Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luíz de Queiroz"

Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre espécies produtoras de aflatoxinas

Georgia Rocha Vilela

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Georgia Rocha Vilela
Engenheira Agrônoma

Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre espécies produtoras de aflatoxinas

Orientadora:
Prof[a]. Dra. **MARISA APARECIDA BISMARA REGITANO D´ARCE**

Dissertação apresentada para obtenção do título Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Vilela, Georgia Rocha
Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre espécies produtoras de aflatoxinas / Geórgia Rocha Vilela. - - Piracicaba, 2007.
64 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Aflatoxinas 2. Aspergillus 3. Cromatografia gasosa capilar 4. Eucalipto 5. Fungos 6. Óleo essencial I. Título

CDD 665.33

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À minha mãe,

Mirian

Por seu exemplo de resignação, força e perseverança frente às dificuldades da vida.

Pelo apoio, incentivo e confiança, bases concretas para a realização desse trabalho.

E por seu AMOR.

Ao meu pai,

Adolfo

Por minha criação, educação, incentivo e confiança.

Ao meu irmão,

Pablo

Meu grande e maior amigo.

Exemplo de dedicação à família e ao trabalho.

Por estar sempre presente em minha vida.

À minha irmã,

Pascally

Por me mostrar que de nossas maiores deficiências nascem nossos maiores talentos, e obrigado por me ensinar a ouvir a voz que vem do coração.

Ao querido,

Faro

Amigo e companheiro de todas as horas e maior incentivador do meu trabalho. Agradeço pelo apoio, pela paciência e por sempre ter uma palavra de carinho.

OFEREÇO E DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marisa Aparecida Bismara Regitano D'Arce pela orientação e amizade.

Ao Dr. Eduardo Micotti da Gloria pelo apoio e empenho no desenvolvimento e no acompanhamento de todas as atividades realizadas para a concretização dessa dissertação.

À Maria Antonia Caloni-Domingues pela amizade.

À Ivani Zambelo e à Francisca Regina da Silva (Fran) pela amizade e pelo auxílio nas análises laboratoriais.

Ao colega Gustavo Steffen de Almeida pela dedicação prestada a todas as atividades desse projeto.

À Maria Heloisa Duarte Moraes (Helô) pelos ensinamentos e paciência em me acompanhar nas atividades desenvolvidas no Laboratório de Sementes do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP.

À Profa. Dra. Sônia Maria de Stefano Piedade do Departamento de Ciências Exatas da ESALQ/USP pela execução das análises estatísticas desse trabalho.

À Profa. Dra. Maria Fátima e ao M.Sc. Sebastião Cruz Silva do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar pelas análises do óleo essencial e pelo auxílio na interpretação dos resultados.

Às bibliotecárias Beatriz e Midian da Biblioteca do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição pelas correções realizadas nessa dissertação.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela amizade e companheirismo.

A TODOS, MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

RESUMO..... 6
ABSTRACT..... 7
1 INTRODUÇÃO..... 8
2 DESENVOLVIMENTO..... 9
2.1 Aflatoxinas..... 9
2.2 Produção de aflatoxinas..... 12
2.2.1 Pré-colheita e colheita..... 12
2.2.2 Pós-colheita..... 14
2.3 Controle do crescimento fúngico e produção de toxinas..... 18
2.3.1 Óleo essencial: características e ações..... 19
2.4 Óleo essencial de *Eucalyptus* spp. 27
2.5 Material e Métodos..... 29
2.5.1 Caracterização e quantificação da composição química do óleo essencial..... 29
2.5.2 Fungos..... 30
2.5.3 Modos de ação “in vitro” do óleo essencial..... 31
2.5.4 Avaliação da eficiência do óleo essencial sobre o crescimento micelial dos fungos.... 32
2.5.5 Avaliação da eficiência do óleo essencial sobre a produção de aflatoxinas..... 32
2.5.6 Análise estatística..... 34
2.6 Resultado e Discussão..... 34
2.6.1 Caracterização e quantificação do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*..... 34
2.6.2 Eficiência do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*..... 37
2.6.3 Óleo essencial sobre as espécies fúngicas..... 38
2.6.4 Modo de ação do óleo essencial sobre o crescimento micelial..... 39
2.6.5 Eficiência do composto 1,8-cineol..... 41
2.6.6 Composto 1,8-cineol sobre as espécies fúngicas..... 41
2.6.7 Modo de ação do composto 1,8-cineol sobre o crescimento micelial..... 42
2.6.8 Contaminação dos fungos por aflatoxinas..... 45
3 CONCLUSÃO..... 49
REFERÊNCIAS..... 50

RESUMO

Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* Labill. sobre espécies produtoras de aflatoxinas

Há relatos na literatura de alguns compostos naturais de plantas que são usados para preservação de alimentos e no controle do desenvolvimento de fungos e bactérias que ocorrem em plantas, grãos, cereais e derivados. O presente trabalho teve como objetivo avaliar "in vitro" o efeito do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* e seu composto majoritário sobre o crescimento micelial dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e a produção de aflatoxinas. A composição química do óleo analisado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massa mostrou-nos que o composto majoritário com 89,95% é o 1,8-cineol. Assim foi avaliada a ação por contato e por compostos voláteis do óleo essencial e do 1,8-cineol. O modo de ação por compostos voláteis, do óleo e do composto, foi estatisticamente mais eficiente do à ação por contato, para ambos os fungos. Independente do modo da ação a partir da dose de 500µL do óleo os fungos tiveram comportamentos semelhantes, com mais de 90% de inibição micelial. O composto 1,8-cineol não demonstrou a mesma eficiência que o óleo, produzindo algum efeito inibitório apenas na dose de 1.500µL, com apenas 5,5% de inibição de crescimento micelial. Foi verificado que o óleo essencial e o composto 1,8-cineol não cessaram a produção de aflatoxinas de ambos os fungos mesmo inibindo o crescimento micelial.

Palavras-chave: *Eucalyptus globulus*; *Aspergillus flavus*; *Aspergillus parasiticus*; Óleo essencial; Aflatoxinas; Cromatografia gasosa.

ABSTRACT

Effects of the essential oil from *Eucalyptus globulus* Labill on aflatoxin producer species

Literature describes some natural plants composites that are used to preserve food and to control fungi and bacteria development in plants, grains, cereals and derivatives. The objective of this research was evaluate the effect in vitro of the *Eucalyptus globulus* essential oil and its major component over mycelial growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. The chemical oil composition, analyzed by gas chromatography connected to mass spectra, showed that 1,8-cineole is the major compound with 89.95%. Thus, the essential oil and the 1,8-cineole were evaluated by the contact and volatiles action. For both analyzed fungi, the oil and the compound action promoted throughout volatile compound were statically more efficient than the action promoted throughout contact. Considering the oil dose of 500µL and so forth, the fungi behaviors were similar independently of the action modes, with more than 90% of mycelial inhibition. The 1,8-cineole compound did not demonstrate the same efficiency that the essential oil did, producing some inhibitory effect only in the dose of 1.500µL, with only 5.5% of inhibition of mycelial growth. It was verified that the essential oil and 1,8-cineole compound did not cease the aflatoxins production in both fungi, even with the inhibition of mycelial growth.

Keywords: *Eucalyptus globulus*; *Aspergillus flavus*; *Aspergillus parasiticus*; Essential oil; Aflatoxins; Gas chromatography.

1 INTRODUÇÃO

O uso de defensivos agrícolas sintéticos no controle de pragas e doenças que normalmente ocorrem nas culturas pode contaminar e desequilibrar o ambiente, comprometer a saúde humana, tanto dos agricultores quanto dos consumidores, deixar resíduos nos produtos agrícolas acima dos limites de tolerância e aumentar o custo de produção. Frente a esta situação a sociedade vem exigindo, cada vez mais, a produção de alimentos sem resíduos de defensivos sintéticos e com menor contaminação para o ambiente.

A preocupação com a contaminação é observada por segmentos do mercado ávidos por produtos agrícolas diferenciados, tanto aqueles produzidos sem uso de agrotóxicos sintéticos, como aqueles portadores de selos indicativos de que os agrotóxicos foram utilizados adequadamente (BETTIOL, 2001).

Diante deste quadro, buscam-se, cada vez mais, alternativas ao uso de defensivos sintéticos, entre eles, os fungicidas. Atualmente, muitos fitocompostos como óleos e extratos com alta atividade bactericida, fungicida e inibidora de produção de toxinas por esses microrganismos são extraídos de ervas e outras plantas. Esses fitocompostos também são utilizados como analgésicos, sedativos, antidepressivos e em tratamentos terapêuticos (SILVA et al., 2003).

De acordo com Bizi (2006), dentre os fitocompostos, os óleos essenciais encontram maior aplicação biológica como agentes antimicrobianos, o que representa uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos.

Os estudos biológicos e a pesquisa de novos compostos tem sido uma das maiores tarefas dos fitoquímicos em todo mundo; o processo da escolha da planta até a obtenção de uma substância biologicamente ativa é longo e multidisciplinar (PENTEADO, 2001). Para a recomendação de produtos naturais ainda há carência de estudos mais profundos em relação aos possíveis riscos à saúde humana, animal e para o meio ambiente.

Entre os vários óleos essenciais que têm sido relatados na literatura como tendo função antifúngica podem-se citar os óleos de eucaliptos (BOLAND et al., 1991; SALGADO, 2001). O eucalipto no Brasil é explorado não somente com a finalidade de exploração de madeira destinada à indústria de carvão, mas também para serrarias, indústrias moveleiras, geração de energia e exploração das folhas para produção de óleos essenciais (SALGADO, 2001).

Os óleos essenciais dos eucaliptos possuem diversas funções; já foram considerados como repelente de insetos que se alimentam de suas folhas, inibidores de germinação e de crescimento

de outras plantas e controladores da atividade microbiológica de alguns fungos e bactérias (BOLAND et al., 1991).

Este trabalho tem como objetivo avaliar “in vitro” o efeito do óleo essencial da espécie *Eucalyptus globulus* sobre o crescimento micelial e a produção de aflatoxinas dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Aflatoxinas

Micotoxina é o termo usado para descrever substâncias tóxicas formadas durante o crescimento de fungos (GRIFFIN, 1994; PITT; HOCKING, 1997; SMITH; MOSS, 1985; WICKLOW, 1995) e abrange uma diversidade de compostos, originários de diferentes precursores e vias metabólicas, reunidos segundo o grau de toxicidade ao homem e aos animais (GRIFFIN, 1994). As micotoxinas podem ser produzidas por diversos gêneros fúngicos, os quais podem diferir na morfologia, bioquímica e nos nichos ecológicos; são compostos altamente tóxicos e podem estar presentes em produtos, subprodutos de grãos e alimentos em geral, atuando isoladamente ou em conjunto, dependendo dos níveis de contaminação no alimento (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - CAST, 2003).

As aflatoxinas são metabólitos secundários sintetizados por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente *A. flavus* e *A. parasiticus* (KOZAKIEWICZ; SMITH, 1994; SMITH; MOSS, 1985), mas sabe-se que outros representantes do gênero como *A. nomius* e *A. pseudotamarii* também produzem aflatoxinas (CAST, 2003). O gênero *Aspergillus* pode ser encontrado em alimentos de origem vegetal, bem como em produtos modificados originados destas matérias-primas (GRIFFIN, 1994).

As aflatoxinas foram descobertas em 1960 ao provocarem em perus, na Inglaterra, um surto com alta letalidade conhecido como "*turkey X disease*", milhares de aves morreram após consumirem torta de amendoim, proveniente do Brasil, que foi adicionada à ração (SARGEANT et al., 1961).

As principais aflatoxinas, B_1, B_2, G_1 e G_2, quando ingeridas por animais, podem ser convertidas em metabólicos tóxicos, M_1 e M_2, que se acumulam na carne e nos ovos e são excretadas no leite (CAST, 2003; DHINGRA; NETTO, 1998; HSIEH; WONG, 1994). Segundo o Food and Drug Administration/Center for Food Safety and Applied Nutrition - FDA/CFSAN

(2006) e Eaton et al. (1994), para ativar a toxicidade e a carcinogenicidade das aflatoxinas estas sofrem um processo de indução ou inibição do sistema de oxidação como as reações de hidrolisação, epoxidação e desmetilação.

As aflatoxinas são absorvidas pelo trato intestinal de onde passam para a circulação sangüínea pela via portal e são transportadas para o fígado onde são biotransformadas. Uma parte da aflatoxina B_1 é ativada e ligada aos tecidos hepáticos, enquanto que alguns outros metabólitos conjugados e solúveis são excretados na bile e, subseqüentemente, nas fezes. Outros metabólitos conjugados solúveis em água e produtos de degradação são excretados para o sistema circulatório e, eventualmente, transferidos para o leite, ovos e carnes (Figura 1) (OGA, 2003).

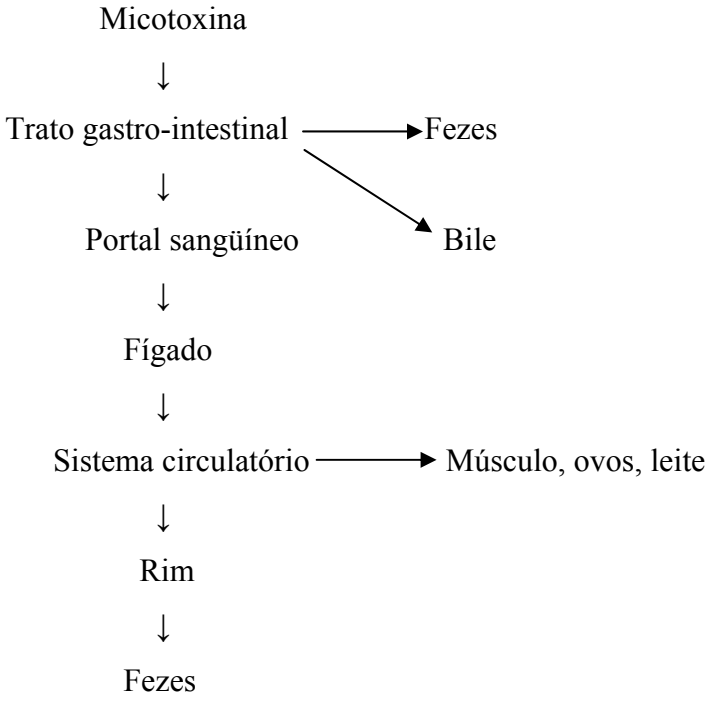


Figura 1 - Via metabólica de uma micotoxina e seus resíduos. Fonte: Oga, 2003.

As aflatoxinas são tóxicas não somente para mamíferos como também para as aves, peixes, microrganismos e plantas superiores (SMITH; MOSS, 1985). A sensibilidade às aflatoxinas varia muito com a espécie (Tabela 1) e o tamanho do animal. Dentro da mesma espécie varia com a dose administrada, o sexo (machos são mais susceptíveis, porém fêmeas grávidas tornam-se altamente susceptíveis aos efeitos tóxicos, transferindo a toxina para o feto), o tipo de aflatoxina, a idade do animal e a composição da dieta (CAST, 2003; CULLEN; NEWBERNE, 1994; ROEBUCK; MAXUITENKO, 1994; SMITH; MOSS, 1985).

Tabela 1 - Toxicidade aguda da aflatoxina B_1 por ingestão oral

Espécie	DL_{50} (mg Kg^{-1} peso corporal)
Pato (macho) – 1 dia de vida	0,34 – 0,59
Truta	0,81
Coelho	0,30
Gato	0,55
Porco	0,62 – 2,0
Cão	0,50 – 1,0
Rato (macho)	6,0
Rato (fêmea)	18,0
Camundongo	9,0
Hamster (macho)	10,2
Galinha	6,0 – 16,0

Fonte: CAST, 2003; Cullen e Newberne, 1994; Roebuck e Maxuitenko, 1994; Smith e Moss, 1985.

Segundo o FDA/CFSAN (2006) e Cullen e Newberne (1994), o fígado é o primeiro órgão a ser atacado pelas aflatoxinas, podendo apresentar danos agudos, além do rim, pâncreas e baço, independente da espécie animal contaminada.

A aflatoxicose aguda ou efeito tóxico de curta duração causado pela ingestão das aflatoxinas ocorre quando da ingestão de quantidade elevada da toxina em uma única dose, caracterizando-se por desordem na atividade gastrointestinal, hemorragias múltiplas, danos agudos ao fígado, edema, alteração na digestão e no metabolismo, convulsão, paralisia e possivelmente morte (CAST, 2003; FDA/CFSAN, 2006; CULLEN; NEWBERNE, 1994).

As aflatoxinas ao serem absorvidas pelas aves promovem má digestão e má absorção pelas lesões causadas na moela, no intestino e no fígado; também enfraquecem os vasos sangüíneos, favorecendo o rompimento e o surgimento de hematomas na carne, o que traz prejuízos à carcaça; em suínos, além de lesões no fígado e redução no crescimento, promovem a redução da ativação do sistema imunológico, aumentando a susceptibilidade dos animais a infecções virais e bacterianas (BÜNZEN; HAESE, 2006).

Segundo o FDA/CFSAN (2006) e CAST (2003), o efeito tóxico causado por exposição às aflatoxinas por um período longo é denominado aflatoxicose crônica, isto é, ingestão de pequenas quantidades por longo período. Neste caso, o fígado torna-se hiperplásico e extremamente cirrótico, com fibrose progressiva com ou sem tumor, icterícia, perda de peso, baixa conversão

alimentar, taxas mais lentas de crescimento, carcinomas e mutagenicidade (ROEBUCK; MAXUITENKO, 1994; SMITH; MOSS, 1985).

De acordo com Dhingra e Netto (1998), a exposição do ser humano a aflatoxinas pode também ocorrer por via respiratória, durante a colheita, trilha, ensacamento, limpeza, armazenamento e processamento de grãos contaminados. Segundo os autores, estudos epidemiológicos evidenciam que as aflatoxinas, em partículas respiráveis, como pó de grãos representa um risco ocupacional.

As aflatoxicoses em humanos e outras micotoxicoses têm sido raramente relatadas, provavelmente, por dificuldades no diagnóstico, contudo algumas doenças possuem possível relação com a ingestão de alimentos contaminados pelas aflatoxinas como a Síndrome de Reye, o "kwashiorkor" e a cirrose indiana infantil (MEHAN et al., 1991). Já segundo Henry et al. (2001), a ingestão de alimentos contaminados com aflatoxinas está diretamente relacionada à incidência de câncer hepático.

2.2 Produção de aflatoxinas

Segundo Rodríguez-Amaya e Sabino (2002), as pesquisas realizadas entre 1991-2000 sobre as micotoxinas em alimentos e rações, no Brasil, superaram em 30% dos trabalhos publicados nas três décadas anteriores e, ainda assim, as aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim continuam alarmantes.

Estima-se que a perda anual de grãos por causa da presença de fungos seja em torno de 25% da produção mundial (FAO, 2007). A infecção fúngica, o desenvolvimento do fungo e a produção de aflatoxinas podem ocorrer nos grãos em todas as fases, passando pela pré-colheita, colheita e pós-colheita e seguindo a cadeia de industrialização com o armazenamento, transporte e comercialização (OMINSKI et al., 1994; PEREIRA, 1992). A produção de micotoxinas é influenciada por vários parâmetros incluindo a nutrição da planta, a atividade de água do grão e a temperatura de desenvolvimento vegetal (SWEENEY; DOBSON, 1998).

2.2.1 Pré-colheita e colheita

A infecção por fungos ainda no campo, na fase pré-colheita, pode ocorrer durante o desenvolvimento, a maturação e a pós-maturação dos grãos; o período pré-colheita inicia-se com a emergência da planta do solo e termina com a colheita da cultura (DHINGRA; NETTO, 1998).

Os fungos produtores de aflatoxinas nos grãos podem estar presentes em toda cadeia produtiva de um produto. Segundo Dhingra e Netto (1998), já foi observada a presença dos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* como patógenos de plantas, em milho e amendoim, respectivamente, com produção de aflatoxinas antes da colheita.

A produção das aflatoxinas pode ser favorecida durante a fase de pré-colheita dos grãos pela elevada temperatura e alta umidade relativa do ar, estresse hídrico da planta durante a formação e maturação dos grãos, deficiência nutricional, danos provocados por insetos, cultivo de genótipos susceptíveis, quantidade de esporos e o potencial toxigênico do fungo presente (CÔRTES et al., 2000; SMITH; MOSS, 1985; WILSON; PAYNE, 1994).

Genótipos de milho com alto teor de ácido graxo, principalmente o ácido linoléico, e com presença da enzima lipoxigenase apresentam maior resistência ao ataque fúngico no período pré-colheita, com conseqüente menor produção de grãos ardidos na colheita (MICOTOXICOLOGIA, 2007).

Os fungos iniciam sua colonização logo após o início da formação dos grãos e continuam se desenvolvendo ao longo da sua maturação e amadurecimento (LACEY et al., 1991). De acordo com Wilson e Payne (1994), a propagação dos *Aspergillus* pode ocorrer na forma de conídios, escleródios ou micélios e a disseminação dos inóculos se dar através ar, do solo e dos insetos.

De acordo com McMillian (1987), os insetos podem ser vetores de propágulos de fungos, incluindo os fungos produtores de aflatoxinas, ou podem causar danos nos grãos facilitando o seu acesso e o desenvolvimento.

Segundo Dhingra e Netto (1998), desde que haja inóculo em quantidade suficiente na época mais susceptível, isto é, altas temperaturas e estresse hídrico, ocorrem colonização fúngica e formação de aflatoxinas nos grãos na pré-colheita. De acordo com Lacey et al. (1991) e Jones (1987), os efeitos da irrigação parecem ser semelhantes ao da chuva, que lava a planta carregando os esporos e reduzindo incidência de *Aspergillus*.

De acordo com Jones (1987), altos níveis de contaminação de aflatoxinas em milho, por exemplo, podem estar associados a baixos níveis de aplicação de nitrogênio no solo, e, conseqüentemente, baixos teores de nitrogênio nas folhas e grãos. O estresse hídrico pode afetar a translocação do nitrogênio e o estado fisiológico da planta de milho, razão pela qual o autor recomenda cuidado na aplicação de nitrogênio, fósforo, potássio e micronutrientes para que não ocorra a toxidez pelo excesso de algum nutriente.

As perdas na colheita podem ser causadas principalmente pela falta de manutenção e regulagem das colhedoras, e também, por adversidades climáticas. Cuidados com a colheita podem reduzir significativamente os riscos de contaminação dos grãos (DHINGRA; NETTO, 1998; BARROS, 1986; JONES, 1987). Os equipamentos usados na colheita e no processamento dos grãos devem ser limpos para evitar a contaminação pela presença de inóculo da safra anterior (BARROS, 1986; OMINSKI et al., 1994).

O cuidado durante a colheita deve ser máximo de forma a se evitar os danos físicos decorrentes de desregulagens na velocidade da colheitadeira, na separação das impurezas e matérias estranhas, além da observância do teor de água dos grãos para que a operação das máquinas não cause quebras ou trincas que favorecem a absorção de água, facilitando a invasão e a penetração de fungos no interior dos grãos, levando ao desenvolvimento rápido e conseqüentemente produção de toxinas (ALMEIDA, 1999; DHINGRA; NETTO, 1998; MATA, 1998).

2.2.2 Pós-colheita

Os fungos são os principais microrganismos da microflora presente nos grãos armazenados e constituem a principal causa das deteriorações e perdas durante o armazenamento (PUZZI, 1986).

Os fungos de armazenamento podem estar presentes nos grãos como contaminantes ou, preferencialmente na forma de micélio dormente no embrião (PEREIRA, 1992).

Muitas vezes, o milho já chega contaminado para ser armazenado, o que pode acontecer quando o período da colheita coincide com altos índices de precipitação pluviométrica ou quando o milho permanece na lavoura após o estágio ideal de colheita (MICOTOXICOLOGIA, 2007).

A colheita e o pré-processamento são etapas importantes que influenciam a qualidade dos grãos armazenados (ALMEIDA, 1999). Uma colheita ou processamento incorreto pode acarretar aos grãos infestação por insetos e ataque de fungos. Isto pode causar a perda direta de produtos agrícolas, redução do poder germinativo das sementes e alteração da cor e do valor nutritivo dos grãos, além de reduzir o aproveitamento industrial e de seus subprodutos; como conseqüência, há o aumento dos custos indiretos para o controle de algumas micotoxinas, para poder tornar o produto aceitável pelo mercado importador (SAUER et al., 1992; PUZZI, 1986; WICKLOW, 1995).

Diferentes técnicas podem ser usadas para minimizar a deterioração dos grãos durante o armazenamento tais como limpeza, secagem, fumigação, fungicidas, inseticidas, aeração e armazenamento com atmosfera modificada (SMITH; MOSS, 1985).

A limpeza dos grãos, após a colheita, reduz a quantidade de materiais indesejáveis de uma massa de grãos (MILMAN, 2002), que podem ser fontes de contaminação de fungos, e facilita o processo de secagem. A secagem além de permitir relativa antecipação da colheita, é realizada para reduzir a quantidade de água até níveis que permitam a conservação dos grãos de forma a reduzir a respiração, o desenvolvimento de microorganismos, de insetos e as reações enzimáticas que aceleram a degradação do grão (LACEY et al., 1991; MILMAN, 2002; WICKLOW, 1995).

A aeração é realizada para que ocorra passagem de ar natural pelos grãos armazenados para promover o resfriamento e a secagem mais lenta, reduzindo assim a absorção de água pelos grãos após a secagem e o desenvolvimento fúngico (MILMAN, 2002; PUZZI, 1986). Segundo Ominski et al. (1994), temperaturas diferentes na massa de grãos podem resultar em uma transferência rápida de calor para áreas mais frias desta massa.

Durante o armazenamento e transporte, os fungos micotoxigênicos que estavam presentes nos grãos continuam presentes, podendo existir também outras fontes de inóculo como, por exemplo, outros produtos armazenados, as instalações de armazenamento e as de transporte.

Fatores como o tempo de incubação, a temperatura, potencial redox, pH e comunidades microbianas são relevantes para o crescimento fúngico durante o armazenamento (SMITH; MOSS, 1985), mas os principais são o teor de água, a atividade de água e a temperatura dos grãos (KAMINSKI; WASOWICZ, 1991; PUZZI, 1986; WILSON; PAYNE, 1994). Além disso, Pitt e Hocking (1997) não somente os fatores externos interferem no crescimento fúngico, como também a composição nutricional do grão é um fator importante que influencia o crescimento fúngico.

De acordo com Griffin (1994) e Pitt e Hocking (1997), mesmo que as condições ambientais como temperatura e atividade de água sejam semelhantes, fungos diferentes tem mais facilidade de crescimento em um alimento do que em outro alimento. Os autores explicam que, a fonte de carbono (tipo de açúcar, ácido graxo, etc.) é muito importante tal como a fonte de nitrogênio, o pH, a tensão de gases e a presença de íons metálicos.

Em grãos ricos em carboidratos, como o milho, estes são utilizados como fonte de nutrientes para o crescimento dos fungos. Segundo Mantovaneli (2001), o desenvolvimento de

Aspergillus na fase inicial causa reações celulares no embrião do grão e quando a deterioração do grão avança, ocorre degradação do amido dentro do endosperma que começa a partir do centro do grão.

Segundo Pomeranz (1992), a presença dos fungos nos grãos acarreta perda de nutrientes ou componentes de interesse tecnológico, em função das alterações nos carboidratos, proteínas, lipídios e vitaminas; os carboidratos podem ser consumidos no processo de respiração do grão, produzindo álcool e acido acético. Wasowicz (1991) encontrou redução de 66 a 75% de total de carboidratos em grãos de trigo inoculados com *A. flavus*.

De acordo com Wasowicz (1991), em amendoim, produto oleaginoso, as mudanças deteriorativas podem ser de forma oxidativa, com alteração do odor e sabor, e hidrolítica, com produção de ácidos graxos livres; o aumento da população de fungos, durante o armazenamento, é acompanhado por um aumento de ácidos graxo livres devido, principalmente, à atividade da lipase extracelular do fungo.

Tendo conhecimento da atividade de água é possível manter a estabilidade dos alimentos, minimizar as reações não enzimáticas de escurecimento e oxidação de lipídios e, também, prolongar a atividade de enzimas e vitaminas dos alimentos (POMERANZ, 1992).

O teor de água no grão é expresso em porcentagem do peso dos grãos, que expressa o total de água presente ou, em atividade de água que é a quantidade de água livre no grão, para participar das reações químicas e crescimento fúngico (KAMINSKI; WASOWICZ, 1991; LACEY et al., 1991).

O alto teor de água nos grãos armazenados acelera a deterioração em função do aumento de temperatura e favorece o ataque de pragas e o desenvolvimento fúngico. É preciso secar os grãos até um teor de água adequado antes da armazenagem para que não ocorram perdas quantitativas nem qualitativas (PUZZI, 1986). Segundo Almeida (1999), o teor máximo de água para armazenagem dos grãos é dependente da espécie do grão, do tipo de armazenamento, do período de estocagem e das condições ecológicas no local do armazenamento.

Segundo Sauer et al. (1992) e Lacey e Magan (1991), a atividade de água é o fator isolado mais importante na colonização dos grãos; conhecendo-se este fator é possível prever o desenvolvimento de células bacterianas e de fungos (Tabela 2), o tempo de geração, a taxa de crescimento dos microrganismos, a taxa respiratória e a alteração da temperatura dos grãos. Uma

micotoxina pode ser produzida por espécies diferentes e um determinado fungo pode produzir várias micotoxinas (Tabela 2).

Tabela 2 - Limite mínimo de atividade de água para crescimento de algumas espécies fúngicas de armazenamento e para produção de micotoxinas

Espécies	Micotoxinas	Atividade de água*	
		Crescimento	Produção de toxinas
Aspergillus flavus	Aflatoxinas	0,78 - 0,80	0,82 - 0,87
Aspergillus parasiticus	Aflatoxinas	0,78 - 0,82	0,87
Aspergillus ochraceus	Ácido penicílico	0,77	0,88
Aspergillus ochraceus	Ocratoxina A	0,76 – 0,85	0,85 - 0,88
Aspergillus clavatus	Patulina	0,88	0,95 - 0,99

Fonte: Ominski et al., 1994; Kozakiewicz e Smith, 1994; Sautour et al., 2002; Ribeiro et al., 2006.
Notas: Sinais convencionais utilizados:
* Não foi relatado qual o substrato foi realizado a leitura da aa.

Outro fator usado para detectar a deterioração de grãos armazenados é a temperatura. A ação desta sobre a conservação dos alimentos e outros materiais biológicos é conhecida universalmente e sabe-se que são desejáveis valores de temperatura reduzidos, pois a maioria das reações químicas sãos aceleradas na presença de temperaturas elevadas (KAMINSKI; WASOWICZ 1991; PUZZI, 1986).

A temperatura inicial de grãos armazenados deve ser igual ou inferior à temperatura do ar atmosférico, baixas temperaturas reduzem o desenvolvimento de microrganismos, insetos e ácaros que atacam os grãos. Em regiões tropicais a temperatura de 30ºC é considerada temperatura ambiente podendo alguns fungos crescer durante o armazenamento (KOZAKIEWICZ; SMITH, 1994; PITT; HOCKING, 1997; SAUTOUR et al., 2002).

As condições ótimas para produção de micotoxinas por um fungo não são necessariamente as mesmas condições ótimas para o crescimento e germinação (Tabela 3) (GONÇALEZ et al., 2001; KOZAKIEWICZ; SMITH, 1994; OMINSKI et al., 1994; RIBEIRO et al., 2006; SAUTOUR et al., 2002; SMITH; MOSS, 1985; WILSON; PAYNE, 1994).

Tabela 3 - Temperaturas para crescimento e para produção de toxinas de alguns fungos comuns em armazenagem de grãos

Espécies	Temperatura* (°C)			Micotoxina	Temperatura* (°C)
	Mínima	Ótima	Máxima		
Aspergillus flavus	10 - 15	35 - 45	45 - 50	Aflatoxinas	30
Aspergillus restrictus	5 - 10	30 - 35	40 - 45		...
Aspergillus ochraceus	8	24 - 31	30 - 37	Ácido penicílico	22
Aspergillus ochraceus	8	24 - 31	30 - 37	Ocratoxina A	30
Aspergillus candidus	10 - 15	45 - 50	50 - 55		...
Aspergillus parasiticus	12	32	42	Aflatoxinas	30

Fonte: Ribeiro et al., 2006; Sautour et al., 2002; Pitt e Hocking, 1997; Kozakiewicz e Smith, 1994.
Nota: Sinais convencionais utilizados:
* Não foi relatado em qual substrato foi observado a temperatura.
... Dado numérico não disponível.

2.3 Controle do crescimento fúngico e produção de toxinas

A contaminação na pós-colheita de grãos por fungos e micotoxinas pode ser controlada usando métodos físicos e/ou métodos químicos e alguns são de alto custo, mas essenciais para a manutenção da qualidade dos grãos. Os métodos físicos como secagem, aeração e outros são práticos e de baixo custo, se aplicados de forma correta e preventiva e podem ser eficientes, não necessitando o uso dos métodos químicos (SMITH; MOSS, 1985).

A prevenção da produção de micotoxinas é uma abordagem mais desejável do que o controle, a maioria das micotoxinas é quimicamente estável e resistem às condições de processamento como temperaturas elevadas (MICOTOXICOLOGIA, 2007).

Muitos dos tratamentos para a descontaminação dos grãos não são economicamente viáveis, apresentam uma relação custo/benefício desfavorável, visto que os resultados podem ser variáveis e alguns produtos podem promover a redução da palatabilidade (BÜNZEN; HAESE, 2006). Os métodos químicos incluem, além de fungicidas e fumegantes, os ácidos orgânicos, ervas e condimentos, óleos essenciais, antioxidantes, metilxantinas e substâncias cloradas (RANZANI, 1993).

De acordo com Bünzen e Haese (2006) alguns programas de descontaminação que visam controlar o desenvolvimento de fungos em grãos armazenados usam amoníaco, bissulfito de sódio, formaldeído e ácido ascórbico.

Sauer e Tuite (1986) relataram o uso de ácidos orgânicos, principalmente, o ácido propiônico, no controle de fungos durante o armazenamento, aplicado puro ou misturado ao ácido acético, ácido isobutírico e formaldeído. Os autores revelaram sua preocupação em relação ao uso destes produtos, pois, requerem cuidados na administração dada a sua corrosividade. Devem ser aplicados nas dosagens certas e a aplicação deve ser uniforme para que não ocorra super dosagem, implicando em gastos excessivos, ou subdosagem, que além de não ter efeito curativo pode resultar em crescimento acelerado dos fungos e produção de aflatoxinas (SAUER et al., 1992; SAUER; TUITE, 1986).

Segundo Bünzen e Haese (2006), na prática existem empresas recebendo grãos com alta umidade, executando uma secagem até 15 ou 16% de umidade e em seguida adicionando antifúngicos para o armazenamento, mesmo quando as condições de aeração são inexistentes ou precárias. De acordo com Mata (1998), há muitos procedimentos que visam à destruição de fungos de armazenamento, mas nenhum deles são satisfatórios ou aplicados em todos os produtos agrícolas contaminados.

Os óleos essenciais podem ser interessantes fontes para base de novos produtos com diferentes funções. Alguns compostos naturais de plantas já vêm sendo/são usados, tradicionalmente, na preservação de alimentos em alguns países como Índia, Egito, Japão e Rússia (SHAHI et al., 2003; SOLIMAN; BADEAA, 2002; MONTES-BELMONT; CARVAJAL, 1998; WILSON; WISNIEWSKI, 1992). A utilização de óleos essenciais para controle do desenvolvimento de fungos e bactérias que ocorrem em plantas, grãos, cereais e derivados é relatada na literatura (ALVAREZ-CASTELLANOS et al., 2001; DHINGRA et al., 2004; PARANAGAMA et al., 2003; SINGH et al., 1993).

2.3.1 Óleo essencial: características e ações

Desde o descobrimento das aflatoxinas, numerosas substâncias e condições ambientais foram estudadas como agentes que controlariam efetivamente o crescimento e a produção de aflatoxinas por *A. flavus* e *A. parasiticus*. Muitas substâncias já foram identificadas como controladoras da produção de toxinas, mas o efeito geralmente é sobre o crescimento fúngico, e dependendo da concentração são muito tóxicos à saúde humana e animal (ZAIKA; BUCHANAN, 1987).

Os óleos essenciais são produzidos por plantas e podem ser destinados a produtos medicinais (fármacos), industriais (odorizantes) e perfumaria (BOLAND et al., 1991; PENFOLD; WILLIS, 1961; SILVA, 2000). A International Standard Organization (ISO) define óleo essencial como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos (SALGADO, 2001). Já Woolf (1999) define óleo essencial como qualquer classe de óleos voláteis que compõe uma mistura de hidrocarbonetos complexos (normalmente terpenos) e outras substâncias químicas extraídas de uma planta, normalmente por um método de destilação.

Os óleos essenciais são extraídos de todas as estruturas das plantas desde que estas partes tenham glândulas que armazenam óleo. Segundo Maia (1994), os óleos essenciais não têm função direta nas principais atividades bioquímicas da planta como fotossíntese, respiração, síntese de proteínas, mas tem função direta na atração de polinizadores e repelência de insetos.

Os óleos são formados por compostos orgânicos voláteis, geralmente por terpenóides e fenilpropenos (alilfenóis, lignóides e cumarinas) (SALGADO, 2001; SILVA, 2000). Os terpenóides podem ser divididos em monoterpenos (10 carbonos) e sesquiterpenos (15 carbonos), e são formados por duas ou mais unidades de isoprenos (BOLAND et al., 1991; CROTEAU, 1987; SILVA, 2000).

Os monoterpenos podem ser classificados como acíclicos (cadeia aberta), monocíclicos (um anel com seis átomos de carbono) e bicíclicos (dois anéis com seis átomos de carbono cada) (BOLAND et al., 1991; CROTEAU, 1987). Segundo Martins (1996), podem ocorrer modificações nas estruturas dos monoterpenos pela adição ou remoção de duplas ligações ou ainda adição de oxigênio formando álcoois, cetonas, aldeídos e ésteres.

São conhecidas mais de 3.600 estruturas sesquiterpênicas, estas têm grande diversidade estrutural e estereoquímica, pois possuem cinco carbonos a mais que os monoterpenos; os sesquiterpenos são menos voláteis e tem menos propriedades organolépticas do que os monoterpenos, no entanto, podem influenciar delicadamente o odor dos óleos nos quais ocorrem (BOLAND et al., 1991; MARTINS, 1996; SILVA, 2000). Como exemplos de monoterpenos podem ser citados o citronelal, o citronelol e o 1,8-cineol e de sesquiterpenos, o globulol e o β-eudesmol (BOLAND et al., 1991; CROTEAU, 1987).

Os fenilpropenos são menos abundantes do que os terpenos e possuem em suas estruturas um anel benzênico com uma cadeia lateral composta de três carbonos que apresentam uma dupla

ligação e podem ter um grupo funcional com oxigênio (MARTINS, 1996). Segundo Croteau et al. (1994) e Croteau (1987), estes possuem propriedades inseticidas, nematicidas, farmacológicas e aromatizantes. A lignina, os flavonóides e o estragol são exemplos de fenilpropenos.

A composição química dos óleos essenciais pode diferir para cada espécie ou subespécie devido ao ambiente, à sazonalidade, aos tratos culturais, às formas de extração e outros fatores os quais são responsáveis por mudanças na composição dos óleos essenciais (BOLAND et al., 1991; DAFERERA et al., 2002; MAIA, 1994). Silva et al. (2006) observaram que a umidade do solo e a temperatura do ar influenciam a produção de óleo essencial, as mais baixas e as mais altas produções de óleo essencial por espécies de *Eucalyptus* aconteceram na primavera e no verão, respectivamente. Segundo os autores, a deficiência hídrica na primavera refletiu no baixo rendimento do óleo enquanto que no verão houve altas temperaturas e não houve estresse hídrico.

Viturro et al. (2003) identificaram diferentes concentrações do composto 1,8-cineol no óleo essencial de *E. globulus*: 64,5% na amostra do Uruguai, 75 a 77% na de Cuba, 58 a 82% na do Marrocos, 48,7% na da África e 73% na da Índia.

Um dos métodos utilizados para estudar a composição química do óleo essencial é a cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM), pois permite a identificação dos compostos encontrados em um óleo comparando o tempo de retenção relativa nos espectros de massa (DAFERERA et al., 2002).

Muitos autores já pesquisaram o efeito de extratos e o óleo essencial de plantas sobre fungos, bactérias, vírus, leveduras e sobre a produção de toxinas por estes microrganismos (ALVAREZ-CASTELLANOS et al., 2001; BENJILALI et al., 1984; CONNER; BEUCHAT, 1984; DHINGRA et al., 2004; FIORI et al., 2000; MONTES-BELMONT; CARVAJAL, 1998; NGUEFACK et al., 2004; PARANAGAMA et al., 2003).

Pesquisas indicam que muitos condimentos contêm componentes com atividades inibidoras de produção de aflatoxinas (BULLERMAN et al., 1977; BUCHANAN; SHEPHERD, 1981; SOLIMAN; BADEAA, 2002). De acordo com Montes-Belmont e Carvajal (1998), os óleos essenciais do grupo dos condimentos (temperos) são os que têm mostrado melhores resultados como antifúngicos, talvez porque o óleo essencial de condimentos e seus principais compostos são os mais estudados, embora todas as plantas produzam óleos com potencial para interferir no crescimento de microorganismos.

Pereira et al. (2006) estudaram a ação dos óleos essenciais dos condimentos alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), cebola (*Allium cepa* L.), manjericão (*Ocimum basilicum* L.), menta (*Mentha piperita* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) sobre o desenvolvimento dos fungos *Fusarium* sp., *Aspergillus ochraceus, A. flavus* e *A. niger.* Os autores observaram que o óleo essencial de orégano inibiu o desenvolvimento dos fungos testados em todas as concentrações exceto o fungo *A. niger* que teve o seu desenvolvimento micelial inibido a partir da concentração de 1.000 mg mL^{-1} e os óleos de alecrim, menta, cebola e manjericão tiveram um efeito pronunciado a partir da concentração de 1.500 mg mL^{-1}.

Bullerman et al. (1977) observaram que os óleos essenciais de canela (*Cinamomum ceylanicum*) a 200ppm e de cravo (*Dianthus caryophyllus*) a 250ppm inibiram o crescimento e a produção de toxina de *A. parasiticus*, enquanto que o aldeído cinâmico e o eugenol, principais constituintes dos óleos essenciais, apresentaram efeito inibidor a 150 e 125ppm, respectivamente, e foram apontados como os de maior atividade antifúngica.

A eficiência "in vitro" dos óleos essenciais de alho (*Allium sativum*), canela, cravo e tomilho (*Thymus vulgaris*) sobre o desenvolvimento micelial dos fungos *Rhizopus* sp., *Penicillium* spp., *Eurotium repens* e *A. niger* foi avaliada por Chalfoun et al. (2004) que constataram uma inibição total do óleo de canela sobre os fungos testados; o cravo inibiu o desenvolvimento dos fungos a partir da concentração de 600mg mL^{-1}.

Garc e Siddiqui (1992) realizaram trabalhos com constituintes isolados do óleo essencial de manjericão evidenciando a ação fungistática em diversos fungos; o eugenol testado na diluição de 1:100 e 1:200 apresentou forte ação contra *Absidia glauca, Alternaria alternata, A. niger, Colletotricum capsici, Fusarium moliniforme* e *Rhizopus nodosus.*

Singh et al. (1993) utilizaram extrato aquoso de manjericão em frutas de banana para controle de doenças provocadas por fungos do gênero *Fusarium, Helminthosporium, Curvularia, Aspergillus* e *Trichothecium* e observaram atraso no aparecimento dos primeiros sintomas das doenças em relação ao controle.

Tantaoui et al. (1993) observaram que os óleos essenciais de orégano e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) afetaram a reprodução assexuada dos fungos *A. niger*, *Penicillium italicum* e *Zygorrhynchus* sp., mas os óleos foram mais ativos sobre o crescimento micelial, e sobre a germinação de esporos e esporulação.

Ao avaliar o efeito do timol, principal componente dos óleos de orégano e de tomilho, Buchanan e Shepherd (1981) constataram que a produção das aflatoxinas foi inibida igualmente ou em menor quantidade que o crescimento fúngico, indicando que a atividade do timol sobre o crescimento não interfere diretamente na produção de aflatoxinas do *A. parasiticus*.

O efeito do extrato das cascas de fruta de *Garcinia cowa* e de *Garcinia pedunculata* com hexano e com clorofórmio no crescimento e produção de aflatoxinas de *A. flavus*, usando pó de amendoim como substrato, foi estudado por Joseph et al. (2005). Os autores observaram que a concentração necessária para a inibição de crescimento do fungo era menor do que para inibir a produção de aflatoxinas.

Salgado (2001) avaliou a ação fungitóxica do óleo essencial de espécies de eucaliptos sobre fungos fitopatogênicos tais como, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxisporum* e *Bipolaris sorokiniana* e observou inibições significativas no crescimento micelial. Segundo a autora, o óleo de *Eucalyptus urophylla* foi o que apresentou maior ação fungitóxica, a qual foi atribuída à presença do composto denominado globulol, ausente nos *Eucalyptus camaldul* e *Eucalyptus citriodora*.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Artemisia asiática* e seus principais componentes sobre as bactérias *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, Rhodotorula rubra* e o fungo *Aspergillus fumigatus* foi investigado por Kalemba et al. (2002). Os autores constataram que a atividade do composto 1,8-cineol (eucaliptol) sobre o fungo foi inferior à sua atividade sobre as bactérias e quando comparados, composto e óleo essencial, o primeiro obteve menor eficiência na inibição do crescimento dos microrganismos estudados.

Os óleos de citronela (*Cymbopogon nardus*), eucalipto (*E. globulus*) e citros (*Citrus aurantium*) foram avaliados por Souza et al. (2006) sobre o crescimento micelial dos fungos *Colletotrichum lindemuthianum* e *Rhizoctonia solani.* Os autores observaram que o óleo essencial de citronela inibiu 100% do crescimento micelial de ambos os fungos a partir da dose de 1.000ppm e que os óleos de citros e eucalipto não reduziram significativamente o crescimento de *C. lindemuthianum* em nenhuma das concentrações avaliadas, enquanto que para *R. solani* a inibição foi à partir de 1.500ppm.

Silva et al. (2003) constataram efeitos analgésicos periféricos e centrais e atividades antiinflamatórias de extratos de óleo essencial de *E. citriodora*, *E. tereticornis* e *E. globulus.*

Dewit et al. (1979) estudaram o efeito dos óleos de alho e de cebola na produção da toxina botulínica e verificaram que na concentração 1.500ppm os óleos inibiram a produção da toxina botulínica tipo A, mas não afetaram a produção de toxina tipo B e E.

Segundo Alitonou et al. (2004), o óleo de *Eucalyptus tereticornis* tem amplo poder inibitório na formação de colônias e no crescimento fúngico apresentando atividade fungicida (destruiu completamente *Saccharomyces* spp., *Sporobolomyces* e *Hansenula* spp.), bactericida (destruiu *Corynebacteriaceae* spp.) e fungistática (inibiu o crescimento de *Torulopsis candida*).

Conner e Beuchat (1984) observaram que leveduras foram sensíveis na presença de oito tipos de óleos essenciais e apenas o óleo de alho inibiu a formação de colônias em 100% de todas as leveduras testadas (*Cândida lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula anômala*, *Kloeckera apiculata*, *Lodderomyces elongispotus*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulopsis glabrata*) e o óleo de cebola demonstrou completa inibição apenas para *S. cerevisiae*.

O desenvolvimento de resistência dos vírus por agentes antivirais aumentou a busca por substâncias naturais com esta propriedade, as plantas medicinais têm uma variedade de substâncias químicas que têm a habilidade de inibir a replicação de vários tipos de DNA ou de RNA, os óleos essenciais de *Cardamine angulata, Conocephalum conicum, Lysichiton americanum, Polypodium glycyrrhiza* e *Verbascum thapsus* demonstraram atividades antivirais sobre o vírus tipo 1 da herpes (JASSIM; NAJI, 2003). Schnitzler et al. (2001) relataram que os óleos essenciais de *Melaleuca alternifólia* (árvore de chá) e de eucalipto exibiram alta atividade antiviral contra o vírus HSV-1 e HSV-2**.**

A atividade antifúngica do óleo essencial das flores de *Chrysanthemum coronarium* sobre doze patógenos foi estudada por Alvarez-Castelanos et al. (2001) que concluíram que o óleo, quando em contato, inibe em mais de 80% os patógenos *Alternaria* sp, *A. flavus* e *Pythium ultimum,* e os compostos voláteis do óleo inibem na mesma proporção os patógenos *Alternaria* sp., *Alternaria brassicola*, *P. ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Serpula lacrymans*.

O óleo de sementes de mostarda (*Brassica rapa*) inibiu completamente o crescimento "in vitro" de *R. solani* em baixas concentrações (50µL L^{-1}) e quando misturado na água de irrigação (150µL L^{-1}) controlou 95% do tombamento e requeima em mudas de feijão-vagem (DHINGRA et al., 2004).

A forma de ação dos óleos essenciais na citomorfologia e fisiologia dos microrganismos ainda é pouco estudada, mas Rasooli et al. (2006) testaram o mecanismo de inibição dos óleos de *Thymus eriocalyx* e *Thymus x-porlock* sobre *A. niger* e observaram que os óleos causaram danos irreversíveis à parede celular, à membrana celular e às organelas das células. De acordo com os autores, o micélio exposto aos óleos mostrou mudanças morfológicas nas hifas, rompimento da membrana plasmática e destruição das mitocôndrias.

Billerbeck et al. (2001) avaliaram o efeito da citronela no crescimento do *A. niger* e observaram modificações estruturais nas hifas do fungo depois do tratamento com o óleo, a principal mudança observada foi no diâmetro das hifas, além de as paredes celulares estarem visivelmente mais finas. Segundo os autores, estas modificações nas estruturas citológicas poderiam ser causadas pela interferência do óleo essencial nas enzimas responsáveis pela síntese da parede, afetando o desenvolvimento normal; o óleo causou ainda o rompimento da membrana do protoplasma e a desorganização nas estruturas das mitocôndrias.

O fitopatógeno *Didymella bryoniae* na presença do óleo de *Achillea millefolium* apresentou hifas mais curtas e rompimento nas paredes, observando extravazamento do conteúdo citoplasmático (FIORI et al., 2000).

Bianch et al. (1997) observaram que o extrato aquoso de alho aumentou os vacúolos e provocou grandes alterações na membrana citoplasmática de *P. ultimiu;* em *R. solani* houve engrossamento da parede celular; enquanto que no *Fusarium solani* o óleo de alho apenas reduziu o diâmetro das hifas. Zambonelli et al. (2004) estudaram os efeitos do óleo de tomilho e do composto timol sobre a citomorfologia das hifas de fungos e concluíram que o óleo e o composto causam aumento no vacúolo do citoplasma, acúmulo de lipídios e alterações na mitocôndria e no retículo endoplasmático.

Alguns autores ainda citam o uso de óleos essenciais combinados com outros produtos químicos como o cloreto de sódio, sorbato de potássio e ácido acético (AKGUL; KIVANÇ, 1988; AZZOUS; BULLERMAN, 1982).

Akgul e Kivanç (1988) avaliaram a atividade inibidora de cominho, coentro, louro, orégano, salsa, hortelã, manjericão e mostarda no crescimento de fungos veiculados por alimentos e verificaram um efeito inibidor pronunciado do óleo de orégano, além de um efeito sinérgico resultante da combinação deste óleo com cloreto de sódio.

Azzous e Bullerman (1982) avaliaram a atividade inibidora de condimentos e produtos químicos comerciais sobre fungos toxigênicos e relataram que o cravo, a canela, a mostarda, a pimenta da Jamaica, o alho e o orégano foram, em ordem decrescente, os antifúngicos mais eficientes. Segundo os autores combinações de diferentes concentrações de cravo com sorbato de potássio levaram a um possível efeito inibidor sinérgico no crescimento dos fungos.

Os óleos essenciais também possuem ação inseticida e carrapaticida. Estudos avaliaram a eficiência de folhas de algumas espécies de eucaliptos sobre insetos deterioradores de grãos (BOUDA et al., 2001; CHAGAS et al., 2002; PAPACHRISTOS; STAMOPOULOS, 2004).

Papachristos e Stamopoulos (2004) testaram óleos essenciais de flores de *Lavandula hybrida*, de folhas de *Rosmarinus officinalis* e de frutos verdes de *E. globulus* na inibição de ovos de *Acanthoscelides obtectus*, *e* observaram que a exposição dos ovos a vapores do óleo aumentou a mortalidade pós-embrionária da larva emergida; os óleos de lavanda e de rosa mostraram um potencial semelhante, enquanto que o óleo de eucalipto foi menos tóxico.

Lee et al. (2001) estudaram a toxicidade de vários óleos e componentes voláteis em *Sitophilus oryzae* que ataca o arroz; o óleo essencial que obteve melhores resultados foi o de eucalipto (DL_{50}=28,9μL L^{-1}), que se mostrou rico em 1,8-cineol (81,1%), limoneno (7,6%) e α-pineno (4,0%). Os autores trataram *S. oryzae* com cada um destes terpenos e demonstraram que o 1,8-cineol é o composto mais ativo (DL_{50}= 23,5μL L^{-1}) seguido pelo benzaldeído (DL_{50}=8,65μL L^{-1}). Segundo os autores, outros voláteis naturais como o benzaldeído poderia ser usado como fumegante mais seguro do que os usados atualmente para controlar insetos pragas de grãos armazenados.

Tapondjou et al. (2005) avaliaram os efeitos repelentes e tóxicos do composto cimol, e dos óleos essenciais de *Eucalyptus saligna* e de *Cupressus sempervirens*, sobre os insetos pragas *Sitophilus zeamais* e *Tribolium confusum*, o óleo de eucalipto apresentou maior toxicidade do que o óleo de *C. sempervirens* em ambas as espécies de inseto (DL_{50}=0,36μL cm^{-2} para *S. zeamais* e 0,48μL cm^{-2} para *T. confusum*). Os autores observaram que os extratos de óleo crus apresentaram maior atividade repelente contra os insetos teste do que o cimol, que é o composto químico encontrado em maior quantidade.

O óleo essencial de *E. staigeriana* matou 100% de larvas e fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* a uma concentração de 12,5%, mostrando melhor eficiência do que o óleo de *E. citriodora* (17,5%) e *E.globulus* (15%) (CHAGAS et al., 2002).

2.4 Óleo essencial de *Eucalyptus* spp.

Até o início do século XX, o eucalipto era plantado somente para fins paisagísticos, pela sua eficiência como quebra-vento, ou por supostas propriedades sanitárias. Segundo Martini (2006), hoje o eucalipto tem sido utilizado para os mais diversos fins e os produtos dele derivados representam expressiva parcela do saldo positivo obtido pela balança comercial do Brasil no ano de 2003. A maior parte das plantações de eucaliptos no Brasil tem a finalidade de papel e carvão, mas têm aumentado o uso dessas espécies para madeira, para construção civil e para extração de essências (SILVA et al., 2006).

O gênero *Eucalyptus* pertence à família das Myrtaceae e subgênero Corymbia, de ocorrência natural na Austrália; dentre as aproximadamente 600 espécies de eucalipto descritas, pouco mais de 200 têm sido estudadas com relação à produção e ao teor de óleos essenciais, e menos de 20 são exploradas comercialmente (VITTI; BRITO, 2003). Segundo Salgado (2001), seu cultivo se adapta melhor a regiões temperadas.

Segundo Foley e Lassak (2004), os óleos de eucaliptos contêm muitas combinações químicas que exercem várias funções nas plantas como defesa contra insetos e herbívoros vertebrados, proteção à radiação ultravioleta e contra estresse de frio. De acordo com os autores, as combinações químicas mais conhecidas são os terpenóides, que atribuem às folhagens dos *Eucalyptus* o odor característico.

De acordo com Viturro et al. (2003) o principal componente dos óleos essenciais de eucaliptos é o 1,8-cineol e na Argentina esse tipo de óleo é obtido exclusivamente de folhas do *E. globulus*, que é um subproduto da extração da madeira.

Alguns dados relatados pela FAO (2007) sobre a toxicidade do óleo essencial de eucaliptos é de que a dose letal oral para matar 50% de ratos (DL_{50}) é 4.440mg de óleo por quilo de peso vivo do animal, e o composto 1,8-cineol é classificado como um álcool terpenóide e com toxicidade oral para ratos DL_{50} de 2.480mg por quilo de peso vivo. Autores como Santos e Rao (2002) e Nog et al. (2003) testaram a toxicidade deste composto em ratos e outros mamíferos como o coala, e verificaram certa toxicidade deste composto para estes animais.

Os óleos essenciais de eucaliptos são obtidos geralmente por destilação das folhas de eucalipto e têm como característica particular o aroma das espécies usadas. Os óleos de eucaliptos estão divididos basicamente em três grupos principais em função do seu uso final:

óleos destinados a produtos medicinais, óleos industriais e óleos de perfumaria (BOLAND et al., 1991; FAO, 2007; PENFOLD; WILLIS, 1961).

Destes, o mais importante em termos de volume de produção e comércio é o tipo medicinal, que é caracterizado por um alto conteúdo de 1,8-cineol no óleo (COPPEN, 1995). Segundo Silva et al. (2006), a espécie utilizada para este fim é o *E. globulus*. Segundo a FAO (2007), a produção mundial anual de todos os tipos de óleos de eucalipto é de aproximadamente 63% para fins medicinais, 33% são óleos para perfumaria e 4% são óleos industriais.

A qualidade do óleo medicinal é dada pelo seu teor do composto principal, devendo o óleo conter no mínimo 70% de 1,8-cineol e estar livre de α e β-felandreno (BOLAND et al., 1991; PENFOLD; WILLIS, 1961; SALGADO, 2001). As principais espécies produtoras de óleos essenciais para essa finalidade, no Brasil, são o *E. citriodora*, *E. globulus* e o *E. smithii* (VITTI; BRITO, 2003; FAO, 2007). Segundo Silva et al. (2003), os óleos essenciais de eucaliptos podem ser usados em medicamentos utilizados para o tratamento de resfriados, febre e infecções branquiais.

Os óleos para fins industriais, segundo Salgado (2001), contêm principalmente piperitona e α-felandreno. De acordo com Penfold e Willis (1961) os óleos ricos em felandreno são utilizados quase que exclusivamente para aromatizar os desinfetantes e na indústria de sabonetes líquidos, enquanto que a piperitona é usada para síntese de timol e mentol que são usados como flavorizantes, como aditivos em preparações medicinais e para síntese de fungicidas. Segundo os autores, na indústria de perfumes poucas espécies são usadas como: *E. citriodora*, *E. staigeriana* e *E. macarthuri*, pois apresentam citronelal e citral como principais componentes.

De acordo com Verlet (1993a), a produção mundial de óleo essencial superava 45.000 toneladas por ano, representando mais de US$ 700 milhões. De acordo com dados do International Trade Centre (TradeMap - ITC), em 2004 o valor mundial estimado de exportação foi de US$ 1,5 bilhões.

O Brasil se posiciona como o 4º maior exportador, com aproximadamente US$ 98,5 milhões, depois dos EUA, França e Reino Unido, e em 2004 importou 2.761 mil toneladas ocupando a 10ª colocação quanto à importação, o que representa aproximadamente US$ 42 milhões (VILHA et al., 2007).

Segundo Melo (2005), de janeiro a outubro de 2005 no Brasil, os óleos essenciais, em geral, renderam US$ 80 milhões, e o país tem condições de aumentar sua participação, como

fornecedor, no mercado externo de óleo essencial. De acordo com o autor, na década de 70 o Brasil foi o maior produtor de óleo essencial de menta, usado na indústria de higiene, limpeza, perfumaria e de alimentos. A estimativa da produção mundial do óleo de *E. globulus* segundo Verlet (1993b) foi de US$ 15.550 milhões, sendo superior ao óleo essencial do *E. citriodora* com US$ 3.400 milhões.

2.5 Material e métodos

2.5.1 Caracterização e quantificação da composição química do óleo essencial

Empregou-se neste estudo óleo essencial de folhas de *Eucalyptus globulus*, obtido através do processo de destilação cedido pelo Laboratório de Química, Celulose e Energia do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo - ESALQ/USP. Este óleo foi caracterizado quanto a sua composição química no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

A análise de quantificação do 1,8-cineol e caracterização dos compostos foi realizada utilizando um equipamento GC-EM – QP5000 (SHIMADZU) com uma coluna capilar DB-5 (30m x 0,32mm de diâmetro interno x 0,25µm). A temperatura foi programada para iniciar em 60°C e aquecer durante 1 minuto, numa taxa de 4°C min^{-1} até 110°C em seguida aumentar numa taxa de 25°C min^{-1} até 220°C, na qual permaneceu por 1 minuto. Utilizou-se Hélio, com um fluxo de 1mL min^{-1} como gás de arraste, temperatura do detector de 280°C e injeção no modo split. O espectro de massa foi determinado em 70eV e o intervalo da relação massa/carga ($m\ z^{-1}$) foi de 50 a 500.

Visando quantificar o composto majoritário presente no óleo essencial, construiu-se uma curva de calibração a partir de padrão analítico de 1,8-cineol da Aldrich (C80601). Para a construção da curva, o padrão na forma líquida foi dissolvido em acetato de etila e soluções com concentrações de 1,0; 0,6; 0,4 e 0,2mg mL^{-1} foram injetadas em triplicatas. A partir das médias das áreas dos picos de cada concentração foi construída uma curva. Em seguida, para a quantificação do 1,8-cineol no óleo de *Eucaliptus globulus* foi injetado 1mg mL^{-1} do óleo diluído em acetato de etila. A área obtida correspondente ao composto 1,8-cineol foi aplicada à equação derivada da curva de calibração do composto, para obtenção da quantidade do composto presente no óleo.

Como na injeção de 1mg mL^{-1} da solução do óleo de *E. globulus* não foi possível identificar e caracterizar todos os picos dos compostos voláteis do óleo, foi necessário injetar novamente em uma concentração de 2mg mL^{-1}. Em seguida comparou-se os índices de Kovats (IK) calculados (Equação 1) para cada composto, presente no cromatograma do óleo essencial, com os IK's da literatura (ADAMS, 2001), e entre os respectivos espectros de massa.

$$IK = \frac{(t_x - t_{n-1})}{(t_n - t_{n-1})} \times 100 \times \Delta C + C_{n-1} \times 100 \qquad (1)$$

Em que:
IK = índice de Kovats do composto detectado
t_x = tempo de retenção do composto detectado
t_{n-1} = tempo de retenção do alcano de menor cadeia, com tempo de retenção mais próximo ao composto detectado
t_n = tempo de retenção do alcano de maior cadeia, com tempo de retenção mais próximo do composto detectado
C_{n-1} = quantidade de carbonos do alcano de menor cadeia, com tempo de retenção mais próximo ao composto detectado
ΔC = diferença entre a quantidade de carbonos entre o alcano de maior e menor cadeia, com tempos de retenção mais próxima do composto detectado.

A obtenção dos IK's foi realizada através dos tempos de retenção dos compostos detectados e dos tempos de retenção dos alcanos contidos em uma solução padrão em acetato de etila (nonano, decano, undecano, dodecano, tridecano, pentadecano, hexadecano, octadecano). A solução padrão contendo os oito alcanos foi injetada separadamente, após a injeção do óleo no CG-EM para realização da identificação dos picos.

Foram consideradas identificadas as substâncias com espectros de massa idênticos aos da literatura. A faixa de tolerância entre os valores de IK calculados e entre os valores tabelados (ADAMS, 2001) foi de ±10 unidades, exceto para o composto majoritário.

2.5.2 Fungos

Como culturas teste foram utilizados os fungos produtores de aflatoxinas *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Os fungos foram obtidos na micoteca do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP.

Para verificar o potencial aflatoxigênico das espécies em estudo, os fungos foram inoculados no meio de cultura extrato de levedura e sacarose (YES), cultivando-os por sete dias na temperatura de 20°C (±2°C) e sob fotoperíodo de 12h. Após este período com auxílio de uma

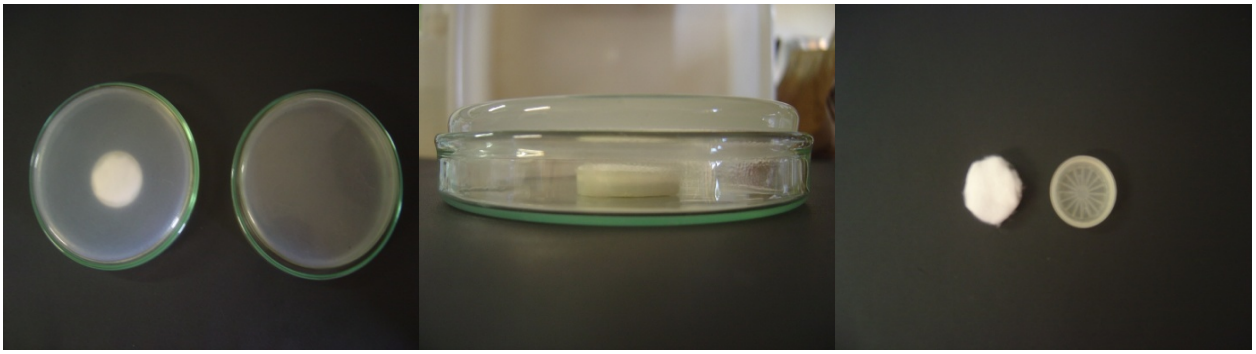
espátula foram retirados pequenos fragmentos do meio de cultura com colônia e submetidos à extração de aflatoxinas com clorofórmio.

2.5.3 Modos de avaliação "in vitro" do óleo essencial

O método utilizado foi o bioanalítico, "in vitro", observando o crescimento micelial em diferentes concentrações dos óleos (ALVAREZ-CASTELLANOS, 2001).

Para verificar a eficiência da ação do óleo essencial por contato foram adicionados diferentes volumes de OE de *E. globulus* ao meio de cultura YES já autoclavado por 20 minutos a 120ºC/1atm. O OE foi misturado ao meio fundente na proporção 0; 2,5; 25; 100; 200; 500; 1.000 e 1.500µL por cerca de 20mL de meio de cultura por placa de Petri, as quais eram previamente esterilizadas em estufa a 180ºC por 2h.

Para verificar a ação dos compostos voláteis também foi utilizado cerca de 20mL de meio de cultura YES e na tampa das placas foi colocado um pequeno recipiente de plástico com algodão (Figura 2), ambos esterilizados sob luz ultravioleta por 15 minutos, com 0; 2,5; 25; 100; 200; 500; 1.000 e 1.500µL de óleo essencial.



(A) (B) (C)

Figura 2 - A esquerda placa de Petri para verificar a ação dos compostos voláteis, a direita placa para verificação da ação por contato (A); placa com a tampa para verificar a ação dos compostos voláteis (B); tampa de plástico com algodão (C).

Em ambos os métodos, após 24h as placas foram inoculadas com um disco de 5mm de diâmetro das culturas fúngicas, de modo que o micélio estivesse em contato com o meio de cultura, em lados opostos das placas. Foram feitas quatro repetições para cada concentração. Todas as placas foram vedadas com filme plástico e incubadas invertidas a 20ºC (±2ºC) sob fotoperíodo de 12h luz e 12h escuro, por 10 dias.

Para verificar a eficiência do composto majoritário do óleo essencial sobre o crescimento micelial dos fungos foram avaliados os mesmos modos de ação, contato e compostos voláteis. Para isso foi elaborada uma solução (1:10) contendo o composto 1,8-cineol com 99% de pureza, da marca Aldrich, com o solvente dimetilsufóxido (DMSO) e retiradas quantidades equivalentes ao conteúdo deste nas doses do óleo essencial avaliado.

Assim, a partir desta primeira solução (solução 1) foram retiradas alíquotas de 146, 98, 49, e 19µL referentes às doses de 1.500, 1.000, 500 e 200µL de óleo, respectivamente. Em seguida, a solução 1 foi diluída na proporção 1:10 (solução 2). Da solução 2 foram retiradas alíquotas de 98, 24 e 2,4µL referentes, respectivamente, às doses de 100, 25 e 2,5µL de OE. Nas placas controle foi adicionado apenas DMSO.

2.5.4 Avaliação da eficiência do óleo essencial sobre o crescimento micelial dos fungos

As avaliações do crescimento micelial iniciaram-se após 48 horas da inoculação dos fungos. As avaliações consistiram na mensuração diária do raio de cada colônia em três diferentes sentidos pré-estabelecidos. Com base na média aritmética das três medições foi calculada a porcentagem de inibição (PI) dos tratamentos em relação ao controle utilizando a equação (2) a seguir:

$$PI\ (\%) = \frac{(Controle - Tratamento)}{Controle} \times 100 \qquad (2)$$

2.5.5 Avaliação da eficiência do óleo essencial sobre a produção de aflatoxinas

A produção de aflatoxinas pelos fungos que apresentaram crescimento nos tratamentos foi realizada pela técnica de cromatografia em camada delgada.

Assim sendo, em cada placa que apresentou crescimento cerca de 50g de colônia com meio de cultura foi retirado com auxílio de estiletes e espátulas. O material assim retirado foi transferido para um frasco âmbar de vidro com capacidade de 4mL previamente tarado. Para a extração das aflatoxinas do meio, adicionou-se no frasco 2mL de clorofórmio P.A, agitando-os por 15 segundos em vortex. Após repouso de 30 minutos, uma alíquota de 1mL do extrato foi transferida para outro frasco âmbar, o volume de 1mL foi evaporado em banho-maria a 50-60°C com fluxo de ar, re-dissolvido para 200µL de tolueno:acetonitrila (9:1) e agitado por 30 segundos em ultra-som.

A presença e a quantificação das aflatoxinas no extrato concentrado foram realizadas por cromatografia em placa bidirecional conforme esquema apresentado na Figura 3. Para isso foram utilizadas cromatofolhas de alumínio da marca Merck, artigo número 1.000.5553.

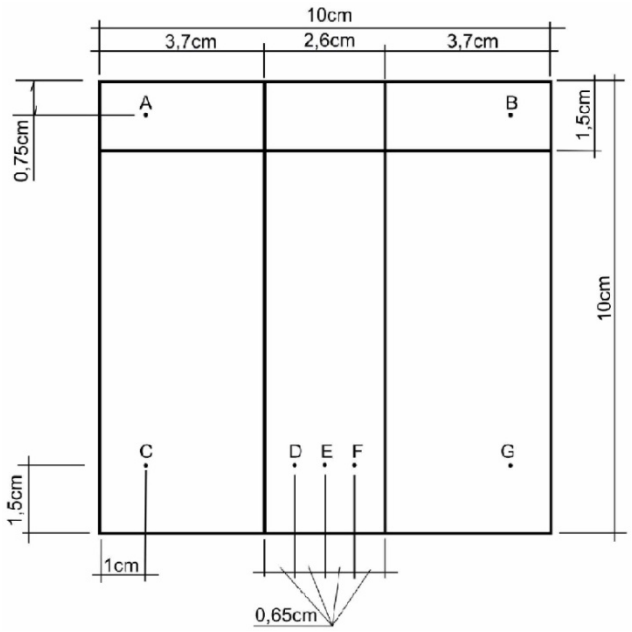


Figura 3- Esquema da placa bidimensional. Nos pontos A, B, D, E e F são aplicados padrões de aflatoxinas, no ponto C é aplicada amostra e em G é aplicada amostra + padrão.

O desenvolvimento das placas de cromatografia foi feito em cubas com 50mL de sistema de solventes. Em uma primeira direção (→) foi utilizado um sistema de solventes composto por clorofórmio:acetona (90:10). Em uma segunda direção (↑) com o sistema éter:metanol:água (96:3:1). A visualização das placas permitiu identificar a presença das aflatoxinas nas amostras por comparação com o posicionamento dos padrões de aflatoxinas, presentes na posição A, B, C, D, E e F e na posição G, onde é aplicada amostra e padrão.

A quantificação foi realizada através da comparação das intensidades das aflatoxinas presentes na amostra com os padrões das posições D, E e F. O cálculo da contaminação presente foi realizado segundo a equação 3.

$$\frac{Y \times S \times V}{X \times W} \quad (3)$$

em que:
Y = concentração do padrão em µg mL^{-1}
S = µL do padrão da toxina com fluorescência equivalente à amostra
V = volume final do extrato (amostra) em µL
X = volume aplicado do extrato (amostra) em µL
W = peso da amostra, em gramas, no extrato final

A solução de padrões foi preparada a partir do padrão Sigma-Aldrich (Sigma AF-1) e verificada quanto à concentração seguindo a metodologia 971.22 da American Official Anality Chemistry - AOAC (2006). O limite mínimo de detecção da técnica, para aflatoxina B1, variou em função da quantidade de meio de cultura retirado das placas de Petri, assim os valores de detecção mínima variaram entre 46 e 112ng g^{-1}.

2.5.6 Análise estatística

O delineamento empregado foi inteiramente ao acaso e as médias de crescimento micelial dos tratamentos foram avaliadas estatisticamente através da análise de variância e comparadas através do teste de Tukey. O instrumento estatístico utilizado foi o Statistical Analyses System - SAS (2003).

2.6 Resultados e discussão

2.6.1 Caracterização e quantificação do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

Na caracterização química por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas do óleo essencial de *E. globulus* (Figura 4) foram encontradas 18 substâncias diferentes porém todos monoterpenos.

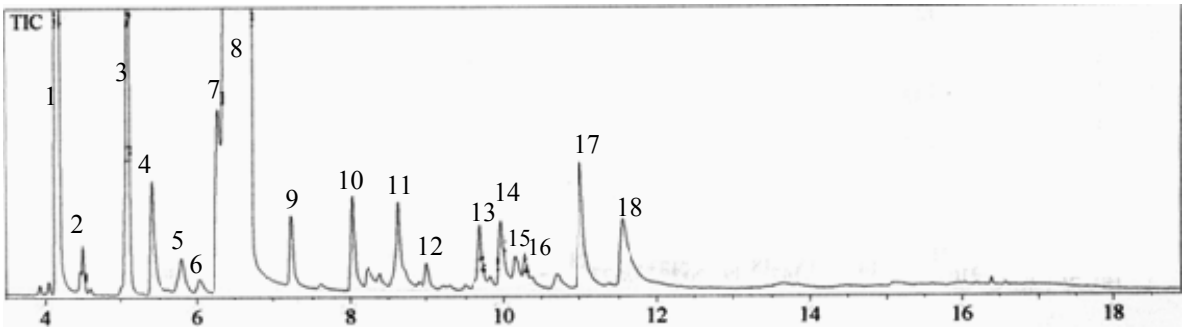


Figura 4 - Cromatograma do óleo de *Eucalyptus globulus*.

Na Tabela 5 verifica-se que o composto em maior quantidade é o 1,8-cineol, seguido de tricicleno e β-pineno. Essa quantidade de compostos voláteis identificados é menor do que a quantidade de compostos identificados por Viturro et al. (2003), que, ao analisarem o óleo essencial de folhas e galhos de *E. globulus* ssp. *bicostata*, encontraram 48 componentes voláteis no óleo, tendo o álcool terpenóide 1,8-cineol (eucaliptol) como composto predominante, seguido dos compostos α-pineno, α-terpineol e o globulol.

Tabela 5 - Relação dos compostos voláteis identificados no óleo de *Eucalyptus globulus* e seus respectivos IK calculados e suas porcentagens

N° do Pico	Composto	IK Literatura	IK Calculado	%
1	Tricicleno	927	929	2,95
2	α-fencheno	953	946	0,17
3	β-pineno	979	982	1,64
4	Mirceno	991	992	0,49
5	Não identificado	-	1006	0,23
6	1,4-cineol	1015	1014	0,07
7	Orto-cimeno	1026	1031	0,88
8	1,8-cineol	1031	1031	89,95
9	γ-terpineno	1060	1063	0,25
10	Terpinoleno	1089	1087	0,38
11	Não identificado	-	1106	0,52
12	Exo-fenchol	1122	1117	0,13
13	Trans-pinocarveol	1139	1139	0,30
14	Isopulegol	1150	1147	0,36
15	Neo-isopulegol	1148	1151	0,18
16	Citronelal	1153	1147	0,16
17	Terpine-4-ol	1177	1177	0,72
18	α-terpineol	1189	1196	0,62

Com a caracterização dos compostos apresentados no cromatograma do óleo detectou-se que o composto 1,8-cineol, fórmula molecular $C_{10}H_{18}O$ e fórmula estrutural apresentada na Figura 6, foi o que estava presente em maior quantidade. Assim, através da área do pico apresentada (Figura 5) procedeu-se a sua quantificação utilizando a curva de calibração elaborada (Gráfico 1).

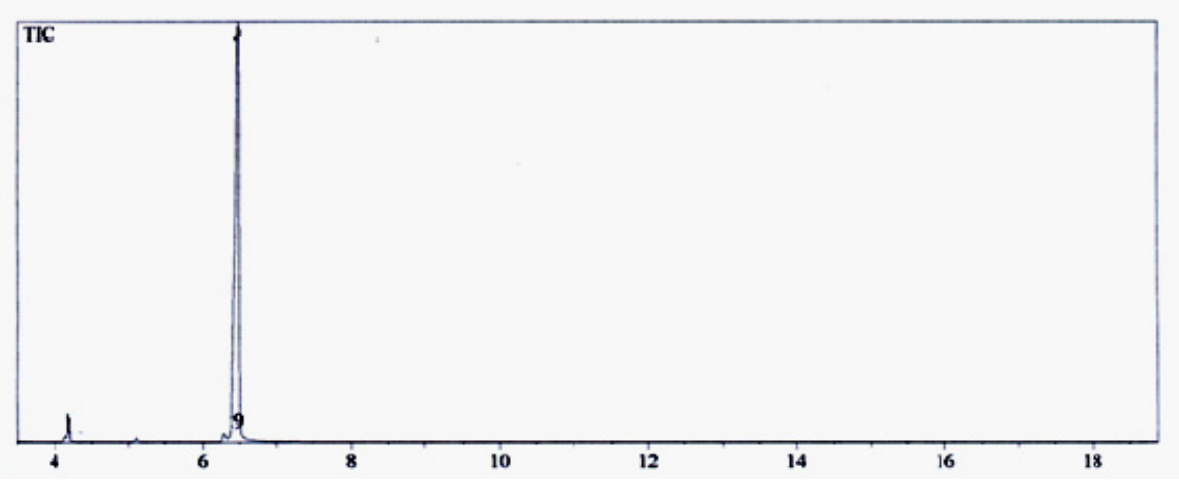


Figura 5 - Cromatograma do óleo de *Eucalyptus globulus* utilizado para a quantificação do 1,8-cineol.

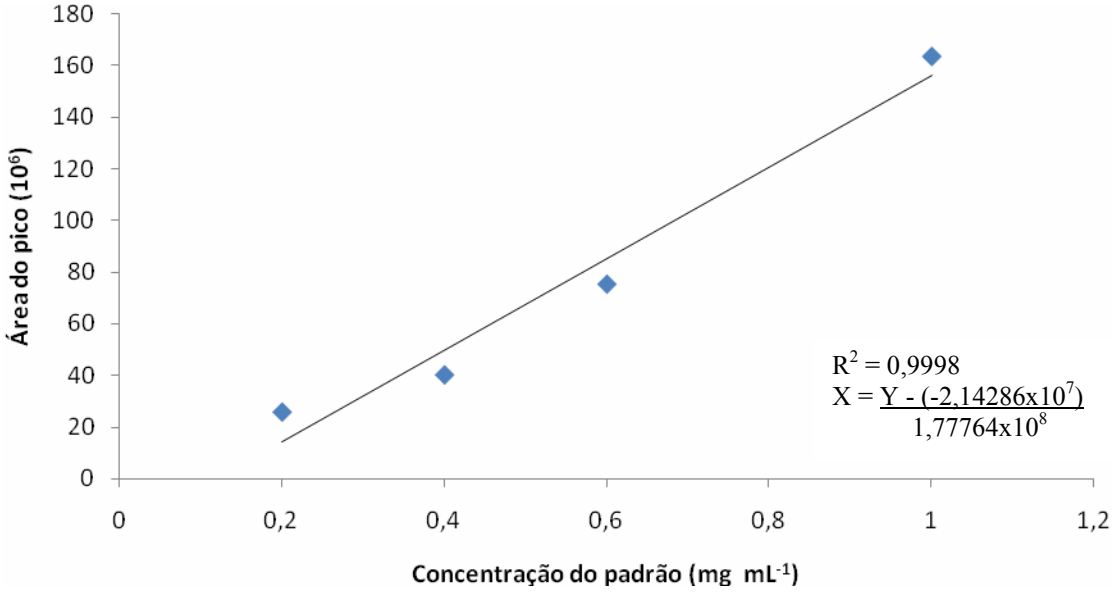


Gráfico 1 - Curva de calibração para quantificação do 1,8-cineol.

A quantificação do 1,8-cineol mostrou que estava presente na concentração de 0,8995mg mL^{-1} do óleo de *E. globulus* estudado, isto é, 89,95% do óleo essencial de *E. globulus* consistia no composto 1,8-cineol.

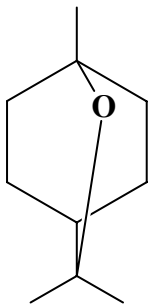


Figura 6 – 1,8-cineol.

O resultado aqui encontrado foi diferente do encontrado por Benjilali et al. (1984) que verificaram na composição química do óleo essencial de *E. globulus* 58% de 1,8-cineol, enquanto que Chagas et al. (2002) encontraram 85,84%.

Variações na quantidade do composto podem ser atribuídas a diferenças na composição bioquímica das plantas usadas para extração do óleo provocadas por diferenças climáticas, do tipo de solo, dos tratos culturais, das formas de extração e/ou outros fatores que interferem na composição dos óleos essenciais como já relatados por Boland et al. (1991), Daferera et al. (2002) e Maia (1994).

2.6.2 Eficiência do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

A avaliação da eficiência do óleo essencial é observada na Tabela 6, onde estão os valores do teste F da análise de variância dos fatores estudados e das interações entre estes, quando testado o OE de *E. globulus*.

Tabela 6 - Quadro de análise de variância para o teste com o óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

Fator de variação	**F**
Fungo	5.2542 *
Modo de ação	33.1716 **
Dose	320.8378 **
Fungo x Modo de Ação	0.0722 ns
Fungo x Dose	2.6991 **
Modo de Ação x Dose	5.1343 **
Fungo x Modo de Ação x Dose	0.7636 ns

* e ** representam significância de 95% e 99% de probabilidade respectivamente; ns: não significativo.

Pode-se observar que o valor de F para os fatores fungo, modo de ação, dose e as interações Fungo x Dose e Modo de Ação x Dose foi significativo estatisticamente.

2.6.3 Óleo essencial sobre as espécies fúngicas

Analisando a interação entre o efeito das diferentes doses sobre as espécies fúngicas avaliadas (Tabela 7), observa-se que com 95% de probabilidade houve diferença significativa em relação ao controle no crescimento micelial entre as doses de 2,5 e 25µL para a espécie *A. flavus* e *A. parasiticus*, respectivamente, independente do modo de ação do óleo essencial.

Tabela 7 - Média do crescimento micelial (cm) e porcentagem de inibição do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* em função das doses testadas

Doses (µL)	***Aspergillus flavus***	**Inibição (%)**	***Aspergillus parasiticus***	**Inibição (%)**
0	3,94 Aa	0,0	3,57 Ab	0,0
2,5	3,18 Ba	19,3	3,20 ABa	10,4
25	3,11 Ba	21,1	2,70 Bb	24,4
100	2,18 Ca	44,7	2,15 Ca	39,8
200	1,39 Da	64,7	0,68 Db	80,9
500	0,16 Ea	95,9	0,11 Ea	96,9
1.000	0,00 Ea	100	0,00 Ea	100
1.500	0,00 Ea	100	0,00 Ea	100

Letras diferentes designam diferença estatística ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey ($p<0,05$). Letras maiúsculas comparam valores nas colunas, letras minúsculas comparam valores nas linhas.

Nas doses de 500, 1.000 e 1.500µL ambos os fungos tiveram comportamentos semelhantes, isto é, mais de 90% de inibição no crescimento (Tabela 7). Os dados nos mostram que o óleo de *E. globulus* reduziu o crescimento dos fungos testados nas baixas dosagens e inibiu totalmente o crescimento micelial nas altas doses (Gráfico 2) e também se pode dizer que as doses que inibem 100% o crescimento micelial são as mesmas para ambos os fungos (Tabela 7).

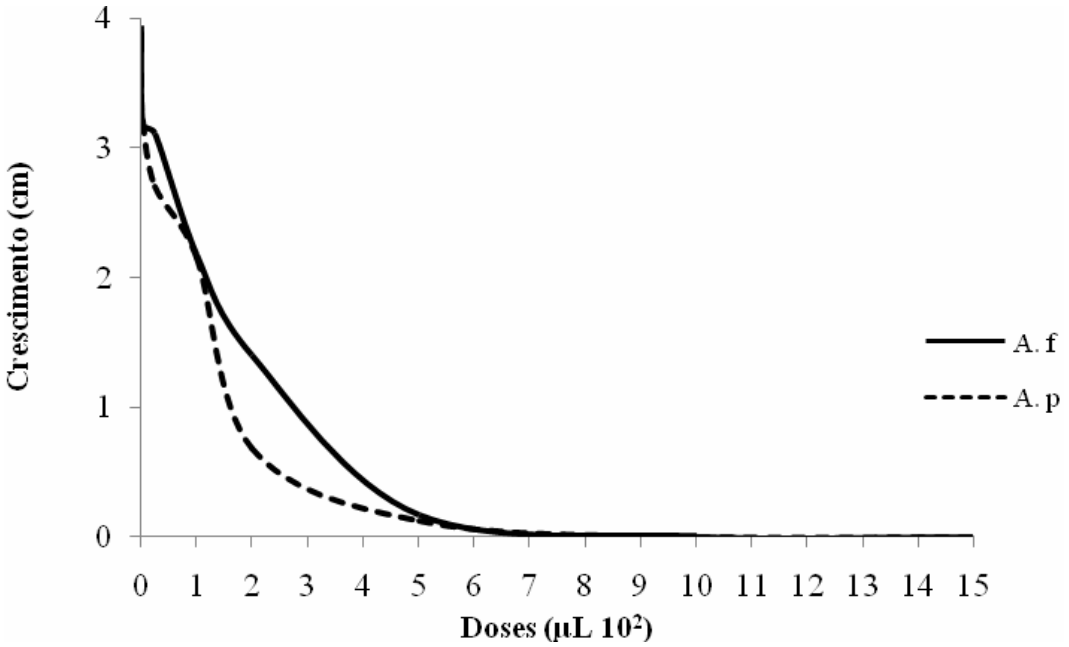


Gráfico 2 - Crescimento micelial dos fungos *Aspergillus flavus* (A.f) e *Aspergillus parasiticus* (A.p), independente do modo de ação.

Na Tabela 7 é verificado que as doses de 25 e 200µL foram mais eficientes na redução do crescimento do fungo *A. parasiticus* quando comparado ao crescimento do *A. flavus*. Nas outras doses o comportamento dos fungos foi semelhante, não havendo diferença significativa. Shahi et al. (2003) observaram que o óleo essencial de *Cybopogon flexuosus* controlou com mais eficiência o desenvolvimento do fungo *A. parasiticus* quando comparado com o fungo *A. flavus*, mas a partir da concentração 0,3µL mL^{-1} houve controle de 100% de ambos os fungos.

2.6.4 Modo de ação do óleo essencial sobre o crescimento micelial

A avaliação da interação entre as doses testadas e o modo de ação do óleo essencial (Tabela 8) nos mostra que houve diferença significativa, com 99% de probabilidade, e que o modo de ação por compostos voláteis foi mais eficiente do que a ação por contato.

A partir da dose de 2,5µL do óleo essencial no modo de ação por compostos voláteis houve diferença no crescimento micelial do tratamento em relação ao controle, enquanto que no modo de ação por contato esse diferença ocorreu somente na dose de 25µL. Na volatilização do óleo a partir da dose de 500µL houve inibição de 100% do crescimento micelial (Gráfico 3), e no modo de ação por contato a redução de 100% no crescimento micelial ocorreu na dose de 1000µL.

Tabela 8 - Média do crescimento micelial (cm) e porcentagem de inibição das doses do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* em função do modo de ação

Doses (µL)	Contato		Inibição (%)	Compostos Voláteis		Inibição (%)
0	3,75	Aa	0,0	3,75	Aa	0,0
2,5	3,39	ABa	9,6	3,00	Bb	20,0
25	3,14	BCa	16,3	2,67	Bb	28,8
100	2,70	Ca	28,0	1,63	Cb	56,5
200	1,30	Da	65,3	0,77	Db	79,5
500	0,28	Ea	92,5	0,00	Ea	100
1.000	0,00	Ea	100	0,00	Ea	100
1.500	0,00	Ea	100	0,00	Ea	100

Letras diferentes designam diferença estatística ao nível de 1% de significância pelo Teste de Tukey ($p<0,01$). Letras maiúsculas comparam valores nas colunas, letras minúsculas comparam valores nas linhas.

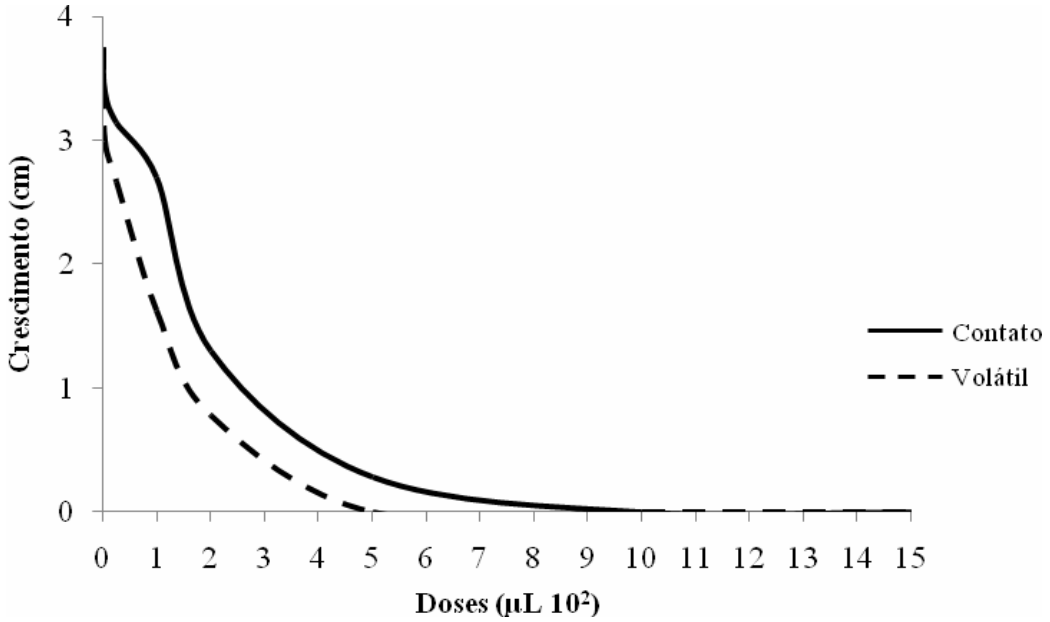


Gráfico 3 - Crescimento micelial em relação ao modo de ação do óleo essencial, independente do fungo.

Esses resultados foram diferentes dos encontrados por Alvarez-Castellanos et al. (2001) pois os autores não encontraram diferença significativa entre os dois métodos quando trabalharam com o óleo essencial das flores de crisântemo (*Chrysanthemum coronarium*) sobre o fungo *A. flavus*.

Os resultados não foram os esperados, pois era hipótese inicial era de que no modo de ação por contato o óleo apresentaria, além do efeito de contato, um efeito adicional decorrente da presença dos compostos voláteis na atmosfera interna da placa de Petri. Verificando a maior eficiência do modo de ação por volatilidade do óleo essencial uma das alternativas é fazer o controle fúngico em locais fechados como silos e armazéns através da fumigação do produto, isto é, utilizando apenas o vapor liberado pelo óleo.

2.6.5 Eficiência do composto 1,8-cineol

A análise estatística das médias de crescimento dos tratamentos com 1,8-cineol é mostrada na Tabela 9, onde estão os valores do teste F da análise de variância dos fatores estudados e das interações entre estes. Pode-se observar que os fatores fungo, modo de ação, dose e as interações Fungo x Modo de Ação e Fungo x Modo de Ação x Dose foram significativos estatisticamente.

Tabela 9 - Quadro de análise de variância para o teste com o composto 1,8-cineol

Fator de variação	**F**
Fungo	38.7630 **
Modo de ação	30.2338 **
Dose	2.3611 *
Fungo x Modo de Ação	4.0116 *
Fungo x Dose	1.0456 ns
Modo de Ação x Dose	1.0683 ns
Fungo x Modo de Ação x Dose	2.2720 *

* e ** representam significância de 95% e 99% de probabilidade respectivamente; ns: não significativo.

2.6.6 Composto 1,8-cineol sobre as espécies fúngicas

Verificando a eficiência das doses do composto 1,8-cineol sobre as espécies fúngicas avaliadas é observado (Tabela 10) que o composto produziu algum efeito inibitório somente na dose mais elevada testada, ou seja, na dose de 1.500µL. Esta dose provocou uma redução estatisticamente significativa no crescimento, com 95% de probabilidade, quando comparado aos demais tratamentos. Exceção a isto foi a dose de 25µL que apresentou uma diferença significativa em comparação à dosagem mais alta testada. Entretanto, devido à discrepância do

resultado deste tratamento concluiu-se que pode ter ocorrido alguma falha de procedimento na realização do experimento, especificamente neste tratamento.

Com base na porcentagem de inibição (Tabela 10) é observado que mesmo na dose de 1.500µL do composto 1,8-cineol a inibição do crescimento micelial foi menor do que a observada na mesma dosagem do óleo essencial.

Tabela 10 - Média do crescimento micelial (cm) e porcentagem de inibição em função das doses do composto 1,8-cineol

Doses (µL)	**Média de Crescimento**		**Inibição (%)**
0	3,08	AB	0,0
2,5	2,96	AB	3,9
25	3,11	A	-1,0
100	2,98	AB	3,2
200	3,00	AB	2,6
500	2,97	AB	3,6
1.000	3,05	AB	1,0
1.500	2,91	B	5,5

Letras diferentes designam diferença estatística ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey ($p<0,05$).

2.6.7 Modo de ação do composto 1,8-cineol sobre o crescimento micelial

Comparando as espécies fúngicas avaliadas em função do modo de ação do composto observa-se que houve diferença significativa a 95%, como mostrado na Tabela 11. O modo de ação por volatilização do composto 1,8-cineol foi mais eficiente para ambas as espécies fúngicas avaliadas, como observado também para o óleo essencial, e a espécie fúngica *A. parasiticus* foi mais sensível na presença do composto em ambos os modos de aplicação, como também observado no tratamento com o óleo.

Tabela 11 - Média do crescimento micelial (cm) dos fungos em função do modo de ação do composto 1,8-cineol

Modo de Ação	***Aspergillus flavus***	***Aspergillus parasiticus***
Contato	3,15 Aa	3,03 Ab
Volátil	3,07 Aa	2,78 Bb

Letras diferentes designam diferença estatística ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey ($p<0,05$). Letras maiúsculas comparam valores nas colunas, letras minúsculas comparam valores nas linhas.

É mostrado nos Gráficos 4 e 5 que o modo de ação por volatilização apresentou um comportamento semelhante ao modo de ação por contato do 1,8-cineol em ambos os fungos testados e mostram também que em nenhuma dose os fungos tiveram o crescimento reduzido em 100%, ou próximos a este valor, como quando testado o óleo essencial, demonstrando a baixa eficiência do composto sobre o crescimento micelial.

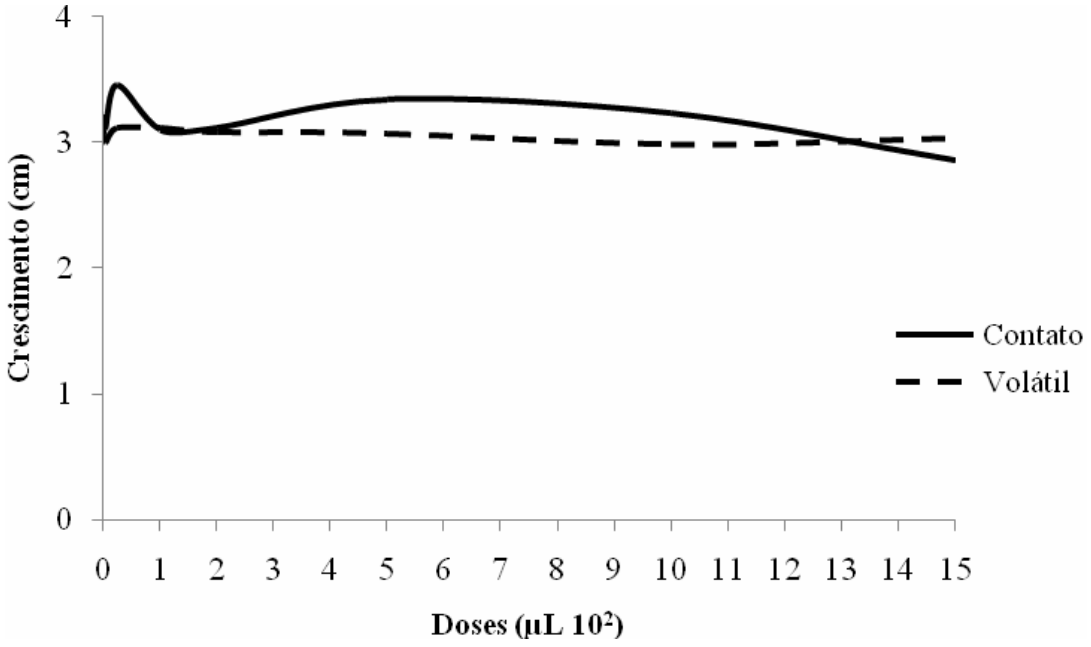


Gráfico 4 - Crescimento do fungo *Aspergillus flavus* em função dos modos de ação por contato e por volatilização do composto 1,8-cineol.

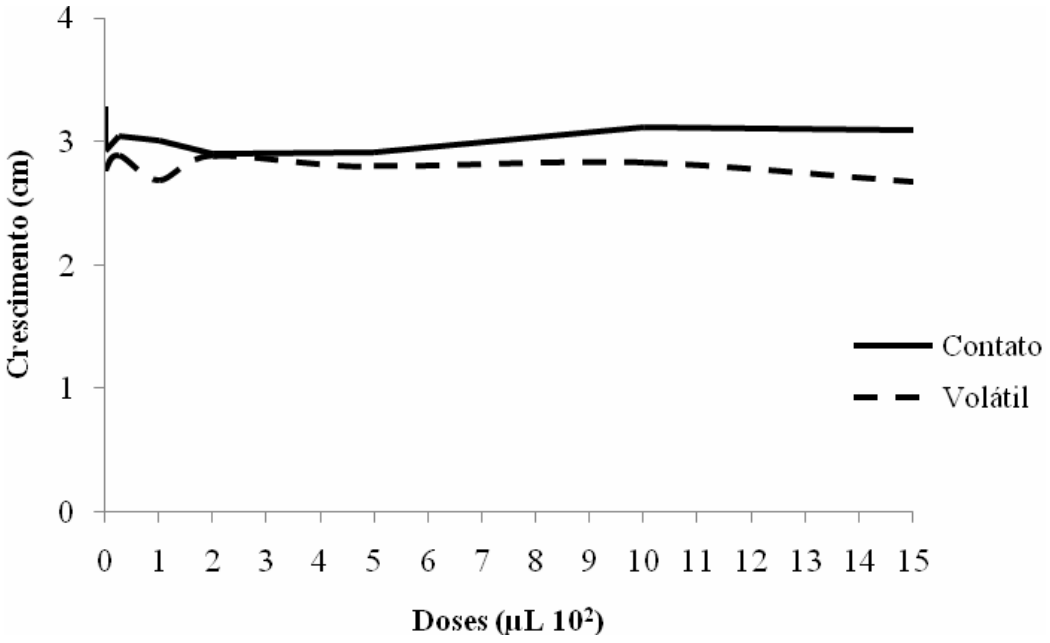


Gráfico 5 - Crescimento do fungo *Aspergillus parasiticus* em função dos modos de ação por contato e por volatilização do composto 1,8-cineol.

O composto 1,8-cineol foi o mais abundante no óleo essencial de *E. globulus* testado neste trabalho, por essa razão esperava-se que este composto fosse o responsável pela ação antifúngica do óleo. Entretanto, observando o Gráfico 6, pode-se concluir que a eficiência do óleo não está diretamente ligada à presença do composto 1,8-cineol. Provavelmente outro composto do óleo é o responsável pelo controle do crescimento micelial ou então é o efeito sinérgico dos constituintes químicos do óleo de *E. globulus* que tem a eficácia quanto ao controle.

Os resultados aqui observados são concordantes com os encontrados por Lis-Balchin et al. (1998), que testaram 105 óleos essencias e alguns de seus constituintes químicos. Os autores observaram uma correlação inversa entre o composto 1,8-cineol e a atividade antifúngica sobre *A. niger*, *A. ochraceus* e *Fusarium culmorum*.

Montes-Belmont e Carvajal (1998) observaram que na concentração com que os óleos essencias de tomilho, canela e menta inibiram em 100% o crescimento micelial do fungo *A. flavus*, seus respectivos compostos majoritários não tiveram a mesma eficiência. Segundo os autores, o timol inibiu 52,3%, o eugenol 14,4 e o mentol inibiu apenas 5,7% do crescimento do fungo.

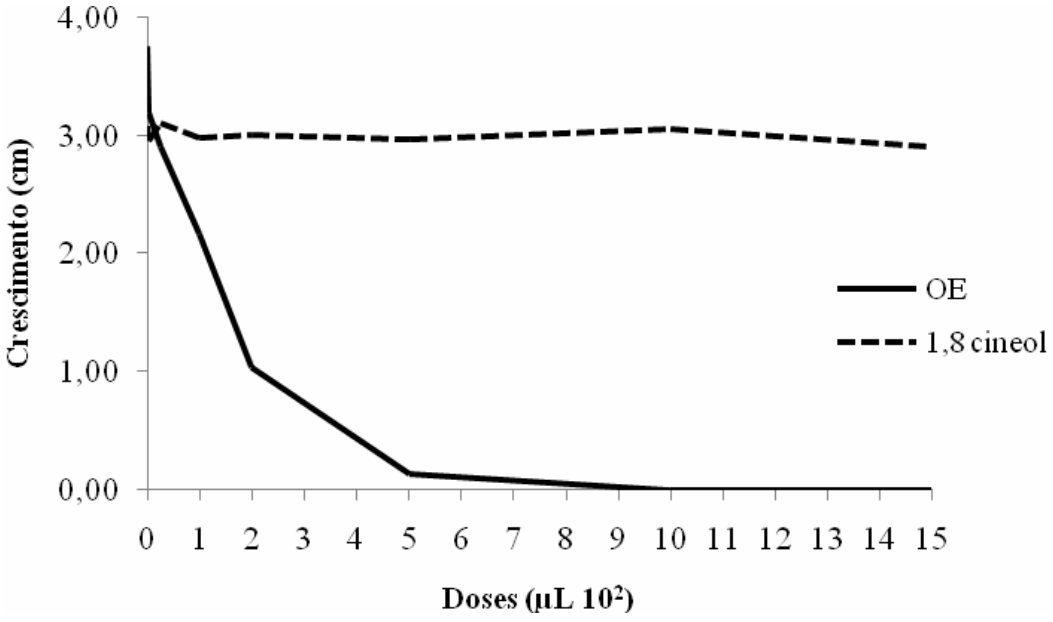


Gráfico 6 - Crescimento dos fungos nos tratamento com o óleo essencial e com o composto 1,8-cineol.

2.6.8 Contaminação dos fungos por aflatoxinas

Os resultados de contaminação por aflatoxinas nas colônias dos tratamentos com óleo essencial que apresentaram crescimento micelial mostraram valores de contaminação bastante variáveis entre as repetições, como mostrada na Tabela 12 e 13. Em alguns tratamentos houve a ausência de valores de contaminação de algumas repetições, pois algumas destas não apresentaram crescimento micelial que permitissem a retirada de material para análise. Assim, a elevada variabilidade e a ausência de resultados de algumas repetições não permitiram uma análise estatística dos resultados.

Observa-se que mesmo o crescimento micelial tendo sido estaticamente afetado nos tratamentos com diferentes doses, nas avaliações do modo de ação volátil e contato, a produção de aflatoxinas ocorreu nestas situações. Contudo, não é possível apresentar uma conclusão acerca da produção das aflatoxinas dada à ausência da análise estatística.

Os autores Joseph et al. (2005) observaram que a concentração do extrato de *Garcinia cowa* e de *G. pedunculata* para inibir a produção de aflatoxinas foi superior a concentração que inibe o crescimento do fungo *A. flavus*, Buchanan e Shepherd (1981) verificaram que a atividade do composto timol, principal componente do orégano e tomilho, não interfere diretamente na produção de aflatoxinas produzidas pelo *A. parasiticus.*

Tabela 12 - Valores de concentração de aflatoxinas (ng g^{-1}) no meio de cultura dos tratamentos de avaliação dos modos de ação, volátil e contato, do óleo essencial sobre *Aspergillus flavus*

Doses (µL)	**Contato**				**Compostos Voláteis**			
	B_1	**B_2**	**G_1**	**G_2**	**B_1**	**B_2**	**G_1**	**G_2**
0	1103	464	3032	331	1103	464	3032	331
0	195	62	766	164	195	62	766	164
0	133	80	312	80	133	80	312	80
0	369	74	423	59	369	74	423	59
2,5	290	291	1662	291	-	-	-	-
2,5	331	83	758	41	151	104	211	129
2,5	1199	200	1412	200	477	595	408	214
2,5	115	83	1354	69	-	-	-	-
25	724	145	609	83	334	251	98	11
25	940	188	1538	63	207	149	54	<12
25	246	59	242	37	-	-	-	-
25	1103	398	866	66	88	38	43	<11
100	429	442	361	66	200	100	16	0
100	222	33	22	0	390	234	22	<12
100	202	97	66	<12	38	19	0	0
100	423	204	249	25	130	63	0	0
200	1518	130	77	<12	276	58	<20	0
200	-	-	-	-	-	-	-	-
200	1095	203	332	<12	-	-	-	-
200	398	96	39	<12	345	259	23	<8

Tabela 13 - Valores de concentração de aflatoxinas (ng g^{-1}) no meio de cultura dos tratamentos de avaliação dos modos de ação, volátil e contato, do óleo essencial sobre *Aspergillus parasiticus*

Doses (µL)	**Contato**				**Compostos Voláteis**			
	B_1	**B_2**	**G_1**	**G_2**	**B_1**	**B_2**	**G_1**	**G_2**
0	101	20	833	36	101	20	833	36
0	89	18	1225	80	89	18	1225	80
0	72	12	1692	37	72	12	1692	37
0	121	16	1388	42	121	16	1388	42
2,5	624	125	4597	187	357	245	501	13
2,5	591	118	2088	118	138	66	<20	0
2,5	284	146	2389	244	178	18	23	0
2,5	364	156	2145	250	1724	518	846	14
25	460	123	2256	123	138	75	43	0
25	467	164	2294	281	153	92	56	0
25	1545	331	541	398	143	39	26	0
25	-	-	-	-	115	35	22	0
100	52	66	61	12	351	42	57	<10
100	356	143	292	18	745	76	50	<11
100	52	9	41	0	1014	61	40	<9
100	237	40	699	10	39	0	0	0
200	290	116	142	11	154	15	15	0
200	139	27	22	<10	-	-	-	-
200	376	16	<23	<14	-	-	-	-
200	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 14 - Valores de concentração de aflatoxinas (ng g^{-1}) no meio de cultura dos tratamentos de avaliação dos modos de ação, volátil e contato, do composto 1,8-cineol sobre *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*

Aflatoxinas	***Aspergillus flavus***		***Aspergillus parasiticus***	
	Modo Contato	**Modo Volátil**	**Modo contato**	**Modo volátil**
B1	> 67	> 54	> 55	> 61
B2	> 39	> 32	> 33	> 35
G1	> 66	> 54	> 54	> 62
G2	> 40	> 32	> 33	> 36

Não é possível inferir sobre a relação entre as doses testadas do óleo essencial e do 1,8-cineol e a redução da produção de aflatoxinas, pois os dados de contaminação entre os tratamentos como comentado anterioramente foram prejudicados. No tratamento com o óleo essencial os limites mínimos observados de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2 foram de 38, 9, 16 e 11ng g^{-1}, respectivamente, e no tratamento com o composto 1,8-cineol foi detectado uma produção mínima de 46ng g^{-1} para B_1, 27ng g^{-1} de B_2 e 45,26 e 27,31ng g^{-1} de G_1 e G_2, respectivamente.

Com base nesses resultados é possível dizer que tanto o óleo como o composto 1,8-cineol nas doses testadas não foram capazes de inibir totalmente a produção de aflatoxinas pelas espécies fúngicas avaliadas mesmo quando reduziram o crescimento das mesmas.

3 CONCLUSÃO

O bom desempenho do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre o crescimento micelial dos fungos *A. flavus* e *A. parasiticus* confirma a sua eficiência como antifúngico nas doses mais elevadas avaliadas, principalmente os compostos voláteis do óleo, porém o composto majoritário do óleo em questão, o 1,8-cineol, não apresentou a mesma eficiência do óleo.

Conclui-se também que tanto o óleo essencial de *E. globulus* quanto o composto 1,8-cineol não inibem totalmente a produção de aflatoxinas produzidas pelos fungos testados. Trabalhos futuros devem testar separadamente os outros compostos do OE para elucidar a ação destes sobre o comportamento dos fungos e sobre a produção de aflatoxinas.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gás chromatography/quadrupole mass spectrometry**. Ilinois: Allured Publishing, 2001. 455p.

AKGUL, A.; KIVANÇ, M. Inhibitory effect of selected Turkish spices and oregano components on some common foodborne fungi. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 6, p.263-268, 1988.

ALITONOU, G.; AVLESSI, F.; WOTTO, V. D.; AHOUSSI, E.; DANGOU, J.; SOHOUNHLOUÉ, D. C. K. Composition chimique, propriétés antimicrobiennes et activités sur les tiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* Sm. **Comptes Rendus Chimie,** Paris, v. 7, p.1051-1055, sept. 2004.

ALMEIDA, R. J. **Interação entre fatores de colheita e ação de insetos e fungos na depreciação das qualidades nutricionais do milho QPM-BR2121 durante o armazenamento**. 1999. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

ALVAREZ-CASTELLANOS, P. P; BISHOP, C. D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Antifungal activity of the essential oil of flower heads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, p.99-102, 2001.

ALVES, W. M. **Influencia dos teores de umidade de colheita e das temperaturas do ar de secagem na qualidade do milho (*Zea mays* L.).** 2000. 59p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

AMERICAN OFFICIAL ANALITY CHEMISTRY. **Official methods of analysis.** Item n. 49.2.02, p. 3, chap. 49, 2006.

AZZOUS, M.A.; BULLERMAN, L.R. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, planta components and commercial anti-fungal agents. **Journal Food of Protection,** Des Moines, v. 45, p. 1298-1301, 1982.

BARROS, A. S. R. Maturação e colheita de sementes. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO EM PRODUÇÃO DE SEMENTES, 1., 1986, Piracicaba, **Anais**... Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Fundação Cargill, 1986. chap. 6, p. 107-134.

BENJILALI, B.; TANTAQUI-ELARAKI, A.; AYADI, A.; IHLAL, M. Method to study antimicrobial e effects of essential oils: Application to the antifungal activity of six moroccan essences. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 47, n. 10, p. 748-752, Oct., 1984.

BETTIOL, W. Resultados de pesquisas com métodos alternativos para o controle de doenças de plantas. In: PROCESSOS DE PROTEÇÃO DE PLANTAS: CONTROLE ECOLÓGICO DE PRAGAS E DOENÇAS, 1°, 2001, Botucatu. **Resumos...** Botucatu: Agroecológica, 2001. p. 196.

BIANCHI, A.; ZAMBONELLI, A.; D'AULERIO, A. Z.; BELLESIA, F. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi in vitro. **Plant Disease,** St. Paul, v. 81, p.1241-1246, nov. 1997.

BILLERBECK, V.G. DE; ROQUES, C. G.; BESSIERE, J. M.; FONVIEILLE, J. L.; DARGENT, R. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 47, n. 1, p. 9-17, 2001.

BIZI, R. M. **Alternativas de controle do mofo-cinzento e do oídio em mudas de eucalipto**. Curitiba: UFPR. 2006. 70p.

BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. ***Eucalyptus* leaf oils:** use, chemistry, distillation and marketing. Melbourne: INKATA; ACIAR; CSIRO, 1991. 247p.

BOUDA, H.; TAPONDJOU L. A.; FONTEM, D. A.; GUMEDZOE, M.Y.D. Effect of essential oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara* and *Chromolaena odorata* on the mortality of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, Elmsford, v. 37, p.103-109, 2001.

BUCHANAN, R. L.; SHEPHERD, A. J. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by thymol. **Journal of Food Science,** Chicago, v. 46, p. 976-977, 1981.

BULLERMAN, L.B.; LIEW, F.Y.; SEIER S.A.. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 42**,** p.1107-1109, 1977.

BÜNZEN, S.; HAESE, D. Controle de micotoxinas na alimentação de aves e suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, Belo Horizonte, v.3, n. 1, p. 304-309, jan./fev.2006.

CHAGAS, A. C. de S.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; FORTES, I. C. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp. em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinarian Research Animal Science**. São Paulo, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.

CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C.; RESENDE, M. L. V.; ANGÉLICO, C. L.; SILVA, R. A. Effect of powdered spice treatments growth, sporulation and production of aflatoxin by toxigenic fungi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 856-862, Jul./Ago., 2004.

CONNER, D.E.; BEUCHAT, L.R**.** Sensitivity of heatstressed yeasts to essential oils of plants. **Applied Environmental Microbioly**, Washington, v.47, p.229-233, 1984.

COPPEN, J. J. W. **Flavors and fragrances of plant origin**. Roma: FAO**,** 1995. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/v5350e/v5350e07.htm> Acesso em: 17 jan. 2007.

CÔRTES, N. A.; NETO, D. C.; CORREA, B. Ocorrência de aflatoxinas em milho produzido pelo sistema tradicional de cultivo, em comunidades de agricultura familiar, no Estado de Mato Grosso. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 77, p. 16-26, out., 2000.

CROTEAU, R. Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. **Chemical Reviews,** Baltimore, v. 87, n. 5, p. 929-954, 1987.

CROTEAU, R; ALONSO, W; KOEPP, A. E; JOHNSON, M. A. Biosynthesis of monoterpenes: partial purification, characterization, and mechanism of action of 1,8-cineole synthase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 309, n.1, p. 184-192, 1994.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Mycotoxins:** risks in plant, animal, and human systems. Ames: FAO, 2003. 109p. (Task Force Report, 139).

CULLEN, J. M.; NEWBERNE, P. M. Acute hepatotoxicityof aflatoxins. In: EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. (Ed.) **The toxicology of aflatoxins**: human health, veterinary and agricultural significance. London: Academic Press, 1994. chap. 1, p.3-26.

DAFERERA, D. J.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, M. G. Characterization of essential oils from Lamiaceae species by fourier transform raman spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 5503-5507, 2002.

DEWIT, J.C.; NOTERMANS, S.; GORIN, N.; KAMPELMACHER, E.H. Effects of garlic and onion oil on toxin production by *C. botulinum* in meat slurry. **Journal of Food Protection,** Des Moines, v.42, p.222-224, 1979.

DHINGRA, O. D.; COSTA, M. L. N; SILVA, JR. G. J.; MIZUBUTI, E. S. G. Essential oil of mustard to control *Rhizoctonia solani* causing seedling damping off and seedling blight in nursery. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 683-686, 2004.

DHINGRA, O. D.; NETTO, R. A. C. Micotoxinas em grãos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas,** Passo Fundo, v. 6, p. 49-101, 1998.

EATON, D. L.; RAMSDELL, H. S.; NEAL, G. E. Biotransformation of aflatoxins. In: EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. (Ed.) **The toxicology of aflatoxins**: human health, veterinary and agricultural significance. London: Academic Press, 1994. chap. 3, p. 45-72.

FAO. **The use of spices and medicinals as bioactive protectants for grains**. Rome, 1999. **(**FAO agricultural services bulletin n. 137). Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/x2230e/x2230e00.HTM> Acesso em: 20 fev. 2007.

FIORI, A. C. G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; VIDA, J. B.; SCAPIM, C. A.; CRUZ, M. E. S.; PASCHOLATI, S. F. Antifungal activity of leaf extracts and essntial oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 148, p. 483-487, 2000.

FOLEY, W.; LASSAK, E. **The potential of bioactive constituents of *Eucalyptus* foliage as non-wood products from plantations.** Canberra: Australian National University Canberra, 2004. (Joint Venture Agroforestry Program, n. 4/154), Nov., 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION/CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION FDA/CFSAN. **Bag bug book**: aflatoxins. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap41.html> Acesso em: 14 dez. 2006.

GARC, S.C.; SIDDIQUI, N. Antifungal activity of some essential oil isolates. **Phormazil**, [S.l.], v. 47, n. 6, p. 467- 468, 1992.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELÍCIO, J. D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. **Biológico**, São Paulo, v.63, n.1/2, p.15-19, jan./dez., 2001.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2ed Ed. New York : Wiley-Liss. 1994. 458 p.

HENRY, S. H.; WHITAKER, T.; RABBANI, I.; BOWERS, J.; PARK, D.; PRICE, W.; BOSCH, F. X.; PENNINGTON, J.; VERGER, P.; YOSHIZAWA, T.; van EGMOND, H.; JONKER, M. A.; COKER, R. Aflatoxin M_1. In: WHO **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Geneve, 2001. chap. 1, p. 1-102. (WHO FOOD ADDITIVES SERIES, n. 47).

HSIEH, D. P. H.; WONG, J. J. Pharmacokinetics and excretion of aflatoxins. In: EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. (Ed.). **The toxicology of aflatoxins**: human health, veterinary and agricultural significance. London: Academic Press, 1994. chap. 4, p. 73-88.

INTERNATIONAL TRADE CENTRE – ITC. TRADE MAP. Disponível em: <http://www.intracen.org/mas/>. Acesso em: 19 Apr. 2007.

JASSIM, S.A.A;. NAJI, M.A. A review: Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, p. 412-427, 2003.

JONES, R. K. The influence of cultural practices on minimizing the development of aflatoxina in field maize. In: LUBER, M. S.; LILLEHOS, E. B.; RENFRO, B. L. (Ed.). **Aflatoxin in maize**. Mexico, D. F.: CIMMYT, 1987. p. 136-144.

JOSEPH, G.S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; SELVI, A. T.; JENA, B. S.; SAKARIAH, K. K. Antiaflatoxigenic and antioxidant activities of *Garcinia* extracts. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.101, p. 153-160, 2005.

KALEMBA, D.; KUSEWICZ, D.; SWIADER, K. Antimicrobial properties of the essential oil of *Artemisia asiatica* Nakai. **Phytotherapy Research,** Chichester, v.16, n. 3, p. 288-291, 2002.

KAMINSKI, E.; WASOWICZ, E. The usage of volatile compounds produced by moulds as indicators of grain deterioration. In: CHELKOWSKI, J. **Cereal grain, mycotoxins, fungi and quality in drying and storage**. Amsterdam: Elieser, 1991. p. 229-280.

KOZAKIEWICZ, Z.; SMITH, D. Physiology of *Aspergillus*. In: SMITH, J. E. (Ed.). ***Aspergillus*.** New York. 1994. p. 23-40.

LACEY, J.; RAMAKRISHNA, N.; HAMER, A.; MAGAN, N.; MARFLEET, I.C. Grain fungi. In: ARORA, D. K.; MUKERJI, K. G.; MARTH, E. H. (Ed.). **Handbook of applied mycology**, New York, 1991, v.3, p. 121-178.

LACEY, J.; MAGAN, N. Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationships. In: CHELKOWSKI, J. **Cereal grain:** mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Amsterdan: Elieser, 1991. chap. 5, p. 77-118.

LEE, S.E.; LEE, B.H.; CHOI, W.S.; PARK, B.S.; KIM, J.G.; CAMPBELL, B.C. Fumigant toxicityof volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). **Pest Management Science,** London, v. 57, p. 548-553, 2001.

LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S. G.; EAGLESHAM, E. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, Hoboken, v. 13, p. 98-104, 1998.

MAIA, N.B. **Nutrição mineral, crescimento e qualidade do óleo essencial da mentha (*Mentha arvensis* L.) cultivada em solução nutritiva**. 1994. 69p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

MANTOVANELI, M. C. H. **Interferência de alguns fungos no teste de tetrazólio e de danos mecânicos, tratamento fungicida e do armazenamento na qualidade de sementes de milho (*Zea mays* L.).** 2001. 173p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

MARTINI, A. **A introdução do eucalipto no Brasil completa 100 anos.** Disponível em: <http://www.canalrioclaro.com.br/colunas/?coluna=61>. Acesso em: 13 nov. 2006.

MARTINS, E. R. **Morfologia interna e externa, caracterização isomática e óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth**. 1996. 97p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

MATA, A. C. da. **Efeito da fosfina no controle de *Aspergillus flavus* em milho armazenado.** Viçosa: UFV, 1998. 38p.

McMILLIAN W. W. Relation of insects to aflatoxin contamination in maize growth in the Southeastern USA. In: LUBER, M. S.; LILLEHOS, E. B.; RENFRO, B. L. (Ed.). **Aflatoxin in maize**. Mexico, D. F.: CIMMYT, 1987. p. 194-200.

MEHAN, V. K.; McDONALD, D.; HARAVU, L. J.; JAYANIHI, S. **The groundnut problem**: review and literature database. Patancheru, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 1991. 387p.

MELO, B. País lucra com óleos essenciais. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 23 de novembro de 2005. Agrícola, p. G10.

MILMAN, M. J. **Equipamentos para pré-processamento de grãos**. Pelotas: Ed. Universitária. UFPel. 2002. 206p.

MICOTOXICOLOGIA. Disponível em: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/2579/9/09-capitulo1.pdf> Acesso em: 17 jan. 2007.

MONTES-BELMONT, R.; CARVAJAL, M. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. **Journal of Food Protection**. Des Moines, v. 61, n. 5, p. 616-619, 1998.

NGO, S. N. T.; MCKINNON, R. A.; STUPANS, I. The effects of *Eucalyptus* terpenes on hepatic cytochrome P450 CYP4A, peroxisomal Acyl CoA oxidase (AOX) and peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARα). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, Oxford, v.136, p. 165-173, 2003.

NGUEFACK, J.; LETHA, V.; AMVAM ZOLLO, P. H. V.; MATHUR, S. B. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology,** Amsterdam, v. 94, p. 329-334, 2004.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu. 2003. 474p.

OMINSKI, K. H.; MARQUARDT, R. R.; SINHA, R. N.; ABRAMSON, D. Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. In: MILLER, J. D.; TRENHOLM, H. L., MN. (Ed.). **Mycotoxins in grain**: compounds other than aflatoxin. St. Paul: Eagan Press, 1994. chap. 6, p. 287-312.

PAPACHRISTOS A. D. P.; STAMOPOULOSB, D. C. Fumigant toxicity of three essential oils on the eggs of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research,** Elmsford, v. 40, p. 517-525, 2004.

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

PENFOLD, A. R.; WILLIS, J. L. **The *Eucalyptus* -** botany, cultivation, chemistry and utilization. London: Leonard Hill, 1961. 550p.

PENTEADO, S. Utilização dos defensivos alternativos na agricultura - Histórico e Perspectivas. In: PROCESSOS DE PROTEÇÃO DE PLANTAS. 1., 2001. Botucatu. **Resumos...** Botucatu: Agroecológica, 2001.

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

PEREIRA, G. F. de A. **Detecção, efeitos e controle de fungos de armazenamento em sementes de soja (*Glycine Max* (L.) Merrill) no estado de Minas Gerais – Safra 1989/90**. 1992. 110p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1992.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2th ed. London : Blackie Academic, 1997. 593p.

POMERANZ, Y. Biochemical, functional, and nutritive changes during storage. In: SAUER, D. B. (Ed.). **Storage of cereal grains and their products**. 4th ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemistry, 1992. chap. 3, p. 55-142.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1986. 603p.

RANZANI, M. R. T. de C. **Avaliação micológica de amendoim em casca (*Arachis hypogaea* L.) tratado quimicamente.** 1993. 161p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

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

RIBEIRO, J. M. M.; CAVAGLIERI, L. R.; FRAGA, M. E.; DIREITO, G. M.; DALCERO, A. M.; ROSA, C.A.R. Influence of water activity, temperature and time on mycotoxins production on barley rootlets. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 42, p. 179-184, 2006.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 1-21, 2002.

ROEBUCK, B. D.; MAXUITENKO, Y. Y. Biochemical mechanisms and biological implications of the toxicity of aflatoxins as related to aflatoxin carcinogenesis. In: EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. (Ed.). **The toxicology of aflatoxins**: human health, veterinary and agricultural significance. London: Academic Press, 1994. chap. 2, p. 27-44.

SALGADO, A. P. S. P. **Estudo dos constituintes químicos a da atividade fungitóxica do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus***. 2001. 52p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Possible role of mast cells in cineole-induced scratching behavior in mice. **Food and Chemical Toxicology,** London, v.40, p. 1453-1457, 2002.

SARGEANT, K.; O'KELLY, J.; CARNAGHAN, R.B.A.; ALLCROFT, R. The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. **Veterinary Record**, London, v. 73, p. 1219-23, 1961.

SAUER, D. B.; MERONUCK, R. A.; CHRISTENSEN, C. M. Microflora. 4th ed. In: SAUER, D. B (ed.). **Storage of cereal grains and their products**. 4th ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemistry,1992. p. 313-340.

SAUTOUR, M.; MANSUR, C. S.; DIVIES, C.; BENSOUSSAN, M.; DANTIGNY, P. Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 28, p. 311-315, 2002.

SCHNITZLER, P.; SCHON, K.; REICHLING, J. Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. **Die Pharmazie,** Gainesville, v. 56, p. 343-347, 2001.

SHAHI, S. K.; PATRA, M.; SHUKLA, A. C.; DIKSHIT, A. Use of essential oil as botanical-pesticide against post harvest spoilage in *Malus pumilo* fruits. **BioControl**, Netherlands, v. 48, p. 223–232, 2003.

SILVA, P. H. M. da; BRITO, J. O.; SILVA JÚNIOR, F. G. da. Potential of eleven *Eucalyptus* species for the production of essential oils. **Scientia Agrícola,** Piracicaba, v.63, n.1, p. 85-89, jan./feb., 2006.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. **Journal of Ethnopharmacology,** Lausanne, v. 89, p. 277–283, 2003.

SILVA, A. F. **Anatomia dos órgãos vegetativos aéreos e análise do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. e *H. glomerata* Mart. Ex Schrank (Lamiaceae).** 2000. 91p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

SINGH, H.N.P.; PRASAD, M.M.; SINHA, K.K. Efficacy of leaf extracts of some medicinal plantas against disease deve lop ment in banana. **Letters in Applied Microbiology**, Chichester, v.17, p. 269-271, 1993.

SMITH, J. E.; MOSS, M. O. **Mycotoxins**: formation, analysis and significance. John Wiley & Sons. 1985. 140p.

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

SOUZA, D. C.; VILELA, G. R.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M.; ITO, M. A. Efeito de óleos essenciais no crescimento micelial de C*olletotrichum lindemuthianum* e *Rhizoctonia solani*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, 3. 2006, Belém. **Anais...**. Belém:UFP, 2006.

STATISTICAL ANALYSES SYSTEM. SAS INSTITUTE. **SAS**. Cary, 2003.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A .D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology,** Amsterdam, v.43,p. 141-158, 1998.

TAPONDJOU A. L.; ADLER, C.; FONTEM, D. A.; BOUDA, H.; REICHMUTH, C. Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. **Journal of Stored Products Research,** Elmsford, v. 41, p. 91-102, 2005.

TANTAOUI, E. A.; FERHOUT, H.; ERRIFI, A. Inhibition of the fungal asexual reproduction stages by three Moroccan essential oils. **Journal of Essential Oil Research,** Winston-Salem, v. 5, n. 5, p. 535-545, 1993.

VERLET, N. Essential oils: supply, demand and price determination. **Acta Horticulturae**, Nethelands, v. 344, p. 9-16, nov., 1993a.

_____. Overview of the essential oils economy. **Acta Horticulturae**, Nethelands, v.333, p. 65-72, nov., 1993b.

VILHA, A. P. M.; BARATA, L. E. S.; CARVALHO, R. DE Q. **Oportunidades para o setor de óleos essenciais a partir da indústria de higiene, perfumaria e cosméticos**: explorando convergências estratégicas e propostas para competitividade. Disponível em: <http://www.cori.rei.unicamp.br/BrasilJapao3/resul_trbs.php?cod=247> Acesso em: 19 abr. 2007.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos Florestais**, Piracicaba, n. 17. p. 26, ago. 2003.

VITURRO, C. I.; MOLINA, A. C.; HEIT, C. I. Volatile Components of *Eucalyptus globulus* Labill ssp. bicostata from Jujuy, Argentina. **Journal of Essential Oil Research,** Winston-Salem, v. 15, p. 206-208, May/June, 2003.

WASOWICZ, E. Changes of chemical grain components, especially lipids, during their deterioration by fungi. In: CHELKOWSKI, J. **Cereal grain, mycotoxins, fungi and quality in drying and storage**. Amsterdam: Elsevier, 1991. chap. 11, p. 229-280.

WICKLOW, D. T. The mycology of stored grain: an ecological perspective. In: JAYAS, D. S.; WHITE, N. D. G.; MUIR, W. E. (Ed.). **Storage grain ecosystems**. New York: Marcel Dekker, 1995. chap. 7, p. 197-250.

WILSON, D. M.; PAYNE, G. A. Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxina contamination of crops. In: EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. **The toxicology of aflatoxins**: human health, veterinary and agricultural significance. London: Academic Press, 1994. chap. 14, p. 309-346.

WILSON, C. L.; WESNIEWSKI, M. E. Future alternatives to synthetic fungicides for control of postharvest diseases. In: TJAMOS, E. T.; PAPAVIZAS, G. C.; COOK, R. J. (Ed.). **Biological control of plant diseases:** progress and challenges for the future. New York: Plenum Press, 1992. p. 133-138.

WOOLF, A. Essential oil poisoning. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, New York, v. 37, n. 6, p. 721-727, Oct., 1999.

ZAIKA, L. L.; BUCHANAN, R. L. Review of compounds affecting the biosíntesis or bioregulation of aflatoxins. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.50, n. 8, p. 691-708, 1987.

ZAMBONELLI, A.; D´AURELIO, A. Z.; SEVERI, A.; BENVENUTI, S.; MAGGI, L.; BIANCHI, A. Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *Thymus vulgaris* L. **Journal of Essential Oil Research**, Winston-Salem, v. 16, n. 1, p. 69-74, 2004.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo