

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Ana Cristina Capelupi Mendes

Atividades antifúngica e antiocrotóxigena dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinallis* L. e *Piper aduncum* L. sobre *Aspergillus carbonarius*

**Juiz de Fora
2015**

Ana Cristina Capelupi Mendes

Atividades antifúngica e antiocrotogênica dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinallis* L. e *Piper aduncum* L. sobre *Aspergillus carbonarius*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Produtos naturais e bioativos.

Orientadora: Dra. Mirian Pereira Rodarte

Coorientador (es): Dr. Ademar Alves da Silva Filho

Dr. Luís Roberto Batista

**Juiz de Fora
2015**

Mendes, Ana Cristina Capelupi.

Atividade antifúngica e antiocrotóxigena dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. e *Piper aduncum* L. sobre *Aspergillus carbonarius* / Ana Cristina Capelupi Mendes.

-- 2015.

81 f. : il.

Orientadora: Mírian Pereira Rodarte

Coorientador: Ademar Alves da Silva Filho; Luís Roberto Batista

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2015.

1. Produtos Naturais. 2. Micotoxinas. 3. Fungos filamentosos. I. Rodarte, Mírian Pereira, orient. II. Luís Roberto Batista, Ademar Alves da Silva Filho;, coorient. III. Título.

Atividade antifúngica e antiocrotóxica dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinallis* L. e *Piper aduncum* L. sobre *Aspergillus carbonarius*

Ana Cristina Capelupi Mendes

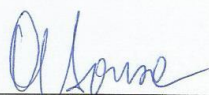
ORIENTADOR (A): Dra. Mirian Pereira Rodarte

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.


Aprovada em 31 / 07 / 2015



Dr. Silvio Silvério da Silva



Dr. Orlando Vieira de Sousa



Dra. Mirian Pereira Rodarte

*“É preciso amor pra poder sonhar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir...”*

(Renato Teixeira)

...E como choveu...e como floriu!

Agradecer com palavras é pouco para mensurar minha gratidão a todos que me ajudaram nessa caminhada. Espero, um dia, ter a oportunidade de poder retribuir pessoalmente cada uma dessas pessoas...Dedico

AGRADECIMENTOS

Há muito nas entrelinhas de um mestrado...

Primeiramente a Deus e à Nossa Senhora das Graças, que me conduziram todo o tempo, dando-me serenidade e certeza ao meu coração de que nada seria em vão;

Ao meu amado marido Anderson pelo apoio e incentivo constantes, e claro, pela imensa compreensão.

Ao meu filhote Miguel, que a cada retorno de viagem, perguntava (na sua inocência) como tinha sido a minha “escolinha, naquele dia. Obrigada filho, por mesmo sendo tão pequeno, ter sido tão compreensivo pelos meus momentos de ausência.

À Natasha pela ajuda incondicional... você foi meus olhos, ouvidos e braços na UFLA. Obrigada de coração.

Aos meus pais Luzia e Almir que me fizeram querer alcançar degraus maiores, esse esforço foi também por vocês!

À toda minha família, meus irmãos, cunhadas e cunhado, em especial novamente meus pais e minha sogra Maria Helena, que fizeram o papel de pai e mãe nos meus dias de ausência! Sem vocês eu nunca teria conseguido.

À professora Dra. Mírian Rodarte, pela orientação plena. Sempre acessível, disposta e prática! Obrigada pelos conselhos e encaminhamentos. Agradeço imensamente por me aceitar como sua orientada, foi uma honra conhecê-la!

Ao professor Dr. Ademar pela coorientação e por compartilhar de seus grandes conhecimentos que, por sinal, não guardou só para si. Obrigada por me aceitar como sua “agregada” ao NIPPAN.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade e acolhimento e ao Prof. Dr. Luís Roberto Batista pela coorientação e por abrir as portas do NETAX a mim. Obrigada pela confiança.

Aos Doutores Antônio Eduardo Miller Crotti, pela ajuda na realização das análises de CG-EM dos óleos e Márcio Roberto Silva pelo auxílio nos tratamentos estatísticos, e ao Wilder pelas análises de CLAE.

Aos amigos do NIPPAN por me receberem tão bem e por estarem sempre dispostos a ajudar. Vocês todos são uns fofos....

A todas as meninas do NETAX que me acolheram tão bem nos meses de experimento! Desejo sucesso à todas vocês.

A minha amiga Thaís por ter aberto as portas de sua casa a mim durante estes dois anos.

À Letícia que mesmo de longe, me ajudou tanto...

A todos os meus grandes amigos, em especial às minhas amigas, que sentiram tanto minha ausência, principalmente neste último semestre...amo vocês!

Não foi só estudar, planejar e executar...foram principalmente intermináveis viagens e nestas, não poderia deixar de lembrar dos meus queridos caroneiros. Obrigada a todos pela disponibilidade em ajudar e acreditem, todas foram muito proveitosas.

Aos professores do Mestrado em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos passados.

À Faculdade de Farmácia da UFJF, em especial ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade desta conquista.

Ao Programa REUNI/CAPES pela bolsa concedida.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que esta etapa pudesse ser completada.

RESUMO

A contaminação de produtos alimentícios e medicinais pode ocorrer desde o cultivo até a estocagem, principalmente quando não existe controle das condições que favorecem o crescimento fúngico. O fungo *Aspergillus carbonarius* causa a deterioração dos produtos, além de produzir ocratoxina A, potencialmente carcinogênica e nefrotóxica. O aumento de cepas resistentes aos antifúngicos sintéticos além da diversidade de ações biológicas relacionadas às espécies vegetais *Rosmarinus officinallis* L. e *Piper aduncum* L. estimula as pesquisas científicas por novos antimicrobianos. Considerando o aumento da exposição aos agentes fúngicos, devido ao crescimento do consumo de produtos *in natura*, e a alta incidência de ocratoxina A, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação antifúngica e antiocratogênica dos óleos essenciais de *R. officinallis* L. e *P. aduncum* L. sobre o fungo *Aspergillus carbonarius* CDCA 0126. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação e o perfil químico determinado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. O efeito inibitório dos óleos essenciais sobre os isolados fúngicos foi determinado pela associação dos métodos da difusão em disco e diluição em ágar e quantificação de ocratoxina por cromatografia líquida de alta eficiência. Foram identificados como compostos majoritários verbenona (24,61%), geraniol (17,55%) e 1,8 cineol (11,26%) e no óleo de *P. aduncum* L., piperitona (28,17%) e limoneno (10,42%). Os ensaios *in vitro* demonstraram a efetividade dos óleos na inibição do crescimento fúngico. O óleo essencial de *R. officinallis* L. reduziu em 94,36% a produção da ocratoxina A, sendo que o óleo de *P. aduncum* L. inibiu totalmente a produção. Os resultados deste trabalho indicam que os óleos essenciais avaliados representam uma alternativa promissora no controle do crescimento *A. carbonarius* e na produção de ocratoxina A.

Palavras-chave: Produtos naturais; Micotoxinas; Fungos filamentosos

ABSTRACT

The contamination of food and medicinal products plants, can occur from cultivation to storage, especially when there is no control of the conditions that favor fungal growth. The fungus *Aspergillus carbonarius* causes deterioration of products, in addition to producing ochratoxin A, a potentially carcinogenic and nephrotoxic. The increase of synthetic antifungal resistant strains beyond the diversity of biological actions related to *Rosmarinus officinalis* L. plant species and *Piper aduncum* L. encourages scientific research for new antimicrobials. Considering the increased exposure to fungal agents, due to elevation consumption of fresh products and the high incidence of ochratoxin A, this study aimed to evaluate the antifungal action and antiochratoxigenic property of essential oils *R.officinallis* L. and *P. aduncum* L. on the fungus *Aspergillus carbonarius* CDCA 0126. The essential oils were obtained by hydrodistillation and the chemical profile determined by gas chromatography-mass spectrometry. The inhibitory effect of essential oils on the fungal isolate was determined by the association of disk diffusion and agar dilution methods and the quantification of ochratoxin A released by high-performance liquid chromatography. They were identified as major compounds verbenone (24.61%), geraniol (17.55%) and 1,8 cineole (11.26%) in *R.officinallis* L. essential oil and piperitone (28.17%) and (10.42%) *P.aduncum* L.. *In vitro* assays demonstrated the effectiveness of oil in the inhibition of fungal growth. The essential oil *R.officinallis* L. reduced the 94.36% the production of ochratoxin A, whereas the oil *P.aduncum* L. completely inhibited production. These results indicate that the evaluated essential oils represent a promising alternative for the control of *A. carbonarius* growth and production of ochratoxin A.

Keywords: Natural products; Mycotoxins; Filamentous fungi

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Estrutura química da unidade isoprenóide.....	22
Figura 2 -	Espécie vegetal <i>Rosmarinus officinallis</i> L.....	23
Figura 3 -	Espécie vegetal <i>Piper aduncum</i> L.....	24
Figura 4 -	Estrutura reprodutiva do Filo Ascomycota	27
Figura 5 -	Micrografia do conidióforo de <i>Aspergillus carbonarius</i> e morfologia.....	31
Figura 6 -	Estrutura química: Ocratoxina A.....	37
Figura 7 -	Placa de Cromatografia em camada delgada com a detecção da OTA	50
Figura 8 -	Cromatograma de CG-EM do óleo essencial de <i>R.officinallis</i> L.....	50
Figura 9 -	Cromatograma de CG-EM do óleo essencial de <i>P.aduncum</i> L.....	52
Figura 10 -	Estrutura química dos componentes majoritários do óleo de <i>Rosmarinus officinallis</i> e <i>Piper aduncum</i>	54
Figura 11-	Estrutura química dos componentes majoritários do óleo de <i>Piper aduncum</i>	54
Figura 12-	Cromatograma do padrão de ocratoxina A.....	64
Gráfico 1-	Crescimento micelial de <i>A.carbonarius</i> CDCA 0126 na ausência e presença dos óleos essenciais avaliados.....	62
Gráfico 2 -	Produção de ocratoxina A pelo fungo controle e fungo na presença dos óleos essenciais	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Bioprodutos de uso industrial produzidos por fungos filamentosos	29
Tabela 2 - Material vegetal utilizado na obtenção dos óleos essenciais (OE).....	41
Tabela 3 - Composição química do óleo essencial de <i>R.officinallis</i> L. (OE1Ro).....	51
Tabela 4 - Composição química do óleo essencial de <i>P.aduncum</i> L. (OE2Pa).....	55
Tabela 5 - Valores médios da zona de inibição (\emptyset mm \pm DP) de OE1Ro, OE2Pa e controle avaliado sobre <i>Aspergillus carbonarius</i> CDCA 0126 nas diferentes concentrações.....	57
Tabela 6 - Média dos diâmetros das colônias (\emptyset mm \pm DP) no ensaio de crescimento micelial de <i>A.carbonarius</i> CDCA 0126 ao longo de 10 dias.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDCA	Coleção de cultura da Ciência dos Alimentos
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CYA	Ágar <i>Czapek Yeast Autolysate</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EI-EM	Espectrometria de massas com ionização por elétrons
FDA	<i>Food and Drug administration</i>
FAO	<i>Food and agriculture organization of the United Nations</i>
GRAS	<i>Generally Recognized as safety</i>
MEA	Ágar extrato de malte com Glicose
IR _{EXP}	Índice de retenção experimental
IR _{LIT}	Índice de retenção da literatura
IS	Índice de similaridade
OE	Óleo essencial
OEs	Óleos essenciais
OTA	Ocratoxina A
OMS	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	PRODUTOS NATURAIS.....	18
2.2	ÓLEOS ESSENCIAIS	20
2.3	AS ESPÉCIES VEGETAIS	22
2.3.1	<i>Rosmarinus officinallis</i> L.	22
2.3.2	<i>Piper aduncum</i> L.	24
2.4	FUNGOS FILAMENTOSOS.....	26
2.4.1	O GÊNERO <i>Aspergillus</i>	30
2.5	CONTAMINAÇÃO FÚNGICA.....	32
2.6	MICOTOXINAS.....	33
2.6.1	Ocratoxina A.	37
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL.....	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	AMOSTRAS VEGETAIS.....	41
4.2	MATERIAIS.....	41
4.2.1	EQUIPAMENTOS.....	41
4.2.2	VIDRARIAS E MATERIAIS.....	41
4.2.3	REAGENTES E PADRÕES.....	42
4.2.4	MEIOS DE CULTURA	42
4.3	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DA ESPÉCIE FÚNGICA.....	42
4.4	ATIVÇÃO DA CEPA.....	43
4.5	ANÁLISE QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A (OTA).....	43
4.6	PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO.....	44
4.7	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS VEGETAIS E DOS ÓLEOS ESSENCIAIS (OES)	44
4.8	IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS OES POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG –EM)	45
4.9	EFEITO INIBITÓRIO SOBRE FUNGOS E ATIVIDADE ANTIOCRATOXIGÊNICA.....	46
4.9.1	Triagem da ação antifúngica dos OE de <i>R.officinallis</i> L. e <i>P.aduncum</i> L.	46

4.9.2 Efeito sobre o crescimento micelial	47
4.9.3 Avaliação da ação antiocratoxigênica	47
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 ANÁLISE QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A (OTA)	50
5.2 PERFIL QUÍMICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	50
5.2.1 Óleo de <i>R. officinallis</i> L.	50
5.2.2 Óleo de <i>P. aduncum</i> L.	53
5.3 EFEITO INIBITÓRIO SOBRE OS FUNGOS.....	56
5.3.1 Triagem da ação antifúngica dos OE de <i>R.officinallis</i> L. e <i>P.aduncum</i> L.	56
5.3.2 Efeito sobre o crescimento micelial	60
5.4 EFEITO ANTIOCRATOXIGÊNICO.....	63
6 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO

Uma considerável parte da biodiversidade vegetal de todo o mundo encontra-se no Brasil, que associada à sua extensa área territorial, torna possível a exploração medicinal e biotecnológica de inúmeras fontes para a obtenção de novos e potenciais bioprodutos. Sob este aspecto diversos estudos têm demonstrado a crescente identificação de atividades biológicas de compostos de origem natural, principalmente vegetal com aplicações nas áreas farmacêutica, biotecnológica, alimentar e agrícola (ANDRADE et al., 2015; CALO et al., 2015; NEWMAN; CRAGG, 2012).

A diversidade de produtos naturais e seus derivados ativos obtidos de plantas tem motivado o desenvolvimento de pesquisas envolvendo o uso de vegetais, visando a aplicabilidade de suas propriedades biológicas (NEWMAN; CRAGG, 2012). Os óleos essenciais, por exemplo, são um grupo de derivados vegetais amplamente utilizados na indústria alimentícia como flavorizante além das aplicações nas áreas cosmética e farmacêutica (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). São notadamente descritos como potentes e eficazes antimicrobianos naturais com uma variedade de aplicações na redução do crescimento e sobrevivência de diversos micro-organismos (CALO et al., 2015).

As famílias *Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Piperaceae*, *Poaceae* e *Rutaceae* destacam-se do ponto de vista das aplicações medicinais e industriais de seus óleos essenciais (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). As espécies vegetais *Rosmarinus officinallis* L. e *Piper aduncum* L. pertencentes respectivamente às famílias *Lamiaceae* e *Piperaceae* apresentam-se como fontes promissoras de compostos ativos a serem avaliados, especialmente os óleos essenciais.

A contaminação fúngica de produtos vegetais, sejam medicinais ou alimentícios, pode ocorrer principalmente em condições ambientais de temperatura e umidade elevadas, clima característico de países tropicais como o Brasil (VIVAN, 2002). Os fungos filamentosos pertencentes ao Filo Ascomycota, representam um vasto grupo de micro-organismos com capacidade de adaptação a diferentes ambientes, permitindo a sobrevivência em nichos altamente competitivos ou em condições desfavoráveis, sejam elas naturais ou laboratoriais. A partir destes micro-organismos, vários metabólitos secundários são produzidos sob estas condições capacitando-os a sobreviver (TORTORA et al., 2012).

Dentre os diversos metabólitos secundários produzidos pelos fungos filamentosos, muitos são de aplicação biotecnológica como enzimas, vitaminas, ácidos orgânicos e medicamentos. Entretanto, alguns outros metabólitos, como as micotoxinas, possuem ação

tóxica, representam um risco potencial à saúde pública, uma vez que podem estar presentes sem sinais visíveis de contaminação (BRYDEN, 2012). A exposição contínua a pequenas doses de micotoxinas é suficiente para gerar efeitos permanentes e nocivos, como carcinogênicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos ao homem e animais (BENNET; KLICH, 2003; FAO, 2015).

A inserção na dieta de produtos *in natura*, como sementes e farináceos, devido aos aspectos benéficos à saúde, proporciona um aumento da exposição a estes contaminantes. A contaminação fúngica também está presente em insumos medicinais, como extratos secos, partes aéreas e inflorescências vegetais, utilizados por grande parte da população (BUGNO et al., 2006; PRADO et al., 2012). Devido a estes riscos supracitados o controle biológico de fungos e suas micotoxinas apresenta-se como uma necessidade emergente.

Devido à produção de micotoxinas, os gêneros fúngicos mais comuns em produtos medicinais e alimentícios, são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* e *Claviceps* (ZAIN, 2011). Dentre as micotoxinas mais estudadas, a ocratoxina A, tricotecenos, zearalenona, fumonisina, toxina PR, patulina, e aflatoxinas são as mais descritas na literatura científica. Destas, destacam-se as ocratoxinas, um grupo de 3 substâncias potencialmente carcinogênicas e nefrotóxicas produzidas principalmente pelos fungos do gênero *Aspergillus*, sendo de maior ocorrência nas espécies pertencentes às Seções *Circumdati* e *Nigri* como *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* (KLICH, 2002a). Entretanto, o crescimento fúngico não é um indicativo da presença da micotoxina, uma vez que, a mesma só é produzida mediante condições ambientais favoráveis, principalmente temperatura e umidade, justificando assim a avaliação do potencial toxigênico dos mesmos (BENNET; KLICH, 2003).

A avaliação de óleos essenciais na redução da produção de micotoxinas por fungos filamentosos tem sido relatada na literatura científica (ANDRADE et al., 2015; PASSONE et al., 2012). No entanto a ação dos óleos de *R.officinallis* L. e *P.aduncum* L. sobre o crescimento de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* e/ou produção de ocratoxina A precisa, ainda ser melhor elucidada.

Considerando o aumento do consumo de produtos *in natura* bem como os riscos à saúde associados às micotoxinas, o presente trabalho visa a avaliação da atividade antifúngica e antiocratoxigênica dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinallis* L. e *Piper aduncum* L. sobre o fungo *Aspergillus carbonarius* produtor de ocratoxina A.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PRODUTOS NATURAIS

As plantas foram, desde o início da civilização, o principal recurso ao qual o homem podia recorrer para garantir a cura para muitas doenças, desta forma, as plantas medicinais têm sido a base para o tratamento de várias patologias (NEWMAN; CRAGG, 2012).

O crescimento da indústria farmacêutica e o desenvolvimento de novos fármacos sintéticos não diminuíram a importância das plantas medicinais. Ao contrário, verifica-se um aumento progressivo na demanda por plantas medicinais e produtos derivados, não apenas nos países em desenvolvimento, mas também em países industrializados (CALIXTO, 2005). Neste sentido, os aspectos quimiotaxonômicos (marcadores químicos que permitem agrupar espécies), botânicos-taxonômicos e informações advindas da medicina tradicional são importantes fontes para a identificação de substâncias ativas de origem vegetal (ROEMER et al., 2011).

A diversidade química dos produtos naturais é complementar à encontrada nas bibliotecas de compostos sintéticos. Contudo, os produtos naturais são mais complexos e apresentam maior heterogeneidade devido ao longo processo de seleção evolutiva e assim, representam uma fonte inesgotável de substâncias ativas com diferentes ações biológicas (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica moderna foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo 25% de plantas, 13% de micro-organismos e 3% de animais (NEWMAN; CRAGG, 2012). De acordo com Arif e colaboradores (2009), em uma estimativa de 250-500.000 espécies vegetais existentes na terra, apenas 10% delas são utilizadas como o intuito medicinal, denotando a importância da pesquisa em busca de novos e potenciais produtos advindos destas.

O Brasil sendo um dos países com uma vasta extensão territorial e com uma grande biodiversidade apresenta inúmeras espécies vegetais conhecidas ou não. Parte dessas espécies são utilizadas na forma de chás, extratos, decocções, unguentos e outras, como medicamentos para o tratamento de doenças (TEMPONE et al., 2008).

A classificação das plantas medicinais e/ou suas partes e formas de uso como medicamentos é descrita pela Resolução RDC nº 26 de 13 de maio de 2014 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e diferencia os termos droga vegetal (plantas medicinais ou suas partes que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica,

após processos de coleta/colheita, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada) e fitoterápico (produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal (BRASIL, 2014).

O consumo de produtos naturais aumentou consideravelmente nos últimos anos, devido, principalmente à busca por uma forma de vida mais saudável. Segundo Prado e colaboradores (2012), no Brasil, a ingestão de certas plantas consideradas como medicinais na forma de chás sempre foi significativa, principalmente nas populações de baixa nível econômico, devido aos baixos custos e à crença popular atribuída a seus efeitos. Ainda de acordo com o mesmo autor, em países industrializados, acredita-se que 30% a 50% da população fazem uso regular de plantas medicinais e/ou suplementos vitamínicos e minerais (PRADO et al., 2012). Neste contexto os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica seja por seus efeitos próprios ou como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos (SONKER et al., 2014).

Produtos de origem vegetal ou microbiana apresentam uma série de propriedades farmacológicas como antialérgica, antidiabética, analgésica, anti-inflamatória, antiviral, antifúngica, antibacteriana, antiparasitária e muitas outras o que determina sua importância no atual cenário da saúde mundial (NEWMANN; CRAGG, 2012).

Por outro lado, a estreita relação entre o consumo de alimentos saudáveis e a saúde do indivíduo é conhecida há muito tempo e o interesse por esta relação não surge apenas dos consumidores, mas também da indústria e da comunidade científica que tem buscado cada vez mais informações acerca dos benefícios da inserção destes produtos na dieta humana (ANDLAUER et al., 2002). O consumo de alimentos funcionais tem ganhado cada vez mais adeptos, que estão em busca de boas condições nutricionais associada aos cuidados com a saúde, pois muitas ações como antioxidante, termogênica, regulatória intestinal e outras estão associadas à estes produtos (STRINGHETA et al., 2007).

O Guia Alimentar da População Brasileira lançado pelo Ministério da Saúde em 2014 traz recomendações claras aos brasileiros pelo aumento do consumo de alimentos funcionais e *in natura* como farelos, linhaça, frutas, soja e demais grãos (ANDLAUER et al., 2002). Isso reflete a extrema importância da manutenção da qualidade destes produtos, principalmente devido ao fato de que muitos destes permanecem estocados, e, portanto, sujeitos à contaminação fúngica e micotoxigênica.

Sabe-se que, por melhor que seja o manejo nas culturas vegetais e produção animal e as condições de armazenamento, as mesmas estão susceptíveis ao ataque de insetos, fungos, bactérias e vírus, sendo possíveis causadores de uma série de danos aos produtos a serem utilizados nos setores farmacêutico, biotecnológico ou alimentar (OLIVEIRA et al., 2007).

Extratos, óleos essenciais e substâncias puras isoladas de plantas têm sido utilizados no controle de insetos, fungos, bactérias, parasitas e outros contaminantes, buscando uma aplicação viável e de interesse econômico, ecológico e social (TEMPONE et al., 2008). Dentre os contaminantes vegetais, destaca-se a contaminação fúngica devido à alta incidência e a produção de micotoxinas (PRAKASH et al., 2015).

O uso indiscriminado de antifúngicos sintéticos leva ao desenvolvimento de estirpes resistentes, que acarreta na utilização de concentrações mais elevadas, com o conseqüente aumento de resíduos tóxicos nos produtos vegetais (CABRAL et al., 2013). Uma forma alternativa de solução para esta problemática, é a utilização de produtos naturais no controle de patógenos, pois, estes, apresentam diversas vantagens como: a redução do uso de defensivos químicos, os quais determinam uma melhor qualidade do produto final; a possibilidade do emprego de produtos naturais com baixa toxicidade para o homem, animais e meio ambiente; a facilidade na obtenção além de serem biodegradáveis (BUGNO et al., 2006).

Com o aumento significativo de casos de resistência fúngica às diversas classes de agentes de combate tanto na área da saúde, agronomia e industrial, a busca por novos e potentes antifúngicos têm se tornado necessária e urgente (ARIF et al., 2009). Diferentes grupos químicos presentes principalmente nas plantas, vêm sendo descritos na literatura como potenciais agentes antimicrobianos como os terpenos, polifenóis, flavonóides, cumarinas, alcalóides e outros (ARIF et al., 2009).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

A norma 9235 de 2013 da International Organization of Standardization define óleos essenciais como produtos obtidos de matérias-primas naturais de origem vegetal, por hidrodestilação a vapor, processos mecânicos (pericarpos de frutos cítricos) ou destilação a seco (ISO, 2013).

Os óleos essenciais são compostos de caráter lipofílico, altamente voláteis, com pesos moleculares abaixo de 300, podem ser fisicamente extraídos de sua planta de origem no que diz respeito a sua ingestão são geralmente considerados como seguros (GRAS) para o uso de

acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA) (TUREK; STINTZING, 2013). Podem ser obtidos a partir de várias partes da planta, como flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, madeiras, frutas e raízes e são os responsáveis pelo aroma e sabor associados às plantas e especiarias, o que lhes conferem alto valor econômico e social para diferentes áreas como farmacêutica, perfumaria, cosmética, alimentação humana e animal entre outras (TABASSUM; VIDYSAGAR, 2013).

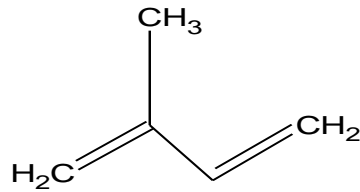
Devido ao grande número de atividades biológicas descritas para os óleos essenciais, como antimicrobiana, antioxidante, inseticida e antiviral, torna-se possível a ampliação de suas aplicações. Dentre as aplicações dessas substâncias destacam-se: aromaterapia, o uso na indústria de perfumes e cosméticos, flavorizantes na indústria de alimentos e defensivos agrícolas (MA et al., 2013; TUREK; STINTZING, 2013).

Schimidt (2010) *apud* Martins e colaboradores (2011) descreveram que o crescente desenvolvimento comercial e industrial na área dos óleos essenciais acompanha alterações globais e flutuações da origem destes, com maior produção atual em países exteriores à Europa como Brasil (29%), Índia (26%), Estados Unidos (17%) e China 9%.

Os óleos essenciais são misturas complexas, que podem conter cerca de 20-60 componentes em diferentes concentrações como hidrocarbonetos, cetonas, álcoois, óxidos, aldeídos, fenóis, ésteres, fenilpropanóides e terpenóides sendo estes últimos dois majoritários (TUREK; STINTZING, 2013), e, de acordo com Tabassum e Vydisagar (2013), a composição do óleo essencial pode variar de acordo com formas de extração, cultivo, horários de coletas, dentre outros fatores, o que influencia diretamente sobre as atividades biológicas na mesma espécie.

Os terpenóides são compostos originários de combinações de unidades isoprenóides (Figura 1) que se originam do ácido mevalônico. Os principais terpenos são os monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15), entretanto, hemiterpenos (C5), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) também são produzidos. Os monoterpenos são as moléculas mais representativas, constituindo cerca de 90% dos óleos essenciais. O carvacrol (30%) e timol (27%) são componentes majoritários de *Origanum compactum* (Orégano), ao passo que na espécie *Coriandrum sativum* (Coentro) o linalol (68%) é o maior componente e ainda mentol (59%) e mentona (19%) estão em *Mentha piperita* (BAKKALI et al., 2008).

Figura 1- Estrutura química da unidade isoprenóide



FONTE: Elaborado pelo próprio autor

Os métodos empregados para a extração dos óleos essenciais variam de acordo com a escala (laboratorial ou industrial), localização do óleo essencial na planta (folhas, flores, frutos) bem como a qualidade do mesmo que se deseja obter. A técnica mais utilizada em escala laboratorial é a hidrodestilação com aparelho de Clevenger que se baseia na volatilidade dos óleos essenciais, onde o material vegetal permanece em contato com a água, no estado líquido, e por possuírem tensão de vapor mais elevada que esta, são arrastados e separados (KAR, 2003).

Devido ao grande número de constituintes químicos, os óleos essenciais podem apresentar diferentes atividades biológicas (BAKKALI et al., 2008). Atividades como antifúngica, antibacteriana, antioxidante, antitumoral e inseticida dentre várias outras são amplamente descritas na literatura demonstrando e evidenciando a importância destes compostos naturais como promissoras fontes de novos produtos no mercado (BAKKALI et al., 2008; SINGH et al. 2008; HAJHASHEMI et al., 2009; FIRUZI et al., 2010; FADLI et al., 2012; SHUKLA et al. 2012; PASSONE et al., 2012; TABASSUM; VYDISAGAR, 2013; ASHIQ et al., 2014; GOMES et al., 2014; KEDIA et al., 2014; ZABKA et al., 2014; CALO et al., 2015).

2.3 AS ESPÉCIES VEGETAIS

2.3.1 *Rosmarinus officinallis* L.

A espécie é conhecida no Brasil como alecrim, alecrim-de-jardim, alecrim-de-cheiro, alecrim-da-horta, alecrim-rosmarino, e é oriunda da região mediterrânea da Europa, entretanto, é amplamente distribuída pelas regiões do mundo, incluindo o Brasil (LORENZI; MATOS, 2008). Apresenta-se como uma planta arbustiva (atingindo até 2 metros), com folhas pequenas, lineares, aromáticas e flores bilabiadas nas cores lilás claro ou brancas e por ser perene (Figura 2), não resiste a invernos rigorosos e altos índices de chuva, necessitando

para seu pleno desenvolvimento, de solos bem drenados e sol pleno (LORENZI; MATOS, 2008).

Figura 2- Espécie vegetal *Rosmarinus officinallis* L.



FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

De acordo com GRANDI (2014) *R. officinallis* L é classificada como: Reino *Plantae*, classe *Magnoliopsida*, ordem *Lamiales*, família *Lamiaceae*, gênero *Rosmarinus* e espécie *R. officinallis* L.. A família Lamiaceae compreende mais de 200 gêneros com aproximadamente 3.200 espécies e muitos membros desta família são utilizados economicamente para utilizações comerciais medicinais, culinárias, ornamentais e várias outras aplicações (TABASSUM;VYDISAGAR, 2013).

Embora a planta seja muito utilizada na culinária como alimento e conservante, tanto o extrato como o óleo essencial, são utilizados desde a antiguidade por suas diversas propriedades medicinais como antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante dentre outras (BONFIM et al., 2015; GOMES-NETO et al., 2014; PESAVENTO et al., 2015; ZAOUALI et al., 2010; RASOOLI et al., 2008).

De acordo com GRANDI (2014), o óleo de *R. officinallis* L. é constituído por monoterpenos como borneol, linalol, eucaliptol, α -pineno, e cânfora que caracterizam seu odor típico. Além disso, dentre os compostos não voláteis, estão os ácidos rosmarínico, caféico, clorogênico, glicólico e cítrico além de alguns flavonóides (diosmina, diosmetina, apigenina, genkuanina) e diterpenos (carnosol).

O processo de extração como a hidrodestilação e a extração livre de solventes em micro-ondas, do OE do alecrim influenciam o rendimento e composição química do óleo, bem como a atividade contra bactérias Gram positivas e negativas (OKOH et al., 2010). Além do processo de extração as características ecológicas da área de cultivo influenciam no

rendimento, na quantidade de compostos isolados e na potencialidade da ação antimicrobiana do óleo essencial de *R. officinallis* L. (JORDAN et al., 2013).

Alguns trabalhos descreveram a avaliação das atividades antibacteriana e antifúngica do OE de *R. officinallis* L., confirmando a importância farmacológica desta espécie vegetal (JIANG et al., 2011; JORDAN et al., 2013; GOMES-NETO et al., 2014; PESAVENTO et al., 2015; RASOOLI et al., 2008; SOYLU et al., 2010; STUPAR et al. 2014; ZAOUALI et al., 2010; BONFIM et al., 2015). No entanto não tenham sido encontrados na literatura científica trabalhos que co-relacionem diretamente o OE de *R. officinallis* L. atuando sobre a espécie *A.carbonarius* na produção de ocratoxina A.

2.3.2-*Piper aduncum* L.

A espécie *Piper aduncum* L. é conhecida popularmente como pimenta-longa, pimenta-de-macaco, aperta-ruão, jaborandi-falso em nosso país, a espécie vegetal *Piper aduncum* L. está distribuída pela América Central, Antilhas e América do Sul, com maior incidência em solos areno- argilosos da Amazônia e Mata Atlântica (GRANDI , 2014).

Apresenta-se como um arbusto com até 8 metros de altura, com ramos articulados e rugosos, folhas agudas, oblongas, assimétricas, ásperas e ainda, inflorescências na forma de espigas isoladas, grandes e curvas (Figura 3) (LORENZI; MATOS, 2008).

Figura 3 - Espécie vegetal *Piper aduncum* L.



FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

De acordo com GRANDI (2014) *P.aduncum* pode pertence ao Reino *Plantae*, classe *Magnoliopsida*, ordem *Piperales*, família *Piperacear*, gênero *Piper* e espécie *P. aduncum* L.

A família Piperaceae compreende mais de 14 gêneros e 2000 espécies, tendo como espécie mais relatada *Piper nigrum* conhecida popularmente como pimenta-do-reino, muito utilizada na culinária (LORENZI; MATOS, 2008). A Piperaceae é uma das famílias botânicas mais primitivas entre as angiospermas, podendo ser considerada um “fóssil vegetal” (TABASSUM; VYDISAGAR, 2013).

O OE de *P. aduncum* L. possui atividades antifúngicas (principalmente contra fitopatógenos), antibacteriana, analgésica e anti-inflamatória (GAIA et al., 2004).

O OE das folhas de *P. aduncum* L. é produzido por tricomas glandulares na face abaxial das folhas e sua constituição química se dá pela presença principalmente da piperitona, dilapiol, miristina e safrol (GRANDI, 2014; OLIVEIRA et al., 2013).

A influência na composição do óleo de *P. aduncum* L. por fatores como a localização geográfica em quatro variedades da espécie, foi avaliada por Potzernheim e colaboradores (2012). O rendimento dos óleos na extração por hidrodestilação apresentou-se entre 0,66-1,3% nas 4 espécies, sendo próximo ou superior ao previsto para a produção comercial, indicando que técnicas de cultivo e melhoramento genético podem aumentar, o rendimento de óleo volátil pode ser aumentado. As análises realizadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas identificaram 65 compostos no total das quatro espécies, e ainda que, as plantas coletadas em duas regiões (eqüidistantes) apresentaram composição e quantificação dos óleos semelhantes, ao passo que nas outras duas regiões o perfil se mostrou bem diferente.

A análise do perfil químico do óleo essencial de *Piper aduncum* L. e *Piper obliquoum* bem como atividades biológicas como antifúngica, antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, analgésica e antitrombótica foi realizada por Guerrini e colaboradores (2009). O resultado para a ação antifúngica de *Piper aduncum* L. sobre o fitopatógeno *Magnaporthe grisea* e os dermatófitos *Trichophyton menthagrophytes* e *T. tonsurans* foi considerável, observando-se que, para estes últimos, houve inibição em concentração três vezes menor que o fungicida controle. Outras atividades como inseticida, larvicida e acaricida são relatadas em outros trabalhos científicos (ARAÚJO et al., 2012; I LING et al., 2009; MISNI et al., 2009; SOUTO et al., 2012).

Diversas atividades biológicas do dilapiol, um dos compostos isolado do OE de *P. aduncum* L., foram avaliadas por Almeida e colaboradores (2009), e dentre elas, a ação fungicida contra *Clinipellis pernicioso* (vassoura-de-bruxa) se mostrou efetiva no combate ao crescimento do fungo.

Navickiene e colaboradores (2006) estudaram a ação antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* do OE de três espécies do gênero *Piper*, incluindo *Piper aduncum* L. A identificação dos compostos por CG-EM indicou que tanto monoterpenos quanto sesquiterpenos ocorreram nas três espécies. A atividade antifúngica se mostrou promissora com satisfatória inibição do crescimento.

Poucos trabalhos envolvendo fungos do gênero *Aspergillus* e a ação antimicotoxigênica através do uso do OE de espécies vegetais do gênero *Piper* são relatados. A espécie *P. aduncum* L. ainda tem sido pouco explorada, o que impulsiona os estudos na busca por estas atividades (NAZMU et al., 2011; PRAKASH et al., 2010; RAHMAM et al., 2011; VIEIRA et al., 2011).

2.4 FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos são micro-organismos eucarióticos, aeróbios (maioria) e heterotróficos classificados no Domínio *Eurakya* e reino *Fungi* e representam um extenso grupo microbiano cosmopolita muito diverso, com uma variedade de morfologias, metabolismos e habitats (BLACKWELL, 2011). Habitam quase todos os nichos ecológicos da terra e tem a capacidade de utilizar vários substratos, como consequência da diversidade de sua evolução biológica e bioquímica (ZAIN et al., 2014). Apenas 4,6% da diversidade de fungos é conhecida com aproximadamente 69.000 espécies descritas de um total estimado em 1,5 milhões existentes no mundo (HAWKSWORTH, 2001). Com as técnicas moleculares e a exploração de novos ambientes, esta estimativa pode ser considerada conservadora e aponta que em todo o mundo, existam cerca de 5,1 milhões de espécies fúngicas (BLACKWELL, 2011).

O Filo Ascomycota compreende 64% das espécies fúngicas conhecidas sendo desta forma, considerado o filo com maior número de espécies dentro do Reino Fungi (HAWKSWORTH, 2001). Os fungos pertencentes a este filo apresentam naturalmente, uma grande capacidade adaptativa para sobrevivência em diferentes habitats uma vez que utilizam fontes de carbono presentes no ambiente para se nutrir além de serem grandes colaboradores dos ciclos ecológicos, pois são decompositores da matéria orgânica (MADIGAN et al., 2010).

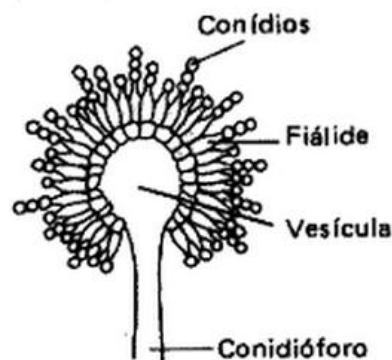
Duas formas de colônias podem se desenvolver no reino Fungi: leveduriformes e filamentosas. Os indivíduos pertencentes ao Filo Ascomycota como o gênero *Aspergillus* apresentam-se na forma filamentosa. Esse tipo de colônia é constituída por estruturas pluricelulares denominadas hifas que se reúnem formando os micélios. O micélio em contato

com o substrato é denominado micélio vegetativo que suporta o micélio aéreo importante durante a fase reprodutiva (MADIGAN et al., 2010; KLICH, 2002a). A reprodução dos fungos acontece de forma diversificada dependendo do grupo ao qual pertencem (TORTORA et al., 2012).

A forma reprodutiva do Filo Ascomycota, o asco (Figura 4), é assexuada pela formação de milhões de esporos chamados conídios produzidos em longas cadeias denominadas conidióforo (TORTORA et al., 2012). Para liberação dos esporos os mesmos se soltam com extrema facilidade ao menor contato.

A morfologia dos conidióforos e dos conídios é o grupo de características mais importantes na identificação morfológica dos gêneros (KLICH, 2002a).

Figura 4 - Estrutura reprodutiva do Filo Ascomycota



FONTE: KLICH (2002a).

Devido à sua grande capacidade adaptativa, os esporos fúngicos podem ser encontrados nos mais diversos tipos de produtos como solo, sedimentos marinhos, alimentos como grãos, cereais, café, chás, frutas secas, rações e sementes como linhaça, gergelim, considerando um potencial risco àqueles estocados por longos períodos sem controle de temperatura e umidade (REDDY et al., 2010b). A estratégia nutricional desse grupo de micro-organismos é também um ponto diferencial; pois, estes micro-organismos são capazes de secretar enzimas e ácidos orgânicos para o ambiente circundante rompendo moléculas poliméricas em simples moléculas, favorecendo sua absorção para posterior nutrição (SAMSON; VARGAS, 2009).

Metabólitos secundários são substâncias sintetizadas que não são de uso primário ao desenvolvimento do fungo, mas, são produzidos quando o crescimento microbiano está na fase estacionária e frequentemente são bioativos (ZAIN et al., 2014).

Os metabólitos secundários apresentam grande importância devido às atividades antibióticas, antifúngicas, antitumorais, imunossupressoras, antivirais e muitas outras (TAKAHASHI; LUCAS, 2008). Zhelifonova e colaboradores (2010) relatam que durante o seu desenvolvimento, os fungos podem seguir rotas metabólicas diferentes o que pode resultar na geração de metabólitos secundários que por sua vez, podem apresentar ampla diversidade atividades biológicas justificando sua aplicação na indústria farmacêutica. MOHAMED e colaboradores (2013) descreveram que a melhor condição para a produção de metabólitos secundários depende do tipo de metabólito, da espécie e do isolado fúngico.

Os metabólitos secundários apresentam algumas características próprias como distribuição taxonômica restrita na qual nem todas as linhagens de uma espécie são capazes de produzir determinado metabólito; não são essenciais para o crescimento e reprodução do micro-organismo; condições de cultivo especialmente a composição do meio (controlam a formação destes); são codificados por genes específicos e podem ser superproduzidos (MEYER, 2008).

De acordo com Tortora e colaboradores (2012) a diversidade genética dentro de uma espécie é afetada pelo comportamento (estratégias para sobrevivência), assim, indivíduos de uma mesma espécie podem ser geneticamente diferentes dos outros. Essa diversidade genética permite a adaptação das espécies às condições ambientais, dentro do processo de seleção natural e a para isso, são produzidos os metabólitos secundários. Desta forma observa-se fungos pertencentes à mesma espécie produzindo metabólitos secundários.

A capacidade de fungos filamentosos de crescer em meios simples e substratos de baixo custo, bem como sua capacidade de produzir uma ampla gama de metabólitos interessantes têm atraído significativa atenção para explorá-los como na produção biotecnológica (MEYER, 2008). De acordo com TAKAHASHI e LUCAS (2008), os bancos de dados *Caplus* e *Medline* apresentaram um número crescente nos últimos anos de publicações sobre metabólitos secundários fúngicos, inclusive patentes, evidenciando o crescente interesse por esta área.

A penicilina, devido à aplicabilidade terapêutica, estimulou a pesquisa por novos compostos de origem fúngica, e, desta forma, outros metabólitos surgiram com o avanço das pesquisas como o ácido micofenólico (imunossupressor) isolado em 1896, o ácido cítrico de aplicação industrial, a ciclosporina, taxol, cefalosporinas e muitos outros (MEYER, 2008; BENNETT, 2010). Diante da importância na produção de inúmeros metabólitos secundários de importância biológica, as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* tem sido destacadas. Muitos metabólitos secundários desse gênero possuem grande importância econômica como

as estatinas e seus derivados que reduzem os níveis de colesterol, enzimas e ácidos orgânicos (BENNETT, 2010). A Tabela 1 apresenta alguns produtos de aplicação na indústria mundial.

Tabela 1- Bioprodutos de uso industrial produzidos por fungos filamentosos

Composto	Fungo	Área de aplicação
Escleroglucano	<i>Sclerotium roolfsii</i>	Indústria de cosméticos
Cefalosporina	<i>Acremonium crhysogenum</i>	Indústria farmacêutica
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Indústria farmacêutica
Ciclosporina	<i>Tolyocladium nivenum</i>	Indústria farmacêutica
Lovastatina	<i>Aspergillus terreus e Monascus ruber</i>	Indústria farmacêutica
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Indústria alimentícia e bebidas.
Ácido itacônico	<i>Aspergillus terreus</i>	Indústria de polímeros
Ácido Kójico	<i>Aspergillus oryzae</i>	Indústria alimentícia
Glucamilase	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>	Indústria têxtil
Lipases	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>	Indústria de detergentes
Xilanases	<i>Aspergillus niger, Trichoderma reesei, e Trichoderma konignii</i>	Indústria têxtil, papel e panificação

FONTE: MEYER, 2008

Aly e colaboradores (2011) descreveram em seu trabalho de revisão sobre metabólitos secundários fúngicos que nos últimos 50 anos, eles revolucionaram a medicina por fornecer drogas ou partes de estruturas para construção de novos fármacos apresentando um enorme potencial terapêutico e agrícola. Dadas as estimativas da biodiversidade de fungos, já identificados no mundo todo, a possibilidade de encontrar espécies fúngicas não identificadas e produtoras de novos metabólitos é alta (GERKE; BRAUS, 2014). Tais achados não só satisfariam a crescente necessidade de novos antibióticos e agentes quimioterapêuticos, mas também de agrotóxicos com melhor rendimento, maior atividade, menor toxicidade e menor impacto ambiental do que os atualmente utilizados.

Muitos metabólitos secundários fúngicos denominados micotoxinas, possuem ação tóxica e podem gerar efeitos danosos e irreversíveis aos organismos quando expostos a elas. As micotoxinas representam um risco à saúde pública uma vez que, depois de contaminados alimentos, plantas utilizadas na forma de chá, insumos alimentícios e rações não geram sinais

perceptíveis visualmente, resultando na ingestão inconsciente destas micotoxinas. Inclui-se neste quadro não somente seres humanos, mas também, animais pra corte e abate como gado e frangos, o que permite a contaminação por via indireta (BRYDEN, 2012).

2.4.1 O GÊNERO *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* é constituído por indivíduos pertencentes ao Domínio Eukarya, Reino Fungi, filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales, e família Aspergilaceae (KLICH, 2002a). Sua função na natureza é de vital importância, pois, são agentes naturais reciclagem de matéria biológica, embora ofereçam potencial risco à saúde humana através das contaminações denominadas aspergiloses (SAMSON; VARGAS, 2009).

De acordo com BRAHM e SEGAL (2009), as aspergiloses, geralmente provocadas por *A. fumigatus*, apresentam-se em duas formas de manifestação: os aspergilomas (colonização da cavidade pulmonar) e as aspergiloses invasivas (doença oportunista de caráter longo e severo). Ainda de acordo com esses mesmos autores, as aspergiloses podem se instalar em órgãos como os pulmões, ouvido, olhos e ainda no sistema nervoso central causando complicações no seu funcionamento fisiológico.

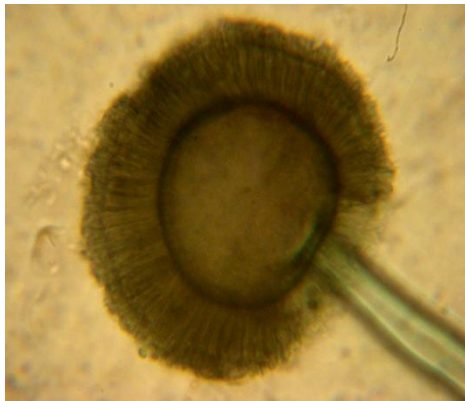
Sobre suas características morfológicas microscópicas o gênero *Aspergillus* caracteriza-se pela reprodução assexuada na maioria das espécies e por formar conidióforo sem ramificação terminados em uma vesícula onde estão inseridas as fiáldes que contém os conídios (BENNET, 2010; KLICH, 2002a) (Figura 5). Regiões de clima tropical e subtropical são o hábitat preferencial, que associadas à capacidade de fácil dispersão de seus esporos favorecem o crescimento em diferentes superfícies (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

Os fungos do gênero *Aspergillus* possuem um grande potencial biotecnológico empregado nas indústrias de fermentação, na produção de enzimas extracelulares, ácidos orgânicos e outros metabólitos secundários de grande interesse farmacêutico, como as estatinas (BENNET, 2010). Muitos são empregados em estudos de produção de proteínas recombinantes, por sua habilidade natural de secretar proteínas em grande quantidade para seus bioprocessos (WANG et al., 2005).

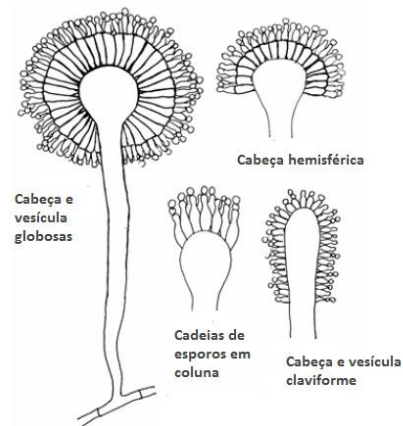
Figura 5- Micrografia do conidióforo de *Aspergillus carbonarius* e morfologia

(A)

(B)



FONTE: Elaborado pelo próprio autor



FONTE: KLICH (2002a).

De acordo com Perrone e colaboradores (2007), o gênero pode apresentar impactos negativos principalmente sobre plantas e produtos vegetais, sendo o agente causador de diversas doenças. Ainda de acordo com esses autores, estes fungos contaminam com facilidade diversos produtos agrícolas em diferentes fases como pré-colheita, colheita, processamento e manuseio através de metabólitos secundários tóxicos.

Muitas das espécies são produtoras de micotoxinas, como ocratoxina e aflatoxinas, amplamente conhecidas como contaminantes tóxicos ao consumo de grãos e insumos alimentares para humanos e animais (BENNETT, 2010). Se ingeridas por animais, as micotoxinas quando não provocam a morte destes em processos de intoxicação aguda, promovem a redução de peso, diminuição da postura, diminuição da conversão alimentar, aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas e parasitárias e problemas reprodutivos entre outros (KUMAR et al., 2008).

De acordo com Perrone e colaboradores (2007) os estudos sobre a biodiversidade de espécies de *Aspergillus* toxigênicos bem como de agentes antifúngicos naturais é útil para esclarecer características moleculares, ecológicas, bioquímicas das diferentes espécies em relação à sua adaptação a diferentes condições ambientais e geográficas, seu potencial para toxigenicidade e como combatê-los perante o risco para a saúde pública.

Em países de clima tropical, das espécies produtoras de OTA, prevalecem as do gênero *Aspergillus* e pertencem às Seções *Nigri* e *Circumdati*. Os fungos da Seção *Nigri* como *A. carbonarius* apresentam esporos na cor preta que lhe conferem proteção à luz solar e à radiação UV, atuando como uma vantagem competitiva nestas regiões climáticas (SAMSON; VARGAS, 2009). Quanto às características, a espécie apresenta cabeça aspergilar

e vesículas esféricas a quase esféricas com conídios esféricos. Os conídios de *A. carbonarius* variam de muito rugosos a espiculados (KLICH, 2002a).

A germinação dos esporos de *A. carbonarius* é muito rápida e ocorre num período de 24 horas à temperatura entre 25 °C e 35 °C, contudo, condições ótimas para a produção de OTA por *A. carbonarius* podem diferir das condições ótimas para o crescimento do fungo (PASSAMANI et al., 2014).

2.5- CONTAMINAÇÃO FÚNGICA

A contaminação por fungos e seus subprodutos tóxicos representam um grande desafio para os pesquisadores, uma vez que, têm surgido com maior frequência casos de resistência às mais diversas classes de agentes antifúngicos (ARIF et al., 2009). O aumento no consumo de produtos *in natura*, insumos medicinais para uso como chás e demais infusões, bem como insumos agrícolas para a alimentação humana e animal, se tornam um foco cada vez mais preocupante no que diz respeito à contaminação fúngica e a presença de suas micotoxinas (BRYDEN, 2012).

O uso de fungicidas sintéticos no combate a fungos não só em quadros clínicos, mas também em produtos para consumo humano e animal apresenta algumas restrições, como a toxicidade aguda e crônica além de efeitos colaterais e acumulativos de resíduos destes sobre a saúde e o ambiente apontam para um futuro não muito promissor (ZABKA et al., 2014). Existe uma necessidade crescente de identificar e utilizar novas substâncias, ambientalmente seguras de degradação rápida e natural ao ambiente (ARIF et al., 2009).

A ocorrência de fungos e sua possível supressão desempenham um papel crucial em termos de economia, higiene e saúde. O efeito da presença destes em produtos para consumo humano e animal representa uma clara ameaça para a saúde pública, principalmente levando-se em conta, o risco da presença das micotoxinas (ZABKA et al., 2014).

Os fungos são micro-organismos com ampla capacidade de sobrevivência em ambientes que ofereçam diferentes condições e, por essa característica, podem se utilizar de diferentes substratos para seu desenvolvimento, principalmente, produtos vegetais estocados sob condições controladas ou não (BRYDEN, 2012).

Por exemplo, os produtos vegetais são susceptíveis ao crescimento fúngico, que inviabiliza sua comercialização e também pela presença de micotoxinas (MA et al., 2013).

Uma forma alternativa de uso dos óleos essenciais sobre as culturas de produtos agrícolas e medicinais, descrita por Prakash et al. (2015) é a fumigação. De acordo com esses autores, este é um dos melhores métodos para evitar a contaminação de pragas durante a armazenagem com nenhum ou muito pouco efeito residual nos produtos.

SOYLU et al. (2010) pesquisaram a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinallis L.*, *Origanum syriacum L. var. bevanii* e *Lavandula stoechas L. var. stoechas* como alternativas aos fungicidas sintéticos utilizados para o combate ao fungo *Botrytis cinerea* causador do mofo cinza em tomates. Todos os óleos inibiram completamente o crescimento do fungo.

PASSONE et al., (2012), avaliaram a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Peumus boldus Mol.*, *Lippia turbinata var. integrifolia (Griseb)*, *Syzygium aromaticum L.*, *Pimpinella anisum* e *Thymus vulgaris* contra *Aspergillus niger A. carbonarius* através do método de fumigação sobre grãos de amendoim. Os óleos de *Lippia turbinata* e *Syzygium aromaticum L.* inibiram a taxa de crescimento fúngico e a produção de OTA foi reduzida pelos mesmos óleos.

A atividade antifúngica de óleos essenciais é discutida na literatura científica explorando a biodiversidade vegetal existente no mundo e, principalmente no Brasil no combate a fungos produtores de micotoxinas. Entre esses fungos destacam-se os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Embora algumas investigações científicas venham dando destaque à contribuição de muitas famílias *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Liliaceae*, *Solanaceae*, *Rutaceae* e *Piperaceae*, na busca por agentes antifúngicos, estas, ainda são muito gerais em termos de avaliação de espécies fúngicas, e a ação antimicotoxigênica, especificamente para a ocratoxina A, ainda é muito pouco explorada (BONFIM et al., 2015; GOMES et al., 2014; KEDIA et al., 2014; RASOOLI et al., 2008; SONKER et al., 2014; TABASSUM; VIDYSAGAR, 2013; ZABKA et al., 2014).

2.6 MICOTOXINAS

Micotoxinas são metabólitos secundários de efeito tóxico quando ingeridas, inaladas ou absorvidas cutaneamente, resultantes do metabolismo de alguns fungos filamentosos que proliferam em produtos de origem vegetal como plantas, alimentos e rações animais produzidos a base de grãos (ZAIN, 2011). Dentre seus efeitos tóxicos destacam-se: carcinogenicidade, teratogenicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, imunotoxicidade e neurotoxicidade (ASHIQ et al., 2014).

Essas toxinas são produzidas, na medida em que o fungo atinge sua maturidade e podem estar contidas nos esporos e micélios, ou ainda serem excretadas como exotoxinas no substrato de crescimento (PITT, 2000).

De acordo com BRYDEN, (2012), existem cerca de 300 compostos classificados como micotoxinas e as mais descritas são as aflatoxinas, ocratoxinas, citrinina, fumonisinas, zearalenona, patulina e os alcalóides do Ergot produzidas principalmente por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* e *Fusarium*.

BENNET e KLICH (2003) destacam que todas as micotoxinas são de origem fúngica, entretanto, nem todos os compostos tóxicos produzidos por fungos são chamados de micotoxinas. Deve-se considerar o alvo e a concentração do metabólito conforme temos atualmente os antibióticos (como a Penicilina) e as fitotoxinas. Segundo RICHARD (2007) para que uma substância seja classificada como micotoxina, esta deve satisfazer os seguintes critérios: ser causadora de doença em homens ou animais, ocorrer na natureza, ser produzida por fungo e ser aguda ou cronicamente tóxica.

De acordo com VIVAN (2002), apenas alguns fungos filamentosos são capazes de produzir micotoxinas e aqueles que as produzem, em geral, só sintetizam tipos particulares. Além disso, a produção de toxina depende de uma combinação de fatores físicos (umidade, umidade relativa, temperatura e danos mecânicos), fatores químicos (pH, dióxido de carbono, oxigênio, composição do substrato, pesticidas e fungicidas) e fatores biológicos (susceptibilidade vegetal, estresse, insetos, carga de esporos) (BRYDEN, 2012). Muitos desses fatores aparecem durante a colheita, o processamento, a conservação e o armazenamento de alimentos, insumos e plantas medicinais (BETINA, 1984; BUGNO et al., 2006).

Lesões mecânicas, provocadas por insetos ou geradas durante o processamento, tornam estes produtos muito susceptíveis à proliferação dos fungos micotoxigênicos, e uma vez inseridos na dieta humana e animal, estes podem levar à intoxicação direta pelas micotoxinas (BENNET; KLICH, 2003). Assim, a atividade tóxica das micotoxinas podem persistir por um longo período mesmo após o desaparecimento dos fungos que as originaram não alterando sua aparência o que dificulta a restrição ao consumo (BRAGULAT et al., 2008).

A contaminação por micotoxinas pode ocorrer de forma direta ou indireta. Na contaminação direta o alimento é colonizado pelo fungo produtor da micotoxina e indireta ocorre quando um ingrediente previamente contaminado é adicionado na formulação. A

contaminação dos produtos por fungos micotoxigênicos pode ocorrer durante etapas de cultivo, processamento, transporte e armazenamento (FREIRE et al., 2007).

Devido à toxicidade, a presença das micotoxinas despertou grande preocupação desde 1960 quando foram reconhecidas como compostos perigosos e como potencial ameaça para a saúde humana e animal, além de provocarem perdas econômicas devido à deterioração dos alimentos e baixo ganho de peso pelos animais (BETINA, 1984; FREIRE et al., 2007).

Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2004) a presença das micotoxinas nos mais variados produtos é motivo de preocupação para a indústria alimentícia, farmacêutica e biotecnológica além do grande risco à saúde pública, não apenas pelo fato de reduzir o efeito nutritivo e terapêutico destes, mas também pelos efeitos tóxicos causados em seres humanos e animais.

Ainda de acordo com a FAO são significativas as perdas econômicas associadas ao seu impacto na saúde humana, produtividade animal e tanto o comércio nacional e internacional. Estima-se que 25% das culturas de alimentos do mundo, incluindo muitos alimentos básicos, são afetados por fungos produtores de micotoxinas e as perdas globais de alimentos devido à micotoxinas estão na ordem de 1000 milhões de toneladas por ano (FAO, 2015).

Devidos aos efeitos nocivos causados pelas micotoxinas à saúde humana e animais muitos países estabeleceram regulamentos para estas substâncias com o objetivo de preservar a saúde e os interesses econômicos, tomados como base para o estabelecimento de limites e regulamentos para micotoxinas. Neste sentido, a crescente preocupação dos países importadores frente à presença de micotoxinas tem levado à elaboração de legislações cada vez mais rígidas aos limites máximos permitidos (VIVAN, 2002).

O clima dos países tropicais como o Brasil (temperatura e umidade elevadas) favorece a proliferação de fungos nos produtos, determinando altos teores de micotoxinas naqueles provenientes dessas regiões. Isso pode ocasionar sérios reflexos para a economia dos países que, a exemplo do Brasil, mantêm o equilíbrio de sua balança comercial baseado na exportação de grandes quantidades de grãos (VIVAN, 2002).

Os limites estabelecidos variam de acordo com o tipo de toxina e produto. Os dados mais atuais fornecidos pela FAO apontam que em 2003, cerca de 100 países mantinham legislação para regulamentar os limites de micotoxinas em alimentos, rações e insumos (FAO, 2004).

A doença causada pela exposição às micotoxinas, denominadas micotoxicoses, podem ser classificadas em crônicas e agudas e dependem basicamente do tipo de micotoxina, da

duração da exposição, da idade e do sexo do indivíduo (BENNETT; KLICH, 2003). A maioria ocorre após o consumo de micotoxinas presente em produtos contaminados, entretanto, outras vias de exposição podem existir como a absorção cutânea. Seus efeitos sobre a saúde humana e animal podem envolver danos carcinogênicos, nefrotóxicos, hepatotóxicos e mutagênicos (PITT, 2000).

A investigação sobre a presença de micotoxinas tem sido realizada por muitos pesquisadores que buscam através de diferentes métodos de detecção e quantificação em variadas matrizes, reforçar o alerta sobre a presença das micotoxinas nos produtos para ingestão humana e animal. Além disso, é importante destacar a necessidade de se implementar os processos de fiscalização das condições de cultivo e estocagem (BUGNO et al., 2006).

As plantas medicinais comercializadas na forma de extratos padronizados ou partes secas além de outros produtos *in natura* podem representar uma porta de entrada para micotoxinas. As condições de estocagem não controladas favorecem a proliferação de fungos com potencial toxigênico, acarretando em um perigo imperceptível ao consumidor (BUGNO et al., 2006). Sob este aspecto ASHIK e colaboradores (2014) abordam em uma ampla revisão sobre as plantas medicinais contaminadas por fungos e suas micotoxinas, que o uso destas ervas tem crescido progressivamente nos últimos anos e que há um risco iminente para a saúde pública. Os autores afirmam ainda que durante a colheita, manipulação, armazenagem e distribuição, as plantas medicinais são submetidas à contaminação por vários fungos, que podem levar à deterioração e produção de micotoxinas. No entanto, destaca-se que em países como o Japão, onde o alto consumo de determinado produto determina uma fiscalização mais eficaz e as normas de cultivo e estocagem são seguidas. Dessa forma, pode-se obter produtos como arroz livre em sua totalidade de micotoxinas (TANAKA et al., 2007).

Apesar da toxicidade apresentada pelas micotoxinas, algumas destas possuem propriedades farmacológicas valiosas e são utilizadas pelo homem na medicina. Por exemplo, a diidroergotamina e metilergonovina são alcalóides do ergot produzidos pelo fungo *Claviceps purpurea*, e são utilizadas no tratamento de enxaquecas e no controle de hemorragias pós-parto respectivamente por induzirem a contração da musculatura lisa (BENNETT; KLICH, 2003).

Das micotoxinas comumente encontradas em produtos farmacêutico, alimentício e animal a ocratoxina merece destaque pela grande incidência e efeitos tóxicos crônicos sobre humanos e animais. A principal via de exposição é a ingestão direta de produtos contaminados, entretanto, a exposição dérmica e inalatória são vias importantes a serem consideradas (BENNETT; KLICH, 2003).

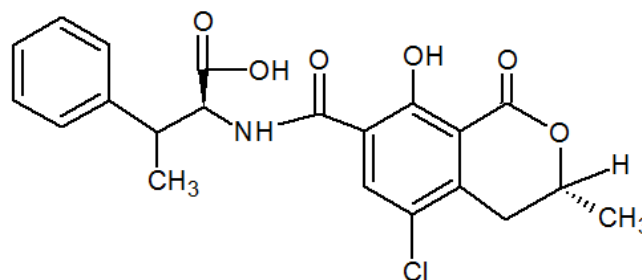
2.6.1 Ocratoxina A

O grupo de metabólitos fúngicos denominado como ocratoxinas compreende três substâncias chamadas de ocratoxina A (OTA), ocratoxina B (OTB) e ocratoxina C (OTC) que, embora sejam de estruturas químicas semelhantes apresentam, ocorrência e toxicidade diferenciadas entre si. De acordo com Marin e colaboradores (2013) a OTA, é considerada a mais tóxica delas, possuindo efeitos carcinogênicos, nefrotóxicos e imunossupressores ao passo que a OTB é cerca de 20 vezes menos tóxica do que a OTA, enquanto que a OTC é considerada pouco tóxica.

Ocratoxina A é o principal composto encontrado como contaminante natural de plantas e alimentos. E por ser termoestável, não é destruída pelos procedimentos comuns de preparo de alimentos. Temperaturas acima de 250°C durante vários minutos são necessários para reduzir a concentração desta toxina (MARIN et al., 2013).

Sua estrutura química é constituída por uma di-idroisocumarina ligada pelo grupo 7-carboxil a uma molécula de L-β-Fenilalanina, através de uma ligação amida e seu nome químico é (R)-N-((5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirano-7-il)carbonil)-L-fenilalanina (CODEX ALIMENTARIUS, 1999) (Figura 6). Possui caráter ácido e dois grupos ionizáveis que influenciam diretamente sua absorção, e conseqüentemente, sua distribuição para todos os tecidos. O grupo carboxílico (pKa ~ 4) da fenilalanina favorece a absorção da OTA pelo estômago. Em seguida, o grupo hidroxila (pKa ~7) do anel di-idroisocumarina favorece sua absorção intestinal. Após entrar na circulação sanguínea, pode ligar-se à proteínas do plasma, principalmente a albumina, e a outras macromoléculas (PFOHL-LESZKOWICZ et al., 2007).

Figura 6- Estrutura química: Ocratoxina A



FONTE: Elaborado pelo próprio autor

É uma micotoxina amplamente estudada devido à sua alta incidência como contaminante em diferentes produtos tais como extratos secos de plantas, uvas, cereais, café, cacau, nozes e especiarias, bem como os alimentos e produtos processados a partir destas matérias-primas (VETORAZZI et al., 2013). OTA foi isolada primeiramente em 1965 a partir de uma cultura sul africana do fungo *Aspergillus ochraceus*, por Van Der Merwe e colaboradores e classificada como substância tóxica pouco tempo depois (VAN DER MERWE et al., 1965). Posteriormente, observou-se também, que muitas outras espécies do mesmo Filo como de *Penicillium* produzem essa toxina (CODEX ALIMENTARIUS, 1998; MARIN et al., 2013).

De acordo com Pfohl-leszkowicz e colaboradores (2007), as condições de temperatura e umidade favoráveis resultam na produção da micotoxina pelos fungos que colonizam produtos sendo que espécies de *Aspergillus* são favorecidas por clima tropical enquanto que espécies de *Penicillium* por climas temperados ou frios. Desta forma, a presença em produtos como grãos, frutas como a uva e seus derivados, além de plantas medicinais é amplamente descrita (BUGNO et al., 2006; BATISTA et al., 2009).

Com relação aos seus efeitos tóxicos, OTA tem seu principal alvo de ação nos rins seguido do fígado além de efeitos imunotóxicos, carcinogênicos e teratogênicos (BENNET; KLICH, 2003; BRAGULART et al., 2008). Os efeitos nefrotóxicos estão relacionados com a formação de complexos de ferro produzindo radicais hidroxila, os quais promovem liperperoxidação. O dano renal é morfológicamente caracterizado por atrofia do túbulo proximal, fibrose e esclerose e funcionalmente por incapacidade da função tubular (BENNETT; KLICH, 2003).

Como é estruturalmente semelhante ao aminoácido fenilalanina (seu precursor na rota biossintética) possui efeito inibidor sobre um número de enzimas que utilizam este aminoácido como um substrato, em particular, Phe-ARNt-sintetase, que pode resultar na inibição da síntese de proteínas. Ao nível mitocondrial, causa stress oxidativo, liperperoxidação, interfere com a fosforilação oxidativa além de aumentar a apoptose em diversos tipos de células (MARIN et al., 2013).

De acordo com dados fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2001) de estudos de toxicidade aguda, valores de dose letal em 50% dos animais (DL₅₀) de OTA podem ser muito variáveis, dependendo da espécie e da via de administração. Assim, cães e porcos parecem ser muito sensíveis com DL₅₀ oral de 0,2 e 1,0 mg/kg de peso corporal, respectivamente. Para frangos o mesmo parâmetro é de 3,3 mg/kg e em ratos aumenta para 20-58 mg/kg de peso corporal (OMS, 2001).

Alguns países, principalmente da Europa, possuem regulamentos que regem a concentração de OTA na alimentação humana e animal com doses máximas permitidas de acordo com o tipo de produto (AMÉZQUETA et al., 2009). O comitê JECFA, uma junção de esforços da FAO e OMS (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA*) recomendou uma dose semanal admissível de OTA de 100 ng/kg de peso corporal, correspondente a cerca de 14 ng/kg de peso corporal por dia (FAO, 2004).

Considerando a importância de protótipos naturais ativos e visto que diferentes óleos essenciais podem apresentar uma grande variedade de atividades biológicas, com destaque à inibição do crescimento de micro-organismos, a investigação da ação contra fungos micotoxigênicos se mostra promissora. Além disso, a atividade antiocrotogênica ainda é pouco investigada.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as ações antifúngica e antiocrotogênica dos óleos essenciais extraídos de *Rosmarinus officinallis* L. e *Piper aduncum* L. sobre a espécie fúngica *Aspergillus carbonarius* como forma de garantir a qualidade de produtos de origem alimentícia e medicinal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a extração dos óleos essenciais das espécies vegetais *Rosmarinus officinallis* L. e *Piper aduncum* L. por hidrodestilação em aparelho de Clevenger
- Determinar o perfil químico dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinallis* L. e *Piper aduncum* L. por cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.
- Avaliar a ação antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais sobre o crescimento de *Aspergillus carbonarius* CDCA 0126
- Avaliar o efeito *in vitro* dos óleos essenciais sobre a produção de ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius* CDCA 0126

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS VEGETAIS

Foram avaliados dois óleos essenciais (OEs) (Tabela 2) de espécies vegetais com atividade antifúngica descrita na literatura científica e disponíveis no Horto da Faculdade de Farmácia da UFJF. As espécies vegetais avaliadas possuem as respectivas exsiccatas depositadas no Herbário Leopoldo Krieger da UFJF e foram identificadas pela Dra. Fátima Gonçalves Salimena.

Tabela 2 - Material vegetal utilizado na obtenção dos óleos essenciais (OE)

Nome científico	Nome popular	
<i>Rosmarinus officinallis</i>	Alecrim-da-horta, alecrim-de-jardim	48253
<i>Piper aduncum</i>	Jaborandi-falso, pimenta-de-macaco	59018

FONTE: Próprio autor

4.2 MATERIAIS

4.2.1 EQUIPAMENTOS

Refrigerador (Brastemp), ultrafreezer (Thermo Cientific Modelo: 88400063), capela de fluxo laminar vertical (Labconco), Incubadora B.O.D (Solab), autoclav e (Eletrolab), microscópio óptico (Bioval), aparelho de Clevenger, manta aquecedora (Marconi), capela de exaustão (Union), cromatovisor com lâmpada UV -254 e 366nm (Camag UF-Betracher), balança de precisão analítica (Marte Modelo-AY220), balança de precisão semi-analítica (Marte Modelo-BL320H),paquímetro (Lee Tools), Microondas (Consul), cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas QP2010Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e demais componentes, cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector UV e demais componentes (Shimadzu).

4.2.2 VIDRARIAS E MATERIAIS

Placas de Petri 9 e 15cm de diâmetro, pinça, palitos de madeira, espátula, alça de Drigalski, gaze (Nexcare), vials, hemocitômetro (câmara de Neubauer) (Optik Labor 0,100mm), lamínula, béquer, ponteiros de 10uL e 1000uL, pipetas automáticas de 10-1000uL, balão de

fundo redondo com capacidade para 2000mL, frascos de vidro âmbar pequenos, bastão de vidro, cromatofolhas de sílica gel 60 GF₂₅₄ para CCD 20x20 (Whatman), Cuba cromatográfica, microseringas, membrana para filtração de 20µm (Millipore).

4.2.3 REAGENTES E PADRÕES

Sulfato de sódio anidro (Impex), tolueno (Synth), acetato de etila (Synth), metanol reagente e grau HPLC (Merck), acetonitrila grau HPLC (Panreac), ácido acético grau HPLC (Panreac), ácido fórmico (Synth), tween 80 (Synth), dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth), água purificada, hexano grau espectroscópico (Mallinkrodt), ocratoxina (OTA) padrão primário (Sigma-aldrich), mistura de padrões de hidrocarbonetos C8-C20; padrão de fludioxonil suspensão comercial 5µL/10mL (Syngenta).

4.2.4 MEIOS DE CULTURA

- Ágar Czapek Yeast Autolysate (CYA): K₂HPO₄ (1,0g), concentrado de Czapeck (10,0mL), solução metálica (1,0mL), Extrato de levedura (5,0g), ágar (15,0g), sacarose (30,0g) e água destilada qsp 1000mL.
- Ágar MEA (Extrato de malte com Glicose): Extrato de Malte (20,0g), peptona (1,0g), Glicose (20,0g), ágar (20,0), água destilada q.s.p. 1000mL.

Os componentes dos meios de cultura MEA e CYA foram pesados separadamente de acordo com a proporção de volume para cada ensaio, homogeneizados e autoclavados a 121°C por 15 minutos.

4.3 MICRO-ORGANISMOS

Isolado fúngico *Aspergillus carbonarius* CDCA 0126 produtor de OTA pertencente à Coleção do Departamento de Ciências dos Alimentos (CDCA) da Universidade Federal de Lavras-MG (UFLA).

4.3.1 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DA ESPÉCIE FÚNGICA

A identificação morfológica macro e microscópica de *A.carbonarius* foi realizada pela equipe do professor Dr. Luís Roberto Batista, responsável pelo Núcleo de Estudos em Taxonomia Polifásica de *Aspergillus* e *Penicillium* (NETAX) do laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos - DCA-UFLA. O método utilizado para identificação foi baseado em KLICH (2002). Após identificação a cepa foi depositada na Coleção de Cultura do Departamento de Ciência dos Alimentos (CDCA) da Universidade Federal de Lavras-MG com o código CDCA 0126.

4.4 ATIVAÇÃO DA CEPA

Para ativação, um criotubo contendo discos de papéis impregnados da cepa congelada foi retirado do ultrafreezer e, após 24 horas, dentro da capela de fluxo laminar e com pinça estéril, foi retirado 1 disco de papel de filtro. Em seguida, o mesmo foi raspado com palitos de madeira estéreis sob três placas de Petri previamente preparada com o meio de cultura MEA. As placas foram incubadas a 25°C por 7 dias.

4.5 ANÁLISE QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A (OTA)

A produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* foi avaliada previamente pela equipe do NETAX da Universidade Federal de Lavras - MG (UFLA) para depósito na coleção e repetida antes do teste de sensibilidade fúngica aos óleos essenciais. A análise foi realizada de acordo com o método do plug ágar em cromatografia de camada delgada (CCD) descrito por FILTERBORG e FRISVARD (1980), citado por BRAGULAT et al., (2001) e PASSAMANI et al., (2014) como descrita a seguir:.

Após crescimento em ágar CYA por 10 dias, foram retirados três cilindros centrais da colônia de *A.carbonarius* com auxílio de ponteira de 1000uL e agulha microbiológica. Os plugs foram colocados em contato com a cromatoplaça de sílica gel 60 F₂₅₄ em pontos equidistantes de 1,5cm até que o fragmento tenha umedecido a placa. Foi aplicado no centro da cromatoplaça, 10uL da solução padrão de OTA a 199, 87µg/mL. As placas foram transferidas para cuba cromatográfica com 200,0mL da fase móvel composta por tolueno: acetato de Etila: ácido fórmico (60:30:10). Após eluição, a placa foi colocada para secagem em capela de exaustão. A confirmação da produção de OTA foi feita pela leitura da placa em cromatovisor sob luz UV (λ 366nm).

4.6 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

O inóculo foi preparado de acordo com o método descrito por Passamani e colaboradores (2014) com adaptações para uma contagem final de 10^4 esporos por mL: Cerca de 30,0mL de água estéril com 0,1% de tween 80 foram transferidos para a placa de petri com a colônia isolada, seguida de raspagem com alça de Drigalski estéril para coleta dos esporos. A suspensão formada foi homogeneizada, filtrada em gaze estéril e 10 μ L foram transferidos para câmara de Neubauer a fim de se efetivar a contagem em microscópio.

4.7 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS VEGETAIS E DOS ÓLEOS ESSENCIAIS (OES)

Os materiais vegetais foram coletados no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia da UFJF em dias amenos e no início da manhã. As folhas foram separadas do caule e inflorescências e selecionadas quanto à sua homogeneidade e sanidade.

A extração dos óleos essenciais (OEs) foi realizada no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFJF. Os OEs foram obtidos por hidrodestilação acoplada ao aparelho de Clevenger conforme metodologia da Farmacopéia Brasileira com adaptações (BRASIL, 2010). A coleta e o processo de extração foram realizados no mesmo dia.

Cerca de 200g de folhas frescas e previamente selecionadas de cada uma das amostras, foram pesadas em balança semi-analítica, trituradas manualmente e transferidas para o balão de fundo redondo. Foram adicionados ao balão, aproximadamente 1000mL de água recém-purificada, sendo então, mantido em manta aquecedora em constante ebulição por 2 horas. Ao final do processo, o óleo foi recolhido cuidadosamente com micropipeta e os possíveis traços de água foram retirados com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Os OEs foram pesados em balança analítica de precisão, respectivamente identificados *R. officinallis* L. (OE1Ro) e *Piper aduncum* L. (OE2Pa) e armazenados em frascos âmbar e sob refrigeração a 4°C até o momento da análise.

4.8 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS OES POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

A constituição química das amostras de OEs das folhas de *R.officinallis* (OE1Ro) e *P. aducum* (OE2Pa) foi determinada por cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) realizada o Núcleo de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade

de Franca, sob a supervisão do Prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti. As análises foram realizadas em aparelho Shimadzu QP2010Plus, equipado com injetor automático AOC-20i, fonte de ionização por elétrons (EI-EM) e analisador quadrupolar do tipo filtro de massas. Para a dissolução da amostra foi utilizado hexano grau espectroscópico. A identificação dos constituintes químicos de OE1Ro e OE2Pa foi realizada com base na metodologia estabelecida por ADAMS (1995) conforme descrito a seguir.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna capilar Rtx5-MS (Restek) de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25 µm de filme), composta de 5% de difenilsiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano. Foi utilizado hélio (99,999%) como gás de arraste, a um fluxo constante de 1,0 mL/min. A temperatura do injetor foi de 240°C e o volume de injeção foi de 0,1 µL. A temperatura do forno foi programada de 60°C a 240°C a uma velocidade de 3°C/min. Para a padronização dos tempos de retenção foi adicionada às amostras de óleos essenciais uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos (C₈ a C₂₀).

Os índices de retenção (IR) foram calculados de acordo com a fórmula 1, proposta por DOOL e KRATZ (1963).

$$\mathbf{IR = 100n + 100 (tx - tn) / (tn + 1 - tn)} \text{ (Fórmula 1)}$$

Onde **n** é o número de carbonos do primeiro hidrocarboneto da mistura de padrões cujo tempo de retenção **tn** é imediatamente menor que o tempo de retenção **tx** do constituinte do óleo essencial, e **tn+1** é o tempo de retenção do hidrocarboneto da mistura de padrões imediatamente maior. Os valores de IR obtidos foram comparados com os da literatura.

A amostra eluída da coluna cromatográfica foi direcionada pelo divisor de fluxo para a fonte de ionização, na razão de 1:20. A temperatura da fonte foi ajustada em 280°C e a energia do feixe de elétrons foi de 70 eV. O analisador foi controlado para separar íons de *m/z* entre 40 e 600. O índice de retenção utilizado foi o índice de Kovats e os valores de IR obtidos foram comparados com os da literatura.

Os espectros de massas obtidos foram comparados com os das bibliotecas Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2 através do software GCMS Solution (Shimadzu, Japão), que forneceu o índice de similaridade (IS), expresso em porcentagem. A identificação de cada constituinte químico presente no óleo essencial foi feita com base na combinação entre os valores de IR e de IS. As porcentagens de cada constituinte químico nos óleos essenciais foram estimadas a partir das áreas dos picos, obtidas por normalização.

4.9 EFEITO INIBITÓRIO SOBRE FUNGOS E ATIVIDADE ANTIOCRATOXIGÊNICA

4.9.1 Triagem da ação antifúngica dos OE de *R.officinallis* L. e *P.aduncum* L.

O efeito inibitório sobre a cepa fúngica foi avaliado pelos métodos da difusão em disco e diluição em ágar padronizado pela *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (CLSI), aceito pela *Food and Drug Administration* (FDA) e descritos por EFSTRATIOU et al., (2012); GOMES et al., (2014); OSTROSKY et al., (2008); SILVA et al., 2012; VIUDA-MARTOS et al., (2007).

Foi preparada em microtubo, uma solução-estoque de cada OE a 50% (v/v) em DMSO. A partir desta, foram preparadas as diluições seriadas nas seguintes concentrações (v/v): 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81 e 3,9 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Uma alíquota 200 μL do inóculo fúngico, foi espalhada com alça de Drigalski em uma triplicata (para cada OE) de placas de petri de 15cm contendo 40mL de ágar CYA pela técnica de espalhamento em superfície. Após absorção, foram distribuídos 10 discos de papel de filtro de 6mm de diâmetro (esterilizados) na superfície de cada uma das placas com auxílio de pinça estéril. Sobre cada disco foram aplicados 10 μL de cada concentração. A disposição dos discos foi feita de forma que sua distância até a lateral da placa seja maior que 15 mm e de modo a não sobrepor as zonas de inibição.

O controle negativo de inibição foi avaliado com uso de 10 μL do solvente dimetilsulfóxido (DMSO), levando-se em consideração os aspectos de solubilidade e de atoxicidade aos micro-organismos e como controle positivo de inibição foi empregado o fungicida Fludioxonil (10 μL) na concentração comercial de 10 $\mu\text{L}/5\text{mL}$ (MALANDRAKIS et al., 2013).

As placas foram incubadas em B.O.D. a 25°C por 72 horas. Após o período de incubação, o halo de inibição foi medido diametralmente com paquímetro digital até o limite onde houve crescimento da colônia do fungo. Foram realizadas duas medidas opostas. O ensaio foi realizado em triplicata e a menor concentração de OE capaz de inibir o crescimento fúngico, foi utilizada para dar prosseguimento ao teste de impacto sobre o crescimento micelial no qual se conseguiu visualizar halo de inibição, sendo considerada a mínima inibitória.

4.9.2. Efeito sobre o crescimento micelial

A partir da menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico, determinada na etapa da difusão em disco, foi realizada, para cada OE. A avaliação do impacto sobre o crescimento micelial foi feito de acordo com método bioanalítico *in vitro* descrito por VIUDA-MATOS (2008) e SILVA et al., (2012).

De acordo com a concentração definida no ensaio de difusão em disco, os OEs foram adicionados proporcionalmente a cada uma das placas de Petri que em seguida receberam 20,0mL do meio de cultura CYA previamente esterilizado e resfriado (a aproximadamente 45°C). Essas placas foram intensamente homogeneizadas e, após solidificação do meio, foram adicionados 10µL do inóculo padronizado de fungos no centro da placa seguida de incubação à 25°C por 10 dias. O ensaio foi realizado em triplicata para cada OE sobre a espécie fúngica e o controle positivo de crescimento foi avaliado com uma triplicata de placas contendo o meio e o inóculo fúngico. O controle negativo de contaminação do óleo foi avaliado com uma triplicata de placas contendo o meio e o óleo.

O crescimento micelial dos fungos foi avaliado diariamente com duas medidas diametrais opostas de cada colônia em cada placa. Os valores foram expressos em milímetros de diâmetro/dia. Os dados foram transformados em porcentagem de inibição micelial de acordo com a seguinte fórmula 2:

$$I(\%) = 100 - (R * 100 / T) \text{ (Fórmula 2)}$$

Onde: **I** – porcentagem de inibição; **R** – diâmetro médio das colônias do fungo na presença dos OE e **T** – diâmetro médio da colônia crescida na ausência dos OEs.

4.9.3 Avaliação da ação antiocratoxigênica

A capacidade dos OEs em afetar e/ou inibir a produção de OTA foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo método descrito por Bragulat e colaboradores (2001); Passamani e colaboradores (2014). As análises foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras - UFLA.

A extração de OTA foi realizada no 10º dia de incubação das placas utilizadas para o ensaio de crescimento micelial seguindo a metodologia de extração descrita no item 4.9 referente à análise qualitativa de OTA (FILTERBORG; FRISVARD (1980)). Foram

retirados, no 10º dia de crescimento, três plugs de cada colônia da triplicata crescida em meio CYA e neste acrescido dos óleos essenciais.

Os mesmos foram pesados e transferidos para tubos de ensaio com tampa de rosca que receberam 1,0mL de metanol grau HPLC. Os tubos foram homogeneizados vigorosamente por 5 segundos e mantidos a 25°C por 60 minutos sob agitação de 80 r.p.m.. Em seguida, o conteúdo foi filtrado para microtubos em unidades filtrantes de membrana (0,20 µm) e levados para análise no cromatógrafo líquido de alta eficiência. O controle positivo de produção de OTA, foi avaliado com uma triplicata de placas inoculadas com 10 µL do inóculo fúngico de cada espécie contendo o meio CYA sem a presença de OE.

A análise cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo Shimadzu acoplado à bomba binária de alta pressão (Modelo: SPD-M20A), desgaseificador (DGU 20A3), interface CBM-20A, injetor automático SIL-10AF e detector de fluorescência RF-10. Uma coluna Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 de fase reversa (4,6 por 250mm, 5mm) acoplada a pré-coluna (4,6 por 12,5mm, 5mm) de mesmo modelo foram utilizadas para as análises. As condições cromatográficas utilizadas foram comprimento de onda para excitação de 332nm e 476nm para emissão; volume injetado de 20µL das amostras e do padrão, fluxo de 0,8mL/min⁻¹. A eluição foi conduzida em sistema isocrático da fase móvel composta pelos solventes Metanol: Acetonitrila: Água: Ácido Acético (35:35:29:1).

Para o preparo da curva padrão utilizou-se uma solução estoque previamente preparada, dissolvendo-se o padrão comercial de OTA (O1877, Sigma) em tolueno/ácido acético (99:1, v/v). A concentração da solução estoque foi determinada por medição da absorbância UV a 333 nm e calculada segundo AOAC (HORWITZ, 2002) em 136% de OTA.

Após a determinação da concentração da solução estoque, foram preparadas, por diluição, soluções padrão com concentrações de 0,001; 0,01; 0,025; 0,1 e 0,15 µg/g, que foram analisadas por HPLC. A detecção de OTA nas amostras foi feita por meio de comparação do tempo de retenção do padrão nas diferentes concentrações (0,001; 0,01; 0,025; 0,1 e 0,15 µg/g).

A quantificação da OTA nas amostras foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear ($y = 1,11756 \times 10^7 x = 2592,1485$; onde, y = área do pico e x = concentração de OTA), correlacionando a área do pico versus a concentração da respectiva solução padrão, sendo que o coeficiente de determinação (r^2) obtido foi de 0,9999. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados por meio dos parâmetros obtidos para a curva analítica construída. Para estes, foram encontrados os valores de 0,4 e 1,6

ng/g, respectivamente. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. O tempo de retenção médio obtido para OTA foi de $11 \pm 0,1$ min.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

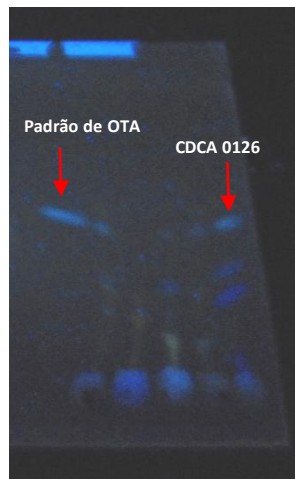
O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com três repetições sendo os tratamentos avaliados individualmente por análise de variância e comparados por teste de Tukey a 5% de significância (MEAD; CURNOW, 1983). Todas as análises foram realizadas no software SISVAR versão 5.3. (FERREIRA, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A (OTA)

O isolado *A.carbonarius* CDCA 0126 considerado produtor de OTA apresentou um RF (fator de retenção) e um spot de fluorescência semelhante ao do padrão da ocratoxina A (Figura 7).

Figura 7 - Placa de Cromatografia em camada delgada com a detecção da OTA



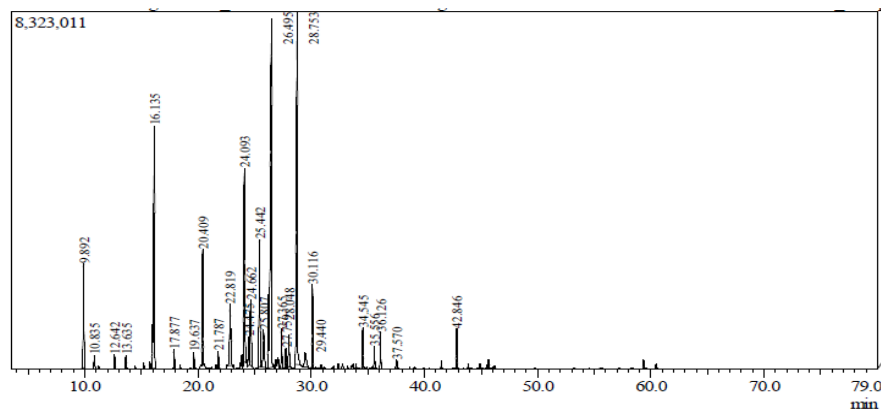
FONTE: Laboratório de micologia e micotoxinas da UFLA.

5.2 PERFIL QUÍMICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

5.2.1 Óleo de *R. officinallis* L.

O óleo de *R. officinallis* teve um rendimento (com base na massa de folhas frescas) de 0,85% (p/p). As análises por CG-EM forneceu o perfil cromatográfico do óleo OE1Ro apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Cromatograma de CG-EM do óleo essencial de *R.officinallis* L.



FONTE: Núcleo de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade de Franca.

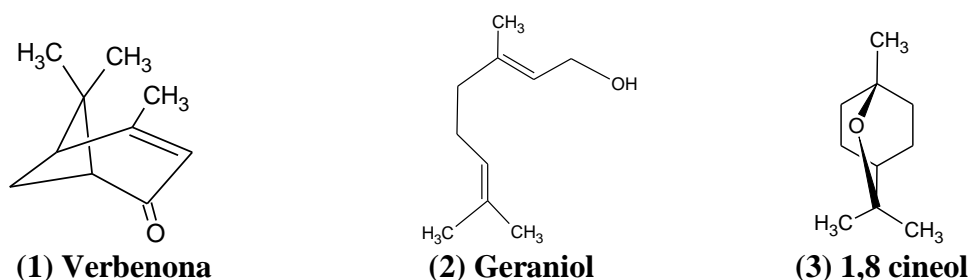
Tabela 3- Composição química do óleo essencial de *R. officinallis* L. (OE1Ro)

Nome do composto	IR _C	IR _L	%	IS	Tempo de retenção	Método de Identificação
Monoterpenos						
α -Pineno	933	930	4,01	98	9,892	IR, EM
Canfeno	947	945	0,51	94	10,385	IR, EM
β -Pineno	976	974	0,53	96	12,642	IR, EM
Mirceno	992	989	0,49	96	13,635	IR, EM
1,8-cineol (3)	1032	1027	11,26	96	16,135	IR, EM
γ -Terpineno	1060	1055	0,69	96	17,877	IR, EM
Terpinoleno	1089	1090	0,56	94	19,637	IR, EM
β -Linalol	1102	1098	3,93	95	20,409	IR, EM
Crisantenona	1127	1128	0,64	93	21,787	IR, EM
Cânfora	1146	1142	3,68	95	22,819	IR, EM
Borneol	1169	1163	8,79	96	24,093	IR, EM
Cis Pinocanfona	1176	1175	0,88	95	24,475	IR, EM
4-Terpineol	1179	1179	2,27	94	24,662	IR, EM
α -Terpineol	1190	1189	5,49	94	25,442	IR, EM
Mirtenol	1200	1196	1,84	94	25,807	IR, EM
Verbenona (1)	1215	1218	24,61	95	26,495	IR, EM
α -Citronelol	1232	1233	1,27	94	27,283	IR, EM
Geraniol (2)	1261	1258	17,55	97	28,753	IR, EM
Geranial	1275	1277	0,99	95	29,440	IR, EM
Acetato de Isoborneol	1289	1285	2,78	95	30,116	IR, EM
Acetato de Geranil	1382	1383	1,37	95	34,545	IR, EM
Fenilpropanóides						
Eugenol	1410	1403	0,83	83	35,558	IR, EM
Sesquiterpenos						
Trans-cariofileno	1423	1419	1,19	92	36,126	IR, EM
α -Humuleno	1460	1467	0,33	92	27,567	IR, EM
óxido de cariofileno	1589	1581	1,34	93	42,842	IR, EM
Total de compostos identificados			97,83			

IR_C: índice de retenção calculado com referência à série de n- alcanos C₈-C₂₀ com a coluna Rtx5-MS ; **IR_L**: índice de retenção obtido da literatura (ADAMS, 1995); **%**: porcentagem de cada constituinte no óleo; **IS**: índice de similaridade; **Método de identificação**: **IR**: Comparação dos índices de retenção obtidos com os da literatura; **EM**: Comparação do espectro de massas com os das bibliotecas Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2.

Através da análise química, foi possível identificar 97,83% dos picos (Tabela 3 e Figura 9). Foram considerados majoritários para o óleo de *R.officinallis* L. (OE1Ro) os compostos verbenona (24,61%), geraniol (17,55%) e 1,8 cineol (11,26%). Foi observada ainda a presença de α -terpineol, α -pineno, β -linalol e cânfora como constituintes minoritários.

Figura 9 – Estrutura química dos componentes majoritários do óleo de *Rosmarinus officinallis* L.



FONTE: Elaborada pelo próprio autor.

Os resultados são condizentes com os obtidos por OKOH et al., (2010) que também obtiveram o monoterpênóide oxigenado verbenona como compostos majoritário nos óleos de *R. officinallis* obtidos por dois métodos diferentes de extração (23,79% e 17,43%). Um perfil químico semelhante foi observado por SACHHETI et al., (2005).

O composto 1,8-cineol foi majoritário no óleo de *R. officinallis* (52,2%), seguidos da cânfora (15,2%) e α -pineno (12,4%) (BONFIM et al., 2015). Outros trabalhos também relatam a presença das mesmas substâncias como majoritárias (BERNARDES et al., 2010; JIANG et al., 2011; STUPAR et al., 2014).

Essa variabilidade no rendimento e na composição de óleos essenciais está bem documentada na literatura científica e se deve à influência de fatores genéticos, climáticos geográficos, bem como, daqueles decorrentes do cultivo e processamento (KALEMBA; KUNICKA, 2003).

Uma avaliação da composição do óleo de seis amostras de duas variedades de *R. officinallis* provenientes de seis áreas geográficas diferentes foi realizada por Zaouali e colaboradores (2010). Os autores observaram que independente da variedade vegetal e da localização geográfica todas as amostras apresentaram como compostos majoritários 1,8-cineol e cânfora, embora com proporções distintas. De forma semelhante o efeito geográfico sobre a composição do óleo foi avaliado por Jordan e colaboradores (2013). Os resultados apontaram que o rendimento e o percentual dos voláteis avaliados podem alterar-se conforme a região de crescimento da planta.

Os óleos de *R. officinallis* obtidos por hidrodestilação e extração livre de solventes em micro-ondas foram avaliados frente ao perfil químico e como resultado, o rendimento e número de compostos isolados foram levemente diferenciados. Entretanto, no óleo obtido por extração em micro-ondas, prevaleceram os monoterpênos borneol, cânfora, 4-terpineol, linalol

e α -terpineol, enquanto na extração por hidrodestilação foram predominantes a verbenona, α -pineno, canfeno e 1,8-cineol (OKHO et al., 2010).

O composto majoritário de OE1Ro, verbenona, foi relatado na literatura como agente antibacteriano, antifúngica e larvicida (ANGIONI et al., 2004; BERNARDES et al., 2010; KYARIMPA et al, 2014; MEEPAGALA et al., 2003). Seu efeito como antiagregante plaquetário tem sido investigado para possível uso profilático de isquemias, já que deriva do verbenol, composto com forte ação anti-isquêmica (JU et al., 2013). A presença de verbenona é também descrita em outras espécies vegetais como *Tagetes minuta*, *Lallemantia royleana*, entretanto, não há relatos para outras espécies do gênero *Rosmarinus* (CAMILETTI et al, 2014; KYARIMPA et al, 2014).

O geraniol foi o segundo composto majoritário no óleo de *R. officinallis* L., sendo um álcool terpênico de ampla ocorrência em plantas aromáticas (MADANKUMAR et al., 2013) e devido a esta característica, é amplamente utilizado na indústria alimentícia como flavorizante e odorizante. Acerca de suas propriedades biológicas, há estudos que lhe conferem uma série de atividades biológicas como inseticida, repelente, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral em melanomas e hepatomas (CHEN;VILJOEN, 2010; LORENZI et al., 2009). Este composto é descrito também em outras espécies vegetais como *Cymbopogon martinii* (palmarosa) citada como sua fonte de obtenção natural, seguida de *Helichrysum italicum* (ANDRADE et al., 2014; LORENZI et al., 2009).

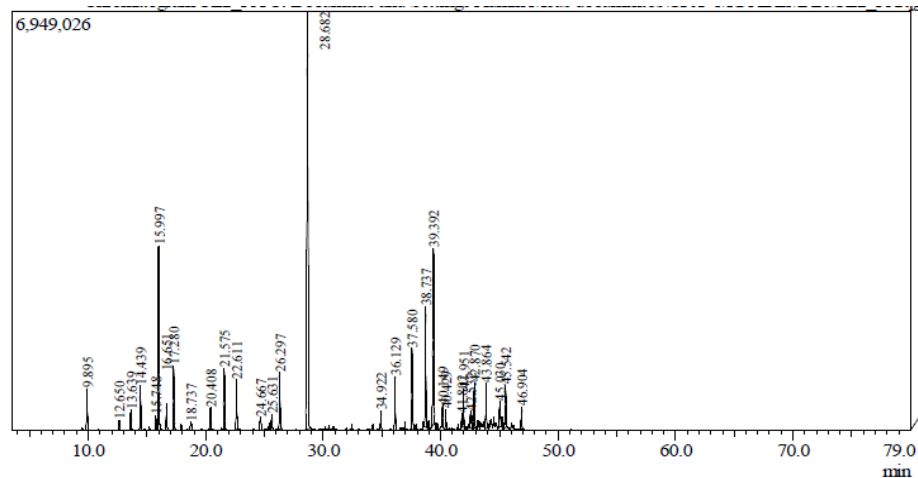
O composto 1,8 cineol também conhecido como eucaliptol, possui aplicação industrial como agente flavorizante, além de atividades farmacológicas como antioxidante, leishmanicida, antitussígena, anti-inflamatória, analgésica, citoprotetora e agente de reparo no DNA (CULAFIC et al., 2009; NIKOLIC et al., 2011).

Outras espécies vegetais como *Melaleuca linarrifolia* Sm. e *Lavandula angustifolia* são relatadas como fontes naturais do 1,8-cineol em seus óleos essenciais (MANTOVANI et al., 2013; PADDALIA et al, 2015).

5.2.2 Óleo de *P. aduncum* L.

O perfil cromatográfico do óleo de *P. aduncum* L. OE2Pa encontra-se na Figura 10. O óleo de *P. aduncum* L. teve um rendimento (com base na massa de folhas frescas) de 0,30% (p/p).

Figura 10 - Cromatograma de CG-EM do óleo essencial de *P. aduncum* L.

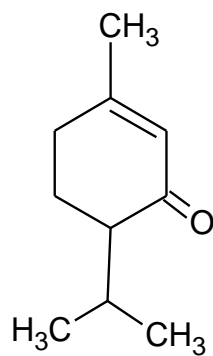


FONTE: Núcleo de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade de Franca.

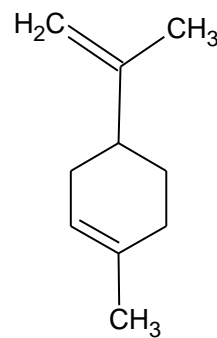
Foram identificados 98,94% dos compostos (Tabela 4 e Figura 11). Os monoterpênicos piperitona (28,17%) e limoneno (10,42%) foram majoritários. Além disso, foram identificados ainda como componentes minoritários o biciclogermacreno (9,68%), D-germacreno (5,78%), Trans β -ocimeno (3,34%), 1-terpineol (2,55%), e α -humuleno (3,82%).

Os resultados obtidos foram similares aos compostos majoritários identificados por Potzernheim e colaboradores (2012) que avaliaram o perfil químico do óleo essencial de quatro variedades de *P. aduncum* coletadas na região do Distrito Federal. Em duas variedades foram majoritários a piperitona (22,74 e 24,91%) e 4-terpineol (15,03 e 16,83%) ao passo que nas terceira e quarta variedades foram maiores as presenças de sarisan (15,8%) e dilapiol (46,95%) mantendo a presença secundária da piperitona, o que demonstra que as variações nas substâncias presentes nos óleos essenciais podem ocorrer na natureza.

Figura 11 – Estrutura química dos componentes majoritários do óleo de *Piper aduncum*.



(4) Piperitona



(5) Limoneno

FONTE: Elaborado pelo próprio autor.

Tabela 4 - Composição química do óleo essencial de *P. aduncum* L. (OE2Pa)

Composto	IR _C	IR _L	(%)	IS	Tempo de retenção	Método de Identificação
Monoterpenos						
α -Pinoeno	933	930	2,29	98	9,985	IR, EM
β -Pinoeno	976	974	0,42	96	12,525	IR, EM
Mirceno	992	989	1,10	97	13,517	IR, EM
α -Felandreno	1005	1002	2,34	98	14,439	IR, EM
β -Cimeno	1026	1020	0,72	94	15,748	IR, EM
Limoneno (5)	1030	1024	10,42	90	15,997	IR, EM
Cis- β -Ocimeno	1041	1041	1,30	97	16,651	IR, EM
Trans- β -Ocimeno	1051	1058	3,34	97	17,280	IR, EM
Trans-óxido de Linalol	1074	1098	0,40	96	18,737	IR, EM
β -Linalol	1102	1098	0,98	97	20,408	IR, EM
Trans-p-Met-2-en-1-ol	1123	1117	3,17	91	21,575	IR, EM
1-terpineol	1142	1141	2,55	88	22,611	IR, EM
4-Terpineol	1179	1179	0,65	92	24,667	IR, EM
trans-piperitol	1197	1207	0,78	91	25,631	IR, EM
Cis-piperitol	1211	1196	2,9	90	26,297	IR, EM
Piperitona (4)	1259	1258	28,17	96	28,682	IR, EM
Sesquiterpenos						
β -Elemeno	1395	1396	0,9	91	34,992	IR, EM
Trans-Cariofileno	1423	1420	2,61	92	36,129	IR, EM
α -Humuleno	1458	1455	3,82	94	37,580	IR, EM
D-germacreno	1486	1484	5,78	88	38,737	IR, EM
Biciclogermacreno	1502	1498	9,68	92	39,392	IR, EM
β - Diidroionona	1521	1438	1,09	83	40,149	IR, EM
α -muuruleno	1528	1523	0,91	82	40,429	IR, EM
γ -Elemeno	1564	1556	0,51	87	41,802	IR, EM
Nerolidol	1567	1564	1,73	94	41,951	IR, EM
D- Germacren-4-ol	1580	1576	1,28	87	42,532	IR, EM
óxido de cariofileno	1586	1582	2,68	90	42,870	IR, EM
Óxido de humuleno	1617	1610	2,03	85	43,864	IR, EM
Torreiol	1649	1642	1,81	80	45,030	IR, EM
α -cadinol	1663	1658	2,46	81	45,542	IR, EM
Total de compostos identificados			98,94			

IR_C: índice de retenção calculado com referência à série de n- alcanos C₈-C₂₀ com a coluna Rtx5-MS ; **IR_L**: índice de retenção obtido da literatura (ADAMS, 1995); **%**: porcentagem de cada constituinte no óleo; **IS**: índice de similaridade; **Método de identificação**: **IR**: Comparação dos índices de retenção obtidos com os da literatura; **EM**: Comparação do espectro de massas com os das bibliotecas Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2.

A avaliação do óleo essencial extraído das folhas, espigas e hastes das espécies *P. aduncum*, *P. arboreum* e *P. tuberculatum* demonstrou que a composição química nas três amostras foi similar com os monoterpenos α -pinoeno, mirceno, limoneno, e linalol além dos sesquiterpenos cariofileno, α -humuleno, D-germacreno e nerolidol. Para a espécie *P.*

aduncum foram majoritários o linalol (31,7%), biciclogermacreno (11,2%) e nerolidol (10,4%) (NAVICHIENE et al., 2006). Outros estudos nos quais foram obtidos como majoritários os dilapiol e a piperitona são descritos na literatura (BRAZÃO et al., 2014; GUERRINI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013).

Perfis químicos diferenciados são descritos em diferentes regiões do mundo como na Bolívia onde o constituinte principal é 1,8-cineol, no Panamá, *P. aduncum* rico em sesquiterpenos como β -cariofileno e aromadendreno e, finalmente, um quimiotipo encontrado na Américas, Sudeste Asiático e Oceania, onde é predominante dilapiol (GUERRINI et al. 2009).

Piperitona é um monoterpênóide presente também em diversas outras espécies vegetais como *Cymbopogon jawarancusa*, *Mentha longifolia* e *Mentha viridis* descrita com atividades antioxidante, citotóxica, antifúngica e antimicrobiana (DAR et al., 2011; MKADDEM et al., 2009).

Yaguchi e colaboradores (2009) descreveram a atividade antifúngica da piperitona isolada do óleo essencial das espécies vegetais *Matricaria recutita* e *Eucalyptus dives* sobre o fungo micotoxigênico *Fusarium graminearum* produtor de compostos do grupo dos tricotecenos. O composto foi ativo inibindo o crescimento micelial e conseqüentemente a produção do tricoteceno deoxinivalenol na concentração de 306 μ Molar.

O limoneno possui atividade antifúngica contra *Tricophyton rubum* descrita por CHEE et al., (2009).

5.3 EFEITO INIBITÓRIO SOBRE O FUNGO

5.3.1 Triagem da ação antifúngica dos OE de *R.officinallis* L. e *P.aduncum* L.

Os valores referentes à concentração dos óleos essenciais OE1Ro e OE2Pa capaz de inibir o crescimento fúngico de *A.carbonarius* CDCA 0126 utilizando a método da difusão em disco estão apresentados na Tabela 5. Nesta tabela é observado que o controle do solvente utilizado para solubilização dos OEs dimetilsulfóxido (DMSO) não forneceu inibição sobre o crescimento fúngico. Os resultados das médias dos halos obtidos com ambos os óleos e o controle positivo de inibição (fludioxonil) mostraram diferenças significativas $p < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Tabela 5 - Valores médios da zona de inibição (\emptyset mm \pm DP) de OE1Ro, OE2Pa sobre *Aspergillus carbonarius* CDCA 0126

Óleos essenciais	Concentrações (μ L/mL)								DMSO	Fludioxonil
	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,91		
OE1Ro	IT	IT	0,80 ^a \pm 0,00	NI	NI	NI	NI	NI	NI	1,22 ^b \pm 0,14
OE2Pa	IT	IT	0,75 ^a \pm 0,05	NI	NI	NI	NI	NI	NI	

IT: Inibição total do crescimento, não sendo possível visualização do halo; **NI:** Não houve inibição; **DMSO:** Dimetilsulfóxido (Controle do solvente); **OE1Ro:** Óleo essencial de *R.officinallis* L. e **OE2Pa:** Óleo essencial de *P.aducum* L.; Médias seguidas por letras diferentes na linha diferem entre si a 5% de significância pelo Teste de Tukey.

Embora, diferentes antimicrobianos sintéticos têm sido comercializados nos últimos anos para minimizar perdas, principalmente no setor agrícola, estes oferecem riscos não só toxicológicos aos seres humanos, mas também de desenvolvimento de resistência por micro-organismos. Assim, a otimização de métodos alternativos para o controle de pragas e doenças que produzam o mínimo de danos ao meio ambiente e à saúde humana com diferentes mecanismos de ação tem sido necessários (PASSONE et al., 2012).

A escolha do fungicida fludioxonil utilizado neste trabalho como controle positivo de inibição do fungo *A.carbonarius* deu-se com base no uso comum em culturas agrícolas e na sua ampla descrição em literatura científica, a qual apresenta o composto como um fenilpirrol e análogo sintético derivado da pirrolnitrina, antibiótico natural produzido por *Pseudomonas pyrociniae* (NISHIDA et al., 1965). Este fungicida é um dos mais utilizados recentemente e possui um amplo espectro contra as três principais classes de espécies fúngicas (Ascomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos) (HAMADA et al., 2011).

De acordo com MALANDRAKIS et al. (2013) o grupo dos fenilpirróis atuam sobre o sistema de sinalização responsável pela osmoregulação das células fúngicas, provocando sua morte. Estes autores avaliaram a ação antifúngica e antiocratoxigênica em diferentes cepas *A. carbonarius* e indicaram que o fungicida mais adequado para o combate à espécie fúngica, inclusive sobre cepas resistentes aos fungicidas mais comuns.

O desenvolvimento de resistência aos fungicidas típicos representa um grave problema que tem envolvido diversas espécies fúngicas, em especial, aquelas conhecidas como produtoras de micotoxinas (HAMADA et al., 2011). Atualmente, diferentes produtos vegetais têm sido formulados para a aplicação em grande escala no controle de contaminações de produtos como grãos, sementes e outros gêneros sob armazenamento (CALO et al., 2015).

Diante estas informações, a busca por substâncias que atuem como inibidoras do crescimento e da produção de micotoxinas se torna importante.

A análise do óleo de *R. officinallis* L. (OE1Ro) apresentou inibição do crescimento fúngico na concentração de 125µL/mL com percentual de inibição de 38,46%. Nas concentrações acima de 125µL/mL, houve colapso dos halos de inibição não sendo possível visualizá-los individualmente, ao passo que nas concentrações menores não ocorreu inibição do crescimento. Neste sentido, a atividade antifúngica do óleo de *R. officinallis* L. foi explorada por BONFIM et al., (2015) que obtiveram uma concentração mínima inibitória (CMI) de 150µg/mL para cepas de *Fusarium verticillioides*. Neste estudo, foi avaliada ainda a produção de ergosterol (componente da membrana celular fúngica) para determinação do mecanismo de ação do óleo sobre o fungo. A produção de ergosterol foi totalmente inibida nas concentrações de 300 a 600 µg/mL, desta forma, os autores puderam afirmar que o caráter lipofílico dos óleos essenciais podem interferir na integridade da membrana celular, causando o extravasamento do conteúdo celular.

A atividade antifúngica do óleo essencial de *R. officinallis* L. contra espécies de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* também foi descrita por SACCHETTI et al., (2005). Outro estudo desenvolvido por Jiang e colaboradores (2011) relataram a ação antimicrobiana do mesmo óleo sobre diferentes bactérias e fungos, e dentre eles, *Aspergillus niger* concluindo com uma inibição do fungo filamentosos em uma concentração de 1% v/v. Da mesma forma o óleo de *R. officinallis* L. foi testado contra o fungo *Botrytis cinerea*, produzindo uma inibição na concentração de 25,6µg/mL (SOYLU et al., 2010).

As diferentes formas de extração dos óleos essenciais podem interferir na composição e a ação biológica dos mesmos. A ação contra bactérias Gram positivas e negativas de óleos de *R. officinallis* obtidos por método de extração diferentes foi investigada por OKOH et al., (2010). Embora ambos os óleos tenham apresentado ação antibacteriana, o efeito ocorreu de forma diferenciada entre eles com uma ação maior do óleo obtido na extração com micro-ondas em comparação ao obtido por hidrodestilação. O mesmo óleo também se mostrou eficaz na inibição do crescimento de *Fusarium gramineum*, *A. parasiticus*, *Bipolaris spicifera*, *Epicoccum nigrum*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Alternaria alternata*, *Stachybotrys chartarum*, *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium* sp. (ANGIONI et al., 2004; RASOOLI et al., 2008; SOYLU et al., 2010; STUPAR et al. 2014; ZABKA et al. 2015).

Apesar da ação inibitória contra diversas espécies fúngicas do óleo de *R. officinallis* ser descrita cientificamente, sua atividade antimicotoxigênica ainda é pouco descrita. Estudos

envolvendo o fungo *A.carbonarius* na produção de ocratoxina A não foram apresentados recentes.

Para o óleo de *P.aduncum* L. (OE2Pa) a concentração ativa e o percentual de inibição comparado ao controle positivo foram de 125µL/mL; 33,82% respectivamente (Tabela 5). Os valores indicam que houve inibição do crescimento do fungo *A.carbonarius* CDCA 0126 na concentração de 125µL/mL.

A ação antifúngica do composto isolado do óleo de *P. aduncum* L. (dilapiol) contra o fungo *Clinipelis pernicioso* (causadora da vassoura-de-bruxa nas plantações) foi avaliada. A substância se mostrou ativa no intervalo de concentrações de 0,6-1ppm (ALMEIDA et al., 2009). NAVICKIENE et al., (2006) relataram a avaliação da ação antifúngica do óleo de *P.aduncum* sobre o fungo *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* através da técnica de bioautografia obtendo inibição na concentração de 50µg/mL para ambas as espécies. Outro estudo mostrou a ação inibidora do óleo de *P. aduncum* L. contra espécies de *Tricophyton* foi pesquisada, obtendo-se uma concentração mínima inibitória de 500µg/mL (GUERRINI et al., 2009).

Segundo Lobato e colaboradores (2007), o óleo essencial de *P. aduncum* L. na concentração de 0,5%, apresentou melhor custo/benefício e não foi fitotóxico à germinação das sementes, além de reduzir os fungos *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kuhn e *Macrophomina phaseolina* associados às sementes de caupi *Vigna unguiculata*. A atividade antibacteriana deste óleo essencial também foi investigada por outros autores (BRAZÃO et al., 2014; CHAHAL et al., 2011; JUNIOR et al., 2012).

O composto majoritário encontrado no óleo de *P.aduncum* avaliado neste trabalho, piperitona, é relatada como agente citotóxico à células cancerosas, antioxidante e antimicrobiana, leishmanicida (DAR et al., 2011; MKADDEM et al., 2009; PICOLO et al., 2014). Dentre as atividades biológicas já realizadas com a piperitona, observa-se a ausência de trabalhos que exploram seu potencial antiocrotogênico.

Apesar de alguns estudos apresentarem os potenciais efeitos de extratos e do óleo de *Piper aduncum* L. frente a fungos, até o presente momento não há relatos na literatura quanto à atividade antiocrotogênica do óleo da mesma. Além disso, estudos têm demonstrado o potencial antifúngico *in vitro* de extratos brutos e do óleo de espécies de *Piper*, como por exemplo, *P. chaba* e *P. betle* (PRAKASH et al., 2010; RAHMAN et al., 2011).

Nos últimos anos, as plantas aromáticas e seus subprodutos como extratos e óleos têm sido avaliados quanto à sua eficácia e aplicação na segurança alimentar e tem recebido atenção como promotores da saúde devido às suas propriedades. De forma geral, os óleos

essenciais, são antimicrobianos de ocorrência natural encontrados em muitas plantas e se mostrado ativos na redução do crescimento e sobrevivência de micro-organismos (CALO et al., 2015).

Embora diversas publicações como as citadas anteriormente, venham documentando a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *R.officinallis* e *P. aduncum*, uma comparação de resultados entre os trabalhos se torna uma problemática. Condições como a variação na composição química de óleos essenciais da mesma espécie vegetal por variações climáticas e ambientais; o micro-organismo testado, a técnica utilizada para determinação da atividade antifúngica e outros (BANSOD; RAI, 2008).

O caráter hidrofóbico dos óleos essenciais levanta uma discussão a respeito da eficácia do método de difusão em disco na avaliação de ações antimicrobianas, uma vez que, tal característica pode dificultar a difusão uniforme dos mesmos em meios de cultura sólidos (OSTROSKY et al., 2008). O método pode se limitar a informações qualitativas de inibição antimicrobiana, podendo, entretanto, ser aplicado conjuntamente com outros métodos para verificação da concentração mínima inibitória (CMI) como a diluição em ágar (KALEMBA; KUNICKA, 2003; BANSOD; RAI, 2008).

O método da microdiluição desenvolvido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para avaliação da ação antimicrobiana com agentes antimicrobianos convencionais, tais como os antibióticos, este também deve sofrer adaptações para a aplicação com extratos vegetais e óleos essenciais (BANSOD; RAI, 2008). Embora a microdiluição seja amplamente reconhecida como uma rápida e eficaz, o método para o ensaio de atividade antifúngica nem sempre é aplicável para todos os fungos (STUPAR et al., 2010). Outros métodos também são descritos em pesquisas de atividade antimicrobiana de óleos essenciais como a macrodiluição e a técnica do contato de vapor (ação de voláteis em microatmosfera com aplicação de um disco de papel de filtro embebido do óleo testado sobre a tampa da placa de Petri) (PASSONE et al., 2013; SOYLU et al., 2010; STUPAR et al., 2014).

5.3.2 Efeito sobre o crescimento micelial

No ensaio de crescimento micelial, as concentrações utilizadas dos óleos foram determinadas a partir da triagem realizada com o ensaio de difusão em disco e outras duas diluições menores. Assim, para ambos os óleos a concentração de partida foi 125 µL/mL seguida de 62,5 e 31,25µL/mL. As duas amostras inibiram e/ou reduziram o crescimento micelial nas diferentes concentrações avaliadas (Tabela 6). O Gráfico 1 apresenta os dados de

crescimento fúngico na presença e ausência dos óleos de *R. officinallis* (OE1Ro) e *P. aduncum* (OE2Pa) ao longo dos 10 dias de incubação.

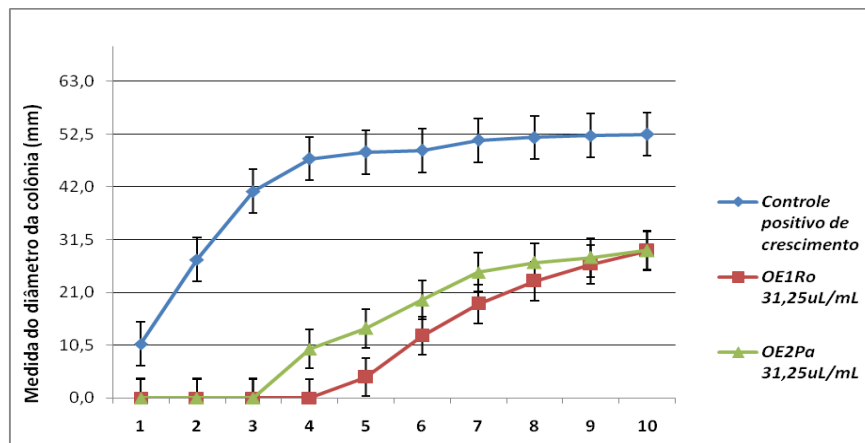
Tabela 6 - Média dos diâmetros das colônias (\emptyset mm \pm DP) no ensaio de crescimento micelial de *A.carbonarius* CDCA 0126 durante 10 dias.

Dias	Controle	OE1Ro (μ L/mL)			OE2Pa (μ L/mL)		
		125	62,5	31,25	125	62,5	31,25
1°	10,78 \pm 1,67	IT	IT	IT	IT	IT	IT
2°	27,55 \pm 1,18	IT	IT	IT	IT	IT	IT
3°	41,11 \pm 1,88	IT	IT	IT	IT	IT	IT
4°	47,63 \pm 6,07	IT	IT	IT	IT	IT	9,72 \pm 0,68
5°	48,94 \pm 7,68	IT	IT	4,14 \pm 3,71	IT	IT	13,79 \pm 1,32
6°	49,26 \pm 9,77	IT	IT	12,37 \pm 2,63	IT	IT	19,48 \pm 1,84
7°	51,46 \pm 10,12	IT	IT	18,71 \pm 3,40	IT	IT	25,01 \pm 2,56
8°	51,45 \pm 10,66	IT	IT	23,24 \pm 2,69	IT	IT	26,91 \pm 3,89
9°	51,67 \pm 10,75	IT	IT	26,57 \pm 3,26	IT	IT	27,93 \pm 1,86
10°	52,20 ^a \pm 10,54	IT	IT	29,26 ^b \pm 4,60	IT	IT	29,35 ^b \pm 1,18
Inibição		43,95%			43,78%		

IT: Inibição total do crescimento, não sendo possível visualização do halo; **NI:** Não houve inibição; **% Inibição:** comparada ao crescimento do fungo sem óleo (controle positivo de crescimento); **OE1Ro:** Óleo essencial de *R.officinallis* L.; **OE2Pa:** Óleo de *P.aduncum* L.; **a, b:** Médias seguidas por letras diferentes na linha diferem entre si a 5% de significância pelo Teste de Tukey.

Os resultados da análise de variância do ensaio de crescimento micelial mostraram diferenças significativas $p < 0,05$. OE1Ro nas concentrações de 125 μ L/mL e 62,5 μ L/mL proporcionou inibição total do crescimento fúngico durante os 10 dias ao passo que na menor concentração, ou seja, 31,25 μ L/mL a inibição ocorreu até o 4° dia de incubação com crescimento micelial reduzido em 43,95% comparado ao controle positivo de crescimento no 10° dia.

Gráfico 1 – Crescimento micelial (mm/dia) de *A.carbonarius* CDCA 0126



Controle Positivo de crescimento: *A.carbonarius* na ausência dos óleos; **OE1Ro:** Óleo essencial de *R. officinallis* L.; **OE2Pa:** Óleo essencial de *P. aduncum* L..

Em um estudo sobre a ação antifúngica do óleo de *R. officinallis* sobre *Fusarium verticillioides* foi observado que o óleo, inibiu o crescimento micelial de forma dose-dependente, ou seja, as concentrações 150; 300; 600 µg/mL foram inibidoras do crescimento fúngico com percentual de 17, 30 e 68% de inibição comparado ao controle (BOMFIM et al., 2015).

A inibição micelial sobre o crescimento de *Botrytis cinerea*, um fungo filamentosos causador da podridão em frutas, foi avaliado com os óleos essenciais de diversas plantas medicinais, incluindo *R. officinallis*. O efeito inibitório observado foi de 100, 62 e 10% nas concentrações de 25,6, 12,8 e 6,4% µg/mL respectivamente (SOYLU et al., 2010). A inibição micelial utilizando técnicas *in vitro* e *in vivo* sobre o mesmo fungo e *P. digitatum* utilizando o óleo de *R. officinallis* apontou resultados diferentes nos quais, na análise *in vitro* o efeito do óleo essencial foi considerado baixo enquanto que na análise *in vivo* o efeito foi considerado alto com redução no número de frutas contaminadas a 300µL/mL (MARANDI et al., 2011)

ANGIONI et al., (2004) relataram a ação do óleo de *R.officinallis* sobre diferentes espécies de *Fusarium*. Os resultados demonstraram que não ocorreu inibição do crescimento micelial dos fungos e ainda que houve um efeito indutivo sobre o crescimento dos micélios de *Fusarium graminearum*.

O óleo OE2Pa inibiu totalmente o crescimento de *A. carbonarius* durante os 10 dias nas concentrações de 125 e 62,5µL/mL. Na concentração de 31,25µL/mL, o óleo inibiu o crescimento até o 3º dia de incubação com crescimento micelial reduzido em 43,78% comparado ao controle positivo de crescimento no 10º dia.

Pesquisas com o óleo de *P. aduncum* demonstraram sua eficiência no controle de *Colletotrichum musae*, fungo causador de atracnose em bananas. Foram realizados testes *in vitro* e *in vivo* em frutos de banana em pós-colheita. Os resultados demonstraram que na concentração de 150µg/mL, o óleo inibiu completamente o crescimento micelial durante 8 dias de incubação e ainda que a 100µg/ml a inibição ficou em torno de 85,4%. Para os estudos *in vivo*, verificou-se que todos os tratamentos reduziram a incidência e a severidade da doença, sendo total na concentração de 1% do óleo (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004).

O extrato aquoso bruto de folhas e espigas de *P. aduncum* foi testado na inibição do crescimento micelial do *Sclerotinia sclerotiorum*. Os resultados apresentados demonstraram que a inibição ocorrida foi em torno de 25% (GARCIA et al., 2012)

Outras espécies pertencentes ao gênero *Piper* também foram avaliadas frente à inibição micelial de fungos filamentosos como *Tricophyton rubum*, *A. flavus*, *A. catechu* e *Botrytis cinerea* com resultados promissores (NAZMUL et al., 2011; PRAKASH et al., 2010; RAHMAN et al., 2011).

Estudos com outras espécies vegetais sobre o crescimento de fungos do gênero *Aspergillus* são relatados nas publicações científicas como Pimentel e colaboradores (2011) que descreveram a ação fungitóxica do óleo de *Tanaecium nocturnum* sobre o fungo *A. flavus*. Trabalho semelhante é descrito por Silva e colaboradores (2012), no qual os óleos essenciais de *Foeniculum vulgare*, *Zingiber officinale*, *Mentha piperita* L., *Thymus vulgaris* L., foram avaliados contra *A. flavus* e *A. parasiticus*. O crescimento micelial de *A. parasiticus* foi reduzido frente a todos os óleos dessas espécies.

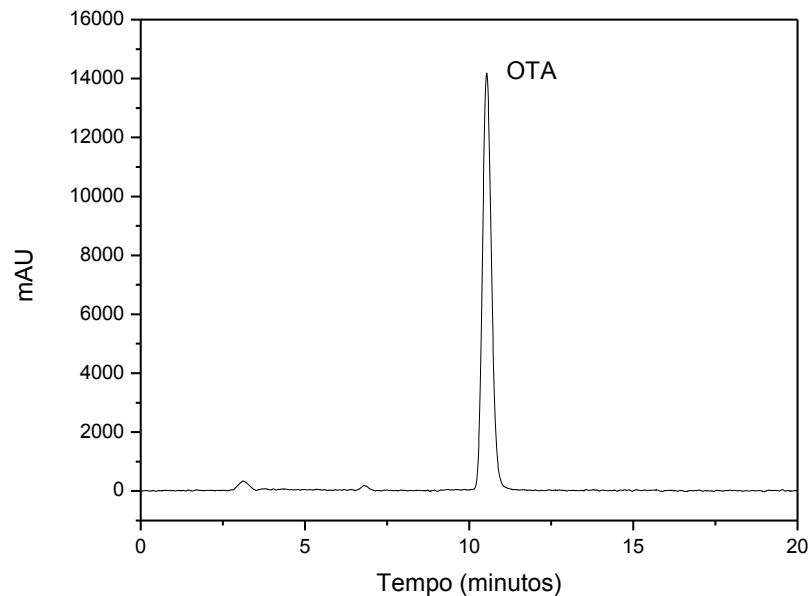
A avaliação das ações antifúngica, antibacteriana e tripanomicida dos óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* e *Siparuna guianensis* foi realizada. A atividade antifúngica demonstrou ser a mais satisfatória, incluindo os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* e *Penicillium commune*. O ensaio, realizado pela técnica da difusão em disco, resultou na inibição do crescimento de todos os fungos nas concentrações de 30µg/mL (ANDRADE et al., 2015).

5.4 EFEITO ANTIOCRATOXIGÊNICO

A quantificação de ocratoxina A (OTA) nas amostras foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear, sendo 1,0 o coeficiente de determinação (r^2) obtido. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) estimados foram

de 0,4 e 1,6 ng/g, respectivamente. O tempo de retenção médio obtido para OTA padrão foi de $11 \pm 0,1$ min (Figura 12).

Figura 12 - Cromatograma do padrão de ocratoxina A por CLAE



Cromatograma do padrão de ocratoxina A

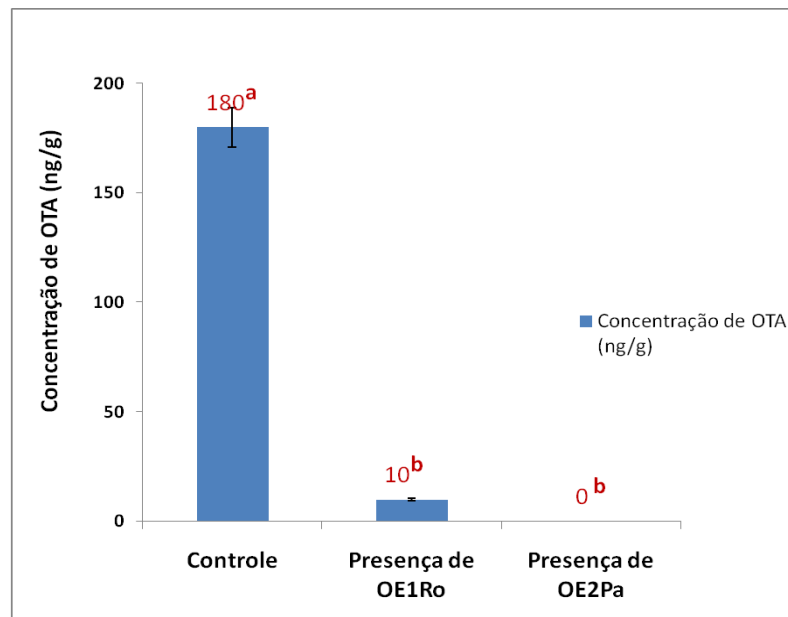
FONTE: Departamento de Química - UFLA.

Os efeitos dos óleos de *R. officinallis* L.(OE1Ro) e *P. adundum* L. (OE2Pa), ambos a $31,25\mu\text{L}/\text{mL}$, sobre a produção de OTA por *A. carbonarius* CDCA 0126 estão apresentados no Gráfico 2.

Os resultados do ensaio de atividade antimicotoxigênica mostraram diferenças significativas $p < 0,05$ entre as médias de produção de ocratoxina A pelo fungo controle (ausência de óleo) e as amostras (presença de óleo).

O óleo OE1Ro proporcionou a redução de OTA em 94,36%, ao passo que para o OE2Pa a inibição da produção foi total, levando a níveis não detectáveis da micotoxina nos extratos.

Gráfico 2 - Produção de ocratoxina A por *A.carbonarius* CDCA 0126



OE1Ro: Óleo de *R.officinallis* L **OE2Pa:** Óleo de *P.aduncum*. L.

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si a 5% de significância pelo Teste de Tukey.

Os estudos sobre a ação inibitória de ambos os óleos sobre a produção de ocratoxina A ainda é escassa, entretanto, são disponíveis algumas publicações descrevendo estudos com outras micotoxinas. Por exemplo, a redução na produção de fumonisinas B1 e B2 produzida pelo fungo *Fusarium verticillioides*, foi avaliada perante diferentes concentrações do óleo essencial de *R.officinallis*. A inibição total da produção ocorreu a 300µg/mL (BOMFIM et al., 2015).

A atividade antiaflatoxigênica do óleo de *R. officinallis* L. foi explorada em diferentes concentrações do óleo sobre o fungo *Aspergillus parasiticus*. A inibição total de aflatoxina ocorreu na concentração de 450ppm do óleo, ao passo que, nas concentrações menores, o efeito se mostrou dose dependente (RASOOLI et al., 2008).

Os óleos e compostos de canela (85% de cinamaldeído), cinamaldeído natural (95%), cinamaldeído sintético (99%), óleo de *Litsea citrate* (85% de citral), citral (96%), eugenol (99% eugenol), óleo de eucalipto (80% 1,8-cineol), e cânfora (55% borneol) foram avaliados na ação antiocratoxigênica de *A. ochraceous*. Os resultados apontaram que cinamaldeído natural, citral e eugenol provocaram a inibição total da produção de aflatoxina (HUA et al., 2014). Outros estudos com a atividade antimicotoxigênica de óleos essenciais foram também descritos na literatura (PASSONE et al., 2012; SONKER et al., 2014).

O efeito antimicotoxigênico da piperitona isolada dos óleos essenciais de *Matricaria recutita* e *Eucalyptus dives*) sobre a produção de tricotecenos por *Fusarium gramineum*, foi avaliada por Yaguchi e colaboradores (2009). A maior inibição na produção das micotoxinas foi reduzida pela piperitona na concentração de 300µMolar/mL. Outra espécie do gênero *Piper* (*P. Betle*) também mostrou ser um potente agente antiaflatoxigênico (PRAKASH et al., 2010).

Devido aos problemas que as micotoxinas acarretam, muitos países têm estabelecido medidas para o controle da contaminação nos produtos para o consumo humano e animal (AZIZI et al., 2012). Os limites legais estabelecidos para a presença de micotoxinas em alimentos variam de acordo com o país no seu grau de rigidez. No Brasil, a legislação abrange uma gama de produtos alimentícios desde grãos, cereais, farináceos e até leite e alguns de seus derivados (BRASIL, 2011), entretanto, os limites ainda são considerados pouco rígidos se comparados aos da Europa e Estados Unidos.

A segurança dos produtos consumidos pela população exige um gerenciamento para o manejo das situações que possam favorecer as possíveis contaminações (PASSONE et al., 2012). Como por exemplo a OTA, que é um dos representantes tóxicos com repercussão direta na saúde pública e na economia do país (AZIZI et al., 2012; BENNET; KLICH, 2003). Devido aos seus efeitos carcinogênicos e nefrotóxicos, exposição cumulativa ou agregada e presença em grãos, cereais, sementes e produtos de origem medicinal torna-se necessário o controle na produção e a inserção de novos antifúngicos/antimicotoxigênicos (BRYDEN et al., 2012; KUMAR et al., 2007).

O aumento do consumo de produtos naturais transformou seu uso em um problema de saúde pública devido à possibilidade de acesso à estes sem adequadas condições de uso (PRADO et al., 2012). A preocupação com a qualidade dos produtos naturais para consumo humano é devido ao potencial de contaminação por fungos e o risco da presença de micotoxinas. Prado e colaboradores (2012) avaliaram a presença diretamente de aflatoxina B1 em drogas vegetais, extratos secos e fitoterápicos industrializadas. A presença de fungos toxigênicos em noventa e uma amostras de plantas medicinais foi avaliada por BUGNO et al., (2006) que concluíram que 55% das amostras estavam contaminadas predominantemente com fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* dos quais 21,97% eram produtores de pelo menos uma micotoxina.

Estes resultados vão de encontro com os relatos de Pereira e colaboradores (2015) que descreveram a pesquisa por fungos toxigênicos e não toxigênicos em doze plantas medicinais. Os autores obtiveram como resultado a presença das espécies fúngicas dos gêneros

Cladosporium, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* em 16,7% das amostras. Este estudo sugere ainda que condições de armazenamento inadequada pode proporcionar o crescimento de fungos e as mesmas devem ser rigidamente mantidas.

Considerando que cada espécie fúngica possui condições ótimas para crescimento e para a produção de micotoxinas, as condições de armazenamento dos produtos susceptíveis, principalmente os de consumo direto (sem preparação prévia) torna-se uma vertente importante na manutenção da qualidade. Além disso, a importância do consumo dos produtos naturais na busca na manutenção de padrões saudáveis de vida é de extrema importância e deve ser estimulado, assim como a preocupação com a qualidade física e microbiológica destes, levando-se em conta o fácil acesso oferecido aos fungos micotoxigênicos nestes estes produtos quando não observados os cuidados desde o cultivo até a estocagem. Desta forma, o uso de substâncias antimicrobianas no controle de micro-organismos, principalmente os fungos se faz necessário. Entretanto, os efeitos tóxicos e contaminantes ao meio ambiente e ao ser humano que estes podem gerar, faz aumentar a busca por produtos alternativos de origem natural.

6 CONCLUSÃO

Os compostos verbenona, geraniol e 1,8-cineol foram identificados como majoritários no perfil químico do óleo essencial de *Rosmarinus officinallis* L.

No óleo essencial de *Piper aducum* L. foram identificados piperitona e limoneno como componentes majoritários no perfil químico.

Os óleos essenciais de *Rosmarinus officinallis* L. e *Piper aducum* L apresentaram ação inibitória sobre o crescimento fúngico de *Aspergillus carbonarius* CDCA 0126 produtor de ocratoxina A.

O óleo essencial de *R.officinallis* L. reduziu a produção de ocratoxina A em 94,36% e o óleo de *P.aduncum* L. promoveu a inibição total da produção de ocratoxina A.

Diante dos resultados obtidos, os óleos essenciais avaliados mostraram-se como uma alternativa promissora tanto para controle de crescimento do fungo *A.carbonarius*, como na produção de ocratoxina A.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. **Resolução da diretoria colegiada n° 7 de 18 de fevereiro de 2011**. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, Distrito Federal, 2011.

BRASIL. Agência nacional de vigilância sanitária. **Farmacopéia Brasileira**, volume 1. 5ª Ed. Brasília, 2010.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**, Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, 1995.

ALY, A.H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fifty years of drug discovery from fungi. **Fungal Diversity**, v. 50, n. 3, p. 19, 2011.

ALMEIDA, R.R.P.; SOUTO, R.N.P.; BASTOS, C.N.; DA SILVA, M.H.L.; MAIA, J.G.S. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. **Chemistry & biodiversity**, v. 6, 2009.

AMEZQUETA, S.; GONZALEZ-PENAS, E.; MURILLO-ARBIZU, M.; CERAIN, A.L. Ochratoxin A decontamination: A review. **Food Control**, v. 20, p. 326–333, 2009.

ANDLAUER, W.; FURST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and Outlook. **Food Research International**, v.35, p. 171–176, 2002.

ANDRADE, M.A.; CARDOSO, M.G.; GOMES, M.S.; AZEREDO, C.M.O.; BATISTA, L.R.; SOARES, M.J.; RODRIGUES, L.M.A.; FIGUEIREDO, A.C.S. Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n.1, p. 189-194, 2015.

ANDRADE, F.B.M.T; CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. B.; FERNANDES, A.; SFORCIN, J. M.. *Cymbopogon martinii* essential oil and geraniol at noncytotoxic concentrations exerted immunomodulatory/anti-inflammatory effects in human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 10, p. 1491-1496, 2014.

ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COÏSSON, J. D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3530-3535, 2004.

ARAÚJO, M.C.; CÂMARA, C.A.G.; BORN, F.S.; MORAES, M.M.; BADJI, C.A. Acaricidal activity and repellency of essential oil from *Piper aduncum* and its components against *Tetranychus urticae*. **Experimental & applied acarology**, v. 57, p. 139–155, 2012.

ASHIQ, S.; HUSSAIN, M.; AHMAD, B. Natural occurrence of mycotoxins in medicinal plants: A review. **Fungal Genetics and Biology**, v. 66, p. 1–10, 2014.

ARIF, T.; BHOSALE, J.D.; KUMAR, N.; MANDAL, T.K.; BENDRE, R.S.; LAVEKAR, G.S. E DABUR, R. Natural products – antifungal agents derived from plants. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 7, p. 621–638, 2009.

AZIZI, J.I.; RHAMINI, K.; SHATERI, S.. Ochratoxin: Contamination and Toxicity (A Review). **Global Veterinaria**, v. 8, n. 5, p. 519-524, 2012.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BANSOD, S.; RAI, M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. **World Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 81-88, 2008.

BATISTA, L. R. ; CHALFOUN, S. M. ; CIRILLO, M. ; SILVA, C. F.; VARGA, E. A.; SCHWAN, R.F. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) Processed by dry and wet methods. **Food Control**, v. 20, p. 784-790, 2009.

BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 3, p. 497–516, 2003.

BENNETT, J.W. An overview oh the genus *Aspergillus*. 2010. Disponível em <http://open-access-biology.com/aspergillus/aspergillusch1.pdf> Acesso em: 01set. 2014.

BERNARDES, W. A.; LUCARINI, R.; TOZATT I, M. G.; BOCALON FLAUZINO, L. G.; SOUZA, M. G.; TURATTI, I. C.; ANDRADE E SILVA, M.L; MARTINS, C.H.G; DA SILVA FILHO, A. A.; CUNHA, W.R. Antibacterial activity of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* and its major components against oral pathogens. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 65, n. 9, p. 588-59, 2010.

BETINA, V. Citrinin and related substances. In: V. Betina (Ed). **Mycotoxins, production, Isolation, Separation and Purification**. Elsevier, Sci. Publ. Co. Inc., New York, p. 3-236. 1984.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**. v. 98, n. 3, p. 426–438, 2011.

BONFIM, N. da S.; NAKASSUGI, L.P.; OLIVEIRA, J.P.O.; KOHIYAMA, C.Y.; MOSSINI, S.A.G.; GRESPAN, R.; NERILO, S.B.; MALLMANN, C.A.; ALVES, A. F.B.; MACHINSKI, M. JR. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. **Food Chemistry**, v. 166, p. 330–336, 2015.

BRAGULAT, M.R.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.L. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 139–144, 2001.

BRAGULAT, M.R.; MARTÍNEZ, E.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F.L. Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 43–48, 2008.

BRAHM, H; SEGAL, M.D. Aspergillosis. **New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 1870-1884, 2009.

BRASIL. Resolução da diretoria colegiada n° 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 9 de maio de 2014. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=14/05/2014&jornal=1&pagina=52&totalArquivos=100> Acesso em: 11-09-2014.

BRAZÃO, M.A.B; BRAZÃO, F.B.; MAIA, J.G.S.; MONTEIRO, M.C. Antibacterial activity of the *Piper aduncum* oil and dillapiole, its main constituent, against multidrug-resistant strains. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 6, p. 517 – 526, 2014.

BRYDEN, W.L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1, p. 134 – 158, 2012.

BUGNO, A.; ALMODOVAR, A.A.B.; PEREIRA, T.C.; PINTO, T.J.A.; SABINO, M. Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 47-51, 2006.

CABRAL, L.C.; PINTO, V.F.; PATRIARCA, A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 66, p. 1–14, 2013.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CALO, J.R.; CRANDALL, P.G.; O'BRYAN, C.A.; RICKE, S.C. Essential oils as antimicrobials in food systems: A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CAMILETTI, B. X., ASENSIO, C. M., PECCI, M. D. L. P. G.; LUCINI, E. I. Natural control of corn postharvest fungi *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp. using essential oils from plants grown in Argentina. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 12, 2014.

CHAHAL, J.; OHLYAN,R.; KANDALE,A.; WALIA,A.; PURI, S.. Introduction, phytochemistry, traditional uses and biological activity of genus *Piper*: a review. **International Journal Current Pharmaceutical Review**, v. 2, n. 2, p. 90-96, 2011.

CHEE, H.Y.; KIM, H.; LEE, M.H. In vitro antifungal activity of limonene against *Trichophyton rubrum*. **Mycobiology**, v. 37, n. 3, p. 243-246, 2009.

CHEN, W.; VILJOEN, A. M. Geraniol—a review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 643-651, 2010.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial disc susceptibility test**. 6th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1997. Approved Standard M2 and A6.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION . **Report of Codex of Committee on Food Additives and Contaminants**. Hague, 1998.

MITIC-CULAFIC, D.; ZEGURA, B. ; Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against *t*-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 260–266, 2009.

DAR, Y.M.; SHAH, W. A.; RATHER, M.A.; QURISHI, Y.; HAMID, A.. Chemical composition, in vitro cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil and major constituents of *Cymbopogon jawarancusa* (Kashmir). **Food Chemistry**, v. 129, p. 1606–1611, 2011.

DIKBAS, N.; KOTAN, R.;DADASOGLU, F.; SAHIN, F.. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 124, p. 179–182, 2008.

DODDS, D.R.; GROSS, R.A. Chemical from biomass. **Science**, v. 318, p. 1250–1251, 2007.

DOOL, H. V. D.; KRATZ, P. D. A. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463- 471, 1963.

EFSTRATIOU, E.; HUSSAIN, A.I.; NIGAM, P.S.; MOORE, J.E.; AYUB, .A.; RAO, J.R.. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 18, p. 173-176, 2012.

FADLI, M.; CHEVALIER, J.; BOLLA, J.M., MEZRIOUI, N.E.;HASSANI, L.; PAGES, J.M. *Thymus maroccanus* essential oil, a membranotropic compound active on Gram-negative bacteria and resistant isolates. **Journal of Applied Microbiology**. v. 113, p. 1120-1129, 2012.

FAO. Food and Agriculture organization of the United Nations. **Mycotoxins**, 2015.

Disponível em: <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/>>. Acesso em 12-01-2015.

FAO. Food and Agriculture organization of the United Nations.**Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. Food and nutrition paper 81, 2004. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm> . Acesso em 10-02-2015.

FERREIRA, D.F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FREIRE, F.C.O.; VIEIRA, I.G.P.; GUEDES, M.I.F.; MENDES, F.N.P. Micotoxinas: Importância na saúde humana e animal. **Documentos 110**, EMBRAPA. 2007.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C. A simple screening-method for toxigenic moulds in pure culture. *Lebensm.-Wiss. Technology*, v. 13, p. 128–130, 1980.

FIRUZI, O.; ASADOLLAHI, M. ;GHOLAMI,M.; JAVIDNIA, K. Composition and biological activities of essential oils from four *Heracleum* species. *Food Chemistry*, v. 122, p. 117–122, 2010.

GAIA, J. M.D.; MOTA, M.G.C.; CONCEIÇÃO, C.C.C. DA; COSTA, M.R.; MAIA, J.G.S.. Similaridade genética de populações naturais de pimenta-de-macaco por análise RAPD. *Horticultura Brasileira*, Brasília , v. 22, n. 4, p. 686-689, 2004.

GERKE, J.; BRAUS, G. H. Manipulation of fungal development as source of novel secondary metabolites for biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, n. 20, p. 8443-8455, 2014.

GOMES, M.S.; CARDOSO, M.G.; SOARES, M.J.; BATISTA, L.R.; MACHADO, S.M.F.; ANDRADE, M.A.A; AZEREDO, C.M.O.; RESENDE, J.M.V.; RODRIGUES, L.M.A. Use of essential oils of the genus *Citrus* as biocidal agents. *American Journal of Plant Sciences*, v. 5, p. 299-305, 2014.

GOMES-NETO, N. J., LUZ, I. S., FRANCO, O. L., MAGNANI, M.; SOUZA, E. L. Tolerance evaluation in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* challenged with sublethal amounts of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil or 1,8-cineole in meat model. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 49, p.1912-1917, 2014.

GRANDI, T.S.M.. **Tratado de plantas medicinais: mineiras, nativas e cultivadas**. 1. ed. Belo Horizonte: Adaequatio Estúdio, p. 62-63, 2014.

GUERRINI, A.; SACCHETTI, G.; ROSSI, D.; PAGANETTO, G.; MUZZOLI, M.V.; ANDREOTTI, E.; TOGNOLINI, M.; ALDONADO, M.E.; BRUNI, R. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 27, p. 39-48, 2009.

HAJHASHEMI, V.; SAJJADI, S.E.; HESHMATI, M. Anti-inflammatory and analgesic properties of *Heracleum persicum* essential oil and hydroalcoholic extract in animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 124, p. 475-480, 2009.

HAMADA, M.S.; YIN, Y.; MA, Z.. Sensitivity to iprodione, difenoconazole and fludioxonil of *Rhizoctonia cerealis* isolates collected from wheat in China. *Crop Protection* , v. 30, n. 8, 2011.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycology Research*, v. 9, n. 6, p. 641-655, 1991.

HAWKSWORTH, D.L.. The magnitude of fungal diversity : the 1±5 million species estimate revisited. *Mycology Research*, v. 105, n. 12, p. 1422-1432, 2001.

HORWITZ, W. **Official methods of analysis**. 17. ed. Washington: AOAC, 2002.

HUA, H.; XING, F.; SELVARAJ, J. N.; WANG, Y.; ZHAO, Y.; LIU, L.Z.X.; LIU, Y. Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and Ochratoxin A production. **Plos One**, v. 25, n. 9, p-9, 2014.

I LING, A.; SULAIMAN, S. ;OTHMAN, H..Evaluation of *Piper aduncum* Linn. Essential Oil (Fam:Piperaceae) against *Periplaneta americana* (L.). **Iranian Journal of Arthropod-Borne Disease**, v. 3, n. 2, p. 1-6, 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO 9235: 2013. Aromatic natural raw materials — Vocabulary. Item 2.11., 2013. Disponível em:<<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-2:v1:en>>. Acesso em: 20-01-2015.

JAYASHREE,T.; SUBRAMANYAM, C. Antiaflatoxic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation T. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p. 179-183, 1999.

JIANG, Y.; WU N.; FU,Y. J.; WANG, W.; LUO, M.; ZHAO, C.J.; ZU, Y.G.; LIU, X.L. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 63-68 , 2011.

JORDAN; M.J.; LAX, V.; ROTA, M.C.; LORÁN, S.; SOTOMAYOR, J.A. Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. **Food Control**, v. 30, p. 463-468, 2013.

JU, C.; SONG, S.; HWANG, S.; KIM, C.; KIM, M.; GU, J.; OH,Y. K.; LEE, K.; KWON, J.; LEE, K.; KIM, W.K.; CHOI, Y. Discovery of novel (1S)-(-)-verbenone derivatives with anti-oxidant and anti-ischemic effects. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 19, p. 5421-5425, 2013.

JUNIOR, C. L.; LOPES DE OLIVEIRA; G.; FERREIRA, B. C.; GONÇALVES, M. F.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R.; COELHO, M. A. Antimicrobial activity of essential oil of *Piper aduncum* L.(Piperaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, p. 3800-3805, 2012.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KAR, A.. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. New age international: s/n ed., Nova Deli, 2003.

KEDIA, A.; PRAKASH, B.; MISHRA, P.K.; DUBEY, N.K. Antifungal and antiaflatoxic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 168-169, p 1–7, 2014.

KLICH, M.A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Amsterdam Centraalbureau voor Schimmelatures, 116 p, 2002a.

KLICH, M.A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, v. 94, n. 1, p. 21–27, 2002b.

KRSKA, R. Mycotoxins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 1203-1204, 2009.

KYARIMPA, C.M.; BÖHMDORFER, S.; WASSWA, J.; KIREMIRE, B.T.; NDIEGE, I.O.; KABASA, J.D. Essential oil and composition of *Tagetes minuta* from Uganda. Larvicidal activity on *Anopheles gambiae*. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 400–404, 2014.

KUMAR, R.; MISHRA, A.; DUBEY, N.K.; TRIPATHI, Y.B. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 159-164, 2007.

KUMAR, V.; BASU, M.S.; RAJENDRAN, T.P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, v. 27, p. 891–905, 2008.

LOBATO, A. K. da S.; SANTOS, D. G. C. dos; OLIVEIRA, F. C. de; GOUVEA, D. D. S.; TORRES, G. I. O. da S.; LIMA JÚNIOR, J. A. de; OLIVEIRA NETO, C. F. de; SILVA, M. H. L. da. Ação do óleo essencial de *Piper aduncum* L. utilizado como fungicida natural no tratamento de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 915-917, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2 ed., p. 330-332, 2008.

LORENZI, V.; MUSELLI, A.; BERNARDINI, A.F.; BERTI, L.; PAGES, J.M.; AMARAL, L.; BOLLA, J.M. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 2209-2211, 2009.

MA, Y. T.; FAN, H. F.; GAO, Y. Q.; LI, H.; ZHANG, A. L.; GAO, J. M. Natural products as sources of new fungicides (I): synthesis and antifungal activity of acetophenone derivatives against phytopathogenic fungi. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 81, p. 545-552, 2013.

MADANKUMAR, A.; JAYAKUMAR, S.; GOKULADHAS, K.; RAJAN, B.; RAGHUNANDHAKUMAR, S.; ASOKKUMAR, S.; DEVAKI, T. Geraniol modulates tongue and hepatic phase I and phase II conjugation activities and may contribute directly to the chemopreventive activity against experimental oral carcinogenesis. **European Journal of Pharmacology**, v. 705, n. 1, p. 148-155, 2013.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 101 p.

MALANDRAKIS, A. A.; VATTIS, K. N.; DOUKAS, E. G.; MARKOGLU, A. N. Effect of phenylpyrrole-resistance on fitness parameters and ochratoxin production in *Aspergillus carbonarius*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, n. 3, 287-294, 2013.

MARANDI, R. J.; HASSANI, A.; GHOSTA, Y.; ABDOLLAHI, A.; PIRZAD, A.; SEFIDKON, F. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on pear with *Thymus kotschyanus*, *Ocimum basilicum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 626-634, 2011.

MARIN, S.; RAMOS, A.J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V.. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food Chem Toxicol.** v. 60, p. 218-37, 2013.

MARTINS, A.P.; NOGUEIRA, M.T.; COSTA, M.C.; SALGUEIRO, L. Requisitos de qualidade de óleos essenciais: a Importância das monografias da Farmacopéia Européia e normas ISO. **Revista de fitoterapia**, v. 11, n. 2, p.131-146, 2011.

MANTOVANI, A. L.; VIEIRA, G. P., CUNHA; W. R., GROppo, M.; SANTOS, R. A.; RODRIGUES, V.; CROTTI, A. E.M. Chemical composition, antischistosomal and cytotoxic effects of the essential oil of *Lavandula angustifolia* grown in Southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 6, p. 877-884, 2013.

MEAD, R.; CURNOW, R. N. **Statistical methods in agriculture and experimental biology.** London: Chapman and hall, p.335, 1983.

MEEPAGALA , K.M.; KUHAJEK, J.M.; STURTZ, G.D.; WEDGE, D.E. Vulgarone B, the antifungal constituent in the steam-distilled fraction of *Artemisia douglasiana*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 8, 2003.

MESSIER, C.; GRENIER, D. Effect of licorice compounds licochalcone A, glabridin and glycyrrhizic acid on growth and virulence properties of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 54, p. 801–806, 2011.

MEYER, V.. Genetic engineering of filamentous fungi- Progress, obstacles and future trends, **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 177-185, 2008.

MKADDEM, M.; BOUAJILA, J.; ENNAJAR, M.; LEBRIHI, A.; MATHIEU, F.; ROMDHANE, M. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha (longifolia* L. and *viridis*) essential oils. **Journal of Food Science.** v. 74, n. 7, 2009.

MISNI, N.; SULAIMAN, S.; OTHMAN, H.; OMAR. Repellency of essential oil of *Piper aduncum* against *Aedes albopictus* in the laboratory. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, n. 4, p. 442–447, 2009.

MOHAMED, S; FLINT, S.; PALMER, J.; FLETCHER, G.C.; PITT, J.I.. An extension of the coconut cream agar method to screen *Penicillium citrinum* isolates for citrinin production. **Letters Applied Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 214-219, 2013.

NAZMUL, M.H.M.; SALMAH, I.; SYAHID, A; MAHMOOD, A.A. In-vitro screening of antifungal activity of plants in Malaysia. **Biomedical Research**, v. 22, n. 1, p. 28-30, 2011.

NAVICKIENE, H.; DEBONSI, M.; MORANDIM, A. DE A.; ALÉCIO, A.C.; REGASINI, L.O.; BERGAMO, D. C.B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A.J.; LOPES, M.N.; BOLZANI, V.DA S.; FURLAN, M.; MARQUES, M. O. M.; YOUNG, M.C. M.; KATO, M.J.. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 467-470, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G.M. J. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-355, 2012.

NIKOLIC, B.; MITIC-CULAFIC, D.; VUKOVIC-GAVIC, B.; KNEZEVIC-VUKCEVIC, J. Modulation of genotoxicity and DNA repair by plant monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in *Escherichia coli* and mammalian cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49 p. 2035–2045, 2011.

NISHIDA, M.; MATSUBARA, T.; WATANABE, N. Pyrrolnitrin, a new antifungal antibiotic: Microbiological and toxicological observations. **Journals of Antibiotics**, v. 18, p. 211–219, 1965.

ODHAV, B.; NAICKER, V.. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n. 1, p. 55-61, 2002.

OKOH, O.O.; SADIMENKO, A.P.; AFOLAYAN, A.J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v. 120, p. 308–312, 2010.

OMS (Organização Mundial da Saúde). **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. WHO Food Additive Series, n. 47, Geneva, 2001.

OLIVEIRA, M. S.; DORS, G.C.; SOUZA-SOARES, L.A.; BADIALE-FURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 267-275, 2007.

OLIVEIRA, G.L.; MOREIRA, D. DE L.; MENDES, A. D. R.; GUIMARÃES, E. F.; FIGUEIREDO, L. S.; KAPLAN, M. A.C.; MARTINS, E.R. Growth study and essential oil analysis of *Piper aduncum* from two sites of Cerrado biome of Minas Gerais State, Brazil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 23, n. 5, p. 743-753, 2013.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, 2008.

PADALIA, R. C.; VERMA, R. S.; CHAUHAN, A.; GOSWAMI, P.; VERMA, S. K.; DAROKAR, M. P. Chemical composition of *Melaleuca linarrifolia* Sm. from India: a potential source of 1, 8-cineole. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 264-268, 2015.

PASSAMANI, F.R. F.; HERNANDES, T.; LOPES, N.A.; BASTOS, S.C.; SANTIAGO, W.D.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R. Effect of Temperature, Water Activity, and pH on Growth and Production of Ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian Grapes. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 11, 2014.

PASSONE, M.A.; GIRARDI, N.S.; ETCHEVERRY, M. Evaluation of the control ability of five essential oils against *Aspergillus* section Nigri growth and ochratoxin A accumulation in peanut meal extract agar conditioned at different water activities levels. **International Journal of Food Microbiology**, v.159, p.198-206, 2012.

- PERRONE, G. G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRLICH, K.; VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; MEIJER, M.; NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W. e SAMSON, R.A. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 53-66, 2007.
- PEREIRA, C.G.; SILVA, J.R.O.; BATISTA, L.R. Isolation and identification of toxigenic and non-toxicogenic fungi in samples of medicinal plants from the market. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 2, p. 262-266, 2015.
- PESAVENTO, G.; CALONICO, C.; BILIA, A.R.; BARNABEI, M.; CALESINI, F. ADDONA, R.; MENCARELLI, L.; CARMAGNINI, L.; DI MARTINO, M.C.; LO NOSTRO, A. Antibacterial activity of Oregano, *Rosmarinus* and *Thymus* essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**, v. 54, p. 188 -199, 2015.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A.; RICHARD, A. MANDERVILLE. Review: Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. **Mol. Nutr. Food Res.**, 51, 61 – 99, 2007.
- PICOLO, C.R.; BEZERRA, M.P.; GOMES, K.S.; PASSERO, L.F.; LAURENTINI, M.D.; MARTINS, E.G.; SARTORELLI, P.; LAGO, J.H. Antileishmanial activity evaluation of adunchalcone, a new prenylated dihydrochalcone from *Piper aduncum* L. **Fitoterapia**, v. 97, p. 28-33, 2014.
- PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. CSIRO, Food Science. 3^a ed., Australia, 2000.
- PIMENTEL, F.A.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; Lima, L.G.; GUIMARÃES, D.M.S. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Acta amazônica**, v. 40, n.1, p. 213 – 220, 2010.
- POTZERNHEIM, M.C.L.; BIZZO, H.B.; SILVA, J.P.; VIEIRA, R.F. Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 42, p. 25–31, 2012.
- PRADO, G.; ALTOÉ, A. F.; GOMES, T. C.; LEAL, A. S.; MORAIS, V. A.; OLIVEIRA, M. S.; FERREIRA, M.B.; GOMES, M.B.; PASCHOAL, F.N.; SOUZA, R.V.; SILVA, D.A.; MADEIRA, J.E.G.C.. Occurrence of aflatoxin B1 in natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1428-1435, 2012.
- PRAKASH, B.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; KUMAR, A.; MISHRA, P.K.; DUBEY, N.K. Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 114–119, 2010.
- PRAKASH, B.; KEDIA, A.; MISHRA, P.K.; DUBEY, N.K. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities e potentials and challenges. **Food Control**, v. 47, p. 38-391, 2015.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

RASOOLI, I.; FAKOOR, M.H.; YADEGARINIA, D.; GACHKAR, L.; ALLAMEH, A.; REZAEI, M.B. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 135–139, 2008.

RAHMAN, A.; AL-REZA, S.M.; KANG, S.C. Antifungal activity of essential oil and extracts of *Piper chaba* hunter against phytopathogenic fungi. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 88, p. 573–579, 2011.

REDDY, K.; REDDY, C.; MURALIDHARAN, K. Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. **Food Control**, n. 20, p.173–178, 2009.

REDDY, K.R.N., NURDIJATI, S.B., SALLEH, B. Efficacy of aqueous medicinal plant extracts on growth and citrinin production by *Penicillium citrinum* isolated from rice grains. **African Journal of Microbiology Research**, v. 23, p. 2562-2565, 2010a.

REDDY, K.R.N.; SALLEH, B; SAAD, B.; ABBAS, H.K. e SHIER, W.T. An overview of micotoxin contamination in foods and its implications for human health. **Toxins Reviews**, v. 29, p. 3-26, 2010b.

RICHARD, J.L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p.3–10, 2007.

ROEMER, T.; XU, D.; SINGH, S.B.; PARISH, C.A.; HARRIS, G.; WANG, H.; DAVIES, J.E.; BILLS, G.F. Confronting the challenges of natural product-based antifungal discovery. **Chem Biol**, v. 25, n. 18(2), p.148-64, 2011.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, p. 621–632, 2005.

SAMSON, R.A. ; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**.v. 47, n.1, 2009.

SCHMIDT, E. Production of oils. In: Baser KHC, Buchbauers G. **Handbook of essential oils**, Science, technology and applications. CPR press, 2010.

SILVA, F. C.; CHALFOUN, S.M.; SIQUEIRA, V.M.; BOTELHO, D.M. S.; LIMA, N.,; BATISTA, L.R.. Evaluation of antifungal activity of essential oils against potentially mycotoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1002-1010, 2012.

SILVA, M.G.; FURTADO, N.A.; PUPO, M.T.; FONSECA, M.J.; SAID, S.; FILHO, A.A.S.; BASTOS, J.K. Antibacterial activity from *Penicillium corylophilum* Dierckx. **Microbiology Research**, v. 159, n. 4, p. 317-22, 2004.

SINGH, P.; SRIVASTAVA, B.; KUMAR, A.; DUBEY, N.K. Fungal contamination of raw materials of some herbal drugs and recommendation of *Cinnamomum camphora* oil as herbal fungitoxicant. **Microbial Ecology**, v.56, n. 3, p. 555-560, 2008.

SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRAKASH, B.; DUBEY, N.K. Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. **Food Control**, v. 25, p. 27-33, 2012.

SONKER, N.; PANDEY, A.Y.K.; SINGH, P.; TRIPATHI, N. N. Assessment of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. essential oil as herbal preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, and antiochratoxin activities and *In Vivo* efficacy during storage. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 4, 2014.

SOUTO, R.N.P.; HARADA, A.Y.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S. Insecticidal Activity of Piper essential oils from the amazon against the fire ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, p. 510–517, 2012.

SOYLU, E.M.; KURT, S.; SOYLU, S. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 183–189, 2010.

STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, T.T.; GOMES, R.C.; AMARAL, M.P.H.; CARVALHO, A.F.; VILELA, M.A.P. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, v. 7, n. 43, p. 181-194, 2007.

STUPAR, M.; GRBIĆ, M.L.J.; DŽAMIĆ, A.; UNKOVIĆ, N.; RISTIĆ, M.; JELIKIĆ, A.; VUKOJEVIĆ, J. Antifungal activity of selected essential oils and biocide benzalkonium chloride against the fungi isolated from cultural heritage objects. **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 118–124, 2014.

TABASSUM, N.; VIDYASAGAR, G. M. Antifungal investigations on plant essential oils: a review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 19-28, 2013.

TANAKA, K.; SAGO, Y.; ZHENG, Y.; NAKAGAWA, H.; KUSHIRO, M. Mycotoxins in rice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 59–66, 2007.

TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TEMPONE, A.G.; SARTORELLI, P.; TEIXEIRA, D.; PRADO, F.O; CALIXTO, I.A.; LORENZI, H.; MELHEM, M.S.C. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 443-449, 2008.

TORTORA G. J.; FUNKE B.R.; CASE C.L. **Microbiologia**. Trad.: Aristóblo Silva *et al.* 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 340 p.

TUREK, C.; STINTZING, F. Stability of essential oils: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, p. 40-53, 2013.

TURNER, N.W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S.A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 168–180, 2009.

VAN DER MERWE, K.J.; STEYN, P.S.; FOURIE, L.; SCOTT, D.B.; THERON, J.J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. Nature, v. 13, n. 205, p. 1112-3, 1965.

VENTUROSIO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

VETTORAZZI, A.; DELFT, J.V.; CERAIN, A.L. A review on ochratoxin A transcriptomic studies. **Food and Chemical Toxicology**, n. 59, p. 766–783, 2013.

VIEIRA, S.C.H.; PAULO, L.F.; SVIDZINSKI, T.I.E.; FILHO, B;P.D.; NAKAMURA, C.V.; SOUZA, A.; YOUNG, M.C.M.M.; CORTEZ, D.A.G. Antifungal activity of *Piper diospyrifolium* kunth (*Piperaceae*) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1001-1006, 2011.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; PEREZ-ALVAREZ, J.. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Food Control**, v.19, p. 1130–1138, 2008.

VIVAN, J. **Produção da micotoxina citrinina por *Penicillium* spp.** Dissertação de Mestrado (Mestrado em Microbiologia agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2002.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies in improve heterologous protein production in fungal fermentations, **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 113-129, 2005.

YAGUCHI, T.; YOSHINARI, T.; SUYUKI, R.; TAKAHASHI, H.; NAKAJIMA, T.; SUGITA-KONISHI, Y.; NAGASAWA, H.; SAKUDA, S. Isolation and identification of precocenes and piperitone from essential oils as specific inhibitors of trichothecene production by *Fusarium graminearum*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 57, p. 846–851, 2009.

ZABKA, M.; PAVELA, R., PROKINOVA E. Antifungal activity and chemical composition of twenty essential oils against significant indoor and outdoor toxigenic and aeroallergenic fungi. **Chemosphere**, v. 112, p. 443-488, 2014.

ZAIN, M.E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 129–144, 2011.

ZAIN, M.E.; AWAAD, A.S.; AL-OTHMAN, M.R.; AFEEFY, A.M.; EL-MELIGY, R.M. Biological activity of fungal secondary metabolites. **International Journal of Chemical and Applied Biological Sciences**, v. 1, n.1, p.14-22, 2014.

ZAOUALI, Y.; BOUZAINE, T.; BOUSSAID, M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3144–3152, 2010.

ZHELIFONOVA, V.P.; ANTIPOVA, T.V.; KOZLOVSKY, A.G. Secondary metabolites in taxonomy of the *Penicillium* fungi. **Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 277–286, 2010.

(site:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>).

(FAO, 2004 <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e07.htm>)