento de sérias condições clínicas que variam consideravelmente, dependendo da espécie animal, da dose, do estado nutricional, da idade e do gênero (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Atualmente, a identificação e a classificação de *Aspergillus* seção *Flavi* baseiam-se, principalmente, nas características morfológicas e nos perfis bioquímico e molecular (BATISTA et al., 2008; RAPER; FENNEL, 1965; SAMSON et al., 2000). Embora estas espécies apresentem diferenças

fisiológicas, as características morfológicas e, até mesmo, genéticas são difíceis de diferenciar. Nesse sentido, a taxonomia deste grupo de fungos é considerada altamente complexa e tem sido objeto de grande interesse para os pesquisadores, com o objetivo de esclarecer o conceito de espécie e limites dentro da seção. Recentemente, análise espectral por MALDI-TOF ICMS tem sido utilizada como uma técnica potencial na identificação de fungos (SANTOS et al., 2010). Entretanto, nenhum dos métodos isolado tem sido aceito como ideal para a identificação de micro-organismos. Como resultado, a abordagem polifásica tem sido adotada e relatada em vários estudos (FENSELAU; DEMIREV, 2001; HONG et al., 2005; RODRIGUES et al., 2011).

A importância da identificação destes fungos toxigênicos contaminantes de alimentos está inteiramente relacionada com o uso de fungos atoxigênicos para o biocontrole, como também com a necessidade de se adotar uma ferramenta capaz de prevenir o desenvolvimento desses fungos.

O uso de fungicidas é o método mais utilizado na prevenção do desenvolvimento desses micro-organismos, contudo, há relatos que afirmam o caráter teratogênico e carcinogênico desses produtos (SKANDAMIS et al., 2001). Soma-se a isso a exigência cada vez maior da sociedade pela produção de alimentos sem resíduos de defensivos agrícolas e com menor contaminação para o ambiente. A exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes nos óleos essenciais de plantas pode constituir uma forma potencial de controle alternativo. Por definição, óleos essenciais são uma mistura complexa de substâncias com atividade bactericida, fungicida e inibidora de produção de toxinas por micro-organismos além de apresentarem outras funções (BURT, 2004). Estudos demonstram que o mecanismo de ação desses compostos sobre os fungos está relacionado a lesões da membrana citoplasmática, danos à parede celular e a organelas celulares, alterações morfológicas das hifas e redução da

produção de ergosterol (PINTO et al., 2009; RASOOLI; REZAEI; ALLAMEH, 2006; ZUZARTE et al., 2011).

Vários métodos têm sido utilizados para validar o efeito desses óleos essenciais sobre o desenvolvimento dos fungos, como, por exemplo, testes bioanalíticos *in vitro*, viabilidade celular e uso da microscopia. Para análise da viabilidade celular, em muitos estudos tem sido utilizada a coloração FUN-1 (GANGWAR et al., 2006; LASS-FLÖR et al., 2001; MILLARD et al., 1997), um método qualitativo que consiste na aplicação do corante FUN-1 sobre o material biológico e posterior visualização em microscópio de fluorescência. Por difusão passiva, o corante penetra nas células e, com metabolismo celular inativo, se apresenta no citoplasma difuso, na cor verde e/ou verde-amarelado. Nas células metabolicamente ativas, observa-se o aparecimento de estruturas cilíndricas intravacuolares (CIVs), sendo o corante retido no seu interior, com coloração vermelha (PINTO et al., 2009).

Neste contexto e pela importante relevância do aprimoramento de novas tecnologias no campo da micologia e segurança microbiológica alimentar, o estudo foi realizado com os objetivos de caracterizar e identificar 35 isolados de *Aspergillus* seção *Flavi*, obtidos de alimentos utilizando uma abordagem polifásica pela caracterização morfológica, perfil bioquímico, análise espectral por MALDI-TOF ICMS e análises moleculares, além de testar *in vitro* o efeito de óleos essenciais de plantas sobre o desenvolvimento de fungos aflatoxigênicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Gênero *Aspergillus* seção *Flavi*

Espécies do gênero *Aspergillus* são contaminantes de vários substratos. Em regiões tropicais e subtropicais, sua ocorrência é mais comum que a do gênero *Penicillium*. Muitas espécies têm atraído a atenção como patógenos humano e animal, devido à sua habilidade de produzir metabólitos tóxicos (micotoxinas). Outras espécies são importantes para aplicação na fermentação de produto alimentício oriental e para aplicação industrial, na produção de ácidos orgânicos, metabólitos secundários, enzimas e na biotransformação de químicos (SAMSON; VARGA, 2010).

O gênero *Aspergillus* é um anamórfico pertencente à família Trichocomaceae, ordem Eurotiales, subclasse Eurotiomycetidae, classe Eurotiomycetes, filo Ascomycota. A reprodução é assexuada e caracteriza-se pela produção de fiálides e conídios em cadeia. O conidióforo de *Aspergillus* é simples, usualmente aseptado e termina numa vesícula, onde ficam inseridas as fiálides. Algumas espécies podem produzir células Hülle ou esclerócios. Muitas espécies de *Aspergillus* apresentam telemorfos e se reproduzem sexuadamente (KLICH, 2002).

A taxonomia de *Aspergillus* é complexa e encontra-se sempre em evolução; sua identificação tem sido tradicionalmente baseada na caracterização morfológica e cultural (RAPER; FENNEL, 1965; SAMSON et al., 2000). O perfil bioquímico e traços ultramicroscópicos, por exemplo, ornamentação do esporos passaram a suplementar as características para identificação da espécie (KOZAKIEWICZ, 1989). No entanto, em várias seções, a variação morfológica deste gênero ocorre, resultando em esquemas taxonômicos discutíveis (HONG; GREENE; DORNER, 1995; SAMSON et al., 2004). Nesse sentido, a taxonomia

de *Aspergillus* e seus telemorfos recentemente tem sido reinvestigada, utilizando-se uma abordagem polifásica interagindo características bioquímicas, ecológicas, genéticas e moleculares, a fim de examinar a variabilidade dentro da espécie e adicionar ou reclassificar as espécies dentro do gênero (FRISVAD; SKOUBOE; SAMSON, 2005; HORN, 1997; ITO et al., 2001; LI et al., 1998; PATERSON, 2000; PETERSON, 2008; PETERSON et al., 2001; PILDAIN et al., 2008; RIGÓ et al., 2002). Manuais e monografias importantes dedicados à taxonomia de *Aspergillus* são listados na Tabela 1.

Tabela 1 Importantes tratamentos taxonômicos e manuais de identificação para o gênero *Aspergillus*

Ano	Referências
1926	Thom, C., and Church, M. The Aspergilli (Baltimore: Williams & Wilkins)
1954	Thom, C., and Raper, K.B. A Manual of the Aspergilli (Baltimore: Williams & Wilkins)
1965	Raper, K.B., and Fennell, D.I. The Genus <i>Aspergillus</i> (Baltimore: Williams & Wilkins)
1985	Samson, R.A., and Pitt, J.I. Advances in <i>Penicillium</i> and <i>Aspergillus</i> Systematics (New York: Plenum)
1988	Klich, M.A., and Pitt, J.I. A Laboratory Guide to Common <i>Aspergillus</i> Species and Their Teleomorphs (North Ryde, Australia: Division of Food Processing).
1989	Kozakiewicz, A. <i>Aspergillus</i> Species on Stored Products (Wallingford: CAB International)
1990	Samson, R.A., and Pitt, J.I. eds. Modern Concepts in <i>Penicillium</i> and <i>Aspergillus</i> Classification (New York: Plenum Press)
2000	Samson, R.A., and J. I. Pitt, eds. Integration of Modern Taxonomic Methods for <i>Penicillium</i> and <i>Aspergillus</i> classification (Amsterdam: Harwood Academic Publications)
2002	Klich, M.A. Identification of Common <i>Aspergillus</i> Species (Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures).
2008	Samson, R.A., and Varga, J. <i>Aspergillus</i> systematics in the genomic era (Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre)

Bennet (2010), adaptado

Considerando a maioria dos esquemas tradicionais de identificação, *Aspergillus* seção *Flavi* inclui seis espécies economicamente importantes: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae* e *Aspergillus tamaritii* (Figura 1). Apesar de essas espécies serem intimamente relacionadas morfológica e filogeneticamente,

dividem-se em dois grupos, pela capacidade de produção de aflatoxinas (GODET; MUNAUT, 2010). O primeiro grupo inclui *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, espécies que são produtoras de aflatoxinas, consideradas um grande problema para saúde humana e animal; o segundo grupo compreende os isolados chamados de espécies domesticadas, *A. oryzae*, *A. sojae* e *A. tamarisii*, utilizadas no processo de fermentação de alimentos, em alguns países asiáticos e aplicados na indústria para a produção de enzimas (HEDAYATI et al., 2007; KUMEDA; ASAO, 2001).

Vários estudos têm mostrado evidências de que a espécie *A. flavus* pode consistir em um grupo parafilético dos isolados (GEISER et al., 2000; PILDAIN et al., 2008); alta intraespecificidade e diversidade metabólica e genética foram frequentemente referidas para populações de *A. flavus* (PILDAIN et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009). Ao lado de *Aspergillus fumigatus*, é a segunda mais comum causa da aspergilose invasiva e não invasiva em seres humanos e animais (DENNING et al., 2003) e, em algumas áreas geográficas, é o principal agente causador da aspergilose. Estes fungos produzem aflatoxinas, agentes naturais cancerígenos e ácido ciclopiazônico (CPA), que é tóxico para uma variedade de animais e humanos (HEDAYATI et al., 2007; YU et al., 2005). Além disso, é um patógeno oportunista de muitas culturas (milho, algodão, amendoim), podendo contaminá-las com aflatoxinas.

Como outras espécies de *Aspergillus*, *A. flavus* tem ampla distribuição geográfica, em especial em áreas cultivadas. É um fungo saprófita que é capaz de sobreviver em muitas fontes de nutrientes orgânicos, como árvore, madeira em decomposição, forragem animal, algodão, pilhas de composto, cadáveres de insetos e de animais e grãos armazenados. Cresce melhor com atividade de água (aw) entre 0,86 e 0,96. A temperatura ótima para crescer é de 37 °C, mas o crescimento dos fungos pode ser observado em temperaturas que variam entre

12 a 48 °C. Tal temperatura ótima de crescimento contribui para a sua patogenicidade em seres humanos (HEDAYATI et al., 2007).

Tradicionalmente, *A. flavus* tem sido relatado como produtor de aflatoxinas B (AFBs) e ácido ciclopiazônico (CPA), mas não aflatoxinas G (AFGs). Com base nas características dos esclerócios produzidos, os isolados *A. flavus* podem ser divididos em dois fenótipos: a estirpe tipo-S produz numerosos esclerócios pequenos (diâmetro médio 400 nm) e a estirpe tipo-L produz menos esclerócios, mas estes maiores. Dentro da estirpe S, alguns isolados, denominados SB, produzem somente aflatoxinas B, enquanto outros, com o nome SBG, produzem tanto aflatoxinas B e G (COTTY, 1989). Os isolados tipo-S têm sido referidos como atípicos, produzindo microesclerócios (SAITO; TSURATA, 1993) e *A. flavus* var. *parvisclerotigena* (GEISER et al., 2000). As estirpes microesclerotiais diferem de *A. flavus* e, portanto, tem sido sugerido que eles representam um taxon separado de *A. flavus* (FRISVAD; SKOUBOE; SAMSON, 2005; GEISER et al., 2000). Filogenia molecular sugere que os isolados SB estão intimamente relacionados com a cultura do tipo *A. flavus* e outros isolados estirpes tipo L (EGEL et al., 1994).

Aspergillus parasiticus e *A. flavus* estão intimamente relacionados, mas separáveis, com base na sequência de DNA e análises por AFLP (BARROS et al., 2007; PETERSON, 2008). Fenotipicamente são facilmente distintos, já que *A. parasiticus* produz aflatoxinas do grupo B e G, mas não CPA (HORN et al., 1996). Klich e Pitt (1988) completam que essa diferenciação deve levar em consideração a cor da colônia e a textura da parede dos conídios. Ademais, populações de *A. parasiticus* apresentam grande diversidade genética, indicada pelo grande número de grupos vegetativamente compatíveis (HORN; GREENE; DORNER, 1995). *Aspergillus sojae* e *Aspergillus toxicarius* não têm sido claramente distintos de *A. parasiticus* (PILDAIN et al., 2008). Outras espécies intimamente relacionadas com *A. parasiticus*, também produzindo AFBs e

AFGs, mas morfológicamente semelhante a *A. flavus*, foram recentemente descritas como *Aspergillus arachidicola* (PILDAIN et al., 2008).

A espécie *A. nomius* é morfológicamente semelhante a *A. flavus*, mas apresenta um perfil micotoxigênico similar ao de *A. parasiticus* (KURTZMAN; HORN; HESSELTINE, 1987; PETERSON et al., 2001). Originalmente foi isolado do mofo de trigo nos EUA e, depois de vários substratos, na Índia, no Japão e na Tailândia. Recentemente, tem sido relatado como um contaminante importante e produtor de aflatoxinas na castanha-do-brasil (JOHNSON et al., 2008; OLSEN et al., 2008).

A. flavus, *A. parasiticus*, *A. oryzae* e *A. sojae* têm demonstrado alto grau de parentesco pelo DNA e similar tamanho do genoma. Com base na complementaridade do DNA, *A. flavus* e *A. oryzae*, assim como *A. parasiticus* e *A. sojae*, foram considerados praticamente impossíveis de discriminar, já que a similaridade do DNA foi de 100% e 91%, respectivamente (KURTZMAN; HORN; HESSELTINE, 1987). *A. oryzae* e *A. sojae* foram considerados variantes não toxigênicos de *A. flavus* e *A. parasiticus*, respectivamente. Estudos filogenéticos indicaram que *A. oryzae* pode ter se originado de um ancestral não aflatoxigênico de *A. flavus* (CHANG; EHRLICH; HUA, 2006; GEISER et al., 2000; GEISER; PITT; TAYLOR, 1998) ou que tenham perdido a capacidade de produzir AFs durante o processo de domesticação (SAMSON et al., 2000). Geiser, Pitt e Taylor (1998) sugerem que tanto *A. oryzae* quanto *A. sojae* devem ser mantidos como espécies separadas por razões práticas, a fim de evitar confusão na indústria de alimentos.

No grupo das espécies de *A. tamaraii*, os isolados apresentam cor castanho-bronze. São tradicionalmente utilizados na indústria de alimento oriental como não aflatoxigênicos. Goto, Wicklow e Ito (1996) relataram a produção de aflatoxinas por um isolado definido como *A. tamaraii*, no entanto,

Ito et al. (2001) descreveram, mais tarde, este isolado como uma nova espécie intimamente relacionada, *Aspergillus pseudotamarii*.

Recentemente, novas espécies têm sido descritas para esta seção. Soares et al. (2011) descreveram três novas espécies produtoras de aflatoxinas, *Aspergillus mottae*, *Aspergillus sergii* e *Aspergillus transmontanensis*, isolados de amêndoas-portuguesas e de milho. Gonçalves et al. (2012), durante uma pesquisa sobre a incidência de *Aspergillus* em ambientes clínicos, encontraram alguns isolados interessantes que foram morfológicamente semelhantes ao *Aspergillus parasiticus*, mas diferiram na cor das colônias e no padrão de sua ornamentação dos conídios, constituindo uma nova espécie, *Aspergillus novoparasiticus*.

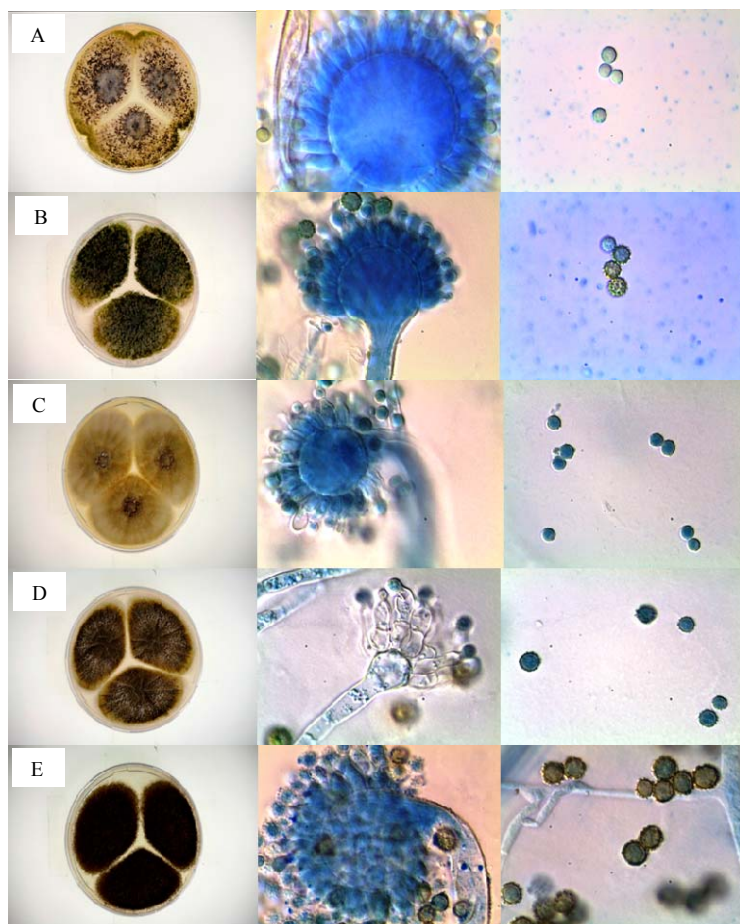


Figura 1 Macro e microfotografias das espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae* e *Aspergillus tamarii*

2.2 Identificação de espécies do gênero *Aspergillus* - abordagem polifásica

A nova taxonomia de espécies de *Aspergillus* é baseada em uma abordagem polifásica, integrando caracteres fenotípicos, juntamente com sequências de DNA. Em uma abordagem polifásica micro e macromorfologia, fisiologia, metabólitos produzidos e dados moleculares são todos importantes e,

em princípio, nenhum dos métodos deve ser subestimado. Em particular, o perfil de extrólitos provou ser específico para táxon e isso tem contribuído para um conceito de espécie estável. Mas, dados da sequência do DNA também têm sido muito valiosos nas revisões críticas de espécies e sua taxonomia e filogenia (SAMSON; HONG; FRISVAD, 2006). Esquema de identificação de *Aspergillus* com o uso da abordagem polifásica é demonstrado na Figura 2.

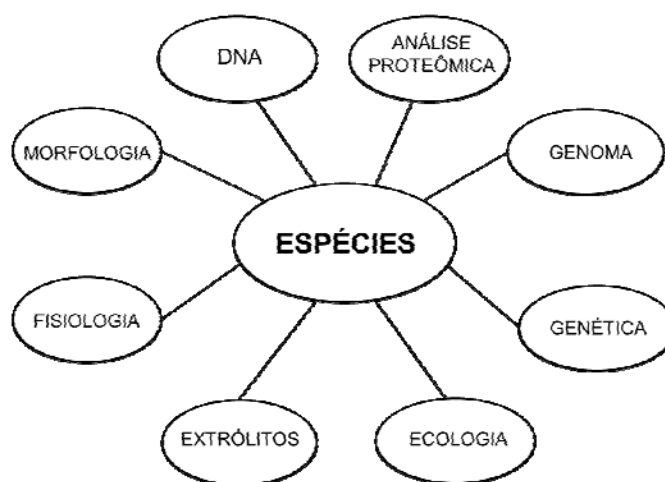


Figura 2 Esquema mostrando a integração de diferentes características que podem ser combinadas para uma classificação taxonômica polifásica de uma espécie de *Aspergillus* (SAMSON; HONG; FRISVAD, 2006), adaptado e atualizado

2.2.1 Características morfológicas e fisiológicas

A identificação de *Aspergillus* tem sido tradicionalmente baseada na caracterização morfológica (RAPER; FENNEL, 1965; SAMSON et al., 2000). Características macromorfológicas incluem cor das colônias em vários meios de cultura, diâmetro da colônia, cor do reverso da colônia, produção de exsudatos e pigmentos solúveis, presença de esclerócios e cleistotécio. A caracterização

micromorfológica está relacionada, principalmente, com a forma de seriação da cabeça conidial, o tamanho da vesícula, a morfologia de conídios, a presença de células Hülle e a morfologia dos esclerócios (KLICK, 2002).

Além de caracteres morfológicos, isolados de *Aspergillus* podem também ser caracterizados por seus perfis de metabólitos secundários, por sua taxa de crescimento em determinada temperatura e atividade de água, seu crescimento em ágar sacarose-creatina e cor dos conídios (SAMSON et al., 2007). Os metabólitos secundários podem ser utilizados para o reconhecimento de espécies devido à sua especificidade entre espécies (FRISVAD, 1989; LARSEN et al., 2005). Praticamente todas as espécies de *Aspergillus* produzem uma combinação única de diferentes tipos de compostos orgânicos pequenos, como policetídeos, peptídeos não-ribossomais e terpenoides, assim como muitos outros compostos de origem biossintética mista. Alguns desses compostos são mesmo exclusivos de uma única espécie. O fato de os metabólitos secundários serem bons caracteres fenotípicos para o reconhecimento de espécies é suportado por recentes estudos sobre o sequenciamento do genoma completo de importantes *Aspergillus*, podendo-se concluir que importantes diferenças genômicas entre as espécies estão frequentemente relacionadas à produção desses metabólitos (GALAGAN et al., 2005).

O perfil bioquímico de *Aspergillus* seção *Flavi* está diretamente relacionado à produção de aflatoxinas. De forma geral, *A. flavus* produz aflatoxinas B (AFBs) e ácido ciclopiazônico (CPA), mas não aflatoxinas G (AFGs). *A. parasiticus* produz a aflatoxina G1 e G2, além de B1 e B2, mas não ácido ciclopiazônico (BENNETT; KLICH, 2003; YU et al., 2005). Aflatoxinas são produzidas por algumas espécies de *Aspergillus* em outros complexos flavus, incluindo *A. toxicarius*, *A. nomius*, *A. bombycis* e *A. pseudotamarii*, produtor de CPA. *A. oryzae* tem sido muito utilizada no oriente, para preparar vários tipos de produtos alimentares, que pode produzir CPA e ácido β -nitropropiónico, mas não

produz a aflatoxina. Além disso, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. sojae*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. tamarisii*, *A. caelatus* e *A. pseudotamarii* podem produzir ácido kójico (VARGA et al., 2003). Na Tabela 2 observa-se a produção de aflatoxinas e alguns eletrólitos por *Aspergillus* seção *Flavi*.

Tabela 2 Produção de aflatoxinas e outros extólitos de espécies *Aspergillus* seção *Flavi* (SAMSON; HONG; FRISVAD, 2006), adaptado

	Ácido Kojic	AFLA Tipo B	AFLA Tipo G	CPA	Ácido Aspergílico	Ocratoxina A	Chrysogine	Parasiticolide
<i>Aspergillus arachidicola</i>	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>Aspergillus avenaceus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus bombycis</i>	+	+	+	-	+/-	-	-/+	-
<i>Aspergillus caelatus</i>	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	+	+/-	-	+	+	-	-	-
<i>Aspergillus lanosus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus leporis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus minimisclerotium</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Aspergillus nomius</i>	+	+	+	-	+	-	-/+	-
<i>Aspergillus oryzae</i> (domesticated from <i>A. flavus</i>)	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus parasiticus</i>	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>Aspergillus parvisclerotigenus</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus sojae</i> (domesticated from <i>A. parasiticus</i>)	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Aspergillus tamarisii</i>	+	-	-	+/-	-	-	-	-
<i>Aspergillus toxicarius</i>	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>Petromyces albertensis</i>	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>Petromyces alliaceus</i>	+	-	-	-	-	+	-	-

2.2.2 Características moleculares

Os métodos moleculares têm sido amplamente aplicados na identificação de um grande número de espécies de *Aspergillus* (BATISTA et al., 2008), os quais estão entre os fungos mais bem estudados geneticamente. Na verdade, os genomas de várias espécies de *Aspergillus* estão concluídos (FEDOROVA et al., 2008; GALAGAN et al., 2005; MACHIDA et al., 2005; NIERMAN et al., 2005; PAYNE et al., 2006; ROKAS et al., 2007) e sequências de inúmeras linhagens encontram-se disponíveis.

Em geral, as características moleculares fornecem um grande número de características variáveis para a taxonomia de fungos, que são gerados utilizando-se uma tecnologia amplamente disponível, com uma infraestrutura de bioinformática extremamente bem desenvolvida que permite a comunicação em todo o mundo e a comparação de resultados. Essa técnica garante que as características moleculares tenham um papel fundamental no reconhecimento da espécie fúngica (GEISER et al., 2007).

Nos últimos anos, ferramentas moleculares, como RFLPs, RAPDs, AFLP, MLEE, sequências ribossomais RNA e sequências de gene de proteínas codificadoras, são aplicadas a questões taxonômicas do gênero. Estudos de sequências DNA multilocos de algumas espécies anamórficas têm mostrado que os padrões de polimorfismos em genes diferentes são consistentes com recombinação nestas espécies assexuadas (GEISER; PITT; TAYLOR, 1998). No entanto, a variedade de genes e métodos empregados nas pesquisas de identificação e de filogenia baseadas no DNA têm limitado a aplicabilidade dos resultados para além dos grupos específicos de estudo (STOECKLI, 2003). Taylor et al. (2000) afirmam que a análise filogenética das características variáveis do ácido nucleico, atualmente, é mais próxima do que os outros a reconhecer as espécies de acordo com a evolução das espécies, mas, este é considerado verdadeiro somente se vários genes são analisados. Para a descrição da espécie e da inferência filogenética, Samson e Varga (2009) recomendam que pelo menos duas sequências de genes devem ser examinados, utilizando-se a abordagem de sequências multilocos (MLST).

A internet oferece um meio para a distribuição rápida de dados, mas nem todos os sites na web contêm dados de igual qualidade. GenBank contém sequências de qualidade questionável e prováveis erros na identificação de organismos (GEISER et al., 2007).

Entretanto, mesmo com o alto nível de sensibilidade e resolução que os métodos moleculares normalmente mostram, alguns problemas ainda surgem no âmbito da seção *Flavi*, por causa do alto nível de similaridade genética entre algumas espécies (RODRIGUES et al., 2011).

2.2.3 Análise proteômica – MALDI-TOF ICMS

A espectrometria de massas pela técnica de MALDI-TOF MS surgiu, no final de 1980, como uma técnica para investigar a espectrometria de massa de compostos orgânicos de elevada massa molecular, por meio de uma ionização suave de moléculas, resultando em fragmentação mínima (TANAKA et al., 1988). Atualmente, esse método tem sido utilizado para analisar a composição proteica de misturas complexas, isto é, fluidos biológicos ou tecidos, bem como de células microbianas ou componentes celulares (FENSELAU; DEMIREV, 2001; MAIER; KOSTRZEWA, 2007).

O funcionamento dessa técnica, de forma geral, para células microbianas, ocorre da seguinte forma: a amostra contendo a espécie de interesse é misturada com uma matriz (geralmente um ácido orgânico aromático), formando uma “mistura sólida”. Um pulso de laser, com comprimento de onda próximo do UV, incide sobre essa mistura e a energia do laser é absorvida pela matriz, que tem o máximo de absorção perto do comprimento de onda do laser. Desse modo, a matriz evapora e o analito, que estava incluso na matriz, agora se encontra na fase gasosa altamente energética atribuída à excitação eletrônica da molécula da matriz, ao absorver a energia do laser. A formação dos íons (ionização) ocorre por meio da transferência de carga (ex: transferência de prótons) das moléculas da matriz para o composto que fica na forma de MH⁺. Os íons formados recebem alta energia cinética inicial (K) que os impulsiona para o analisador de massas *time-of-flight* (TOF), onde são

separados de acordo com o tempo de voo, considerando a distância na qual o íon se movimenta até atingir o detector. Utilizando-se a equação da energia $K=mV^2/2$, em que V é a velocidade do íon, calcula-se a massa molecular do composto. Os compostos são separados no analisador de acordo com sua razão m/z . Íons mais leves chegam mais rapidamente no detector, enquanto os íons mais pesados demoram mais tempo. No MALDI, o analisador de massas pode operar em dois modos: modo linear e modo reflectron. O modo linear é utilizado para moléculas de grande massa molecular, como proteínas, peptídeos e polímeros e o modo reflectron utilizado para moléculas de massa de até 7000Da, como as micotoxinas. O modo reflectron tem a vantagem de apresentar uma maior resolução quando comparado ao modo linear, devido à presença de um conjunto de lentes com diferença de potencial crescente, propiciando o aumento de resolução. Além disso, programas online estão disponíveis para permitir a detecção do conjunto massas matriz, o que pode interferir com os das amostras (KELLER et al., 2008; MARVIN; ROBERTS; FAY, 2003). Caracterização mais detalhada da técnica é relatada em um estudo realizado por Santos et al. (2010).

A vantagem de MALDI-TOF MS sobre as outras metodologias de espectrometria de massa é que ela simplificou a análise de massa espectral devido à ionização suave, reduzindo o número de sinais, tendo a faixa de massa mais ampla (KEMPTNER et al., 2009). Como resultado, muitas amostras complexas, como células inteiras, podem ser investigadas. Além disso, é uma técnica uma rápida e reprodutível, que tem sido utilizada com sucesso para a identificação e a discriminação de vários micro-organismos e tem mostrado altas potencialidades para discriminar táxons relacionados muito próximos.

Vários estudos têm sido realizados para o uso desse método. Santos et al. (2010) apresentam, em sua pesquisa de revisão, o uso do MALDI-TOF ICMS para a caracterização de fungos filamentosos. Sulc et al. (2008) utilizaram a abordagem da espectrometria de massas (MALDI-TOF) para análise direta do

esporo intacto de fungos do gênero *Aspergillus* e verificaram que a técnica tem a capacidade de diferenciar espécies dentro do mesmo gênero. Trabalho semelhante foi feito por Hettick et al. (2008), que usaram a técnica do MALDI-TOF para gerar *fingerprints* de massa espectral reprodutível para 12 espécies de fungos do gênero *Aspergillus* e 5 diferentes cepas de *Aspergillus flavus*.

Kallow et al. (2006) relatam que, em fungos filamentosos, a maior parte dos sinais corresponde a proteínas ribossomais, cujas massas altamente características podem ser utilizadas para identificação e classificação. Na verdade, a composição da parede celular de fungos e também de esporos de fungos apresenta diferenças qualitativas e quantitativas em diferentes espécies de fungos, mas também entre as diferentes estirpes da mesma espécie fúngica (KEMPTNER et al., 2009).

Autores atribuem as diferenças entre os *fingerprints* dos espectros de massa a vários fatores, como instrumentação nomeadamente, condições de cultivo e preparação da amostra e da matriz MALDI. Essas diferenças refletem a importância do uso da metodologia padronizada para o MALDI-TOF.

Santos et al. (2010) enfatizam que uma biblioteca de referência padrão de espectros de massa biológica precisa ser implementada com base em testes interlaboratoriais.

2.3 Desenvolvimento de fungos toxigênicos e síntese de micotoxinas

O crescimento e o desenvolvimento de fungos são os principais problemas em alimentos, em toda parte do mundo e pode levar a uma queda na qualidade dos produtos derivados, quanto a efeitos adversos tanto à saúde humana como à animal. Esse fato é decorrente da contaminação de alimentos e de rações animais por biocontaminantes, tais como as micotoxinas, que são

produtos resultantes do metabolismo secundário de alguns fungos (MAIA; SIQUEIRA, 2007).

As micotoxinas ganharam importância como contaminantes tóxicos da alimentação humana e animal desde o ocorrido na Inglaterra, no início da década de 1960, quando mais de 100 mil perus morreram após a ingestão de torta de amendoim de origem africana e brasileira. Este surto recebeu o nome de doença X dos perus e, mais tarde, foi descoberto que essa misteriosa doença ocorrera devido à presença de aflatoxinas em um de seus ingredientes (ASPLIN; CARNAGHAN, 1961).

Os fungos toxigênicos envolvidos na cadeia alimentar de humanos e de animais pertencem, principalmente, a três principais gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Os dois primeiros gêneros são normalmente encontrados como contaminantes presentes em alimentos durante a secagem e a estocagem, enquanto o último é patógeno de plantas e produz micotoxinas antes ou imediatamente após a colheita (DRAGAN; PITOT, 1994).

Dentre as micotoxinas encontradas em alimentos, as aflatoxinas são as mais importantes. Tais substâncias são produtos do metabolismo secundário, principalmente, dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius* e *Aspergillus parasiticus*, ocorrendo após a fase de crescimento exponencial dos fungos (PEREIRA; CARVALHO; PRADO, 2002), podendo contaminar uma grande variedade de alimentos, principalmente quando a temperatura se encontra entre 25-30 °C e umidade relativa do ar é elevada (85%) (MAGAN; ALDRED, 2007; OSWEILER, 2005). Devido aos efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos, as aflatoxinas representam um risco à saúde pública e animal (BRYDEN, 2007; THANABORIPAT, 2005), sendo imprescindível o emprego de medidas de controle de fungos durante o cultivo, a colheita, o armazenamento e o transporte de grãos.

O caráter mutagênico das aflatoxinas tem sido relatado para o gene p53, em que há transversão de guanosina a tiamina, levando à carcinogenicidade que causa carcinoma hepatocelular (HCC). Também foi demonstrado causar danos ao DNA mitocondrial por adução e mutação, bem como das membranas das células mitocondriais, levando à interrupção da produção de energia em forma de ATP e morte celular (apoptose) dentro do fígado. Essa perturbação pode afetar também outros órgãos e tecidos, como cérebro, pulmões, rins e o processo de coagulação do sangue. Também pode facilmente atravessar a placenta, afetando recém-nascidos (BENNETT; KLICH, 2003; WILLIAMS et al., 2004).

O efeito de uma micotoxina depende da dose e da frequência com que é ingerida e pode ser agudo (letal ou não) ou subagudo. O efeito agudo é de manifestação e percepção rápidas, podendo levar à morte, por causa de alterações irreversíveis, e é resultante da ingestão de doses geralmente elevadas. O efeito subagudo é o resultado de doses menores que provocam distúrbios e alterações nos órgãos dos humanos e dos animais (BENNETT; KLICH, 2003; SHEPHARD, 2008).

As aflatoxinas constituem um grupo de, pelo menos, 16 derivados bisfuranoisocumarínicos. As 4 principais naturalmente produzidas são as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (Figura 3). A aflatoxina B₁, entre todas as aflatoxinas, é, usualmente, a toxina de maior ocorrência e concentração presente nos alimentos. Provoca alterações orgânicas que levam a hemorragias por meio da inibição dos fatores II e VII da coagulação sanguínea, além de lesões no hematócito. A ingestão de baixas quantidades por um longo período determina baixa conversão alimentar nos animais, imunodepressão e câncer hepático (BALDISSERA et al., 1993; LUZ, 2001).

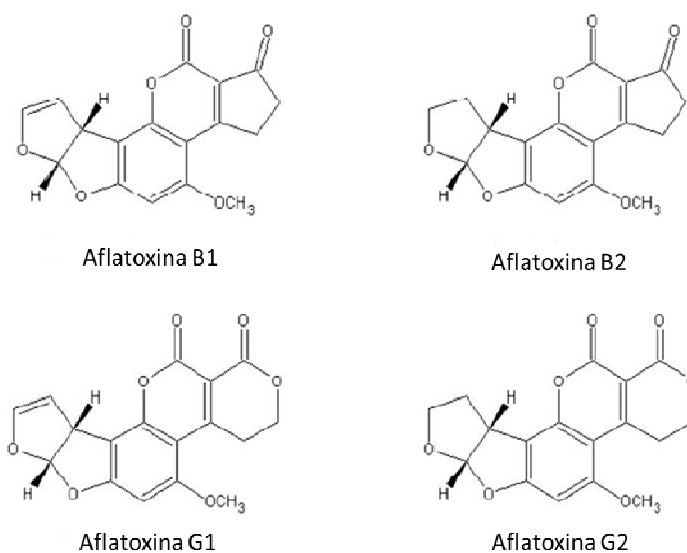


Figura 3 Estrutura química das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂

A nomenclatura B e G é em função das fluorescências de cor azul e verde, respectivamente, que são produzidas quando essas toxinas, adsorvidas em placas de sílica gel 60G, são expostas à lâmpada de ultravioleta de comprimento de onda 366 nm (SWEENEY; DOBSON, 1999).

Na prática, as aflatoxinas têm sido detectadas por técnicas físico-químicas e biológicas. Dentre as técnicas para verificar a presença de aflatoxina em alimentos estão as físico-químicas cromatográficas e as instrumentais. As técnicas biológicas incluem os bioensaios e os imunoenaios (KWIATKOWSKI; ALVES, 2007).

O problema das aflatoxinas torna-se mais grave porque os processos para a sua inativação nos alimentos não são eficazes. Além de eliminarem apenas pequenas partes de tais substâncias, podem causar alterações indesejáveis nos alimentos, como perda de nutrientes e mudanças no aroma e no sabor dos produtos (PRADO et al., 1996).

No Brasil, o limite máximo tolerado para aflatoxinas totais em alimentos é normatizada pela Resolução RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, na qual está discriminado o limite máximo permitido para cada alimento (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2011). Por exemplo, podem-se citar que, para o feijão, cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada, a concentração máxima permitida para AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 é de 5 µg/kg. Para castanhas, exceto castanhas-do-brasil, incluindo nozes, pistaches, amêndoas, avelãs, frutas desidratadas e secas, castanhas-do-brasil sem casca direto para o consumo e amêndoas de cacau, é de 10 µg/kg. Para amendoim, milho, milho em grãos, sêmolos, farinha, especiarias e castanhas-do-BRASIL com casca, para consumo direto, é de 10 µg/kg. Já para fórmulas infantis para lactantes e crianças de primeira infância, alimentos à base de cereais para alimentação infantil, este teor é extremamente limitado para 1µg/kg.

A ocorrência de aflatoxinas, no Brasil, tem sido observada com frequência, e em altos níveis, em alimentos utilizados para consumo humano e animal, como milho, amendoim e derivados. A contaminação de derivados de amendoim, como paçocas e outros doces, assume destacada relevância em saúde pública, dado que as crianças constituem os principais consumidores desses produtos. Soma-se a este cenário a produção de rações, produzidas, na sua maioria, por cereais, como, por exemplo, farelo de amendoim, que não são tão bem monitoradas, em comparação com os estudos realizados para micotoxinas em alimentos para o consumo humano. Destaca-se, dessa forma, uma preocupação mundial pela grande probabilidade de contaminação desses animais pela toxina e a possibilidade de transmissão de resíduos tóxicos para a carne, o leite e os ovos, resultando num potente risco à saúde humana (MAIA; SIQUEIRA, 2007).

Contudo, não existem estimativas acerca do grau de exposição da população por meio da ingestão de alimentos contaminados. Desconhece-se, também, o impacto das aflatoxinas sobre a incidência do câncer hepático ou outras doenças, nas condições brasileiras (OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

No levantamento realizado por Rodriguez-Amaya (2001), a contaminação do amendoim brasileiro e de seus subprodutos chega a níveis alarmantes. Foram analisadas amostras das regiões sul e sudeste, sendo que 27% e 49%, respectivamente, das amostras analisadas estavam contaminadas com mais de 30 µg/kg de aflatoxinas totais.

A ocorrência das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ e ácido ciclopiazônico (CPA) foi avaliada em 25 amostras de rações colhidas em propriedades leiteiras da região de São Carlos, SP. A identificação e a quantificação das toxinas foram efetuadas POR MEIO de cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados revelaram 19 amostras (76%) positivas para uma ou mais frações de aflatoxinas, porém, em níveis (0,05-24,12 µg/kg) abaixo do limite recomendado para rações no Brasil (50 µg/kg, dado pela somatória de B₁ + B₂ + G₁ + G₂). Seis amostras (24%) foram positivas para CPA, em concentrações de 2,56-84,46 µg/kg, das quais quatro também apresentaram aflatoxinas, em níveis de 0,36-3,08 µg/kg (soma das quatro frações). Esta é a primeira constatação de CPA em rações no Brasil. A coocorrência desta micotoxina juntamente com AFB₁ reforça a importância do controle de micotoxinas nas rações destinadas à alimentação do gado leiteiro (OLIVEIRA et al., 2006).

Em estudo realizado por Labuda e Tancinová (2006), na República Eslováquia, com misturas de carnes de aves, entre outros fungos, foi detectada a presença do *Aspergillus* (11 ssp.) em 69% das amostras, em quatro anos de análise (2001 a 2004), totalizando 100 amostras.

Em Marrocos, Zenedine et al. (2007) pesquisaram a presença aflatoxina M₁ em 54 amostras de leite pasteurizado de cinco usinas de beneficiamento e

constatarem a presença em 88,8% das amostras, com valores que variaram de 0,001 a 0,117 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A legislação deste país permite o máximo de 0,05 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Assim como a aflatoxina M_1 pode estar presente no leite, pode também estar em seus derivados. Martins e Martins (2004) pesquisaram a presença de aflatoxina M_1 em 96 amostras de iogurtes comercializados em Portugal e detectaram a presença em 18,8% delas.

Sendo assim, a prevenção da contaminação pelo fungo *Aspergillus* sp. continua sendo a melhor medida para evitar a presença de aflatoxina em alimentos e garantir a segurança alimentar de humanos e animais, considerando que o consumo de carne, ovos e leite também pode acarretar patologias, já que também podem estar com a micotoxina.

2.4 Plantas condimentares

As plantas condimentares vêm acompanhando a civilização há muitos anos, exercendo grande influência na história mundial, sendo alvo da atenção dos povos e estando até ligadas diretamente à descoberta de muitos países. O homem tem utilizado estas plantas na agricultura, na alimentação, na medicina e, em tempos remotos, era empregada na mumificação de corpos.

Por definição, condimentos e especiarias são produtos aromáticos de origem vegetal empregados, principalmente, para conferir sabor aos alimentos. Além dessa utilidade, possuem também propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais. Os condimentos são selecionados com base no sabor e na cor que eles dão aos alimentos, como, por exemplo, quente (pimenta), pungente (alho), aromático (canela, cravo), herbáceo (sálvia, alecrim) e colorido (tunérico) (SALGADO, 2005; SOLIMAN; BADEAA, 2002).

A utilização de substâncias naturais, de origem vegetal, torna o alimento mais atrativo ao consumidor, por não apresentarem efeito tóxico, mesmo quando

empregadas em concentrações relativamente elevadas. Além dos benefícios proporcionados à saúde, diversos estudos têm demonstrado o efeito inibidor de condimentos sobre o desenvolvimento de micro-organismos deterioradores veiculados por alimentos (BAKKALI et al., 2008; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Vale ainda dizer que o valor condimentar de uma planta está quase sempre associado ao teor de óleos essenciais (FURLAN, 1998).

Foeniculum vulgare Mill. (**funcho-doce**)

Foeniculum vulgare, conhecido vulgarmente como funcho-doce, anis-doce e marato é uma espécie da família das Apiaceae, planta perene ou bienal, aromática, de 40 a 90 cm de altura, originária da região do Mediterrâneo, NORTE da África e Oeste da Ásia, cultivada em todo Brasil. As folhas inferiores são alargadas a até 30 cm de comprimento e as superiores são mais estreitas, com pecíolo alargado como bainha que envolve o caule, compostas pinadas, com folíolos reduzidos a filamentos. As flores são pequenas, hermafroditas, de cor amarela, dispostas em umbrelas compostas por 10-20 umbrelas menores. Os frutos são oblongos, compostos por dois aquênios de cerca de 4 mm de comprimento. A base da haste é usada como legume, enquanto os frutos, vulgarmente chamados de sementes, têm sido empregados, desde a mais remota antiguidade, como chá medicamentoso (Figura 3) (CARDOSO et al., 2003; LORENZI; MATOS, 2008).

Vegeta bem em diversos climas, mas prefere os temperados, em locais bem iluminados e com luz solar direta. Não resiste a geadas fortes. Suas folhas são muito ricas em fibras e contêm boa quantidade de vitamina C, cálcio, fósforo, ferro e doses menores de vitamina B (CARDOSO et al., 2003; TESKE; TRENTINI, 1997).

Sua aplicação é relatada na culinária em saladas, molhos e até iogurtes e na perfumaria e em bebidas, como licores (CARDOSO et al., 2003). A fracção óleo, constituída principalmente por anetol (90-95%), é responsável pela sua atividade terapêutica, inseticida e antimicrobiana, bem como aromatizante, em medicamentos e em confeitaria, na fabricação de licores e guloseimas (BIBLIA et al., 2002; LORENZI; MATOS, 2008).

Zingiber officinalis Roscoe. (**gengibre**)

Zingiber officinalis Roscoe. é conhecida também como gengibre, mangaratiá e mangarataia. Espécie da família das Zingiberaceae, é uma planta herbácea de 0,30 a 1,20 m de altura, rizomatosa, aromática. As folhas são lineares a lanceoladas, tamanho médio de 28 cm de comprimento e 3 cm de largura, alternas, dísticas, glabras na face adaxial e ásperas na face abaxial. Inflorescência cimosa, pedúnculo de 15 a 20 cm de comprimento, brácteas florais obovadas, flores vistosas, numerosas, bissexuadas, verde-amareladas. O fruto é uma cápsula de semente azulada (Figura 4) (FERNANDES, 2002).

Originária da China, Índia e Malásia, é, atualmente, a terceira planta medicinal, aromática e condimentar mais produzida no Paraná, Brasil. Vegeta melhor em terrenos areno-argilosos, húmidos e bem drenados, preferindo climas quentes. A planta necessita de temperatura alta, entre 25 °C a 30 °C, e precipitação de até 2.000 mm anuais, principalmente na época do plantio até o início da formação de novos rizomas. O plantio é feito utilizando-se pedaços do rizoma, num espaçamento em torno de 25 cm entre covas, numa profundidade de 8 cm, adubadas com matéria orgânica (CARDOSO et al., 2003; FERNANDES, 2002; SILVESTRINI et al., 1996).

Sua fração principal óleo essencial tem como principal constituinte o zingibereno, contendo também monoterpenos e compostos associados:

campfeno, α e β -pineno, cumeno, mirceno e limoneno. Os extratos contêm amido, glucose e frutose (CARDOSO et al., 2003).

O rizoma de gengibre é amplamente comercializado em função de seu emprego na medicina popular (excitante, estomacal e carminativo), na alimentação, na indústria, especialmente como matéria-prima para fabricação de bebidas, perfumes e produtos de confeitaria, como pães, bolos, biscoitos e geleias (CORRÊA JÚNIOR; MING; SCHEFFER, 1991). Apresenta também, ação antisséptica, antiemética, anti-inflamatória, bacteriostática, carminativa e espasmolítica, além de ser estimulante da circulação periférica e estomáquico (CARDOSO et al., 2003). Propriedades antimicrobianas relacionadas ao óleo essencial de gengibre têm sido relatadas em vários estudos (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2007; ROZWALKA et al., 2008; SILVA et al., 2009).

Mentha piperita L. (**menta**)

Mentha piperita L., conhecida também como hortelã-pimenta, menta e hortelã-apimentada., é uma espécie da família das Lamiaceae. É uma planta herbácea, de 25 cm a 100 cm de altura, vivaz ou perene, com caule ramificado, contendo folhas opostas pecioladas ovais e com margem serrilhada, apresentando cor verde mais escura na face superior da folha e mais pálida na inferior. Apresenta flores avermelhadas e riqueza em óleo essencial (Figura 4) (CARDOSO et al., 2003; DAVID; BOARO; MARQUES, 2006).

Originária de Portugal e Espanha, prefere ambientes em meia sombra, solos úmidos e férteis, florescendo no verão. Quimicamente, em suas folhas, encontram-se a presença de vitaminas A, B, C e minerais (cálcio, fósforo, ferro e potássio) (CARDOSO et al., 2003).

O óleo essencial das folhas é incolor ou ligeiramente amarelado, com aroma próprio e sabor característico, constituído, principalmente, por

monoterpenos, atribuindo-se a estes as funções de defesa da planta contra herbívoros, agentes antimicrobianos e alelopáticos (CARDOSO et al., 2001; TRAJANO et al., 2009). O mentol e a mentona são os principais componentes do óleo e os de maior valor econômico, embora sejam conhecidos mais de 200 componentes presentes nos óleos do gênero *Mentha* (TAVISH; HARRIS, 2002). Além do uso farmacêutico, é aplicado como matéria-prima importante na indústria de tabaco e de produtos destinados à higiene bucal e de confeitaria (SCHILCHER, 1989).

In natura é muito utilizada na culinária, como, por exemplo, no preparo de chás, assados e grelhados em geral, sobremesas e molhos (CARDOSO et al., 2003).

Thymus vulgaris L (tomilho)

O tomilho (*Thymus vulgaris*), conhecido popularmente por timo, erva-urso e tomilho-de-inverno, pertence à família das Lamiaceae. Caracteriza-se por ser um pequeno arbusto, com altura de 20 a 30 cm, com poucos ramos, prostrados ou eretos, duros e um pouco lignificados, levemente cobertos de pelos brancos. As folhas são inteiras, pequenas, sésseis, de forma oval, tendo, juntamente com os caules, odor parecido ao da hortelã. As flores são brancas ou lilases, dispostas em rodélas compactas na parte apical dos muitos ramos que formam a moita e constituem pequenas espigas ralas, destacando-se o verde-cinza das folhas. Apresentam frutos pequenos e duros, ovais, lisos (Figura 4) (CARDOSO et al., 2003; LORENZI; MATOS, 2002).

Originária do Mediterrâneo, remonta à Grécia Antiga, seu nome vem de "coragem" (*thymon*), por estimular os guerreiros. O cultivo dessa planta ocorre, preferencialmente, em regiões secas, áridas, expostas ao sol e solos pedregulhosos, mas leves e possivelmente calcáricos; é planta de solos pobres,

rústica, evitando umidade e terras compactadas (CASTRO; CHEMALE, 1995). Sua composição química é extremamente rica, podendo-se, ainda, incluir vitaminas do complexo B, vitamina C e magnésio, entre outros minerais. Apresenta também os princípios ativos timol e carvacrol (LORENZI; MATOS, 2002).

Na culinária é utilizado para aromatizar carnes e guisados, temperar alimentos cozidos no vinho e em patês, molhos e pães. Acentua os sabores em peixes e frangos, quando usado moderadamente. Salienta o sabor de manteigas e tempera bem queijos. Já sua aplicação no uso terapêutico é observada como digestivo, antisséptico, cicatrizante, vermífugo e estimulante (CARDOSO et al., 2003).

A fração óleos essenciais possui atividades antimicrobianas, carminativas e expectorantes, as quais são atribuídas ao timol e ao carvacrol, componentes fenólicos do óleo, sendo o timol o mais potente. Esta aplicação tem sido relatada em vários estudos (PINA-VAZ et al., 2004; ROTA et al., 2008; SANTURIO et al., 2007).

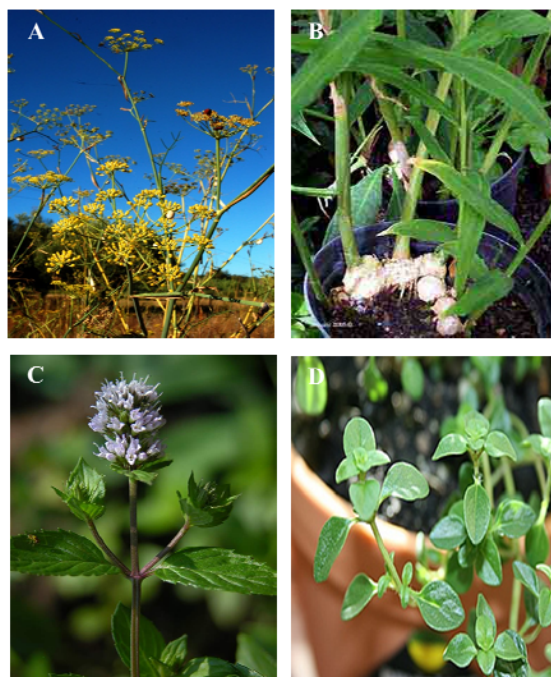


Figura 4 Aspecto geral da planta de funcho-doce (A), gengibre (B), menta (C) e tomilho (D)

2.5 Óleos essenciais

Estima-se que em torno de 1.700 substâncias orgânicas voláteis de plantas, oriundas de mais de 90 famílias, já tenham sido identificadas (KNUDSEN; GERSHENZON, 2006). Geralmente, trata-se de substâncias de baixa polaridade, oriundas do metabolismo secundário de plantas, que apresentam alta pressão de vapor e podem atravessar as membranas com facilidade para serem liberadas no solo e na atmosfera (DUDAREVA et al., 2006). Usualmente são obtidas por hidrodestilação de materiais de origem vegetal, o que resulta em uma mistura de substâncias voláteis conhecida como óleos essenciais, que podem ser caracterizados pelo forte odor que apresentam (ARAÚJO, 2005; SARTORATTO et al., 2004).

Para a International Organization for Standardization - ISO (2009), os óleos essenciais são produtos obtidos de partes das plantas, por meio da destilação por arraste com vapor de água, bem como produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. As denominações dadas a estes óleos estão relacionadas às suas características físico-químicas. São considerados óleos por serem, geralmente, líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente e por apresentarem volatilidade. Recebem, ainda, o nome óleos voláteis e são chamados de essências, devido ao aroma agradável e intenso da maioria deles. A denominação óleos etéreos refere-se ao fato de os mesmos serem solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter.

A produção de óleos essenciais ocorre, geralmente, por estruturas secretoras especializadas, tais como pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas específicas. Tais estruturas podem estar localizadas em algumas partes específicas ou em toda a planta. Assim, podem-se encontrar os óleos essenciais na parte aérea, como na menta; nas flores, como é o caso da rosa e do jasmim; nas folhas, como ocorre nos eucaliptos e no capim-limão; nos frutos, como na laranja e no limão; na madeira, como no sândalo e no pau rosa; nas cascas do caule, como ocorre nas canelas; nas raízes, como se observa no vetiver; nos rizomas, como no gengibre e nas sementes, como na noz moscada. E a obtenção destes óleos a partir de diferentes órgãos de uma mesma planta pode proporcionar composição química, caracteres físico-químicos e odores distintos (BAKKALI et al., 2008; SIMÕES; SPITZER, 2000).

A caracterização química desses óleos essenciais evidencia mais de sessenta componentes individuais (RUSSO; GALLETI; BOCCHINI, 1998; SENATORE, 1996) e os principais podem constituir até 85% do óleo, considerando que os outros componentes só estão presentes como traço (SENATORE, 1996). Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos

terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre (SIMÕES et al., 2004). Quimicamente, a grande maioria dos óleos voláteis é constituída de derivados de fenilpropanoides ou de terpenoides, sendo que esses últimos preponderam. Os terpenoides são produzidos com maior abundância e mais frequentemente, enquanto os fenilpropanoides são indispensáveis para características flavorizantes e odorizantes dos óleos (SANGWAN et al., 2001).

Na maioria dos casos, há dois ou três componentes que se apresentam em maiores concentrações (20% a 70%) que os outros. Por exemplo, carvacrol (30%) e timol (27%) são os principais componentes do óleo essencial de *Origanum compactum*; linalol (68%) é a principal substância do óleo essencial de *Coriandrum sativum*; em *Mentha piperita* L., mentol (59%) e mentona (19%) são as substâncias em maiores quantidades no óleo essencial correspondente (BAKKALI et al., 2008). No entanto, como a produção metabólica das plantas pode variar muito de acordo com as condições ambientais e fisiológicas (GOBBO-NETTO; LOPES, 2007; SANGWAN et al., 2001), é comum que se avaliem os óleos essenciais com vistas a correlacionar a atividade biológica observada e a sua composição. Procedendo dessa forma, Miceli, Negro e Tommasi (2006) verificaram, dentre outras coisas, que, em óleos essenciais de vários tipos de *Thymbra capitata* coletados no sul da Apulia (Itália), havia uma relação inversa entre a concentração de timol e as de mirceno e terpineno. De forma análoga, Randrianalijaona et al. (2005) observaram variações nos óleos essenciais de *Lantana camara* L. coletada em Madagascar, enquanto Angioni et al. (2006) verificaram variações sazonais nos óleos essenciais de *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas*, coletada no sul da Sardinia (Itália).

Uma das mais poderosas ferramentas para a análise química dos óleos essenciais é a cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria

de massas (CGAR-EM), que permite identificar e quantificar os diversos componentes. Para exemplificar, é possível mencionar o trabalho de Hymete, Rohloff e Iversen (2006), que identificaram 55 componentes no óleo essencial de *Aframomum corrorima* (Braun) P.C.M. Jansen, sendo 1,8-cineol (44,3%), sabineno (17,3%), (*E*)-nerolidol (17,2%) e cariofileno (16,6%) os principais. Já Melkani et al. (2005) verificaram que o óleo essencial de *Elsholtzia strobilifera* Benth., coletada na Índia, possuía mais de 50 constituintes, dentre os quais neral (18,3%) e geranial (29,9%) eram os majoritários. No caso do óleo essencial de *Achillea ligustica*, um total de 82 compostos foi identificado, sendo cânfora (21,3%) borneol (6,2%) e acetato de bornila (3,5%) os majoritários (FILIPPI et al., 2006).

O mercado mundial de óleos essenciais gira em torno de US\$ 1,8 bilhão e a participação do Brasil gira em torno de 0,1% (COSTA, 2008). Os óleos essenciais e seus componentes são utilizados em produtos de perfumaria, higiene pessoal, na agricultura, como conservantes naturais, em analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, espasmolíticos e anestésicos locais, com um mercado em expansão representando um crescimento de 11% ao ano (BIZZO, 2009).

Por serem considerados seguros (Generally Recognized as Safe - GRAS), a aplicação dos óleos essenciais em alimentos tem ganhado importância, devido ao fato de não apenas conferir sabor e aroma, mas também de acrescentar componentes naturais, evitando-se o uso de aditivos químicos, deteriorações, oxidações e o ataque de micro-organismos, e demonstrando eficiência nas funções antioxidantes, antirradicais e antimicrobianas em alimentos (PEREIRA et al., 2006). Essa atividade antimicrobiana é dependente do tipo, da composição e da concentração do óleo essencial, do tipo do micro-organismo em questão, da composição do substrato, do processamento e da condição de estocagem (MARINO; BERSANI; COMI, 2001; ROTA et al., 2008).

O mecanismo de ação desses óleos sobre os fungos ainda não é totalmente esclarecido. 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 ericoelyx* 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*, *Aspergillus* 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.

Em vários estudos tem sido verificada a capacidade e a possibilidade do uso dos óleos essenciais como conservantes naturais. Os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Monodora myristica*, *Ocimum gratissimum*, *Thymus vulgaris* e *Zingiber officinale* (NGUEFACK et al., 2004) e o óleo essencial de *Foeniculum vulgare* (MIMICA-DUKIÉ et al., 2003) foram eficazes no controle de *A. flavus* e na produção de micotoxinas. No mesmo sentido, os óleos essenciais de *Thymus vulgaris* e *Citrus aurantifolia* inibiram tanto o crescimento de *A. parasiticus* como a produção de aflatoxinas. Os óleos essenciais de *Mentha spicata* L., *Foeniculum moleiro*, *Azadirachtindica* A. Juss, *Conium maculatum* e *Artemisia dracunculus* apenas inibiram o crescimento do fungo, enquanto *Carum carvi* L. efetivamente inibiu a produção de aflatoxinas

sem nenhum efeito óbvio sobre o crescimento do fungo. As outras plantas, incluindo *Ferula gummosa*, *Citrus sinensis*, *Mentha longifolia* e *Eucalyptus camaldulensis*, não tiveram efeito sobre o crescimento de *A. parasiticus* e a produção de aflatoxinas em todas as concentrações utilizadas.

Em relação a outras espécies fúngicas, Mishra e Dubey (1994) constataram a atividade fungitóxica do óleo essencial de capim-limão a 1.500 ppm em meio BDA sobre fungos dos gêneros *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* e *Botrytis*. Mishra, Chaturvedi e Tripathi (1995) verificaram que *Fusarium oxysporum* apresentou inibição de seu crescimento micelial quando submetido ao óleo essencial de rizomas de *Nardostachys jatamansi*, na concentração de 1.000 ppm em meio Czapek-dox ágar. O efeito *in vitro* de óleos essenciais dos condimentos de alho (*Allium sativum* L.), canela (*Cinnamomum* spp.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.), em concentrações de 500, 1.000, 1.500 e 2.000 mg/mL e do óleo de cravo (*Caryophyllus aromaticus* L.) nas concentrações de 200, 400, 600 e 800 mg/mL, foi testado sobre o desenvolvimento micelial dos fungos *Rhizopus* sp., *Penicillium* spp., *Eurotium repens* e *Aspergillus niger*. Constatou-se inibição total dos fungos quando se empregou o óleo de canela em qualquer das concentrações. Os óleos de tomilho e alho tiveram o mesmo efeito nas concentrações mais altas, enquanto o de cravo inibiu o desenvolvimento dos fungos a partir da concentração de 600 mg/mL (CHALFOUN et al., 2004).

2.6 Métodos para avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais. Os mais conhecidos incluem o método de difusão em ágar e o método de diluição em caldo.

2.6.1 Métodos de difusão

O teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um micro-organismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do micro-organismo desafiado com a concentração da substância ensaiada (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003). A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de micro-organismos (BARRY; HORNSBERRY, 1991). Como controle positivo, emprega-se um quimioterápico padrão e, como controle negativo, o solvente utilizado para a dissolução dos óleos essenciais (KARAMAN et al., 2003; SPRINGFIELD et al., 2003).

As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana no método de difusão são por meio de disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em ágar (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003), sendo o primeiro mais aplicado para fungos.

Teste de difusão em disco

O teste de difusão em disco é aceito pelo Food and Drug Administration (FDA) e estabelecido como padrão pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (BARRY; THORNSBERRY, 1991). É o método qualitativo comumente utilizado para avaliar a atividade dos óleos essenciais, conhecido também como “zona de inibição”. Zaika (1988) menciona que o método consiste na deposição dos óleos essenciais em discos de papel filtro, usualmente, 0,5 cm de diâmetro, que é, então, plaqueado no centro da placa de Petri contendo o meio de crescimento sólido inoculado com o micro-organismo teste. As placas são incubadas por um período de tempo. A zona de inibição é

medida em mm e corresponde ao halo formado desde a extremidade do filtro de papel disco até a margem onde há de crescimento do micro-organismo. Adicionalmente, Barry e Thornsberry (1991) relatam que a disposição dos discos deve ser tal que sua distância até a lateral da placa seja maior que 15 mm e de modo a não sobrepor as zonas de inibição. O pH do meio de cultura deve estar entre 7,2 e 7,4. Em vários estudos tem sido demonstrado o uso dessa técnica (PIRBALOUTI et al., 2011; ROTA et al., 2008; SOUZA et al., 2005).

2.6.2 Métodos de diluição em caldo

Os testes de diluição em caldo envolvem o contato do fungo estudado com os agentes antimicrobianos em um caldo de cultura. Cada antimicrobiano é testado utilizando-se uma série de concentrações comumente expressas em μL (microlitros) do óleo essencial por mililitro de caldo (i.e., $\mu\text{L}/\text{mL}$). Como controle positivo, utiliza-se o caldo com o quimioterápico padrão com a suspensão padronizada do micro-organismo em teste e, como controle negativo, o meio de cultura com o solvente usado para dissolução da amostra e a suspensão microbiana. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003). As técnicas empregadas neste caso são a macrodiluição e a microdiluição.

O princípio para os testes é o mesmo explicado anteriormente. A única diferença é o volume de caldo utilizado para as provas onde o teste é realizado.

Para a macrodiluição, preparam-se vários tubos de ensaio com meio caldo (1 a 10 mL), aos quais são acrescentadas diversas concentrações dos agentes antimicrobianos. A seguir, os tubos são inoculados com uma suspensão padrão do organismo a ser testado. Após incubação *overnight*, a 35 °C, examinam-se os testes e determina-se a concentração mínima inibitória (CIM),

que pode ser detectada a “olho nu” ou por meio de aparelhos baseados em leitura óptica.

A técnica de microdiluição em caldo é uma adaptação da macrodiluição em caldo. É denominada microdiluição porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo (0,05 ou 0,1 mL) colocados em placas de 80, 96 ou mais poços de fundo redondo ou cônico estéreis, próprias para microdiluição. As placas de microdiluição inoculadas devem ser incubadas, a 35 °C, por 16-24 horas, com, no máximo, quatro placas em cada pilha, a fim de manter a mesma temperatura de incubação para todas as culturas (CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI, 2008).

Trata-se de um método importante por prover tanto os resultados quantitativos (CIM) quanto os qualitativos (classificando a cepa em resistente, intermediário ou sensível) (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS, 2002). Estudos têm demonstrado o uso desse método, principalmente para testes antibacterianos e leveduras (MENEZES et al., 2009; POZZO et al., 2011).

Entretanto, tem sido demonstrado também que estes métodos apresentam limitações para aplicação com óleos essenciais. O método de difusão em ágar é limitado a micro-organismos de rápido crescimento, aeróbios ou aeróbio facultativos (OSTROSKY et al., 2008). Outra questão é a distribuição desigual dos componentes lipofílicos dos óleos essenciais, que resulta em concentrações não uniformes do óleo essencial no Ágar, causando a formação de regiões com diferentes atividades antimicrobianas que podem levar a interpretações equivocadas (LAMBERT et al., 2001; SUHR; NIELSEN, 2003). Ostrosky et al. (2008) também relatam que, no método de difusão em ágar, a atividade antimicrobiana do óleo pode ser influenciada pelo meio de cultura (concentração do ágar e origem), o pH, a disponibilidade de oxigênio, a quantidade de inóculo e as condições de incubação.

Na diluição em caldo, nos ensaios com óleos essenciais, deve-se considerar que os óleos são voláteis, insolúveis em água, viscosos e complexos. Podem ocasionar a formação de uma suspensão turva que impede a determinação visual da eficácia antimicrobiana do óleo, devido à interferência da dissolução insuficiente dos componentes testados (HOOD; WILKINSON; CAVANAGH, 2003). Além disso, os testes podem ser influenciados pela sensibilidade do organismo, o diluente utilizado, o estágio e a taxa de crescimento microbiano.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A caracterização e a identificação de fungos deterioradores de alimentos são essenciais para o controle da contaminação por estes micro-organismos e a possível presença de micotoxinas.

O uso da abordagem polifásica, incluindo características fenotípicas, perfil micotoxigênico, análise molecular e espectral por MALDI-TOF MS, é necessário e indispensável para a caracterização de uma espécie. Além disso, é importante ressaltar que nenhuma das análises realizadas pode ser super ou subestimada.

A exploração de isolados atoxigênicos e a atividade biológica dos compostos secundários presentes nos óleos essenciais de plantas podem se constituir em modalidades potenciais de controle. Entretanto, a otimização da aplicabilidade desses conservantes precisa ser estudada detalhadamente.

Dessa forma, a caracterização de fungos deterioradores e/ou toxigênicos em alimentos, associada a técnicas de controle, é essencial para a garantia da segurança alimentar.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 46, p. 66, 9 mar. 2011. Seção 1.

ANGIONI, A. et al. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 12, p. 4364-4370, June 2006.

ARAÚJO, R. de C. Z. **Embalagens ativas com ervas aromáticas e condimentares na conservação de pães artesanais**. 2005. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

ASPLIN, F. D.; CARNAGHAN, R. B. A. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with especial reference to their affect on ducklings and chickens. **Veterinary Record**, London, v. 73, n. 46, p. 1215-1218, 1961.

BAKKALI, F. et al. Biological effected of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Apr. 2008.

BALDISSERA, M. A. et al. Aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona em alimentos para consumo animal no sul do Brasil: parte II. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 53, n. 42, p. 6-9, 1993.

BARROS, G. G. et al. Molecular characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolates collected from peanut fields in Argentina using AFLPs. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 4, p. 900-909, 2007.

BARRY, L. A.; THORNSBERRY, C. Susceptibility test: diffusion test procedures. In: BALLOWS, A. et al. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. Washington: ASM, 1991. p. 1117-1125.

BATISTA, P. P. et al. Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 3, p. 706-717, 2008.

BENNET, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. (Ed.). *Aspergillus: molecular biology and genomics*. Caister: Academic, 2010. p. 235-238.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497-516, June 2003.

BILIA, A. R. et al. GC-MS analysis of essential oil of some commercial Fennel teas. **Food Chemistry**, London, v. 76, n. 3, p. 307-310, Mar. 2002.

BIZZO, H. R. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, maio/jun. 2009.

BRYDEN, W. L. Mycotoxins in the food chain: human health implications. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, Victoria, v. 16, n. 1, p. 95-101, 2007.

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, Sept. 2004.

CARDOSO, M. G. et al. **Metabólitos secundários vegetais: visão geral química e medicinal**. Lavras: UFLA, 2001. 81 p.

_____. **Plantas aromáticas e condimentares**. Lavras: UFLA, 2003. 78 p. (Boletim Técnico, 62).

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. **Plantas medicinais: condimentares e aromáticas**. Guairá: Agropecuária, 1995. 194 p.

CHALFOUN, S. M. et al. Effect of powdered spice treatments growth, sporulation and production of aflatoxin by toxigenic fungi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 856-862, jul./ago. 2004.

CHANG, P. K.; EHRLICH, K. C.; HUA, S. S. T. Cladal relatedness among *Aspergillus oryzae* isolates and *Aspergillus flavus* S and L morphotype isolates. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 172-177, June 2006.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M38-A2**: reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi approved standard. Wayne, 2008. Disponível em: <<http://www.clsi.org/>>. Acesso em: 10 nov. 2011.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Curitiba: EMATER, 1991. 151 p.

COSTA, A. G. **Desenvolvimento vegetativo, rendimento, composição do óleo essencial de Patchouli após a adubação nitrogenada**. 2008. 92 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

COTTY, P. J. Virulence and cultural characteristic of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 7, p. 808-814, Sept. 1989.

DAVID, E. F. S.; BOARO, C. S. F.; MARQUES, M. O. M. Rendimento e composição do óleo essencial de *Mentha piperita* L., cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de fósforo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 183-188, 2006.

DENNING, D. W. et al. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature and review. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 37, n. 3, p. 265-280, June 2003.

DRAGAN, Y. P.; PITOT, H. C. Aflatoxin carcinogenesis in the context of the multistage nature of cancer. In: EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. (Ed.). **The toxicology of aflatoxins**. London: Academic, 1994. p. 179-206.

DURAVERA, N. et al. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 25, n. 5, p. 417-440, 2006.

EGEL, R. Mapping of additional markers in fission yeast, especially fus1 and three mfm genes. **Current Genetics**, New York, v. 26, n. 2, p. 187-189, Aug. 1994.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em microrganismos isolados do meio ambiente. **Boletim CEPPA**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 193-206, 2007.

FEDOROVA, N. D. et al. Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 4, n. 4, p. 146-151, 2008.

FENSELAU, C.; DEMIREV, P. A. Characterization of intact microorganisms by maldi mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 20, n. 4, p. 157-171, 2001.

FERNANDES, J. M. **Plantas medicinais de Alta Floresta**: com contribuição a etnobotânica. Alta Floresta: Liderança, 2002. 62 p.

FILIPPI, J. et al. Composition, enantiomeric distribution, and antibacterial activity of the essential oil of *Achillea ligustica* All. from Corsica. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 17, p. 6308-6313, Sept. 2006.

FRISVAD, J. C. The use of high-performance liquid chromatography and diode array detection in fungal chemotaxonomy based on profiles of secondary metabolites. **Botanical Journal Linnean Society**, London, v. 99, n. 1, p. 81-95, 1989.

FRISVAD, J. C.; SKOUBOE, P.; SAMSON, R. A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-Omethylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, n. 5, p. 442-453, May 2005.

FURLAN, M. R. **Ervas e temperos**: cultivo e comercialização. Cuiabá: SEBRAE/MT, 1998. 128 p.

GALAGAN, J. E. et al. Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 15, n. 12, p. 1620-1631, Dec. 2005.

GANGWAR, M. et al. Application of fluorescent probes to study structural changes in *Aspergillus fumigatus* exposed to amphotericin B, itraconazole, and voriconazole. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 162, n. 4, p. 103-109, Aug. 2006.

GEISER, D. M. et al. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 59, n. 1, p. 1-10, Jan. 2007.

_____. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 31, n. 3, p. 169-179, Mar. 2000.

GEISER, D. M.; PITT, J. I.; TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v. 95, n. 1, p. 388-393, 1998.

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

GODET, M.; MUNAUT, F. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 304, n. 2, p. 157-168, Feb. 2010.

GONÇALVES, S. S. et al. *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section *Flavi*. **Medical Mycology**, Oxford, v. 50, n. 4, p. 152-160, 2012.

GOTO, T.; WICKLOW, D. T.; ITO, Y. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a Sclerotium-producing *Aspergillus tamaris* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 11, p. 4036-4038, Nov. 1996.

HEDAYATI, M. T. et al. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, New York, v. 153, n. 6, p. 1677-1692, June 2007.

HETTICK, J. M. et al. Discrimination of *Aspergillus* isolates at the species and strain level by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 380, n. 2, p. 276-281, Feb. 2008.

HONG, S. B. et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 6, p. 1316-1329, 2005.

HOOD, J. R.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 15, n. 6, p. 428-433, Dec. 2003.

HORN, B. W. *Aspergillus caelatus*, a new species in section *Flavi*. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 56, n. 2, p. 185-191, 1997.

HORN, B. W. et al. Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii*. **Mycologia**, New York, v. 88, n. 4, p. 574-587, Aug. 1996.

HORN, B. W.; GREENE, R. L.; DORNER, J. W. Effect of corn and peanut cultivation on soil populations of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in southwestern Georgia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 7, p. 2472-2475, July 1995.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Limerick, v. 167, n. 2, p. 101-134, Feb. 2001.

HYMETE, A.; ROHLOFF, J.; IVERSEN, T. Essential oil from seeds and husks of *Aframomum corrorima* from Ethiopia. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 21, n. 4, p. 642-644, Aug. 2006.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Essential oils: nomenclature**. Geneva, 2009. 26 p.

ITO, Y. et al. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 2, p. 233-239, Apr. 2001.

JOHNSSON, P. et al. Growth of aflatoxigenic moulds and aflatoxin formation in Brazil nuts. **World Mycotoxin Journal**, Wageningen, v. 1, n. 2, p. 127-137, June 2008.

KALLOW, W. et al. Microbial strain characterisation by MALDI-TOF MS possibilities and limits. In: ANNUAL GENERAL MEETING OF THE EUROPEAN CULTURE COLLECTIONS' ORGANISATION, 10., 2006, Budapest. **Proceedings...** Budapest: Corvinus University of Budapest, 2006. p. 146-159.

KARAMAN, İ. 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, 2003.

KELLER, B. O. et al. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 627, n. 1, p. 71-81, Mar. 2008.

KEMPTNER, J. et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) preparation techniques for surface characterization of intact *Fusarium* spores by MALDI linear time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 23, n. 6, p. 877-884, June 2009.

KLICH, M. A. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 48, n. 4, p. 1-80, 2007.

_____. **Identification of common *Aspergillus* species**. Wageningen: CBS, 2002. 510 p.

KLICH, M. A.; PITT, J. L. Differentiation of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* and other closely related species. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 91, n. 1, p. 99-108, Apr. 1988.

KNUDSEN, J. T.; GERSHENZON, J. The chemistry diversity of floral scent. In: DURADEVA, N.; PICHERSKY, E. (Ed.). **Biology of floral scent**. Boca Raton: CRC, 2006. p. 27-52.

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products. **Mycological Papers**, Geneva, n. 161, p. 1-188, 1989.

KUMEDA, Y.; ASAO, T. Heteroduplex panel analysis, a novel method for genetic identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 9, p. 4084-4090, Sept. 2001.

KURTZMAN, C. P.; HORN, B. W.; HESSELTINE, C. W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 53, n. 3, p. 147-158, 1987.

KWIATKOWSKI, A.; ALVES, A. P. F. Importância da detecção e do controle de aflatoxinas em alimentos. **SaBios - Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 2, n. 2, p. 45-54, 2007.

LABUDA, R.; TANČINOVÁ, D. Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenicity. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Lublin, v. 13, n. 2, p. 193-200, June 2006.

LAMBERT, R. J. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal Applied of Microbiology**, Washington, v. 91, n. 3, p. 453-462, Mar. 2001.

LARSEN, T. et al. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. **Natural Product Reports**, London, v. 22, n. 6, p. 675-695, Dec. 2005.

LASS-FLÖRL, C. et al. Studies of in vitro activities of voriconazole and itraconazole against *Aspergillus* hyphae using viability staining. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 45, n. 1, p. 124-128, Mar. 2001.

LI, D. M. et al. Three new *Aspergillus* species isolated from clinical sources as a causal agent of human aspergillosis. **Mycoscience**, Tokyo, v. 39, n. 3, p. 299-305, June 1998.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 512 p.

_____. _____. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 521 p.

LUZ, C. A. S. Aflatoxina: esse mal tem cura. **Cultivar**, Pelotas, v. 3, n. 33, p. 30-31, 2001.

MACHIDA, M. et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, London, v. 438, n. 7071, p. 1157-1161, 2005.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 3, p. 131-139, Mar. 2007.

MAIA, P. P.; SIQUEIRA, M. E. B. P. Aflatoxinas em rações destinadas a cães, gatos e pássaros: uma revisão. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 14, n. 1, p. 235-257, 2007.

MAIER, T.; KOSTRZEWA, M. Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. **Chemistry Today**, Milano, v. 25, n. 2, p. 68-71, 2007.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, n. 3, p. 187-195, Mar. 2001.

MARTINS, L. M.; MARTINS, H. M. Aflatoxin M1 in yoghurts in Portugal. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 91, n. 3, p. 315-317, Mar. 2004.

MARVIN, L. F.; ROBERTS, M. A.; FAY, L. B. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 337, n. 4, p. 11-21, Apr. 2003.

MELKANI, A. B. et al. Constituents of the essential oil of a new chemotype of *Elsholtzia strobilifera* Benth. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 419-425, Apr. 2005.

MENEZES, T. O. de A. et al. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extractos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 38, n. 3, p. 184-191, 2009.

MICELI, A.; NEGRO, C.; TOMMASI, L. Essential oil variability in *Thymbra capitata* (L.) Cav. growing wild in Southern Apulia (Italy). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 34, n. 4, p. 528-535, Aug. 2006.

MILLARD, P. J. et al. Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 7, p. 2897-2905, July 1997.

MIMICA-DUKIĆ, N. et al. Essential oils composition and antifungal activity of *F. vulgare* Mill. obtained by different distillation conditions. **Phytotherapy Research**, London, v. 17, n. 4, p. 368-371, Aug. 2003.

MISHRA, D.; CHATURVEDI, R. D.; TRIPATHI, S. C. The fungitoxic effect of the essential oil of the herb *Nardostachys jatamansi* DC. **Tropical Agriculture**, Surrey, v. 72, n. 1, p. 48-52, 1995.

MISHRA, D.; DUBEY, N. K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 4, p. 1101-1105, Aug. 1994.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **M27-a2**: reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard. Wayne, 2002. Disponível em: <<http://www.nccls.org>>. Acesso em: 12 nov. 2011.

NGUEFACK, J. et al. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 329-334, June 2004.

NIERMAN, W. C. et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, London, v. 438, n. 7071, p. 1151-1156, 2005.

OLIVEIRA, C. A. F. et al. Ocorrência simultânea de aflatoxina e ácido ciclopiazônico em rações para vacas leiteiras. **Revista Analytica**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 24, p. 56-58, 2006.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 4, p. 417-424, 1997.

OLSEN, M. et al. *Aspergillus nomius*, an importante aflatoxin producer in Brazil nuts? **World Mycotoxin Journal**, Wageningen, v. 1, n. 2, p. 123-126, 2008.

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

OSWEILER, G. **Diagnostic mycotoxin assays for at the ISU veterinary diagnostic laboratory**. Ames: Iowa State University, 2005. 4 p.

PATERSON, R. R. M. Fungal enzyme inhibitors as pharmaceuticals, toxins, and scourge of PCR. **Current Enzyme Inhibition**, Hilversum, v. 4, n. 1, p. 46-59, Mar. 2008.

- PAYNE, G. A. et al. Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. **Medical Mycology**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 9-11, Feb. 2006.
- PEREIRA, M. C. et al. Inhibition fungi growth through of utilization essential oils of spice. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 731-738, jul./ago. 2006.
- PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus Flavus* e *Aspergillus Parasiticus*. **Boletim CEP-PA**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 141-156, 2002.
- PETERSON, S. W. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. **Mycologia**, New York, v. 100, n. 2, p. 205-226, Feb. 2008.
- _____. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Ed.). **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Amsterdam: Harwood Academic, 2000. p. 323-355.
- PETERSON, S. W. et al. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. **Mycologia**, New York, v. 93, n. 4, p. 689-703, Apr. 2001.
- PILDAIN, M. B. et al. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 3, p. 725-735, June 2008.
- PINA-VAZ, C. et al. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 73-78, 2004.
- PINTO, E. et al. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 58, n. 11, p. 1454-1462, Nov. 2009.
- PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325 p.

PIRBALOUTI, A. et al. Antifungal activity of the essential oil of Iranian medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, Victoria, v. 5, n. 20, p. 5089-5093, Oct. 2011.

POZZO, M. D. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 4, p. 667-672, abr. 2011.

PRADO, G. et al. Teste preliminar de resistência de genótipo de amendoim 2117 e Tatu Vermelho, com relação à produção de aflatoxina B1 por uma espécie toxigênica de *Aspergillus flavus* Link. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 56, n. 2, p. 71, 1996.

RANDRIANALJAONA, J. et al. Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L. essential oils from Madagascar. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 545, n. 1, p. 46-52, Jan. 2005.

RAPER, K. B.; FENNEL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams & Wilkins, 1965. 686 p.

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**, Guildford, v. 17, n. 5, p. 359-364, May 2006.

RIGÓ, K. et al. Evolutionary relationships within *Aspergillus* section *Flavi* based on sequences of the intergenic transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. **Journal of General Applied Microbiology**, Tokyo, v. 48, n. 1, p. 9-16, Jan. 2002.

RODRIGUES, P. et al. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 187-193, June 2009.

_____. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 111, n. 4, p. 877-892, Aug. 2011.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Occurrence of mycotoxins and mycotoxin-producing fungi in Latin America. In: KOE, W. J. et al. (Ed.). **Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millenium**. Wageningen: W. J. Dekoe, 2001. p. 309-320.

ROKAS, A. et al. What can comparative genomics tell us about species concepts in the genus *Aspergillus*? **Studies in Mycology**, Berlin, v. 59, n. 1, p. 11-17, Jan. 2007.

ROTA, M. C. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 7, p. 681-687, July 2008.

ROZWALKA, L. C. et al. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 301-307, mar./abr. 2008.

RUSSO, M.; GALLETI, G. C.; BOCCHINI, P. Carnacini A. essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum* (Link) Ietswaart): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis: 1., inflorescences. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Easton, v. 46, n. 9, p. 3741-3746, Sept. 1998.

SAITO, M.; TSURUTA, O. A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxins productivity. **Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology**, Tokyo, v. 37, n. 1, p. 31-36, 1993.

SALGADO, A. P. S. P. **Efeito da luz na planta e no óleo essencial de tomilho (*thymus vulgaris*)**. 2005. 48 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

SAMSON, R. A. et al. Identification of the common food and airborne fungi, *Aspergillus*. In: _____. **Introduction to food and airborne fungi**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmekultures, 2000. p. 64-97.

_____. Methods for the detection, isolation and characterisation of food-borne fungi. In: SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. (Ed.). **Introduction to food and airborne fungi**. 7th ed. Wageningen: CBS, 2004. p. 283-305.

_____. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 59, n. 1, p. 147-207, Jan. 2007.

SAMSON, R. A.; HONG, S. B.; FRISVAD, J. C. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. **Medical Mycology**, Oxford, v. 44, n. 1, p. S133-S148, 2006. Supplement.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. Molecular systematics of *Aspergillus* and its teleomorphs. In: MASHIDA, M.; GOMI, K. (Ed.). ***Aspergillus: molecular biology and genomics***. London: Caister Academic, 2010. p. 19-40.

_____. What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 13-20, Jan. 2009.

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

SANTOS, C. et al. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 2, p. 375-385, Feb. 2010.

SANTURIO, J. M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 803-808, maio/jun. 2007.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 275-280, Aug. 2004.

SCHILCHER, H. Quality requirements and quality standards for medicinal, aromatic and spices plants. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 249, n. 1, p. 33-44, 1989.

SENATORE, F. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania, Southern Italy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 5, p. 1327-1332, May 1996.

SHEPHARD, G. S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 25, n. 2, p. 146-151, 2008.

SILVA, M. T. N. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 257-262, 2009.

SILVESTRINI, A. et al. **A cultura do gengibre**. Curitiba: EMATER/PR, 1996.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 1102 p.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2000. p. 387-416.

SKANDAMIS, P. et al. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *E.coli* 0157:H7. **Italian Journal of Food Science**, Pinerolo, v. 13, n. 1, p. 55-65, 2001.

SOARES, C. et al. Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. **Mycologia**, New York, 2011. In press.

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

SOUZA, E. L. et al. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Londrina, v. 48, n. 2, p. 245-250, 2005.

SPRINGFIELD, E. P. et al. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**, Jena, v. 10, n. 5, p. 434-439, Sept. 2003.

STOECKLI, E. RNAi in avian embryos. In: HANNON, G. J. (Ed.). **RNA: a guide to gene silencing**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 2003. p. 297-312.

SUHR, K. I.; NIELSEN, P. V. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 4, p. 665-674, Apr. 2003.

SULC, M. et al. Biomarkers of *Aspergillus* spores: strain typing and protein identification. **International Journal Mass Spectrometry**, London, v. 280, n. 1/3, p. 162-168, 2008.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 175, n. 2, p. 149-163, June 1999.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 9, p. 1199-1218, Sept. 2010.

TANAKA, K. et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 2, n. 8, p. 151-153, Aug. 1988.

TAVISH, H. M.; HARRIS, D. **An economic study of essential oil production in the UK: a case study comparing non-UK lavender/lavandin production and peppermint/spearmint production with UK production techniques and costs.** Edinburgh: Government Industry, 2002.

TAYLOR, J. W. et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 31, n. 1, p. 21-32, Feb. 2000.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium compêndio de fitoterapia.** 3. ed. Curitiba: UFPR, 1997. 317 p.

THANABORIPAT, D. **Mycotoxins: occurrence and control in foods.** Bangkok: Sovereign, 2005. 133 p.

TRAJANO, V. N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

VARGA, J. et al. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 41, n. 1, p. 29-36, Jan. 2003.

WILLIAMS, J. H. et al. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **American Society for Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 80, n. 5, p. 1106-1122, May 2004.

YU, J. et al. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 22, n. 4, p. 194-202, 2005.

ZAIKA, L. L. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v. 9, n. 2, p. 97-118, 1988.

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, Feb. 2004.

ZENEDINE, A. et al. Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 25-29, Mar. 2007.

ZUZARTE, M. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér. **Journal of Medical Microbiology**, London, 2012. In press.

SEGUNDA PARTE**ARTIGO 1****Use of polyphasic approach for identification of strains of *Aspergillus*
section *Flavi* isolated from food commodities****Normas da Revista Food Microbiology (Versão Preliminar)**

Fernanda Chaves da Silva ^{a, d}, Sara Maria Chalfoun ^{b*}, Luís Roberto Batista ^c,
Cledir Santos ^d, Nelson Lima ^d

^a Departamento de Biologia, Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil.

^b Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, EPAMIG, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil.

^c Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil.

^d IBB-Centre of Biological Engineering, Universidade do Minho, Braga, Portugal.

*Correspondence:

Sara Maria Chalfoun, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, EPAMIG, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil.

E-mail address: chaulfon@epamig.ufla.br

Tel: +35 38291190; Fax: +35 38216244

ABSTRACT

The present work aim to identify fungi of genus *Aspergillus* section *Flavi* by combining various classic phenotypic and genotypic methods as well as the novel approach based on spectral analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Thirty-five isolated from different food commodities were characterized in terms of macro- and micro-morphologies, mycotoxin pattern and MALDI-TOF MS protein fingerprint spectra. Three isolates were further analysed using the ITS region and calmodulin gene sequences. Dendrograms were created and results were compared. The data obtained from the phenotypic and spectral analyses divide the isolates into three groups, corresponding to taxa closely related to *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus tamarii*. Molecular and spectral analyses were not able to distinguish the isolate 32. This result demonstrates that in a polyphasic approach none of the methods must be underestimated and that the identification of a species should consider all characteristics analyzed.

Keywords: *Aspergillus*, food mycology, food safety, polyphasic taxonomy.

1. Introduction

The genus *Aspergillus* is one of the most important micro-fungi in industry, agriculture, and public health. Approximately more than 180 species are widely distributed in the world. Additionally, some of the most important micro-organisms used in food fermentations, enzyme production and in industrial bioprocesses are part of this genus. Inside this genus, the section *Flavi* includes six economically important species that are very closely related morphological and phylogenetically, and which are often separated into two groups on the basis of their impact on food or human health (Godet and Munaut, 2010). The first group includes *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius* species that are aflatoxin producers, and the second group comprises the *A. oryzae*, *A. sojae* and *A. tamarii* species which are used in the fermenting process in some Asian countries (Kumeda and Asao, 2001; Hedayati et al., 2007).

The identification of *Aspergillus* section *Flavi* has been traditionally based on morphological and biochemical characterization (Raper and Fennel, 1965; Samson et al., 2000). Macro-morphological features which are considered include conidial and mycelial colour, colony diameter, colony reverse colour, production of exudates and soluble pigments, presence of sclerotia and cleistothecia. Micro-morphology characterization is mainly dependent on seriation, shape and size of vesicle, conidia and stipe morphology, presence of Hülle cells, and morphology of cleistothecia and ascospores (Klick, 2002). *Aspergillus flavus* has been considered to produce aflatoxins B (AFBs) and cyclopiazonic acid (CPA). However, has not been associated with production aflatoxins G (AFGs). *A. parasiticus* produces aflatoxin G1 and G2, in addition to B1 and B2, but not cyclopiazonic acid (Bennett and Klich, 2003; Yu, 2004). Aflatoxins are produced by some other species in *Aspergillus flavus* complex, including *A. toxicarius*, *A. nomius*, *A. bombycis* and *A. pseudotamarii* also produces cyclopiazonic acid. *Aspergillus oryzae* has long been used in the Orient

to prepare various kind of food products; it can produce cyclopiazonic acid and β -nitropropionic acid, but does not produce aflatoxin. *Aspergillus oryzae*, *A. parasiticus*, *A. sojae*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. tamarii*, *A. caelatus* and *A. pseudotamarii* may produce kojic acid (Varga et al., 2003).

Over the last years molecular methods have been widely applied in the identification of a large number of *Aspergillus* species (Batista et al., 2008). Molecular characters provide the greatest number of variable characters for fungal taxonomy. They can be generated using a widely variable technologies. These that technologies come with an extremely well-developed bioinformatics infrastructure that allow worldwide communication and comparison of results, and they produce results that generally correlate with reproductive barriers and physiological differences. This utility ensures that molecular characters will have a primary role in recognizing fungal taxa (Geiser, 2007). However, even with the high level of sensitivity and resolution of molecular methods usually show, some problems still arise within section *Flavi*. It comes from the high level of genetic similarity that some of the species share (Rodrigues et al., 2011).

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) emerged in the late 1980s as a sound technique to investigate the mass spectrometry of molecular high-mass of organic compounds through a soft ionization of molecules resulting in minimum fragmentation (Tanaka et al., 1988). Currently, this method has been used to analyse the protein composition of complex mixtures, i.e., biological fluids or tissues, as well as of microbial cells or cell components (Fenselau and Demirev, 2001; Maier and Kostrzewa, 2007; Rodrigues et al., 2011). The whole process is reviewed and described in detail by Santos et al. (2010). Schmidt and Kallow (2005) differentiated mycelia within pairs each of the closely related indoor wood decay fungi *Serpula lacrymans*, *S. himantioides*, *Coniophoraputena*, *C. marmorata*, and *Antrodia vaillantii*, *A. sinuosa* using MALDI-TOF MS. Sulc et

al. (2009) used the spectral approach based on MALDI-TOF MS for direct analysis of intact spores of the fungi *Aspergillus*. Authors found that the MALDI-TOF MS has the ability to differentiate species within the same genus. These studies report the high potential of the technique for identification of fungi.

The objective of this study was to use polyphasic approach to identify species belonging to the section *Flavi* isolated from different food commodities.

2. Material and Methods

2.1 Fungal isolates and culture conditions

Thirty isolates of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from food products (coffee, maize, peanuts, rice and cereal bar snack) obtained the EcoCentro Mycological Collection the Agricultural and Livestock Minas Gerais State Research Institution - EPAMIG, Lavras/MG, Brazil, were used in this study as field isolates designated with the code CMecoCentro 000nn, where nn is the isolate number. Five isolates of the Mycology and Mycotoxins Laboratory of the Department of Food Sciences, Federal University of Lavras (Lavras, MG), were included in the study (Table 1). Reference strains *A. flavus* MUM 92.01 (NRRL6412), *A. parasiticus* MUM 92.02 (NRRL3386), *A. oryzae* MUM 98.04 (NRRL3484), *A. tamarii* MUM 92.03 (NRRL 427) and *A. sojae* MUM 10.241 (CBS 100928) from Micoteca da Universidade do Minho culture collection were used as controls.

All isolates were maintained in tubes with Potato Dextrose Agar (PDA: 4g/L potato extract, glucose 20g/L, agar 15g/L) at 4 °C and grown on Malt Extract Agar (MEA: malt 20 g/L, glucose 20 g/L, peptone 1 g/L, agar 20 g/L) .

2.2 Morphological characterisation

For each isolate, suspensions of spores in 1 mL of 0.2% agar, was used for three-point inoculations on 9 cm diameter Petri dishes containing 20 mL of

MEA, CYA (sucrose 30 g/L, powdered yeast extract 5 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, NaNO₃ 2 g/L, KCl 0.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.01 g/L, CuSO₄·5H₂O 0.005 g/L, agar 20 g/L), CY20S (sucrose 200 g/L, yeast extract 5 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, Czapek concentrate 10 mL, trace metals solution 1 mL, agar 15 g/L) and CZ (sucrose 30 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, NaNO₃ 2g/L, KCl 0.5g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.01 g/L, CuSO₄·5H₂O 0.005 g/L, agar 20 g/L). Cultures were incubated for 7 days, in the dark, at 25°C for culture media MEA, CYA and CY20S, 37°C for CYA and 42°C for CZ and then analysed for colony colour, presence of sclerotia, head seriation and conidia ornamentation. Identification followed the taxonomic keys and guides available for the *Aspergillus* genus (Klich, 2002; Samson et al., 2004). All isolates were cultured on *A. flavus* and *A. parasiticus* Agar (AFPA; Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) for 3 to 5 days at 25 °C, in the dark, to confirm group identification by colony reverse colour.

2.3 Mycotoxigenic ability of the isolates

Aflatoxins detection: All strains were tested for aflatoxin production in aflatoxin-inducing Yeast Extract Sucrose medium (YES: yeast extract 20 g/L, sucrose 150 g/L, agar 15 g/L). The isolates were inoculated on 6 cm diameter plates and incubated at 25°C for 7 days, in the dark. Then the methodology of Bragulat et al. (2001) was employed: briefly, 3 agar plugs were removed from one colony, and placed into a 4 mL vial, where 2 mL of methanol was added. After 60 min, the extract was filtered by 0.45 µm filters and analysed by HPLC.

Samples were analysed using a HPLC equipped with a Jasco FP-920 fluorescence detector (365 nm excitation wavelength; 435 nm emission wavelength), using a photochemical post-column derivatization reactor (PHRED unit — Aura Industries, USA). Chromatographic separations were performed on a reverse phase C18 column (Waters Spherisorb ODS2, 4.6mm×250mm, 5 µm), fitted with a pre-column with the same stationary phase. The mobile phase used

was pumped at 1.0 mL/min and consisted of an isocratic programme as follows: water: acetonitrile:methanol (3:1:1, v/v/v). The injection volume was 50 μ L.

Aflatoxins standard was supplied by R-Biopharm Rhône LTD. A mix of aflatoxins, containing 1 μ g/mL of AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2 was used. Samples were taken as positive for each of the toxins when yielding a peak at a retention time similar to each standard, with a height five times higher than the baseline noise.

Cyclopiazonic acid detection: The isolates were tested for cyclopiazonic acid in Czapek Yeast Autolysate medium (CYA: sucrose 30 g/L, powdered yeast extract 5 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $NaNO_3$ 2 g/L, KCl 0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.005 g/L, agar 20 g/L). All strains were inoculated on 6 cm diameter plates and incubated at 25 °C for 14 days, in the dark (Gqaleni et al., 1997). Then, the methodology of Bragulat et al. (2001) was employed, as already described above.

Samples were analysed using a HPLC equipped with a Varian 2050UV detector (285 nm). Chromatographic separations were performed on a EuroSpher 100 NH2 column (Knauer, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), fitted with a precolumn with the same stationary phase. The mobile phase used was pumped at 1.0 mL/min and consisted of an isocratic programme as follows: acetonitrile:50mM ammonium acetate (3:1, v/v), pH 5. The injection volume was 50 μ L.

Cyclopiazonic acid standard was supplied by Sigma (St. Louis, MO, USA). Samples were taken as positive when yielding a peak at a retention time similar to the CPA standard, with a height five times higher than the baseline noise.

2.4 Data analysis

A dendrogram of phenotypic relatedness was constructed. The characteristics analysed were: head seriation, colony colour on CYA; conidia

ornamentation, reverse colour on AFPA, AFBs, AFGs and CPA production. The analysis was made using the hierarchical clustering with the Complete Linkage method and was performed with the statistical package SPSS version 16.0.

2.5 Spectral analysis by MALDI-TOF MS

Growth conditions: For the analysis of the *Aspergillus* isolates, a small number of spores were transferred from 7-day-old cultures to 6 cm MEA plates. Cultures were incubated in the dark for 3 days at 25 °C. *Escherichia coli* DH5 α was used as external calibrante and was obtained from MUM. *Escherichia coli* DH5 α cells were grown on Luria–Bertani medium agar (LB; 10 g/l bacto-tryptone, 5 g/l bactoyeast extract, 10 g/l NaCl) at 30 °C for 20 h.

Flex target plate preparation: Approximately 50 μ g of spores and young mycelium of each micro-organism were transferred directly from the culture plate to the 48-well MALDI-TOF plate. Immediately, 1 μ L of matrix solution [75 mg/mL 2, 5-dihydroxybenzoic acid in ethanol/water/acetonitrile (1:1:1) with 0.03% trifluoroacetic acid] was added to the samples and mixed gently. The sample mixtures were air dried at room temperature. Each sample was spotted in duplicate to test reproducibility. During the analyses, all solutions were prepared and stored at +5 °C.

Data acquisition: The analyses were performed in the Laboratory of Mycology of Centre of Biological Engineering on an Axima LNR system (Kratos Analytical; Shimadzu, Manchester, UK) equipped with a nitrogen laser (337 nm), where the laser intensity was set just above the threshold for ion production. The mass range from $m/z = 2$ –20 Da was recorded using the linear mode with a delay of 104 ns and using an acceleration voltage of +20 kV. Final spectra were generated by summing 20 laser shots accumulated per profile and 50 profiles produced per sample, leading to a total of up to 1000 laser shots per summed spectrum. The resulting peak lists were exported to the SARAMISTM software package (Spectral Archiving and Microbial Identification System;

AnagnosTec, Postdam-Golm, Germany). In SARAMISTM database, peak lists of individual samples were compared to SuperSpectra and/or reference spectra. It generated a ranked list of matching SuperSpectra and reference spectra. For both SuperSpectra and reference spectra, SARAMISTM uses a point system based on peak list with mass signals weighed according to their specificity. The weighting is based on empirical data from multiple samples of type, reference and well-characterized strains. SuperSpectra are consensus spectra containing a pattern of mass signals which are specific for individual microbial taxa and allow the identification of specimens as well as cluster analyses of spectra of multiple samples. Reference spectra are individual empiric spectra of undoubtedly identified species isolates. For both cases, the similarity between individual spectra is expressed as relative or absolute number of matching mass signals after subjecting the data to a single link agglomerative clustering algorithm. Dendrograms of spectral proximity between isolates were created.

Isolates tested: Forty-three isolates were included in this analysis. Eight of these isolates correspond to type strains or reference strains for the most significant species: *A. flavus* (MUM 92.01), *A. parasiticus* (MUM 92.02), *A. tamari* (MUM 08.119), *A. sojae* (MUM 100.928), *A. oryzae* (MUM 100.925), *A. mottae* (MUM 10.231), *A. sergii* (MUM 10.219), *A. transmontanensis* (MUM 10.214).

The remaining isolates were field isolates selected on a way that they would be representative of all phenotypes identified, with major incidence on those phenotypes that could not be assigned to any known species.

2.6 Molecular identification

Isolates tested: The isolates 18, 7 and 32 were submitted to molecular analysis.

DNA extraction and amplification: DNA extraction followed the protocol described by Rodrigues et al. (2009). Two regions of the genome were

analysed, namely the ITS region of the rRNA gene and partial calmodulin gene, to determine which was more informative for the phylogenetic analysis of our isolates. The ITS region (spanning part of the 18S rRNA gene, the internal transcribed spacer 1, the 5.8S rRNA gene, the internal transcribed spacer 2 and part of the 28S rRNA gene; ca. 600 bp) was amplified using the primer pair ITS1 (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). The amplification of a portion of the calmodulin gene (comprising part of exon 2, exons 3–5, part of exon 6 and introns 2–5; ca. 730 bp) was set up with the primers CL1 (5'-GARTWCAAGGAGGCCTTCTC-3') and CL2A (5'-TTTTGCATCATGAGTTGGAC-3') (O'Donnell et al., 2000). PCR amplifications were performed on 25 µL of a reaction mixture containing MgCl₂-free reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 1.25 U of Taq polymerase, 200 µM of each dNTP, 0.2 µM of each primer and 1 ng/µL of template DNA. PCR was carried out as follows: 1) 1 step at 95 °C for 5 min; 2) 30 cycles of the following three steps: 30 s at 95 °C, 1 min at 62 °C, 2 min 72 °C; and 3) one final 5 min step at 72 °C. For the calmodulin gene initial denaturation was performed at 95 °C for 2 min. Amplified products were purified using the commercial kit PCR Product Purification JetQuick (Genomed, Lisbon, Portugal), according to the instructions of the manufacturer, quantified and subjected to sequencing by using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standart Kit for an automated ABI 3730xl DNA Analyser (Applied Biosystems). The sets of primers used for sequencing were the same described above.

Phylogenetic analysis: Sequences were compared with ITS-rRNA sequence data from strains available at the public databases Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and CBS Fungal Biodiversity Centre (<http://www.cbs.knaw.nl/fungi/BioLoMICSSequences.aspx>) by using the BLAST N sequence match routines. The sequences were aligned using CLUSTAL X

program and phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 4.0 (Tamura et al., 2007). The Kimura two-parameter mode (Kimura, 1980) was used to estimate evolutionary distance. The phylogenetic reconstruction was done using the neighbor-joining (NJ) algorithm, with bootstrap values calculated from 1000 replicate runs, using the software routines included in the MEGA software.

3. Results

3.1 Phenotypic characterization

Phenotypic characterization of the isolates is summarized in Table 2. On the basis of morphological features (mainly colony colour on CYA and conidia ornamentation), we found three distinct groups among the population under study: isolates with dark-green colonies and rough conidia, which were classified as *A. parasiticus* (4 isolates, 11.4 %), isolates with yellow-green between dark-green and yellow-green colonies, smooth and smooth to finely rough conidia, classified as *A. flavus* (28 isolates, 80 %), isolates with brown colonies, and rough conidia, classified as *A. tamarii* (2 isolates, 5.7 %). The isolate 32 showed brown colony but smooth to finely rough conidia, being classified as *A. oryzae* (2.9 %).

All isolates were confirmed as *Aspergillus* section *Flavi* by a bright orange or yellow-orange colour of the colony reverse on AFPA (Table 2). Isolates of *A. flavus* (18 isolates) and *A. parasiticus* (4 isolates) were sclerotia producers.

Isolates were characterized on the basis of mycotoxin profile, namely AFBs, AFGs and CPA production ability. All *A. parasiticus* isolates showed a consistent mycotoxigenic profile: they all produced AFB and AFG1, and no CPA production was detected. For *A. flavus* 39.3 % (11 isolates) were atoxigenic, 46.4 % (13 isolates) produced only CPA, 10.7 % (3 isolates) produced AFB1 and

CPA and isolate *A. flavus* 16 (3.6 %) produced only AFBs.

By associating morphotypes to chemotypes, isolates were grouped into four morphotype (Figure 1). The morphotype *A. parasiticus* and *A. tamarii* showed the distinct characteristics described above. However, the group *A. flavus* subdivided into two morphotype. Morphotype (I) *A. flavus* showed the following characteristics: 60% of the isolates were atoxigenic, 73.3% biseriatae, 66, 7% showed smooth conidia, 66.7% yellow-green between dark-green colonies and 60% of fungi were isolated from maize and derivatives. On the other hand, morphotype (II) *A. flavus* presented 93.3% of the isolates producers of mycotoxins, all uniseriate, 53.8 % with smooth conidia and 46.2 % finely rough conidia, 42.9% dark green colonies and 79.6 % of fungi were isolated from coffee.

3.2 MALDI-TOF MS spectral analysis

Figure 2 shows a dendrogram of relatedness based on MALDI-TOF ICMS spectral analysis of isolates. In the complete analysis we obtained the following distribution: 14 *A. flavus* (I) (50% of all isolates *A. flavus*), 10 *A. flavus* (II) (35, 7% of all isolates *A. flavus*) and 4 *A. flavus* (III) (17% of *A. flavus* isolates), 4 *A. parasiticus* (100 %), 1 *A. oryzae* (100 %), 1 *A. tamarii* (100 %), 1 *A. sojae* (100 %).

3.3 Molecular identification

The three strains used in the present study were characterized taxonomically by molecular methods. Data derived from phylogenetic analyses from ITS regions could not show differences between them because it made a cluster separated to others sequences from database such as *Aspergillus flavus* MUM 10.209 (HQ340107), *Aspergillus flavus* NRRL 32354 (HQ288050) and *Aspergillus oryzae* NRRL 35191 (EF591304) (data not shown). Otherwise, looking at the Phylogenetic tree based on calmodulin gene (Figure 3), we observe clearly that the samples 7 and 18 made a cluster with sequence of

Aspergillus flavus MUM 10.209 (HQ340087) both with 99% of BLAST similarity (Table 4). The isolate 32 made a cluster with others sequences *Aspergillus oryzae* NRR 447 (EF661506), *Aspergillus oryzae* CBS 466.91 (FN594585) and *Aspergillus flavus* NRRL 4822 (EF661513) both with 99% of BLAST similarity (Table 3), means that this isolate could not been clearly separated. In this way, others methodologies were made such as MALDI-TOF MS, HPLC analyses and morphological characterisation to improve these results.

4. Discussion

In the present study, we aimed to identify and characterize 35 *Aspergillus* isolates belonging to section *Flavi*. Morphological differentiation of species belonging to this group is difficult, due not only to interspecific similarities, but also to intraspecific variability. In this analysis, colour on CYA, conidia ornamentation, CPA production, AFBs production and AFGs production retained their high association with species, but in some cases at levels lower than those obtained for phenotypic identification. *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* are morphologically distinguished by colony colour and texture of the wall of conidia (Klich and Pitt, 1998). Horn et al. (1996) adds that to complete this differentiation can be made mycotoxigenic profile analyzes. The group *A. parasiticus* produces AFBs and AFGs but not CPA and *A. flavus* produces only AFBs and CPA. *A. oryzae* and *A. sojae* were considered non-toxigenic variants of *A. flavus* and *A. parasiticus*, respectively. Aflatoxin production by *A. tamarii* was reported in several studies (Goto et al., 1996, Ito et al., 2001).

It was also observed is this study that the presence of sclerotia and aflatoxin production are not directly related. Kozakiewicz (1989) reported that production of sclerotia is a rare characteristic of *A. flavus* strains only, and, in

accordance to Klich (2007), the presence of sclerotia per se does not seem to be related to aflatoxin production, but the presence of small sclerotia appears to be correlated with high aflatoxin production. Several authors have tried to establish a correlation between sclerotia production ability and aflatoxigenicity, but published data are contradictory. Various studies refer to a positive correlation between high aflatoxin production and presence of small sclerotia (Novas and Cabral, 2002; Pildain et al., 2004), whereas others report no correlation between sclerotial production/size and aflatoxigenicity (Giorni et al., 2007; Razzaghi-Abyaneh et al., 2006).

In the molecular analysis the calmodulin gene shows the similarity genomic between *A. flavus* and *A. oryzae*. Phylogenetic studies indicated that *A. oryzae* may have originated from an ancestral non-aflatoxigenic *A. flavus* (Chang et al., 2006), or have lost the ability to produce AFs during the domestication process (Samson et al., 2000). Rokas et al. (2007) report that *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. oryzae* and *A. sojae* have been shown to possess high degrees of DNA relatedness. *Aspergillus flavus* and *A. oryzae* have been considered virtually impossible to discriminate, and the same happens with *A. parasiticus* and *A. sojae* (Hedayati et al., 2007). The close relatedness among these four species of section *Flavi*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. oryzae* and *A. sojae*, paralleled with their striking difference in terms of aflatoxigenicity and industrial applications, is the foremost example of the challenge posed to the accurate classification of section *Flavi* species (Rodrigues et al., 2011).

When the isolates were analyzed by MALDI-TOF ICMS clades similar to the phenotypic dendrogram was obtained. In the *A. flavus* clade, spectral analysis was not able to resolve between aflatoxigenic and nonaflatoxigenic isolates. Also, *A. oryzae* was not clearly differentiated from *A. flavus* from the spectral point of view, and for that reason, we cannot undoubtedly state that they constitute different species. Study by Rodrigues et al. (2011) to identify

Aspergillus section *Flavi* isolated from almonds using the polyphasic approach found the same technical limitation. However, Li et al. (2000) analysed intact spores *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. oryzae* and *A. sojae* by MALDI-TOF ICMS and found that aflatoxigenic strains and non-aflatoxigenic strains have different mass peak profiles. Furthermore, the MALDI results of non-aflatoxigenic *A. flavus* and *A. parasiticus* spores resemble those of the closely related *A. oryzae* and *A. sojae* spores, respectively.

Thus, micro- and macro-morphology, physiology, mycotoxigenic profile and molecular data are all important for species identification. Still, phenotypic characterization was extremely time-consuming and not completely straightforward, and dubious results made accurate identification difficult to attain.

Molecular features provide a large number of variables for the taxonomy of fungi, which are generated using a technology widely available, with a bioinformatics infrastructure that allows extremely well developed communication around the world and comparing results. However, the variety of genes and methods used in the research identification and phylogeny based on DNA has limited the applicability of the results beyond the specific groups of study (Stoeckli, 2003).

MALDI-TOF ICMS-based fingerprinting methodology has herein been demonstrated to be sensitive and accurate for the discrimination between species and strains of section *Flavi*, and it can thus be regarded as an extra step to the polyphasic scheme of identification. Furthermore, it is a simple, economical, fast and highly effective. However, there is still the need for a comprehensive database of fungal fingerprint mass spectra to be established.

Acknowledgements

The authors are grateful to colleagues from Laboratory of EPAMIG, Microbiology – DEB/UFLA and the Centre of Biological Engineering, UMINHO for their support. Acknowledgments are due to FAPEMIG and Micoteca da Universidade do Minho for the financial support, and to CAPES for granting Fernanda Chaves with a PhD scholarship.

References

- Batista, P.P., Santos, J.F., Oliveira, N.T., Pires, A.P.D., Motta, C.M.S. and Luna-Alves Lima, E.A., 2008. Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. *Genetics and Molecular Research* 7, 706-717.
- Bennett, J.W. and Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 497–516.
- Bragulat, M.R., Abarca, M.L. and Cabañes, F.J., 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology* 71, 139–144.
- Chang, P.K., Bennett, J.W. and Cotty, P.J., 2001. Association of aflatoxin biosynthesis and sclerotial development in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* 153, 41–48.
- Fenselau, C. and Demirev, P.A., 2001. Characterization of intact microorganisms by maldi mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 20, 157-171.
- Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J. and Samson, R.A., 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 59, 1–10.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T. and Battilani, P., 2007. Studies on *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 113, 330–338.
- Godet, M. and Munaut, F., 2010. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. *FEMS Microbiology Letter* 304, 157–168.
- Goto, T., Wicklow, D.T. and Ito, Y., 1996. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamaris* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4036–4038.
- Gqaleni, N., Smith, J.E., Lacey, J. and Gettinby, G., 1997. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1048–1053.

- Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bower, P. and Denning, D.W., 2007. *Aspergillus flavus*: Human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153, 1677–1692.
- Horn, B.W., Greene, R.L., Sobolev, V.S., Dorner, J.W. and Powell, J.H., 1996. Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii*. *Mycologia* 88, 574–587.
- Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T. and Goto, T., 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research* 105, 233–239.
- Kimura, M., 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111–120.
- Klich, M.A. and Pitt, J.L., 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* and other closely related species. *Transactions of the British Mycological Society* 91, 99–108.
- Klich, M.A., 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. CBS, Netherlands. Klich, M.A., 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8, 713–722.
- Kozakiewicz, Z., 1989. *Aspergillus* Species on Stored Products. Wallingford: CAB International.
- Kumeda, Y. and Asao, T., 2001. Heteroduplex panel analysis, a novel method for genetic identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4084–4090.
- Li, T.-Y., Liu, B.-H. and Chen, Y.-C., 2000. Characterization of *Aspergillus* spores by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14, 2393–2400.
- Maier, T. and Kostrzewa, M., 2007. Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. *Chemistry Today* 25, 68–71.
- Novas, M.V. and Cabral, D., 2002. Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus* from peanut in Argentina. *Plant Disease* 86, 215–219.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Tacke, B.K. and Casper, H.H., 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 7905–7910.
- Pildain, M.B., Vaamonde, G. and Cabral, D., 2004. Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. *International Journal of Food Microbiology* 93, 31–40.

- Raper, K. B. and Fennel, D.I., 1965. The Genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Allameh, A., Kazeroon-Shiri, A., Ranjbar-Bahadori, S., Mirzahoseini, H. and Rezaee, M.-B., 2006. A survey on distribution of *Aspergillus* Section *Flavi* in corn field soils in Iran: population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. *Mycopathologia* 161, 183–192.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., Kozakiewicz, Z. and Lima, N., 2009. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology* 129, 187–193.
- Rodrigues, P., Santos, C., Venâncio, A. and Lima, N., 2011. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. *Journal of Applied Microbiology* 111, 877–892.
- Rokas, A., Payne, G., Fedorova, N.D., Baker, S.E., Machida, M., Yu, J., Georgianna, D.R., Dean, R.A. et al., 2007. What can comparative genomics tell us about species concepts in the genus *Aspergillus*? *Studies in Mycology* 59, 11–17.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O., 2000. Identification of the common food and airborne fungi, *Aspergillus*. In *Introduction to Food and Airborne Fungi*, pp. 64–97. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmekultures.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., 2004. *Introduction to Food- and Airborne Fungi*, 7th ed. CBS, Wageningen.
- Santos, C., Paterson, R.R.M., Venâncio, A. and Lima, N., 2010. Filamentous fungal characterizations by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology* 108, 375–385.
- Schmidt, O. and Kallow, W., 2005. Differentiation of indoor wood decay fungi with MALDI-TOF mass spectrometry. *Holzforschung* 59, 374–377.
- Stoeckli, E., 2003. RNAi in avian embryos. In *RNAi: A Guide to Gene Silencing*. G.J. Hannon, ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).
- Sulc, M., Peslova, K., Zabka, M., Hajduch, M. and Havlicek, V., 2009. Biomarkers of *Aspergillus* spores: strain typing and protein identification. *International Journal of Mass Spectrometry* 280, 162–168.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S., 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596–1599.

- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S. and Yoshida, Y., 1988. Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2, 151–153.
- Varga, J., Rigo, K., Toth, B., Téren, J. and Kozakiewicz, Z., 2003. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology* 41, 29–36.
- White T.J., Bruns T., Lee S. and Taylor S., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols. A guide to methods and applications*. eds InninsM. A., GelfandD. H., SninskyJ. J., WhiteT. J. (Academic Press, Inc. San Diego, Calif), pp 315–322.
- Yu, J., Whitelaw, C. A., Nierman, W. C., Bhatnagar, D. and Cleveland, T.E., 2004. *Aspergillus flavus* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in aflatoxin contamination of crops. *FEMS Microbiology Letter* 237, 333–340.

Table 1 Species of the genus *Aspergillus* used in this study

Number of isolates	Code	Species	Origin
0000.022	CEcoCentro 00040	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Coffee
0000.023	CEcoCentro 00041	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Coffee
0000.024	CEcoCentro 00095	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Coffee
0000.021	CEcoCentro 00042	<i>Aspergillus flavus</i>	Coffee
0000.018	CEcoCentro 00043	<i>Aspergillus flavus</i>	Coffee
0000.017	CEcoCentro 00044	<i>Aspergillus flavus</i>	Coffee
0000.016	CEcoCentro 00045	<i>Aspergillus flavus</i>	Coffee
0000.026	CEcoCentro 00047	<i>Aspergillus flavus</i>	Coffee
0000.027	CEcoCentro 00048	<i>Aspergillus flavus</i>	Coffee
0000.001	CEcoCentro 00049	<i>Aspergillus flavus</i>	Coffee
0000.002	CEcoCentro 00050	<i>Aspergillus flavus</i>	Coffee
0000.003	CEcoCentro 00051	<i>Aspergillus flavus</i>	Coffee
0000.004	CEcoCentro 00052	<i>Aspergillus flavus</i>	Coffee
0000.005	CEcoCentro 00053	<i>Aspergillus flavus</i>	Coffee
0000.006	CEcoCentro 00054	<i>Aspergillus flavus</i>	Coffee
0000.007	CEcoCentro 00055	<i>Aspergillus flavus</i>	Coffee
0000.008	CEcoCentro 00056	<i>Aspergillus flavus</i>	Coffee
0000.011	CEcoCentro 00057	<i>Aspergillus flavus</i>	Maize
0000.015	CEcoCentro 00058	<i>Aspergillus flavus</i>	Maize
0000.010	CEcoCentro 00059	<i>Aspergillus flavus</i>	Maize
0000.014	CEcoCentro 00061	<i>Aspergillus flavus</i>	Maize
0000.028	CEcoCentro 00062	<i>Aspergillus flavus</i>	Peanut
0000.012	CEcoCentro 00084	<i>Aspergillus flavus</i>	Rice
0000.020	CEcoCentro 00085	<i>Aspergillus flavus</i>	Peanut
0000.009	CEcoCentro 00086	<i>Aspergillus flavus</i>	Maize
0000.013	CEcoCentro 00089	<i>Aspergillus flavus</i>	Cereal bar
0000.029	CEcoCentro 00090	<i>Aspergillus flavus</i>	Cereal bar
0000.030	CEcoCentro 00091	<i>Aspergillus flavus</i>	Cereal bar
0000.031	CEcoCentro 00093	<i>Aspergillus flavus</i>	Cereal bar
0000.019	CEcoCentro 00094	<i>Aspergillus flavus</i>	Maize
0000.032	CCDCA 01	<i>Aspergillus flavus</i>	Brazil nut
0000.033	CCDCA 03	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Brazil nut
0000.034	CCDCA 05	<i>Aspergillus tamaritii</i>	Brazil nut
0000.035	CCDCA 09	<i>Aspergillus sojae</i>	Brazil nut
0000.036	CCDCA 11	<i>Aspergillus oryzae</i>	Brazil nut

Table 2 Morphological and chemical characterization of isolates of *Aspergillus* section *Flavi*

Isolate code	Morphology										Mycotoxins					Identification
	Sclerotia	Head seriation	Conidia ornamentatio	Colony colour	Colony diameter (cm)					Reverse colour	AF B1	AF B2	AF G1	AFG2	CPA	
					CYA	CYA	MEA	CY20S	CZ							
					25°C	37°C	25°C	25°C	42°C							
CMEcoCentro 00041	+	u	r	D	6.2	6.9	6.7	7.0	4.3	y/o	+	+	+	-	-	<i>A. parasiticus</i>
CMEcoCentro 00095	+	u	r	d	6.3	6.9	6.2	7.0	4.0	y/o	+	+	+	-	-	<i>A. parasiticus</i>
CMEcoCentro 00040	+	u	r	d	6.2	6.2	6.6	7.1	3.5	y/o	+	+	+	-	-	<i>A. parasiticus</i>
CMEcoCentro 00042	+	u	s	d	6.6	6.7	6.1	7.0	2.6	o	-	-	-	-	+	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00043	+	u	fr	d	6.6	6.5	5.6	7.0	2.3	o	-	-	-	-	+	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00044	-	u	fr	y	6.7	6.5	6.5	7.2	3.6	o	-	-	-	-	+	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00045	+	u	s	y	6.9	6.5	6.3	6.9	1.4	o	+	+	-	-	+	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00047	+	u	s	d	6.3	6.5	5.3	7.0	2.3	o	-	-	-	-	+	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00048	-	u	s	d	5.5	6.4	5.9	7.0	3.3	o	-	-	-	-	+	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00049	+	u	fr	y/d	6.6	6.5	6.4	6.9	2.1	o	-	-	-	-	+	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00050	-	u	s	y/d	5.4	6.6	6.4	7.0	5.9	o	-	-	-	-	+	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00051	+	b	s	y/d	5.9	5.2	6.5	7.0	3.0	o	-	-	-	-	+	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00052	-	u	s	y/d	6.4	6.1	6.2	6.9	3.9	o	+	-	-	-	+	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00053	+	u	fr	y/d	6.3	6.9	5.7	7.0	3.4	o	-	-	-	-	+	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00054	+	u	fr	y/d	6.4	6.4	6.0	7.0	2.9	o	-	-	-	-	+	<i>A. flavus</i>

Table 2, continuation

CMEcoCentro 00055	-	u	fr	d	6.8	6.3	6.2	7.0	3.7	o	-	-	-	-	+	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00056	+	u	fr	d	6.5	6.7	6.2	7.1	4.1	o	-	-	-	-	-	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00057	+	b	s	d	6.2	5.4	6.2	7.1	4.3	o	-	-	-	-	-	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00058	+	b	s	y/d	6.0	6.2	6.5	7.0	4.4	o	-	-	-	-	-	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00059	+	b	fr	y/d	6.6	5.0	6.6	7.0	4.7	o	-	-	-	-	-	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00061	+	b	fr	y/d	6.6	5.7	6.7	6.7	4.7	o	-	-	-	-	-	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00062	-	b	s	y/d	5.8	5.1	5.4	6.9	4.6	o	+	-	-	-	-	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00084	+	b	s	y/d	5.7	4.1	6.3	7.0	5.1	o	-	-	-	-	-	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00085	-	u	s	y/d	6.5	6.3	6.4	6.8	5.0	o	-	-	-	-	-	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00086	+	b	s	y/d	6.2	6.6	6.1	7.0	1.5	o	-	-	-	-	-	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00089	-	u	s	d	5.5	6.6	6.0	6.8	3.9	o	-	-	-	-	+	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00090	+	b	s	y/d	5.7	6.5	6.4	7.0	2.4	o	-	-	-	-	-	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00091	+	b/u	s	y/d	6.7	6.8	6.3	6.8	2.8	o	-	-	-	-	-	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00093	-	b/u	s	y/d	5.9	6.7	5.5	6.9	2.4	o	-	-	-	-	+	<i>A. flavus</i>
CMEcoCentro 00094	+	b	s	y/d	6.3	6.5	6.4	7.0	3.1	o	+	-	-	-	+	<i>A. flavus</i>
CCDCA 01		b	fr	d	6.2	6.9	5.9	6.9	2.8	o	-	-	-	-	-	<i>A. flavus</i>
CCDCA 03	+	u	r	y/d	5.9	6.9	5.1	6.7	3.0	y/o	+	+	+	-	-	<i>A. parasiticus</i>
CCDCA 05	-	u	r	b	7.0	6.2	6.9	5.1	nd	nd	-	-	-	-	+	<i>A. tamarii</i>
CCDCA 11	+	u	fr	b	6.0	6.9	5.4	5.8	2.1	nd	-	-	-	-	+	<i>A. oryzae</i>
CCDCA 09	-	u	r	b	6.1	4.8	5.4	7.0	7	nd	-	-	-	-	-	<i>A. sojae</i>

Table 2, continuation

Controls																
MUM 92.01	b/u	s	y	6.4	6.8	6.0	7.0	1.8	nd	nd	-	-	-	-	+	<i>A. flavus</i>
MUM 92.02	u	r	d	5.9	6.9	6.6	6.1	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	<i>A. parasiticus</i>
MUM 98.04	u	fr	y	5.9	6.7	6.4	5.1	1.9	nd	nd	-	-	-	-	+	<i>A. oryzae</i>
MUM 92.03	u	r	b	6.7	7.1	6.5	5.5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<i>A. tamarii</i>
MUM 10.241	u	r	d	65	66	63	62	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	<i>A. sojae</i>

yellow-green; d: dark-green; y/d: in between y and d; b: brown; ^e Average of 3 colonies, in cm; ^g y/o: yellow-orange; o: orange; c: cream; ^h nd: not determined

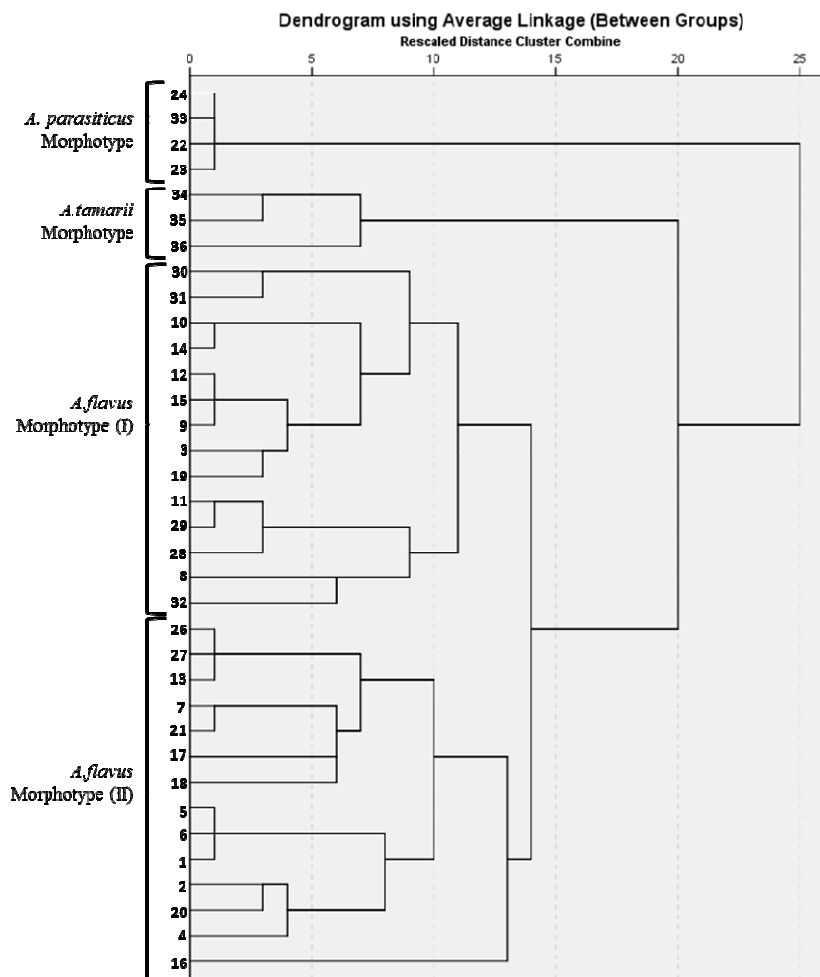


Figure 1 Dendrogram of relatedness between isolates of *Aspergillus* section *Flavi* based on the analysis of: seriation, colony colour on CYA; conidia ornamentation; reverse on AFPA; AFB production; AFG production; cyclopiazonic acid (CPA) production; AFPA, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* agar, origin of the isolate

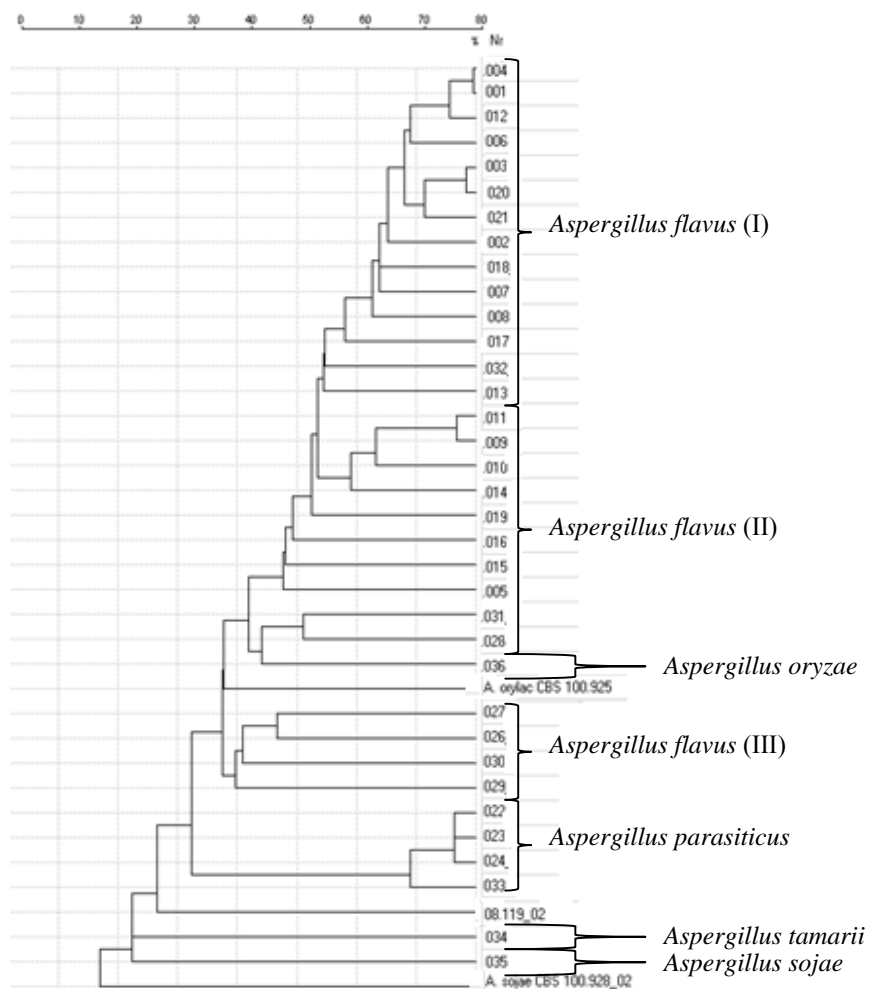


Figure 2 Dendrogram of relatedness between the isolates of *Aspergillus* section *Flavi* based on MALDI-TOF ICMS. Distances are measured as percentage of similarity

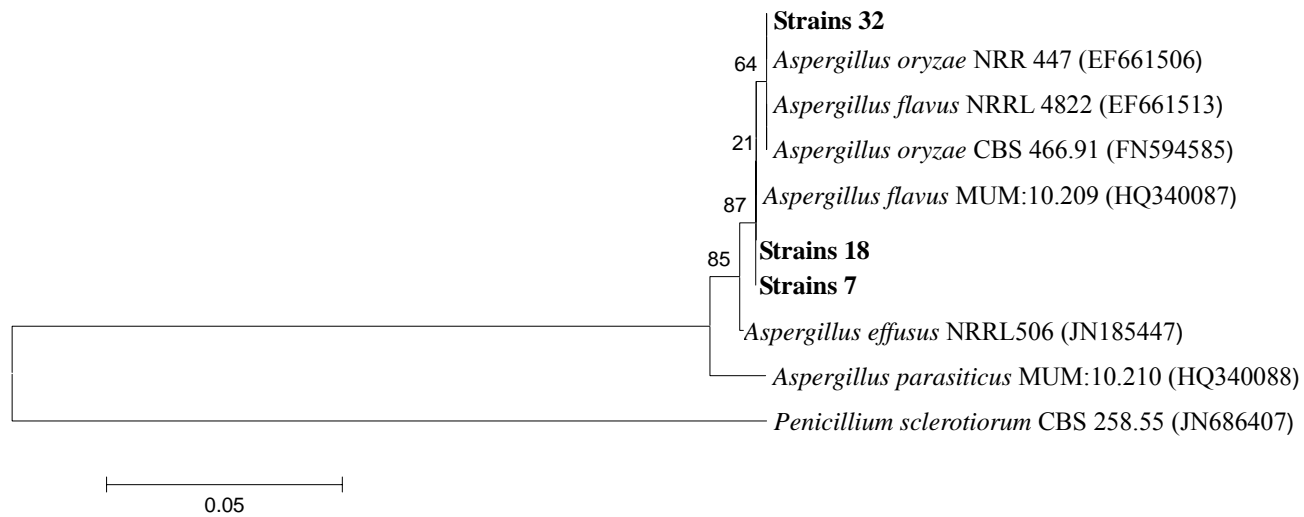


Figure 3 Phylogenetic tree based on calmodulin gene analyses showing closest relatives of strains isolated (Kimura two-parameter model; neighbor-joining algorithm and 1000 replicate bootstrap)

Table 3 *Aspergillus* section *Flavi* identification and data from sampling, isolation and accession numbers

Strains	Source	Molecular identification BLAST similarity	Molecular and morphological identification
7	Brazil coffee	99% <i>Aspergillus flavus</i> MUM 10.209 (HQ340087) 98% <i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 447 (EF661506) 98% <i>Aspergillus effusus</i> NRRL 506 (JN185447) 96% <i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 4123 (EF661518)	<i>A. flavus</i>
18	Brazil coffee	99% <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357 (AY974340) 99% <i>Aspergillus flavus</i> MUM 10.209 (HQ340087) 99% <i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 447 (EF661506) 99% <i>Aspergillus effusus</i> NRRL 506 (JN185447) 97% <i>Aspergillus parasiticus</i> MUM 10.210 (HQ340088)	<i>A. flavus</i>
32	Brazil nut	99% <i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 447 (EF661506) 99% <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 4822 (EF661513) 99% <i>Aspergillus effusus</i> NRRL 506 (JN185447) 99% <i>Aspergillus oryzae</i> CBS 466.91 (FN594585) 97% <i>Aspergillus parasiticus</i> MUM 10.210 (HQ340088)	<i>A. flavus</i>

ARTIGO 2**EVALUATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS
AGAINST POTENTIALLY Mycotoxigenic *Aspergillus flavus* AND
*Aspergillus parasiticus*****Normas da Revista Brasileira de Farmacognosia (Versão aceita)**

***Fernanda C. da Silva*¹, *Sara M. Chalfoun*^{*2}, *Virgínia M. de Siqueira*³, *Deila
M. dos S. Botelho*², *Nelson Lima*³, *Luís R. Batista*⁴**

¹ *Departamento de Biologia, Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil.*

² *Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais- EPAMIG, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil.*

³ *IBB/Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, Portugal.*

⁴ *Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil*

ABSTRACT: The antifungal activity of essential oils of fennel (*Foeniculum vulgare*), ginger (*Zingiber officinale*), mint (*Mentha piperita*) and thyme (*Thymus vulgaris*) was evaluated against mycotoxin producers *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. High Resolution Gas Chromatography was applied to analyze chemical constituents of essential oils. The effect of different concentrations of essential oils was determined by solid medium diffusion assay. Mycelial growth and sporulation were determined for each essential oil at the concentrations established by solid medium diffusion assay. At the 5th, 7th and 9th days the mycelial diameter (Ø mm) and spore production were also determined. FUN-1 staining was performed to assess cell viability after broth macrodilution assay. Trans-anethole, zingiberene, menthol and thymol are the major component of essential oils of fennel, ginger, mint and thyme, respectively. The effective concentrations for fennel, ginger, mint and thyme were 50%, 80%, 50% and 50% (oil/DMSO; v/v), respectively. The four essential oils analysed in this study showed antifungal effect. Additionally, FUN-1 staining showed to be a suitable method to evaluate cell viability of potential mycotoxigenic fungi *A. flavus* and *A. parasiticus* after treatment with essential oils.

Keywords: *Foeniculum vulgare*, FUN-1, Fungi, *Mentha piperita*, *Thymus vulgaris*, *Zingiber officinale*

Introduction

Aspergillus flavus and *A. parasiticus* are the predominant species responsible for aflatoxin contamination of crops prior to harvest or during storage (Yu et al., 2004). Many strategies are taken intending to prevent fungal growth and further mycotoxin production and food contamination, including chemical, physical or biological treatments which require sophisticated equipment and expensive chemicals or reagents (Reddy et al., 2010a). The use of natural plant extracts provides an opportunity to avoid chemical preservation,

thus the search for new antifungal material natural sources for food preservation has increased (Soliman & Badeaa, 2002; Irkin & Korukluoglu, 2007).

Mycotoxins, i.e. toxic secondary metabolites produced by filamentous fungi, of most concern are produced by species within the genera *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*, which occur in major food crops in the field and continue to contaminate during storage (Reedy et al., 2010b). *Aspergillus* species are well-known as active agents in decay processes, as human and animal pathogen and as producer of valuable metabolic products (Raper & Fennel, 1965). *Aspergillus* species are also able to cause diseases in economically important crops, such as maize, corn and peanuts, and to produce potent mycotoxins.

Plants known as condiments are traditionally used to enhance taste or aroma of food, and their essential oils (EOs) represent a complex mixture of natural substances. EOs are known to possess antibacterial and antifungal activity and have been empirically used as antimicrobial agents (Burt, 2004; Bakkali et al., 2008), but the spectrum of activity and mechanisms of action remain unknown for most of them. For EOs of plants used as condiments, the antimicrobial activity seems to be associated with phenolic compounds (Simões & Spitzer, 2000) and the antimicrobial effect is related mainly with changes in the permeability and integrity of cell membrane (Lambert et al., 2001; Carson et al., 2006).

FUN-1 is a halogenated asymmetric cyanine compound, virtually no fluorescent in aqueous solution. FUN-1 is permeable to cell membrane and flows through freely into the cell and initially appears in the cytoplasm as a bright diffuse green/yellow stain. In normal fungal cells, FUN-1 is metabolically converted into orange/red cylindrical intravacuolar structures (CIVS). Adenosine triphosphate (ATP) is required for CIVS formation. However, in non-metabolic

active cells, the dye remains in the cytoplasm in a diffuse pattern, thus indicating a disorder in the viable state of the cells (Millard et al., 1997).

The aim of this study was to investigate inhibitory concentrations of fennel (*Foeniculum vulgare*), ginger (*Zingiber officinale*), mint (*Mentha piperita*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against mycotoxin producers *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Mycelial growth and sporulation inhibition effects and broth macrodilution assay for cell viability test using FUN-1 staining were also studied.

Materials and Methods

Essential oils

Foeniculum vulgare Mill., Apiaceae, *Zingiber officinale* Roscoe, Zingiberaceae, *Mentha piperita* L., Lamiaceae and *Thymus vulgaris* L., Lamiaceae essential oils were purchase from Ferquima Industry and Trade Ltda, Vargem Grande Paulista-SP, Brazil, and stored in hermetically sealed flasks at 4 °C. Samples of the essential oils as a reference are stored in the Agricultural and Livestock Minas Gerais State Research Institution - EPAMIG, Lavras-MG, Brazil. Analytical gas chromatography was carried out on a Varian CP-3380 chromatograph equipped with a flame ionization on Chromatography Laboratory of the Department of Chemistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte / MG, Brazil. We used a column HP-5 (HP) 30m X 0.25 mm with a gradient of temperature: 50 °C, 3 min, 3 °C/min to 170 °C; injector (split 1/200) to 200°C and detector 200 °C. N₂ as carrier gas (2 mL / min) and injection volume 1mL. Samples were diluted to 0.5 % in chloroform. The identification of peaks was made by calculation of retention index standards for hydrocarbons C10 to C18 linear and comparison with literature data (Adams, 2007). The EOs were tested pure and dissolved in DMSO (Dimethyl sulfoxide) at concentrations of 90/10, 80/20, 70/30; 60/40; 50/50 (v/v; oil/diluent).

Fungal isolates and culture conditions

Aspergillus flavus (CMEcoCentro00062) and *Aspergillus parasiticus* (CMEcoCentro 00040) isolated from peanuts and coffee respectively were used for EOs antifungal assay. The fungi were maintained in tubes with potato dextrose agar (PDA: 4g/L Potato, Dextrose 20g/L, Agar 15g/L) at 4 °C.

Antifungal activity of essential oils

Effect of different concentrations of essential oils

A spore suspension (10^6 spores / mL) was prepared and 120 μ L of it was spread on dishes with MEA. After absorption, a sterile filter paper disc (\varnothing 6 mm) was added to the center of the plate and 10 μ L of different dilutions (100, 90, 80, 70, 60 and 50 %) of EOs were added on it. Filter paper disks impregnated with DMSO only were used as control to confirm no solvent effect on bioactivity. The dishes were incubated for 5 days at 25 °C. The lowest concentration able to inhibit each fungus (visible inhibition halo around disk of filter paper) was used in the following test. The tests were performed in triplicate.

Mycelial growth and sporulation assay

The effect of each EO (ie, at the EO concentration determined by solid medium diffusion assay) on mycelial growth and sporulation were performed using the in vitro bioanalytical method. For 250 mL of culture medium Malt Extract Agar (MEA: 20 g/L malt extract, 5 g/L peptone, 20 g/L agar) was added 250 μ L of each EO. 10mL of culture medium containing EO was added to Petri dishes (\varnothing 90 mm). After solidification, inoculation was made of each fungus at a central point of the dishes. The dishes were incubated at 25 ° C for 9 days. At the 5th, 7th and 9th days, it was mensuared the diameter of the colony (\varnothing mm) and the produce of spore in a Neubauer chamber. The tests were performed in triplicate.

Broth macrodilution test using hyphae as inoculum

Fungi were tested by the broth macrodilution method for antifungal activity of EOs described previously (Espinell-Ingroff et al., 1995). The spore suspension was harvested by flooding each colony with 2 mL of sterile 0.85% saline and further diluted to in RPMI 1640 medium to obtain 10^6 spores / mL. Spore suspension was previously incubated at 35 °C for 24 h for formation of hyphae. A total of 100 µl of the fungal suspensions was inoculated into 24-well plates containing 800 µL of RPMI medium and 100 µl of each EO. Final concentrations, i.e., 50 %, 50 %, 50 % and 80 % for fennel, mint, thyme and ginger, respectively were used. EO antifungal activity was evaluated by FUN-1 viability test as further described. RPMI medium added with DMSO alone was used as control to confirm no solvent effect on bioactivity.

FUN-1 viability staining of hyphae

At each EO concentration tested, fungal hyphae were used for FUN-1 staining (Molecular Probes, The Netherlands) at 48 h of incubation. For FUN-1 staining, 50 µL of hyphae suspension plus 50 µL of FUN-1 were added on a Ependorff tube, homogenised, following incubation in the dark at 30 °C during 30 min. 20 µL of Calcofluor White M2R, (25 µM) which stains fungal cell walls was also used as counterstain. The excitation/emission wavelength for CW was 346/433 nm and the signal acquired was blue. Twenty µL of each sample were pipetted on glass slides and observed under an Olympus BX51 epifluorescent microscope using UV light equipped with 40x/0.30 and 10x/0.65 objectives. FUN-1 stains (EX 450-490 nm, EM 520) the dead cells with a diffuse yellow-green fluorescence and the metabolically active cells with red Cylindrical Intra-Vacuolar Structures (CIVS). The images were acquired with a colour camera Zeiss AxioCam HRc using the software CellB®. Storage and handling of reagents were performed as recommended by the supplier. Two samples from each well were assayed and examined for staining with FUN-1.

Statistical analysis of experiments

The data were analyzed by the statistical program Analysis of Variance System for Balanced Data – SISVAR (Ferreira, 2000).

Results

Essential oils and major constituents

The major components of EOs are listed in Table 1. Trans-anethole (51.5%), zingiberene (32.7%), menthol (55.4%), and thymol (54.9%) were the main components of fennel, ginger, mint, and thyme, respectively.

Effect of different concentrations of essential oils

Inhibition zones diameters in solid culture of *A. flavus* and *A. parasiticus* are listed in Table 2. The same concentration of each EO was established for both *A. flavus* and *A. parasiticus*, i.e. 50% for fennel, mint, and thyme EOs and 80 % for ginger EO (Table 2). For both fungi the EO of ginger a halo of inhibition was observed at a concentration of 80%.

Mycelial growth and sporulation assay

The effects of EOs on mycelial growth and sporulation of *A. parasiticus* are reported in Table 3. Throughout the study it was found that each EO showed different effect on mycelial growth and fungal sporulation. All essential oils showed inhibitory effect on mycelial growth of *A. parasiticus* at the 7th and 9th days of analysis (Table 3). For fennel and thyme EOs, similar results were observed at the 5th day. Ginger EO showed effect in inhibition of mycelial growth at 7th day (44.66 mm). For sporulation was observed that thyme EO showed inhibitory effect on all analyzed days. At the 7th day, the EO of fennel caused a considerable increase in number of spores (4.10×10^6 spores / mL). Same effect was observed for the EOs of mint (2.5×10^6 spores / mL) and ginger (2.18×10^6 spores / mL) on 9 days. The EO of thyme showed the best inhibitory effect on mycelial growth and sporulation of *A. parasiticus* (Table 3).

There was no difference in the effect of EOs on the *A.flavus* on the 5th, 7th and 9th days of analysis. The EO of thyme highlighted in the evaluation of mycelial growth and sporulation of *A. flavus*. The EO of fennel presented similar to sporulation control, it is not considered effective in this study.

FUN-1 viability staining

In this study, positive control of *A. flavus* and *A. parasiticus* (i.e. fungi without the addition of EOs) showed green fluorescent hyphae with clearly CIVS (Figures 1A and 2A). Thus, fungi were classified as viable. This same feature was observed with ginger EO, and CIVS were also observed within both *A. flavus* and *A. parasiticus* hyphae after treatment (Figures 1B and 2B). These result correlate to results found in growth effect assay in which a high ginger oil concentration (80 %) did not considerably affect fungal growth. The presence of CIVS after treatment with ginger oil classifies both fungi as viable. On the other hand, only bright diffuse yellow/green cytoplasm was observed after treatment with fennel, mint, and thyme (Figures 1C-E and 2C-E). Thus, in this case fungi were classified as non-viable. These same EOs showed inhibition effects in both fungi; this feature was also confirmed by FUN-1 staining results.

Discussion

Recently, the scientific interest in biological properties of EOs has been increased. New researches about biological active secondary compounds present in EOs of plants have been seen as a potential way to control fungal contamination (Burt, 2004; Soliman & Badea, 2002, Tajkarimi et al., 2010).

The results obtained on the chemical characterisation of the fennel, ginger, mint, and thyme EOs used in this study is according to the large chemical polymorphism for the majority of EOs (Sridhar et al., 2003; Gulfranz et al., 2008; Matan et al., 2009, Razzaghi-Abyaneh et al., 2009).

Thyme EO showed better antifungal effect against *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. This antifungal activity is reported in several studies. Soliman & Badea (2002) reported that thyme EO (≤ 500 ppm) completely inhibited the growth of *A. flavus* and *A. parasiticus*. This same effect was observed by Nguetack et al., (2004), that the thyme OE at a concentration of 200 ppm reduced the radial growth of *A. flavus* by 81%. Complete inhibition of conidial germination of *A. flavus* was achieved by 1000ppm. Among various plants tested, thyme EO inhibited growth and aflatoxin production of *A. parasiticus* (Razzaghi-Abyaneh et al., 2009). The same effect was observed for *A. flavus* (Kumar et al., 2008). Lis-Balchin & Deans (1997) reported that strong antimicrobial activity could be correlated with essential oils containing high percentage of monoterpenes, eugenol, cinnamic aldehyde, and thymol. It seems possible that phenol components may interfere with cell wall enzymes like chitin synthase/chitinase as well as with the α - and β -glucanases of the fungus (Adams et al., 1996). Thymol, the major constituent of the *Thymus vulgaris*, in a study by Zambonelli *et al.* (2004) was correlated with damage to the cell, as increase in the vacuolization of the cytoplasm and an accumulation of lipid droplets, ripples in the plasmalemma and changes in the mitochondria and endoplasmic reticulum of *Colletotrichum lindemuthianum* and *Pythium ultimum*. Rasooli *et al.* (2006) observed severe hyphae collapsing, plasmatic membrane rupture and destruction of mitochondria in *Aspergillus niger* treated with essential oils of *Thymus eriocalyx* and *T. xporlock*.

Antifungal activity of fennel and mint EOs is reported in other investigations (Duarte et al., 2005; Özcan et al., 2006; Sokovic & Van Griensven, 2006; Gulfraz et al., 2008; Freire et al., 2011). The effect antifungal of fennel EO is directly related to its main component trans-anethole (Muckenstrum et al., 1997; Patra et al., 2002) and the effect of mint EO can be

attributed to menthol and 1, 8-cineole, which exhibited very good antifungal properties (Griffin et al., 2000).

The ginger EO showed low antifungal activity on the mycelial growth of *A.flavus* when compared to other EOs and ineffective inhibitory effect for the other parameters tested and fungi. No inhibitory effect of fungal growth by this EO was reported in studies by Sridhar et al., (2003) and Thanaboripat et al., (2007). Holley & Patel (2005) reported that spices, such as ginger, black pepper, red pepper, chili powder, cumin and curry powder showed lower antimicrobial properties.

The differences between the antifungal activity of essential oils studied against *A. flavus* and *A. parasiticus* and permanence of the inhibitory effect over time are directly related to chemical composition of the EO, the microbial species, the mechanism of action and the method used to analyze the antimicrobial activity of the EO (Bakkali et al., 2008; Pinto et al., 2009; Tajkarimi et al., 2010).

In this study, the method used to evaluate the antifungal activity of EOs was solid medium diffusion. Research has shown that this method has limitations. The use of the method is limited to fast-growing microorganisms, aerobic or facultative aerobic (Ostrosky et al., 2008). Another problem noted is the uneven distribution lipophilic components of EOs which results in unequal concentrations of EO in the agar causing the formation of regions with varying antimicrobial activity which can lead to misinterpretations (Lambert et al., 2001; Suhr & Nielsen et al. 2003). Ostrosky et al., 2008 also report that the agar diffusion method, the antimicrobial activity of oil can be influenced by the culture medium (agar concentration and origin), pH, oxygen availability, amount of inoculum and incubation conditions. Studies to compare methods of application of EOs with antimicrobial activity have been performed (Hammer et al., 2003; Suhr & Nielsen et al. 2003).

To corroborate the result of in vitro and verify the feasibility of the method for testing antifungal with EOs, cell viability associated FUN-1 staining was performed. This test showed to be a suitable method to evaluate cell viability of potential mycotoxigenic fungi *A. flavus* and *A. parasiticus* after treatment with EOs. Studies show that the applicability of fluorescent dyes as a reliable and fast alternative to assess fungal cell viability in environmental and medical fields has been increasingly used (Pina-Vaz et al., 2001; Bowman et al., 2002; Wierzchos et al., 2004). In a study with *A. fumigatus*, FUN-1 and Calcofluor were applied to document patterns of structural changes and its relationship with MIC after following antifungal treatment (Gangwar et al., 2006). Calcofluor binds to glucans and chitin in the cell walls and septa of fungi and it has been useful to analyse fungal morphology and as a counterstaining (Agger et al., 1998). Antifungal activity analyses of EOs against pathogenic fungi such as *A. fumigatus* and *Candida* spp. has been carried out using FUN-1 as well (Pinto et al., 2009). Although the interest in discover new antifungal agents which activity against mycotoxigenic fungi has been increased, a lack of studies in this area still remains and more efforts to establish standardized methods in this area is needed.

Already published results of studies which evaluate antifungal agents indicate that FUN-1 method correlates closely to colony counts method. FUN-1 staining is as a rapid and sensitive method for assaying the viability of fungi and may be applied as an alternative for antifungal tests using EOs. In addition, essential oils showed inhibitory effect on fungi tested being, the thyme EO more effective. However, it is necessary to standardize the method for testing antifungal agents with essential oils and more detailed studies on the mechanism of action of these substances in the fungal cell.

Acknowledgements

The authors are grateful to the colleagues from Laboratory of EPAMIG and Microbiology DEB/UFLA and the Micoteca da Universidade do Minho (MUM), Center for Biological Engineering, UMINHO for their support to perform this work. A special acknowledgment is also due to the FAPEMIG and MUM-UMINHO for the financial support of bench work and to CAPES for granting the first author with a PhD scholarship.

References

- Adams S, Kunz B, Weidenböner M 1996. Mycelial deformations of *Cladosporium herbarum* due to the application of Eugenol and Carvacrol. *J. Essent. Oil Res.* 8: 535-540.
- Adams RP 2007. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation.
- Agger T, Spohr AB, Carlsen M, Nielsen J 1998. Growth and product formation of *Aspergillus oryzae* during submerged cultivations: verification of a morphologically structured model using fluorescent probes. *Biotechnol Bioeng* 57: 321–329.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar, M 2008. Biological effected of essential oils - A review. *Food Chem Toxicol* 46: 446-475.
- Bowman JC, Hicks PS, Kurtz MB, Rosen H, Schmatz DM, Liberator PA, Douglas CM 2002 The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3001–3012.
- Burt S 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int J Food Microbiol* 94: 223-253.
- Carson CF, Hammer KA, Riley TV 2006. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev* 19: 50–62.
- Duarte MCT, Figueira,GM, Sartoratto A, Rehder VLG and Delarmelina C 2005. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 97, 305–311.
- Espinell-Ingroff A, Dawson K, Pfaller M, Anaissie E, Breslin B, Dixon D, Fothergill A, Paetznick V, Peter J, Rinaldi M, et al. 1995. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 314–319.

- Freire, MM.; Jham, G.N.;2,5, Dhingra, O.D.; Jardim, C.M.; Barcelos, R.C.; Valente, V.M.M. Composition, antifungal activity and main fungitoxic components of the essential oil of *Mentha piperita* L. 2011. *Journal of Food Safety*, p.1-8.doi:10.1111/j.1745-4565.2011.00341
- Ferreira, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In 45^a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, Julho de 2000. p.255-258. Disponível em < <http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm>>. Acesso em 06 set. 2011.
- Gangwar M, Cole R, Ramani R, Sheehan DJ, Chaturvedi V 2006. Application of fluorescent probes to study structural changes in *Aspergillus fumigatus* exposed to amphotericin B, itraconazole, and voriconazole. *Mycopathologia* 162: 103-109.
- Griffin GS, Markham LJ, Leach ND 2000. An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J Essent Oil Res* 12, 149-255.
- Gulfraz M, Mehmood S, Minhas N, Jabeen N, Kausar R, Jabeen K and Arshad G 2008. Composition and antimicrobial properties of essential oil of *Foeniculum vulgare*. *Afr J Biotechnol* 24: 4364-4368.
- Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak EM, Carson CF, Riley TV 2003. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol* 18: 389-392.
- Holley RA, Patel D 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol* 4: 273–292.
- Irkin R, Korukluoglu M 2007. Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion and leek extracts. *Afr J Biotechnol* 6: 384-387.
- Kumar A, Shukla R, Singh P, Prasad C S, Dubey N K 2008. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post-harvest fungal infestation of food commodities. *Innovat Food Sci Emerg Tech* 9: 575-580.
- Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 91: 453- 462.
- Lis-Balchin M, Deans SG 1997. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol* 82: 759–762.
- Matan N, Woraprayote W, Saengkrajang W, Sirisombat N and Matan N 2009. Durability of rubberwood (*Hevea brasiliensis*) treated with peppermint oil, eucalyptus oil, and their main components. *Int. Biodeter. Biodegr.* 63, 621–625. DOI: 10.1186/1471-2180-10-282.

- Millard PJ, Roth BL, Thi HP, Yue ST, Haugland RP 1997. Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Appl Environ Microbiol* 63: 2897–2905.
- Muckenstrum B, Foechterlen D, Reduron JP, Danton P, Hildenbrand M 1997. Pythochemical and chemotaxonomic studies of *Foeniculum vulgare*. *Biochem Syst Ecol* 25: 353-358.
- Nguefack J, Leth V, Amvam Zollo PH, Mathur SB 2004. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *Int J Food Microbiol* 94: 329–334.
- Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima ME L, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas, BR 2008. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev Bra Farmacogn* 18: 301-307
- Özcan MM, Chalchat JC, Arslan D, Ateş A, and Ünver A 2006. Comparative Essential Oil Composition and Antifungal Effect of Bitter Fennel (*Foeniculum vulgare* ssp. *piperitum*) Fruit Oils Obtained During Different Vegetation. *J Med Food* 4: 552-561.
- Pina-Vaz C, Sansonetty F, Rodrigues AG, Costa-de- Oliveira S, Martinez-de-Oliveira J, Fonseca AF 2001. Susceptibility to fluconazole of *Candida* clinical isolates determined by FUN-1 staining with flow cytometry and epifluorescence microscopy. *J Med Microbiol* 50, 375–382.
- Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L 2009. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol* 58, 1454–1462.
- Patra M, Shahi, SK, Midgely G, Dikshit A 2002 Utilization of essential oil as natural antifungal against nail infective fungi. *Flavour Fragr J* 17, 91-94.
- Raper KB, Fennell DI 1965. *The Genus Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins Company.
- Rasooli I, Rezaei MB, Allameh A (2006) Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control* 17: 359-364.
- Razzaghi-Abyaneh MM, Shams-Ghahfarokhi MB, Rezaee K, Jaimand S, Alinezhad R, Saberi and Yoshinari T 2009. Chemical composition and antiaflatoxic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food Control* 20: 1018-1024.
- Reddy KRN, Nurdijati SB, Salleh B 2010a. An overview on plant derived products on control of mycotoxigenic fungi and mycotoxins. *Asian J Plant Sci* 9: 126-133.
- Reddy KRN, Salleh B, Saad B, Abbas, HK, Abel, CA, Shier, WT 2010b. An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Rev* 29, 3-26.

- Simões CMO, Spitzer V 2000. Óleos voláteis. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCPD, Mentz LA, Petrovick PR.. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 387-415.
- Sokovic M, Van Griensven LJLD. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal Plant Pathology*, v.116, n.3, p.211-224, 2006. Disponível em:<<http://www.springerlink.com/content/t285j32876337950/fulltext.pdf>>. Acesso em: 22 jan.2012. doi: 10.1007/s10658-006-9053-0.
- Soliman KM and Badea BI 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem Toxicol* 40: 1669-1675.
- Sridhar SR, Rajagopal RV, Rajavel R, Masilamani S, Narasimhan S 2003. Antifungal Activity of Some Essential Oils. *J Agric Food Chem* 51: 7596-7599.
- Suhr KI and Nielsen PV 2003. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *J Appl Microbiol* 94: 665–674.
- Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21: 1199-1218.
- Thanaboripat D, Suvathi Y, Srilohasin P, Sripakdee S, Patthanawanitchai O, Charoensettasilp S 2007. Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*. *KMITL Sci. Tech. J* 1: sp.
- Wierzechos J, de Los Ríos A, Sancho LG, Ascaso C 2004. Viability of endolithic micro-organisms in rocks from the McMurdo Dry Valleys of Antarctica established by confocal and fluorescence microscopy. *J Microsc* 1: 57–61.
- Zambonelli A, D'aulerio AZ, Severi A, Benvenuti S, Maggi L, Bianchi A 2004. Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *Thymus vulgaris* L. *J. Essent. Oil Res.* 16: 69-74.
- Yu J, Whitelaw CA, Nierman WC, Bhatnagar D, Cleveland TE 2004. *Aspergillus flavus* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in aflatoxin contamination of crops. *FEMS Microbiol Lett* 237: 333 - 340.

***Correspondence**

Sara M. Chalfoun

Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG

Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, Universidade Federal de Lavras, caixa postal 176, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

E-mail adress: chaulfon@epamig.ufla.br

Tel: +35 38291190

Fax number: +35 38216244

Table 1 Essential oils and their major constituents used in this work

Fennel		Ginger		Mint		Thyme	
Trans-anethole	51.5	Zingibereno	32.7	Mentol	55.4	Timol	54.9
δ-3-Careno	28.7	Sesquifelandreno	12.9	Mentona	18.6	p-cimeno	25.4
Fenchona	5.7	β-Bisaboleno	12.1	Neomental	5.2	Linalool	6.0
		Canfeno	8.2			γ-terpineno	2.8
		Mirceno	6.9				

Values given are expressed in percentage

Table 2 Size of inhibition zone (Ø mm) of mycelial growth of *A. flavus* and *A. parasiticus* at different EOs concentrations

Concentrations (essential oil/DMSO; v/v)						
Essential oils	50:50	60:40	70:30	80:20	90:10	100:0
<i>Aspergillus flavus</i>						
Fennel	2.33 C ab	2.33 C b	3.00 C b	7.66 B a	5.00 BC b	84.00 A a
Ginger	0.00 A b	0.00 A b	0.00 A b	1.66 A b	1.00 A bc	2.00 A c
Mint	4.66 B a	2.66 B b	2.33 B b	2.00 B b	3.66 B bc	9.66 A b
Thyme	4.66 C a	9.33 B a	13.66 B a	11.33 B a	84.00 A a	84.00 A a
DMSO	0.00 A b	0.00 A b	0.00 A b	1.00 A b	0.66 A bc	0.00 A c
Control	0.00 A b	0.00 A b	0.00 A b	0.00 A b	0.00 A c	0.00 A c
<i>Aspergillus parasiticus</i>						
Fennel	4.66 B b	3.66 B b	6.66 B c	5.33 B b	4.66 B b	84.00 A a
Ginger	0.00 A b	0.00 A b	0.00 A b	0.66 A b	0.00 A b	0.66 A b
Mint	2.33 B b	2.00 B b	3.00 AB bc	2.00 B b	4.33 AB b	9.00 A c
Thyme	26.33 B a	84.00 A a	84.00 A a	23.33 CB a	84.00 A a	84.00 A a
DMSO	0.00 A b	0.00 A b	0.00 A b	1.00 A b	0.33 A b	0.00 A b
Control	0.00 A b	0.00 A b	0.00 A b	0.00 A b	0.00 A b	0.00 A b

*Means followed by the same lowercase letter in the column and uppercase letter in a line, do not differ by Tukey test at 5% probability

Table 3 Diameter of colony (\emptyset mm) and sporulation (10^6 spores/mL) of *A. parasiticus* at 5th, 7th, and 9th days after inoculation

Treatments	Diameter of colony (days)			Sporulation (days)		
	5 th	7 th	9 th	5 th	7 th	9 th
Fennel 50 %	21.00 A a	47.33 B b	61.33 C bc	0.41 A ab	4.10 B b	6.76 B b
Ginger 80 %	51.00 AB b	44.66 A b	62.00 B bc	2.76 A b	1.66 A ab	2.18 A ab
Mint 50 %	36.66 A b	77.00 AB b	51.66 B b	2.16 A b	5.01 A b	2.50 A ab
Thyme 50 %	16.00 A a	26.00 AB a	33.33 B a	0.03 A a	0.06 A a	0.15 A a
Control	43.33 A b	69.66 B c	74.00 B c	2.25 A b	2.50 A b	1.46 A a

*Means followed by the same lowercase letter in the column and uppercase letter in a line, do not differ by Tukey test at 5% probability

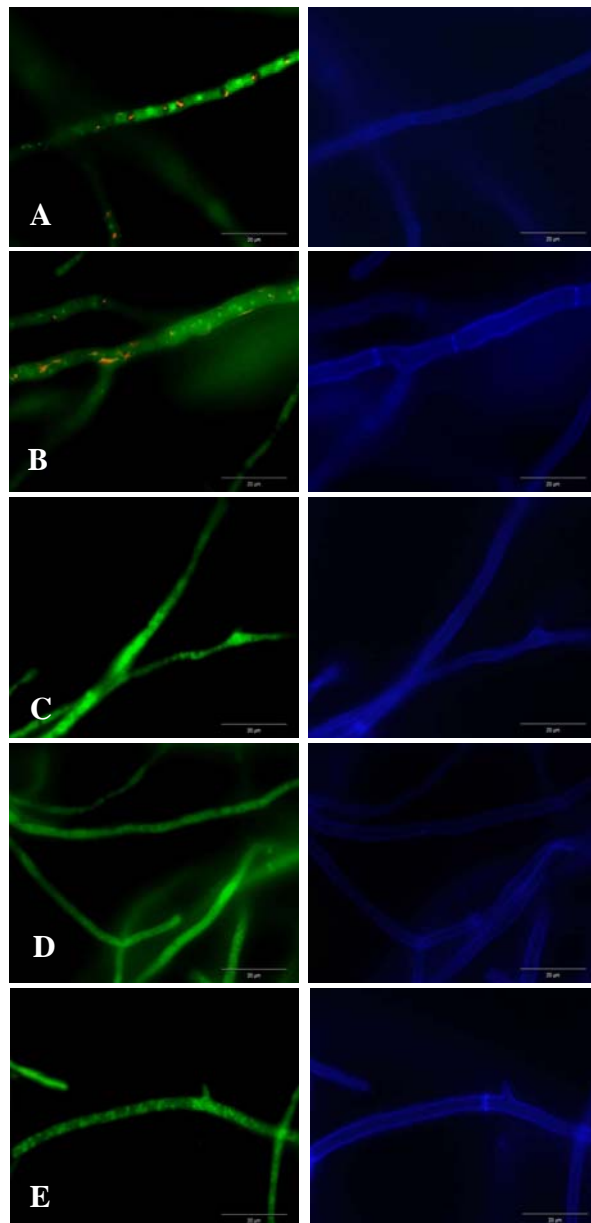


Figure 1 Images of epifluorescence microscope showing *Aspergillus flavus* after FUN-1 (left column) and CW (right column) staining. Positive control (A) and ginger EO treatment (B) show CIVS. Mint, fennel and thyme EOs treatments (C-E) show only yellow/green diffuse hyphae

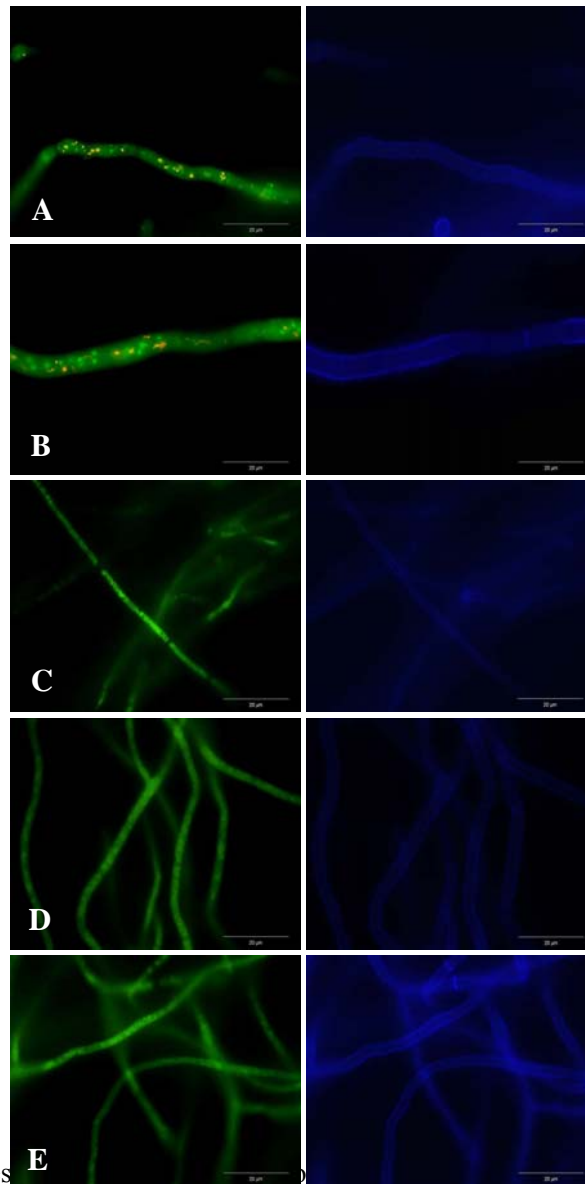


Figure 2 Images of *Aspergillus parasiticus* after FUN-1 (left column) and CW (right column) staining. Positive control (A) and ginger EO treatment (B) show CIVS. Mint, fennel and thyme EOs treatment (C-E) show only yellow/green diffuse hyphae