

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

**Óleos Essenciais e Extratos Vegetais de Plantas Cultivadas
no Brasil: Impacto no Crescimento de Cepas Toxígenas de
Aspergillus Seção Flavi.**

Tatiana Xavier de Almeida

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS DE PLANTAS
CULTIVADAS NO BRASIL: IMPACTO NO CRESCIMENTO DE
CEPAS TOXÍGENAS DE *Aspergillus* Seção Flavi**

TATIANA XAVIER DE ALMEIDA

Sob a Orientação do Professor
Carlos Alberto da Rocha Rosa

e Co-orientação da Professora
Lilia Renée Cavaglieri

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal

Seropédica, RJ
Fevereiro, 2010

589.204334

A447o

T

Almeida, Tatiana Xavier, 1985-

Óleos essenciais e extratos vegetais de plantas cultivadas no Brasil: impacto no crescimento de cepas toxígenas de *Aspergillus* Seção Flavi / Tatiana Xavier Almeida - 2010.

57 f.: il.

Orientador: Carlos Alberto da Rocha Rosa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 38-43.

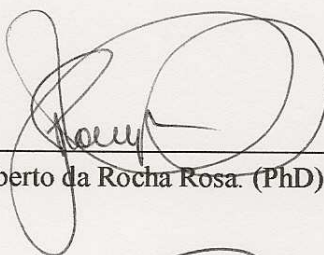
1. Fungos - Teses. 2. Plantas aromáticas - Teses. 3. Micotoxicose - Teses. 4. Micotoxina - Teses. I. Rosa, Carlos Alberto da Rocha, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

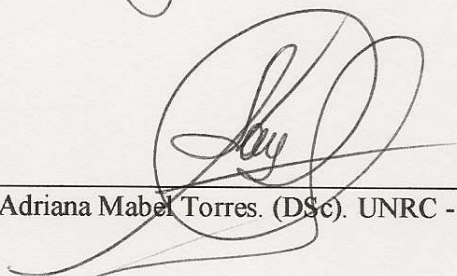
TATIANA XAVIER DE ALMEIDA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

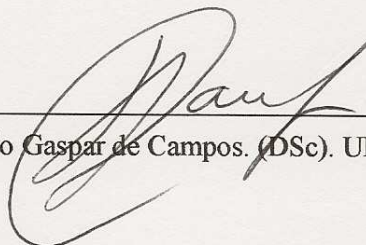
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 09/02/2010



Carlos Alberto da Rocha Rosa. (PhD). UFRRJ



Adriana Mabel Torres. (DSc). UNRC - Arg



Sérgio Gaspar de Campos. (DSc). UFRRJ

*Dedico esse trabalho a meus pais
meu irmão e a meu noivo, partes
fundamentais na minha vida e
que amo incondicionalmente. . .*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por iluminar o meu caminho, por me permitir aprender algo a cada dia que passa e me dar oportunidade de conviver com pessoas muito especiais.

Agradeço a toda minha família, em especial meus pais por todo apoio durante os anos dessa trajetória. Ao meu pai Paulo, meu exemplo, pelos conselhos e longas conversas, além dos infinitos ensinamentos que me fizeram acertar em minhas escolhas e ser a pessoa que sou hoje. A minha mãe, Leila, por todo carinho, amor e paciência infinita, inclusive nos meus diversos momentos de estresse. Ao meu irmão Raphael, pelos momentos de descontração, das noites assistindo filmes e amizade.

Ao meu noivo Gabriel, por compreender meus momentos de ausência, pelo companheirismo e motivação, achando sempre uma forma de me dar força para prosseguir, inclusive lendo e corrigindo esta dissertação inúmeras vezes só pra ficar ao meu lado. Te amo muito e agradeço-lhe imensamente por tudo.

Ao meu tio Tony, meu segundo pai, presente sempre que possível, me incentivando sempre a buscar o melhor de mim. Obrigada pelas caminhadas, pelos conselhos, pelas piadas e filosofias que só você sabe contar.

Ao Professor Carlos Alberto da Rocha Rosa, que me aceitou como sua aluna, pela orientação e amizade, acreditando em mim e em meu trabalho.

As Professoras Lilia Renée Cavaglieri e Ana Maria Dalcerro que muito contribuíram para a conclusão e apresentação deste trabalho.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e as amigas feitas desde o tempo da graduação, amigas como Camila Franco Basalo, Priscila Simões Ramos, Paula Sant'ana Alves, Mariana do Desterro Inácio e Souza, pessoas que me fizeram amar ainda mais a profissão de veterinária. Em especial, agradeço a minha amiga Águida Aparecida de Oliveira, principal responsável pelo meu ingresso no mestrado, me acompanhando durante todo o caminho e mostrando que com amizade, força de vontade e muito trabalho tudo é possível! Muito obrigada por todas as horas de bate papo, pelas “festinhas de pijama”, por me incentivar, enfim, por estar sempre presente com uma palavra amiga ou apenas me escutando quando eu precisava.

À Kelly Moura Keller, por todos os ensinamentos, amizade, motivação e confiança depositada em mim ao decorrer dos anos. Agradeço também as broncas e aos puxões de orelha, fundamentais para o meu crescimento e peço desculpas pela ‘tartarugice’.

Ao Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas, que começou devagar e hoje conta com grandes amigos: Luiz Antonio Moura Keller, Ana Cláudia Marassi, Michele Valadares Deveza, Beatriz de Souza Monteiro, Carla Alves Soleiro, Thais Ferreira Fagundes, Lucila Maria Teixeira Nunes, Renata Quintela Assad, Caroline da Cruz Bessa, Francine Siqueira Santos, Tayane Karine Barbosa de Moraes. Obrigada pelo apoio, amizade e por fazerem o convívio diário e o trabalho serem mais divertidos.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante os anos do curso e financiamento da pesquisa.

Enfim, a tarefa de agradecer a todos que ajudaram a construir esta dissertação não é nem um pouco fácil. Então, finalizo agradecendo a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar por vocês minha profunda gratidão. **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

ALMEIDA, Tatiana Xavier de. **Óleos essenciais e extratos vegetais de plantas cultivadas no Brasil: impacto no crescimento de cepas toxígenas de *Aspergillus* Seção Flavi.** 2010. 43p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

A contaminação de alimentos por fungos e micotoxinas constitui um grande problema mundial. Alguns produtos naturais, como por exemplo, óleos essenciais, são demonstrados como potenciais inibidores do crescimento fúngico, bem como da produção de suas toxinas. Neste estudo, um total de 40 extratos de plantas foi avaliado como inibidores do desenvolvimento fúngico de cepas pertencentes ao gênero *Aspergillus* seção Flavi. Tais extratos foram obtidos a partir de dez ervas, utilizadas especialmente como condimentos e cultivadas no Brasil: alecrim (*Rosmarinus officinalis*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), cominho (*Cuminum cyminum*), cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), hortelã (*Mentha piperita*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), manjerona (*Origanum majorana*), noz moscada (*Myristica fragrans*) e orégano (*Origanum vulgare*). Ensaios preliminares *in vitro* utilizando o método de difusão em agar demonstraram que os óleos essenciais foram os mais efetivos na inibição do crescimento fúngico quando comparados com extratos etanólicos e aquosos. Foram selecionados os óleos essenciais de orégano e alecrim, os extratos etanólicos de cravo-da-Índia e cominho e, os óleos essenciais hexânicos de orégano e canela para ensaios mais aprofundados. Diferentes concentrações de extratos de plantas aromáticas (0, 50, 100, 150, 300 e 600 µg/g) foram adicionadas ao meio de cultivo. Utilizou-se uma suspensão de 10^3 conídios por inoculação. As placas foram incubadas por dez dias enquanto medições diárias do diâmetro da colônia eram realizadas a fim de obter velocidade de crescimento (mm/dia) e fase de latência (h) das cepas toxígenas. Comparando os óleos essenciais selecionados, tanto *A. flavus* quanto *A. parasiticus* apresentaram uma melhor inibição através da incorporação do óleo essencial de orégano no meio de cultivo a uma concentração de 600 µg/g. Apesar disso, o óleo essencial hexânico de orégano não demonstrou qualquer diferença estatística em relação ao grupo controle, havendo então alteração em algum componente do extrato devido a forma de extração. Entre os extratos etanólicos avaliados, o cravo-da-Índia obteve o melhor resultado. *Aspergillus flavus* demonstrou uma discreta diminuição de crescimento (4,5 a 3,5 mm/dia), quando comparado ao grupo controle, mas um grande aumento em sua fase de latência (37 h a 600 µg/g). *Aspergillus parasiticus* apresentou uma diminuição gradativa conforme ocorria o aumento das concentrações, exceto pela concentração de 150 µg/g, e um aumento significativo da fase lag nas maiores concentrações testadas (45 e 48 h respectivamente). Os dados apresentados aqui são de extrema relevância para os constantes esforços de controle microbiológico em alimentos, principalmente em se tratando de controle fúngico.

Palavras-chave: Antifúngicos, plantas aromáticas, micotoxina.

ABSTRACT

ALMEIDA, Tatiana Xavier de. **Essential oils and plant extracts derived from plants of Brazil: Impact on growth of toxigenic strains from *Aspergillus* Section Flavi.** 2010. 43p. Dissertation (Master's Degree in Veterinary Science, Animal Health). Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Fungal and mycotoxin contamination in food is one of the greatest problems around the world. Some natural products, such as essential oils, have been shown to be effective inhibitors of fungal growth and production of their toxins. In this study, a total of 40 vegetal extracts were tested for inhibition on *Aspergillus* section Flavi growth. These extracts were obtained from ten herbs cultivated in Brazil: basil (*Ocimum basilicum*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), clove (*Eugenia caryophyllata*), cumin (*Cuminum cyminum*), marjoram (*Origanum majorana*), nutmeg (*Myristica fragrans*), oregano (*Origanum vulgare*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*), spearmint (*Mentha piperita*) and sweet fennel (*Pimpinella anisum*). Preliminary *in vitro* tests using the agar diffusion method showed that essential oils were more effective in inhibiting the fungal growth when compared with ethanol and aqueous extracts. Essential oils obtained from oregano and rosemary, clove and cumin ethanolic extracts and the essential hexanic oil of oregano and cinnamon were selected for advanced tests. Different concentrations of plant material (0, 50, 100, 150, 300 and 600 µg/g) were added to culture medium. A suspension of 10^3 conidia per inoculation were used. Plates were incubated for ten days while daily measurements of colony diameters were made to obtain growth rate (mm/day) and lag phase (h) of toxigenic strains. The comparison of selected essential oils effect on *A. flavus* and *A. parasiticus* showed better inhibition by incorporating oregano essential oil in the culture medium at 600 µg/g concentration. Nevertheless, the hexanic essential oil of oregano showed no statistical difference with the control group, a change occurred in the plant product due to the extraction method. Among the evaluated ethanol extracts, clove had the best result. *Aspergillus flavus* showed a slight reduction of growth (4.5 to 3.5 mm/day) when compared to control group, but a large increase in the latency period (37 h at a 600 µg/g concentration). *Aspergillus parasiticus* showed gradual decreases as increased concentrations were assayed, except for the 150 µg/g concentration, and a significant increase on lag phase at the highest concentrations tested (45 and 48 h, respectively). The data presented here are very important for the continued efforts of microbiological control in food, especially when it comes to control fungi.

Keywords: Antifungal, aromatic plants, mycotoxin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do gênero <i>Aspergillus</i> .	6
Tabela 2. Rendimentos da produção de óleos essenciais por hidrodestilação.	18
Tabela 3. Análise do efeito de diferentes concentrações de óleo essencial de alecrim sob a velocidade de crescimento e a fase de latência das cepas de <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i> .	25
Tabela 4. Análise do efeito de diferentes concentrações de óleo essencial de orégano sob a velocidade de crescimento e a fase de latência das cepas de <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i> .	28
Tabela 5. Análise do efeito de diferentes concentrações de extrato vegetal de cravo-da-Índia sob a velocidade de crescimento e a fase de latência das cepas de <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i> .	30
Tabela 6. Análise do efeito de diferentes concentrações de extrato vegetal de cominho sob a velocidade de crescimento e a fase de latência das cepas de <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i> .	32
Tabela 7. Análise do efeito de diferentes concentrações do óleo essencial hexânico de orégano sob a velocidade de crescimento e a fase de latência das cepas de <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i> .	34
Tabela 8. Análise do efeito de diferentes concentrações óleo essencial hexânico de canela sob a velocidade de crescimento e a fase de latência das cepas de <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i> .	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Milho contaminado por <i>Aspergillus flavus</i> .	4
Figura 2. Formas de vesículas de <i>Aspergillus</i> spp: (a) globoso ou esférico; (b) piriforme; (c) espatulado; (d) clavado.	5
Figura 3. Conidióforos de (a) <i>Aspergillus clavatus</i> (unisseriado) e (b) <i>Aspergillus flavus</i> (bisseriado).	6
Figura 4. Macroscopia de (a) <i>Aspergillus flavus</i> e (b) <i>Aspergillus parasiticus</i> .	7
Figura 5. Microscopia de <i>Aspergillus flavus</i> (400x).	8
Figura 6. (a) Microscopia de <i>Aspergillus parasiticus</i> (400x); (b) Observação de conídios rugosos (400x).	8
Figura 7. Estrutura das principais aflatoxinas.	9
Figura 8. Embalagem de orégano devidamente identificada e armazenada.	15
Figura 9. Aparelho de Clevenger utilizado na hidrodestilação.	15
Figura 10. Análise das placas controle do teste de difusão <i>in vitro</i> para (a) <i>Aspergillus flavus</i> e (b) <i>Aspergillus parasiticus</i> , sendo água destilada (A), etanol (E) e hexano (H).	19
Figura 11. Análise <i>in vitro</i> da difusão dos óleos essenciais de noz moscada (NM), erva-doce (ED), cravo-da-Índia (CR), alecrim (AL), cominho (CO), orégano (OR), canela (CA) manjerona (MO), manjerição (MC) e hortelã (HT), sob a inibição do crescimento de <i>Aspergillus flavus</i> .	19
Figura 12. Análise <i>in vitro</i> da difusão dos óleos essenciais de noz moscada (NM), erva-doce (ED), cravo-da-Índia (CR), alecrim (AL), cominho (CO), orégano (OR), canela (CA) manjerona (MO), manjerição (MC) e hortelã (HT), sob a inibição do crescimento de <i>Aspergillus parasiticus</i> .	20
Figura 13. Análise <i>in vitro</i> da difusão dos óleos essenciais hexânicos de noz moscada (NM), erva-doce (ED), cravo-da-Índia (CR), alecrim (AL), cominho (CO), orégano (OR), canela (CA) manjerona (MO), manjerição (MC) e hortelã (HT), sob a inibição do crescimento de <i>Aspergillus flavus</i> .	20
Figura 14. Análise <i>in vitro</i> da difusão dos óleos essenciais hexânicos de noz moscada (NM), erva-doce (ED), cravo-da-Índia (CR), alecrim (AL), cominho (CO), orégano (OR), canela (CA) manjerona (MO), manjerição (MC) e hortelã (HT), sob a inibição do crescimento de <i>Aspergillus parasiticus</i> .	21

Figura 15. Análise <i>in vitro</i> da difusão dos extratos aquosos de noz moscada (NM), erva-doce (ED), cravo-da-Índia (CR), alecrim (AL), cominho (CO), orégano (OR), canela (CA) manjerona (MO), manjericão (MC) e hortelã (HT), sob a inibição do crescimento de <i>Aspergillus flavus</i>	21
Figura 16. Análise <i>in vitro</i> da difusão dos extratos aquosos de noz moscada (NM), erva-doce (ED), cravo-da-Índia (CR), alecrim (AL), cominho (CO), orégano (OR), canela (CA) manjerona (MO), manjericão (MC) e hortelã (HT), sob a inibição do crescimento de <i>Aspergillus parasiticus</i> .	22
Figura 17. Análise <i>in vitro</i> da difusão dos extratos etanólicos de noz moscada (NM), erva-doce (ED), cravo-da-Índia (CR), alecrim (AL), cominho (CO), orégano (OR), canela (CA) manjerona (MO), manjericão (MC) e hortelã (HT), sob a inibição do crescimento de <i>Aspergillus flavus</i> .	22
Figura 18. Análise <i>in vitro</i> da difusão dos extratos etanólicos de noz moscada (NM), erva-doce (ED), cravo-da-Índia (CR), alecrim (AL), cominho (CO), orégano (OR), canela (CA) manjerona (MO), manjericão (MC) e hortelã (HT), sob a inibição do crescimento de <i>Aspergillus parasiticus</i> .	23
Figura 19. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa <i>Aspergillus flavus</i> frente à adição do óleo essencial de alecrim a diferentes concentrações.	24
Figura 20. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa <i>Aspergillus parasiticus</i> frente à adição do óleo essencial de alecrim a diferentes concentrações.	24
Figura 21. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa <i>Aspergillus flavus</i> frente à adição do óleo essencial de orégano a diferentes concentrações.	26
Figura 22. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa <i>Aspergillus parasiticus</i> frente à adição do óleo essencial de orégano a diferentes concentrações.	27
Figura 23. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa <i>Aspergillus flavus</i> frente à adição do extrato vegetal de cravo-da-Índia a diferentes concentrações.	29
Figura 24. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa <i>Aspergillus parasiticus</i> frente à adição do extrato vegetal de cravo-da-Índia a diferentes concentrações.	30
Figura 25. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa <i>Aspergillus flavus</i> frente à adição do extrato vegetal de cominho a diferentes concentrações.	31
Figura 26. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa <i>Aspergillus parasiticus</i> frente à adição do extrato vegetal de cominho a diferentes concentrações.	32
Figura 27. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa <i>Aspergillus flavus</i> frente à adição do óleo essencial hexânico de orégano a diferentes concentrações.	33

- Figura 28.** Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa *Aspergillus parasiticus* frente à adição do óleo essencial hexânico de óregano a diferentes concentrações. 34
- Figura 29.** Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa *Aspergillus flavus* frente à adição do óleo essencial hexânico de canela a diferentes concentrações. 35
- Figura 30.** Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa *Aspergillus parasiticus* frente à adição do óleo essencial hexânico de canela a diferentes concentrações. 36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Hipótese	2
1.2 Objetivos	2
1.2.1 Objetivo geral	2
1.2.2 Objetivos específicos	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Micologia de alimentos	4
2.2 O gênero <i>Aspergillus</i>	5
2.2.1 Caracterização das espécies <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	7
2.3 Aflatoxinas	8
2.3.1 A aflatoxina B ₁	10
2.4 O uso de substâncias fungicidas	10
2.5 Produtos de origem vegetal	11
2.6 Atividade antimicrobiana	11
2.6.1 Alecrim	11
2.6.2 Canela	12
2.6.3 Cominho	12
2.6.4 Cravo-da-Índia	13
2.6.5 Orégano	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Cepas fúngicas	14
3.2 Capacidade toxígena das cepas	14
3.3 Amostragem do material vegetal	14
3.4 Extração dos óleos essenciais	15
3.5 Obtenção dos extratos vegetais	16
3.6 Seleção dos óleos essenciais e extratos vegetais de maior atividade antifúngica pelo método de difusão em agar	16
3.7 Avaliação dos óleos essenciais e extratos vegetais sobre o crescimento das cepas toxígenas produtoras de aflatoxina B ₁	17
3.8 Análises estatísticas	17

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Verificação da produção de aflatoxina B ₁ por cepas toxígenas de <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	18
4.2 Avaliação do rendimento da produção de óleos essenciais	18
4.3 Avaliação dos ensaios <i>in vitro</i> de difusão em agar	18
4.3.1 Óleos essenciais	19
4.3.2 Extratos vegetais	21
4.4 Avaliação do efeito dos óleos essenciais e extratos vegetais sobre o desenvolvimento de cepas toxígenas de <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	23
4.4.1 Efeito <i>in vitro</i> da adição do óleo essencial de alecrim sob a velocidade de crescimento e fase de latência das cepas analisadas	23
4.4.2 Efeito <i>in vitro</i> da adição do óleo essencial de orégano sob a velocidade de crescimento e fase de latência das cepas analisadas	26
4.4.3 Efeito <i>in vitro</i> da adição do extrato vegetal de cravo-da-Índia sob a velocidade de crescimento e fase de latência das cepas analisadas	28
4.4.4 Efeito <i>in vitro</i> da adição do extrato vegetal de cominho sob a velocidade de crescimento e fase de latência das cepas analisadas	31
4.4.5 Efeito <i>in vitro</i> da adição do óleo essencial hexânico de orégano sob a velocidade de crescimento e fase de latência das cepas analisadas	33
4.4.6 Efeito <i>in vitro</i> da adição do óleo essencial hexânico de canela sob a velocidade de crescimento e fase de latência das cepas analisadas	35
5 CONCLUSÕES	37
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1 INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos, também conhecidos como mofo ou bolores, são seres vivos eucarióticos com ampla capacidade de adaptação e crescimento sob condições de umidade e temperatura bem variáveis. São seres ubíquos, sendo encontrados amplamente no solo, na água, nos vegetais, nos animais, no homem e em detritos em geral.

A contaminação dos alimentos por fungos pode ocasionar redução na capacidade de germinação de grãos, redução de seu valor nutricional além de produção de micotoxinas, substâncias tóxicas produzidas durante o metabolismo secundário de determinadas cepas de fungos filamentosos. Essa contaminação por fungos pode ocorrer a nível de campo ou ainda durante o armazenamento ou estocagem do produto.

É cada vez maior o conhecimento acerca dessas micotoxinas e de suas conseqüências para a sociedade, sendo altamente relacionadas com diversas perdas econômicas para o país. Ao serem ingeridas, inaladas ou absorvidas pela pele ou mucosas causam manifestações sintomáticas de acordo com suas ações e, em último caso, mortalidade animal como também humana.

O gênero *Aspergillus* consta de um dos principais grupos de fungos contaminantes de alimentos, tendo como alvos potenciais grãos e sementes armazenados, inclusive matérias-primas para produção de diversos alimentos utilizados na nutrição animal. Agrupa diversas espécies potencialmente toxígenas, como *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, grandes produtores de um grupo de micotoxinas denominado aflatoxinas (AFs).

As AFs constituem-se em potentes substâncias com efeitos mutagênicos, carcinogênicos, teratogênicos, hepatotóxicos e imunossupressores, sendo capazes de alterar diversos sistemas metabólicos. Classificadas no grupo de carcinógenos de Classe 1 segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 1993), são largamente estudadas hoje em dia, sendo relacionadas como causa de alta mortalidade em animais de produção e, muitas vezes, de humanos também.

Dentre as diferentes classes de AFs, a aflatoxina B₁ (AFB₁) é a mais relevante em termos de riscos para a saúde humana, apresentando o maior grau de toxicidade para animais, seguida das aflatoxinas M₁ (AFM₁), G₁ (AFG₁), B₂ (AFB₂) e G₂ (AFG₂). Tal fato é importante ao analisarmos a situação do país frente a esta realidade.

A legislação brasileira (MAPA, 1988) admite um nível máximo de contaminação por aflatoxinas totais equivalente a 50 ng/g (ppb), sendo válida para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente em rações destinadas ao consumo animal. Sabe-se que cerca de 1% da AFB₁ ingerida na alimentação animal será excretada no leite na forma de AFM₁, seu metabólito hidroxilado. Por conta disso, houve a preocupação de alguns países criarem regulamentação específica para estas micotoxinas, como a comunidade européia que fixou um limite de cinco ng/g (ppb) na alimentação animal, correspondendo a somente 0,05 ng/g (ppb) no leite produzido. Em nosso país, a legislação vigente visa principalmente produtos destinados à exportação.

No Brasil, pesquisas acerca da qualidade dos alimentos destinados ao consumo animal cada vez mais vêm demonstrando os problemas causados pelas micotoxinas. O clima tropical e subtropical de certas regiões brasileiras favorece o desenvolvimento de fungos e a produção das micotoxinas. As exigências do mercado consumidor, aliadas a esta característica climática, e o controle exercido pelas agências governamentais nacionais e internacionais, apontam para a necessidade da implementação de programas de monitoramento da qualidade

dos alimentos, bem como novas formas de controle e prevenção dessas contaminações fúngicas.

Diversos fungicidas são utilizados hoje em dia, contudo sua segurança nos alimentos não está completamente estabelecida. Antioxidantes sintéticos, como o hidroxianisol butilado (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT), são comumente utilizados em alimentos para prevenir ou retardar a oxidação lipídica, contudo, presume-se que são possíveis carcinógenos. É importante considerar que há um grande interesse na indústria de alimentos e nas preferências dos consumidores por antioxidantes naturais. A utilização de numerosos produtos vegetais e de seus componentes constitui uma alternativa para a prevenção do crescimento fúngico e a consequente produção de aflatoxinas.

Há evidências experimentais que relacionam as micotoxicoses com o estresse oxidativo. A incorporação na dieta de extratos vegetais de plantas aromáticas, que podemos considerar como um sistema antioxidante de multicomponentes, fenóis e/ou óleos essenciais evitaria a deterioração oxidativa do alimento além de diminuir o estresse oxidativo do fungo no alimento e, como resultado dessa ação, diminuir a produção da toxina que ao ser ingerida através do alimento, teria seu efeito diminuído no organismo que a consome. As ervas aromáticas são uma fonte importante de antioxidantes, tanto por um aporte de constituintes fenólicos como por seus óleos essenciais (OE).

No Brasil, são escassos os dados sobre as propriedades dos derivados vegetais com relação aos fungos toxígenos e suas micotoxinas associadas. Por outro lado, são cultivadas diversas espécies de plantas, algumas das quais serão avaliadas nesta dissertação.

1.1 Hipótese

Os antioxidantes naturais de plantas cultivadas no Brasil são capazes de inibir o crescimento de fungos produtores de AFB₁.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência que os aditivos de origem vegetal exercem sobre o crescimento de cepas produtoras de AFB₁.

1.2.2 Objetivos específicos

- a. Caracterizar o perfil toxígeno das cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus* utilizadas durante o experimento;
- b. Obter os óleos essenciais a partir do material vegetal: hidrodestilação e extração hexânica;
- c. Obter os extratos vegetais a partir do material vegetal: concentrado aquoso pós hidrodestilação e extrato etanólico;
- d. Avaliar e selecionar *in vitro*, através do método de difusão em agar os extratos vegetais e/ou óleos essenciais com maior capacidade de inibição do crescimento dos fungos produtores de AFB₁;

- e. Avaliar *in vitro* o material selecionado no item d sobre a velocidade de crescimento e fase de latência dos fungos produtores de AFB₁;
- f. Otimizar as condições do laboratório para execução das metodologias de extração a partir do material vegetal e dos ensaios anti-fúngicos *in vitro*;
- g. Analisar estatisticamente os resultados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Micologia de alimentos

Os problemas causados pelo desenvolvimento de fungos em alimentos e matérias primas constam de uma grande preocupação hoje para a indústria alimentícia e veterinária, sendo considerada uma contaminação mais comum que as originadas por qualquer outro grupo de microrganismos (PEREIRA; CARVALHO; PRADO, 2002). Quando há desenvolvimento fúngico em grãos, considerados constituintes básicos em rações para animais, há uma queda drástica de seu valor nutritivo, já que os nutrientes serão então utilizados pelos fungos contaminantes, diminuindo a qualidade da ração e, conseqüentemente, a produção animal (Figura 1).



Figura 1. Milho contaminado por *Aspergillus flavus*.

Fonte: <http://www.ipm.iastate.edu/ipm/icm/files/images/aspercorn.jpg>

O crescimento de fungos em produtos agrícolas é influenciado por diversos fatores, tais como: componentes minerais, potencial hidrogeniônico (pH), atividade de água do substrato, umidade ambiental, temperatura além de danos físicos presentes nesses substratos causados por insetos ou ainda transporte e armazenagem inadequados, que facilitam o desenvolvimento fúngico nessas matérias, já que permitem uma quebra da integridade dos grãos (PITT; HOCKING, 1997). Os países tropicais sofrem bastante com tal contaminação já que possuem temperaturas e umidades altas, dificultando a secagem ideal dos grãos.

Uma vez presentes no alimento e obtendo as condições ideais, alguns fungos são ainda capazes de produzir metabólitos tóxicos a partir de seu metabolismo secundário, contaminando principalmente produtos de origem vegetal, sendo tais substâncias denominadas micotoxinas.

No entanto, é importante salientar que, o isolamento de fungos toxígenos, a partir de alimentos, não significa obrigatoriamente risco imediato para o consumo, já que a cepa pode não ser uma potencial produtora. Assim como, a ausência de fungos no substrato não significa ausência de micotoxinas, já que o fungo pode ter produzido seus metabólitos, mas por algum motivo não sobreviveu a certas condições as quais o alimento passou, como processamento, por exemplo (PITT; HOCKING, 1997).

2.2 O gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* é considerado de grande importância, sendo um dos principais contaminantes durante o armazenamento inadequado dos alimentos. São fungos filamentosos, ubíquos, comumente isolados na natureza, no solo, no ar e materiais vegetais, possuindo mais de 180 espécies descritas atualmente (SAMSON et al., 2000).

São conhecidos também por causarem infecções oportunistas em pacientes com imunossupressão, estados alérgicos e toxicoses que variam desde infecções locais até disseminação completa (aspergilose), onde quase todos os órgãos podem ser comprometidos causando, por exemplo, oncomiçose, sinusite, aspergilose cerebral, miocardite, aspergilose pulmonar, etc, tanto em humanos quanto em animais (KELLER, 2009).

Consta de um grande grupo de fungos, onde muitos são potenciais produtores de toxinas, principalmente aflatoxinas, e em especial com as espécies da Seção Flavi: *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Sua reprodução ocorre de forma assexuada através de conídios, embora algumas espécies apresentem a forma sexuada (teleomorfo) do tipo ascosporada, como é o caso do *A. nidulans* e *A. glaucus*.

Este gênero pertence à classe dos Hyphomycetos e é caracterizado pela formação de conidióforos, ou seja, hifas especializadas e produtoras de conídios com formas e arquitetura variáveis (PITT; HOCKING, 1997). Os conidióforos de *Aspergillus* spp. caracterizam-se por apresentar um formato bem distinto, com o ápice de sua estipe se expandindo em uma vesícula que pode apresentar diferentes formatos (Figura 2).

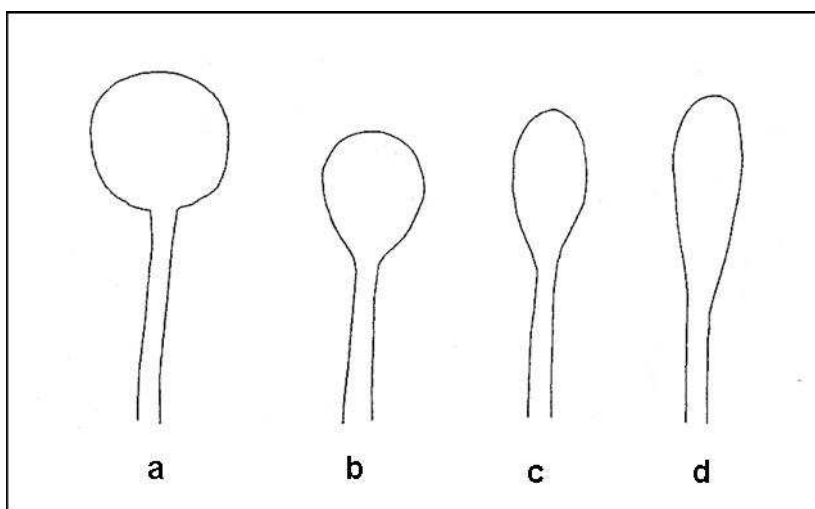


Figura 2. Formas de vesículas de *Aspergillus* spp: (a) globoso ou esférico; (b) piriforme; (c) espatulado; (d) clavado.

Fonte: KLICH (2002).

Em algumas espécies, os conídios se formam diretamente das fiálides, sendo denominadas espécies unisseriadas. Podem também apresentar entre a vesícula e as fiálides uma segunda camada de células chamadas métulas, sendo tais espécies caracterizadas como bisseriadas (Figura 3). Outra característica que distingue tal gênero é que, tanto métulas quanto fiálides surgem simultaneamente a partir da vesícula (KLICH, 2002). Tais características em conjunto com outros achados microscópicos e com observações macroscópicas servem de base para a taxonomia deste importante gênero fúngico.

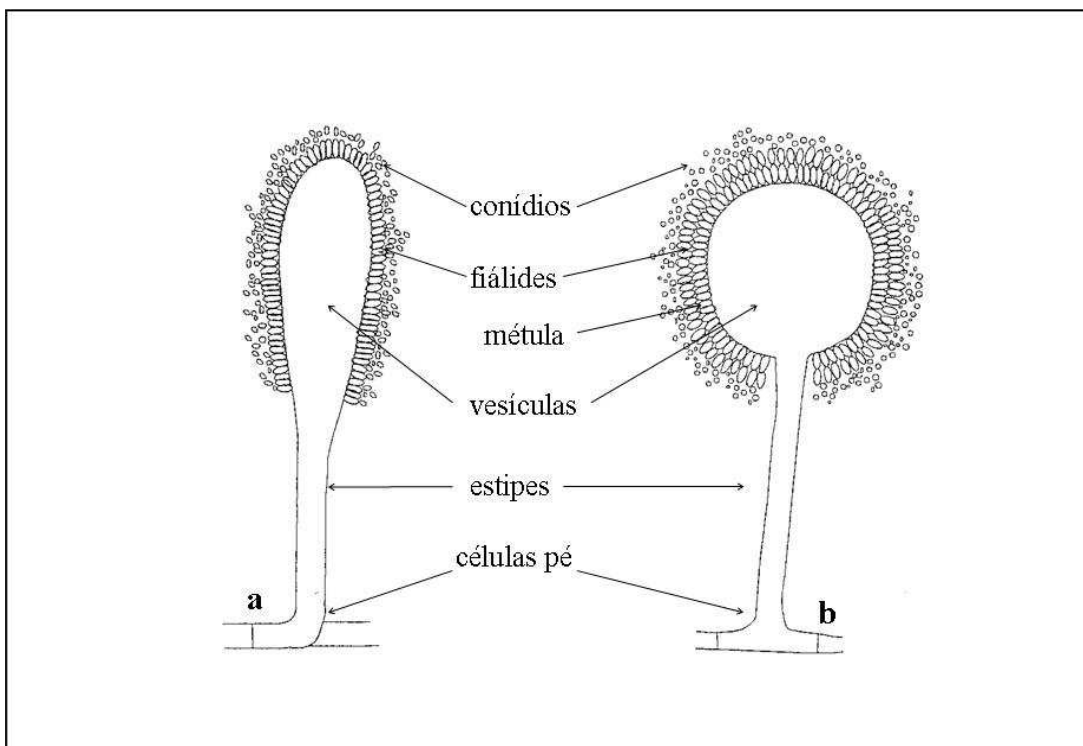


Figura 3. Conidióforos de (a) *Aspergillus clavatus* (unisseriado) e (b) *Aspergillus flavus* (bisseriado).

Fonte: KLICH (2002), modificado.

A fim de facilitar o estudo das numerosas espécies pertencentes a este gênero, alguns autores os dividiram em subgêneros e seções baseados em características comuns como coloração dos conídios, tamanho e formato da vesícula, presença de teleomorfos, etc. (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação do gênero *Aspergillus*.

Subgênero	Seção
<i>Aspergillus</i>	Aspergillus
	Restricti
<i>Fumigati</i>	Fumigati
	Cervini
<i>Ornati</i>	-
<i>Clavati</i>	Clavati
<i>Nidulantes</i>	Nidulantes
	Versicolores
	Usti
	Terrei
	Flavipedes
<i>Circumdati</i>	Wentii
	Flavi
	Nigri
	Circumdati
	Candidi
	Cremei
Sparsi	

O subgênero *Circumdati* compreende espécies unisseriadas e bisseriadas, com vesículas que variam do formato esférico ao piriforme. A seção Flavi, pertencente a este subgênero, possui como características a presença de conídios verde-amarelados a marrom-oliva. Dentro desta seção encontram-se as espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, potenciais produtoras de aflatoxinas e alvo deste estudo.

2.2.1 Caracterização das espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*

Aparentemente semelhantes, *A. flavus* e *A. parasiticus* são espécies amplamente distribuídas ao redor do mundo. Enquanto *A. flavus* é relatado como a espécie mais isolada em alimentos, ambos são relatados como colonizando também vegetação, sementes e diversos substratos em ambientes internos e externos, sendo reportado inclusive como patógeno para insetos e animais (PITT; HOCKING, 1997; SAMSON et al., 2000).

Devido as suas semelhanças, há uma grande dificuldade em identificar e diferenciar essas duas espécies fúngicas, já que a maior diferença entre elas se encontra microscopicamente.

Macroscopicamente observa-se que as colônias de *A. flavus* possuem conídios abundantes que conferem à colônia uma coloração que varia do verde ao verde-oliva, podendo ter cepas algumas vezes amareladas. O micélio apresenta-se branco, reverso pálido a alaranjado, podendo haver presença de exsudato transparente e esclerócios, estruturas de resistência fúngica. O aspecto geral de suas colônias varia de lanoso a flocoso (Figura 4). Já *A. parasiticus* apresenta colônias de coloração oliva escuro ou verde bem escuro. O micélio é branco e usualmente imperceptível. Esclerócios marrons ou negros são ocasionalmente produzidos, podendo haver produção de exsudato hialino. O reverso varia de pálido a amarelado e o aspecto da colônia costuma ser plano e aveludado (KLICH, 2002).

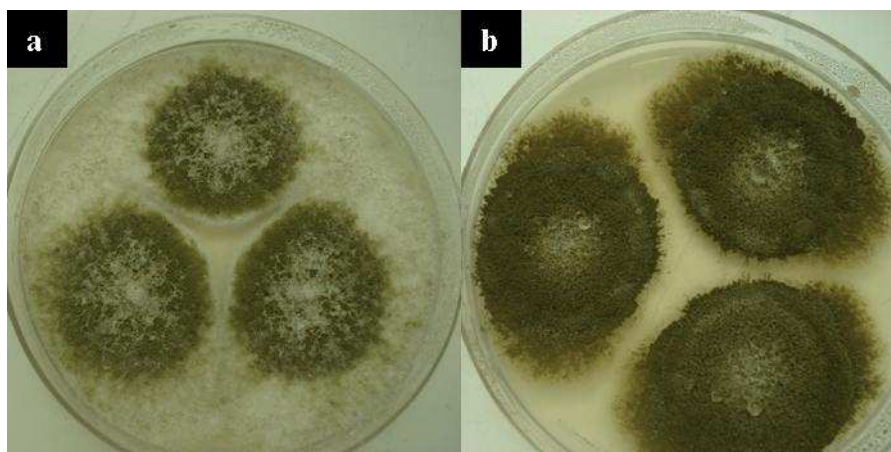


Figura 4. Macroscopia de (a) *Aspergillus flavus* e (b) *Aspergillus parasiticus*.

A espécie *A. flavus* possui como características microscópicas vesículas esféricas, radiadas a colunares, podendo ser tanto unisseriados quanto bisseriados dependendo do meio de cultivo. Sua estipe é rugosa a finamente rugosa e geralmente sem cor. Os conídios apresentam-se globosos a elipsoidais, com paredes lisas a finamente rugosas (Figura 5).

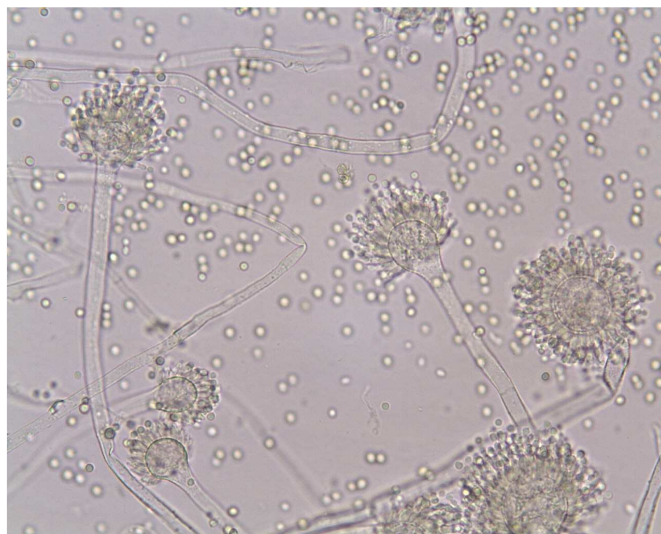


Figura 5. Microscopia de *Aspergillus flavus* (400x).

Por outro lado, *A. parasiticus* apresenta vesículas esféricas a levemente alongadas, usualmente radiadas. As estipes variam de finamente a muito rugosas. São predominantemente unisseriados, com conídios globosos e, diferentemente de *A. flavus*, de paredes bem rugosas (Figura 6).



Figura 6. (a) Microscopia de *Aspergillus parasiticus* (400x); (b) Observação de conídios rugosos (400x).

A principal importância dessas espécies reside no fato de que ambas são potencialmente produtoras de aflatoxinas.

2.3 Aflatoxinas

A presença dessas toxinas nos alimentos tem sido objeto de grande preocupação para a ciência, desde a sua descoberta. Foram caracterizadas e isoladas em 1960, na Inglaterra, após a morte de mais de 100.000 perus que consumiram ração à base de amendoim mofado, provenientes do Brasil e da África (*turkey X disease*) (PEREIRA; CARVALHO; PRADO, 2002). Existem mais de 20 tipos de moléculas de aflatoxinas (AFs) sendo as quatro principais

B₁, B₂, G₁ e G₂. São classificadas com base nas suas fluorescências sob luz UV (azul ou verde – do inglês *blue* ou *green*) além de sua mobilidade em cromatografia em camada delgada (TLC – *thin layer chromatography*) (BENNETT; KLICH, 2003). A biotransformação desses quatro tipos, em diversas espécies animais, resulta na produção de M₁ e M₂, que foram isoladas inicialmente no leite e urina de animais que consumiram AFs (FERREIRA et al., 2006).

As AFs são metabólitos secundários produzidos principalmente por algumas cepas de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Tais toxinas são tóxicas de forma aguda e crônica para humanos e animais, estando entre as substâncias mutagênicas e carcinogênicas mais potentes produzidas na natureza (THANABORIPAT et al., 2007). Também possuem efeitos teratogênicos, hepatotóxicos e imunossupressores, sendo capazes de alterar diversos sistemas metabólicos (ELLIS; SMITH; SIMPSON, 1991; MINTO; TOWNSEND, 1997), tendo sido relacionadas como causas de alta mortalidade em animais de produção e muitas vezes, como causadoras de mortalidade em humanos (ALLOCRAFT, 1969; SALUNKHE; ADSULE; PADULE, 1987).

A capacidade de produção de aflatoxinas depende dos sistemas metabólicos individuais, essenciais para o metabolismo primário de lipídios e enzimas específicas (sintetases) capazes de produzir tais metabólitos secundários (MARTINS; MARTINS; BERNARDO, 2000).

As estruturas químicas das AFs são muito semelhantes. Possuem baixo peso molecular e um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bi-furanóide, no entanto, enquanto as AFs do tipo B apresentam anel ciclopentona, as da série G apresentam um anel lactona (Figura 7). Além disso, são compostos cristalinos, termoestáveis e solúveis em solventes polares, como clorofórmio e metanol (OGIDO, 2003).

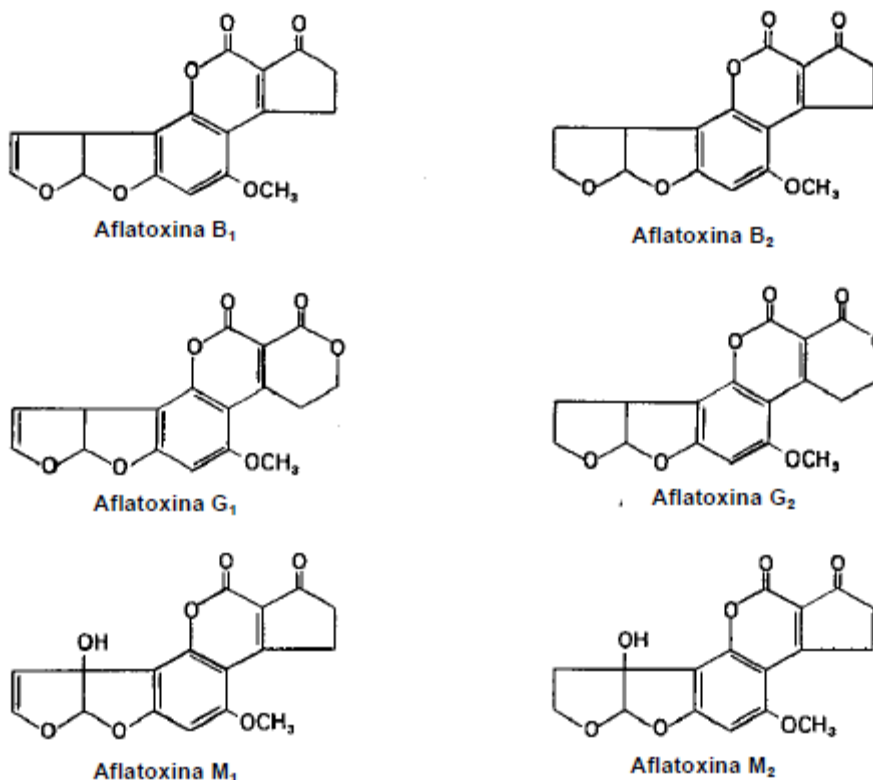


Figura 7. Estrutura das principais aflatoxinas.

Fonte: <http://www.fao.org/docrep/X5036E/x5036E27.GIF>, modificado.

As AFs se desenvolvem naturalmente em diversos tipos de cereais e matérias primas, como amendoim, arroz, milho, trigo. Todos esses alimentos devem ser então alvos de controle contra a contaminação fúngica, principalmente por constituírem um grupo de alimentos muito consumidos por brasileiros, além de ser base para alimentação de muitos animais de produção.

A legislação brasileira estabeleceu através da Resolução RDC número 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002, um limite máximo de 20 µg/kg (ppb) de aflatoxinas totais, ou seja AFB₁ + AFG₁ + AFB₂ + AFG₂, em amendoim e seus derivados e em milho e seus derivados que sejam destinados ao consumo humano. Para qualquer matéria prima destinada ao consumo animal, o Ministério da Agricultura, através da portaria MA/SNAD/SFA número 07, de 9 de novembro de 1988 estabelece um limite máximo de 50 µg/kg para aflatoxinas totais. Enquanto isso, países da União Européia possuem limites melhor definidos adotando, por exemplo, como limite máximo o valor de 10 µg/kg apenas para AFB₁ em rações prontas, e 2 µg/kg de AFB₁ para amendoim, nozes em geral e frutas secas destinadas ao consumo direto ou como ingrediente de alimentos (FONSECA, 2003).

Estudos da incidência de micobiota e detecção de micotoxinas em alimentos destinados ao consumo humano e animal demonstram a presença das principais espécies produtoras de aflatoxinas, em níveis acima dos preconizados (DALCERO et al., 1997, 1998; MAGNOLI et al., 1998, 1999, 2002, 2006). Tais fatos demonstram uma constante preocupação a nível de controlar fungos e com isso a presença de micotoxinas em alimentos.

2.3.1 A aflatoxina B₁

Apesar das semelhanças estruturais das AFs, estas apresentam diferentes graus de atividade biológica. A AFB₁ é a mais significativa em termos de risco para a saúde humana e animal. Os alimentos contaminados com fungos produtores e a presença de AFs são de grande interesse mundial devido aos efeitos deletérios que produzem não somente no nível de saúde, como também para o comércio internacional (MISHRA; DAS, 2003).

2.4 O uso de substâncias fungicidas

Diversos fungicidas encontram-se em uso, contudo sua segurança nos alimentos não está completamente estabelecida, e as possibilidades de obtenção de novos compostos, que cumpram com os requisitos ambientais e os requerimentos de segurança, são escassas (GOPALKRISHNAN; BANUMATHI; SURESH, 1997).

Antioxidantes sintéticos, como BHA e BHT, são comumente utilizados em alimentos para prevenir ou retardar a oxidação lipídica, contudo, presume-se que são possíveis carcinógenos (MADHAVI; SALUNKHE, 1996). Além do mais, há um considerável interesse na indústria de alimentos e nas preferências dos consumidores por antioxidantes naturais.

Uma das formas de se obter antioxidantes naturais se dá pelo uso de materiais vegetais, como através de seus OEs e EVs. A atividade antioxidante desses extratos vegetais ocorre principalmente pela presença de compostos fenólicos, como também por flavonóides e terpenóides. Tais substâncias são capazes de interceptar e neutralizar radicais livres, impedindo que a oxidação ocorra (RIZZO, 2008).

O uso de numerosos extratos vegetais, e seus componentes constitui uma alternativa para a prevenção do crescimento fúngico e a produção de AFs.

Estudos *in vitro* com adsorventes não nutritivos (zeolitas e bentonitas) demonstraram que estes foram capazes de adsorver AFB₁ e seus resultados foram promissores (CHIACCHIERA et al., 2000; KIKOT et al., 2002). A extrapolação destes estudos para ensaios *in vivo* demonstrou a capacidade destas partículas para diminuir os efeitos da

aflatoxicose em frangos de corte (MIAZZO et al., 2000; ROSA et al., 2001). Entretanto, um dos inconvenientes do uso de substâncias inorgânicas é sua inespecificidade com relação a sua capacidade de adsorção, já que podem seqüestrar moléculas de alto valor nutritivo da dieta. Atualmente, os extratos vegetais são de grande interesse como uma fonte inócua. Foi comprovado que são muito efetivos como substitutos dos agentes químicos antimicrobianos produzidos sinteticamente (ZYGADLO et al., 1995a,b; ZYGADLO; JULIANI, 2000). Alguns produtos naturais tais como os fenóis, especiarias e vários óleos essenciais, foram evidenciados como inibidores efetivos do crescimento fúngico e da produção de AFs (PRASAD; SAHAY; MASOOD, 1994; ARORA; OHLAN, 1997).

2.5 Produtos de origem vegetal

Os EVs são tidos como importantes componentes para a história da humanidade, sendo tal utilização difundida além do uso culinário, como por exemplo, em tratamento de doenças na medicina tradicional e alternativa e rituais religiosos (RIZZO, 2008). Existem várias metodologias descritas para a preparação de EVs, visando o isolamento de seus constituintes químicos. Cechinel Filho; Yunes (1998) consideram mais adequado para a análise químico-farmacológica a preparação de um extrato hidroalcoólico (etanol/água 50/50, v/v).

Os OEs são definidos como líquidos aromáticos oleosos obtidos a partir de diversos materiais vegetais (flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutas e raízes). Podem ser extraídos através de diversos métodos reconhecidos, mas a destilação a vapor consta como o mais comum e largamente utilizado para fins comerciais. Tal método foi usado primeiramente há mais de 2000 anos atrás no Oriente Médio, mas seu uso só foi difundido por toda a Europa a partir do século XIII, dando início então aos estudos com uso de materiais vegetais (BURT, 2004).

Ultimamente verifica-se um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais visando obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Outro aspecto a ser ressaltado é a quantidade de plantas existente no planeta, sendo a maioria ainda desconhecida sob o ponto de vista científico, onde entre aproximadamente um total de 250-500 mil espécies, somente cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor avaliadas sob os aspectos biológicos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, taninos, lignanas, torna-se de grande importância já que muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes antimicrobianos e, o fato dos produtos de origem vegetal possuírem mais de um princípio ativo quando comparados aos antimicrobianos tradicionais já confere certa vantagem a seu uso na prática.

No Brasil, são escassos os dados sobre as propriedades dos extratos vegetais com relação aos fungos toxígenos e suas micotoxinas associadas. Por outro lado, são cultivadas diversas espécies de plantas que poderiam ser avaliadas com este propósito.

2.6 Atividade antimicrobiana

2.6.1 Alecrim

O alecrim (*Rosmarinus officinalis*), pertence à família Lamiaceae, sendo um arbusto perene, nativo do Mediterrâneo, que atinge até 1,5 m de altura (PORTE; GODOY, 2001).

Vários trabalhos têm sido publicados em relação ao isolamento e identificação de diferentes antioxidantes, diterpenos e triterpenos, bem como flavonóides desta planta,

substâncias essas que conferem ao alecrim um efetivo agente antimicrobiano (SOLIMAN et al., 2001; MORENO et al., 2006; GENENA et al., 2008; ROZMAN; JERSEK, 2009).

Soliman et al. (2006) analisaram OEs de alecrim de diferentes partes do Egito. Encontraram em seu trabalho atividade inibitória contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacterium intracellulare*, mas nenhuma atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *A. flavus*, *A. fumigatus* e *Trichophyton mentagrophytes*. A ação antifúngica, portanto está presente para algumas espécies, sendo bastante utilizada no tratamento de pneumonia causadas por *C. neoformans*, bem como para o tratamento de infecções cutâneas e diarreia provocadas por *C. albicans*.

Queijos do tipo cheddar foram cobertos com óleo de alecrim a fim de retardar a deterioração por fungos *Penicillium roqueforti*, *P. camemberti* e *A. parasiticus*. Os resultados demonstraram que o OE de alecrim não foi eficiente para retardar a deterioração causada por *P. roqueforti*, contudo inibiu o crescimento de *P. camemberti* e *A. parasiticus* (WENDORFF; WEE, 1997).

Apesar de cultivado em quase todo o território brasileiro há poucos estudos realizados sobre esta importante planta condimentar em nível nacional, principalmente a respeito de atividade antifúngica e produção de micotoxinas.

2.6.2 Canela

A canela (*Cinnamomum zeylanicum*) é uma especiaria muito utilizada na culinária como condimento e aromatizante. Nativa da Índia e do Sri Lanka, hoje em dia é cultivada em muitos países tropicais, inclusive o Brasil. Existem diversos trabalhos que indicam algumas substâncias presentes em seu OE responsáveis por agir inibindo crescimento de fungos, leveduras e bactérias.

Soliman; Badeaa (2002) encontraram que concentrações ≤ 500 $\mu\text{g/g}$ foram capazes de inibir *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *Fusarium verticillioides* quando incorporados em meio agar batata dextrosado (BDA). Azzouz; Bullerman (1982) também encontraram este OE numa concentração de 2% em BDA inibindo completamente o crescimento de sete fungos micotoxígenos: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *Penicillium* sp. M46, *P. roqueforti*, *P. patulum* and *P. citrinum*, enquanto Conner; Beuchat (2006) verificaram esta ação inibitória em leveduras.

No continente americano, o OE de canela é utilizado principalmente no tratamento para diarreia, contra doenças respiratórias e como anti-séptico cutâneo (PITTMAN, 2000), tendo efeitos promissores na inibição fúngica.

2.6.3 Cominho

Cominho (*Cuminum cyminum*) é uma planta aromática da família Apiaceae, principalmente utilizadas para saborizar alimentos, adicionado em fragrâncias e em preparações médicas. Outra forma de uso descrita seria como anti-espasmódico e estimulante de apetite (IACOBELLIS et al., 2005).

Iacobellis et al. (2005) relataram haver atividade antibacteriana do OE de cominho contra cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Gachkar et al. (2007) verificaram haver alta atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*.

Os relatos deste OE frente a inibição fúngica são escassos, necessitando de mais estudos.

2.6.4 Cravo-da-Índia

O cravo-da-Índia, frutos secos de *Eugenia caryophyllata*, pertencem a família Myrtaceae, sendo um tempero com vasta gama de propriedades medicinais (FERDOUS, ISLAM, 1991). Propriedades antibacterianas de cravo já foram relatadas por Ueda et al. (1982), Briozzo et al. (1989), Islam et al. (1990).

Segundo Briozzo et al. (1989) o óleo essencial de cravo disperso em solução concentrada de açúcar (0,4% v/v) revelou efeito germicida marcante contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli*.

Ferdous; Islam (1991) verificaram haver atividade antifúngica em extratos clorofórmico, etanólico e aquoso de cravo.

2.6.5 Orégano

O orégano (*Origanum vulgare*) é uma erva perene e aromática. Suas folhas, frescas ou secas, são muito utilizadas na cozinha do Mediterrâneo, pelo sabor e aroma que dão aos pratos. Tem sido reconhecido como uma espécie vegetal possuidora de várias propriedades terapêuticas, de modo que atualmente seu potencial antimicrobiano vem recebendo um grande interesse científico (SOUZA et al., 2005).

Sagdiç et al. (2002) verificaram a atividade antibacteriana ao avaliar a inibição de *E. coli* O157:H7, através do uso de extrato de orégano enquanto Pereira et al. (2006) reportaram haver atividade antifúngica através do uso de OE de orégano, confirmando assim a atividade antimicrobiana desta erva.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas fúngicas

Foram utilizadas as cepas toxígenas de referência *A. flavus* RC 2053 (Universidad Nacional de Rio Cuarto, Argentina), isolado de castanha-do-Pará, e *A. parasiticus* IMI 242695 (*International Mycological Institute*, Inglaterra), isolado de produtos alimentícios. Tais cepas foram testadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) quanto à capacidade de produção de AFB₁.

Para manter a viabilidade das espécies, estas foram mantidas cultivadas em tubos contendo agar extrato de malte (MEA) inclinado (PITT; HOCKING, 1997), sendo realizados repiques conforme houvesse escassez de colônia.

3.2 Determinação da capacidade toxígena das cepas

As cepas adquiridas foram testadas quanto à sua capacidade de produzir AFs (GEISEN, 1996). Ambas foram cultivadas em placas de Petri contendo o meio MEA durante 5 dias a 30°C. Após este período, foram cortados 3 *plugs* da colônia, de forma equidistante, e estes foram transferidos para microtubos de 2 mL de capacidade onde foi adicionado 500 µL de clorofórmio. Os microtubos foram centrifugados por 10 minutos a 4.000 rotações por minuto (rpm).

Ao saírem da centrífuga, o extrato clorofórmico foi filtrado, transferido a outro microtubo e evaporado. A fase limpa (clorofórmica) foi filtrada em filtros Milipore[®], retendo assim possíveis conídios e sujidades. Este filtrado foi transferido para outro microtubo de 2,0 mL e este conteúdo foi evaporado. Depois de evaporados, os microtubos foram mantidos secos e armazenados em freezer (-20°C) até análise por CLAE. Os extratos foram ressuspensos em fase móvel no momento da análise.

Para quantificação, foi utilizada cromatografia de fase reversa, detector UV-Vis com comprimento de onda de 365 nm e coluna C18 (Microsorb MV, Varian[®]; 150 mm x 4,6 mm x 5µm). Como fase móvel utilizou-se metanol:água (45:55) com fluxo de 0,6 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL. Foi obtido um tempo de retenção de 14 min ± 1 e o limite de detecção da técnica foi de 2 ng/g (ppb).

3.3 Amostragem do material vegetal

Os produtos vegetais, tanto OEs quanto EVs, foram obtidos a partir de dez plantas aromáticas fornecidas gentilmente por Vitalis Indústria de Alimentos Ltda., sendo elas: alecrim (*Rosmarinus officinalis*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), cominho (*Cuminum cyminum*), cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), hortelã (*Menta piperita*), manjerição (*Ocimum basilicum*), manjerona (*Origanum majorana*), noz moscada (*Myristica fragrans*) e orégano (*Origanum vulgare*), cultivadas no Brasil e de mesmo lote.

Todo o material vegetal foi recebido em embalagens hermeticamente fechadas, lacradas, identificadas e protegidas da luz (Figura 8). Estas foram armazenadas em condições ideais até o dia das respectivas extrações.



Figura 8. Embalagem de orégano devidamente identificada e armazenada.

3.4 Extração dos óleos essenciais

Os OEs foram obtidos por hidrodestilação através do equipamento de Clevenger (Figura 9) segundo Bassole et al. (2003), com modificações. Os equipamentos foram manufaturados por vidreiro artesão na UFRRJ.

Foram utilizados 100g de material vegetal para 1L de água. O condimento a ser extraído era pesado e acondicionado dentro do aparelho, enquanto a água, disposta em um Erlenmeyer, era acoplada ao aparelho e apoiada em um suporte acima do bico de Bunsen. Após 1h de destilação, contadas a partir da primeira gota formada, o óleo foi recolhido e armazenado em frascos âmbar, protegidos da luz, a fim de manter suas propriedades, e mantidos sob refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) até serem utilizados.

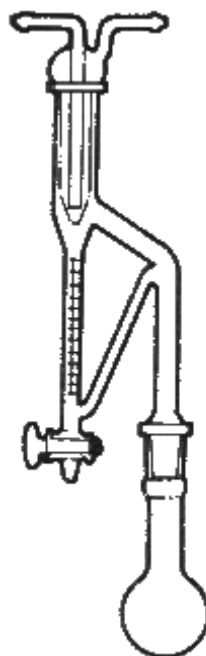


Figura 9. Aparelho de Clevenger utilizado na hidrodestilação.

Fonte: http://www.glasslabor.com.br/config/imagens_conteudo/produtos/imagensGRD/GRD_11_apar_para_det_oleo_clevenger.jpg

O rendimento total de cada óleo produzido foi devidamente calculado em mL através de medições realizadas em tubos do tipo Falcon.

Outra forma de extrair OEs é através da extração hexânica. Tal metodologia é uma alternativa que pode ser adotada quando o rendimento de produção através da destilação for considerado baixo ou insuficiente, dificultando a utilização destes na prática.

Para a extração hexânica utilizou-se uma proporção de material vegetal/hexano 1:2 p/v, ocorrendo de forma passiva. Os Erlenmeyers com tal conteúdo foram mantidos sob escuro por 48h (KUIATE et al., 2006). Ao final deste período, o solvente foi filtrado e concentrado em rotavapor. Os óleos obtidos por extração hexânica foram armazenados da mesma forma que os obtidos por hidrodestilação.

3.5 Obtenção dos extratos vegetais

Foram realizados dois tipos de EVs, um aquoso e outro etanólico. O extrato etanólico foi obtido de acordo com Thanaboripat et al. (2007), utilizando uma proporção de material vegetal/etanol 1:2 p/v. A extração foi realizada de forma passiva e sob escuro durante 48h. Decorrido tal período, o extrato obtido foi filtrado e concentrado em rotavapor.

O extrato aquoso utilizado foi o concentrado aquoso resultante da hidrodestilação das plantas aromáticas, recebendo a denominação de extrato aquoso pós hidrodestilação (ROZWALKA et al., 2008).

Todos os EVs foram armazenados em frascos âmbar sob refrigeração a cerca de 4°C até seu uso.

3.6 Seleção dos óleos essenciais e extratos vegetais de maior atividade antifúngica pelo método de difusão em agar

Foram realizados ensaios iniciais para verificar aqueles OEs e/ou EVs que apresentavam melhor atividade antifúngica contra as cepas selecionadas através do método de difusão em agar.

Primeiramente foi realizada uma suspensão de conídios fúngicos (10^6 conídios por mL de água destilada estéril) que foram contados com auxílio de uma câmara de Neubauer. Tal suspensão foi incorporada em tubos de ensaio contendo 20 mL de MEA a cerca de 50°C, temperatura esta em que o meio encontra-se líquido. A mistura foi homogeneizada em agitador do tipo vortex e vertida em placas de Petri estéreis.

Após a solidificação do meio, foram feitos cinco poços de 6 mm de diâmetro, equidistantes entre si, através do uso de um bisturi do tipo *punch*. Nesses pequenos poços foram pipetados 50µL do OE/EV de cada planta, cada qual devidamente identificado em suas placas.

Placas controle com adição de 50µL do solvente utilizado para extrair os produtos vegetais (água, etanol ou hexano) foram realizadas para que se verificasse ausência de interferência desses produtos químicos nas colônias fúngicas. Os solventes utilizados foram de grau de alta pureza.

A verificação da atividade antifúngica se deu através da medição dos halos de inibição do crescimento fúngico após incubação das placas por 5 dias (MARIATH et al., 2006).

3.7 Avaliação dos óleos essenciais e extratos vegetais sobre o crescimento das cepas toxígenas produtoras de aflatoxina B₁

Aqueles OEs/EVs que demonstraram grande eficiência em inibir o crescimento fúngico nos ensaios *in vitro* preliminares prosseguiram em avaliações mais específicas a fim de verificar o efeito causado sobre parâmetros de crescimento das cepas avaliadas.

Os extratos oriundos das plantas aromáticas foram adicionados a tubos contendo 20 mL de MEA a cerca de 50°C, temperatura esta em que o meio de cultivo encontra-se líquido e em condições que não sejam alteradas as propriedades dos antioxidantes naturais. A incorporação dos OEs/EVs ocorreu nas seguintes concentrações pré-determinadas: 0 µg/g (controle), 50 µg/g, 100 µg/g, 150 µg/g, 300 µg/g e 600 µg/g. Os tubos foram bem homogeneizados em agitador do tipo vortex e seus conteúdos vertidos em placas de Petri estéreis e identificadas.

Após a solidificação do meio prosseguiu-se com a inoculação das cepas toxígenas. Esta foi realizada através de uma suspensão de conídios em agar semi-sólido com Tween 80 com 10³ conídios por inoculação. Com auxílio de uma alça de platina reta e próximo ao bico de Bunsen, as cepas foram inoculadas no centro de cada placa, permitindo assim um crescimento homogêneo da colônia fúngica. As placas foram incubadas à temperatura de 25°C em estufa com controle eletrônico por 10 dias (SOLIMAN; BADEAA, 2002, com modificações). Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

O diâmetro de crescimento das colônias foi medido diariamente, aproximadamente na mesma hora do dia em que a inoculação foi realizada, para depois obter a velocidade de crescimento (mm/dia) e a fase de latência (fase lag), em horas, das colônias fúngicas. A medição seguiu até que a colônia do grupo controle (0 µg/g) ocupasse todo o diâmetro da placa (90 mm). A velocidade de crescimento das cepas foi obtida através de uma regressão linear enquanto a fase lag correspondeu ao tempo, em horas, necessário para atingir 2 mm de diâmetro de colônia.

3.8 Análises estatísticas

Os valores de velocidade de crescimento e fase lag foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Os tratamentos foram comparados com o grupo controle através do teste de Dunnett, sendo o nível de significância para informar as diferenças de P ≤ 0,05. As análises foram realizadas através do programa estatístico PROC GLM em SAS (SAS Institute, Cary, NC).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Verificação da produção de aflatoxina B₁ por cepas toxígenas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*

As cepas de referência *A. flavus* RC 2053 e *A. parasiticus* IMI 242695 foram adquiridas e testadas quanto à produção de AFB₁, e produziram respectivamente 6,8 µg/mL e 5,3 µg/mL quando cultivadas em MEA, dando prosseguimento as próximas etapas do experimento.

4.2 Avaliação do rendimento da produção de óleos essenciais

Depois de extraídos os OEs das plantas selecionadas para este projeto, verificou-se que houve grande variação quanto ao rendimento total de produção do óleo pelo método da hidrodestilação, avaliados para cada 100g de material vegetal (Tabela 2).

Tabela 2. Rendimentos da produção de óleos essenciais por hidrodestilação para cada 100g de material vegetal.

OE	Rendimento (mL)
Alecrim	1,5
Canela	0,2
Cominho	0,5
Cravo-da-Índia	0,9
Erva-doce	0,7
Hortelã	0,2
Manjericão	0,5
Manjerona	0,8
Noz moscada	0,3
Orégano	1,0

Observa-se que os maiores rendimentos obtidos foram para OE de alecrim, orégano, cravo-da-Índia e manjerona

Os OEs foram obtidos, também, por outro método, a extração hexânica. Desta forma, aqueles com menores rendimentos (canela, hortelã e noz moscada) puderam ser melhor avaliadas quanto a atividade antifúngica.

4.3 Avaliação dos ensaios *in vitro* de difusão em agar

Neste ensaio *in vitro* inicial verificou-se a atividade antifúngica dos OEs e EVs obtidos, utilizando como controle os solventes utilizados durante a extração, ou seja, água destilada estéril no caso da hidrodestilação, hexano no caso da obtenção de OE por extração hexânica e etanol para os extratos etanólicos.

Observa-se que não houve qualquer interferência dos solventes, já que não foram capazes de exibir halos de inibição de crescimento em nenhuma das cepas avaliadas (Figura 10).

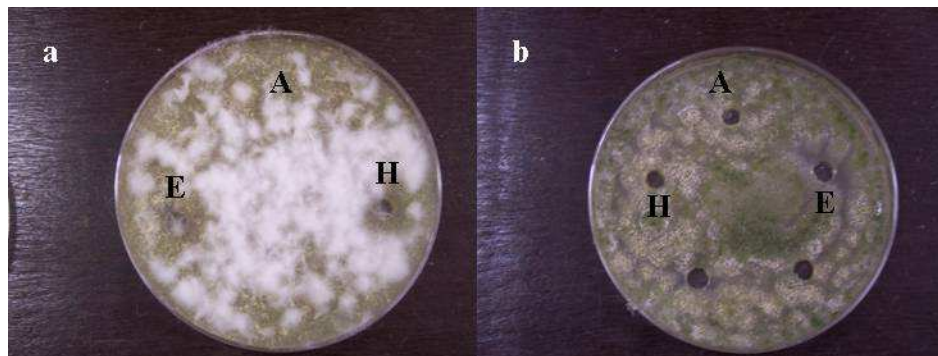


Figura 10. Análise das placas controle do teste de difusão *in vitro* para (a) *Aspergillus flavus* e (b) *Aspergillus parasiticus*, sendo água destilada (A), etanol (E) e hexano (H).

4.3.1 Óleos essenciais

Foram analisados os OEs extraídos por duas formas. Através da hidrodestilação, os OEs que obtiveram maiores halos de inibição foram o alecrim e o orégano, tanto para a cepa de *A. flavus* (Figura 11), apresentando 25 mm para alecrim e 35 mm para orégano, como para a cepa de *A. parasiticus* (Figura 12), com 16 mm de inibição causada pelo alecrim e 40 mm pelo orégano. Assim sendo, os OEs de alecrim e orégano foram selecionados para estudos mais aprofundados por apresentarem melhores rendimentos, ou seja, maior produção e, portanto, com maior facilidade de obtenção em larga escala, possuindo maior viabilidade de uso prático.



Figura 11. Análise *in vitro* da difusão dos óleos essenciais de noz moscada (NM), erva-doce (ED), cravo-da-Índia (CR), alecrim (AL), cominho (CO), orégano (OR), canela (CA) manjerona (MO), manjeriço (MC) e hortelã (HT), sob a inibição do crescimento de *Aspergillus flavus*.

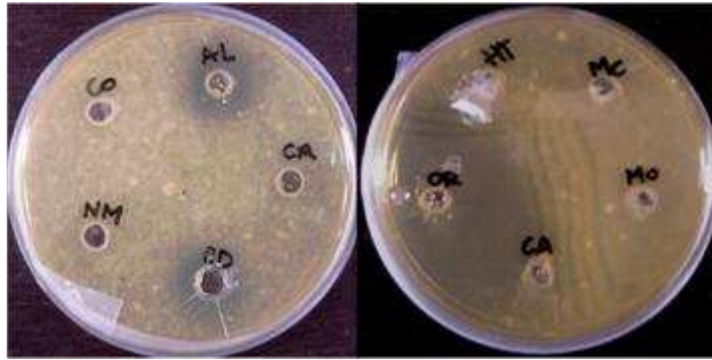


Figura 12. Análise *in vitro* da difusão dos óleos essenciais de noz moscada (NM), erva-doce (ED), cravo-da-Índia (CR), alecrim (AL), cominho (CO), orégano (OR), canela (CA) manjerona (MO), manjerição (MC) e hortelã (HT), sob a inibição do crescimento de *Aspergillus parasiticus*.

Outra forma de extração de OEs testada foi a extração hexânica. A avaliação dos resultados de difusão desses OEs demonstrou completa inibição do crescimento fúngico nas placas de ambas as cepas avaliadas, não havendo qualquer desenvolvimento micelial (Figuras 13 e 14). Pode-se dizer então que tal forma de extração surtiu um efeito antifúngico bastante promissor.

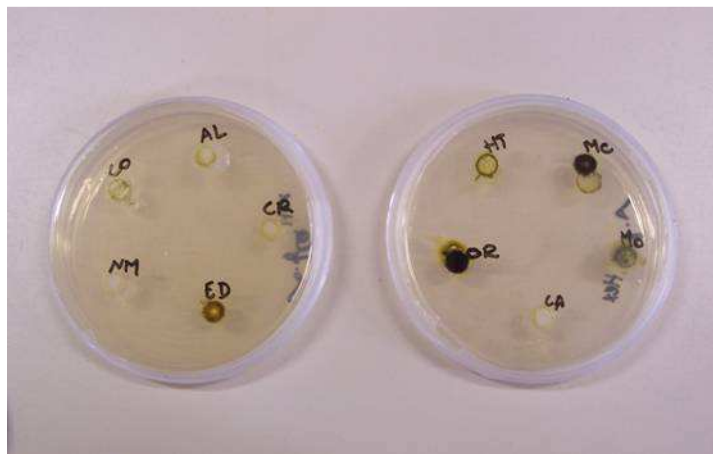


Figura 13. Análise *in vitro* da difusão dos óleos essenciais hexânicos de noz moscada (NM), erva-doce (ED), cravo-da-Índia (CR), alecrim (AL), cominho (CO), orégano (OR), canela (CA) manjerona (MO), manjerição (MC) e hortelã (HT), sob a inibição do crescimento de *Aspergillus flavus*.

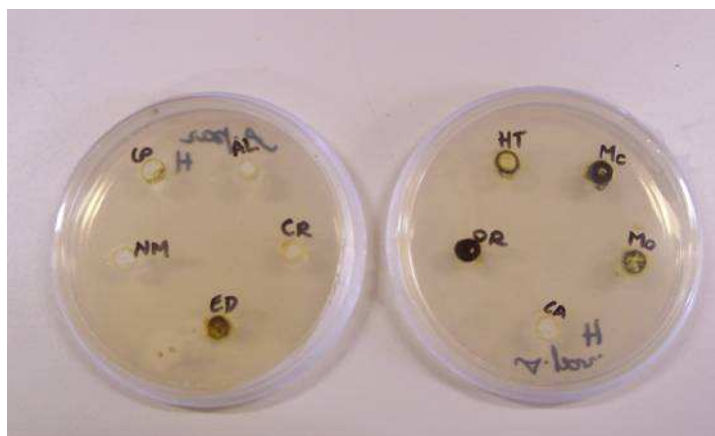


Figura 14. Análise *in vitro* da difusão dos óleos essenciais hexânicos de noz moscada (NM), erva-doce (ED), cravo-da-Índia (CR), alecrim (AL), cominho (CO), orégano (OR), canela (CA) manjerona (MO), manjeriçã (MC) e hortelã (HT), sob a inibição do crescimento de *Aspergillus parasiticus*.

4.3.2 Extratos vegetais

Foram avaliados dois tipos de EVs, o aquoso e o etanólico. O extrato aquoso pós hidrodestilação não surtiu qualquer efeito de inibição de crescimento micelial nas cepas avaliadas (Figuras 15 e 16).

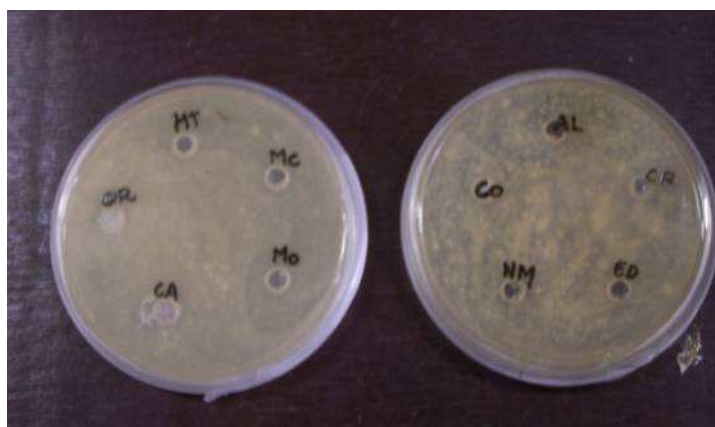


Figura 15. Análise *in vitro* da difusão dos extratos aquosos de noz moscada (NM), erva-doce (ED), cravo-da-Índia (CR), alecrim (AL), cominho (CO), orégano (OR), canela (CA) manjerona (MO), manjeriçã (MC) e hortelã (HT), sob a inibição do crescimento de *Aspergillus flavus*.



Figura 16. Análise *in vitro* da difusão dos extratos aquosos de noz moscada (NM), erva-doce (ED), cravo-da-Índia (CR), alecrim (AL), cominho (CO), orégano (OR), canela (CA) manjerona (MO), manjericão (MC) e hortelã (HT), sob a inibição do crescimento de *Aspergillus parasiticus*.

Já os extratos etanólicos apresentaram efeito inibitório frente às cepas estudadas. Foi observado para *A. flavus* halos de inibição de 31 mm para o extrato de cravo-da-Índia e 15 mm para o extrato de cominho (Figura 17). *Aspergillus parasiticus* demonstrou um comportamento semelhante, apresentando 30 mm de inibição para o extrato de cravo-da-Índia, 15 mm para o extrato de cominho e 10 mm para o extrato de erva-doce (Figura 18).



Figura 17. Análise *in vitro* da difusão dos extratos etanólicos de noz moscada (NM), erva-doce (ED), cravo-da-Índia (CR), alecrim (AL), cominho (CO), orégano (OR), canela (CA) manjerona (MO), manjericão (MC) e hortelã (HT), sob a inibição do crescimento de *Aspergillus flavus*.

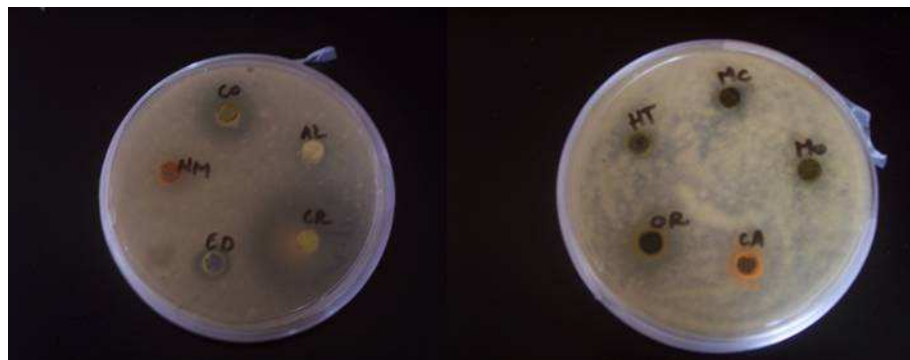


Figura 18. Análise *in vitro* da difusão dos extratos etanólicos de noz moscada (NM), erva-doce (ED), cravo-da-Índia (CR), alecrim (AL), cominho (CO), orégano (OR), canela (CA) manjerona (MO), manjericão (MC) e hortelã (HT), sob a inibição do crescimento de *Aspergillus parasiticus*.

4.4 Avaliação do efeito dos óleos essenciais e extratos vegetais sobre o desenvolvimento de cepas toxígenas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*

A partir dos resultados obtidos nas análises *in vitro* iniciais, foram selecionados aqueles de melhor rendimento e de maior inibição fúngica para que ensaios mais aprofundados fossem realizados.

Assim sendo, os OEs de orégano e alecrim e os EVs etanólicos de cravo-da-Índia e cominho avançaram em nossos estudos. O OE hexânico de orégano também foi avaliado, já que todos os OEs hexânicos apresentaram inibição este foi escolhido pelo OE obtido por hidrodestilação ter obtido o melhor resultado. Finalmente, o OE hexânico de canela também foi selecionado já que este método de extração proporcionou maior rendimento e um melhor resultado.

4.4.1 Efeito *in vitro* da adição do óleo essencial de alecrim sob a velocidade de crescimento e fase de latência das cepas analisadas

Ambas as cepas analisadas demonstraram comportamentos muito semelhantes. Observando-se a figura 19, *A. flavus* apresentou um menor crescimento a uma concentração de 300 µg/g de óleo de alecrim (4,5 mm/dia), fato este que não ocorreu com a cepa de *A. parasiticus* que obteve a maior velocidade de crescimento exatamente nesta concentração do óleo (6,3 mm/dia).

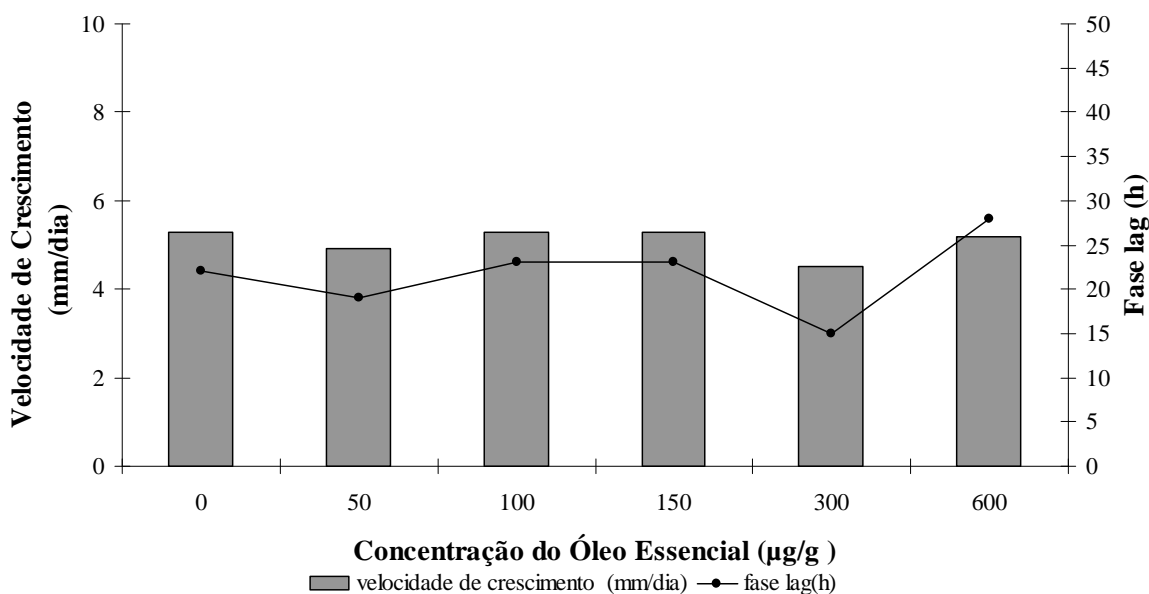


Figura 19. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa *Aspergillus flavus* frente à adição do óleo essencial de alecrim a diferentes concentrações.

Nas outras concentrações, observou-se um padrão que se assemelhou muito ao crescimento da placa controle (0 $\mu\text{g/g}$ de óleo). Para *A. flavus*, a concentração de 300 $\mu\text{g/g}$ mostrou-se mais inibitória, obtendo apenas 4,5 mm/dia de crescimento da cepa. Já a cepa de *A. parasiticus* demonstrou uma melhor inibição a uma concentração de 600 $\mu\text{g/g}$ do OE de alecrim, tendo como velocidade de crescimento 4,7 mm/dia (Figura 20).

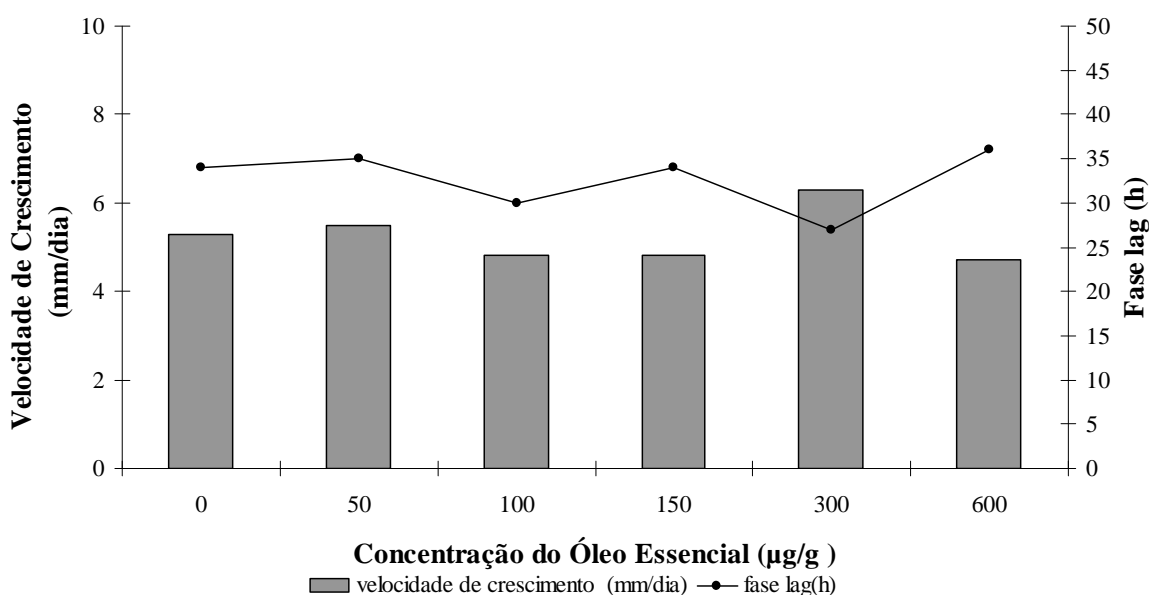


Figura 20. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa *Aspergillus parasiticus* frente à adição do óleo essencial de alecrim a diferentes concentrações.

As análises realizadas com o OE de alecrim permitiram ainda observar o comportamento da fase de latência das cepas testadas. Neste caso, *A. flavus* foi a cepa que demonstrou valores mais baixos, variando de 15 a 28 h. A menor fase de latência encontrada (15 h) ocorreu a uma concentração de 300 µg/g de OE de alecrim, exatamente aquela que obteve menor velocidade de crescimento (Figura 19). Já o maior tempo (28 h) de latência desta cepa foi observado com uma concentração de 600 µg/g do OE, condizendo com uma velocidade de crescimento alta (5,2 mm/dia). As concentrações de 50, 100 e 150 µg/g aproximaram-se mais do tempo encontrado para a placa controle (22 h).

O comportamento de *A. parasiticus* variou entre 27 e 36 h. Tais limites encontram-se nas maiores concentrações do OE, 300 e 600 µg/g respectivamente. As concentrações intermediárias tiveram valores próximos aos da placa controle analisadas (34 h).

Os resultados obtidos nos ensaios com OE de alecrim foram dispostos na tabela 3. Na maior concentração de óleo testada (600 µg/g), foi observada a ocorrência das menores velocidades de crescimento (5,2 e 4,7 mm/dia), bem como das maiores fases de latência (28 e 36 h).

A concentração de 300 µg/g apresentou as menores fases de latências (15 e 27 h) para ambas as cepas, mas somente em *A. parasiticus* obteve a maior velocidade de crescimento (6,3 mm/dia). A maior velocidade para *A. flavus* esteve em 100 e 150 µg/g (5,3 mm/dia), mesmo resultado de sua placa controle (0 µg/g).

As concentrações de 100 e 150 µg/g demonstram padrão idêntico na cepa de *A. flavus*, tanto na velocidade de crescimento (5,3 mm/dia) quanto na fase de latência (23 h). Já essas concentrações em *A. parasiticus* foram bem semelhantes na fase de latência (30 e 34 h respectivamente) e idênticas na velocidade de crescimento (4,8 mm/dia).

Tabela 3. Análise do efeito de diferentes concentrações de óleo essencial de alecrim sob a velocidade de crescimento e a fase de latência das cepas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

Cepas	Óleo essencial de alecrim		
	µg/g	Velocidade de Crescimento (mm/dia)	Fase lag (h)
<i>A. flavus</i>	0	5,3	22
	50	4,9 ***	19
	100	5,3	23
	150	5,3	23
	300	4,5 ***	15 ***
	600	5,2	28 ***
<i>A. parasiticus</i>	0	5,3	34
	50	5,5	35
	100	4,8	30
	150	4,8	34
	300	6,3	27
	600	4,7	36

Valores médios baseados em dados em triplicata. Comparações significativas, segundo o teste de Dunnett (P<0,05) são indicadas por ***.

Estatisticamente, foi possível perceber que a cepa de *A. flavus* obteve diferenças quanto à velocidade de crescimento nas concentrações de 50 e 300 µg/g, havendo uma diminuição significativa quando comparadas ao grupo controle. Já quanto a fase lag, as concentrações de 300 e 600 µg/g exibiram respectivamente o menor e o maior tempo de

latência, sendo estatisticamente distintos do controle. A cepa de *A. parasiticus* não apresentou qualquer diferença estatística, mostrando-se indiferente à adição do OE de alecrim.

Estes resultados concordam com os apresentados por Pereira et al. (2006), que ao avaliar OE de alecrim sob cepas fúngicas, observou só haver inibição do desenvolvimento micelial de *A. flavus* a partir de 2000 µg/g concentração bem mais elevada que as testadas aqui. Suhr; Nielsen (2003) testaram a atividade antifúngica de dois OEs de alecrim sobre cepas de *Penicillium roqueforti*, *P. corylophilum* e *A. flavus* e também consideraram este óleo um fraco inibidor.

4.4.2 Efeito *in vitro* da adição do óleo essencial de orégano sob a velocidade de crescimento e fase de latência das cepas analisadas

Avaliando os ensaios com OE de orégano, ambas as cepas fúngicas apresentaram decréscimos de seus crescimentos conforme a concentração do óleo aumentava, com exceção das concentrações de 100 e 150 µg/g, que se apresentaram indiferentes (Figuras 21 e 22), resultados estes similares aos relatados por Pereira et al. (2006).

Nas placas controle, as cepas apresentaram 5,7 mm/dia (*A. flavus*) e 5,3 mm/dia (*A. parasiticus*). Na concentração de 600 µg/g de óleo, as cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus* obtiveram respectivamente 1,2 mm/dia e 1,3 mm/dia de crescimento. Na menor concentração, de 50 µg/g, as cepas apresentaram maiores velocidades, 4,7 mm/dia para o *A. flavus* e 4,5 mm/dia para *A. parasiticus*.

Já com a fase de latência, um padrão inverso ocorreu: conforme se aumentava a concentração, se observavam maiores tempos de latência. Os maiores tempos foram encontrados com a cepa de *A. parasiticus*, variando de 32 a 89 h, enquanto *A. flavus* de 19 a 72 h.

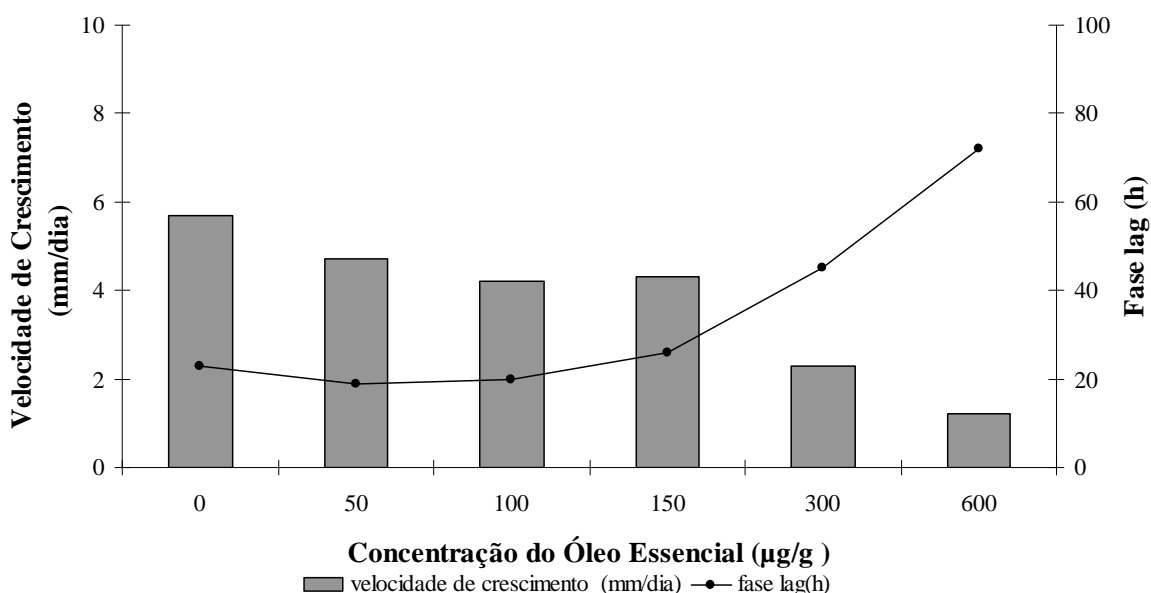


Figura 21. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa *Aspergillus flavus* frente à adição do óleo essencial de orégano a diferentes concentrações.

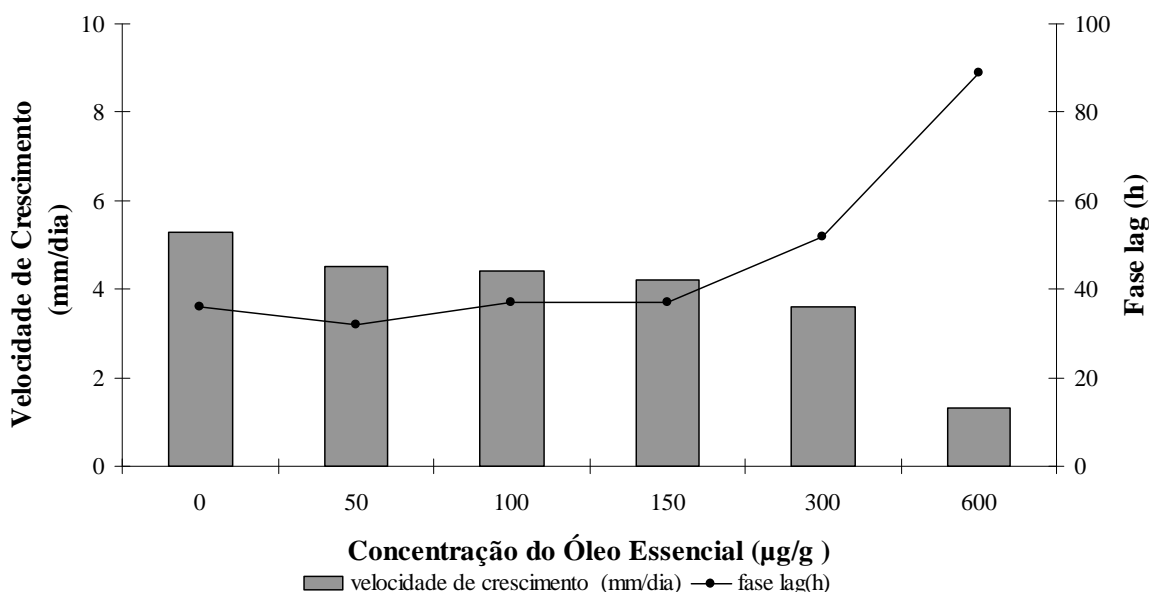


Figura 22. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa *Aspergillus parasiticus* frente à adição do óleo essencial de orégano a diferentes concentrações.

Com a maior concentração de óleo utilizada (600 µg/g), foram observadas as menores velocidades de crescimento (1,2 e 1,3 mm/dia) e as maiores fases de latência (72 e 89 h). A concentração mais baixa utilizada (50 µg/g) apresentou as menores fases de latência (19 e 32 h) e as maiores velocidades de crescimento (4,7 e 4,5 mm/dia).

As concentrações de 100 e 150 µg/g demonstram padrão semelhante ao controle (0 µg/g) para as duas variáveis, enquanto a de 300 µg/g apresenta valores mais próximos da maior concentração analisada (Tabela 4).

Estatisticamente, os resultados observados para OE de orégano foram excelentes, obtendo em todas as concentrações velocidades de crescimento com diferença significativa quando comparados ao grupo controle. Para a fase lag, ambas as cepas apresentaram diferenças nas maiores concentrações testadas (300 e 600 µg/g), mostrando essas serem mais efetivas.

Pereira et al. (2006) reportaram haver atividade antifúngica do OE de orégano a partir de 500 µg/g para todas as cepas avaliadas em seu estudo, exceto *A. niger*, discordando em parte de nossos resultados. López et al. (2004) verificaram que a atividade antifúngica deste OE contra cepa toxigênica de *Fusarium verticillioides* foi uma das maiores encontradas em seu estudo, havendo também diminuição de produção de fumonisina B₁ com uma concentração de 30 µg/g do óleo, comprovando a eficácia do produto contra outras espécies fúngicas também.

Tabela 4. Análise do efeito de diferentes concentrações de óleo essencial de orégano sob a velocidade de crescimento e a fase de latência das cepas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

Óleo essencial de orégano			
Cepas	µg/g	Velocidade de Crescimento (mm/dia)	Fase lag (h)
<i>A. flavus</i>	0	5,7	23
	50	4,7 ***	19
	100	4,2 ***	20
	150	4,3 ***	26
	300	2,3 ***	45 ***
	600	1,2 ***	72 ***
	<i>A. parasiticus</i>	0	5,3
50		4,5 ***	32
100		4,4 ***	37
150		4,2 ***	37
300		3,6 ***	52 ***
600		1,3 ***	89 ***

Valores médios baseados em dados em triplicata. Comparações significativas, segundo o teste de Dunnett (P<0,05) são indicadas por ***.

4.4.3 Efeito *in vitro* da adição do extrato vegetal de cravo-da-Índia sob a velocidade de crescimento e fase de latência das cepas analisadas

Ao analisar as cepas frente a adição do EV de cravo-da-Índia em seu meio de cultivo, percebe-se que para *A. flavus* houve uma espécie de estagnação do efeito inibitório, onde o aumento da concentração do extrato não exerceu uma diminuição gradativa das velocidades de crescimento (Figura 23). Para esta cepa, a menor velocidade de crescimento ocorreu a uma concentração de 100 µg/g (3,5 mm/dia), valor este considerado estatisticamente semelhante às outras concentrações, com exceção do controle (Tabela 5).

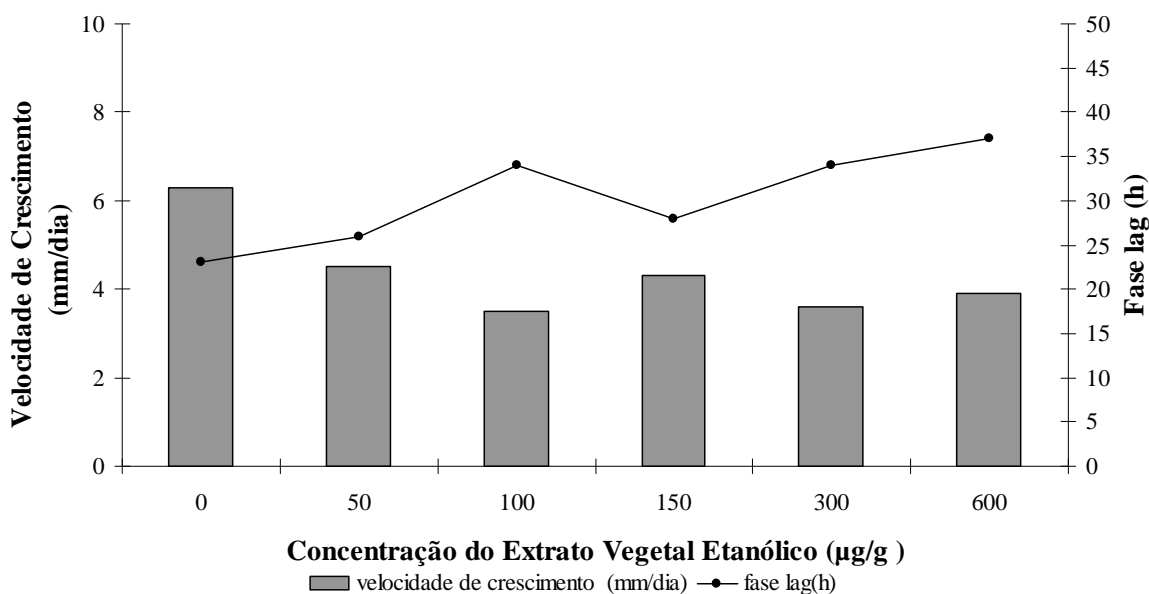


Figura 23. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa *Aspergillus flavus* frente à adição do extrato vegetal de cravo-da-Índia a diferentes concentrações.

Observando o efeito provocado sobre a cepa de *A. parasiticus* percebe-se um padrão oposto, onde a maior concentração do EV provoca uma menor velocidade de crescimento do fungo (2,1 mm/dia) (Figura 24), velocidade esta que se apresenta estatisticamente semelhante na concentração de 300 µg/g (Tabela 5). Nas outras concentrações ocorreu uma pequena diminuição da velocidade conforme a concentração aumentou. Por outro lado, a fase lag apresentou-se estatisticamente semelhante ao controle (21 h) nas concentrações de 50 µg/g, 100 µg/g e 150 µg/g, somente sofrendo um aumento demasiado (45 e 48 h) nas maiores concentrações testadas (Tabela 5).

As análises estatísticas demonstram haver grande capacidade inibitória deste EV já que os resultados obtidos para velocidades de crescimento apresentam diferença estatísticas em todas as concentrações. Para a fase lag, ambas as cepas apresentaram diferenças nas maiores concentrações testadas (300 e 600 µg/g para *A. parasiticus* e 600 µg/g para *A. flavus*), mostrando essas serem mais efetivas.

Tais resultados concordam com os encontrados por Ferdous; Islam (1991), que confirmaram haver atividade antifúngica com o uso de extrato etanólico de cravo-da-Índia contra diversas espécies fúngicas, inclusive *A. flavus*.

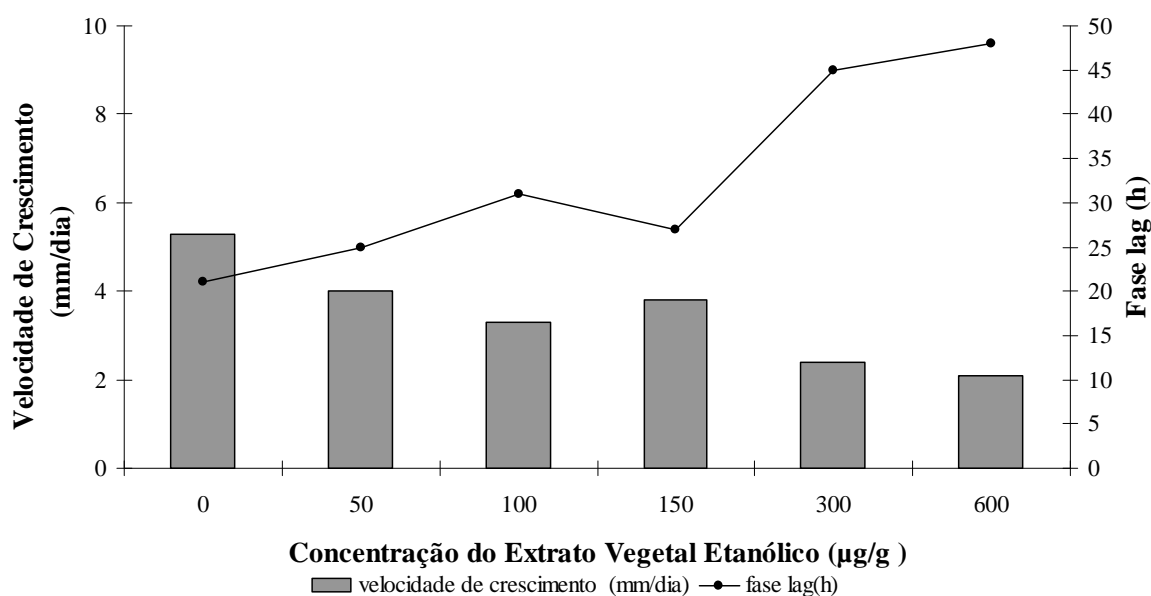


Figura 24. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa *Aspergillus parasiticus* frente à adição do extrato vegetal de cravo-da-Índia a diferentes concentrações.

Tabela 5. Análise do efeito de diferentes concentrações de extrato vegetal de cravo-da-Índia sob a velocidade de crescimento e a fase de latência das cepas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

Extrato vegetal de cravo-da-Índia			
Cepas	µg/g	Velocidade de Crescimento (mm/dia)	Fase lag (h)
<i>A. flavus</i>	0	6,3	23
	50	4,5 ***	26
	100	3,5 ***	34
	150	4,3 ***	28
	300	3,6 ***	34
	600	3,9 ***	37 ***
	<i>A. parasiticus</i>	0	5,3
50		4,0 ***	25
100		3,3 ***	31
150		3,8 ***	27
300		2,4 ***	45 ***
600		2,1 ***	48 ***

Valores médios baseados em dados em triplicata. Comparações significativas, segundo o teste de Dunnett ($P < 0,05$) são indicadas por ***.

4.4.4 Efeito *in vitro* da adição do extrato vegetal de cominho sob a velocidade de crescimento e fase de latência das cepas analisadas

Nos ensaios realizados com EV de cominho verificou-se não haver diferença estatística entre as velocidades de crescimento da espécie de *A. flavus* (Figura 25), sendo o menor resultado encontrado na concentração de 600 $\mu\text{g/g}$ (4,9 mm/dia). As fases lag para esta cepa em questão demonstrou um discreto aumento nas concentrações de 50 e 300 $\mu\text{g/g}$ (Tabela 6).

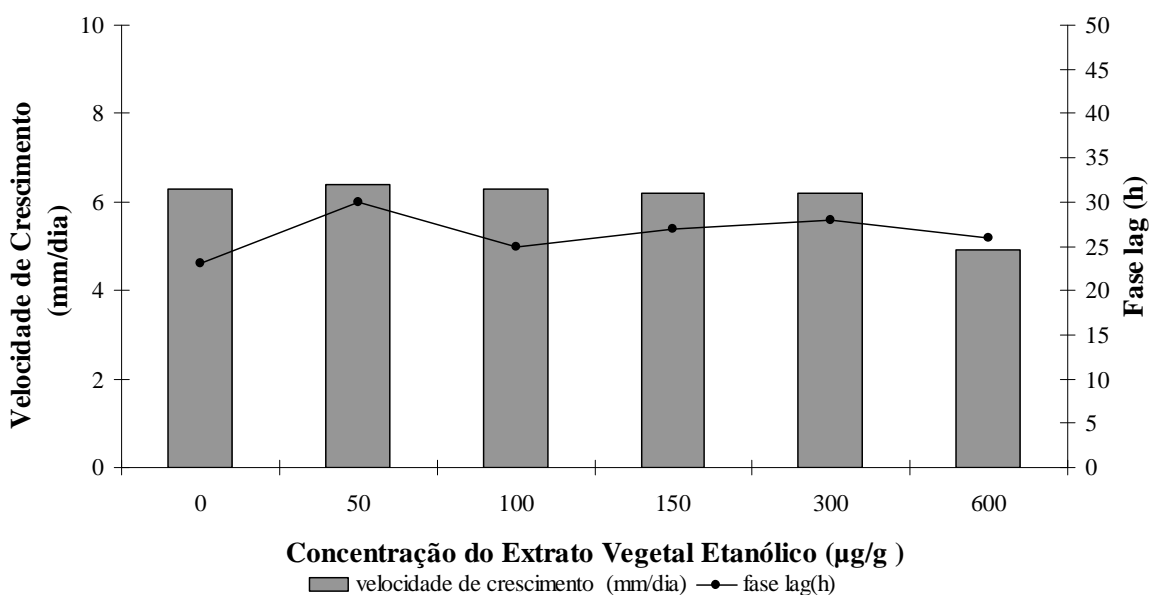


Figura 25. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa *Aspergillus flavus* frente à adição do extrato vegetal de cominho a diferentes concentrações.

Ao analisarmos este extrato com a cepa de *A. parasiticus*, percebe-se que houve uma maior inibição do crescimento na maior concentração testada (4,1 mm/dia). O maior aumento da fase lag também ocorreu a 600 $\mu\text{g/g}$ (28h), no entanto apresenta-se como um pequeno aumento ao compararmos com o controle (5,3 mm/dia) (Figura 26).

Os efeitos provocados nas cepas podem ser melhor avaliados através da tabela 6. Tal EV apresentou diferenças estatísticas mais significativas frente à cepa de *A. parasiticus* ao avaliar o parâmetro velocidade de crescimento. Ao avaliar a fase lag, *A. flavus* demonstrou diferenças nas concentrações de 50, 150 e 300 $\mu\text{g/g}$ e *A. parasiticus* somente nas menores e maiores concentrações utilizadas.

Os autores Farag; Daw; Abo-Raya (1989) encontraram em seu trabalho que o óleo essencial de cominho foi capaz de inibir *A. parasiticus*, bem como a produção de AFs, possuindo atividade antifúngica. Os resultados apresentados aqui demonstram uma pequena inibição das cepas, mas considerada não significativa, discordando do trabalho anterior, apesar de trabalhar com extrato etanólico.

Hitokoto et al. (1980) avaliaram o efeito de condimentos em pó no crescimento e produção toxigênica de *A. flavus*, *A. versicolor* e *A. ochraceus*. Encontraram uma completa inibição de ocratoxina A por *A. ochraceus* além de uma inibição parcial do crescimento e produção de toxina por *A. flavus* e *A. versicolor*, resultados estes semelhantes aos descritos aqui.

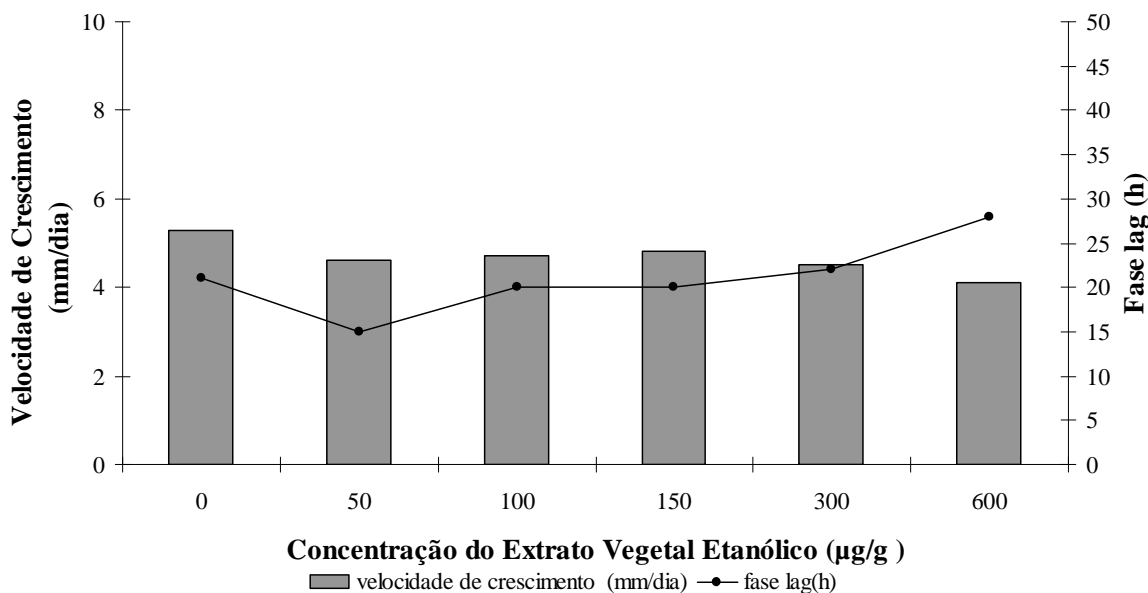


Figura 26. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa *Aspergillus parasiticus* frente à adição do extrato vegetal de cominho a diferentes concentrações.

Tabela 6. Análise do efeito de diferentes concentrações de extrato vegetal de cominho sob a velocidade de crescimento e a fase de latência das cepas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

Extrato vegetal de cominho			
Cepas	µg/g	Velocidade de Crescimento (mm/dia)	Fase lag (h)
<i>A. flavus</i>	0	6,3	23
	50	6,4	30 ***
	100	6,3	25
	150	6,2	27 ***
	300	6,2	28 ***
	600	4,9	26
<i>A. parasiticus</i>	0	5,3	21
	50	4,6 ***	15 ***
	100	4,7 ***	20
	150	4,8 ***	20
	300	4,5 ***	22
	600	4,1 ***	28 ***

Valores médios baseados em dados em triplicata. Comparações significativas, segundo o teste de Dunnett ($P < 0,05$) são indicadas por ***.

4.4.5 Efeito *in vitro* da adição do óleo essencial hexânico de orégano sob a velocidade de crescimento e fase de latência das cepas analisadas

O óleo essencial hexânico de orégano não apresentou qualquer significância nas cepas, tanto quando se avaliou a velocidade de crescimento quanto a fase de latência (Figuras 27 e 28). Tal resultado nos faz crer que a forma de extração do OE altera a composição final do produto, já que o OE de orégano extraído por hidrodestilação demonstrou excelentes resultados, como descrito no item 4.4.2.

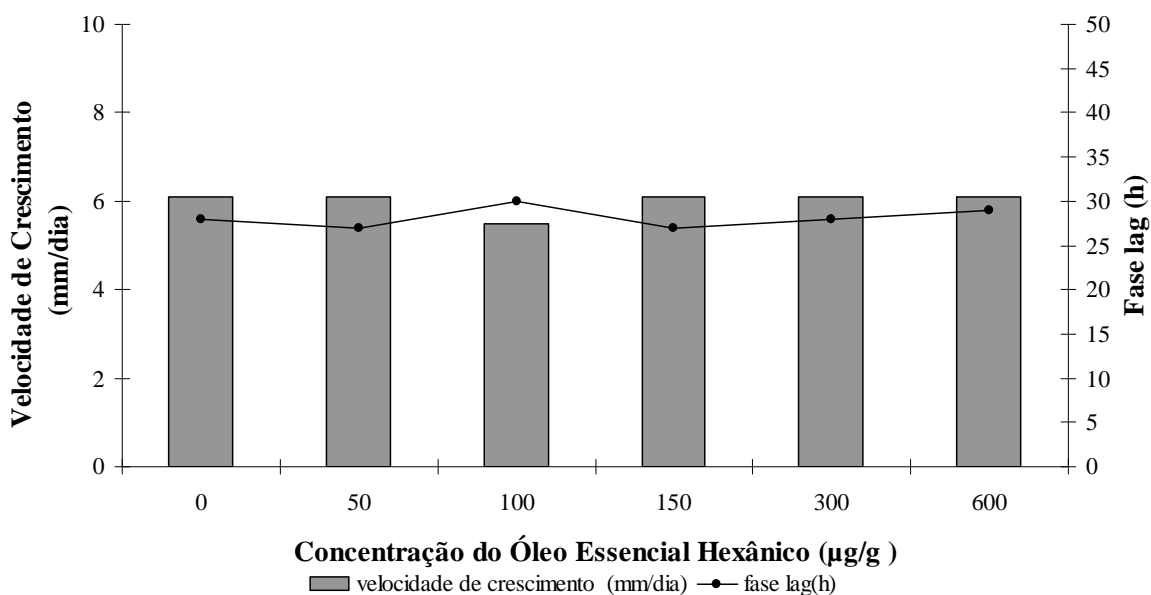


Figura 27. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa *Aspergillus flavus* frente à adição do óleo essencial hexânico de orégano a diferentes concentrações.

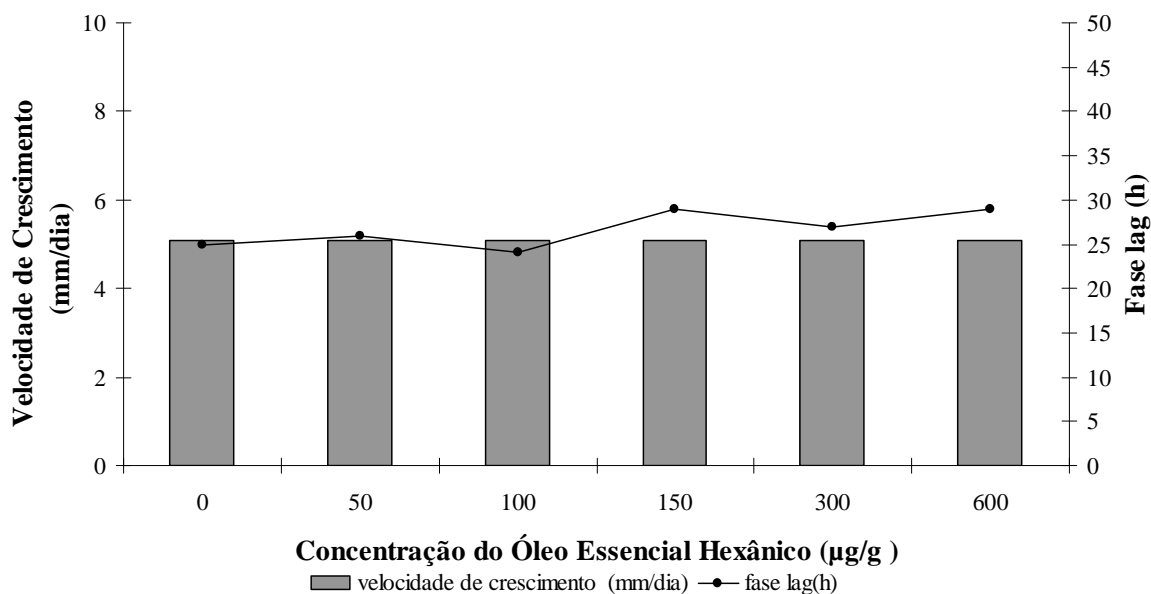


Figura 28. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa *Aspergillus parasiticus* frente à adição do óleo essencial hexânico de orégano a diferentes concentrações.

Os resultados para velocidade de crescimento apenas sofreram uma pequena diminuição em *A. flavus* numa concentração de 100 µg/g do OE (5,5 mm/dia), enquanto *A. parasiticus* permaneceu idêntico ao grupo controle em todas as concentrações (5,1 mm/dia). A fase de latência sofreu variações mínimas para ambas as cepas, não demonstrando um efeito inibitório desejado, sendo estatisticamente significativo somente na cepa de *A. parasiticus* nas concentrações de 150 e 600 µg/g (Tabela 7).

Tabela 7. Análise do efeito de diferentes concentrações do óleo essencial hexânico de orégano sob a velocidade de crescimento e a fase de latência das cepas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

Óleo essencial hexânico de orégano			
Cepas	µg/g	Velocidade de Crescimento (mm/dia)	Fase lag (h)
<i>A. flavus</i>	0	6,1	28
	50	6,1	27
	100	5,5 ***	30
	150	6,1	27
	300	6,1	28
	600	6,1	29
<i>A. parasiticus</i>	0	5,1	25
	50	5,1	26
	100	5,1	24
	150	5,1	29 ***
	300	5,1	27
	600	5,1	29 ***

Valores médios baseados em dados em triplicata. Comparações significativas, segundo o teste de Dunnett ($P < 0,05$) são indicadas por ***.

4.4.6 Efeito *in vitro* da adição do óleo essencial hexânico de canela sob a velocidade de crescimento e fase de latência das cepas analisadas

O OE hexânico de canela confirmou demonstrar uma ótima inibição em ambas as cepas analisadas. *Aspergillus flavus* (Figura 29) não apresentou qualquer desenvolvimento micelial nas concentrações de 300 e 600 $\mu\text{g/g}$ e *A. parasiticus* (Figura 30) a 600 $\mu\text{g/g}$ do OE. A fase lag foi gradualmente aumentando a medida que a concentração do OE também aumentava. Nas concentrações onde não ocorreu crescimento micelial, a fase lag foi tão longa que os fungos nunca conseguiram sair dela, sendo por isso incapaz de ser medida numericamente através dos gráficos.

Estatisticamente, *A. flavus* apresentou resultados com maiores diferenças para ambos os parâmetros, enquanto *A. parasiticus* demonstrou tal comportamento frente as duas maiores concentrações do produto vegetal.

Souza et al. (2004) encontraram resultados similares ao trabalhar com OE de canela na inibição do crescimento de *A. niger*. Sinha et al. (1993) concluíram que este óleo foi bastante efetivo inibindo crescimento de *A. flavus* bem como a produção de AFB₁.

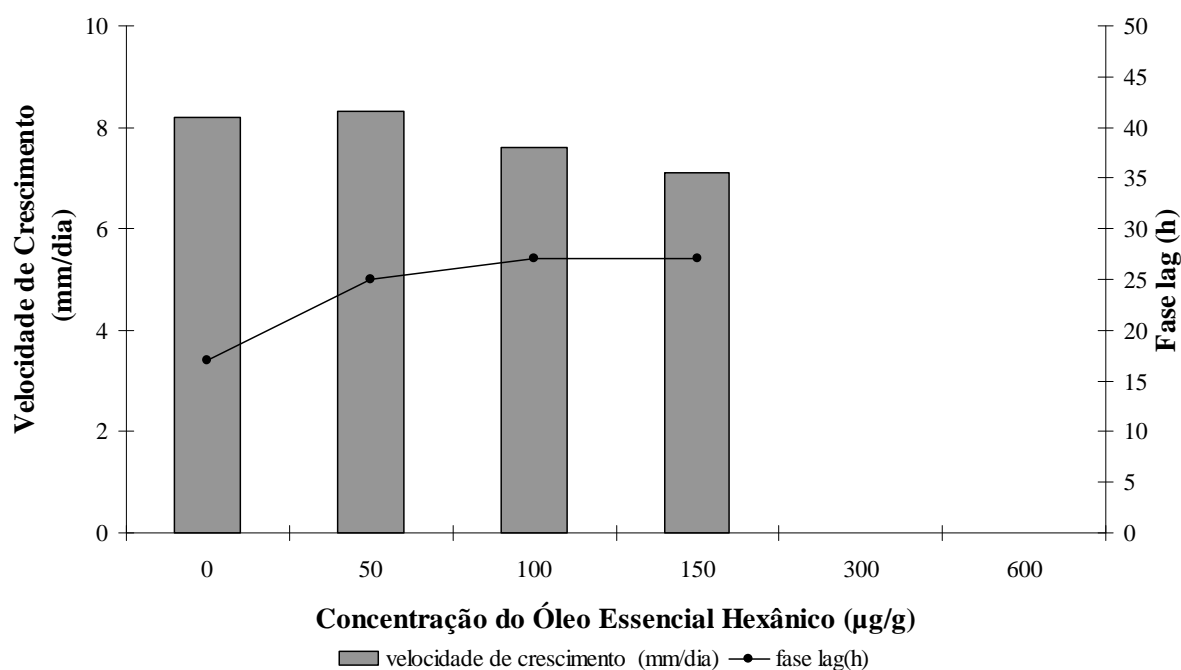


Figura 29. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa *Aspergillus flavus* frente à adição do óleo essencial hexânico de canela a diferentes concentrações.

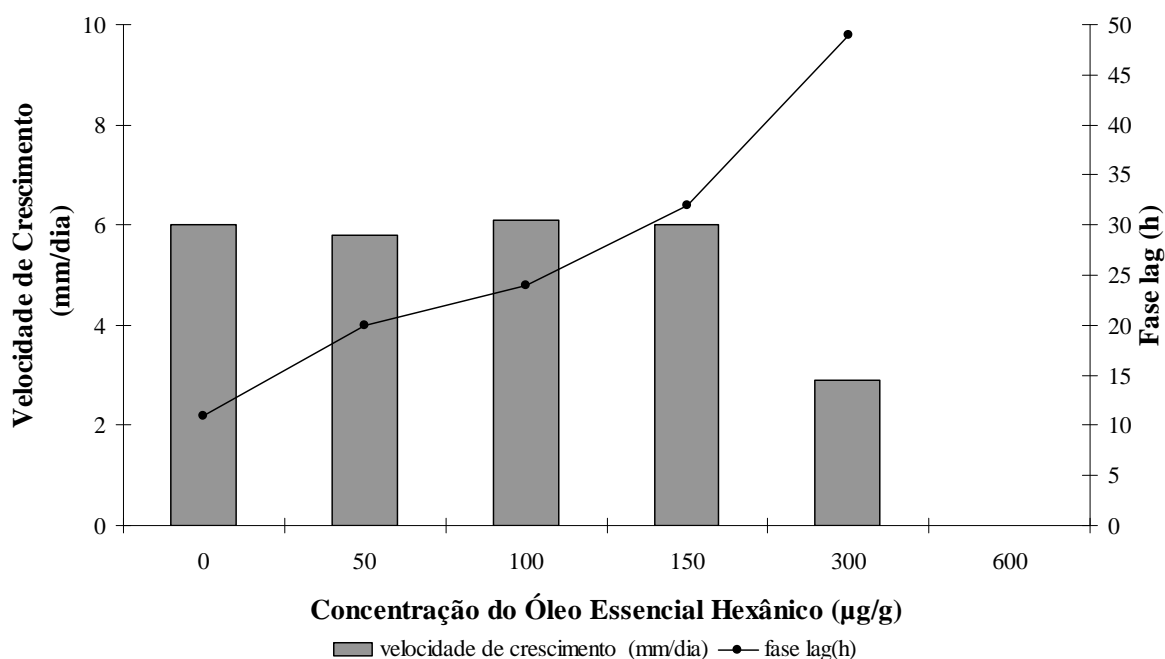


Figura 30. Velocidade de crescimento e fase de latência da cepa *Aspergillus parasiticus* frente à adição do óleo essencial hexânico de canela a diferentes concentrações.

Tabela 8. Análise do efeito de diferentes concentrações óleo essencial hexânico de canela sob a velocidade de crescimento e a fase de latência das cepas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

Óleo essencial hexânico de canela			
Cepas	µg/g	Velocidade de Crescimento (mm/dia)	Fase lag (h)
<i>A. flavus</i>	0	8,2	17
	50	8,3	25 ***
	100	7,6 ***	27 ***
	150	7,1 ***	27 ***
	300	0 ***	- ***
	600	0 ***	- ***
	<i>A. parasiticus</i>	0	6,0
50		5,8	20
100		6,1	24
150		6,0	32
300		2,9 ***	49 ***
600		0 ***	- ***

Valores médios baseados em dados em triplicata. Comparações significativas, segundo o teste de Dunnett ($P < 0,05$) são indicadas por ***.

5 CONCLUSÕES

1- Foi notada uma diferença nos rendimentos da produção de cada produto vegetal. Isso se dá pela constituição física e química de cada condimento avaliado nesta dissertação. Dependendo da forma de extração há maior ou menor produção, podendo ser mais ou menos viável na prática.

2- Os ensaios *in vitro* de difusão em agar com as cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus* apresentaram excelentes resultados de inibição com os OEs de orégano e alecrim, EVs etanólicos de cravo-da-Índia e cominho e todos os OEs hexânicos. Os EVs aquosos e o grupo controle não surtiram qualquer efeito de inibição do crescimento micelial das cepas.

3- Nos ensaios realizados para avaliar velocidade de crescimento e fase de latência, o OE de orégano apresentou uma maior inibição do crescimento das cepas estudadas do que o OE de alecrim.

4- Dentre os EVs etanólicos avaliados, o EV de cravo-da-Índia apresentou melhores resultados de inibição do crescimento das cepas. O EV de cominho, apesar de ter formado um halo representativo de inibição nos ensaios de difusão em agar, não apresentou qualquer diferença significativa quanto à velocidade de crescimento e fase lag.

5- Apesar dos OEs hexânicos terem apresentado excelentes resultados nos ensaios de difusão em agar, o OE hexânico de orégano não obteve qualquer diferença significativa quando comparada ao grupo controle nos ensaios de inibição de crescimento. Tal fato demonstra que a forma de extração resulta em algum efeito na composição do material extraído, bem como que as concentrações avaliadas não foram suficientes para exibir um efeito inibitório desejável.

6- Os resultados apresentados aqui são de extrema relevância para os constantes esforços de controle microbiológico em alimentos, principalmente em se tratando de controle fúngico. São necessários estudos mais avançados para que se avalie o efeito destes na prática, através da incorporação de tais materiais vegetais selecionados, obtidos a partir de condimentos, como uma forma viável de controle fúngico, especialmente para alimentos armazenados.

7- Estudos mais avançados devem ser realizados a fim de verificar a influência que a incorporação destes OEs e EVs pode exercer sobre a produção de AFB₁ por fungos aflatoxígenos, constituindo-se em uma possível alternativa para o controle das micotoxinas em alimentos industrializados, como as rações destinadas a animais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLOCRRAFT, R. Aflatoxicosis in farm animals. In: GOLDBLAT, L.A. **Aflatoxin: scientific background, control and implications**. New York: Academic Press, 1969. p. 231-269.

ARORA, D.S.; OHLAN, D. *In vitro* studies on antifungal activity of tea (*Camellia sinensis*) and coffee (*Coffea arabica*) against wood-rotting fungi. **Journal of Basic Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 157-165, 1997.

AZZOUZ, M.A.; BULLERMAN, L.B. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. **Journal of Food Microbiology and Toxicology**, v. 45, n. 14, p. 1298-1301, 1982.

BASSOLE, I.H.N.; OUATTARA, A.S.; NEBIE, R.; OUATTARA, C.A.T.; KABORE, Z.I.; TRAORE, S.A. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 209-212, 2003.

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

BRIOZZO, J.; NUNEZ, L.; CHIRIFE, J.; HERSZAGE, L.; D'AQUINO, M. Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 1, p. 69-75, 1989.

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

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHIACCHIERA, S.M.; MAGNOLI, C.E.; ASTORGA, P.; MIAZZO, R.; COMBINA, M.; DALCERO, A.M.; KIKOT, E.; BASALDELLA, E. Use of synthetic zeolites to adsorb different mycotoxins, prevention of mycotoxicosis. **Atualidades de Físicoquímica Orgânica**, p. 218-236, 2000.

CONNER, D.E.; BEUCHAT, L.R. Effect of essential oils plants on growth of food spoilage yeasts. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 2, p. 429-434, 2006.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIOS, G.; REYNOSO, M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 137, n. 3, p. 179-184, 1997.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; LUNA, M.; ANCASI, G.; REYNOSO, M.M.; CHIACCHIERA, S.; MIAZZO, R.; PALACIO, G. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 141, n. 1, p. 37-43, 1998.

ELLIS, W.O.; SMITH, J.P.; SIMPSON, B.K. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, and effects on organisms, detection and methods of control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 30, n. 4, p. 403-439, 1991.

FARAG, R.S.; DAW, Z.Y.; ABO-RAYA, S.H. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 1, p. 74-76, 1989.

FERDOUS, A.J.; ISLAM, S.K.N. *In vitro* antifungal activity of clove extracts. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 87-89, 1991.

FERREIRA, H.; PITTNER, E.; SANCHES, H.F.; MONTEIRO, M.C. Aflatoxinas: Um risco a saúde humana e animal. **Ambiência - Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 2, n.1, p. 113-127, 2006.

FONSECA, H. **Legislação sobre Micotoxinas**. Piracicaba, 2003. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/legisla.html>>. Acesso em: 09 Set 2009.

GACHKAR, L.; YADEGARI, D.; REZAEI, M.B.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S.A.; RASOOLI, I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 898-904, 2007.

GEISEN, R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 388-392, 1996.

GENENA, A.K.; HENSE, H.; SMÂNIA JUNIOR, A.; SOUZA, S.M. Rosemay (*Rosmarinus officinalis* L.) – A study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 463-469, 2008.

GOPALKRISHNAN, G.; BANUMATHI, B.; SURESH, G. Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivative. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 5, p. 519-524, 1997.

HITOKOTO, H.; MOROZUMI, S.; WAUKE, T.; SAKAI, S.; KURATA, H. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 818-822, 1980.

IACOBELLIS, N.S.; CANTORE, P.L.; CAPASSO, F.; SENATORE, F. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 57-61, 2005.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.** Lyon: IARC, 1993. p. 489-521. (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 56).

ISLAM, S.N.; FERDOUS, A.J.; AHSAN, M.; FAROQUE, A.B.M. Antibacterial activity of clove extracts against pathogenic strains including clinically resistant isolates of *Shigella* and *Vibrio cholerae*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 1-5, 1990.

KELLER, K.M. **Estudo sobre a contaminação com espécies toxígenas, potencialmente produtoras de micotoxinas, em rações destinadas à alimentação de equinos.** Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, UFRuralRJ, 2009.

KIKOT, A.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; DALCERO, A.; MIAZZO, R.; BASALDELLA, E.I. Effect of fumonisin B₁ on NaA zeolite effectiveness to adsorb aflatoxin B₁. **Metal Ions in Biology and Medicine**, v. 7, p. 242-246, 2002.

KLICH, M.A. **Identification of Common *Aspergillus* Species.** Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 2002.

KUIATE, J.R.; BESSIERE, J.M.; ZOLLO, P.H.A.; KUIATE, S.P. Chemical composition and antidermatophytic properties of volatile fractions of hexanic extract from leaves of *Cupressus lusitanica* Mill. from Cameroon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 160-165, 2006.

LÓPEZ, A.G.; THEUMER, M.G.; ZYGADLO, J.A.; RUBINSTEIN, H.R. Aromatic plants essential oils activity on *Fusarium verticillioides* fumonisin B₁ production in corn grain. **Mycopathologia**, v. 158, n. 3, p. 343-349, 2004.

MADHAVI, D.L.; SALUNKHE, D.K. Toxicological aspects of food antioxidants. In: MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K. **Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives.** New York: Marcel Dekker, 1996. p. 267-359.

MAGNOLI, C.; DALCERO, A.M.; CHIACCHIERA, S.M.; MIAZZO, R.; SAENZ, M.A. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. **Mycopathologia**, v. 142, n. 1, p. 27-32, 1998.

MAGNOLI, C.E.; SAENZ, M.A.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A.M. Natural occurrence of *Fusarium* species and fumonisin-production by toxigenic strains isolated from poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 145, n. 1, p. 35-41, 1999.

MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; MIAZZO, R.; PALACIO, G.; ANGALETTI, A.; HALLAK, C.; DALCERO, A.M. The mycoflora and toxicity of feedstuffs from a production plant in Córdoba, Argentina. **Mycotoxin Research**, v. 18, p. 7-22, 2002.

MAGNOLI, C.; HALLAK, C.; ASTORECA, A.; PONSONE, L.; CHIACCHIERA, S.; DALCERO, A.M. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in commercial corn kernels in Argentina. **Mycopathologia**, v. 161, n. 1, p. 53-58, 2006.

MAHMOUD, A.L.E. Inhibition of growth and aflatoxin biosynthesis of *Aspergillus flavus* by extracts of some Egyptian plants. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 334-336, 1999.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Portaria nº 07 de 09 de novembro de 1988. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 de novembro de 1988, Seção 1, p. 21968.

MARIATH, I.R.; LIMA, I.O.; LIMA, E.O.; BATISTA, L.M. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Eugenia aromatica* B. contra fungos dematiáceos. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 87, n. 3, p. 81-84, 2006.

MARTINS, H.M.; MARTINS, M.L.; BERNARDO, F.A. Interaction of strains of non-toxicogenic *Aspergillus flavus* with *Aspergillus parasiticus* on aflatoxin production. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 6, p. 439-443, 2000.

MIAZZO, M.; ROSA, C.A.R.; DE QUEIROZ CARVALHO, E.C.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.M.; PALACIO, G.; SAENZ, M.; KIKOT, A.; BASALDELA, E.; DALCERO, A.M. Efficacy of synthetic zeolite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 79, n. 1, p. 1-6, 2000.

MINTO, R.E.; TOWNSEND, C.A. Enzymology and molecular biology of aflatoxin biosynthesis. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 7, p. 2537-2555, 1997.

MISHRA, H.N.; DAS, C.A. review on biological control and metabolism of aflatoxin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 3, p. 245-264, 2003.

MORENO, S.; SCHEYER, T.; ROMANO, C.S.; VOJNOV, A.A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, v. 40, n. 2, p. 223-231, 2006.

OGIDO, R. **Efeitos da exposição prolongada de aflatoxina B₁ e fumonisina B₁ em codornas: avaliação de parâmetros de desempenho e de qualidade dos ovos**. Pirassununga: USP, 2003. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, USP, 2003.

PEREIRA, M.C.; VILELA, G.R.; COSTA, L.M.A.S.; SILVA, R.F.; FERNANDES, A.F.; FONSECA, E.W.N.F.; PICCOLI, R.H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PEREIRA, M.M.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 141-156, 2002.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2nd ed. Cambridge: Chapman & Hall. 1997.

PITTMAN, S. Cinnamon: It's not just for making cinnamon rolls. **Ethnobotanical Leaflets**, 2000. Disponível em: <<http://www.ethnoleaflets.com/leaflets/cinna.htm>>. Acesso em: 10 Set. 2009.

PORTE, A.; GODOY, R.L.O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.19, n.2, p.193-210, 2001.

PRASAD, G.; SAHAY, S. S.; MASOOD, A. Inhibition in aflatoxin biosynthesis by the extracts of *Amorphophallus campanulatus* (OL) and calcium oxalate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 203-205, 1994.

RIZZO, P.V. **Misturas de extratos vegetais como alternativas ao uso de antibióticos melhoradores do desempenho nas dietas de frangos de corte**. Piracicaba: USP, 2008. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, ESALQ/USP, 2008.

ROSA, C.A.R.; MIAZZO, R.; MAGNOLI, C.; SALVANO, M.; CHIACCHIERA, S.M.; FERRERO, S.; SAENZ, M.; CARVALHO, C.Q.; DALCERO, A. Evaluation of the efficacy of bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. **Poultry Science**, v. 80, n. 2, p. 139-144, 2001.

ROZMAN, T.; JERSEK, B. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L) against different species of *Listeria*. **Acta Agriculturae Slovenica**, v. 93, n. 1, p. 51-58, 2009.

ROZWALKA, L.C.; LIMA, M.L.R.Z.C.; MIO, L.L.M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 301-307, 2008.

SAGDIÇ, O.; KUSÇU, A.; OZCAN, M.; OZÇELIC, S. Effects of Turkish spices extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* 0157:H7. **Food Microbiology**, v.19, n. 5, p. 473-480, 2002.

SALUNKHE, D.K.; ADSULE, R.N.; PADULE, D.N. Occurrence of aflatoxin. In: SALUNKHE, D.K.; ADSULE, R.N.; PADULE, D.N. **Aflatoxins in foods and feeds**. New Delhi: Metropolitan, 1987. p. 44-92.

SAMSON, R.A.; VAN REENEN-HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to Food and Airborne Fungi**. 6 ed., Utrecht, Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures. 2000.

SINHA, K.K.; SINHA, A.K.; PRASAD, G. The effect of clove and cinnamon oils on growth of and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 114-117, 1993.

SOLIMAN, F.M.; EL-KASHOURY, E.A.; FATHY, M.M.; GONAIID, M.H. Analysis and biological activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. from Egypt. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 9, n.1, p. 29-33, 2006.

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

SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O.; TRAJANO, V.N.; FILHO, J.M.B. Orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae): Uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 132, p. 40-45, 2005.

SOUZA, S.M.C.; PEREIRA, M.C.; ANGÉLICO, C.L.; PIMENTA, C.J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 3, p. 685-690, 2004.

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**, v. 94, n. 4, p. 665-674, 2003.

THANABORIPAT, D.; SUVATHI, Y.; SRILOHASIN, P.; SRIPAKDEE, S.; PATTHANAWANITCHAI, O.; CHAROENSETTASILP, S. Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*. **King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Science and Technology Journal**, v. 7, n. 1, p.1-7, 2007.

UEDA, S.; YAMASHITA, H.; NAKAJIMA, M.; KUWABARA, Y. Inhibition of microorganisms by spice extracts and flavouring compounds. **Journal of Japanese Society of Food Science and Technology**, v. 29, n. 2, p. 111-116, 1982.

WENDORFF, W. L., WEE, C. Effect of smoke and spice oils on growth of molds on oil-coated cheese. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 2, p. 153-166, 1997.

ZYGADLO, J.A.; LAMARQUE, A.L.; GUZMÁN, C.A.; GROSSO, N.R. Composition of the flower oils of some *Lippia* and *Aloysia* species from Argentina. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, n. 6, p. 593-595, 1995a.

ZYGADLO, J.A.; LAMARQUE, A.L.; MAESTRI, D.M.; GROSSO, N.R. Empleo de aceites esenciales como antioxidantes naturales. **Grasas y Aceites**, v. 46, n. 4-5, p. 285-388, 1995b.

ZYGADLO, J.A.; JULIANI, H. R. Bioactivity of essential oil components. **Current Topics in Phytochemistry**, v. 3, p. 203-214, 2000.