

**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  
*Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius*.**

**Águida Aparecida de Oliveira**

**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  
*Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius*.**

**ÁGUIDA APARECIDA DE OLIVEIRA**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Carlos Alberto da Rocha Rosa**

*e Co-orientação da Professora*  
**Ana Maria Dalcero**

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

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2010.

FICHA CATALOGRÁFICA

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

**ÁGUIDA APARECIDA DE OLIVEIRA**

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., L.D. - UFRRJ  
(Orientador)

---

Lilia Renée Cavaglieri, DSc. - UNRC, Argentina

---

Adriana Mabel Torres, DSc. - UNRC, Argentina

*Dedico este trabalho ao meu pai  
Aguinaldo, ao meu irmão Júnior e ao meu  
namorado Alexandre por todo amor em todos  
esses anos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas graças em minha vida, dons a mim concedidos e saúde para continuar meu caminho. À minha família, em especial ao meu pai Aguinaldo, ao meu irmão Júnior, à minha mãe Lia (*in memorian*) e ao meu namorado Alexandre pela oportunidade e incentivo de ingressar na universidade, pela compreensão, pelo amor, carinho e suporte em todos os momentos de dificuldade e de alegria. Devo essa vitória a vocês!

Ao Professor Carlos Alberto da Rocha Rosa pela orientação, pela amizade e pela oportunidade ímpar de ingressar no laboratório e poder me desenvolver como aluna e profissional da pesquisa.

Às Professoras Ana Maria Dalcerro (minha co-orientadora), Lilia Renée Cavaglieri, Carina Elizabeth Magnoli e aos amigos da Universidad Nacional de Río Cuarto pela grande atenção e por todos os ensinamentos passados com carinho.

À amiga Kelly Moura Keller, que muito admiro, pelo apoio e colaboração incondicional, pelos ensinamentos e conselhos, atenção dedicada e por sua grande amizade, sem a qual não chegaria até aqui.

Ao CNPq pelo financiamento da pesquisa gerada.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas (NPMM) da UFRRJ, que me ajudaram e tornaram os dias de trabalho mais alegres. Aos amigos que primeiro conheci no grupo: Luiz Antonio Moura Keller, Beatriz Dias Queiroz, Ana Cláudia Marassi. E a todas as meninas que depois ingressaram, porém não menos importantes: Michele Valadares Deveza, Beatriz de Sousa Monteiro, Lucila Maria Teixeira Nunes, Débora de Castro Rocha, Carla Alves Soleiro, Renata Quintela Assad, Francine Siqueira Santos e Tayane Karine Barbosa de Morais.

Aos amigos que nessa jornada de estudos e trabalho, cada qual ao seu jeito, me apoiaram, me entenderam e estiveram comigo: Camila Franco Basalo, Carla Valéria Rocha, Fernanda Alcântara, Márcia Nascimento, Priscila Simões, Mariana Desterro, Cristiane Nascimento, Paula Alves, Meine Anny Cruz da Silva, Bruna da Silva Narciso, Thais Ferreira Fagundes, entre outros. E um agradecimento especial à amiga Tatiana Xavier de Almeida, pela forte amizade, carinho, ajuda, e por ter feito mais feliz nossa jornada, desde que ingressamos juntas no curso de Medicina Veterinária da UFRRJ até aqui, na conclusão de nosso Mestrado, trabalhando também no NPMM, sempre unidas.

E a todos aqueles que de alguma forma participaram, estiveram comigo de presença e de coração, e que não foram citados, mas não foram esquecidos, obrigada por tudo!

## RESUMO

OLIVEIRA, Águida Aparecida de. **Óleos essenciais e extratos vegetais de plantas cultivadas no Brasil: impacto no crescimento de *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius***. 2010. 47 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal) Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Óleos essenciais e extratos vegetais de plantas aromáticas são reconhecidos por suas propriedades antimicrobianas e eficiência como antioxidante de alimentos. As micotoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por fungos filamentosos em alimentos, sendo particularmente nocivas a animais e humanos. A ocorrência de micotoxinas ocorre depois de um processo de oxidação, conseqüentemente, a prevenção da oxidação é um meio de evitar a produção de micotoxinas, como a ocratoxina A, que é uma toxina nefrotóxica, principalmente produzida por *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* em áreas tropicais. Há evidências de que antioxidantes sintéticos possam ser prejudiciais à saúde animal e humana. Assim, este estudo objetivou avaliar o efeito inibitório de plantas aromáticas brasileiras (óleos essenciais – obtidos por hidrodestilação e extração hexânica; e extratos vegetais: etanólico e aquoso) sobre o crescimento de *A. ochraceus* NRRL 3174 e *A. carbonarius* RC 2054 (UNRC). Um total de 40 extratos de plantas oriundos de dez espécies vegetais: manjeriço (*Ocimum basilicum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), cravo (*Eugenia caryophyllata*), cominho (*Cuminum cyminum*), manjerona (*Origanum majorana*), noz moscada (*Myristica fragrans*), orégano (*Origanum vulgare*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), hortelã (*Menta piperita*) e erva-doce (*Pimpinella anisum*) foram submetidos a uma seleção pelo teste de difusão em agar para eleger os que proporcionassem os maiores halos de inibição fúngica. Os óleos essenciais de orégano (obtidos por hidrodestilação e extração hexânica), de alecrim (obtido por hidrodestilação) e o extrato etanólico de cravo foram os mais efetivos, e foram então escolhidos para a obtenção dos parâmetros de velocidade de crescimento e fase lag nas concentrações de 0, 50, 100, 150, 300 e 600 mg/kg em placas de Petri contendo meio agar extrato de levedura e sacarose (*yeast extract sucrose agar* - YES); as cepas foram inoculadas no ponto central, e o crescimento radial da colônia (mm/dia) foi mensurado diariamente. A velocidade de crescimento diminuía à medida que a concentração do óleo essencial aumentava em todos os tratamentos e cepas testadas. O óleo essencial de orégano mostrou os melhores resultados dentre os óleos essenciais. Comparando os quatro tratamentos, os melhores resultados foram obtidos com o extrato etanólico de cravo, e os piores resultados com o óleo essencial de orégano obtido por extração hexânica. A concentração de 600 mg/kg foi a de maior poder inibitório. Esses resultados são interessantes na conexão com a prevenção do crescimento fúngico em muitos alimentos, e poderão ser usados em substituição dos produtos antifúngicos sintéticos. Mais estudos devem ser conduzidos para determinar a habilidade desses óleos e extratos na redução da produção de ocratoxina A.

**Palavras-chave:** fungos, micotoxinas, antioxidantes naturais.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Águida Aparecida de. **Brazilian essential oils and plant extracts: impact on growth of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius***. 2010. 47 p. Dissertation (Master's Degree in Veterinary Sciences, Animal Health) Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Essential oils and plant extracts from aromatic plants are recognized for its antimicrobial properties and effectiveness as food antioxidants. The mycotoxins are toxic metabolites produced by filamentous fungi in feed, being particularly harmful to animals and humans. The mycotoxin occurrence happens after an oxidation process, consequently, the oxidation prevention is a way to avoid mycotoxins production, like ochratoxin A, which is a nephrotoxic toxin, mainly produced by *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in tropical areas. There is evidence that syntetic antioxidants can be prejudicial to animals and humans health. Thus, this study aimed to evaluate the effectiveness of Brazilian plant extracts (essential oils – hydrodistillation and hexanic extraction; and vegetal extracts: aqueous and ethanolic) to inhibit the growth of *A. ochraceus* NRRL 3174 and *A. carbonarius* RC 2054 (UNRC). A total of 40 plant extracts from ten vegetable species: 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 (*Menta piperita*) and sweet fennel (*Pimpinella anisum*) were screened by diffusion agar test for the best results on mycelial growth inhibition. Oregano essential oils (obtained by hydrodistillation and hexanic extraction), the rosemary essential oil and the clove ethanolic extract were chosen to obtain the growth rate and the lag phase at concentrations of 0, 50, 100, 150, 300 and 600 mg/kg on yeast extract-sucrose agar (YES). Strains were centrally inoculated and the radial growth (mm/day) was daily measured. The growth rate decreased as the essential oil concentration increased in all treatments and fungal strains assayed. The oregano essential oil showed the best results among the other essential oils. Comparing all four treatments, the best result was for clove ethanolic extract and the worst one was for oregano essential oil produced by hexanic extraction. The concentration of 600 mg/kg exerted the best inhibitory effect. These results are interesting related to the prevention of fungi contamination in many foods and they could be used instead of synthetic antifungal products. Future studies should be conducted to determine the ability of these oils and extracts to reduce the ochratoxin A production.

**Key words:** Fungi, mycotoxins, natural antioxidants.



## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1: Potencial toxígeno das principais espécies de <i>Aspergillus</i> que contaminam produtos agrícolas.	11
Tabela 2: Rendimentos da produção de óleos essenciais (OE) por hidrodestilação.	19
Tabela 3: Halo de inibição do crescimento de <i>Aspergillus ochraceus</i> provocado pelos óleos essenciais e extratos vegetais.	24
Tabela 4: Halo de inibição do crescimento de <i>Aspergillus carbonarius</i> provocado pelos óleos essenciais e extratos vegetais.	29
Tabela 5: Velocidade de crescimento e fase lag das cepas <i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i> quando semeadas em meio YES com diferentes concentrações de óleo essencial de alecrim.	30
Tabela 6: Velocidade de crescimento e fase lag das cepas <i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i> quando semeadas em meio YES com diferentes concentrações de óleo essencial de orégano.	32
Tabela 7: Velocidade de crescimento e fase lag das cepas <i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i> quando semeadas em meio YES com diferentes concentrações de extrato etanólico de cravo.	34
Tabela 8: Velocidade de crescimento e fase lag das cepas <i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i> quando semeadas em meio YES com diferentes concentrações de óleo essencial hexânico de orégano.	36

## LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1:	Planta de <i>Rosmarinus officinalis</i> (alecrim).	4
Figura 2:	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (a) Árvore da canela; (b) Canela em “casca”.	4
Figura 3:	<i>Cuminum cyminum</i> (a) Grãos de cominho; (b) Planta de cominho.	5
Figura 4:	<i>Eugenia caryophyllata</i> (a) Botão de cravo seco; (b) Botão de cravo verde.	6
Figura 5:	<i>Pimpinella anisum</i> (a) Planta de erva doce florida; (b) Grãos de erva doce.	6
Figura 6:	Planta de <i>Menta piperita</i> (hortelã).	7
Figura 7:	Planta de <i>Ocimum basilicum</i> (manjericão).	7
Figura 8:	Planta de <i>Origanum majorana</i> (manjerona).	8
Figura 9:	<i>Myristica fragrans</i> (a) Grão de noz moscada; (b) Fruto da moscadeira.	8
Figura 10:	Planta de <i>Origanum vulgare</i> (orégano).	9
Figura 11:	(a) Colônia de <i>Aspergillus ochraceus</i> ; (b) Colônia de <i>Aspergillus niger</i> ; (c) Colônia de <i>Aspergillus carbonarius</i> .	12
Figura 12:	(a) Micrografia de <i>Aspergillus ochraceus</i> ; (b) Micrografia de <i>Aspergillus niger</i> ; (c) Micrografia de <i>Aspergillus carbonarius</i> .	13
Figura 13:	Estrutura química da ocratoxina A.	14
Figura 14:	Esquema ilustrativo da metodologia proposta por Téren et al. (1996) para determinação da capacidade de produção de ocratoxina A.	16
Figura 15:	(a) Controle de <i>Aspergillus ochraceus</i> para o teste de difusão em agar no quinto dia de incubação; (b) Controle de <i>Aspergillus carbonarius</i> para o teste de difusão em agar no quinto dia de incubação.	20
Figura 16:	<i>Aspergillus ochraceus</i> no quinto dia de incubação contendo nos poços óleo essencial de orégano (OR), manjerona (MO), hortelã (HT), manjericão (MC) e canela (CA).	20
Figura 17:	<i>Aspergillus ochraceus</i> no quinto dia de incubação contendo nos poços óleo essencial de orégano (OR), manjerona (MO), hortelã (HT) e manjericão (MC).	21
Figura 18:	<i>Aspergillus ochraceus</i> no quinto dia de incubação contendo nos poços óleo essencial de alecrim (AL), erva doce (ED), noz moscada (NM), cominho (CO) e cravo (CR).	21
Figura 19:	<i>Aspergillus ochraceus</i> no quinto dia de incubação contendo nos poços óleo essencial hexânico de alecrim (AL), cominho (CO), noz moscada (NM), erva doce (ED), cravo (CR), orégano (OR), hortelã (HT), manjericão (MC), manjerona (MO) e canela (CA).	22
Figura 20:	<i>Aspergillus ochraceus</i> no quinto dia de incubação contendo nos poços extrato etanólico de orégano (OR), manjericão (MC), manjerona (MO), hortelã (HT) e canela (CA).	22
Figura 21:	<i>Aspergillus ochraceus</i> no quinto dia de incubação contendo nos poços extrato etanólico de alecrim (AL), cominho (CO), noz moscada (NM), erva doce (ED) e cravo (CR).	23
Figura 22:	<i>Aspergillus ochraceus</i> no quinto dia de incubação contendo nos poços extrato aquoso de orégano (OR), manjericão (MC), manjerona (MO), hortelã (HT) e canela (CA).	23

Figura 23:	<i>Aspergillus ochraceus</i> no quinto dia de incubação contendo nos poços extrato aquoso de alecrim (AL), cominho (CO), noz moscada (NM), erva doce (ED) e cravo (CR).	24
Figura 24:	<i>Aspergillus carbonarius</i> no quinto dia de incubação contendo nos poços óleo essencial de orégano (OR), manjerona (MO), hortelã (HT), manjerição (MC) e canela (CA).	25
Figura 25:	<i>Aspergillus carbonarius</i> no quinto dia de incubação contendo nos poços óleo essencial de orégano (OR), hortelã (HT), manjerona (MO) e manjerição (MC).	25
Figura 26:	<i>Aspergillus carbonarius</i> no quinto dia de incubação contendo nos poços óleo essencial de alecrim (AL), erva doce (ED), noz moscada (NM), cominho (CO) e cravo (CR).	26
Figura 27:	<i>Aspergillus carbonarius</i> no quinto dia de incubação contendo nos poços óleo essencial hexânico de alecrim (AL), cominho (CO), cravo (CR), erva doce (ED), noz moscada (NM), orégano, hortelã (HT), manjerição (MC), manjerona (MO) e canela (CA).	26
Figura 28:	<i>Aspergillus carbonarius</i> no quinto dia de incubação contendo nos poços extrato etanólico de orégano (OR), hortelã (HT), manjerona (MO), manjerição (MC) e canela (CA).	27
Figura 29:	<i>Aspergillus carbonarius</i> no quinto dia de incubação contendo nos poços extrato etanólico de alecrim (AL), cominho (CO), erva doce (ED), noz moscada (NM) e cravo (CR).	27
Figura 30:	<i>Aspergillus carbonarius</i> no quinto dia de incubação contendo nos poços extrato aquoso de orégano (OR), hortelã (HT), manjerona (MO), manjerição (MC) e canela (CA).	28
Figura 31:	<i>Aspergillus carbonarius</i> no quinto dia de incubação contendo nos poços extrato aquoso de alecrim (AL), cominho (CO), erva doce (ED), noz moscada (NM) e cravo (CR).	28
Figura 32:	Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de alecrim sobre a velocidade de crescimento (mm/dia) e a fase lag (h) de <i>Aspergillus ochraceus</i> .	31
Figura 33:	Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de alecrim sobre a velocidade de crescimento (mm/dia) e a fase lag (h) de <i>Aspergillus carbonarius</i> .	31
Figura 34:	Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de orégano sobre a velocidade de crescimento (mm/dia) e a fase lag (h) de <i>Aspergillus ochraceus</i> .	33
Figura 35:	Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de orégano sobre a velocidade de crescimento (mm/dia) e a fase lag (h) de <i>Aspergillus carbonarius</i> .	33
Figura 36:	Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico de cravo sobre a velocidade de crescimento (mm/dia) e a fase lag (h) de <i>Aspergillus ochraceus</i> .	35
Figura 37:	Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico de cravo sobre a velocidade de crescimento (mm/dia) e a fase lag (h) de <i>Aspergillus carbonarius</i> .	35
Figura 38:	Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial hexânico de orégano sobre a velocidade de crescimento (mm/dia) e a fase lag (h) de <i>Aspergillus ochraceus</i> .	37

Figura 39: Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial hexânico de orégano sobre a velocidade de crescimento (mm/dia) e a fase lag (h) de *Aspergillus carbonarius*.

37

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Hipótese	2
1.2 Objetivo geral	2
1.3 Objetivos específicos	2
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1 As plantas aromáticas condimentares no Brasil	3
2.1.1 Alecrim	3
2.1.2 Canela	4
2.1.3 Cominho	5
2.1.4 Cravo	5
2.1.5 Erva-doce	6
2.1.6 Hortelã	7
2.1.7 Manjericão	7
2.1.8 Manjerona	8
2.1.9 Noz-moscada	8
2.1.10 Orégano	9
2.2 Os fungos	9
2.3 As micotoxinas	10
2.4 Gênero <i>Aspergillus</i> e as espécies produtoras de ocratoxina A	11
2.5 Ocratoxina A	13
2.6 Óleos essenciais e extratos vegetais de plantas como forma de prevenção do crescimento fúngico	14
2.7 Estudos preliminares	15
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>16</b>
3.1 Determinação da capacidade toxígena de cepas de <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i> a serem utilizadas durante o experimento	16
3.2 Amostragem do material vegetal	16
3.3 Obtenção dos óleos essenciais	17
3.4 Obtenção dos extratos vegetais	17
3.5 Seleção dos óleos essenciais e extratos vegetais de maior atividade antifúngica pelo método de difusão em agar	17
3.6 Avaliação dos óleos essenciais e extratos vegetais sobre o crescimento de cepas de <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i> produtoras de ocratoxina A	18
3.7 Análises estatísticas	18
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>19</b>
4.1 Determinação da capacidade toxígena de cepas de <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i> utilizadas durante o experimento	19
4.2 Rendimento da produção de óleos essenciais por hidrodestilação	19
4.3 Seleção dos óleos essenciais e extratos vegetais de maior atividade antifúngica pelo método de difusão em agar	19
4.3.1 Teste de difusão em agar sobre <i>Aspergillus ochraceus</i>	20
4.3.2 Teste de difusão em agar sobre <i>Aspergillus carbonarius</i>	24

4.4 Avaliação dos óleos essenciais e extratos vegetais sobre a velocidade de crescimento e a fase lag de <i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i> produtores de ocratoxina A	29
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>38</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas aromáticas condimentares no Brasil são muito difundidas e valorizadas principalmente por serem usadas como temperos e chás. Sua produção adequa-se bem aos princípios da agroecologia, da valorização da pequena produção rural, da produção orgânica e também caseira, por serem plantas de pequeno porte, fácil manutenção e manejo manual.

Os óleos essenciais (OE) extraídos de plantas aromáticas são misturas de compostos voláteis naturais, obtidos tradicionalmente por hidrodestilação e que há muitos anos são reconhecidos por suas propriedades farmacológicas e antimicrobianas, podendo ser obtidos das folhas, flores, raízes e outras estruturas da planta.

Os extratos vegetais (EV) podem ser obtidos destas mesmas estruturas das plantas, e da mesma forma exibem atividade antioxidante. Os OE e EV de muitas plantas aromáticas condimentares cultivadas no Brasil já foram reconhecidamente eficazes em testes de antioxidação de alimentos e antimicrobianos.

Os fungos filamentosos são por excelência contaminantes e deteriorantes de alimentos, e algumas espécies são capazes de produzir micotoxinas, que são compostos metabólicos tóxicos, produzidos durante o metabolismo secundário fúngico e que, por ingestão, contato ou inalação são prejudiciais à saúde de animais e homens.

A produção das micotoxinas em um alimento por um fungo toxígeno precede o evento químico da oxidação. Logo, a prevenção da oxidação é uma forma de prevenção da formação de micotoxinas em alimentos. O hidroxibutilanisol (BHA) e o hidroxibutiltolueno (BHT) são os antioxidantes sintéticos mais usados com esse objetivo em alimentos comercializados, sendo inclusive chamados de antimicotoxigênicos. Porém a possibilidade de que possam ser nocivos ao organismo, somado à busca cada vez maior dos consumidores por produtos naturais e não sintéticos, abrem espaço para a pesquisa de novos antioxidantes naturais.

Diversas espécies de fungos são atualmente conhecidas como capazes de produzir uma ou mais toxinas, em função do substrato, da cepa fúngica envolvida, da temperatura, umidade relativa e atividade aquosa, dentre outros fatores. Dentre as espécies toxígenas isoladas a partir de cereais em nosso país destacam-se as pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Este gênero compreende espécies produtoras de ocratoxina A (OTA), tendo como principal produtor o *A. ochraceus*. Recentemente, *A. niger* e *A. carbonarius* ganharam importância por também serem considerados ocratoxígenos em regiões tropicais e subtropicais. Essas três espécies toxígenas são relatadas como presentes nos principais produtos destinados à alimentação animal e humana no Brasil.

A OTA é uma nefrotoxina, que causa impactos econômicos relevantes na avicultura e suinocultura, pois as aves domésticas e os suínos são os animais mais susceptíveis à ocratoxicose e às lesões renais dela conseqüentes. Segundo a Agência Internacional de Investigação sobre o Câncer (IARC), a OTA também acomete os humanos e foi classificada como pertencente à categoria 2b (um possível carcinógeno para o homem com evidências para animais). Baseada na sua carcinogenicidade, a Organização Mundial de Saúde (WHO) propôs um limite máximo de OTA de 5 ng/g (ppb) em cereais. Sua ingestão ocorre principalmente por alimentos vegetais como milho, café, cevada e seus derivados (micotoxicose primária) e, através de resíduos e metabólitos presentes em alimentos de origem animal, como carne e patês (micotoxicose secundária).

A prevenção da ocratoxicose consiste em boas práticas de produção de alimentos para evitar o crescimento e estabelecimento de fungos e no uso de aditivos como os antioxidantes sintéticos e adsorventes de micotoxinas.

A incorporação na dieta de OE e EV de plantas aromáticas, que podemos considerar como um sistema antioxidante de multicomponentes permitiria evitar a deterioração oxidativa do alimento, diminuir o estresse oxidativo do fungo no alimento e como resultado dessa ação diminuir a produção da micotoxina sem os efeitos nocivos dos antioxidantes sintéticos. No Brasil, são escassos os dados sobre as propriedades dos OE e EV com relação aos fungos toxígenos e suas micotoxinas associadas. Por outro lado, são cultivadas diversas espécies dessas plantas, e seus OE e EV poderiam constituir-se como antimicotoxicogênicos naturais prevenindo a ocratoxicose.

### **1.1 Hipótese**

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

### **1.2 Objetivo Geral**

Avaliar a efetividade de aditivos de origem vegetal para reduzir o crescimento dos fungos produtores de OTA.

### **1.3 Objetivos Específicos**

- a) Caracterizar o perfil toxígeno das cepas de *A. ochraceus*, *A. niger* e *A. carbonarius* utilizadas durante o experimento.
- b) Obter os OE a partir do material vegetal: hidrodestilação e extração hexânica.
- c) Obter os EV a partir do material vegetal: concentrado aquoso pós hidrodestilação e EV etanólico.
- d) Avaliar e selecionar *in vitro*, através do método de difusão em agar: técnica dos poços, os OE e/ou EV com maior capacidade de inibição do crescimento dos fungos produtores de OTA.
- e) Avaliar *in vitro* o material selecionado no item d sobre a velocidade de crescimento e fase de latência dos fungos produtores de OTA.
- f) Otimizar as condições do laboratório para execução das metodologias de extração a partir do material vegetal e dos ensaios antifúngicos *in vitro*.
- g) Analisar estatisticamente os resultados.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 As plantas aromáticas condimentares no Brasil

Logo após a descoberta de microorganismos como causadores de doenças, a idéia de que as plantas possuíssem uma capacidade natural de inibição do crescimento microbiano foi bem aceita. Desde a antiguidade o homem usa plantas para o tratamento de doenças infecciosas comuns, e alguns remédios tradicionais incluem ainda estas plantas para o tratamento de várias doenças (RÍOS; RECIO, 2005). Em muitas comunidades e grupos étnicos, o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza geralmente o único recurso terapêutico. Nos dias atuais, nas regiões mais pobres do País e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (BERTINI et al., 2005).

As plantas aromáticas condimentares no Brasil são muito difundidas e valorizadas principalmente por serem usadas como condimentos e chás, fortemente presentes na culinária. Seu cultivo pode ser realizado de forma orgânica, constituindo assim importante opção para a diversificação da pequena propriedade, podendo atingir cotações maiores do que quando cultivadas convencionalmente (MARCHESE et al., 2004).

As propriedades antimicrobianas dos condimentos e de seus OE têm sido estudadas principalmente com relação ao efeito inibidor de microorganismos patogênicos presentes em alimentos (SOUZA, S. et al., 2004). Os OE estão descritos como antimicrobianos, antioxidantes e antitoxígenos (BALANDRÍN et al., 1985).

A composição dos OE das plantas é determinada pela sua espécie, variedade e também por condições agrônômicas, período de colheita e tipo de processamento. Muito importantes também são as características ambientais e ecológicas, particulares da região de crescimento do vegetal (PORTE; GODOY, 2001).

#### 2.1.1 Alecrim

O *Rosmarinus officinalis* (Figura 1), pertence à família Lamiaceae, a qual engloba diversas plantas aromáticas, como hortelã, manjeriço, manjerona, tomilho e orégano, por exemplo, das quais é possível extrair um OE muito cheiroso, que apresenta em sua composição química complexa mistura de hidrocarbonetos, álcoois e compostos carbonílicos, onde os principais compostos são  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol, cânfora e  $\beta$ -mirceno (PORTE; GODOY, 2001).

De nome popular alecrim, esta erva apresenta diversos outros sinônimos: alecrim-de-cheiro, alecrim-das-hortas, alecrim-da-casa, alecrim-comum, alecrim-verdadeiro. Apresenta emprego culinário, medicinal, farmacêutico e cosmético (PORTE; GODOY, 2001). A atividade antioxidante do alecrim é conhecida há aproximadamente 30 anos (NASSU et al., 2003). O OE do alecrim é incorporado em unguentos para reumatismo, eczema, úlcera e feridas; por via oral é diurético, carminativo e ainda anti-inflamatório intestinal. Também é usado como inseticida (PORTE; GODOY, 2001; BACKLEH; LEUPOLD; PARLAR, 2003).

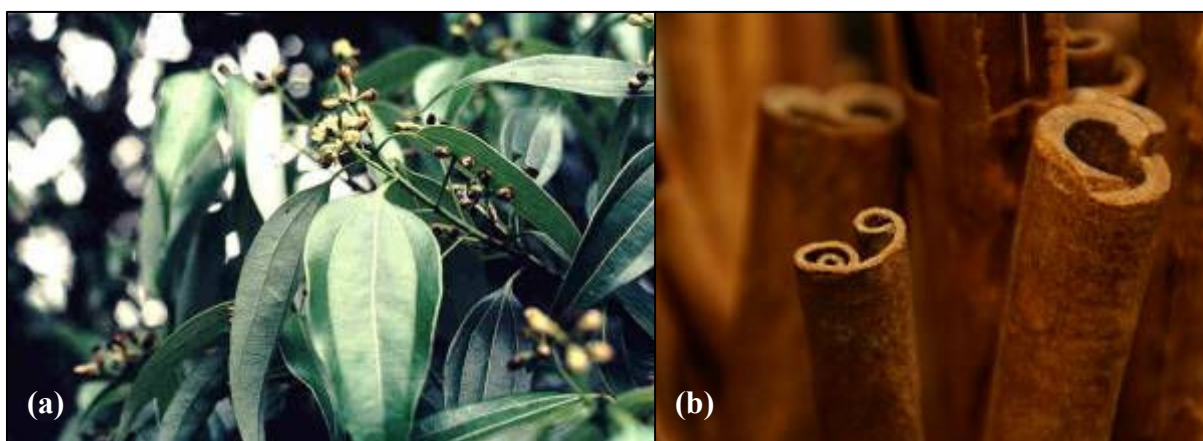


**Figura 1:** Planta de *Rosmarinus officinalis* (alecrim).

Fonte: [www.naturalnet.com.br/alecrim.html](http://www.naturalnet.com.br/alecrim.html)

### 2.1.2 Canela

A canela (*Cinnamomum* sp.) (Figura 2) pertence a família Lauraceae que compreende mais de 250 espécies. A espécie *Cinnamomum zeylanicum* é originária da Ásia e foi difundida na América do Sul. As partes importantes da planta são as folhas e a casca da árvore. Seu OE tem importância na medicina (para tratar úlceras, febre, alergias e efeitos anestésico e anti-diabético), e na conservação de alimentos como um aditivo. Seus principais constituintes são o aldeído cinâmico e o eugenol. Já foi reportado o seu efeito antifúngico em relação à fungos filamentosos isolados de alimentos (SOLIMAN; BADEAA, 2002; SOUZA, S. et al., 2004; VELLUTI et al., 2004; VIEGAS et al., 2005). Apesar do seu vasto uso, mais estudos são necessários explorando todas as propriedades do OE e EV de canela (KWON et al., 2009; WANG; WANG; YANG, 2009).



**Figura 2:** *Cinnamomum zeylanicum* (a) Árvore da canela; (b) Canela em “casca”.

Fonte: (a)[www.jardimdeflores.com.br](http://www.jardimdeflores.com.br); (b) [flickr.com/photos/amandavivan](https://www.flickr.com/photos/amandavivan)

### 2.1.3 Cominho

Pertencente a família Apiaceae, o cominho (*Cuminum cyminum*) é muito popular na culinária. Usam-se do cominho principalmente os grãos, mas também suas folhas (Figura 3). É utilizado no combate às atonias gástricas e intestinais, aos espasmos gastrintestinais, diarreia e epilepsia. Seu OE possui principalmente aldeído cumínico, cimol, álcool cumínico e matérias resinosas (SAFOURA; MORTEZA; MOHSEN, 2008; LI et al., 2009), que é retirado dos grãos e possui efeito inseticida, atividade antimicrobiana e antifúngica (SINGH et al., 2002; BOYRAZ; ÖZCAN, 2005).



**Figura 3:** *Cuminum cyminum* (a) Grãos de cominho; (b) Planta de cominho.

Fonte: (a) [br.geocities.com/receitasvege/ervas\\_temperos](http://br.geocities.com/receitasvege/ervas_temperos); (b) [www.portalsaofrancisco.com.br](http://www.portalsaofrancisco.com.br)

### 2.1.4 Cravo-da-Índia

O cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*) (Figura 4) pertence a família Myrtaceae, e é usado como condimento, medicamento natural, elemento para elaboração de perfumes e incensos aromáticos. Os botões florais secos são a fonte do OE, e seu componente mais importante é o eugenol. O eugenol apresenta efeitos anti-inflamatório, cicatrizante, analgésico e é eficaz na eliminação de bactérias presentes na boca. (GENG et al., 2007). O cravo-da-Índia possui reconhecido potencial antifúngico descrito na literatura em relação aos fungos isolados normalmente de alimentos (RANASINGHE; JAYAWARDENA; ABEYWICKRAMA, 2002; SOUZA, S. et al., 2004; VELLUTI et al., 2004; AMARAL; BARA, 2005; LOPEZ et al., 2005).



**Figura 4:** *Eugenia caryophyllata* (a) Botão de cravo seco; (b) Botão de cravo verde.

Fonte: [natural.enternauta.com.br/tag/cravo-da-india](http://natural.enternauta.com.br/tag/cravo-da-india).

### 2.1.5 Erva-doce

As folhas e sementes da erva-doce (*Pimpinella anisum*) (Figura 5) são de uso na culinária e na fabricação de cosméticos. O chá das sementes é indicado para constipações, dismenorréias, cólicas, afecções do sistema urinário, diarreias, azia e para acalmar a área dos olhos, e mais recentemente foi reportada a atividade antiepilética da planta (AL-BAYATI, 2008; JANAHMADI et al., 2008). A erva-doce é da família Umbeliferae e possui um OE de forte odor característico e com atividade antibiótica e antifúngica, cujo principal composto é o anetol (SINGH et al., 2002; SOLIMAN; BADEAA, 2002).



**Figura 5:** *Pimpinella anisum* (a) Planta de erva doce florida; (b) Grãos de erva doce.

Fonte : [www.naturezadivina.com.br/loja/product](http://www.naturezadivina.com.br/loja/product)



### 2.1.6 Hortelã

Menta ou hortelã (*Mentha* sp) (Figura 6) também pertence a família Lamiaceae. A espécie mais difundida no Brasil é a hortelã-pimenta (*Mentha piperita*). É uma planta conhecida por suas propriedades terapêuticas (antiflatulento, colagogo, digestivo) e aromáticas, sendo muito utilizada para problemas de mau hálito (na forma de chicletes e balas, e até mesmo a planta *in natura*) e na indústria cosmética. Possui importância na culinária tanto em doces como em salgados. Seu OE possui taninos, flavonóides, princípios amargos, triterpenos e principalmente mentol (ANSARI et al., 2000; RUIZ DEL CASTILHO; BLANCH; HERRAIZ, 2004; VIDAL et al., 2007).



**Figura 6:** Planta de *Mentha piperita* (hortelã).

Fonte: [www.aphotoflora.com/DevonandCornwall](http://www.aphotoflora.com/DevonandCornwall)

### 2.1.7 Manjericão

O manjericão (*Ocimum basilicum*) (Figura 7) pertence à mesma família que a hortelã e o alecrim e está fortemente presente na culinária do Brasil e do mundo devido ao seu aroma e sabor. O OE é retirado de suas folhas e é usado como aromatizante e possui como constituintes principais o estragol (metil-chavicol) e o linalol. Esse OE mostrou-se capaz de inibir o crescimento de microorganismos em alimentos, agir como antioxidante (por possuir compostos fenólicos) e ser eficaz como inseticida (por possuir cânfora) (LÓPEZ; JORDÁN; PASCUAL-VILLALOBOS, 2008; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009).



**Figura 7:** Planta de *Ocimum basilicum* (manjericão).

Fonte: [correiogourmand.com.br](http://correiogourmand.com.br)

### 2.1.8 Manjerona

A manjerona (*Origanum majorana*) (Figura 8) é da mesma família do manjericão, e também exibe atividade antioxidante e antimicrobiana devido ao seu OE, que possui como principais constituintes o  $\alpha$ -terpineol e linalol, sendo usado como aromatizante de alimentos. A planta fresca e seca é usada em culinária e o seu chá é usado para distúrbios gastrointestinais e respiratórios (BUSATTA et al., 2008; FECKA; TUREK, 2008).



**Figura 8:** Planta de *Origanum majorana* (manjerona).

Fonte: [aromacoresabor.com/Ervasarom.html](http://aromacoresabor.com/Ervasarom.html)

### 2.1.9 Noz moscada

Noz moscada (*Myristica fragrans*) é a semente seca de um fruto (Figura 9) que provem de uma árvore vistosa, a moscadeira, pertencente à família das Myristicaceae. A noz moscada é largamente comercializada como condimento na indústria frigorífica, na indústria farmacêutica, na perfumaria e tabacaria. Como principais componentes do seu OE temos: borneol, geraniol, linalol, terpineol, eugenol e miristicina, este último, narcótico e tóxico se ingerido em alta quantidade (SHEKARFOROUSH et al., 2007; CALLISTE et al., 2010).



**Figura 9:** *Myristica fragrans* (a) Grão de noz moscada; (b) Fruto da moscadeira

Fonte: (a) [aromacoresabor.com/especiarias.html](http://aromacoresabor.com/especiarias.html); (b) [gastronomicas.blogspot.com](http://gastronomicas.blogspot.com)

### 2.1.10 Orégano

O orégano (*Origanum vulgare*) (Figura 10) é uma planta pertencente a família Lamiaceae, conhecida e amplamente utilizada por seu sabor e aroma conferidos aos alimentos. É originária da Europa e Ásia (centro e norte) podendo ser usada também em perfumaria, como planta medicinal e melífera (CASTRO; RAMOS, 2003). O OE do orégano mostra grande atividade antimicrobiana atribuída aos compostos fenólicos timol e carvacrol que são usados inclusive para tratamento de infecções orais, além de hidrocarbonetos (SANTORO et al., 2007; SHEKARFOROUSH et al., 2007). O OE é usado para conservar alimentos armazenados em diferentes temperaturas (SHEKARFOROUSH et al., 2007; SOUZA, E., 2008).



**Figura 10:** Planta de *Origanum vulgare* (orégano).

Fonte: [aromacoresabor.com/especiarias.html](http://aromacoresabor.com/especiarias.html)

## 2.2 Os fungos

Os fungos são um vasto grupo de organismos heterotróficos classificados dentro do Reino Fungi. Estão incluídos neste reino organismos de dimensões consideráveis, como os cogumelos, mas também muitas formas microscópicas, como as leveduras. O Reino Fungi sofreu mudanças substanciais no arranjo dos vários filios nas últimas décadas, especialmente a partir do momento em que técnicas para comparar características bioquímicas (tais como RNA ribossômico e DNA) foram se tornando mais sofisticadas e precisas. O sub filo Eumycota (fungos verdadeiros) reconhece quatro divisões: os Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota. O gênero *Aspergillus* se enquadra dentro da divisão Ascomycota, são fungos dotados de septos regulares, e os conídios não estão em esporângios (BRUNS; WHITE; TAYLOR, 1991; BRUNS et al., 1993).

Os fungos são capazes de utilizar uma grande variedade de substratos para obter carbono orgânico e possuem adaptações a uma grande variedade de condições de vida. Por isso, colonizam inúmeros *habitats* (águas doces e salgadas, terra, madeira, estrume, resíduos queimados) e desempenham funções relevantes nos ecossistemas, como decompositores ou parasitas, por exemplo. Os fungos saprófitas são grandes decompositores da biosfera e possuem várias enzimas capazes de degradar matéria orgânica. A decomposição libera dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) para a atmosfera e retorna ao solo nitrogênio e fósforo nas formas minerais que as plantas poderão utilizar (SAMSON et al., 2000). Também possuem importância econômica, com uso em cervejaria, panificação, fermentação industrial, uso farmacêutico, biotecnológico, e diretamente como alimento. Como um dos efeitos negativos

da colonização fúngica, podemos citar a redução do valor nutricional de grãos armazenados (MUELLER; BILLS; FOSTER, 2004).

A propagação dos fungos filamentosos, em geral, se dá por dispersão de conídios, mas fragmentos hifálicos podem também originar outra formação micelial quando destacado e colocado em meio apropriado ao seu crescimento. As estruturas reprodutivas são diferenciadas das vegetativas, o que constitui a base sistemática de identificação desses fungos (SAMSON et al., 2000). Além da redução do valor nutricional dos alimentos pode ocorrer a produção de micotoxinas e produção de esporos alergênicos, que constituem um fator de risco para a saúde humana e animal. Síndromes tóxicas causadas por ingestão ou aspiração de micotoxinas são denominadas micotoxicoses (RICHARD et al., 2009).

### 2.3 As micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos tóxicos de baixo peso molecular, produzidas como resultado do metabolismo secundário de fungos filamentosos, principalmente pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, e que exercem efeitos nocivos sobre os animais e seres humanos. Dentre as micotoxinas que contaminam os alimentos, as mais estudadas e de maior importância econômica são as aflatoxinas, a zearalenona, os tricotecenos, as fumonisinas e a ocratoxina A. (SASSAHARA; YANAKA; NETTO, 2003). Porém nem todos os fungos são produtores de micotoxinas e a presença de espécies fúngicas contaminantes não significa necessariamente que há presença destes metabólitos em um determinado alimento. A produção destas depende de vários fatores relacionados ao ambiente, substrato e potencial fúngico para produção das mesmas (SAMSON et al., 2000).

Elas possuem diversos efeitos no organismo animal, como reações hepatotóxicas, nefrotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas. A gravidade dos seus efeitos depende, entre outros fatores, da sua toxidez, do grau e tempo de exposição, da idade e do estado nutricional do indivíduo. Além da problemática no nível da segurança alimentar, as micotoxinas freqüentemente impõem graves conseqüências em nível sócio-econômico, sendo responsáveis por elevadíssimas perdas econômicas na produção de cereais, no seu processamento, na redução do valor nutricional dos alimentos e ainda nas conseqüentes perdas devidas a patologias/mortes de animais alimentados com rações contaminadas (NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2006). Geralmente, a contaminação por micotoxinas se associa ao manejo inadequado das plantações, colheita, armazenamento e transporte em condições inapropriadas. Os principais fatores intervenientes são as condições de umidade e temperatura relacionados à armazenagem, que propiciam o crescimento indesejado dos fungos toxígenos (ROSA et al., 2006; ASTORECA et al., 2009).

As micotoxicoses podem ser primárias e secundárias. A micotoxicose primária ocorre com o consumo direto dos produtos contaminados, e a secundária ocorre ao se ingerir leite, carne, ovos ou derivados de animais que ingeriram alimento contaminado. A micotoxicose não é contagiosa e o tratamento com drogas produz pouco ou nenhum efeito. Geralmente se apresenta como surto associado com um alimento ou forragem específica, onde o exame do material suspeito revela sinais de atividade fúngica (LILLEHOJ, 1991). A principal via de contaminação é a digestiva, porém também é descrita a via aérea, onde diversas micotoxinas já foram detectadas em grãos de poeira orgânica e esporos de fungos. Foi relatado que estas substâncias podem penetrar os alvéolos pulmonares, causando alterações imunológicas e inflamatórias locais, entre outros efeitos (SORENSEN, 1999).



## 2.4 Gênero *Aspergillus* e as espécies produtoras de ocratoxina A

O gênero *Aspergillus* foi catalogado em 1729 pelo padre italiano e biólogo Pietro Antonio Micheli. Observando o fungo no microscópio, Micheli lembrou-se da forma de um *aspergillum* (borrifador de água santa), e o nomeou de acordo com o objeto.

As espécies são aeróbicas e encontradas em ambientes ricos em oxigênio, onde geralmente crescem na superfície do local que vivem (KLICH, 2002). São capazes de crescer em uma grande faixa de variação de temperatura (de 10 a 50°C), pH (2,0 – 11) e osmolaridade (próximo ao da água pura até 34% de sais) (LUBERTOZZI; KEASLING, 2009). O gênero possui mais de 200 espécies, é filamentososo, cosmopolita e distribuído amplamente na natureza. É comumente isolado do solo e alimentos, sendo encontrado com maior frequência nas regiões de climas tropicais e subtropicais (PITT; HOCKING, 1997).

Este talvez seja o gênero fúngico mais conhecido no mundo, com ações positivas e negativas ao homem. Por exemplo, *Aspergillus niger* é importante na fabricação da progesterona e ácido cítrico; *A. oryzae* na fabricação do saquê (vinho de arroz). Algumas cepas de *A. fumigatus* são patógenos de homens e animais por aspiração de seus esporos, e *A. flavus*, *A. niger* e *A. ochraceus* são exemplos de produtores de micotoxinas (LUBERTOZZI; KEASLING, 2009). Com certeza, a produção de inúmeras micotoxinas por inúmeras espécies (Tabela 1) é o pior efeito negativo descrito.

**Tabela 1:** Potencial toxígeno das principais espécies de *Aspergillus* que contaminam produtos agrícolas.

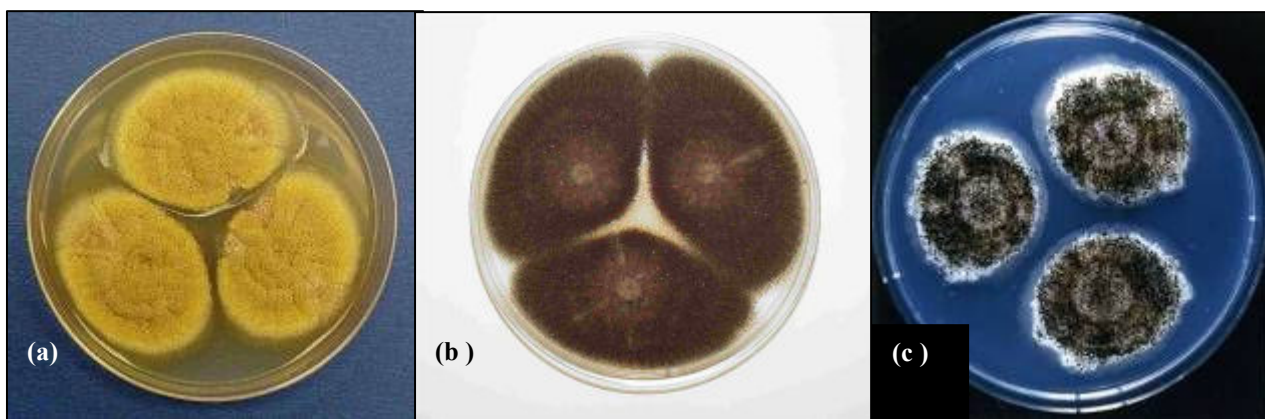
ESPÉCIES	MICOTOXINAS
<i>A. aculeatus</i>	Ácido Secalônico D
<i>A. candidus</i>	Ácido Kójico, Candidulina, Terfenilina, Xantoacina
<i>A. clavatus</i>	Citochalasina E, Patulina, Clavatol, Triptoquivalonas
<i>A. carbonarius</i>	Rubrofusarina B, Ocratoxina A
<i>A. carneus</i>	Citrinina
<i>A. flavus</i>	Aflatoxinas B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> , Aflatrem, Ácido Aspergílico, Ácido Ciclopiazônico, Ácido Kójico, Aflavininas, Ácido 3-Nitropropilônico, Paspalininas
<i>A. fumigatus</i>	Fumitremorgens A e C, Gliotoxinas, Fumigaclavinas, Fumitoxinas, Fumigatinas, Fumagilinas, Espinulosinas, Triptoquivalinas, Verruculogem
<i>A. niger</i>	Ocratoxinas, Malforminas, Naftoquinonas
<i>A. niveus</i>	Citrinina
<i>A. nomius</i>	Aflatoxinas (B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> ), Ácido Aspergílico, Ácido Kójico
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxinas, Ácido Penicílico, Ácido Kójico, Ácido Secalônico A, Xantomegnina, Viomeleina
<i>A. oryzae</i>	Ácido Ciclopiazônico, Ácido Kójico, Ácido 3-Nitropropilônico
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas (B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> ), Ácido Aspergílico, Ácido Kójico, Aflavininas
<i>A. tamaritii</i>	Ácido Ciclopiazônico, Ácido Kójico
<i>A. terreus</i>	Citrinina, Patulina, Citreoviridina, Mevinolina, Territrems, Ácido Terréico, Terramide A
<i>A. versicolor</i>	Esterigmatocistina, Versicolorinas, Nidulotoxinas
<i>A. wentii</i>	Metilxantonas, Ácido 3-Nitropropilônico, Ácido Kójico

Fonte: FRISVAD; SAMSON (1991); PITT; HOCKING (1997).

As espécies de *Aspergillus* sp. caracterizam-se por conidióforos na forma de *aspergillum*, ou seja, uma vesícula seguida de estruturas chamadas fiálides. Se as fiálides são ligadas diretamente a vesícula dizemos que a cabeça aspergilar é unisseriada. Se entre as fiálides e a cabeça aspergilar há outra camada de células (métulas), a cabeça aspergilar será bisseriada. A base do conidióforo forma um “T” ou “L” que os conecta com uma célula vegetativa chamada de célula pé. Estas e outras características macro e microscópicas são a base da taxonomia do gênero (KLICH, 2002).

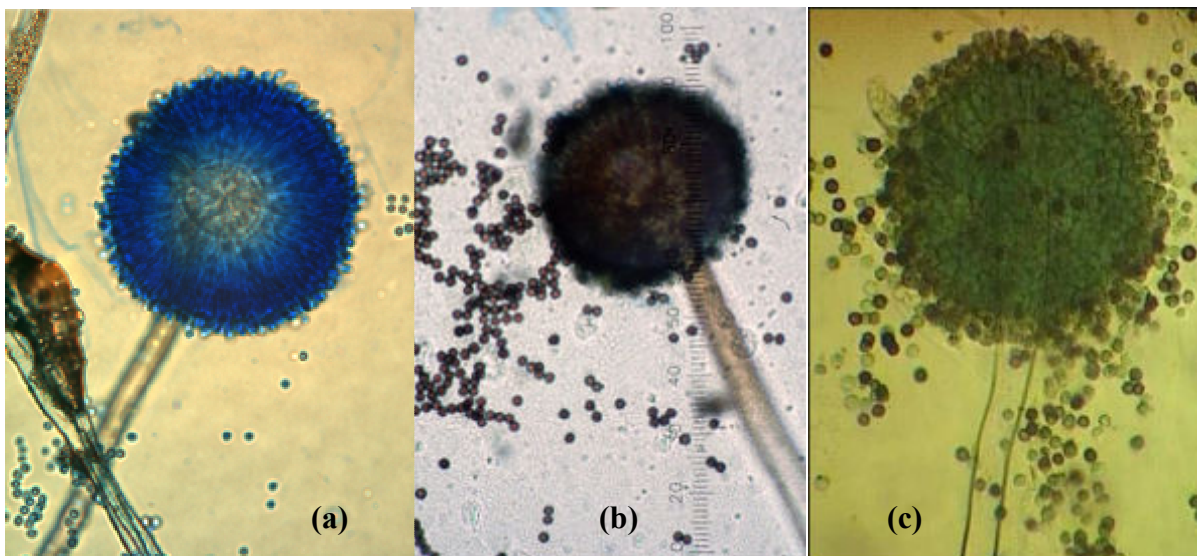
As espécies de *Aspergillus* produtoras de OTA são: *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. melleus* e *A. petrakii* (CIEGLER, 1971; HESSELTINE et al., 1972), *A. glaucus* (CHELKOWSKI et al., 1987), *A. niger* agregados, *A. carbonarius* (ABARCA et al., 2001; TÉREN et al., 1996) e algumas espécies de *Penicillium* sp. (EL-BANNA; PITT; LEISTNER, 1987; BRIDGE et al., 1989). Em nosso país, com regiões de clima tropical e subtropical, destacam-se as espécies *A. ochraceus*, *A. niger* e *A. carbonarius* (SCUSSEL, 1998).

A colônia de *A. ochraceus*, Seção Circumdati, possui cor amarelo-ocre, conferida pela cor dos conídios, enquanto que as colônias de *A. niger* agregados e *A. carbonarius* (Figura 11), Seção Nigri, são negras. Quanto as características microscópicas, as três espécies apresentam em sua maioria, cabeça aspergilar bisseriada e vesículas esféricas a quase esféricas com conídios esféricos. Os conídios de *A. ochraceus* se apresentam de lisos a finamente rugosos, os de *A. niger* agregados são finamente rugosos a muito rugosos, e de *A. carbonarius* (Figura 12) variam de muito rugosos a espiculados (KLICH, 2002).



**Figura 11:** (a) Colônia de *Aspergillus ochraceus*; (b) Colônia de *Aspergillus niger*; (c) Colônia de *Aspergillus carbonarius*.

Fonte: (a) [www.aemtek.com/.../Aspergillus+ochraceus.jpg](http://www.aemtek.com/.../Aspergillus+ochraceus.jpg); (b) [www.aemtek.com/.../433-3/Aspergillus+niger\\_p.jpg](http://www.aemtek.com/.../433-3/Aspergillus+niger_p.jpg); (c) [www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/showImage.jsp](http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/showImage.jsp)



**Figura 12:** (a) Micrografia de *Aspergillus ochraceus*; (b) Micrografia de *Aspergillus niger*; (c) Micrografia de *Aspergillus carbonarius*.

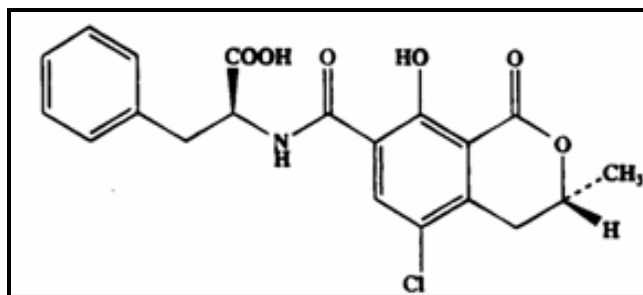
Fonte: (a) [www.schimmel-schimmelpilze.de/images](http://www.schimmel-schimmelpilze.de/images); (b) [www.msml-laboratories.com/phdi/p1.nsf/imgpage](http://www.msml-laboratories.com/phdi/p1.nsf/imgpage); (c) [www.tigulliovino.it/enologia\\_viticultura/aspergillus-carbonarius-ocratossina.jpg](http://www.tigulliovino.it/enologia_viticultura/aspergillus-carbonarius-ocratossina.jpg)

## 2.5 Ocratoxina A

A OTA é uma nefrotoxina com impacto principalmente na produção suína e aviária, responsável pela nefropatia micotóxica suína e aviária (SCUSSEL, 1998). A sua nefrotoxicidade manifesta-se de diversos modos, desde a alteração do volume dos rins dos animais, alteração da osmolaridade da urina, aumento do volume de urina, alterações na função renal, diminuição do *clearance*, necrose do túbulo proximal, diminuição da atividade enzimática do rim e desenvolvimento de adenomas e tumores renais (NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2006).

É a segunda em importância toxicológica na alimentação animal e humana, depois das aflatoxinas (BRAGULAT; ABARCA; CABAÑES, 2001). O grupo das ocratoxinas compreende nove metabólitos do ponto de vista estrutural, a OTA é a mais estudada por sua alta frequência e toxicidade. É uma fenilalanina (C<sub>20</sub> H<sub>18</sub> ClNO<sub>6</sub>) que se deriva da substituição da isocumarina, ou seja, uma dihidro-isocumarina unida a um grupo L-fenilalanina por uma ligação peptídica (Figura 13) (MOSS, 1996).

O trato gastrointestinal é a principal via de contaminação de OTA, sendo absorvida lentamente ao longo do percurso. Uma das suas propriedades toxicocinéticas mais significativas é a alta afinidade para ligar-se a proteínas plasmáticas. A fração ligada a macromoléculas constitui um reservatório da micotoxina que permite libertá-la para os tecidos durante um longo período de tempo, aumentando o seu tempo de meia-vida (NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2006).



**Figura 13:** Estrutura química da ocratoxina A

Fonte: [http://www.gendiag.com.br/nossos\\_produtos/food-safety/OcratoxinaA.png](http://www.gendiag.com.br/nossos_produtos/food-safety/OcratoxinaA.png)

A OTA já foi detectada em soro sanguíneo de homens e mulheres (ZIMMERLI; DICK, 1995; UENO et al., 1998) e em leite humano (MIRAGLIA et al., 1998). Sua ingestão ocorre principalmente por alimentos vegetais como milho, café e seus derivados (micotoxicose primária) e, através de resíduos e metabólitos presentes em alimentos de origem animal, como carne e patês (micotoxicoses secundária) (MONACI et al., 2005). Ela tem sido detectada, na sua maioria, em cereais, frutas secas, café e cacau. Foi detectada também no sangue de pessoas e animais após o consumo de alimentos contaminados nos Bálcãs, Escandinávia, Alemanha, França, Canadá, Estados Unidos e Japão. É uma micotoxicoses de ocorrência no mundo inteiro com variações na frequência entre os países, sempre causando problemas renais clínicos e subclínicos em humanos e similarmente aos animais de granja (SANGARE-TRIGORI et al., 2006).

No caso dos ruminantes, a OTA é rapidamente hidrolisada a  $\alpha$ -ocratoxina pela população microbiana do rúmen. Por este motivo, os níveis séricos nestes animais são muito mais baixos que os encontrados em outros mamíferos. Os ruminantes têm capacidade para degradar a OTA presente em rações, em concentrações superiores a 12 mg/kgde ração. Este valor excede em muito os teores encontrados nos gêneros alimentícios (NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2006).

Segundo a Agência Internacional de Investigação sobre o Câncer (IARC), a OTA foi classificada como pertencente à categoria 2b, isto é, um possível carcinógeno para o homem com evidências para animais (LEGARDA; BURDASPAL, 1998). Baseada na sua carcinogenicidade, a Organização Mundial de Saúde (WHO) propôs um limite máximo de OTA de 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (ppb) em cereais (ABARCA et al., 2001).

## 2.6 Óleos essenciais e extratos vegetais de plantas como forma de prevenção do crescimento fúngico e da produção da ocratoxina A

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. Dentre as substâncias antimicotoxicogênicas conhecidas temos: os adsorventes e os antioxidantes (GOPALKRISHNAN; BANUMATHI; SURESH, 1997).

O funcionamento dos adsorventes baseia-se no fato das toxinas se ligarem a estes produtos através de cargas elétricas, fazendo com que as toxinas não sejam absorvidas pelos animais, e sejam eliminadas nas fezes. São argilas de origem vulcânica, como aluminossilicatos e as bentonitas, adicionados à ração animal (LOPES, 2008). Um dos inconvenientes do uso de substâncias inorgânicas adsorventes de micotoxinas é sua

inespecificidade em sua capacidade de adsorção, já que podem sequestrar moléculas de alto valor nutritivo da dieta.

Atualmente, os OE e EV 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).

Uma substância antioxidante pode ser definida como composto ou substância química que inibe ou retarda a oxidação (ATOUI et al., 2005). O BHA, o BHT, e o propilgalato (PG) são os antioxidantes sintéticos mais eficientes em vários sistemas alimentícios, apresentando alta estabilidade e baixo custo. Porém presume-se que os antioxidantes sintéticos são possíveis carcinógenos (MADHAVI; SALUNKHE, 1996), e a possibilidade de que possam ser nocivos ao organismo, somada à busca cada vez maior dos consumidores pelos produtos naturais e não sintéticos, abre espaço para a pesquisa de novos antioxidantes naturais.

O método mais comumente utilizado para o isolamento de antioxidantes naturais de materiais vegetais é a extração com solventes, polares ou não-polares, como água, metanol, hexano ou pentano (BANDONIENE et al., 2002). Folhas, frutos, sementes e óleos recebem especial atenção por serem fontes de antioxidantes naturais, como compostos fenólicos, o ácido ascórbico, o  $\alpha$ -tocoferol e os carotenóides (SALDANHA, 2005); e recentemente alguns EV, como de alecrim, sálvia, chá verde, etc.

Estes extratos são bem conhecidos por suas propriedades antioxidantes, anti-mutagênicas, anti-inflamatórias, anti-úlceras, anticarcinogênicas e antimicrobianas, bem como pela redução do risco de doenças cardiovasculares (LOULI; RAGOSSIS; MAGOULAS, 2004; HRAS et al., 2000). Os compostos fenólicos presentes nestas plantas podem atuar como antifúngicos e inibidores da produção de micotoxinas por atuarem na regulação da peroxidação lipídica, inibindo a formação de peróxidos e conseqüente estresse oxidativo que está relacionado à biossíntese de micotoxinas (OLIVEIRA et al., 2007).

Logo, o uso de numerosos OE e EV, e seus componentes, constituem uma alternativa para a prevenção do crescimento fúngico e a produção de micotoxinas de forma não nociva ao organismo animal. O inconveniente do uso desses OE e EV de plantas condimentares seria a baixa aceitação pelo forte odor e sabor causados pela quantidade considerável a ser adicionada nos alimentos. Mais estudos estão sendo realizados a fim de buscar combinações de óleos e extratos e formas de obter uma concentração inibitória mínima sem interferir na aceitação do alimento (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009).

## 2.7 Estudos preliminares

Estudos da incidência de micobiota e detecção de micotoxinas em alimentos destinados ao consumo humano e animal demonstraram a presença das principais espécies produtoras de OTA (DALCERO et al., 1997, 1998; MAGNOLI et al., 1998, 1999, 2002, 2006, ROSA et al., 2004, 2006, 2009).

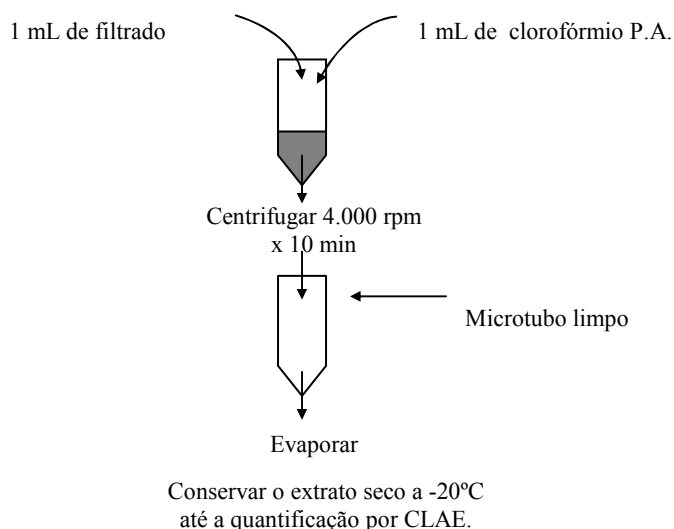
Alguns produtos naturais tais como fenóis, especiarias e vários OE foram evidenciados como inibidores efetivos do crescimento fúngico e da produção de micotoxinas em todo o mundo (PRASAD; SAHAY; MASOOD, 1994; ARORA; OHLAN, 1997; SOLIMAN; BADEAA, 2002; PARANAGAMA et al., 2003; NGUEFACK et al., 2004; SOUZA, S. et al., 2004; VIEGAS et al., 2005; BLUMA; ETCHEVERRY, 2008).

Apesar dos avanços desse tipo de estudo nos últimos dez anos, há poucos relatos no Brasil envolvendo as plantas aromáticas condimentares cultivadas no país, avaliando seu potencial antifúngico contra as cepas produtoras de OTA e a sua possível interferência nos níveis de produção desta micotoxina.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Determinação da capacidade toxígena de cepas de *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* a serem utilizadas durante o experimento

Foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Téren et al. (1996) (Figura 14). As cepas toxígenas (*A. ochraceus* NRLL 3174, *A. niger* ATCC 1004 e *A. carbonarius* RC 2054) foram cultivadas em caldo extrato de levedura sacarose (*yeast extract sucrose agar* - YES) por 10 dias a 30 °C sob escuro; após o tempo de cultivo o caldo foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 1. Acrescentou-se a microtubos 1mL do filtrado e 1mL de clorofórmio que foram centrifugados a 4000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos, seguidos de evaporação e ressuspensão em 1mL dda fase móvel no momento da análise. A produção de OTA foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, com detector de fluorescência ( $\lambda_{exc}$  330 nm;  $\lambda_{em}$  460 nm), coluna C18 (Microsorb MV, Varian; 150 x 4,6mm x 5 $\mu$ m). A fase móvel (acetonitrila:água:ácido acético, 57: 41: 2) foi bombeada a um fluxo de 0,7 mL min<sup>-1</sup>. O volume de injeção foi de 20  $\mu$ L e o tempo de retenção foi cerca de 4 $\pm$ 1 min. O limite de detecção da análise foi de 1 ng g<sup>-1</sup>.



**Figura 14:** Esquema ilustrativo da metodologia proposta por Téren et al. (1996) para determinação da capacidade de produção de ocratoxina A.

#### 3.2 Amostragem do material vegetal

As plantas aromáticas escolhidas para o experimento são plantas originárias e/ou amplamente cultivadas e usadas no Brasil como condimentos. Um total de dez espécies vegetais foi selecionado; espécies cujos seus OE/EV possuem alguma atividade antimicrobiana relatada na literatura. Todo o material vegetal foi gentilmente cedido pela

Vitalis Ind. e Com. Ltda., em embalagens hermeticamente fechadas, na quantidade total de 1 kg cada, e identificadas como:

- Alecrim
- Canela
- Cominho
- Cravo
- Erva doce
- Hortelã
- Manjeriçã
- Manjerona
- Noz moscada
- Orégano

### **3.3 Obtenção dos óleos essenciais**

Os OE foram extraídos por hidrodestilação em equipamento Clevenger modificado e armazenados sob escuro, a 4°C, em frascos tipo Falcon graduados (BASSOLE et al., 2003). Os equipamentos foram manufaturados por vidreiro artesão na UFRRJ.

Foi obedecida uma relação de 100g de material vegetal para cada litro de água. O processo de extração ocorreu por 1h após ebulição e o rendimento total de cada óleo essencial foi registrado.

Os OE foram também obtidos através de extração hexânica que constitui uma ótima alternativa para quando rendimento obtido por hidrodestilação é baixo. Esta foi realizada de forma passiva e sob escuro, de acordo com Kuate et al. (2006), com modificações, numa relação de 1:2 p/v (material/solvente), por 48 horas. O filtrado obtido foi evaporado em banho Maria a 70°C até se obter um volume final de 10 mL de cada OE hexânico, que foram armazenados a 4 °C em frasco âmbar.

### **3.4 Obtenção dos extratos vegetais**

Os EV usados no estudo foram: o concentrado aquoso pós hidrodestilação e o etanólico. O EV etanólico foi produzido segundo Thanaboripat et al. (2007), com modificações, de forma passiva e sob escuro, numa relação de 1:2 p/v (material/solvente), por 48 horas. O filtrado obtido foi evaporado em banho Maria a 80°C até se obter um volume final de 10 mL, sendo então armazenados a 4 °C em frasco âmbar.

O EV aquoso foi obtido juntamente com o óleo essencial após o processo de hidrodestilação, denominado então EV aquoso pós hidrodestilação. Todo o concentrado aquoso foi coletado do aparato de Clevenger modificado e armazenado em frasco âmbar a uma temperatura de 4 °C (ROZWALKA et al., 2008).

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

Foi realizado segundo metodologia de Mariath et al. (2006): uma suspensão de conídios fúngicos ( $10^6$  conídios/mL contados em hematocitômetro) foi incorporada em 20 mL de agar YES fundido. Cinco poços de 6 mm de diâmetro e equidistantes entre si foram feitos na placa com auxílio de um bisturi *punch*. Nesses pequenos poços foram pipetados 50 µL das substâncias testadas. Foram realizados controles com hexano para o OE hexânico, etanol para o EV etanólico, água destilada estéril para o EV aquoso pós hidrodestilação.

### **3.6 Avaliação dos óleos essenciais e extratos vegetais sobre o crescimento de cepas de *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* produtoras de ocratoxina A**

Os OE e EV mais efetivos na inibição do crescimento fúngico no ensaio de triagem através do método de difusão em agar foram selecionados. A avaliação dos antioxidantes naturais foi feita seguindo o teste de diluição em agar segundo Soliman; Badeaa com modificações (2002): Os EV e OE foram adicionados ao meio de cultivo a 45-50°C nas concentrações de 50 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg, 300 mg/kg e 600 mg/kg, além dos controles. A inoculação de cada cepa em estudo foi feita no centro das placas com uma suspensão de conídios em agar semi-sólido ( $10^3$  conídios por inoculação) obtida a partir de colônia com 7 dias de crescimento cultivada em agar YES. Todas as placas foram incubadas a 25°C, durante 10 dias em estufas com controle eletrônico de temperatura. Toda esta etapa do experimento foi realizada em triplicata. Foram medidos parâmetros do crescimento fúngico: dois diâmetros perpendiculares foram aferidos diariamente até que a colônia ocupasse toda a placa. A velocidade de crescimento (mm/dia) foi calculada através de regressão linear (fase linear do crescimento fúngico). Também foi determinada a fase de latência (fase lag) do crescimento fúngico, que é a fase onde não ocorre divisão celular, e o metabolismo celular trabalha a fim de produzir enzimas para o crescimento e adaptação nas novas condições ambientais. A fase lag foi definida como o tempo (h) para se atingir 2 mm de diâmetro.

### **3.7 Análises estatísticas**

Os valores da velocidade de crescimento e fase lag foram submetidos à análise de variância. O nível de significância para informar as diferenças foi de  $P \leq 0,05$ . As comparações estatísticas foram realizadas entre controles e tratamentos (SAMPAIO, 2007), através do teste de Dunnett. As análises foram conduzidas usando o programa computacional PROC GLM em SAS (*SAS Institute, Cary, NC*).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Determinação da capacidade toxígena de cepas de *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* utilizadas durante o experimento

A avaliação do perfil toxígeno das cepas de referência em meio MEA foi realizada antes do início dos experimentos. A cepa *A. ochraceus* NRLL 3174 e *A. carbonarius* RC 2054 foram produtoras de OTA durante todo o experimento, com valores de produção respectivos de 6,1 ug/mL e 9,9 ug/mL, diferentemente da cepa *A. niger* (ATCC 1004), que não se mostrou constante na produção, sendo então excluída do experimento. Nenhuma cepa de *A. niger* testada mostrou-se constantemente produtora de OTA, esta espécie foi então excluída de nossos objetivos.

### 4.2 Rendimento da produção de óleos essenciais por hidrodestilação

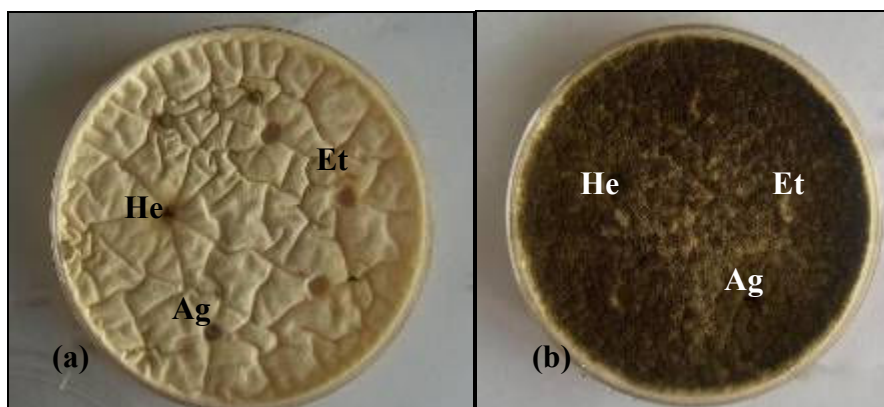
O processo de extração de OE através de hidrodestilação apresentou volumes de rendimento distintos para cada planta utilizada (Tabela 2). As plantas que apresentaram melhores rendimentos foram alecrim (1,5 mL) e orégano (1,0 mL).

**Tabela 2:** Rendimentos da produção de óleos essenciais por hidrodestilação

OE	Rendimento total em mL para cada 100g de matéria vegetal
Alecrim	1,5
Orégano	1,0
Cravo	0,9
Manjerona	0,8
Erva-doce	0,7
Cominho	0,5
Manjericão	0,5
Noz moscada	0,3
Hortelã	0,2
Canela	0,2

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

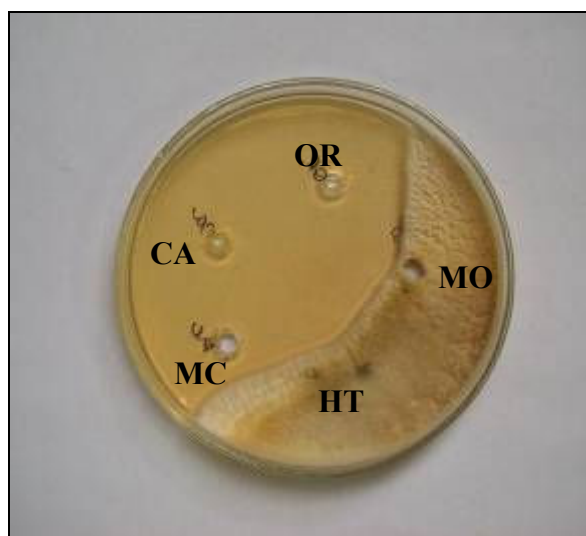
Não houve inibição do crescimento fúngico (nenhum halo de inibição de crescimento foi observado) nas placas controle (Figura 15), onde foram pipetados os solventes de cada extrato.



**Figura 15:** (a) Controle de *Aspergillus ochraceus* para o teste de difusão em agar no quinto dia de incubação; (b) Controle de *Aspergillus carbonarius* para o teste de difusão em agar no quinto dia de incubação. He = hexano; Ag = Água destilada estéril; Et= Etanol.

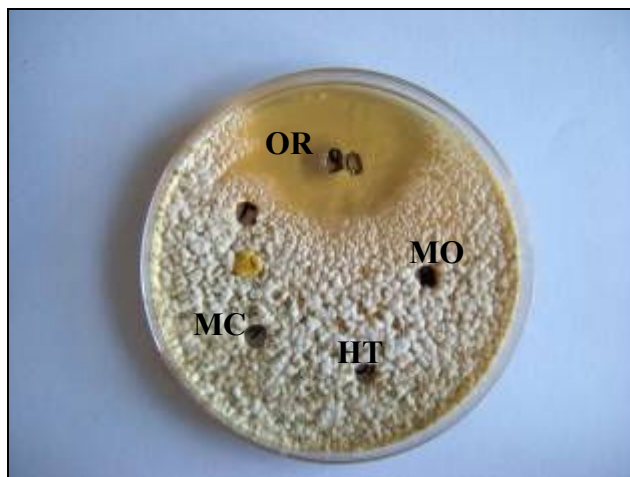
#### 4.3.1 Teste de difusão em agar sobre *Aspergillus ochraceus*

Em um primeiro ensaio, o óleo essencial de canela exibiu uma ótima atividade antifúngica e um halo de 60 mm, que se sobrepôs aos possíveis halos de inibição de orégano e manjeriço (Figura 16).



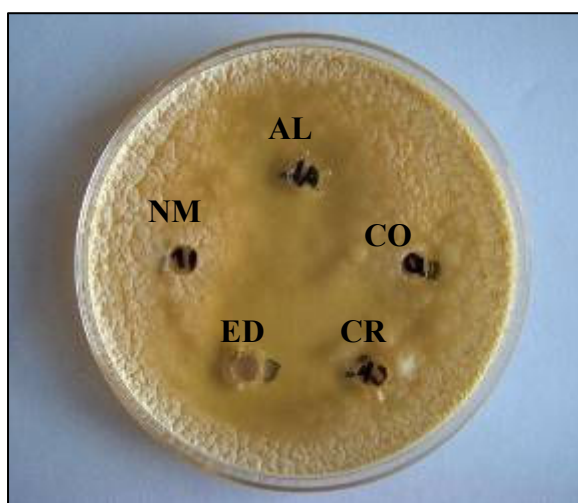
**Figura 16:** *Aspergillus ochraceus* no quinto dia de incubação contendo nos poços óleo essencial de orégano (OR), manjerona (MO), hortelã (HT), manjeriço (MC) e canela (CA).

O ensaio foi então repetido sem pipetar no quinto poço o óleo essencial de canela, (Figura 17), sendo possível então a visualização do efeito antifúngico do OE de orégano.



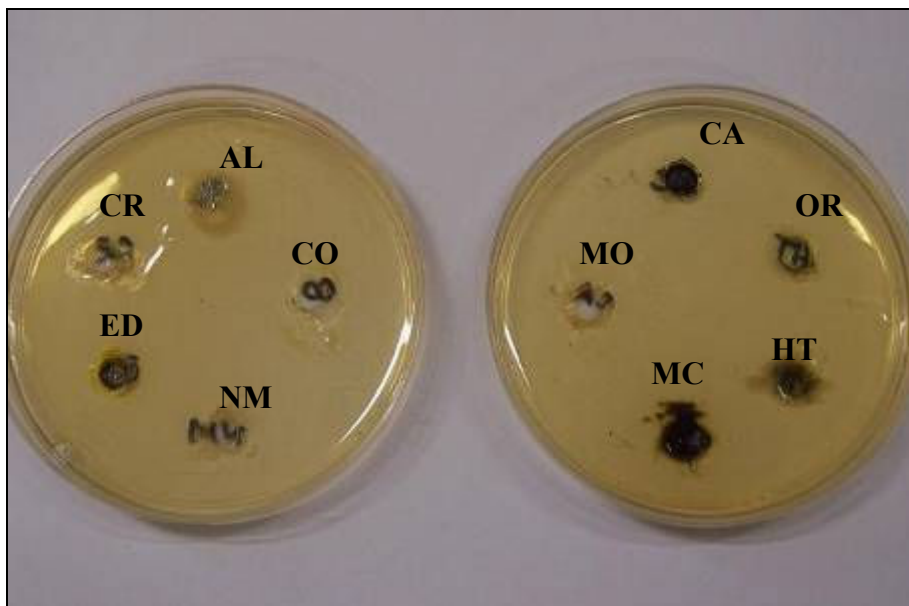
**Figura 17:** *Aspergillus. ochraceus* no quinto dia de incubação contendo nos poços óleo essencial de orégano (OR), manjerona (MO), hortelã (HT) e manjeriço (MC).

Na segunda placa os OE de alecrim, cominho, cravo, erva doce e noz moscada foram pipetados. Desta, apenas os OE de alecrim e de erva doce exibiram atividade antifúngica (Figura 18).



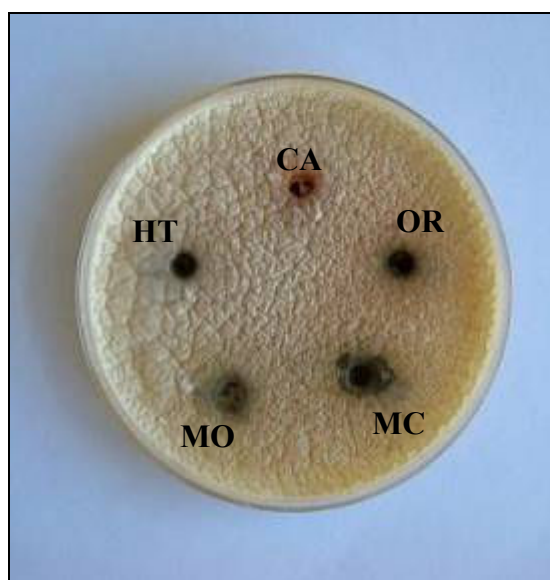
**Figura 18:** *Aspergillus ochraceus* no quinto dia de incubação contendo nos poços óleo essencial de alecrim (AL), erva doce (ED), noz moscada (NM), cominho (CO) e cravo (CR).

Nas placas contendo os OE hexânicos não houve qualquer crescimento fúngico (Figura 19).



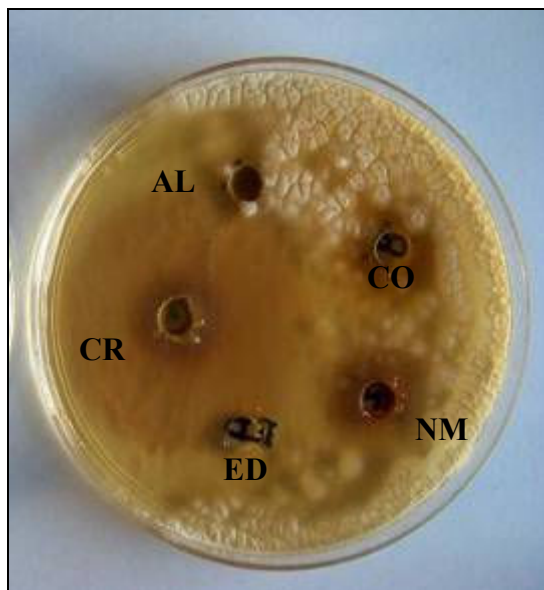
**Figura 19:** *Aspergillus ochraceus* no quinto dia de incubação contendo nos poços óleo essencial hexânico de alecrim (AL), cominho (CO), noz moscada (NM), erva doce (ED), cravo (CR), orégano (OR), hortelã (HT), manjeriço (MC), manjerona (MO) e canela (CA).

Os extratos etanólicos de orégano, canela, manjeriço, manjerona e hortelã não exibiram nenhuma atividade antifúngica (Figura 20).



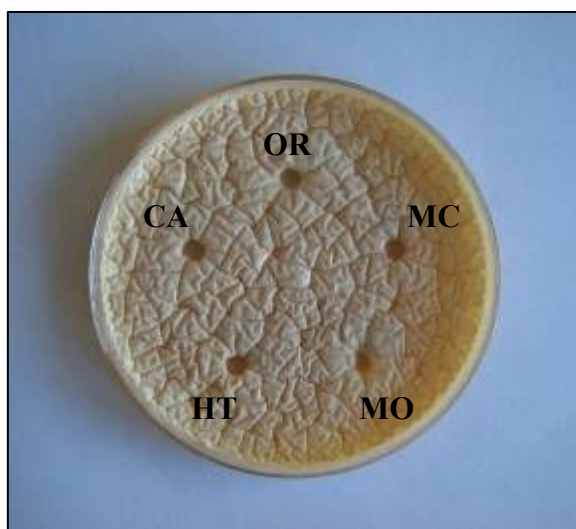
**Figura 20:** *Aspergillus ochraceus* no quinto dia de incubação contendo nos poços extrato etanólico de orégano (OR), manjeriço (MC), manjerona (MO), hortelã (HT) e canela (CA).

Os demais extratos etanólicos exibiram atividade antifúngica em diferentes intensidades (Figura 21).

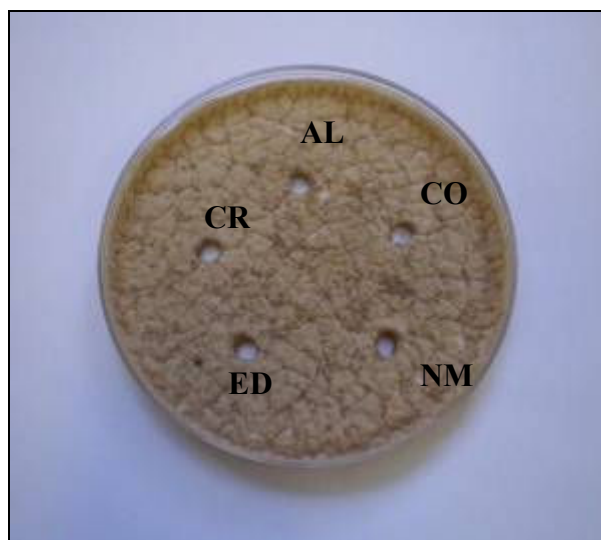


**Figura 21:** *Aspergillus ochraceus* no quinto dia de incubação contendo nos poços extrato etanólico de alecrim (AL), cominho (CO), noz moscada (NM), erva doce (ED) e cravo (CR).

Os extratos aquosos pós hidrodestilação não exibiram nenhuma atividade antifúngica (Figuras 22 e 23).



**Figura 22:** *Aspergillus ochraceus* no quinto dia de incubação contendo nos poços extrato aquoso de orégano (OR), manjeriçao (MC), manjerona (MO), hortelã (HT) e canela (CA).



**Figura 23:** *Aspergillus ochraceus* no quinto dia de incubação contendo nos poços extrato aquoso de alecrim (AL), cominho (CO), noz moscada (NM), erva doce (ED) e cravo (CR).

Os valores agrupados dos halos de inibição do crescimento fúngico provocados pela adição dos OE e EV sobre *Aspergillus ochraceus* estão dispostos na Tabela 3.

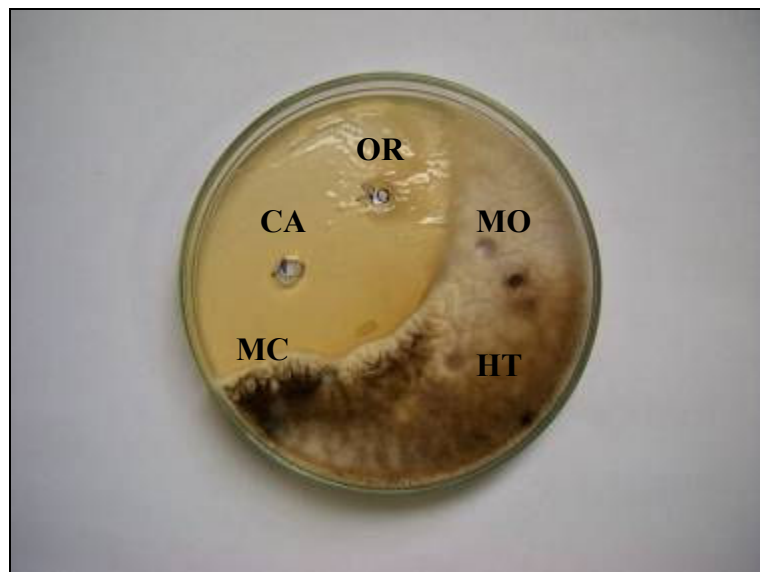
**Tabela 3:** Halo de inibição do crescimento de *Aspergillus ochraceus* provocado pelos óleos essenciais e extratos vegetais.

Plantas	OE	EA	EE	EH
Alecrim (AL)	16	NO	15	CP
Canela (CA)	60	NO	NO	CP
Cominho (CO)	NO	NO	12	CP
Cravo (CR)	NO	NO	55	CP
Erva-doce (ED)	26	NO	28	CP
Hortelã (HT)	NO	NO	NO	CP
Manjeriçã (MC)	NO	NO	NO	CP
Manjerona (MO)	NO	NO	NO	CP
Noz moscada (NM)	NO	NO	16	CP
Orégano (OR)	38	NO	NO	CP

CP = Inibição completa; NO = Não observado efeito inibitório; OE = Óleo essencial obtido por hidrodestilação; EA = Extrato vegetal aquoso; EE = Extrato vegetal etanólico; EH = Óleo essencial obtido por extração hexânica.

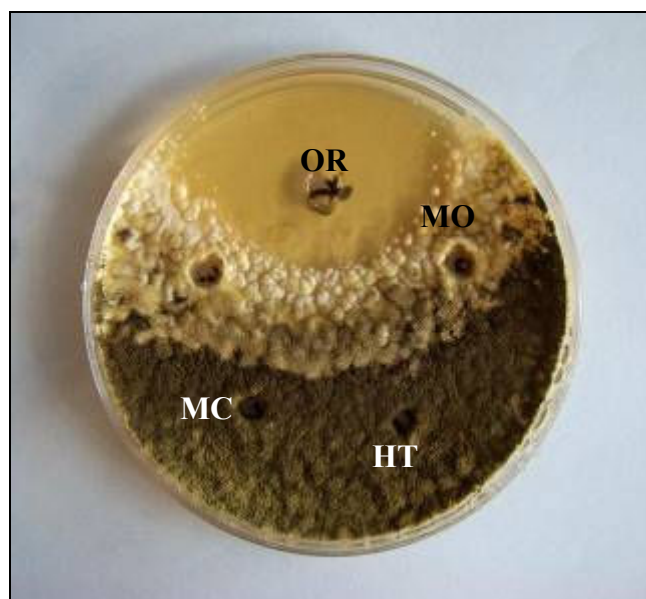
#### 4.3.2 Teste de difusão em agar sobre *Aspergillus carbonarius*

Em um primeiro ensaio, o óleo essencial de canela também exibiu uma ótima atividade antifúngica e um halo de 55 mm, que se sobrepôs ao possível halo de inibição do OE de orégano (Figura 24).



**Figura 24:** *Aspergillus carbonarius* no quinto dia de incubação contendo nos poços óleo essencial de orégano (OR), manjerona (MO), hortelã (HT), manjeriço (MC) e canela (CA).

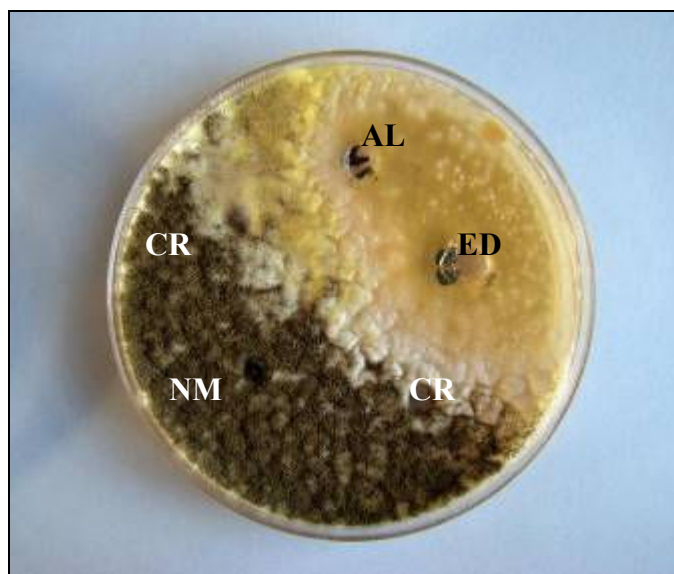
O ensaio foi repetido sem pipetar no quinto poço o óleo essencial de canela, e então o observado foi que o óleo essencial de orégano apresentava atividade antifúngica (Figura 25).



**Figura 25:** *Aspergillus carbonarius* no quinto dia de incubação contendo nos poços óleo essencial de orégano (OR), hortelã (HT), manjerona (MO) e manjeriço (MC).

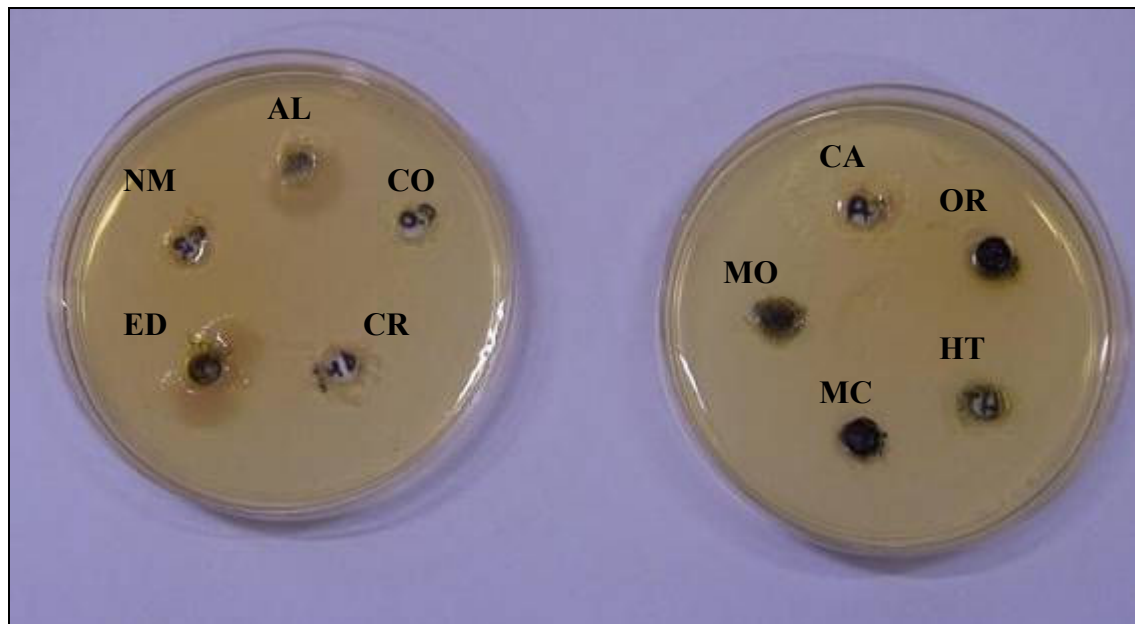
Para a segunda placa apenas os OE de alecrim e erva doce exibiram atividade antifúngica (Figura 26).





**Figura 26:** *Aspergillus carbonarius* no quinto dia de incubação contendo nos poços óleo essencial de alecrim (AL), erva doce (ED), noz moscada (NM), cominho (CO) e cravo (CR).

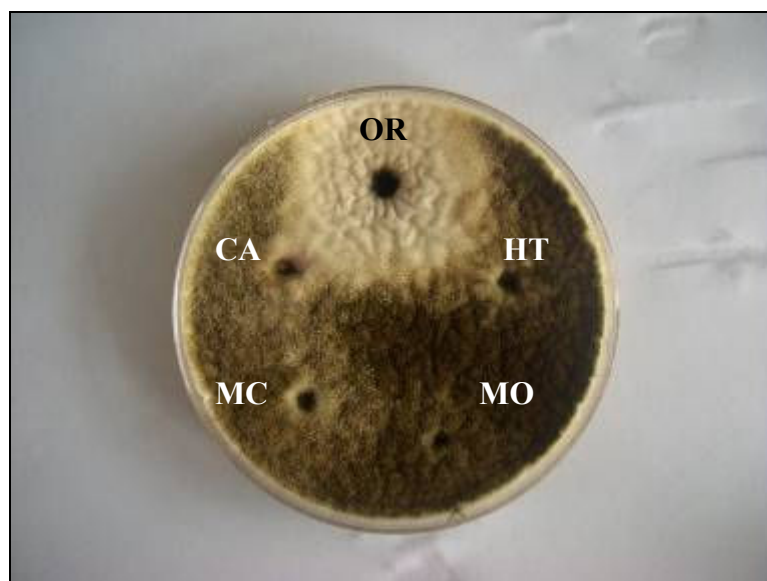
Nas placas contendo os óleos essenciais obtidos por extração hexânica houve uma inibição completa do crescimento fúngico (Figura 27).



**Figura 27:** *Aspergillus carbonarius* no quinto dia de incubação contendo nos poços óleo essencial hexânico de alecrim (AL), cominho (CO), cravo (CR), erva doce (ED), noz moscada (NM), orégano, hortelã (HT), manjerição (MC), e manjerona (MO) e canela (CA).

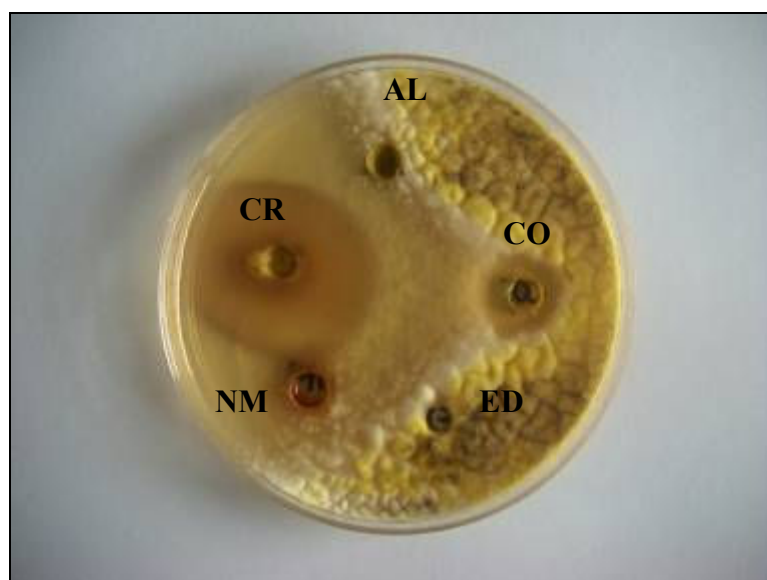
Os extratos etanólicos de orégano, hortelã, manjerona, manjerição e canela não inibiram o crescimento fúngico, porém merece atenção a inibição da conidiogênese provocada pela difusão do extrato de orégano (Figura 28).





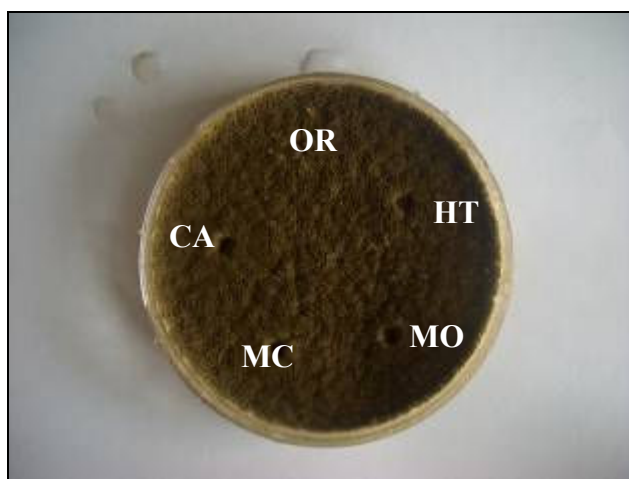
**Figura 28:** *Aspergillus carbonarius* no quinto dia de incubação contendo nos poços extrato etanólico de orégano (OR), hortelã (HT), manjerona (MO), manjeriço (MC) e canela (CA).

Os extratos etanólicos de alecrim e erva doce e noz moscada não exibiram atividade antifúngica. Os extratos etanólicos de cominho, noz moscada e cravo provocaram um halo de inibição do crescimento fúngico de 12 mm, 10 mm e 46 mm respectivamente (Figura 29).

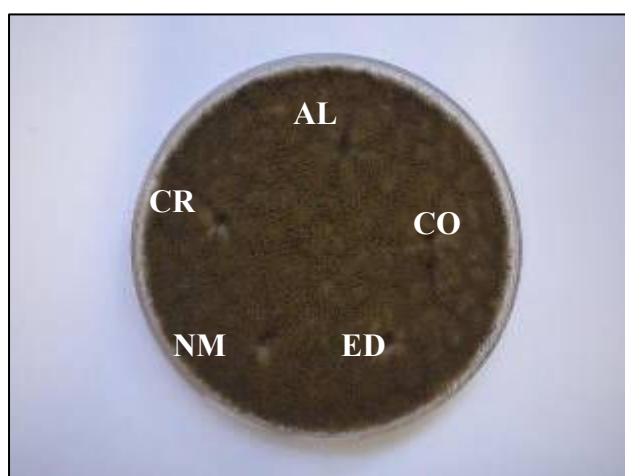


**Figura 29:** *Aspergillus carbonarius* no quinto dia de incubação contendo nos poços extrato etanólico de alecrim (AL), cominho (CO), erva doce (ED), noz moscada (NM) e cravo (CR).

Os extratos aquosos pós hidrodestilação não exibiram nenhuma atividade antifúngica (Figuras 30 e 31).



**Figura 30:** *Aspergillus carbonarius* no quinto dia de incubação contendo nos poços extrato aquoso de orégano (OR), hortelã (HT), manjerona (MO), manjeriço (MC) e canela (CA).



**Figura 31:** *Aspergillus carbonarius* no quinto dia de incubação contendo nos poços extrato aquoso de alecrim (AL), cominho (CO), erva doce (ED), noz moscada (NM) e cravo (CR).

Os valores agrupados dos halos de inibição do crescimento fúngico provocados pela adição dos OE e EV sobre *Aspergillus carbonarius* estão dispostos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Halo de inibição do crescimento de *Aspergillus carbonarius* provocado pelos óleos essenciais e extratos vegetais.

Plantas	OE	EA	EE	EH
Alecrim (AL)	15	NO	NO	CP
Canela (CA)	55	NO	NO	CP
Cominho (CO)	NO	NO	12	CP
Cravo (CR)	NO	NO	46	CP
Erva-doce (ED)	26	NO	NO	CP
Hortelã (HT)	NO	NO	NO	CP
Manjeriço (MC)	NO	NO	NO	CP
Manjerona (MO)	NO	NO	NO	CP
Noz moscada (NM)	NO	NO	10	CP
Orégano (OR)	42	NO	NO	CP

CP = Inibição completa; NO = Não observado efeito inibitório; OE = Óleo essencial obtido por hidrodestilação; EA = Extrato vegetal aquoso; EE = Extrato vegetal etanólico; EH = Óleo essencial obtido por extração hexânica

Os OE obtidos por hidrodestilação de alecrim e orégano foram os mais efetivos neste teste antifúngico de triagem. O óleo essencial de canela mostrou excelentes resultados, porém a produção de óleo por hidrodestilação foi insatisfatória. Estes resultados concordam com os encontrados por Soliman; Badeaa (2002), Souza, S. et al. (2004) e Viegas et al. (2005).

Soliman e Badeaa (2002) estudaram o efeito inibitório de óleos essenciais de 12 plantas medicinais sobre o crescimento de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *Fusarium moniliforme*. Eles concluíram que o óleo essencial de canela na concentração de  $\geq 1000$  mg/kg provocava completa inibição de *A. parasiticus*, *A. flavus* e *A. ochraceus*. Souza, S. et al. (2004) avaliaram o efeito inibitório dos óleos essenciais de alho, canela, cravo e tomilho sobre o crescimento de fungos associados a fabricação de produtos de panificação (*Rhizopus* sp., *Penicillium* spp., *Eurotium repens* e *A. niger*). O óleo essencial de canela na concentração de 500 mg/kg inibiu o crescimento de todos os fungos. Os óleos de alho e tomilho só tiveram efeito em altas concentrações, e o de cravo inibiu o crescimento de *A. niger*, *Rhizopus* sp. e *E. repens* com concentrações acima de 600 mg/kg, e acima de 800 mg/kg para *Penicillium*. Viegas et al. (2005) avaliaram o efeito inibitório de dez óleos essenciais sobre o crescimento de fungos do gênero *Aspergillus* seção Flavi; e os melhores resultados foram atribuídos ao óleo essencial de canela. No presente estudo, os resultados insatisfatórios de muitos OE/EV podem ser atribuídos a uma baixa atividade antifúngica ou a ausência de atividade antifúngica, sendo necessários mais estudos a respeito.

#### **4.4 Avaliação dos óleos essenciais e extratos vegetais sobre a velocidade de crescimento e a fase lag de *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius* produtores de ocratoxina A**

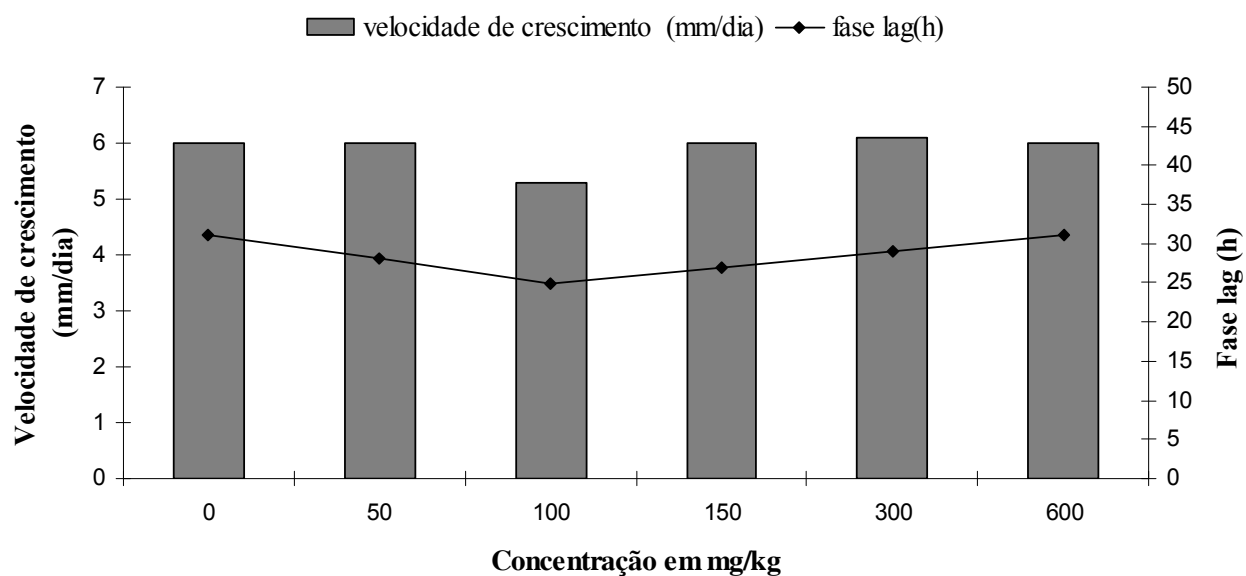
Os OE de orégano (obtidos por hidrodestilação e extração hexânica) foram escolhidos para obtenção dos parâmetros de crescimento sob as diferentes concentrações propostas. Também foram eleitos o extrato etanólico de cravo e o óleo essencial de alecrim obtido por hidrodestilação. Comparando os óleos essenciais escolhidos, o OE de orégano mostrou os melhores resultados, e comparando os quatro tratamentos, o extrato etanólico de cravo foi o mais efetivo.

**Tabela 5:** Velocidade de crescimento e fase lag das cepas *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius* quando semeadas em meio YES com diferentes concentrações de óleo essencial de alecrim.

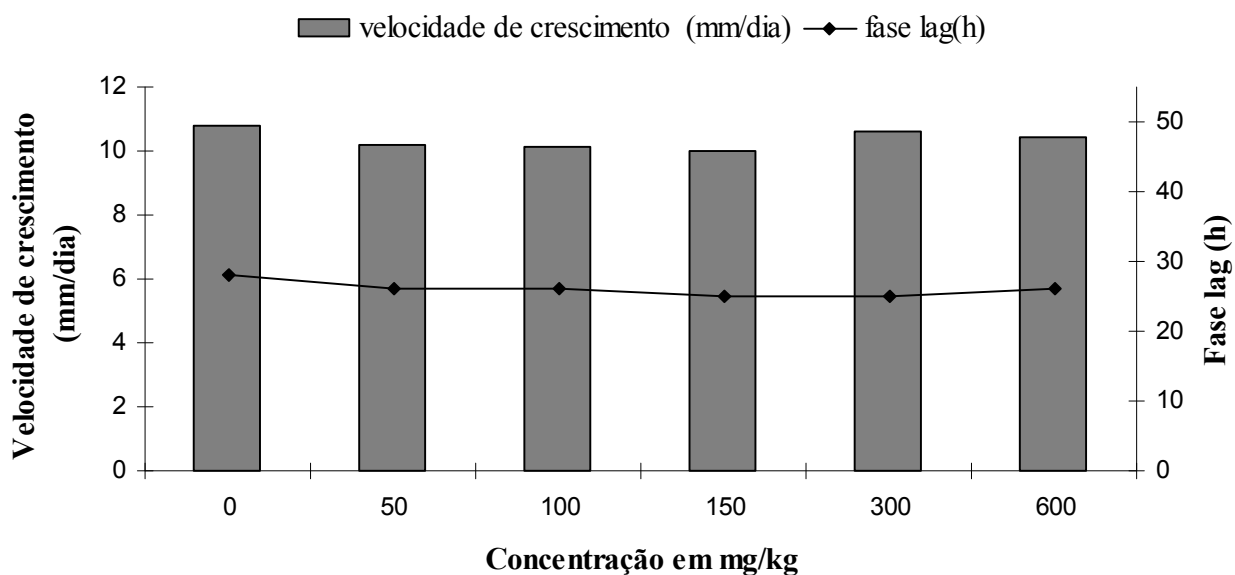
OE de alecrim			
Cepas	mg/kg	Velocidade de Crescimento (mm/dia)	Fase lag (h)
<i>A. ochraceus</i>	0	6,0	31
	50	6,0	28 ***
	100	5,3 ***	25 ***
	150	6,0	27 ***
	300	6,1	29 ***
	600	6,0	31
	<i>A. carbonarius</i>	0	10,8
50		10,2 ***	26 ***
100		10,1 ***	26 ***
150		10,0 ***	25 ***
300		10,6 ***	25 ***
600		10,4 ***	26 ***

Valores médios das triplicatas. Diferenças estatísticas significativas segundo teste de Dunnett estão representadas por \*\*\* ( $P \leq 0,05$ ).

Para *A. ochraceus*, o OE de alecrim resultou em velocidade de crescimento micelial variando de 5,3 a 6,1 mm/dia, e valores de fase lag variando de 25 a 31 h (Figura 32). Não há diferenças estatísticas significantes entre os valores de velocidade de crescimento, exceto para a concentração de 100 mg/kg. Para os valores de fase lag somente a concentração de 600 mg/kg foi estatisticamente similar ao controle. Para *A. carbonarius*, os valores de velocidade de crescimento variaram de 10,0 a 10,8 mm/dia, e os valores de fase lag de 25 a 28 h (Figura 33). Todos os tratamentos foram estatisticamente diferentes ao controle. O óleo essencial de alecrim mostrou-se efetivo em uma concentração pura, quando estudado em baixas concentrações não se observa inibição do crescimento significativa, concordando com o estudo de Pereira et al. (1996), em que houve inibição do crescimento com o óleo essencial de alecrim sobre todos os fungos estudados somente a partir da concentração de 1500 mg/kg, uma concentração muito mais elevada do que a maior concentração estabelecida por este estudo.



**Figura 32:** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de alecrim sobre a velocidade de crescimento (mm/dia) e a fase lag (h) de *Aspergillus ochraceus*.



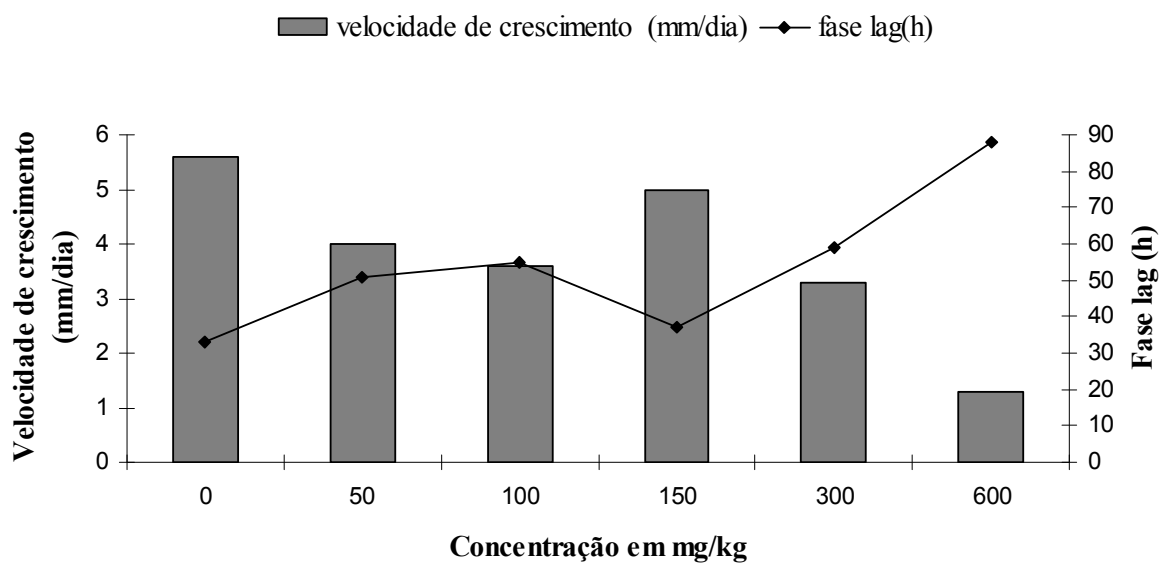
**Figura 33:** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de alecrim sobre a velocidade de crescimento (mm/dia) e a fase lag (h) de *Aspergillus carbonarius*.

**Tabela 6:** Velocidade de crescimento e fase lag das cepas *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius* quando semeadas em meio YES com diferentes concentrações de óleo essencial de orégano.

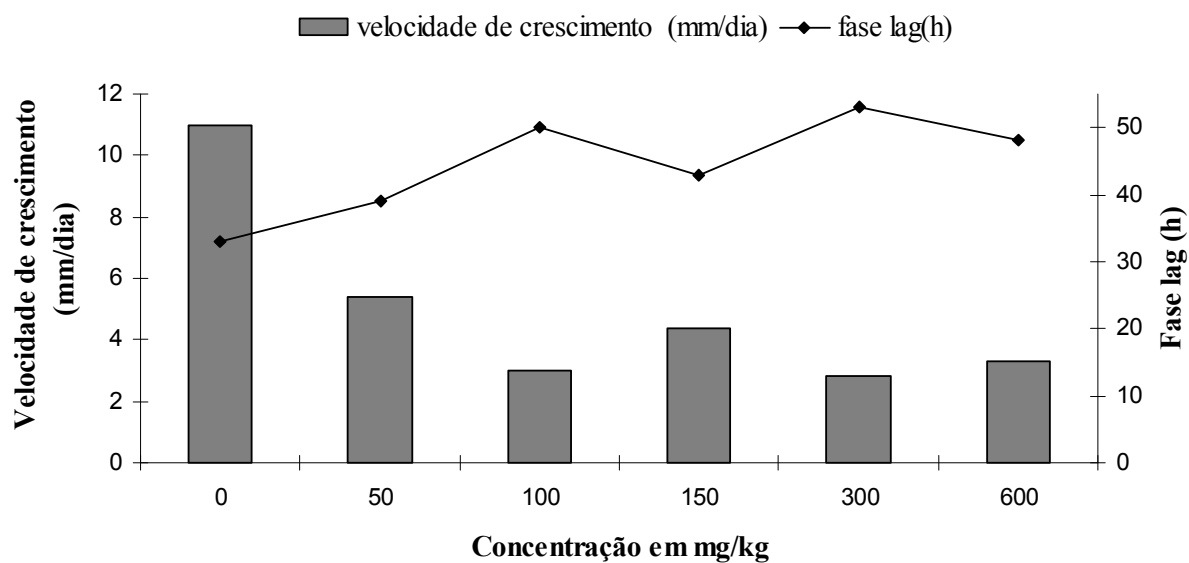
OE de orégano			
Cepas	mg/kg	Velocidade de Crescimento (mm/dia)	Fase lag (h)
<i>A. ochraceus</i>	0	5,6	33
	50	4,0 ***	41 ***
	100	3,6 ***	55 ***
	150	5,0 ***	37
	300	3,3 ***	59 ***
	600	1,3 ***	88 ***
	<i>A. carbonarius</i>	0	11,0
50		5,4 ***	39 ***
100		3,0 ***	50 ***
150		4,4 ***	43 ***
300		2,8 ***	53 ***
600		3,3 ***	48 ***

Valores médios das triplicatas. Diferenças estatísticas significativas segundo teste de Dunnett estão representadas por \*\*\* ( $P \leq 0,05$ ).

Com relação ao OE de orégano, os valores de velocidade de crescimento para *A. ochraceus* variaram de 1,3 a 5,6 mm/dia, e os valores de fase lag de 33 a 88h (Figura 34). Para *A. carbonarius*, a velocidade de crescimento variou de 2,8 a 11,0 mm/dia, e os valores de fase lag de 33 a 53h (Figura 35). Todos os tratamentos foram estatisticamente diferentes do controle para ambas as cepas, exceto no caso de *A. ochraceus* para a fase lag na concentração de 150 mg/kg. Estes resultados concordam com Paster et al. (1995), que encontraram uma excelente atividade inibitória do óleo essencial (OE) de orégano sobre *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. flavus*. Paster et al. (1995) em seus estudos relataram o óleo essencial de orégano inibindo completamente o crescimento desses fungos sob a concentração de 400 mg/kg, diferentemente deste trabalho, onde apenas o óleo essencial na concentração bruta inibiu por completo o crescimento micelial fúngico. Porém, a concentração máxima estudada foi a de 600 mg/kg. Basilico; Basilico (1999), entretanto estudaram o efeito inibitório de cinco óleos essenciais sobre o crescimento de *A. ochraceus* NRRL 3174 e a produção de OTA por esta cepa, e o óleo essencial de orégano inibiu completamente o crescimento deste fungo a uma concentração de 1000 mg/kg. Pereira et al. (1996) encontraram o mesmo resultado: o óleo essencial de orégano inibindo completamente o crescimento de vários fungos a 1000 mg/kg, incluindo *A. ochraceus*.



**Figura 34:** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de orégano sobre a velocidade de crescimento (mm/dia) e a fase lag (h) de *Aspergillus ochraceus*.



**Figura 35:** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de orégano sobre a velocidade de crescimento (mm/dia) e a fase lag (h) de *Aspergillus carbonarius*.

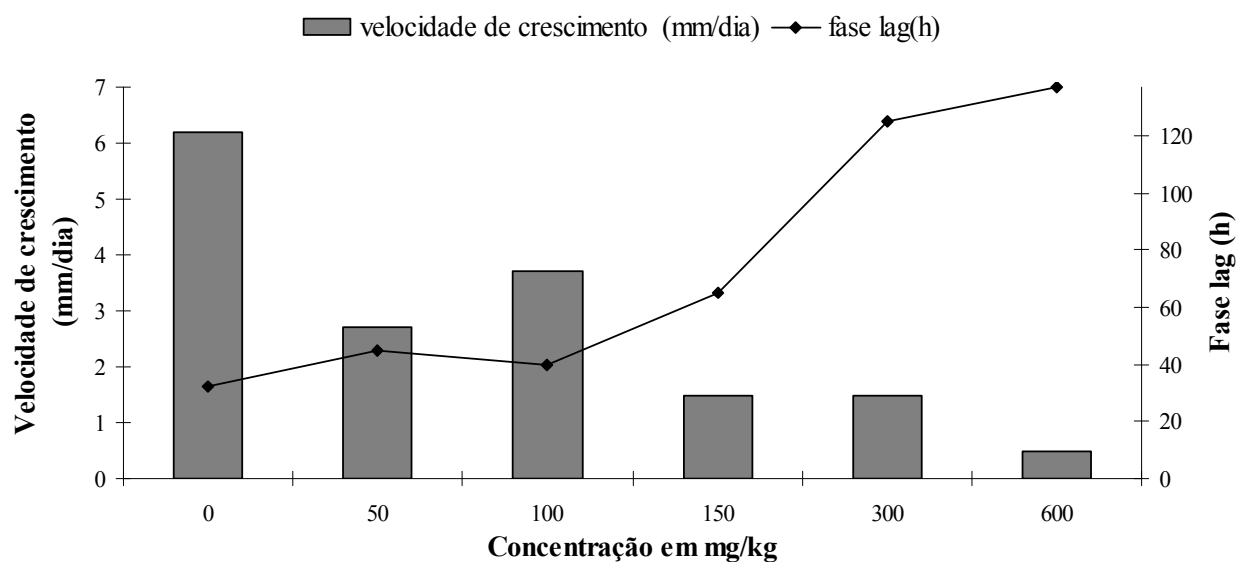
**Tabela 7:** Velocidade de crescimento e fase lag das cepas *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius* quando semeadas em meio YES com diferentes concentrações de extrato etanólico de cravo.

EE de cravo			
Cepas	mg/kg	Velocidade de Crescimento (mm/dia)	Fase lag (h)
<i>A. ochraceus</i>	0	6,2	32
	50	2,7 ***	45
	100	3,7 ***	40
	150	1,5 ***	65
	300	1,5 ***	125 ***
	600	0,5 ***	137 ***
<i>A. carbonarius</i>	0	9,8	19
	50	5,6	19
	100	4,0 ***	34
	150	5,1	21
	300	0,6 ***	114 ***
	600	0,5 ***	130 ***

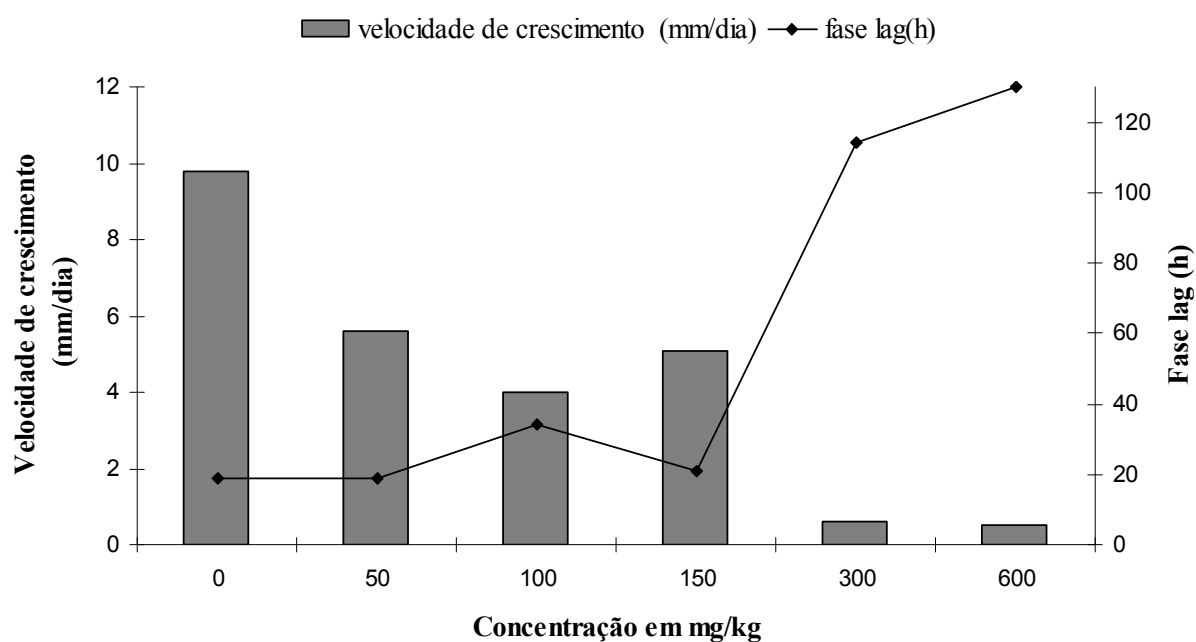
Valores médios das triplicatas. Diferenças estatísticas significativas segundo teste de Dunnett estão representadas por \*\*\* ( $P \leq 0,05$ ).

Para *A. ochraceus* o uso do extrato etanólico de cravo resultou em valores de velocidade de crescimento variando de 0,5 a 6,2 mm/dia, e os valores de fase lag variando de 33 a 137 h (Figura 36). Quanto a velocidade de crescimento, todas as concentrações foram estatisticamente diferentes do controle, e para os valores de fase lag houve diferença estatística significativa somente para as concentrações de 300 e 600 mg/kg. Para *A. carbonarius* os valores de velocidade de crescimento variaram de 0,5 a 9,8 mm/dia e os valores de fase lag variaram de 19 a 130 h (Figura 37). No caso de velocidade de crescimento, as concentrações 100, 300 e 600 mg/kg foram estatisticamente diferentes do controle, e no caso da fase lag somente as duas mais altas concentrações foram efetivas. Nenhum estudo na literatura consultada reporta a efetividade do extrato etanólico de cravo sobre fungos filamentosos de alimentos, porém Souza, S. et al. (2004) encontraram o óleo essencial (OE) de cravo inibindo o crescimento de *A. niger*, *Rhizopus* sp., *Eurotium repens* a uma concentração de 600 mg/kg e *Penicillium* spp. a 800 mg/kg.





**Figura 36:** Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico de cravo sobre a velocidade de crescimento (mm/dia) e a fase lag (h) de *Aspergillus ochraceus*.



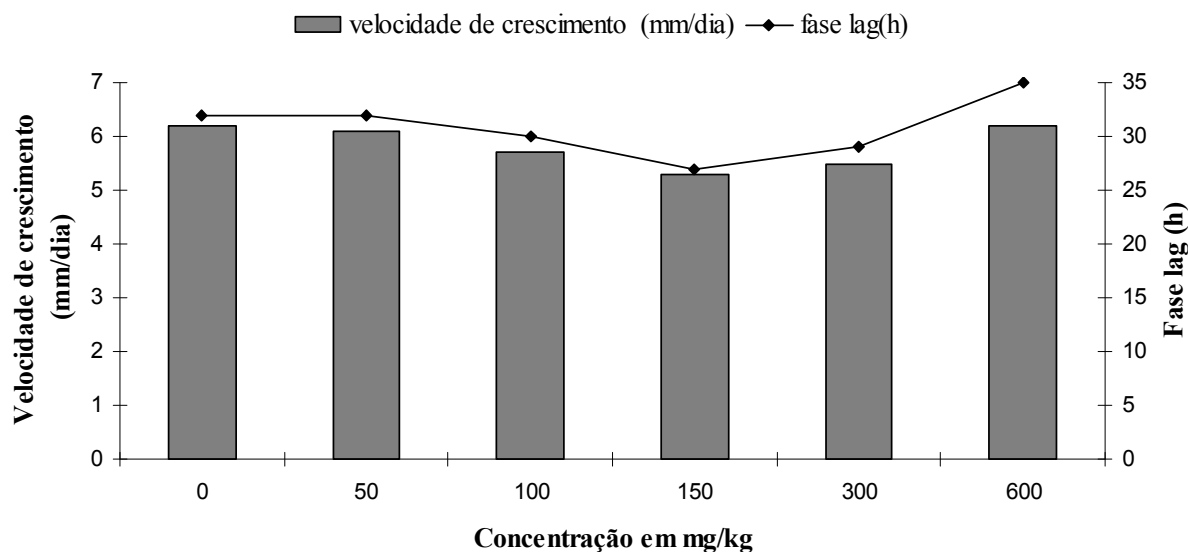
**Figura 37:** Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico de cravo sobre a velocidade de crescimento (mm/dia) e a fase lag (h) de *Aspergillus carbonarius*.

**Tabela 8:** Velocidade de crescimento e fase lag das cepas *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius* quando semeadas em meio YES com diferentes concentrações de óleo essencial hexânico de orégano.

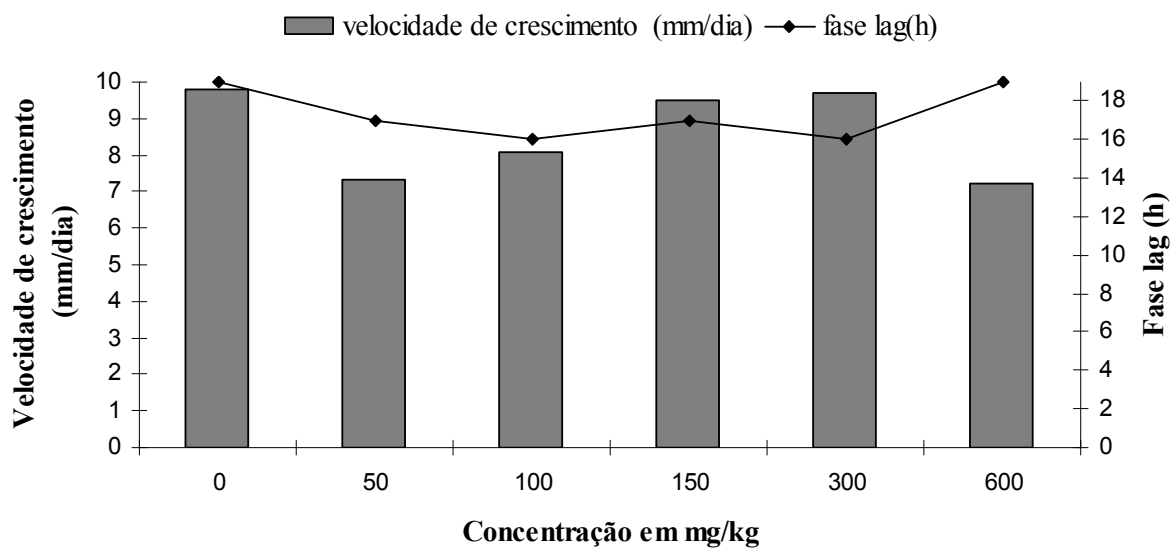
<b>OE hexânico de orégano</b>			
Cepas	mg/kg	Velocidade de Crescimento (mm/dia)	Fase lag (h)
<i>A. ochraceus</i>	0	6,2	32
	50	6,1	32
	100	5,7	30
	150	5,3 ***	27 ***
	300	5,5 ***	29
	600	6,2	35
	<i>A. carbonarius</i>	0	9,8
50		7,3 ***	17
100		8,1	16
150		9,5	17
300		9,7	16
600		7,2 ***	19

Valores médios das triplicatas. Diferenças estatísticas significativas segundo teste de Dunnett estão representadas por \*\*\* ( $P \leq 0,05$ ).

O uso do OE hexânico de orégano resultou em uma velocidade de crescimento variando de 5,3 a 6,2 mm/dia, e valores de fase lag variando de 27 a 35 h (Figura 38). Para os valores de velocidade de crescimento, somente as concentrações 150 e 300 mg/kg foram estatisticamente diferentes do controle, e no caso de fase lag, somente a concentração de 150 mg/kg. Para *A. carbonarius*, os valores de velocidade de crescimento ficaram entre 7,2 e 9,8 mm/dia, e os valores de fase lag entre 16 e 19 h (Figure 39). Para a velocidade de crescimento as concentrações 50 e 600 mg/kg foram diferentes estatisticamente com relação ao controle, enquanto não houve nenhuma diferença estatística significativa para os valores de fase lag. Os óleos essenciais hexânicos de todas as plantas na concentração pura inibiram por completo o crescimento de ambas cepas estudadas, e OE hexânico de orégano foi eleito pela correlação com os ótimos resultados do óleo essencial da mesma planta obtido pela hidrodestilação. Porém os resultados médios de velocidade de crescimento e de fase lag sob as diferentes concentrações não foram bons, sendo observado apenas a mais alta concentração com diferenças significativas em relação à placa controle.



**Figura 38:** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial hexânico de orégano sobre a velocidade de crescimento (mm/dia) e a fase lag (h) de *Aspergillus ochraceus*.



**Figura 39:** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial hexânico de orégano sobre a velocidade de crescimento (mm/dia) e a fase lag (h) de *Aspergillus carbonarius*.

## 5 CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de orégano e de alecrim obtidos por hidrodestilação, o óleo essencial de orégano obtido por extração hexânica, e o extrato etanólico de cravo foram os mais efetivos no teste de triagem por difusão em agar, e eleitos para avaliação sobre os parâmetros de crescimento de *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius* (velocidade de crescimento e fase lag) sob diferentes concentrações.

O orégano e o alecrim foram as plantas das quais se obteve melhor rendimento na produção de óleo essencial por hidrodestilação;

Os extratos hexânicos de todas as plantas testadas (alecrim, canela, cravo, cominho, erva-doce, hortelã, orégano, manjerição, manjerona e noz moscada) inibiram completamente o crescimento fúngico pelo teste de difusão em agar;

Os extratos aquosos de todas as plantas testadas não foram capazes de inibir o crescimento fúngico pelo teste de difusão em agar;

O OE de orégano mostrou os melhores resultados quando comparado aos demais óleos essenciais escolhidos, e o extrato etanólico de cravo foi o mais efetivo quando comparado aos quatro tratamentos.

Estes aditivos naturais podem ser trabalhados como fontes de compostos naturais para a prevenção e controle do crescimento fúngico em alimentos como alternativa ao uso de produtos sintéticos;

O resultado inferior dos óleos essenciais de outras plantas aromáticas pode ser atribuído a uma possível inadequação das doses empregadas ou a ausência de efeito antifúngico, sendo necessários estudos futuros para melhor elucidação;

Estudos futuros também devem ser conduzidos a fim de se determinar o efeito destes aditivos naturais sobre a habilidade na produção de ocratoxina A pelas cepas fúngicas toxígenas, e se avaliar sua viabilidade de uso na preservação de alimentos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; CABAÑES, F. J. Current importance of ochratoxin A – producing *Aspergillus* spp. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 6, p. 903-906, 2001.

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520 - Informação e documentação - Citações em documentos - Apresentação**. Rio de Janeiro: ABNT. 2002.

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023 - Informação e documentação - Referências - Elaboração**. Rio de Janeiro: ABNT. 2002.

AL-BAYATI, F. A. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, p. 403-406, 2008.

AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 5-8, 2005.

ANSARI, M. A.; VASUDEVAN, P.; TANDON, M.; RAZDAN, R. K. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. **Bioresource Technology**, v. 71, n. 3, p. 267-271, 2000.

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.

ASTORECA, A.; BARBERIS, C.; MAGNOLI, C.; COMBINA, M.; DALCERO, A. Ecophysiological factor effect on growth rate, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate strains on irradiated peanut seeds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 2, p. 131-135, 2009.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.

BACKLEH, M.; LEUPOLD, G.; PARLAR, H. Rapid quantitative enrichment of carnosic acid from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by isoelectric focused adsorptive bubble chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1297-1301, 2003.

BALANDRÍN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W. H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science**, v. 228, n. 4704, p. 1154-1160, 1985.

- BANDONIENE, D.; MURKOVIC, M.; PFANNHAUSER, W.; VENSKUTONIS, P. R.; GRUZDIENE, D. Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods. **European Food Research and Technologies**, v. 214, n. 1-3, p. 143–147, 2002.
- BASILICO, M. Z.; BASILICO, J. C. Inhibitory effect of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 238–241, 1999.
- 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.
- BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, n. 3-4, p. 80-83, 2005.
- BLUMA, R. V.; ETCHEVERRY, M. G. Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section Flavi growth parameters and aflatoxin accumulation. **Food Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 324–334, 2008.
- BOYRAZ, N.; ÖZCAN, M. Antifungal effect of some spice hydrosols. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7-8, p. 661-665, 2005.
- BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 2-3, p. 139-144, 2001.
- BRIDGE, P. D.; HAWKSWORTH, D. L.; KOZAKIEWICZ, Z.; ONIONS, A. H. S.; PATERSON, R. R. M.; SACKIN, M. J.; SNEATH, P. H. A. A reappraisal of the terverticillate *Penicillia* using biochemical, physiological and morphological features I. Numerical taxonomy. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 2941-2966, 1989.
- BRUNS, T. D.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 22, p. 525-564, 1991.
- BRUNS, T. D.; VILGALYS, R.; BARNS, S. M.; GONZALEZ, D.; HIBBETT, D. S.; LANE, D. J.; SIMON, L.; STICKEL, S.; SZARO, T. M.; WEISBURG, W. G.; SOGIN, M. L. Evolutionary relationships within the fungi: analysis of nuclear small subunit rRNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 1, p. 231- 241, 1993.
- BUSATTA, C.; VIDAL, A. S.; POPIOLSKI, A. J.; MOSSI, C.; DARIVA, M. R. A. RODRIGUES, F. C.; CORAZZA, M. L.; CORAZZA, J.; OLIVEIRA, V.; CASIAN, R. L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 207-211, 2008.

CALLISTE, C. A.; KOZLOWSKI, D.; DUROUX, J. L.; CHAMPAVIER, Y.; CHULIA, A. J.; TROUILLAS, P. A new antioxidant from wild nutmeg. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 489 – 496, 2010.

CASTRO, L. O.; RAMOS, R. L. D. **Descrição botânica, cultivo e uso de *Origanum majorana* L., manjerona e de *Origanum vulgare* L., orégano (Lamiaceae)**. Porto Alegre: FEPAGRO, 2003.

CHELKOWSKI, J.; SAMSON, R. A.; WIEWIOROWSKA, M.; GOLINSKI, P. Ochratoxin A formation by isolated strains of the conidial stage of *Aspergillus glaucus* Link ex Grey from cereal grains. **Die Nahrung**, v. 4, p. 267-269, 1987.

CIEGLER, A. Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 631-636, 1971.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIO, G.; REYNOSO, M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B<sub>1</sub>, 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.

EL-BANNA, A. A.; PITT, J. I.; LEISTNER, L. Mycotoxin production by *Penicillium* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 10, n.1, p. 42-46, 1987.

FECKA, I.; TUREK, S. Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1039-1053, 2008.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Mycotoxins produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. In: CHELKOWSKI, J. **Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 441-476.

GENG, Y.; LIU, J.; LV, R.; YUAN, J.; LIN, Y.; WANG, X. An efficient method for extraction, separation and purification of eugenol from *Eugenia caryophyllata* by supercritical fluid extraction and high-speed counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 57, n. 2, p. 237–241, 2007.

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

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 142-150, 2009.

HESELTIME, C. W.; VANDEGRAFT, E. E.; FENNELL, D. I.; SMITH, M. I.; SHOTWELL, O. L. Aspergilli as ochratoxin producers. **Mycología**, v. 64, n. 3, p. 539-550, 1972.

HRAS, A. R.; HADOLIN, M.; KNEZ, Z.; BAUMAN, D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with  $\alpha$ - tocoferol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 71, n. 2, p. 229-233, 2000.

JANAHMADI, M.; FARAJNIA, S.; VATANPARAST, J.; ABBASIPOUR, H.; KAMALINEJAD, M. The fruit essential oil of *Pimpinella anisum* L. (Umbelliferae) induces neuronal hyperexcitability in snail partly through attenuation of after-hyperpolarization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 3, p. 360-365, 2008.

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

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.

KWON, H.; JEON, W. K.; HWANG, J.; LEE, C.; JAE-SEON SO, J.; PARK, J.; BYOUNG SEOB KO, B. S.; SIN-HYEOG IM, S. Cinnamon extract suppresses tumor progression by modulating angiogenesis and the effector function of CD8+ T cells. **Cancer Letters**, v. 278, n. 2, p. 174 – 182, 2009.

LEGARDA, T. M.; BURDASPAL, P. A. Ocratoxina A en cervezas elaboradas en España y en otros países de la Unión Europea. **Alimentaria: Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos**, n. 291, p. 115-122, 1998.

LI, X. -M.; TIAN, S. -L.; PANG, Z. -C.; SHI, J. -Y.; FENG, Z. -S.; ZHANG, Y. -M. Extraction of *Cuminum cyminum* essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and steam distillation. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 1114-1119, 2009.

LILLEHOJ, E. B. Aflatoxins: an ecologically elicited genetic activation signal. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. **Mycotoxins and Animal Foods**. Boca Ratón: CRC Press, 1991. p. 1-35.

LOPES, P. R. S. **Efeito das aflatoxinas e dos adsorventes sobre o desempenho zootécnico de alevinos e juvenis de jundiá: *Rhamdia quelen***. Pelotas, Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Pelotas, 2008. Originalmente apresentada como tese de Doutorado (Zootecnia). 99p.

LÓPEZ, M. D.; JORDÁN, M. J.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Toxic compounds in essential oils of coriander, caraway and basil active against stored rice pests. **Journal of Stored Products Research**, v. 44, n. 3, p. 273– 278, 2008.



- LOPEZ, P.; SANCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERIN, C. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 17, p. 6939–6946, 2005.
- LOULI, V.; RAGOSSIS, N.; MAGOULAS, K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 2, p. 201–208, 2004.
- LUBERTOZZI, D.; KEASLING, J. D. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 53-75, 2009.
- 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.; CHIACCHIERA S.; 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.; SAENZ, M. A.; CHIACCHIERA, S.; DALCERO, A. 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.; HALAK, C.; DALCERO, A. The mycoflora and toxicity of feedstuffs from a production plant in Córdoba, Argentina. **Mycotoxin Research**, v. 18, n. 1, p. 7-22, 2002.
- MAGNOLI, C.; HALAK, C.; CHIACCHIERA S.; DALCERO, A. Occurrence of ochratoxin A- producing fungi in commercial corn kernels in Argentina. **Mycopathologia**, v. 161, n. 1, p. 53-58, 2006.
- MARCHESE, J. A.; BROETTO, F.; MING, L. C.; GOTO, R.; STEFANINI, M. B.; GALINA, A.; TEDESCO, A. C.; CONTE, C.; MINIUK, C. M.; SCHURT, D. A.; SANGALETTI, E.; SILVA, G. O.; GOMES, G.; BERTAGNOLLI, J. A.; FRANCHESCHI, L.; COSSA, M. L.; MORAES, M. R. D.; LIMA, P. M.; LIRA, R.; COSTA, S. Perfil dos consumidores de plantas medicinais e condimentares do município de Pato Branco (PR). **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 332-335, 2004.
- 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.
- MIRAGLIA, M.; BRERA, C.; CORNELI, S.; CAVA, E.; MONTAMINO, G.; MIRAGLIA, E. Occurrence of ochratoxin A in maternal serum, placenta and folliculum. In: IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 9., 1995, Rome. **Proceedings of IX International IUPAC symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**. Colorado: Inc. Fort Collins, 1998. p. 165-179.
- MONACI, L.; PALMISANO, F.; MATRELLA, R.; TANTILLO, G. Determination of ochratoxin A at part-per-trillion level in Italian salami by immunoaffinity clean-up and high-

performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1090, n. 1-2, p. 184–187, 2005.

MOSS, M.O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, n. 1, p. 5-9, 1996.

MUELLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. **Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods**. Burlington, United States: Elsevier Academic Press, 2004. 777 p.

NASSU, R. T.; GONÇALVES, L. A. G.; PEREIRA DA SILVA, M. A. A.; BESERRA, F. J. Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant. **Meat Science**, v. 63, n. 1, p. 43-49, 2003.

NGUEFACK, J.; LETH, V.; AMVAM ZOLLO, P. H.; MARTHUR, S. B. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 329 – 334, 2004.

NOGUEIRA S.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Prevalência de ocratoxina A em alimentos e conseqüentes problemas de segurança alimentar. **Revista da Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição e Alimentação**, v. 12, n. 2, p. 69-75, 2006.

OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; BADIALE-FURLONG, E. Antioxidant activity of phenolic compounds from plant extracts. **Alimentos e Nutrição – Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 18, n. 2, p. 267-275, 2007.

PARANAGAMA, P. A.; ABEYSEKERA, K. H, T.; ABEYWICKRAMA, K.; NUGALIYADDE, L. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 86 – 90, 2003.

PASTER, N.; JUVEN, B. J.; SHAYYA, E.; MENASHEROV, M.; NITZAN, R.; WEISSLOWICZ, H.; RAVID, U. Inhibitory effect of oregano and thymus essential oils on mould and foodborne bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 33–37, 1990.

PEREIRA, M. C.; CHALFOUN, S. M.; PIMENTA, C. J.; ANGÉLICO, C. L.; MACIEL, W. P. Spices, fungi mycelial development and ochratoxin A production. **Scientific Research and Essay**, v. 1, n. 2, p. 38-42, 2006.

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

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim 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. 5, p. 203-205, 1994.

RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEYWICKRAMA, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M.

Perry against rot and anthracnose pathogens isolated from banana. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 208–211, 2002.

RICHARD, E.; HEUTTE, N.; BOUCHART, V.; GARON, D. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 148, n. 2 - 4, 309 - 320, 2009.

RÍOS, J. L; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1 - 2, p. 80 – 84, 2005.

ROSA, C. A. R.; MAGNOLI, C. E.; FRAGA, M. E.; DALCERO, A. M.; SANTANA, D. M. N. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 4, p. 358-364, 2004.

ROSA, C. A. R; RIBEIRO, J. M. M; FRAGA, M. E; GATTI, M; CAVAGLIERI, L. R; MAGNOLI, C. E; DALCERO, A. M; LOPES, C. W. G. Mycobiota of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 1-2, p. 89–96, 2006.

ROSA, C. A. R.; KELLER, K. M.; KELLER, L. A. M.; GONZÁLEZ PEREYRA, M. L.; PEREYRA, C. M.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L. R.; LOPES, C. W. G. Mycological survey and ochratoxin A natural contamination of swine feedstuffs in Rio de Janeiro State, Brazil. **Toxicon**, v. 53, n. 2, p. 283 – 288, 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.

RUIZ DEL CASTILHO, M. L.; BLANCH, G. P.; HERRAIZ M. Natural variability of the enantiomeric composition of bioactive chiral terpenes in *Mentha piperita*. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 87-93, 2004.

SAFOURA, D.; MORTEZA, S.; MOHSEN, B. Effect of subinhibitory concentrations of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seed essential oil and alcoholic extract on the morphology, capsule expression and urease activity of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents** v. 32, n. 5 , p. 432–436, 2008.

SALDANHA, L. A. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*)**. São Paulo: Editora Universidade de São Paulo, 2005.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 3. ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 2007. v. 1. 264 p.

SAMSON, R. A.; VAN REENEN-HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to Food and Airborne Fungi**. 6 ed., Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, 2000. 388 p.

SANGARE-TRIGORI, B.; MOUKHA, S.; KOUADIO, J. H.; DANO, D. S.; BETBEDER, A. –M.; ACHOUR, A.; CREPPY, E. E. Ochratoxin A in human blood in Abidjan, Côte d'Ivoire. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 894-900, 2006.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P.; MENNA BARRETO, R. F. S.; SOARES, M. J. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology Research**, v. 100, n. 4, p.783-790, 2007.

SASSAHARA, M.; YANAKA, E. K.; NETTO, D. P. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na Região Norte do Estado do Paraná. **Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 63-72, 2003.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em Alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998.

SHEKARFOROUSH, S. S.; NAZER, A. H. K.; FIROUZI, R.; ROSTAMI, M. Effects of storage temperatures and essential oils of oregano and nutmeg on the growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in barbecued chicken used in Iran. **Food Control**, v. 18, n. 11, p.1428–1433, 2007.

SINGH, G.; KAPOOR, I. P. S.; PANDEY, S. K.; SINGH, U. K.; SINGH, R. K. Studies of essential oils: Part 10. Antibacterial activity of volatile oils of some spices. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 7, p. 680–682, 2002.

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.

SORENSEN, W. G. Fungal Spores: Hazardous to Health? **Environmental Health Perspectives**, v. 107, s. 3, p. 469-472, 1999.

SOUZA, E. L. **Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.): uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos**. Recife, Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, 2008. Originalmente apresentada como tese de Doutorado (Ciência de Alimentos). 141p.

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 Agrotécnica de Lavras**, v. 28, n. 3, p. 685-690, 2004.

TÉREN, J.; VARGA, J.; HAMARI, Z.; RINYU, E.; KEVEI, F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. **Mycopathologia**, v. 134, n. 3, p. 171–176, 1996.

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.

UENO, Y.; MAKI, S.; LIN, J.; FURUYA, M.; SUGIURA, Y.; KAWAMURA, O. A 4-year study of plasma ochratoxin A selected population in Tokyo by immunoassay and

immunoaffinity column-linked HPLC. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 5, p. 445-449, 1998.

VELLUTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; TURON, C.; MARIN, S. Impact of essential oil on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity condition in maize grain. **Journal of Applied Microbiology** v. 96, n. 4 , p. 716–724, 2004.

VIDAL, F.; VIDAL, J. C.; GADELHA, A. P. R.; LOPES, C. S.; COELHO, M. G. P.; MONTEIRO-LEAL L. H. *Giardia lamblia*: The effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 25-31, 2007.

VIEGAS, E. C.; SOARES, A.; CARMO, M. G. F.; ROSSETTO, C. A.V. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 915-919, 2005.

WANG, R.; WANG, R.; YANG, B. Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 289–292, 2009.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 666, n. 1, p. 85-89, 1995.

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.; GROSSO, N. R.; MAESTRI, D. M. 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.