

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

Quimioprevenção pelo óleo essencial de mentrasto (*Ageratum conyzoides*) no crescimento de *Aspergillus flavus* e da produção de aflatoxina.

JULIANA HELLMEISTER DE CAMPOS NOGUEIRA
Farmacêutica-Bioquímica

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente

Orientador: Prof^a. Dr^a. Joana D'arc Felicio

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Núcleo de Informação e Documentação - Biblioteca
Instituto Biológico
Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo

Nogueira, Juliana Hellmeister de Campos
Quimioprevenção pelo óleo essencial de mentrasto (*Ageratum conyzoides*) no crescimento de *Aspergillus flavus* e da produção de aflatoxina. / Juliana Hellmeister de Campos Nogueira. -- São Paulo, 2009.

Dissertação (Mestrado) Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.
Área de concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente.
Linha de pesquisa: Química e atividade biológica de produtos naturais.
Orientador: Joana D'Arc Felício.
Chemoprevention by mentrasto essential oil (*Ageratum conyzoides*) in the growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxina.

1. *Aspergillus flavus* 2. *Ageratum conyzoides* 3. Óleo essencial 4. Ultra estrutura 5. Mentrasto 6. Aflatoxinas.
I. Felício, Joana D'Arc II. Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação III. Título

IB/Bibl /004/2009



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
pg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Juliana Hellmeister de Campos Nogueira

Título: Quimioprevenção pelo óleo essencial de mentrasto (*Ageratum conyzoides*) no crescimento de *Aspergillus flavus* e da produção de aflatoxina.

Orientadora: Prof. Dra. Joana D'arc Felicio

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente

Aprovada em: 30/04/2009

Banca Examinadora

Assinatura:

Profª. Dra.: **Joana D'arc Felicio**

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

Profª. Dra.: **Edlayne Gonçalez**

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

Profª. Dra.: **Márcia Ortiz Mayo Marques**

Instituição: Instituto Agronômico

Aos meus pais,

Eduardo Monteiro de Campos Nogueira e Angela Hellmeister de Campos Nogueira,

Pelo carinho e amor em nossa família.

Por serem eternos exemplos de caráter, dignidade, honestidade e garra a serem seguidos.

Pelo apoio e afinco em minha formação pessoal e profissional.

Por sempre incentivarem e apoiarem meus sonhos.

DEDICO

Aos meus avós,

José maria, Maria Stella, Plínio e Maria Angela

Às minhas irmãs,

Adriana e Luana

Por toda amizade, conselhos e carinho.

Ao Lucius, Fefas e Dani,

Pela amizade, companheirismo, boas risadas e muitas viagens...

Ofereço

Agradecimentos

A *Prof.^a Dr.^a Joana D'arc Felício de Souza*, por inicialmente ter me acolhido no Laboratório de Química e Farmacologia de Produtos Naturais como estagiário pela faculdade, pela sua orientação na pós-graduação e principalmente, pela amizade, conversa, e companheirismo assim como pelo incentivo, dedicação, confiança e colaboração em meu enriquecimento profissional.

A *Prof.^a Dr.^a Edlayne Gonçalez*, por sua total colaboração. Pela paciência e resolução de minhas mais variadas dúvidas.

A *Prof.^a Dr.^a Márcia Ortiz Maio Marquez*, pelas suas preciosas contribuições nas correções na dissertação, e ao Laboratório de Fitoquímica (IAC) pela execução da CG/EM.

A *Prof.^a Dr.^a Simone Aquino*, pelas suas preciosas contribuições nas correções na dissertação.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, em especial a Sílvia Galleti e ao Ricardo, pelas suas colaborações e execuções na parte de microscopia eletrônica.

A Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia (ITAL), pela doação da cepa de *Aspergillus flavus* produtora de AFB₁.

Ao Herbário Municipal da Prefeitura do Município de São Paulo, em especial ao Ricardo José Francischetti Garcia, por depositar a planta no herbário.

Aos amigos de laboratório Harry Léo, Fernando, Eduardo, Bia, pela amizade, convivência e pelos momentos de descontração. Em especial a Rosane por sua colaboração e essencial ajuda para o desenvolvimento desta tese.

Aos membros do laboratório de Química e Farmacologia de Produtos Naturais *Prof.^a Dr.^a Maria Helena Rossi*, *Prof.^a Dr.^a Mitsue Haraguchi*, *Prof.^a Dr.^a Marta Maria Baggio* por me acolherem tão bem durante todos esses anos em que estive com vocês.

A FAPESP pela bolsa auxílio pesquisa e a bolsa de TT3.

**“O que é então uma erva daninha senão
uma planta cujas virtudes ainda não foram
descobertas”**

(R. W. Emerson)

**“A vida é mais simples do que a gente pensa;
basta aceitar o impossível, dispensar o indispensável
e suportar o intolerável.”**

(Kathleen norris)

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Aflatoxinas e aflatoxicoses.....	04
2.2. Metabolismo das aflatoxinas	07
2.3. Legislação.....	09
2.4. Controle de fungos toxigênicos e micotoxinas por óleos essenciais.....	09
2.5. <i>Ageratum conyzoides</i>	13
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo Geral.....	19
3.2. Objetivos Específicos.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Materiais	20
4.2. Meios de cultura.....	20
4.3. Cepa de <i>Aspergillus flavus</i>	20
4.4. Teste de produção de aflatoxinas pela cepa de <i>Aspergillus flavus</i>	21
4.5. Material Vegetal.....	21
4.6. Extração do óleo essencial de folhas e flores de <i>Ageratum conyzoides</i>	21
4.7. Identificação da composição química do óleo essencial de mentrasto.....	21
4.8. Fracionamento do óleo essencial de mentrasto	22
4.9. Avaliação do óleo essencial de mentrasto em cultura de <i>A. flavus</i>	22
4.9.1. Determinação da sensibilidade fúngica ao óleo essencial de mentrasto	22
4.9.2. Avaliação de produção da aflatoxina B ₁	22
4.9.3. Extração da aflatoxina B ₁	23
4.9.4. Quantificação da AFB ₁	23
4.9.5. Avaliação do crescimento do fungo pelo peso seco.....	23
4.10. Microscopia Eletrônica	23
4.11. Análise estatística	24
5. RESULTADOS	25
5.1. Avaliação do óleo essencial de mentrasto em cultura de <i>A. flavus</i>	25
5.1.1. Determinação da sensibilidade fúngica ao óleo essencial bruto.....	25
5.1.2. Determinação da sensibilidade fúngica das subfrações do óleo essencial.....	25
5.2. Teste de produção da aflatoxina B ₁	27
5.2.1. Quantificação da aflatoxina B ₁	27
5.2.2. Avaliação do crescimento do fungo.....	27
5.3. Avaliação da constituição química	28

5.3.1. Identificação da composição química do óleo essencial	28
5.3.2. Identificação da composição química das subfrações.....	29
5.4. Microscopia eletrônica	31
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÕES	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

RESUMO

NOGUEIRA, J.H.C. **QUIMIOPREVENÇÃO PELO ÓLEO ESSENCIAL DE MENTRASTO (*Ageratum conyzoides*) NO CRESCIMENTO DE *Aspergillus flavus* E DA PRODUÇÃO DE AFLATOXINA** São Paulo - 2009. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

A aflatoxina B₁ é um metabólito altamente tóxico e carcinogênico, produzida por espécies de *Aspergillus* em alimento e produtos agrícolas. Substâncias naturais como, por exemplo, compostos orgânicos de espécies aromáticas podem possuir efeitos reguladores aos das células controlando a produção de aflatoxinas. Foi estudado o efeito inibidor do óleo essencial de mentrasto (*Ageratum conyzoides*), no crescimento micelial e produção de aflatoxina B₁ por *Aspergillus flavus*. Culturas de *Aspergillus flavus* foram incubadas em meio YES durante 6 dias a 25°C, com concentrações de óleo essencial de mentrasto 30 µg/mL; 20 µg/mL; 10 µg/mL; 5 µg/mL; 1 µg/mL; 0,40 µg/mL; 0,20 µg/mL; 0,10 µg/mL; 0,04µg/mL; 0,020µg/mL; 0,01 µg/mL and 0,00 µg/mL (controle). Essas concentrações quando comparadas com a amostra controle, inibiram significativamente o crescimento do fungo ($P < 0.05$) em 58%, 61% 44%, 45%, 63%, 63%, 57%, 49%, 30%, 29% e 20% respectivamente. As oito primeiras concentrações inibiram a produção da aflatoxina B₁ completamente. A análise do óleo essencial por CG-EM mostrou que os principais componentes eram o precoceno II (46,35%), precoceno I (42,78%), cumarina (5,01%) e trans-cariofileno (3,02%). As frações do óleo essencial foram avaliadas também em cultura de *Aspergillus flavus* e os resultados mostraram que o precoceno II é o composto ativo do óleo essencial. A comparação das células fúngicas tratadas com o óleo essencial por microscopia eletrônica de transmissão mostrou alterações ultraestruturais dependente da concentração do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* utilizado. Estas alterações ultraestruturais foram mais evidentes no sistema das endomembranas, afetando principalmente a mitocôndria. A habilidade em inibir a produção da aflatoxina é uma nova atividade biológica para o *Ageratum conyzoides*, esta atividade indica que a planta pode ser considerada como forte candidata para o estudo completo da rota biossintética das aflatoxinas. O óleo essencial de *Ageratum conyzoides* pode ser uma alternativa para a proteção de produtos agrícolas contra infestação por *Aspergillus flavus*, resolvendo um dos grandes problemas do agronegócio, especialmente na estocagem de grãos. O uso deste óleo essencial, não tóxico e constituído por substâncias voláteis no controle de fungos, pode ser uma grande colaboração para a redução de resíduos de fungicidas no ambiente e nos produtos agrícolas, além de colaborar com a proteção do ambiente agrícola.

Palavra chave: *Aspergillus flavus*, *Ageratum conyzoides*, óleo essencial, ultraestrutura, mentrasto, aflatoxinas.

ABSTRACT

NOGUEIRA, J.H.C. **CHEMOPREVENTION BY MENTRASTO ESSENTIAL OIL (*Ageratum conyzoides*) IN THE GROWTH OF *Aspergillus flavus* AND PRODUCTION OF AFLATOXIN** São Paulo - 2009. Dissertation (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

Aflatoxin B₁ (AFB₁) is a highly toxic and carcinogenic metabolite produced by *Aspergillus* species on food and agricultural commodities. Natural products may regulate the cellular effects of aflatoxins and evidence suggests that aromatic organic compounds of spices can control the production of aflatoxins. Inhibitory effects of essential oil of mentrasto (*Ageratum conyzoides*), on the mycelial growth and aflatoxina B₁ production by *Aspergillus flavus* were studied. Cultures were incubated on yeast extract-sucrose (YES) broth, at concentrations of 30 µg/mL; 20 µg/mL; 10 µg/mL; 5 µg/mL; 1 µg/mL; 0.40 µg/mL; 0.20 µg/mL; 0.10 µg/mL; 0.04µg/mL; 0.020µg/mL; 0.01 µg/mL and 0 µg/mL (control) of essential oil during 6 day at 25 degrees C. These concentrations inhibited fungal growth in 58%, 61%, 44%, 45%, 63%, 63%, 57%, 49%, 30%, 29% and 20% respectively, when compared with control samples was significant ($P < 0.05$). An aflatoxin production was inhibited completely by first eight concentrations. The analysis of the oil by GC/MS showed that its main components are precocene II (46.35%), precocene I (42.78%), cumarine (5.01%), Trans caryophyllene (3.02%). The fractions of oil were evaluation in *A. flavus* culture and the results showed that precocene II is active compounds, of the oil essential. Comparison by transmission electron microscopy of cells of the fungus control and fungal cells incubated with essential oil showed ultrastructural changes dependent on the concentration of essential oil of *A. conyzoides* used. These ultrastructural changes were more evident in the system endomembranas, affecting mainly the mitochondria. Degradations were also observed in both the fibrils surrounding. The ability to inhibit aflatoxin production as a new biological activity for *A.conyzoides* L. indicate that it may be considered as useful candidates for clarifying more about the non-fully understood complex pathway of aflatoxin biosynthesis. The essential oil of *A. conyzoides* may be an alternative environment for the protection of agricultural products against infestation of *A flavus*, working well in solving a major problem for agribusiness, especially in storage of grains. The use of this essential oil, non-toxic and made of highly volatile substances in the control of fungus, can make a great collaboration for the reduction of fungicide residues in the environment and agricultural products in addition to collaborating with the protection of agricultural environment.

Key-words: *Aspergillus flavus*, *Ageratum conyzoides*, essential oil, ultra structural, mentrasto, aflatoxins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química das principais aflatoxinas.	5
Figura 2	Estrutura química da aflatoxina M ₁ .	6
Figura 3	Metabolismo da aflatoxina B ₁ no fígado.	8
Figura 4	<i>Ageratum conyzoides</i> L. (Asteraceae).	14
Figura 5	Estruturas da composição básica do óleo essencial de folhas e flores de Mentrasto.	28
Figura 6	Halo de inibição do óleo de mentrasto em <i>A. flavus</i> .	25
Figura 7	Resultado de atividade das frações do óleo de mentrasto em cultura de <i>A. flavus</i> .	26
Figura 8	Avaliação da inibição do crescimento e da produção de aflatoxina B ₁ por <i>A. flavus</i> nas concentrações de 30µg/mL, 20µg/mL, 10µg/mL, 5µg/mL, 1µg/mL, 0,4µg/mL, 0,2µg/mL, 0,1µg/mL, 0,04µg/mL, 0,02µg/mL, 0,01µg/mL de mentrasto.	27
Figura 9	Estruturas químicas dos dois principais constituintes do óleo de mentrasto estudado.	28
Figura 10	Microscopia eletrônica de células fúngicas de <i>A. flavus</i> não tratadas com óleo essencial de mentrasto, mostrando Núcleo (N) Vacúolo(V) com aspectos normais.	33
Figura 11	Microscopia eletrônica de células fúngicas de <i>A. flavus</i> não tratadas com óleo essencial de mentrasto mostra da Membrana plasmática (MP) com aparência uniforme e linear, Camada fibrilar (CF) com aparência intacta e parede celular (PC) uniforme.	33
Figura 12	Microscopia eletrônica de células fúngicas de <i>A. flavus</i> tratadas com 0,01µg/mL óleo essencial de mentrasto, mostra afrouxamento e o destacamento da camada fibrilar (CF) e a diminuição de sua espessura, membrana plasmática (MP) com vilosidades e a desorganização da estrutura das mitocôndrias (Mit) acarretando diminuição das cristas.	34
Figura 13	Microscopia eletrônica de células fúngicas de <i>A. flavus</i> tratadas com 0,2µg/mL óleo essencial de mentrasto, mostra a diminuição da espessura da camada fibrilar (CF).	34
Figura 14	Microscopia eletrônica de células fúngicas de <i>A. flavus</i> tratadas com 0,4µg/mL óleo essencial de mentrasto, mostra membrana plasmática (MP) não linear com vilosidades a diminuição da	35

espessura da camada fibrilar (CF), diminuição da espessura da camada fibrilar (CF) e a desorganização da estrutura das mitocôndrias (Mit) acarretando diminuição das cristas .

- | | | |
|------------------|---|----|
| Figura 15 | Microscopia eletrônica de células fúngicas de <i>A. flavus</i> tratadas com 1µg/mL óleo essencial de mentrasto, mostra a diminuição da espessura da camada fibrilar (CF), e falhas NBA deposição da camada fibrilar (CF) sobre a parede celular (PC), e a desorganização da estrutura das mitocôndrias (Mit) acarretando diminuição das cristas (Mit a) e ainda invaginações da membrana mitocondrial acarretando formação de vesículas dentro da mitocôndria (Mit b) . | 35 |
| Figura 16 | Microscopia eletrônica de células fúngicas de <i>A. flavus</i> tratadas com 30µg/mL óleo essencial de mentrasto mostra camada fibrilar (CF) praticamente não evidenciada, membrana plasmática (MP) com invaginações com tendências a formação de na estrutura das mitocôndrias (Mit) observa –se uma polarização das cristas. | 36 |
| Figura 17 | Microscopia eletrônica de células fúngicas de <i>A. flavus</i> tratadas com 0,2 µg/mL óleo essencial de mentrasto mostra desagregação gradual do conteúdo dos grânulos elétrons densos (GEDS) e a diminuição da densidade mitocondrial (Mit) em relação ao citoplasma. | 36 |
| Figura 18 | Microscopia eletrônica de células fúngicas de <i>A. flavus</i> tratadas com 0,4µg/mL óleo essencial de mentrasto mostra a desorganização da estrutura das mitocôndrias a diminuição das cristas (Mit a) e vesículas dentro da mitocôndria (Mit b) | 37 |
| Figura 19 | Microscopia eletrônica de células fúngicas de <i>A. flavus</i> tratadas com 0,2 µg/mL óleo essencial de mentrasto mostra a membrana plasmática com invaginações com tendência a formação de vesículas e mitocôndrias (Mit) com vesículas internas. | 37 |
| Figura 20 | Microscopia eletrônica de células fúngicas de <i>A. flavus</i> tratadas com 0,02µg/mL óleo essencial de mentrasto, mostra a dissociação da membrana plasmática (MP) em relação a parede celular (PC). | 38 |
| Figura 21 | Microscopia eletrônica grânulos elétrons densos (GEDS) de células fúngicas de <i>A. flavus</i> não tratadas com óleo essencial de mentrasto, com aparência densa. | 38 |

Figura 22	Microscopia eletrônica de células fúngicas de <i>A. flavus</i> tratadas com 0,01 µg/mL óleo essencial de mentrasto mostra a membrana plasmática (MP) com invaginações com tendência a formação de vesículas e desagregação gradual dos grânulos elétrons densos (GEDS).	39
Figura 23	Microscopia eletrônica de células fúngicas de <i>A. flavus</i> tratadas com 0,04 µg/mL óleo essencial de mentrasto mostra a desagregação gradual dos grânulos elétrons densos (GEDS) até a não visualização.	39
Figura 24	Microscopia eletrônica de células fúngicas de <i>A. flavus</i> não tratadas com óleo essencial de mentrasto, apresenta mitocôndrias (Mit) com organização típica conteúdo uniforme e cristas distribuídas homogeneamente no seu interior.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Limites máximos admissíveis de concentração de aflatoxinas no Brasil.	9
Tabela 2	Efeito inibitório de diferentes concentrações de óleo essencial de mentrasto no crescimento do fungo e na inibição da biossíntese da aflatoxina em porcentagem.	27
Tabela 3	Principais componentes identificados como constituintes do óleo essencial de <i>Ageratum conyzoides</i> (%).	28
Tabela 4	Constituintes químicos da fração 2 de óleo essencial de Mentrasto.	29
Tabela 5	Constituintes químicos da fração 3 de óleo essencial de Mentrasto.	29
Tabela 6	Constituintes químicos da fração 4 de óleo essencial de Mentrasto.	30
Tabela 7	Constituintes químicos da fração 5 de óleo essencial de Mentrasto.	30
Tabela 8	Constituintes químicos da fração 6 de óleo essencial de Mentrasto.	30
Tabela 9	Constituintes químicos da fração 7 de óleo essencial de Mentrasto.	31
Tabela 10	Constituintes químicos da fração 8 de óleo essencial de Mentrasto.	31

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
AFB₁	Aflatoxina B ₁
<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>A. parasiticus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
AFM₁	Aflatoxina M ₁
ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFB₂	Aflatoxina B ₂
AFG₁	Aflatoxina G ₁
AFG₂	Aflatoxina G ₂
PPM	Parte por milhão
V/V	Volume/ Volume
<i>A. conyzoides</i>	<i>Ageratum conyzoides</i>
Yes	Yeast Extrat Sucrose
BDA	Batata dextrose Agar
AFS	Aflatoxina
N	Núcleo
V	Vacúolo
MP	Membrana plasmática
CF	Camada fibrilar
PC	Parede celular
Mit	Mitocôndrias
GEDS	Grânulos elétrons densos

1. INTRODUÇÃO

Os fungos podem causar uma série de danos aos grãos durante o plantio e a colheita, bem como durante o armazenamento. Os impactos econômicos da invasão fúngica incluem a diminuição do poder de germinação, emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, cozimento, mudanças químicas e nutricionais com conseqüente perda da qualidade (PASTER; BULLERMAN, 1988). Alguns fungos denominados toxigênicos, além de depreciarem produtos destinados à alimentação, têm a capacidade de produzir micotoxinas (SHARMA; SALUNKHE, 1991).

Micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas pelo metabolismo secundário de várias espécies de fungos filamentosos que contaminam alimentos no campo, no armazenamento ou após a manufatura (MOSS, 1996). A ingestão de micotoxinas pode causar ao animal uma intoxicação (micotoxicose) podendo afetar o crescimento, desenvolver tumores, e levar até mesmo a morte. Além dos efeitos citados, a ingestão de alimentos ou rações contaminados com aflatoxinas por animais, em geral, podem desencadear não só redução no crescimento, mas também redução na produção de leite e de ovos, queda da fertilidade, anemia (MAIA; SIQUEIRA, 2007).

A contaminação de grãos com micotoxinas e fungos toxigênicos, pode ocasionar, além de problemas de saúde, perdas econômicas consideráveis já que lotes contaminados devem ser descartados (BHATNAGAR et al., 2003). A FAO (Food and Agriculture Organization) estima uma perda mundial de 25% dos grãos produzidos (VIEIRA, 1995).

Aspergillus, *Fusarium* e *Penicillium* são os principais gêneros de fungos produtores de micotoxinas em alimentos (SIAME et al., 1998).

As aflatoxinas são micotoxinas produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, são conhecidas por serem potentes mutagênicos, cancerígenos, teratogênicos, hepatotóxicos, imunossupressores inibindo também vários sistemas metabólicos (IARC, 1993; MINTO; TOWNSEND, 1997). Dentre todas as aflatoxinas, a aflatoxina B₁ (AFB₁) é a mais conhecida por apresentar significativos riscos para a saúde animal e humana (PIER, 1992; COULOMBE, 1991).

Assim devido ao grande impacto na economia e na saúde pública relacionado à ingestão por humanos e animais de grãos e cereais contaminados por micotoxinas, bem como as implicações no comércio internacional de produtos agrícolas contaminados, prevenir a contaminação pelos fungos *Aspergillus flavus* e *parasiticus* continua sendo a melhor medida para evitar a presença de aflatoxina em alimentos e garantir a segurança alimentar de humanos e animais, visto que existem alguns fatores predisponentes que facilitam a colonização fúngica no alimento, tais como condições inadequadas de

armazenamento, falta de resistência genética da planta e manejo na colheita (FERNANDES et al., 2006). Recomenda-se o plantio de cultivares de grãos que possuam maior resistência à contaminação fúngica e o tratamento dos grãos antes do armazenamento, são soluções viáveis para prevenir o crescimento fúngico pós-colheita. Após a colonização dos grãos por fungos, vários métodos podem ser utilizados para eliminar os contaminantes, tais como a remoção física dos grãos, o uso de solventes e o processamento físico dentre outros. Contudo, muitos desses métodos são inviáveis economicamente (MAGAN, 2007).

Apesar de um número grande de substâncias químicas possuir efeito inibidor da produção de micotoxinas e do crescimento de fungo, muitas delas não devem ser utilizadas tendo em vista os seus efeitos perigosos sobre a saúde humana e animal (JAYASHREE; SUBRAMANYAM, 1999). A necessidade de reduzir ou eliminar o uso de substâncias químicas que possam causar algum problema para a saúde dos consumidores tem se motivado na busca de substâncias naturais que possam atuar como fungicida sem provocar prejuízos ao homem e ao meio ambiente. A busca de substâncias naturais para a supressão ou controle de fungos produtores de micotoxinas tem grande apoio da sociedade, visto que a utilização de doses elevadas de substâncias químicas sintéticas com atividade fungicida tem a desvantagem da toxicidade para os seres humanos e animais.

As plantas produzem metabólitos secundários, muitos deles apresentam atividade antimicrobiana, quer como parte de sua biossíntese normal ou em resposta ao ataque de patógenos ou estresse. Dentre estes metabólitos, os óleos essenciais são uma forte promessa na luta contra a redução e a proliferação de microrganismos e / ou produção e suas toxinas (HARBORNE, 1980; MOTHES, 1980; SWAIN, 1977).

O desenvolvimento de uma nova estratégia para o controle de *A. flavus* e da contaminação de aflatoxinas, utilizando produtos voláteis como os óleos essenciais são de grande interesse, pois os produtos agrícolas poderão apresentar pouco ou nenhum resíduo destes. Resultados deste tipo de pesquisa vão ao encontro dos anseios da sociedade que cada vez mais demandam por alimentos seguros (BLUMA et al., 2008).

Os óleos essenciais podem ser utilizados como aditivos naturais em diferentes alimentos (TEISSEDRE; WATERHOUSE, 2000; BADEAA; SOLIMAN, 2002). Vários trabalhos têm relatado o efeito de óleos essenciais e substâncias isoladas destes, sobre espécies de fungos toxigênicos (MAHMOUD, 1994; PARANAGAMA et al., 2003; PINTO et al., 2006; PEREIRA, 2006; NOGUEIRA et al., 2006; OMIDBEYGI et al., 2007; HELAL, et al., 2007; RASOOLI et al., 2008).

O laboratório de Produtos Naturais do Instituto Biológico, já avaliou em meio de cultura, alguns extratos e substâncias puras isoladas (PINTO et al., 2001; GONÇALEZ et al., 2003). Óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *Ageratum conyzoides* e *Pittosporum undulatum* foram previamente avaliados em culturas de *A. flavus* via testes de disco de

difusão, mostrando atividade inibidora do crescimento do fungo (CARVALHO et al., 2007; NOGUEIRA et al., 2007a e 2007b; SILVA et al., 2008). Desta forma, averiguar o crescimento do fungo e a produção de aflatoxinas por óleo essencial de plantas que apresentem tal atividade pode trazer resultados bastante promissores, para a diminuição do índice de contaminação de grãos, rações e alimentos por micotoxinas, que é um grande problema no agronegócio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aflatoxinas e aflatoxicoses

Aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, ocorrendo após a fase de crescimento exponencial dos fungos (DUTTON, 1988; ELLIS et al., 1991). Estes fungos podem contaminar uma grande variedade de alimentos, principalmente o amendoim, nozes, sementes de algodão, milho, trigo, sementes oleosas em geral, ração animal, produzindo a aflatoxina em condições ambientais adequadas, como temperatura entre 25-30 °C e atividade de água superior a 0,86 (NORTHOLT; EGMOND; PAULSCH, 1977).

Atualmente, são conhecidas cerca de dezessete compostos designados pelo termo aflatoxina, mas apenas quatro delas são bem conhecidas e estão até o momento, intimamente relacionadas com surtos de intoxicação. Entretanto este termo refere-se habitualmente a quatro compostos do grupo de metabólitos bis-furano-cumarina, derivadas de um decacetídeo pela via biosintética dos policetídeos, no qual a unidade C₂ é perdida durante a formação dos anéis bisfuranos (SMITH; MOSS, 1985).

Estes compostos heterocíclicos são caracterizados como aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e são distinguíveis cromatograficamente por suas fluorescências azuis (B de “Blue”) para aflatoxinas B₁ e B₂ e verdes (G de “Green”) para aflatoxinas G₁ e G₂ quando observados sob luz ultravioleta a 365 nm (SCUSSEL, 2002).

A série G das aflatoxinas difere quimicamente da série B pela presença de um anel 3-lactona, no lugar do anel ciclopentenona. Uma dupla ligação 8, 9 é encontrada na forma de um éter vinil no anel terminal furano nas aflatoxinas B₁ e G₁, mas não em B₂ e G₂ (figura 1). Essas variações que diferem as aflatoxinas estruturalmente estão associadas também as suas atividades, sendo as aflatoxinas B₁ e G₁ carcinogênicas e consideravelmente mais tóxicas que B₂ e G₂ (JAIMEZ et al., 2000).

Apesar das semelhanças estruturais, as aflatoxinas apresentam diferentes graus de atividade biológica. A AFB₁, além de ser a mais freqüentemente encontrada nos cereais, é a que apresenta maior poder toxigênico, seguida das aflatoxinas G₁, B₂ e G₂ (COULOMBE, 1991).

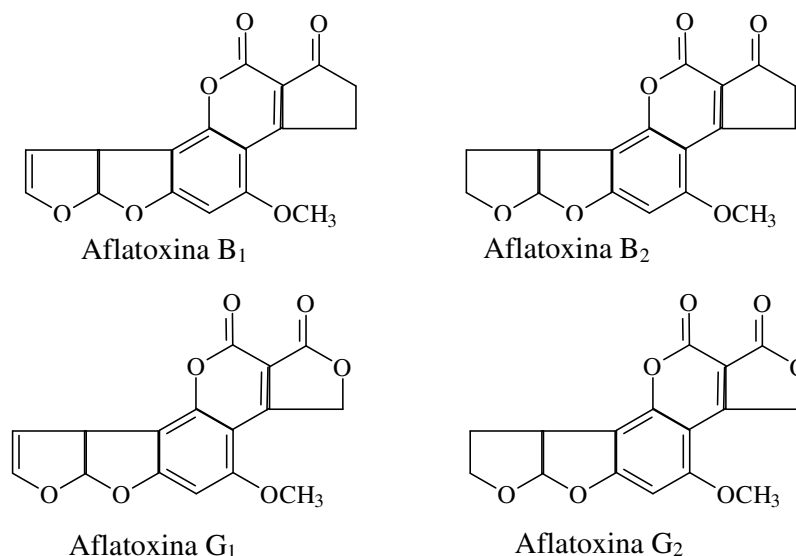


Figura 1 – Estrutura química das principais aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

A aflatoxina M₁ (figura 2) é um produto biotransformado da aflatoxina B₁, formada através do processo de hidroxilação, produzindo assim um derivado hidrossolúvel, o que possibilita a sua excreção por fluidos corporais. É considerado um potente hepatocarcinogênico e sua contaminação em leite para consumo humano tem recebido grande importância em saúde pública (SILVA, 2005). Esta toxina é transportada pelo sangue, podendo se ligar as células ou proteínas plasmáticas, ficando presentes no leite, ovos, urina, fezes, músculos e tecidos comestíveis de animais (CREPPY, 2002). Esse composto pode ser detectado entre 12-24 horas após a primeira ingestão de aflatoxina B₁ (LÓPEZ et al., 2001).

A AFM₁ revela-se geralmente estável em alguns queijos, iogurtes, leite pasteurizado, leite magro ou gordo e gelados. Em processos de pasteurização a 63°C durante 30 minutos, pasteurização a 77°C durante 16 segundos, processamento térmico a 64-100°C durante 15-20 minutos, processamentos térmicos diretos durante 3-4 horas e durante alguns processos de pasteurização e esterilização, a concentração de contaminação original do leite cru permanece praticamente inalterada (YOUSEF; MARTH, 1989).

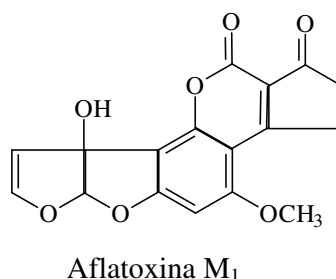


Figura 2 - Estrutura química da aflatoxina M₁.

A condição patológica resultante da ingestão de aflatoxinas é conhecida como aflatoxicose. A sensibilidade ao tóxico varia grandemente entre as espécies animais, e mesmo entre indivíduos da mesma espécie, dependendo da idade, sexo, condições nutricionais do animal e composição da dieta. Além disso, os efeitos da aflatoxicose variam de acordo com a quantidade ingerida e tempo de exposição à toxina (MAIA; SIQUEIRA, 2007). Abaixo estão descritos os principais efeitos causados pela ingestão de aflatoxinas em alguns animais (MAIA; SIQUEIRA, 2007):

Frangos e poedeiras – Redução do crescimento e da eficiência dos antibióticos; fígados e rins descolorados, pigmentados e um pouco aumentados, fibrose, acumulação de gordura; hemorragia, anorexia, fraqueza das pernas e das asas; diminuição da produção de ovos, gema pálida, ovos menores, casca frágil, pontos pretos; desenvolvimento menor dos embriões, redução do ganho de peso.

Suínos – Necrose centrilobular, fibrose; proliferação dos dutos biliares; problemas nos rins, hemorragias, ataxia, menor peso das crias e menor taxa de sobrevivência, perda de peso, morte.

Bovinos – Necrose centrilobular, fibrose, infecção no miocárdio, síndrome nervosa, infertilidade, diminuição da gordura do leite, redução do consumo de ração, ataxia.

Eqüinos – Dano ao fígado, anorexia, hemorragia, convulsão, morte.

Peixes – Dano ao fígado e rins, pouco desenvolvimento, morte.

O fígado é o órgão alvo das aflatoxinas, no qual produzem alterações tumorais e teciduais, podendo desencadear o câncer. Outros órgãos também podem ser afetados, sendo que a administração de quantidades mínimas pode produzir tumores (LAZZARI, 1997). Dentre os principais efeitos biológicos causados pela ingestão das aflatoxinas estão: hepatomas, cirrose hepática, hemorragias do trato gastrointestinal, proliferação do epitélio do

ducto biliar, inapetência, prostração e morte. Além destes, as aflatoxinas apresentam efeitos teratogênicos e mutagênicos (MALLOZZI; CÔRREA, 1998).

As aflatoxinas também podem prejudicar o sistema imunológico, quando ingeridas em doses baixas, elas levam a uma morte prematura (apoptose) das células imunológicas, resultando no aumento da susceptibilidade a infecções por microrganismos patogênicos. As alterações no sistema imunológico também podem causar reações específicas a antibióticos, funções medidas por células, ou ambas; levando a uma diminuição da resistência, a possibilidade do fracasso das vacinas, aumento da morbidez e mortalidade, que é caracterizado por moléstias infecciosas de origem bacteriana ou virótica. A diminuição da resistência imunológica propicia surtos de hepatites virais tipo B, estando também associada à Síndrome de Reye, febre, convulsões, vômito, coma (FERREIRA et al., 2006).

A intoxicação por aflatoxinas pode proceder-se de forma direta ou indireta. A forma direta (primária) ocorre quando o produto contaminado é diretamente utilizado na alimentação humana ou animal, enquanto que a forma indireta (secundária) ocorre quando subprodutos (leite, ovos, carne e produtos lácteos) de animais que consumiram ração contaminada são ingeridos. Manipuladores de cereais, rações, amendoim e pesquisadores que trabalham com toxinas em experimentos ou toxinas puras como padrões de análise, também podem estar expostos à intoxicação (MAIA; SIQUEIRA, 2007).

2.2. Metabolismo das aflatoxinas

As aflatoxinas (substâncias lipofílicas e de baixo peso molecular) são rapidamente absorvidas e lentamente excretadas. A absorção ocorre no trato gastrointestinal por difusão passiva, difundindo-se rapidamente por todo o organismo de maneira que três horas após a alimentação, as aflatoxinas B₁ e B₂ podem ser encontradas em todos os tecidos (SHARMA; SALUNKHE, 1991; MELLO; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 1999).

Segundo Oga (1996) as aflatoxinas são primeiramente biotransformadas pelo sistema oxidase mista no fígado. A detoxificação das aflatoxinas ocorre por hidroxilação, permitindo ser conjugada pelo ácido glicorônico. Conforme a Organización mundial de la salud (1983) a absorção ocorre no trato digestivo, atravessando a membrana celular por meio de transporte químico e a passagem ocorre devido à alta lipossolubilidade das aflatoxinas. Ao ser absorvida a AFB₁ é imediatamente ligada de forma reversível à albumina e também em menor escala a outras proteínas.

Formas de aflatoxinas ligadas e não ligadas a proteínas séricas distribuem-se pelos tecidos, especialmente o fígado (WYATT, 1991). Segundo Lindner (1995) a aflatoxina ataca os ácidos nucléicos, ADN e ARN. Os metabólitos de aflatoxina B₁ se unem ao ácido

desoxirribonucleico (ADN), principalmente no nitrogênio 7 da guanina, dificultando a transcrição e diminuindo a síntese do ácido ribonucleico (ARN). Sendo então a ação cancerígena da aflatoxina explicada pela obstrução da síntese do ADN, diminuindo a síntese de proteínas e outros processos metabólicos como a síntese de ácidos graxos.

Existe consenso entre grande número de especialistas, de que a AFB₁ é na realidade um pró-cancerígeno, o qual requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos (BIEHL; BUCK, 1987).

A forma ativada da AFB₁ é o composto identificado como 8,9-óxido de AFB₁ ou AFB₁-epóxido (Figura. 3), anteriormente denominado AFB₁ - 2,3 - epóxido, originado através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanóide da molécula de AFB₁ (BIEHL; BUCK, 1987).

Este composto, altamente eletrofílico, é capaz de reagir rapidamente, através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como do ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) e proteínas. Estas ligações determinam a formação de aductos, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas (OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

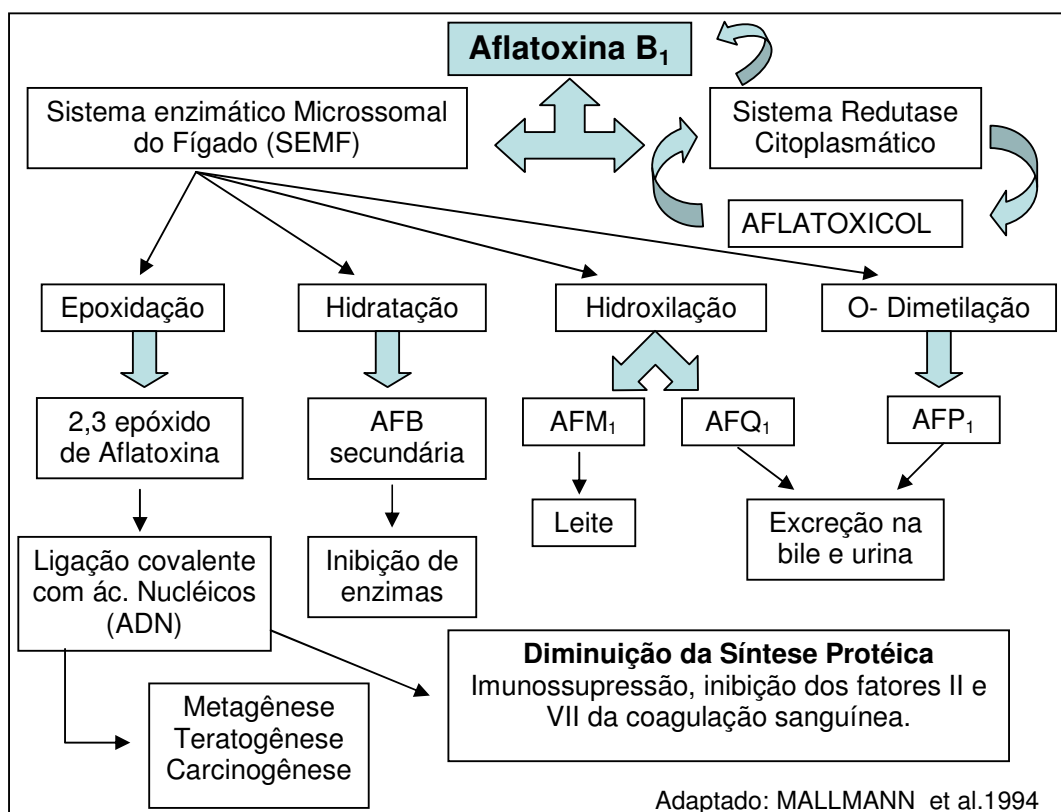


Figura 3 - Metabolismo da aflatoxina B₁ no fígado.

2.3. Legislação

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos limites máximos em alimentos estão previstos na legislação. A Resolução nº 34 de 1976, antiga CNNA – Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, estabelecia o limite de 30 ppb para a soma dos conteúdos das aflatoxinas B₁ e Aflatoxinas G₁ em alimentos. Em 15 de outubro de 2002, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), cria a Resolução RDC nº 274, que revoga a Resolução nº 34/76, para os alimentos: leite fluído, leite em pó, amendoim, pasta de amendoim, milho em grão, farinha ou sêmola de milho para consumo humano, aprovando o regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis nestes alimentos, conforme tabela 1 (BRASIL, 2002).

TABELA 1: Limites máximos admissíveis de concentração de aflatoxinas no Brasil

Alimento	Aflatoxina	Limite
Leite fluído	M ₁	0,5 µg/L
Leite em pó	M ₁	5,0 µg/kg
Milho em grão (inteiro, partido, amassado ou moído)	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	20,0 µg/kg
Farinhas ou Sêmolos de milho	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	20,0 µg/kg
Amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado)	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	20,0 µg/kg
Pasta de Amendoim ou Manteiga de Amendoim	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	20,0 µg/kg

Em 21 de março de 1996, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Portaria nº 183, adota o regulamento técnico MERCOSUL sobre os limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho, após aprovação pela Resolução nº 56/94, de 12 de janeiro de 1995, que posteriormente é alterado pela Resolução MERCOSUL GMC nº 25/02. Os limites de aflatoxinas em matérias-primas destinadas a ração animal são no máximo 50 µg/kg, exceto cão gato que é 20 µg/kg, determinados pela Portaria MA/SNAD/SFA No. 07, de 09/11/88 (BRASIL, 1996; BRASIL, 1988).

2.4. Controle de fungos toxigênicos e micotoxinas por óleos essenciais

A prevenção é a medida mais eficiente de se controlar a contaminação. O conhecimento dos fatores que favorecem a produção de aflatoxinas é útil para minimizar o problema (STUSSI et al., 2002). É importante lembrar que várias práticas agrícolas podem

influenciar a contaminação das culturas, mas até mesmo a melhor gestão das estratégias de explorações agrícolas não pode eliminar totalmente a contaminação (JOUANY, 2001).

As aflatoxinas são encontradas mundialmente, sendo as regiões de temperatura e umidade elevadas as principais áreas de ocorrência. Detectar a presença de aflatoxinas em grãos é bastante difícil, uma vez que a contaminação é extremamente heterogênea. Métodos de controle depois que a toxina já foi produzida pelo fungo e sua inativação é uma alternativa dispendiosa uma vez que a contaminação dos gêneros alimentícios e produtos agrícolas para consumo animal e humano com aflatoxina podem ocorrer apesar dos mais árduos esforços de prevenção, portanto técnicas de controle são bastante estudadas (AMARAL et al., 2006). O uso de substâncias químicas é um método de controle muito utilizado, nos últimos anos várias pesquisas vêm buscando o uso de substâncias naturais como alternativa ao controle químico com substância sintética sendo os óleos essenciais um dos principais objetos de estudos.

Óleos essenciais são compostos voláteis extraídos das plantas por processos de destilação, sendo o principal a hidrodestilação. Quimicamente, constituem-se de misturas de substâncias de baixo peso molecular, divididas em dois grupos: terpenóides (principalmente monoterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanóides. Sua função nas plantas está relacionada à comunicação química no reino vegetal e atuam como armas de defesa química contra o reino animal (WOLFFENBUTTEL, 2007)

A obtenção de óleos essenciais constitui importante atividade econômica, sendo amplamente utilizados como fragrância em cosméticos, aromatizantes de alimentos, bebidas e produtos de utilidade doméstica, como, por exemplo, detergentes, sabões, repelentes de insetos e aromatizantes de ambiente, além de seu emprego como intermediários sintéticos de perfumes (BURT, 2004).

Os óleos essenciais são empregados no setor farmacêutico devido as suas propriedades antimicrobianas. Numerosas pesquisas têm confirmado a ação fungicida, contra fungos toxigênicos por óleos essenciais em sistemas de meio de cultura e em alimentos, bem como seu efeito inibidor de micotoxinas (KOUTSOUMANIS et al., 1998; TSIGARIDA et al., 2000; CHAO e YOUNG, 2000; SAHIN et al., 2003; GUYNOT et al., 2005; NERI et al., 2006; PINTO et al., 2006; IRKIN e KORUKLUOGLU, 2007; KUMAR et al., 2007; OMIDBEYGI et al., 2007). Velluti et al., (2004) relatam o efeito de óleos essenciais de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), orégano (*Origanum vulgare*), limão (*Citrus limon*) na produção de zearalenona (ZEA) e desoxinivalenol (DON) por *Fusarium graminearum* em grão de milho contaminados naturalmente.

Basílico e Basílico 1999 relataram o efeito inibidor de óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), hortelã (*Menta arvensis*), manjerição (*Ocimum basilicum*), sálvia (*Salvia officinalis*) e coentro (*Coriandrum sativum*), sobre o crescimento micelial de *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 e na produção de ocratoxina A, nas concentrações de 0, 500, 750 e 1000 ppm de óleos essenciais durante 7, 14 e 21 dias a 25 °C. Orégano e hortelã a 1000 ppm, inibiram completamente o desenvolvimento do fungo e a produção da ocratoxina até 21º dia. O manjerição a 1000 ppm foi eficaz apenas até 7º dia. O orégano a 750 ppm, foi totalmente eficaz até 14º dia e a hortelã nesta concentração não inibiu o desenvolvimento do fungo e nem da produção da ocratoxina. Quanto à sálvia e o coentro não foi observado atividade.

Singh et al. (1993) relatam o efeito fungicida e fungistático do óleo essencial de *Mentha arvensis* sobre 23 espécies de fungos, entre elas *Fusarium verticillioides* Sheld. e *F. solani* Mart. (Sacc), nas concentrações de 500 a 10.000 mg/mL e observaram inibição de 100% dos micélios, a partir de 2.000 mg/mL. Os resultados mostraram que o óleo de menta (*Mentha arvensis*) possui atividade fungicida superior a alguns fungicidas comerciais, podendo ser usado como um forte produto no controle de doenças de plantas e animais.

Pereira et al. (2006) avaliaram o efeito de óleos essenciais de condimentos em meio sintético sobre o desenvolvimento micelial dos fungos *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. flavus* e *Fusarium* ssp. Óleos essenciais obtidos dos condimentos: orégano (*Origanum vulgare*), manjerição (*Ocimum americanum*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) apresentaram índices variáveis de inibição no desenvolvimento micelial dos fungos estudados, quando comparados com a testemunha não tratada. Os autores observaram que a partir de 500 mg/mL todos os fungos estudados tiveram o desenvolvimento significativamente reduzido, com exceção do fungo *A. niger*, resultado semelhante ao observado por outros autores (AKGUL; KIVANÇ 1988; VELLUTI et al., 2003 e 2004).

Hitokoto et al. (1980), testaram 29 condimentos e observaram uma inibição completa de três espécies toxigênicas de *Aspergillus* por extratos de cravo, semente de anis e pimenta, enquanto que os outros 26 condimentos, foram eficientes somente na inibição da aflatoxina. O eugenol e o timol extraídos respectivamente do cravo e do tomilho causaram inibição completa no desenvolvimento de *A. flavus* e *A. versicolor* (Vuill) a 0,4 mg/mL na concentração de 2 mg/mL, o anetol extraído das sementes de anis inibiu o desenvolvimento de todas as estirpes testadas.

Óleos essenciais de manjerição doce (*Ocimum basilicum*), Cassia (*Cinnamomum cassia*), coentro (*Coriandrum sativum*) e louro (*Laurus nobilis*) inibiram completamente em meio de cultura o crescimento micelial de *A. parasiticus* e a produção de aflatoxinas nas

concentrações de 1-5% (v/v). Nas mesmas concentrações o óleo de cássia reduz a produção da toxina AFB₁ e AFG₁ em 97,92% e 55,21% respectivamente, enquanto o coentro não tem qualquer efeito sobre ambos os crescimentos do micélio e nem na produção de aflatoxina. Os efeitos destes óleos em grãos de sorgo foram também avaliados pelos autores que observaram uma redução da contaminação de 100% para *Ocimum basilicum* e 99% para *Cinnamomum cassia*, sendo que a mistura dos dois óleos nas proporções 1:1 inibe 100% a contaminação do sorgo pelo fungo (ATANDA et al., 2007).

Óleos essenciais de anis e boldo inibiram o crescimento de *A. flavus* proporcionalmente a concentração utilizada, sendo o maior efeito de 80% de inibição para a concentração de 500mg/Kg⁻¹ (BLUMA 2008). Viuda – Martos et al. (2007) também observaram atividade inibidora do crescimento de *A. flavus* pelo óleo de *Citrus reticulata* nas concentrações de 0,27%, 0,47%, 0,71% com atividade de 55,5%, 62,8% e 64,8% respectivamente.

Rassoli et al. (2008) relatam a atividade fungicida e a inibição total da produção de aflatoxina em concentrações de 450 ppm pelo óleo de *Rosamarinus officinalis*, em *Aspergillus parasiticus*. O óleo essencial da planta é constituído de algumas substâncias que já haviam sido relatadas anteriormente como possuidoras de atividade antifúngica, como borneol, outros compostos fenólicos e terpenos como cânfora, canfeno, 1,8 cineol, α pineno, canfeno, verbenona e acetato de bornila (DAVIDSON; NAIDU, 2000; CARDENAS-ORTEGA et al., 2005; MAHMOUD, 1994).

Abyaneh et al. (2008) relatam o efeito inibidor do óleo essencial *Satureja hortensis* L. no crescimento do fungo e na produção da aflatoxina por *Aspergillus parasiticus*, esta mesma atividade foi observada por Omidbeygi et al, (2007), para o fungo *Aspergillus flavus*. Os autores avaliaram a atividade antifúngica do óleo de *Thymus vulgaris* e *Satureja hortensis* em cultura de *Aspergillus flavus* e em massa de tomate e os resultados mostraram uma forte inibição do crescimento fúngico nas concentrações de 350 ppm e 500 ppm. O óleo a 500 ppm inibiu em 87% o crescimento do fungo na massa de tomate sendo que no meio de cultura apresentou efeito inibidor de 100%. A atividade antifúngica do óleo essencial e extrato metanólico de *S. hortensis* contra *A. flavus* “*in vitro*” foi relatada por Dikbas et al. (2008), que também relata os resultados obtidos com o óleo essencial de *Satureja hortensis* em placas contendo *A. flavus* observando uma redução no crescimento de 97% após 20 dias na concentração de 6,25 μ L/mL e de 100% na concentração de 25 μ L/mL.

Segundo Helal et al. (2007) o crescimento micelial de *Aspergillus flavus* foi completamente inibido usando 1,5 μ g/mL ou 2,0 μ g/mL de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* aplicada pelo método de fumigação. Dose 1,0 μ g/mL inibiu cerca de 65% do desenvolvimento do fungo após cinco dias de incubação. Avaliações microscópicas utilizando

Microscópio Eletrônico foram realizadas em *A. flavus* após o tratamento com o óleo do *C. citratus* observando diminuição do diâmetro hifal, interrupções da membrana plasmática e desorganizações na estrutura mitocondrial.

Neste contexto, há relatos sobre a ação de óleos essenciais e de constituintes de óleos essenciais, na degradação da parede celular, alteração na membrana plasmática e nas proteínas de membrana, no fluxo de elétrons e na coagulação do citoplasma de fungos e bactérias (JUVEN et al., 1994; ULTEE et al., 2002, LUO et al., 2004). Essas ações são justificadas, pois se acredita que os óleos essenciais constituídos de monoterpenos, possuam atividade microbiana por desencadear efeitos tóxicos na estrutura e na função das membranas das células dos microrganismos, como alterações na fluidez e permeabilidade e interação com componentes internos da célula, ações estas, explicadas principalmente pelo caráter lipofílico destas substâncias (TROMBETA et al., 2005).

2.5. *Ageratum conyzoides*

O mentrasto (*Ageratum conyzoides*) é uma planta tropical muito comum na África Ocidental, algumas partes da Ásia, América do Sul e América Central. A planta é nativa dos países tropicais da América e foi introduzida e naturalizada na Índia (YOGANARNARASIMHAM, 2000).

Pertencente a família *Asteraceae* é uma erva anual, invasora de culturas e áreas não cultivadas, em cerca de 50 países. Esta família é bem marcada nas suas características e não pode ser confundida com qualquer outra. O gênero *Ageratum* é composto por cerca de 30 espécies, mas apenas algumas espécies têm sido investigadas fitoquimicamente (BURKILL, 1985). Na Malásia é muito utilizado como forragem para caprinos, bovinos e muares. É utilizado largamente na medicina indígena e na medicina tradicional da Ásia, África e América do Sul (EKUNDAYO; HILTUNEN, 1988, CASTRO et al., 2004 b, LADEIRA et al., 1987, MING, 1999). Na área agrícola, é muito perturbadora, interferindo com o crescimento e com a criação de culturas reduzindo então o seu rendimento (BANSAL, 1988).

Tem odor peculiar, na Austrália é comparado ao odor de bode, daí o nome popular de catinga-de bode, dentre outros, como: mentrasto, maria-preta, picão-branco; picão-roxo, erva-de-São João, erva-de-São-José, erva-de-Santa-Lúcia (LORENZI; MATOS, 2002; OKUNADE, 2002).

A planta apresenta-se de forma ereta, pilosa e aromática com até 1 m de altura. O caule (talos) e folhas são cobertos com pêlos brancos, sendo que as folhas são opostas, longo-pecioladas, ovóides e ásperas, com até 7,5 cm de comprimento. Possuem

inflorescência tipo capítulo com cerca de 30-50 flores de cor lilás a branca (LORENZI; MATOS, 2002; OKUNADE, 2002).



Figura 4 - *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae)

Disponível em: <http://vidanatural.fortunecity.com/ageratum.html>

A principal razão do uso de *Ageratum conyzoides* em várias partes do mundo é por apresentar efeitos terapêuticos diversos. Na medicina popular é largamente utilizado como laxante, antipirético, tratamento de úlceras e curativo, além de sua utilização popular para cicatrização de feridas cutânea (GITHENS, 1948, OKUNADE, 2002). Suas folhas também foram relatadas em tratamentos de infecção por parasitas, reumatismo, cefaléia e cólicas (MENUT et al., 1993). As propriedades antipiréticas e antientérica também foram relatadas em uma resenha sobre “Plantas medicinais do Senegal” (KERHARO; ADAMS, 1974). A planta teve seu consumo aumentado desde a inclusão na lista da Central de Medicamentos, com propriedades analgésicas e antiinflamatórias (CASTRO et al., 2004).

Na África Central, *A. conyzoides* é usada particularmente em feridas causadas por queimaduras, enquanto que no Quênia (África Oriental), é usada na medicina tradicional como antiasmática, antiespasmódica e hemostática. Já na Nigéria (oeste da África) uma decocção da planta é utilizada para tratar a diarreia e para aliviar a dor associada com o umbigo em crianças (GITHENS, 1948).

Na Índia, é utilizada no tratamento da hanseníase e a loção do seu óleo para oftalmia purulenta, no Vietnã a planta é particularmente usada para o tratamento de doenças ginecológicas (KIRTIKAR; BASU, 1991).

Marques Neto et al. (1988) verificaram em laboratório clínico a atividade analgésica e tolerabilidade do chá de mentrasto na dor crônica, em pacientes que sofrem de artrose. Os resultados indicaram que o chá de mentrasto mostrou atividade analgésica e ausência de qualquer efeito secundário, sendo recomendada a inclusão do chá de mentrasto como uma opção alternativa no tratamento da doença.

No Brasil, o chá é utilizado como antiinflamatório, analgésico e anti-diarréico (YAMAMOTO et al., 1991). Outras soluções são utilizadas contra coceiras, doença do sono, elixires para dor de dente, tosse, vermífugo, tônica e para matar piolhos (flores) (KAPUR, 1993). As folhas são utilizadas para aplicação em cortes, feridas (AHLUWALIA, 1968; DUTTA; NATH, 1998; GANGWAR; RAMAKRISHNAN, 1990; SUDHAKAR; CHETTY, 1998; UPADHAY et al., 1998); hemostático (BANERJEE; BANERJEE, 1986; JAIN; PAND PURI, 1984; JAMIR, 1990; KUMAR; JAIN, 1998; SURESH et al., 1995); como um inseticida (RAMACHANDRAN; NAIR, 1981); nas dores de cabeça (KAPUR, 1993; MAHESHWARI et al., 1980); em furúnculos (SIDDIQUI et al., 1989); doenças de pele (SANKARAN; ALAGESABOOPATHI, 1995); micose; em febre tifóide, como antídoto ao veneno (JAIN; SAHU, 1993; NEOGI et al., 1989); febre amarela; para problemas uterinos (RAJWAR, 1983; DHASMANA, 1985); prolapso do ânus (SINGH, 1988); infecção de garganta; na cicatrização de feridas e leucorréia (DAGAR; DAGAR, 1996; KATEWA; ARORA, 1997; SAHOO; MUDGAL, 1993; SHARMA et al., 1985).

Em relação ao seu potencial alelopático, extratos aquosos foliares, da raiz e da rizosfera aplicados em solo inibiram o crescimento de outras plantas (JHA; DHAKAL, 1990; SINGH et al., 2003). No noroeste da Índia, *A. conyzoides* é muito comum nos campos de trigo e grão de bico durante o período de inverno e afeta negativamente o crescimento das culturas (BANSAL, 1988). Estudos têm demonstrado que *A. conyzoides* afeta o crescimento do trigo através da liberação de constituintes químicos solúveis em água (SINGH et al., 2003).

O teor de óleo essencial varia aleatoriamente de 0,11 a 0,58% para as folhas, de 0,03 a 0,18% para as raízes e de 0,1 a 0,2% para as flores, dependendo épocas do ano (WANDJI et al., 1996; SOOD, 1973).

O óleo essencial de *A. conyzoides* é relatado por ser venenoso para coelhos devido à presença de HCN e cumarina (ABBIW, 1990), também é relatado por possuir atividade antibacteriana (SHARMA et al., 1979) e atividade antifúngica sobre *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* e *Trichophyton mentagrophytes* (SINGH et al., 1986). O óleo essencial também apresentou deteriorização na oviposição e completa inibição do

surgimento de insetos adultos de *Callosobruchus chinensis* (GBOLADE et al., 1999) e mortalidade ninfal de *Schistocerca gregaria* (KOTEPPA et al., 1998).

A atividade antibacteriana do óleo essencial de *A. conyzoides* contra *V. cholerae*, *S. shigae*, *S. pyogenes*, *C. diphtheriae* e *S. typhi* também já foi relatada (SHARMA et al., 1979a e SHARMA et al., 1979b), Okunade, (2002) relatou a atividade antibacteriana e antifúngica contra 22 espécies de bactérias e 4 fungos, onde o óleo essencial inibiu o crescimento de 20 bactérias e 4 fungos (*Candida albicans* SP-14, *Cryptococcus neoformans* SP-16, *Sclerotium rolfsii* SP-5 e *Trichophyton mentagrophytes* SP-12). Os extratos das folhas exibem atividade inseticida (MOREIRA et al., 2004). O óleo essencial de *A. conyzoides* também mostrou atividade antifúngica contra *H. turcicum*, *H. oryzae*, *C. capsici*, *P. setariae* e *F. moniliforme* (SHARMA et al., 1978 e ASTHANA et al., 1982). Concentração de 2000 ppm do óleo apresentou atividade antifúngica contra *E. floccosum*, *M. canis* e *T. mentagrophytes* (SINGH et al., 1986).

Testes com o óleo essencial de *A. conyzoides* em ratos demonstraram atividades analgésicas, antiinflamatórias e antipiréticas e não foi observada toxicidade. Nas doses de 3,0 e 4,0 mL/kg, o óleo mostrou ter significativa atividade anti-inflamatória. Na dose de 3,0 mL/kg o efeito antipirético foi comparável com um composto de referência (acetil salicilato 50,0 mg/kg), considerando que atividade analgésica foi mostrada nas doses de 2,0, 3,0 e 4,0 mL/kg. A administração diária por 7 dias não mostrou toxicidade gástrica (ABENA et al., 1996; MAGALHÃES et al., 1997; OKUNADE, 2002).

A planta, que abastece o mercado de São Paulo e Rio de Janeiro e, por extensão, todo o Brasil, é proveniente do extrativismo (OLIVEIRA et al., 1993).

A composição química dos óleos varia com as diferentes origens geográficas (VERA, 1993). Segundo Castro et al. (2004) a composição básica do óleo essencial de mentrasto é: (*E*)-cariofileno (1); precoceno I (2); γ -muroleno (3); α -muroleno (4); óxido de cariofileno (5); precoceno II (6); 6-hidroximetil-7-metoxi-2,2-dimetil-2H-cromeno (7) e cumarina (8). O autor avaliou diferentes acessos da planta de diferentes localidades (Mariana-MG, Piratininga-MG, Visconde do Rio Grande-MG e Viçosa-MG), verificando uma variação no número de compostos presentes nos diferentes acessos de mentrasto. No acesso de Piratininga-MG mais rico em número de compostos e nos acessos de Viçosa-MG, o menor número de compostos. Os compostos identificados no óleo essencial dos acessos de mentrasto estão divididos em monoterpenos, sesquiterpenos, cromenos e fenilpropenos. Os dois compostos precoceno I (2) e precoceno II (6) foram identificados como os compostos majoritários, ambos cromenos. O precoceno I (2) foi o composto majoritário no acesso de Piratininga, e o precoceno II (6), o composto majoritário nos outros acessos. Outro cromeno identificado,

relatado pela primeira vez nessa espécie, foi o 6-hidroximetil-7-metoxi-2,2-dimetil- 2H-cromeno (7), constituinte minoritário e não encontrado no acesso de Viçosa (figura 5).

O precoceno I (2) e precoceno II (6) causaram metamorfoses prematuras em várias espécies de insetos, causando esterilidade nos adultos (CASTRO et al., 2004a; BOWERS et al., 1976). Resultados semelhantes foram encontrados em plantas de *Ageratum conyzoides* originárias de países da Ásia e África, dos quais os constituintes majoritários também foram os cromenos (precoceno I (2) e precoceno II (6)) (WANDJI et al., 1996; MENUT et al., 1993).

Os monoterpenos identificados foram o terpineno-4-ol (10) e o acetato de bornila (11). Os sesquiterpenos identificados foram o (*E*)-cariofileno (1), o γ -muroleno (2), o δ -cadineno (9), o α -muroleno (4) e o óxido de cariofileno (5). Entre os terpenos, o (*E*)-cariofileno (1) foi o composto encontrado em maior concentração (MENUT et al., 1993; OKUNADE, 2002).

O δ -cadineno (9), composto presente somente no acesso Piratininga, é precursor do gossipol, composto que atua na defesa química das plantas (BUCHANAN *et al.*, 2000).

Em relação aos fenilpropenos, identificaram-se as cumarinas (8). A maior concentração de cumarina (8) foi encontrada no acesso Piratininga (3,94%), sendo esta ausente no acesso Viçosa (CASTRO et al., 2004).

Os componentes mais comuns do óleo essencial de mentrasto foram também relatados num estudo realizado comparando óleo essencial de mentrasto do Vietnã, com o óleo essencial de planta coletado no Congo, o qual observou que o 7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (precoceno I) (2) variavam de 30% no primeiro, para 93% no Óleo do congo, já o derivado do 6,7-dimetoxi ageratocromeno (precoceno II) (6) observou-se uma variação de 0,7 a 55% (WANDJI et al., 1996).

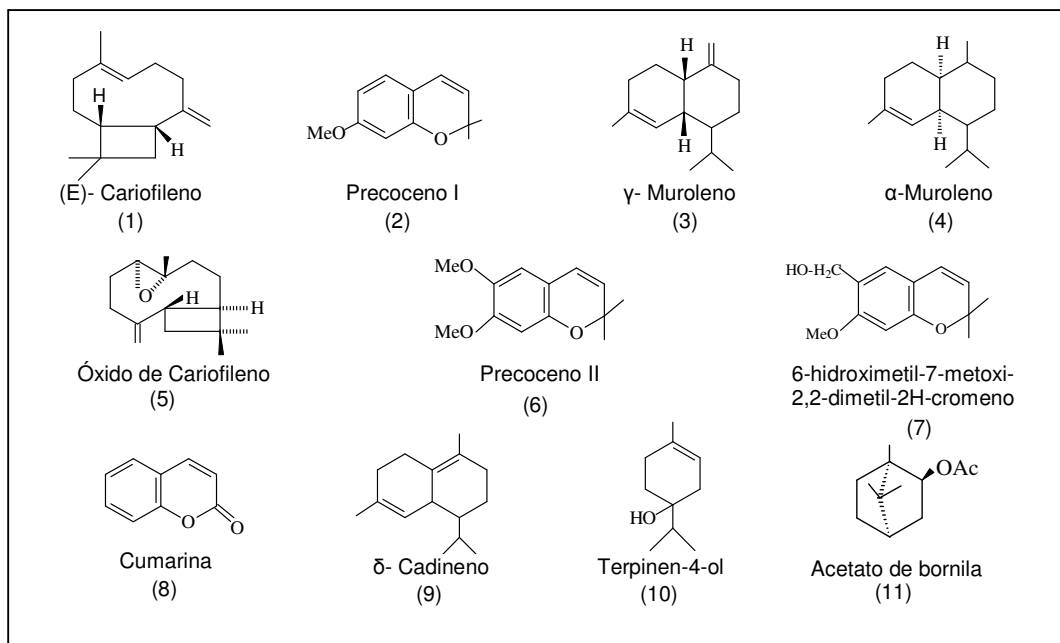


Figura 5 - Estruturas químicas dos principais componentes do óleo essencial de folhas e flores de Mentrasto.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial do óleo essencial de folhas e flores de mentrasto (*Ageratum conyzoides*) na inibição do crescimento e da produção da aflatoxina B₁ (AFB₁) em cultura de *Aspergillus flavus*.

3.2. Objetivos Específicos

- 3.2.1. Verificar a composição química do óleo essencial das folhas e flores de mentrasto;
- 3.2.2. Avaliar diferentes concentrações do óleo essencial das folhas e flores em culturas de *Aspergillus flavus*, verificando o crescimento e produção de aflatoxina B₁;
- 3.2.3. Fracionar o óleo essencial para obtenção do princípio ativo inibidor do crescimento e da produção de aflatoxina B₁;
- 3.2.4. Avaliar possíveis alterações na ultra-estrutura celular do fungo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Cromatofolha de sílica gel 60 (Merck), hexano, clorofórmio PA (Merck), *tween* 80 (Sigma), acetona (Merck), sacarose (Synth), extrato de levedura (Difco), ágar batata dextrose (Difco), sulfato de sódio anidro, benzeno, acetonitrila, câmara de *neubauer*, coluna para cromatografia, cuba para cromatografia, vidraria geral de laboratório, fotodensitômetro com lâmpada de xenônio (Shimadzu, modelo CS9000), leitor de placa (BIO-RAD, modelo 3550 UV), Microscópio (Zeiss), banho com aquecimento (Fisaton), rotaevaporador (Fisaton), estufas (Fanem), clevenger (Marconi), lâmpada UV (Camag), cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), estufa com placa agitadora (Marconi), autoclave (Fabbe), câmara de fluxo laminar (Marconi), microscópio eletrônico de transmissão (Philips EM 208), ultramicrotomo (LKB III), glutaraldeído, tampão fosfato, tetróxido de ósmio, acetato de uranila, acetona, resina *Spurr*, forno para polimerizar, tela de cobre, filme parlódio reforçado com carvão, citrato de chumbo.

4.2. Meios de cultura

O meio semi sintético de YES (DAVIS; DINNER, 1966), empregado para testes de produção AFB₁, foi utilizado como meio de cultura e preparado de acordo com a fórmula:

Sacarose.....200 g

Extrato de Levedura.....20 g

Água destilada.....1000 mL

Dissolver à quente a sacarose e o extrato de levedura na água e autoclavar a 120 °C por 15 minutos.

Meio batata dextrose ágar (BDA), foi empregado para estimular a esporulação fúngica e para testes de disco de difusão. Foi adquirido da Difco e utilizado de acordo com instruções de rótulo.

4.3. Cepa de *Aspergillus flavus*

A cepa de *Aspergillus flavus* produtora de aflatoxina B₁ isolada do solo de plantação de arroz, foi cedida pela Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia localizada no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) – Campinas - SP.

4.4. Teste de produção de aflatoxina B₁ pela cepa de *A. flavus*

Aspergillus flavus foi inoculado em meio de cultura batata dextrose ágar e mantido por 10 dias a 25 °C. No 11º dia foi preparada uma suspensão de esporos lavando-se as culturas com uma solução estéril de *Tween* 80 (0,2 %).

O inóculo foi transferido para tubo de ensaio contendo 5 mL de meio YES. A cultura foi incubada a 25 °C por 5 dias em uma incubadora agitadora e no 6º dia a produção da aflatoxina B₁ avaliada. O teste foi realizado em quadruplicata.

4.5. Material Vegetal

O *Ageratum conyzoides* foi coletado em Ibiúna - São Paulo entre julho e agosto (2007). As folhas e flores foram armazenadas sob resfriamento (4 °C) até posterior utilização. Um exemplar foi depositado no herbário da Prefeitura Municipal de São Paulo (PMSP 9686).

4.6. Extração do óleo essencial de *Ageratum conyzoides*

Na extração por hidrodestilação do óleo essencial das folhas e flores de mentrasto, foi utilizado o aparelho Clevenger, adaptado a um balão de fundo redondo com capacidade de 1.000 mL (MING et al., 1996). O balão foi carregado com 300 gramas da planta fresca cortada e 500 mL de água destilada, em cada extração. O tempo de extração variou de 120 a 180 min. Depois de obtido o hidrolato (mistura de água + óleo), o óleo foi extraído com 50 mL hexano em funil de separação, a extração foi repetida por 3 vezes. A fração orgânica obtida foi tratada com sulfato de sódio anidro em excesso. Após 5 minutos em repouso, a solução foi filtrada e concentrada em rotaevaporador a 40 °C, o óleo obtido foi transferido para frascos apropriados e mantido em refrigeração (4 °C).

4.7. Identificação da composição química do óleo essencial de mentrasto

A identificação das substâncias foi conduzida em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), dotado de coluna capilar de sílica fundida OV - 5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.), operando por impacto de elétrons (70 eV.), realizado no Laboratório de Fitoquímica do Instituto Agrônômico.

Condições de Análise:

Injetor: 240 °C; *Detector*: 230 °C; *Gás de arraste* He; *Vazão*: 1,7 mL/min; *Diluição*: 2 µL óleo essencial/1,0 mL acetato de etila, *Volume de Injeção*: 1 µL, *Split*: 1/30; *Programa de Temperatura*: 60 °C – 240 °C, 3 °C/min.

A identificação das substâncias foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 lib.) e literatura (MCLAFFERTY; STAUFFER, 1989) e índice de retenção (ADAMS, 2001). Os índices de retenção (IR) das substâncias foram obtidos através da co-injeção da amostra com uma série homologa de n-alcanos (C_9H_{20} – $C_{25}H_{52}$, Sigma – Aldrich, 99%) no seguinte programa de temperatura: 60 °C – 240 °C, 3 °C/min. (ADAMS, 2001), aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963).

4.8. Fracionamento do óleo essencial de mentrasto

Foram fracionadas 50 mg do óleo essencial de folhas e flores de mentrasto em coluna de sílica gel 60, eluída com hexano, fornecendo 212 frações de aproximadamente 3 mL e cromatografadas em cromatografia em camada delgada eluída com hexano e reveladas em cuba saturada com iodo e reunidas de acordo com o perfil cromatográfico, obtendo-se 8 subfrações, as quais após a secagem do solvente foram avaliadas em cultura de *A. flavus*.

4.9. Avaliação do óleo essencial de mentrasto em cultura de *A. flavus*

4.9.1. Determinação da sensibilidade fúngica ao óleo essencial de mentrasto

A determinação da sensibilidade fúngica ao óleo essencial bruto e subfrações foi realizada através do método de superfície. Repiques de *Aspergillus flavus* foram transferidos para tubos contendo ágar batata dextrose e incubados por 10 dias a 25 °C para esporular. No 11º dia os esporos de *A. flavus* foram inoculados em placa de Petri contendo BDA, e discos de papéis estéreis de 6 mm de diâmetro embebidos em óleo essencial bruto e suas subfrações foram adicionados assepticamente na placa de Petri. Como controle positivo foi empregado o fungicida Benlate 50 WP (5,27 mg/mL). As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias, durante este período foram realizadas leituras diárias dos halos de inibição. O teste foi realizado em triplicata.

4.9.2. Avaliação de produção de Aflatoxina B₁

Aspergillus flavus foi inoculado em meio de cultura BDA e mantido por 10 dias a 25 °C. No 11º dia foi preparada uma suspensão de esporos lavando-se as culturas com uma solução estéril de Tween 80 (0,2 %) e efetuou-se a contagem dos esporos em câmara de Neubauer.

O inóculo contendo $2,6 \times 10^4$ esporos/mL foi transferido para tubo de ensaio contendo 5 mL de meio YES com diferentes concentrações do óleo essencial 30 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL, 0,40 µg/mL, 0,20 µg/mL, 0,10 µg/mL, 0,04 µg/mL, 0,02 µg/mL e 0,01 µg/mL. A cultura foi incubada a 25°C por 5 dias em uma incubadora sob agitação e no 6º dia a produção da aflatoxina B₁ foi avaliada. Teste realizado em quadruplicata.

4.9.3. Extração de aflatoxina B₁

A aflatoxina do micélio e do filtrado foram extraídas da seguinte forma:

O filtrado foi colocado em um funil de separação e a AFB₁ extraída com 5 mL de clorofórmio por três vezes. O solvente foi evaporado à pressão reduzida em rotaevaporador e transferido para um volume conhecido de clorofórmio (1 mL) e, depois, aplicado em placa de sílica gel G-60 Merck. (DAVIS; DINNER, 1966)

Micélio: Após a secagem e pesagem, o micélio foi triturado manualmente em cadinho de porcelana para posterior extração em incubadora com placa agitadora, onde se adicionou 5 mL de clorofórmio e agitou-se por 30 minutos. O produto foi filtrado, evaporado em rotaevaporador e transferido para um volume conhecido de clorofórmio (1 mL) e, então aplicado em placa de sílica gel G-60 Merck.

4.9.4. Quantificação de AFB₁

Uma alíquota de concentração conhecida de padrão de AFB₁, juntamente com as amostras foram aplicadas em placa de sílica gel G-60. A placa foi eluída unidimensionalmente com a mistura de solvente clorofórmio: acetona (9:1) v/v.

Após a secagem do solvente, a placa foi analisada em fotodensitômetro à 360 nm, para análises das amostras e do padrão. A quantificação das amostras foi feita por comparação das áreas das amostras com a do padrão.

4.9.5. Avaliação do crescimento do fungo pelo peso seco

O micélio retirado do meio de cultura foi lavado com água destilada e levado à estufa por três dias à 50 °C, para secagem e determinação do peso seco.

4.10. Microscopia eletrônica

Os fungos controles (concentração de 0% de óleo essencial) e os fungos tratados com as diferentes concentrações de óleo essencial concentrações (30 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL, 0,40 µg/mL, 0,20 µg/mL, 0,10 µg/mL, 0,04 µg/mL, 0,02 µg/mL e 0,01 µg/mL), foram encaminhados para a visualização de sua ultra-estrutura pela técnica de inclusão em resina Spurr e posterior obtenção de cortes ultrafinos.

Pequenos fragmentos do micélio do fungo foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5 %, diluído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2, por 12 horas em temperatura de 4°C. Após este tempo os fragmentos foram lavados no mesmo tampão, por 3 vezes, 5 minutos cada passagem e, então, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1 % em água, por 4 horas em

temperatura ambiente na ausência de luz. Após este período foram lavados por 6 vezes com água destilada, 5 minutos cada passagem.

Os fragmentos foram, então, fixados/contrastados *in bloc* com acetato de uranila 4 % por 18 horas e, em seguida, desidratados em série cetônica crescente (50, 70, 90 e 100 %) por 5 minutos, 3 vezes em cada concentração, salvo na concentração de 100%, onde os fragmentos permaneceram por 15 minutos, por 3 vezes.

Após a desidratação, os pequenos fragmentos foram colocados em uma solução de resina *Spurr* e acetona 100 % (1:1) por cerca de 24 horas sob rotação em temperatura de 37°C para, em seguida, serem colocados em resina *Spurr* pura, por 4 horas, também sob rotação na mesma temperatura. Posteriormente os fragmentos foram colocados em molde de silicone preenchido com resina *Spurr* pura, a qual foi polimerizada em forno a 60 °C por 72 horas. Os blocos, contendo o fragmento em estudo, foram seccionados para a obtenção dos cortes ultrafinos em um Ultramicrótomo (LKB III).

Os cortes obtidos foram depositados em telas de cobre, cobertas com filme parlódio reforçado com carvão, contrastados com acetato de uranila 2,5 % por 30 minutos, lavados com água destilada, pós-contrastados com citrato de chumbo por 2 minutos e finalmente lavados, novamente, com água destilada (MARTELLI; RUSSO, 1984). As preparações foram observadas sob microscópio eletrônico de transmissão (Philips EM 208), do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Vegetal do Instituto Biológico.

4.11. Análise estatística

A inibição da produção de AFB₁ e do crescimento do fungo (através do peso seco) foi avaliada empregando-se a análise de variância pelo teste de ANOVA com nível de significância de $p < 0,05$ e o teste de Tukey-Kramer para análise de variância por comparação múltipla com nível de significância $p < 0,05$ e $q > 4,457$, utilizando o programa GraphPad InStat versão 2.00.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação do óleo essencial de mentrasto em cultura de *A. flavus*

5.1.1. Determinação da sensibilidade fúngica do óleo essencial bruto

Os dados *in vitro* obtidos mostraram que após 5 dias de incubação o óleo essencial do mentrasto inibiu o crescimento fúngico, formando um halo de 1,2 cm de diâmetro em média, efeito também observado no controle positivo, onde houve formação de um halo de 2,5 cm (figura 6), demonstrando o efeito inibidor de 48%.

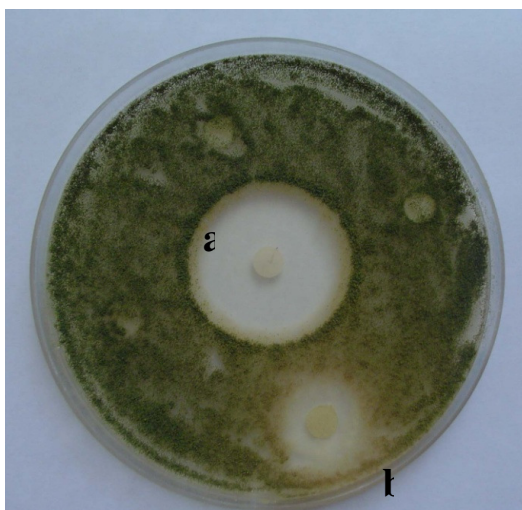


Figura 6: Halo de inibição do óleo de mentrasto em *A. flavus* **a** = grupo controle, **b** = óleo essencial de mentrasto

5.1.2. Determinação da sensibilidade fúngica das subfrações do óleo essencial

Apenas subfrações dos grupo 2, 3 e 4 apresentaram alteração no crescimento do fungo. Foi observado a formação de um pequeno halo (inferior á 1 cm) de inibição apenas na subfração 4 indicando efeito inibidor do crescimento e nas subfrações 2 e 3 observou-se atividade fungistática (figura 7), as demais frações não alteraram o crescimento do fungo.

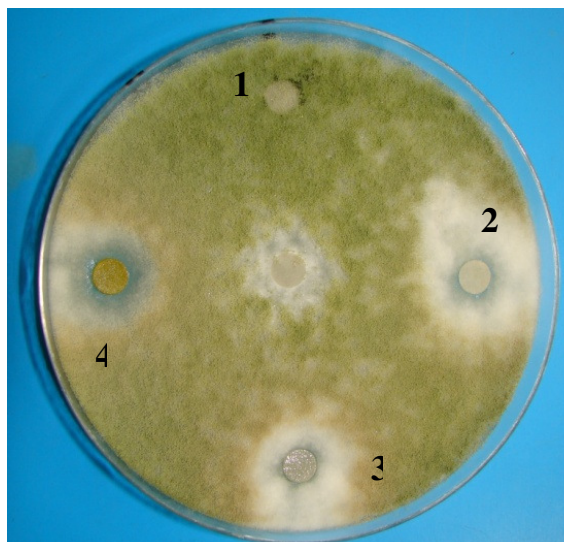


Figura 7: Resultado de atividade das subfrações 1, 2, 3 e 4 do óleo de mentrasto em cultura de *A. flavus*

5.2. Teste de produção de Aflatoxina

5.2.1. Quantificação da toxina

Nas concentrações iguais ou acima de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial testadas, não foram quantificadas aflatoxina, indicando inibição de 100% da produção da toxina, enquanto que nas concentrações mais baixas (0,04 $\mu\text{g/mL}$, 0,02 $\mu\text{g/mL}$ e 0,01 $\mu\text{g/mL}$) a inibição da produção de aflatoxina, diminui para 65%, 65% e 48%, respectivamente (tabela 2 e figura 8).

5.2.2. Avaliação do crescimento do fungo

Com relação aos resultados obtidos observou-se uma crescente inibição do crescimento do fungo, estatisticamente significante ($p > 0,05$), à medida que se aumenta a concentração do óleo essencial (tabela 2 e figura 8).

Tabela 2 – Efeito inibitório de diferentes concentrações de óleo essencial de mentrasto no crescimento do fungo e na inibição da biossíntese da aflatoxina em porcentagem

Concentração		Inibição do Crescimento (%)	Inibição da Produção de toxina (%)
$\mu\text{g} / \text{mL}$ (ppb)	%		
30	3	58	100
20	2	61	100
10	1	44	100
5	0,5	45	100
1	0,1	63	100
0,4	0,04	63	100
0,2	0,02	57	100
0,1	0,01	49	100
0,04	0,004	30	65
0,02	0,002	29	65
0,01	0,001	20	48

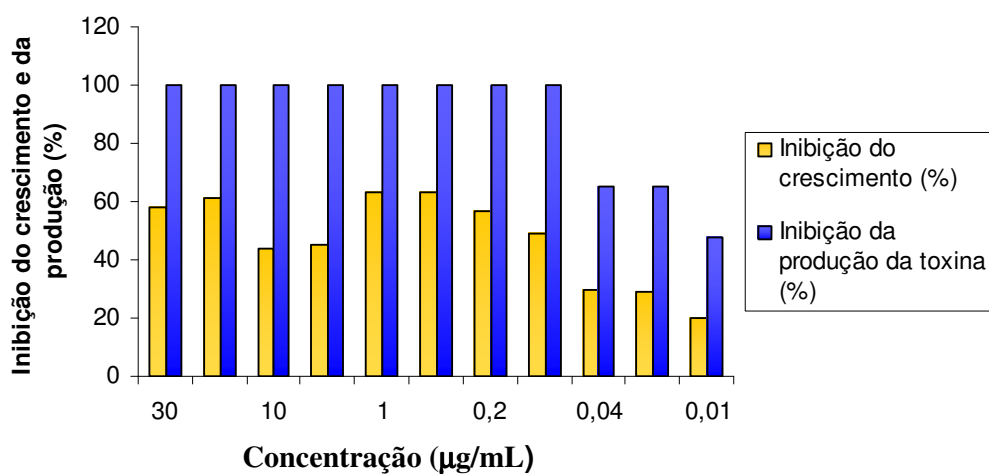


Figura 8 - Avaliação da inibição do crescimento e da produção de aflatoxina B₁ por *A. flavus* nas concentrações de 30 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 0,4 $\mu\text{g/mL}$, 0,2 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,04 $\mu\text{g/mL}$, 0,02 $\mu\text{g/mL}$, 0,01 $\mu\text{g/mL}$ de óleo essencial de mentrasto.

5.3. AVALIAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO QUÍMICA

5.3.1. Identificação da composição química do óleo essencial

Análise da composição química do óleo essencial de mentrasto por GC-EM mostrou que o óleo é constituído de monoterpenos, sesquiterpenos, cromenos e fenilpropenos (tabela 3). Observa-se que os dois principais constituintes são precoceno II (46,35%) e precoceno I (42,78) (figura 8).

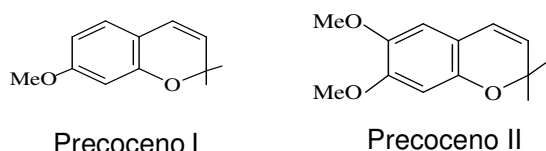


Figura 9 – Estruturas químicas dos dois principais constituintes do óleo de mentrasto analisado por CG-EM

Tabela 3: Principais componentes identificados como constituintes do óleo essencial de mentrasto utilizado no experimento.

Constituintes	RT	[%]	IR*	IR**
Acetato de Bornila	19,494	0,20	1285	1285
Andro enecalinalol	24,606	0,20	-	-
trans-cariofileno	25,458	3,02	1422	1418
Cumarina	25,621	5,01	1426	1429
α -humuleno	26,892	0,18	1456	1454
Dimetoxi ageratocromeno (Precoceno I)	27,096	42,78	1461	-
Ageratocromeno (Precoceno II)	35,056	46,35	1659	-

RT: tempo de retenção (min) (*) índices experimentais de retenção (**) índices de retenção da literatura (ADAMS, 2001)

5.3.2. Identificação da composição química das frações do óleo essencial

A análise da constituição química das frações utilizando CG-EM mostrou que as 3 frações ativas tinham como constituintes comum o precoceno II e este composto é o constituinte principal (tabela 4,5 e 6). As frações inativas não são constituídas de precoceno II (tabela 7, 9 e 10), exceto a fração 6 que apresenta em sua constituição 92,64% de cumarina e apenas 7,36% de precoceno II (tabela 8).

Tabela 4: Constituintes químicos da fração 2 de óleo essencial de mentrasto.

Pico	Substâncias	Tempo de retenção	[%]	IR*	IR**
1	Dimetoxi ageratocromeno (Precoceno I)	26,188	53,75	1456	-
2	Ageratocromeno (Precoceno II)	33,794	46,25	1653	-
TOTAL			100		

(*) Índice de retenção experimental (**) Índice de retenção literatura (ADAMS, 2001)

Tabela 5: Constituintes químicos da fração 3 de óleo essencial de mentrasto.

Pico	Substâncias	Tempo de retenção	[%]	IR*	IR**
1	Ageratocromeno (Precoceno II)	33,785	100,00	1653	-
TOTAL			100		

(*) Índice de retenção experimental (**) Índice de retenção literatura (ADAMS, 2001)

Tabela 6: Constituintes químicos da fração 4 de óleo essencial de mentrasto

Pico	Substâncias	Tempo de retenção	[%]	IR*	IR**
1	Cumarina	24,754	23,69	1429	1421
2	Ageratocromeno (Precoceno II)	33,794	76,31	1653	-
TOTAL			100		

(*) Índice de retenção experimental (**) Índice de retenção literatura (ADAMS, 2001)

Tabela 7: Constituintes químicos da fração 5 de óleo essencial de mentrasto.

Pico	Substâncias	[%]	IR*	IR**
1	Cumarina	100	1423	1429
TOTAL		100		

(*) Índice de retenção experimental (**) Índice de retenção literatura (ADAMS, 2001)

Tabela 8: Constituintes químicos da fração 6 de óleo essencial de mentrasto.

Pico	Substâncias	[%]	IR*	IR**
1	Cumarina	92,64	1423	1429
1	Ageratocromeno (Precoceno II)	7,36	1653	-
TOTAL		100		

(*) Índice de retenção experimental (**) Índice de retenção literatura (ADAMS, 2001)

Tabela 9: Constituintes químicos da fração 7 de óleo essencial de mentrasto.

Pico	Substâncias	[%]	IR*	IR**
1	Cumarina	100	1423	1429
TOTAL		100		

(*) Índice de retenção experimental (**) Índice de retenção literatura (ADAMS, 2001)

Tabela 10: Constituintes químicos da fração 8 de óleo essencial de mentrasto.

Pico	Substâncias	[%]	IR*	IR**
1	Cumarina	41,43	1423	1429
2	ni***	41,59	1594	-
3	Andro encecalinol	7,44	1671	1675
4	Isômero do Andro encecalinol	9,53	1803	-
TOTAL		100		

(*) Índice de retenção experimental (**) Índice de retenção literatura (ADAMS, 2001)

(***) Substância aromática não identificada

5.4. Microscopia eletrônica de transmissão

As células fúngicas do grupo controle (0% de óleo essencial) apresentaram-se normais: núcleo (N) (figura 10), vacúolos (V) (figura 10), grânulos eletro densos (GED) (figura 21), mitocôndrias (Mit) (figura 23). Foi observada maior densidade das organelas das células controle, quando comparadas com as células dos fungos incubados com diferentes concentrações do óleo.

Na microscopia eletrônica dos fungos tratados com óleos essenciais, pôde-se observar alterações ultra-estruturais, dependente da concentração de óleo essencial utilizado, sendo mais evidentes nas concentrações maiores. Foi constatado que a alteração ultra-estrutural celular mais evidente ocorreu no sistema de endomembranas, afetando principalmente a membrana plasmática (MP) e as organelas membranosas, especialmente as mitocôndrias.

Nas células controle a parede celular (PC) apresentou-se uniforme e completamente cercada por uma camada fibrilar (CF) intacta (figura 11). A membrana plasmática (MP) mostrou-se linear e com formato relativamente uniforme. Nas células tratadas a parede celular apresentou-se intacta em todos os tratamentos com óleo essencial. Foi nítida a alteração ocorrida com a camada fibrilar que circunda esta parede (figura 11), onde se observou o início do afrouxamento e do destacamento da camada. Também se observou uma diminuição da espessura da camada (figura 13). Nas células tratadas com 0,4 µg/mL e 1 µg/mL óleo essencial de mentrasto, observou-se que a camada fibrilar passou a apresentar falhas na sua deposição (figuras 14 e 15) sobre a parede celular. Nas células tratadas com 30 µg/mL, esta camada passa praticamente a não ser mais evidenciada (figura 16).

A membrana plasmática (MP) perdeu o aspecto linear apresentando vilosidades (figuras 12, 14 e 15) e invaginações com tendência a formação de vesículas (figuras 16, 19 e 22). Em algumas situações observou-se dissociação da membrana plasmática em relação à parede celular (figura 20).

Os grânulos eletro densos das células controle apresentaram-se com aparência densa (figura 21). Nas células dos fungos tratados com 0,2 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,04 µg/mL de óleo essencial observou-se desagregação gradual do conteúdo dos grânulos em função do aumento da concentração do óleo essencial de mentrasto (figuras 17, 22 e 23). A não visualização destas estruturas nos tratamentos mais concentrados (2 µg/mL e 30 µg/mL) pode ser justificada pela total dissolução dos GEDs, não permitindo a sua identificação dentro da célula.

As células controle apresentaram as mitocôndrias com organização típica, ou seja, conteúdo uniforme e cristas distribuídas homogeneamente no seu interior (figura 24). Nas células tratadas com óleo essencial pode-se observar uma desorganização da estrutura interna das mitocôndrias acarretando na diminuição das suas cristas (figuras 12 e 15 mit. a), diminuição da densidade da matriz mitocondrial em relação ao citoplasma (figura 17) e polarização das cristas (figura 16). Além disso, um aspecto interessante visualizado foi a invaginação da membrana mitocondrial (figura 15 mit b), acarretando na formação de vesícula dentro da mitocôndria (figuras 14, 15 e 19). Esta alteração foi evidenciada a partir do tratamento de 0,4 µg/mL (figura 14). No tratamento de 1 µg/mL pode-se também observar a nítida presença de um componente fibrilar dentro destas invaginações (figura 15 mit b).

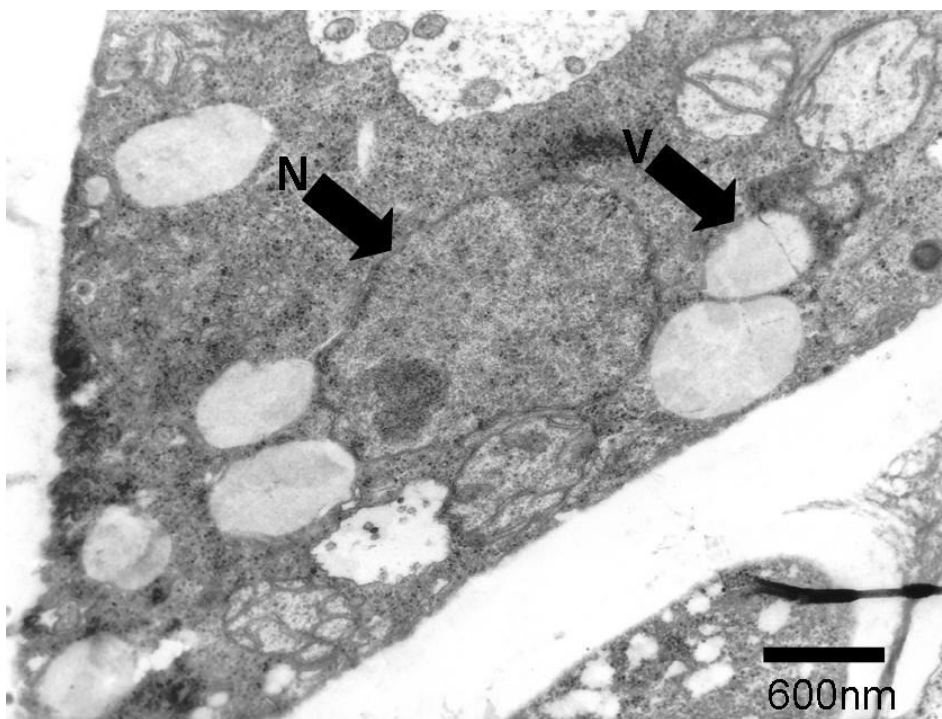


FIGURA 10: Microscopia eletrônica de células fúngicas de *A. flavus* não tratadas com óleo essencial de mentrasto, mostrando Núcleo (N) Vacúolo(V) com aspectos normais.

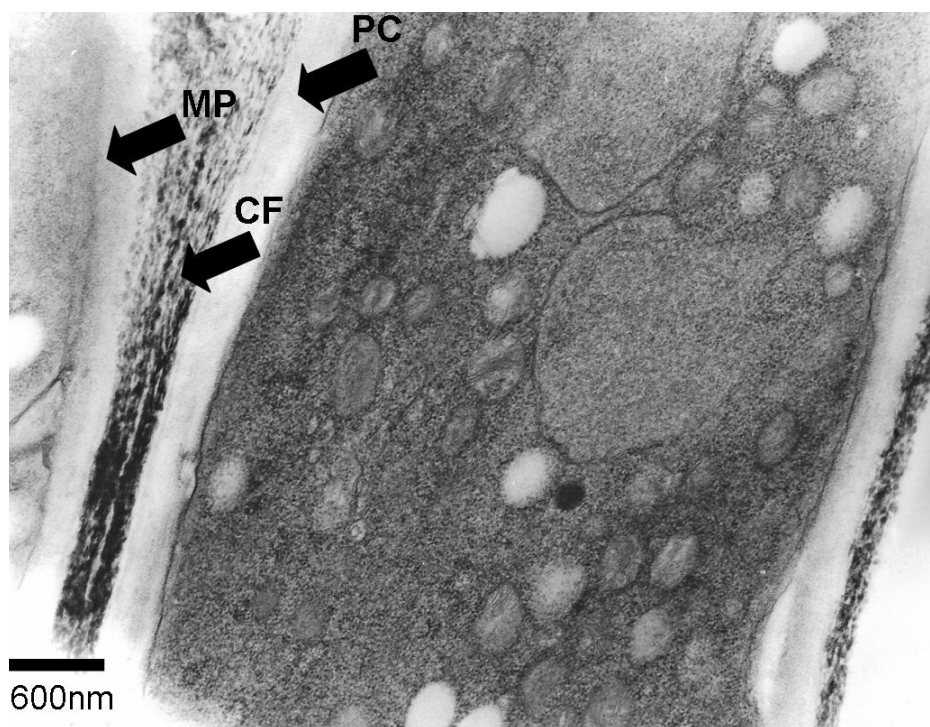


FIGURA 11: Microscopia eletrônica de células fúngicas de *A. flavus* não tratadas com óleo essencial de mentrasto mostra da Membrana plasmática (MP) com aparência uniforme e linear, Camada fibrilar (CF) com aparência intacta e parede celular (PC) uniforme.

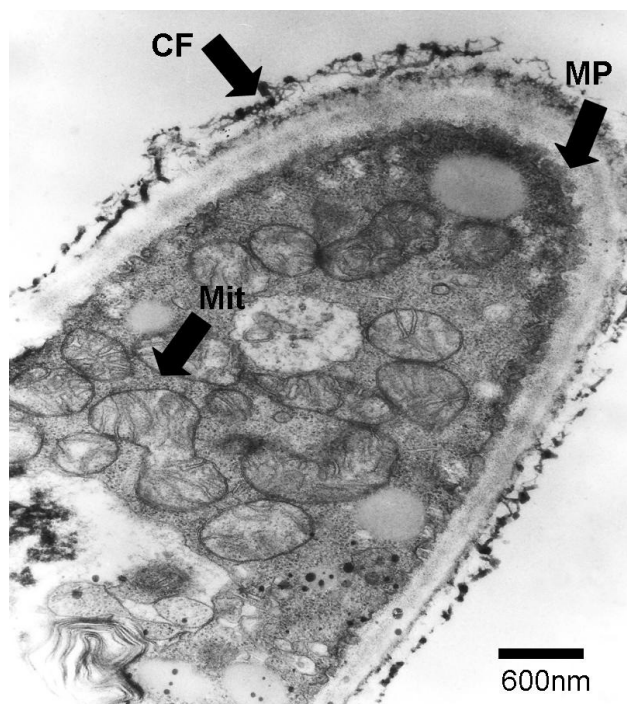


FIGURA 12: Microscopia eletrônica de células fúngicas de *A. flavus* tratadas com 0,01µg/mL óleo essencial de mentrasto, mostra afrouxamento e o destacamento da camada fibrilar (CF) e a diminuição de sua espessura, membrana plasmática (MP) com vilosidades e a desorganização da estrutura das mitocôndrias (Mit) acarretando diminuição das cristas.

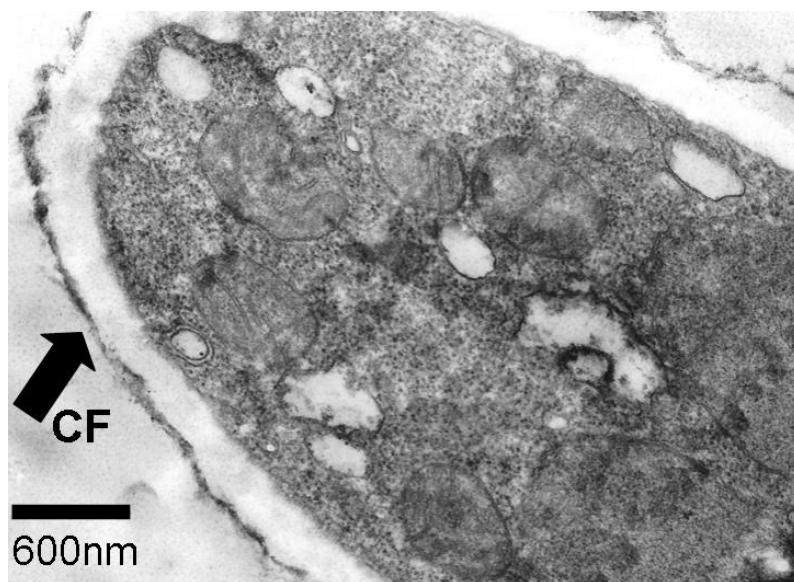


FIGURA 13: Microscopia eletrônica de células fúngicas de *A. flavus* tratadas com 0,2µg/mL óleo essencial de mentrasto, mostra a diminuição da espessura da camada fibrilar (CF).

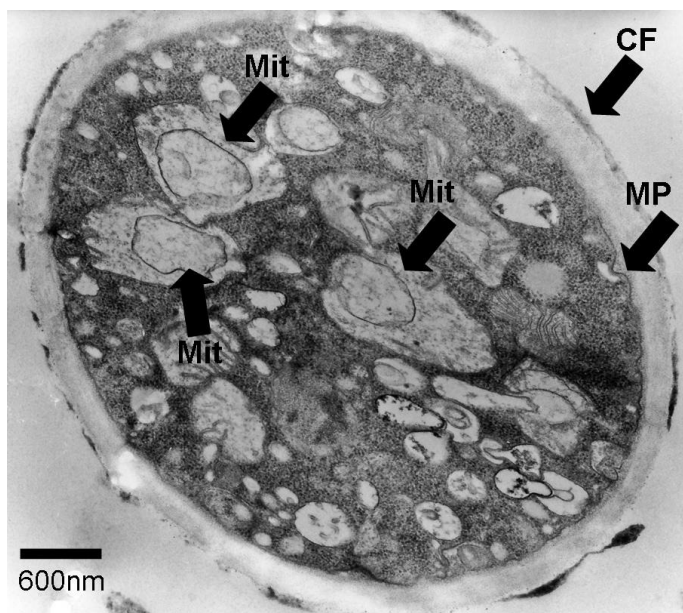


FIGURA 14: Microscopia eletrônica de células fúngicas de *A. flavus* tratadas com 0,4µg/mL óleo essencial de mentrasto, mostra membrana plasmática (MP) não linear com vilosidades a diminuição da espessura da camada fibrilar (CF), diminuição da espessura da camada fibrilar (CF) e a desorganização da estrutura das mitocôndrias (Mit) acarretando diminuição das cristas.

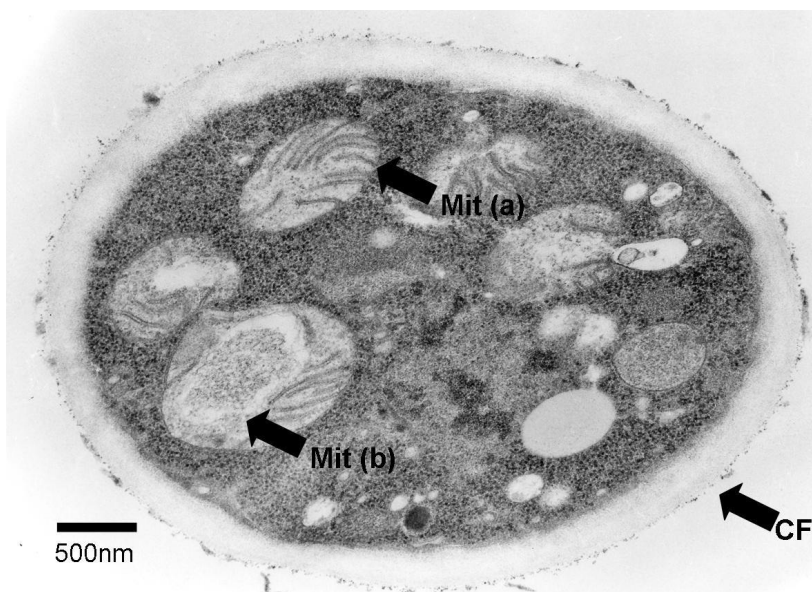


FIGURA 15: Microscopia eletrônica de células fúngicas de *A. flavus* tratadas com 1µg/mL óleo essencial de mentrasto, mostra a diminuição da espessura da camada fibrilar (CF), e falhas na deposição da camada fibrilar (CF) sobre a parede celular (PC), e a desorganização da estrutura das mitocôndrias (Mit) acarretando diminuição das cristas (Mit a) e ainda invaginações da membrana mitocondrial acarretando formação de vesículas dentro da mitocôndria (Mit b) .

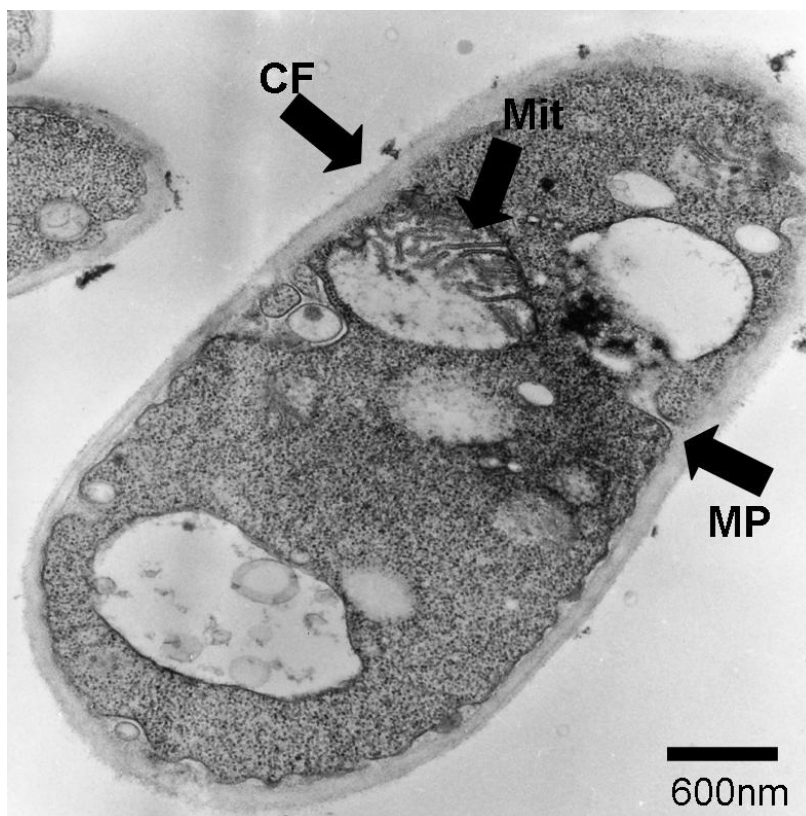


FIGURA 16: Microscopia eletrônica de células fúngicas de *A. flavus* tratadas com 30µg/mL óleo essencial de mentrasto mostra camada fibrilar (CF) praticamente não evidenciada, membrana plasmática (MP) com invaginações com tendências a formação de na estrutura das mitocôndrias (Mit) observa –se uma polarização das cristas.

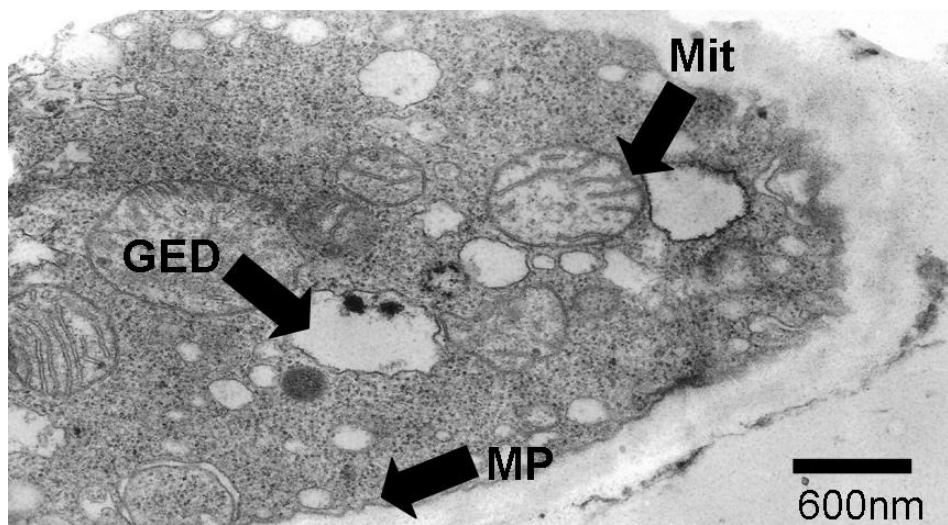


FIGURA 17: Microscopia eletrônica de células fúngicas de *A. flavus* tratadas com 0,2 µg/mL óleo essencial de mentrasto mostra desagregação gradual do conteúdo dos grânulos elétrons densos (GEDS) e a diminuição da densidade mitocondrial (Mit) em relação ao citoplasma.

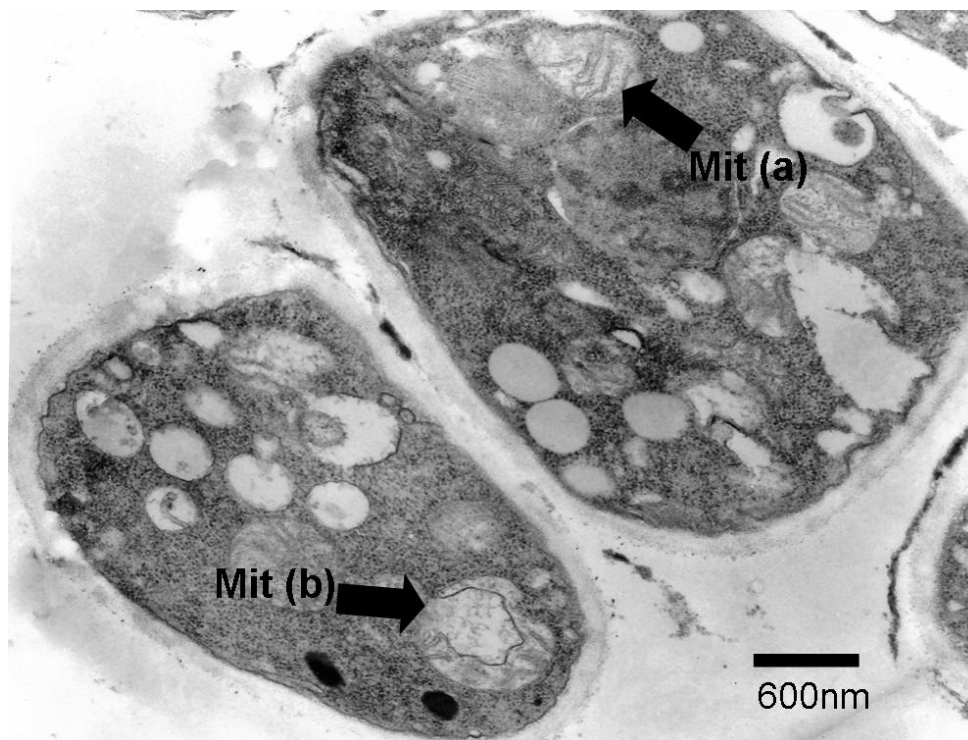


FIGURA 18: Microscopia eletrônica de células fúngicas de *A. flavus* tratadas com 0,4µg/mL óleo essencial de mentrasto mostra a desorganização da estrutura das mitocôndrias a diminuição das cristas (Mit a) e vesículas dentro da mitocôndria (Mit b).

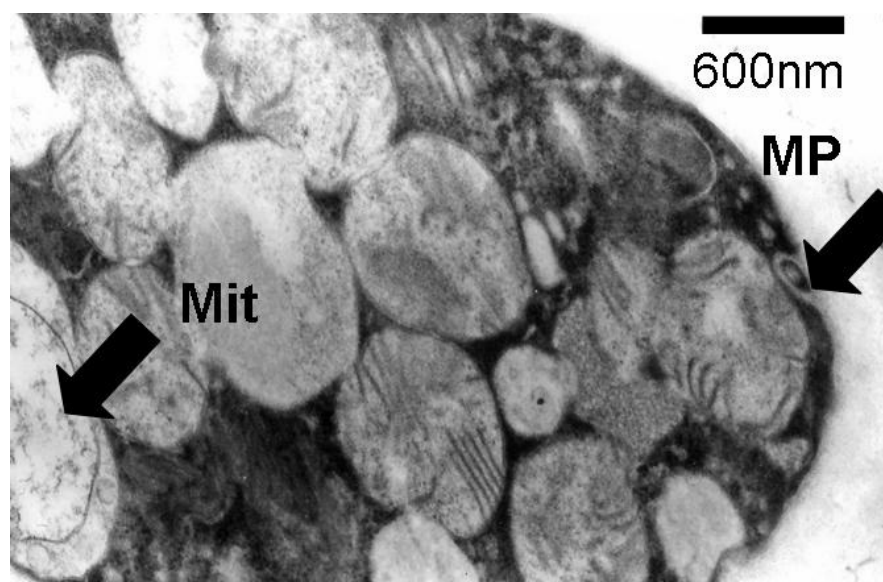


FIGURA 19: Microscopia eletrônica de células fúngicas de *A. flavus* tratadas com 0,2 µg/mL óleo essencial de mentrasto mostra a membrana plasmática com invaginações com tendência a formação de vesículas e mitocôndrias (Mit) com vesículas internas.

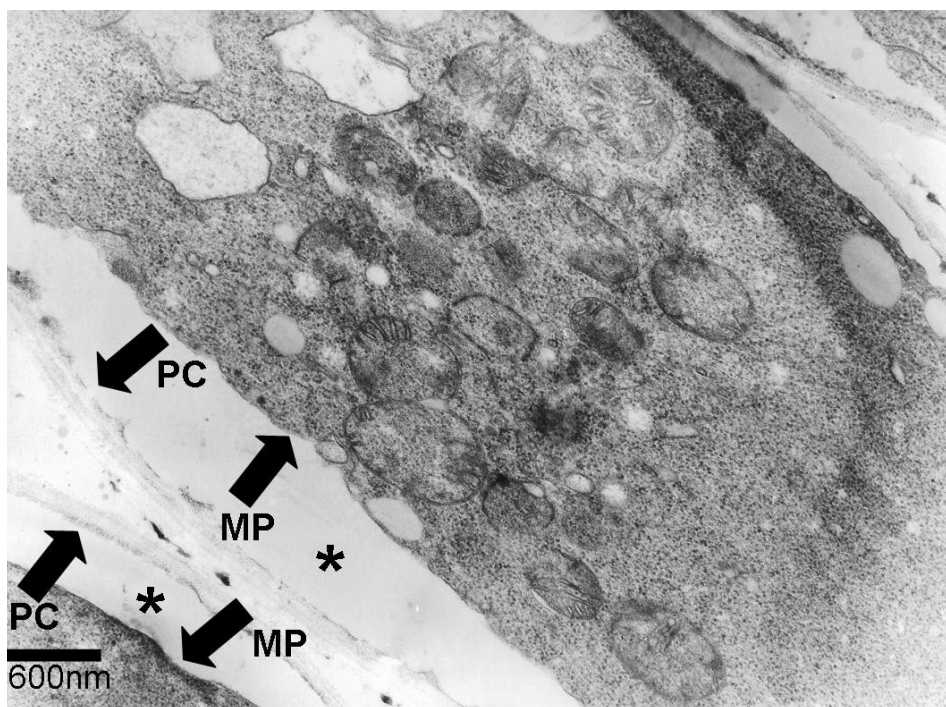


FIGURA 20: Microscopia eletrônica de células fúngicas de *A. flavus* tratadas com 0,02 μ g/mL óleo essencial de mentrasto, mostra a dissociação da membrana plasmática (MP) em relação a parede celular (PC), (*) região de dissociação.

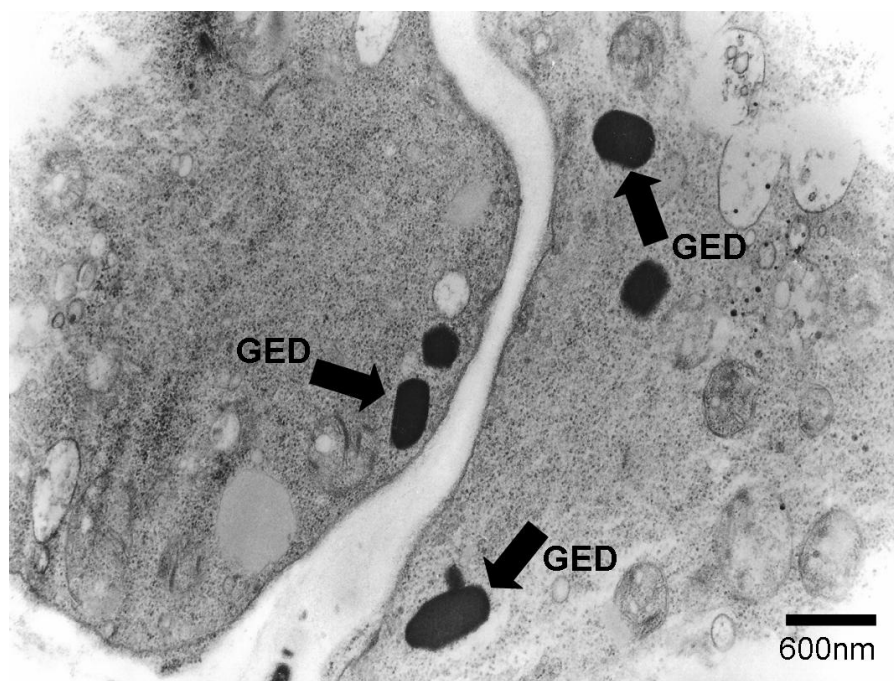


FIGURA 21: Microscopia eletrônica grânulos elétrons densos (GEDS) de células fúngicas de *A. flavus* não tratadas com óleo essencial de mentrasto, com aparência densa.

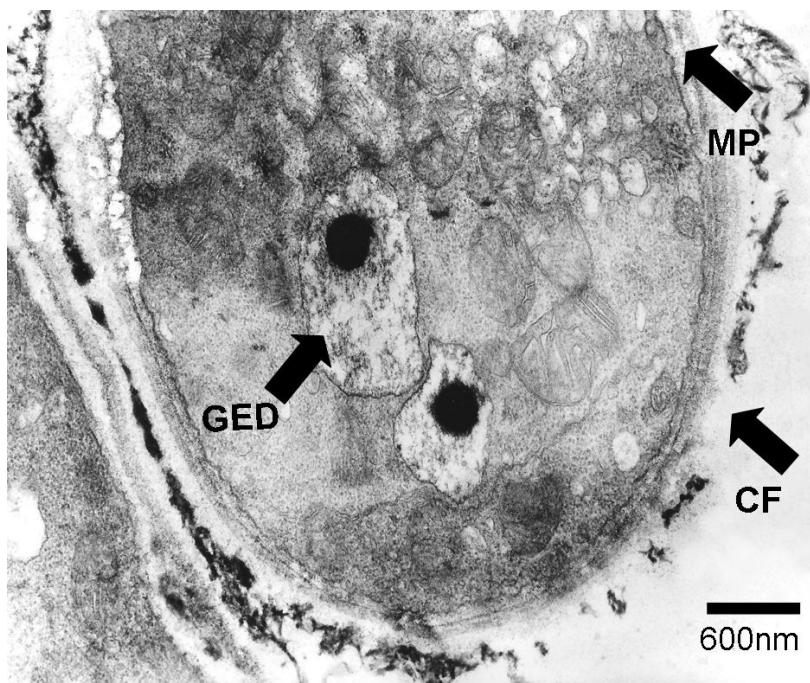


FIGURA 22: Microscopia eletrônica de células fúngicas de *A. flavus* tratadas com 0,01 µg/mL óleo essencial de mentrasto mostra a membrana plasmática (MP) com invaginações com tendência a formação de vesículas e desagregação gradual dos grânulos elétrons densos (GEDS).

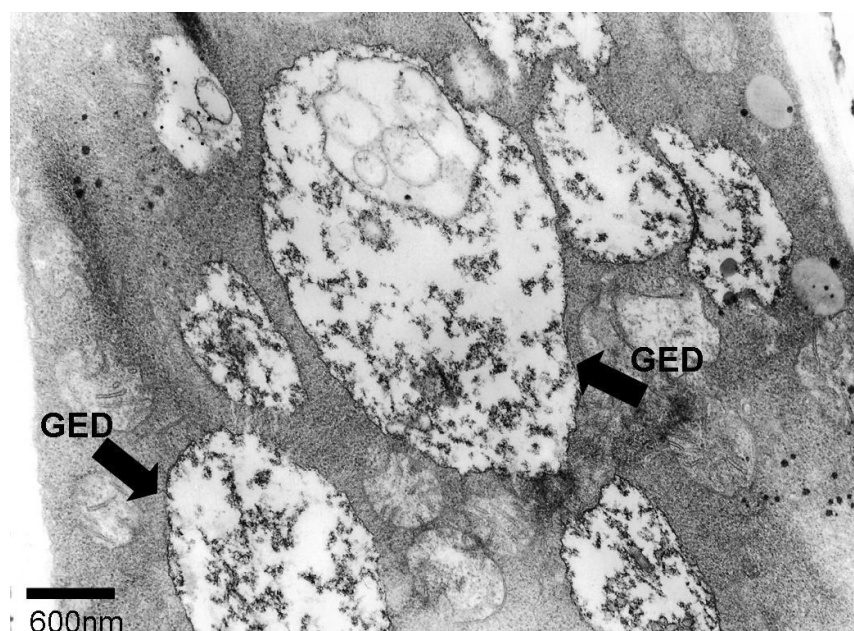


FIGURA 23: Microscopia eletrônica de células fúngicas de *A. flavus* tratadas com 0,04 µg/mL óleo essencial de mentrasto mostra a desagregação gradual dos grânulos elétrons densos (GEDS) até a não visualização.

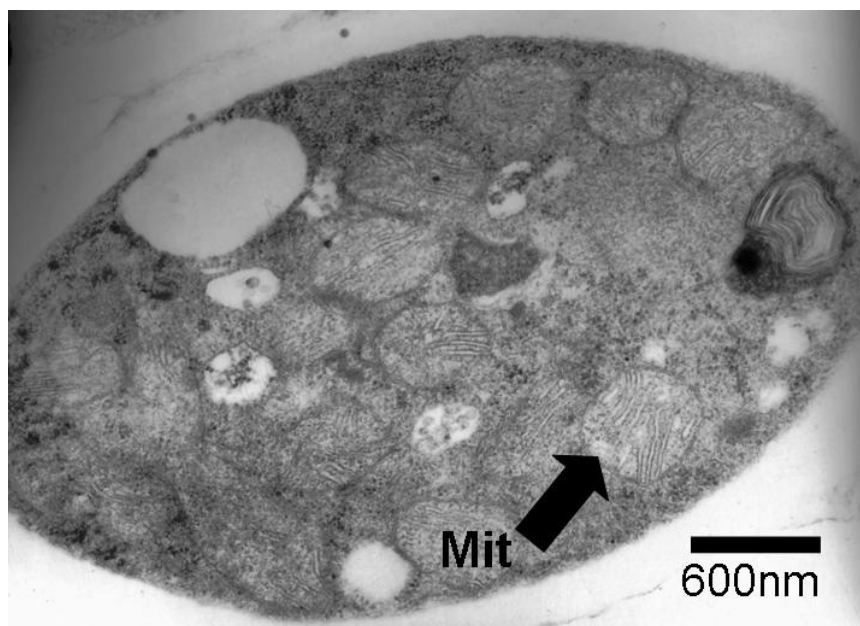


FIGURA 24: Microscopia eletrônica de células fúngicas de *A. flavus* não tratadas com óleo essencial de mentrasto, apresenta mitocôndrias (Mit) com organização típica conteúdo uniforme e cristas distribuídas homogeneamente no seu interior.

6. DISCUSSÃO

O teste de determinação de sensibilidade fúngica demonstrou que o óleo essencial bruto inibiu em 48 % o crescimento do fungo. A inibição do crescimento de *A. flavus* também foi verificada com o teste de avaliação do crescimento do fungo pelo peso seco, onde as diferentes concentrações (30 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL, 0,40 µg/mL, 0,20 µg/mL, 0,10 µg/mL, 0,04 µg/mL, 0,02 µg/mL e 0,01 µg/mL) inibiram o crescimento do fungo em 58 %, 61 %, 44 %, 45 %, 63 %, 63 %, 57 %, 49 %, 30 %, 29% e 20%, respectivamente (tabela 2).

A ação antimicrobiana de óleos essenciais e terpenos voláteis como carvacol, cineol, cânfora, 1,8 cineol, α-pineno, acetato de bornila, sobre fungos em sistemas de modelos e em alimentos é relatada por vários autores (DAVIDSON; NAIDU, 2000, KOUTSOUMANIS et al., 1998).

Omidbeygi et al. (2007) avaliou a atividade antifúngica do óleo de *Thymus vulgaris* em *Aspergillus flavus* no meio de cultura e em massa de tomate e os resultados mostraram uma forte inibição do crescimento fúngico nas concentrações de 350 ppm e 500 ppm. O óleo a 500 ppm inibiu em 87 % o crescimento do fungo na massa de tomate, sendo mais ativo meio de cultura cuja inibição foi 100%.

Há relatos de redução na germinação de esporos de *A. flavus* e *A. parasiticus* por óleos essenciais de anis, boldo e orégano (BLUMA et al., 2008). Viuda - Martos et al. (2007) também observaram atividade inibidora do crescimento de *A. flavus* pelo óleo de *Citrus reticulata* nas concentrações de 0,27 %, 0,47 %, 0,71 % com atividade de 55,5 %, 62,8 % e 64,8 %, respectivamente, resultados bem próximos ao obtido no presente estudo em concentrações também similares, (0,5 % e 1 %) as quais apresentaram um efeito de 63 % de inibição. Outro resultado bastante interessante quanto à redução do crescimento de *A. flavus* por óleo essencial foi relatado por Dikbas et al. (2008) o qual mostra excelentes resultados obtidos com o óleo essencial de *Satureja hortensis*, observando uma redução no crescimento de 97 % após 20 dias na concentração de 6,25 µL/mL e de 100 % na concentração de 25 µL/mL.

A inibição total da produção da aflatoxina foi observada em concentrações muito baixas como 30 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL, 0,40 µg/mL, 0,20 µg/mL, 0,10 µg/mL, e em concentrações extremamente baixas 0,04 µg/mL, 0,02 µg/mL e 0,01 µg/mL observou-se uma inibição de 65 %, 65 % e 48 % respectivamente. Rassoli et al. (2008) relatam a inibição total da produção de aflatoxina em concentrações de 450 ppm pelo óleo de *Rosmarinus officinalis*, enquanto que em concentrações muito mais baixas, entre

30 e 0,1 µg/mL o óleo de mentrasto inibe a totalmente biossíntese da aflatoxina (tabela 2 e figura 8). Nossos dados mostraram que a exposição de cepas toxigênicas de *A. flavus*, ao óleo essencial de folhas de *Ageratum conyzoides* resulta numa inibição total da produção de aflatoxina para concentrações 30 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL, 0,40 µg/mL, 0,20 µg/mL, 0,10 µg/mL, mas não sobre o crescimento fúngico, uma vez que as mesmas concentrações apresentam efeito inibidor ao redor de 60%.

O efeito inibidor da produção de aflatoxina não foi estatisticamente significativo pelo método utilizado, apesar de seu valor ter sido superior a 48%.

Pela microscopia eletrônica de transmissão foi observado que o óleo essencial de folhas e flores de mentrasto agiu na parede celular e nas organelas membranosas, especialmente nas mitocôndrias do fungo, provocando um dano direto. Além disto, os resultados obtidos por microscopia eletrônica de transmissão das células do grupo controle (incubados sem óleo essencial), quando comparados com células fúngicas tratadas com diversas concentrações de óleo essencial de mentrasto, mostraram que as alterações celulares são dependentes da concentração.

São poucos os estudos que relatam o mecanismo de ação de óleos essenciais na inibição do crescimento e na produção de micotoxinas. A alteração ocorre na permeabilidade da célula, devido às alterações da membrana plasmática que resulta na diminuição dos micélios e formação de vesículas nas membranas vinculadas no interior das células. Além disso, também foi observada alteração nas membranas de organelas, principalmente das mitocôndrias, e ainda é importante relatar a deleção e destruição dos GEDs. Abyaneh et al. (2008) apesar de terem trabalhado com substância sintética, também relatam alteração nas mitocôndrias e nos GEDs, além de ruptura nas membranas do núcleo e retículo endoplasmático. Alterações na membrana plasmática e nas mitocôndrias também foram relatados por Rasooli et al. (2006) que neste caso investigaram a ação do óleo essencial de duas espécies de *Thymus* sobre o fungo *A. niger*.

Os resultados indicam que o óleo essencial de mentrasto em diferentes concentrações atravessa não só a parede celular, mas também a membrana plasmática e, em seguida, interage com as estruturas membranosas citoplasmáticas das organelas. Concluímos também, assim como Rasooli et al. (2006) que o óleo essencial de *A. conyzoides* apresenta atividade antifúngica contra *A. flavus* acarretando alterações morfológicas deletérias.

Luo et al. (2004) também relatam os resultados de microscopia eletrônica de transmissão das células de *Aspergillus flavus* submetida a incubação com citral e

observaram que a substância provoca um prejuízo direto na parede da membrana. As análises dos parâmetros morfológicos sugerem que a diminuição da produção de aflatoxina está relacionada com o aumento na rigidez da membrana e uma diminuição na sua flexibilidade.

Embora tenha sido claramente demonstrado que a biossíntese das aflatoxinas é estreitamente relacionada com a diferenciação fúngica, muitos aspectos desta correlação continuam sendo estudados (CALVO et al., 2004; KELLER et al., 2000). Em fungos aflatoxigênicos, a produção de AFS normalmente ocorre após esporulação. Portanto, determinados compostos que inibem o crescimento e a esporulação também foram relatados por inibir a produção de AFS (REIB, 1982). Greene-McDowelle et al. (1999) estudaram os efeitos morfológicos ocasionados pelo óleo essencial de folhas de algodão, em relação ao crescimento fúngico de *A. parasiticus* e produção de aflatoxina. Os autores observaram alterações morfológicas, como a redução radial do crescimento, perda de pigmentação micelial, diminuição da esporulação exclusivamente aérea e indução de hifas pode ser correlacionada com a inibição em qualquer crescimento fúngico ou biossíntese da aflatoxina.

A ação de óleo essencial se deve segundo Trombeta et al. (2005) aos monoterpenos constituintes dos óleos essenciais, pois estas substâncias desencadeiam efeitos tóxicos na estrutura e na função das membranas das células dos microrganismos, como por exemplo, alterações na fluidez e permeabilidade e interação com componentes internos da célula, ações estas, explicadas principalmente pelo caráter lipofílico destas substâncias.

O presente resultado mostra claramente que o óleo essencial de mentrasto em teste *in vitro* é capaz de inibir o crescimento fúngico, e a produção de AFB₁ alterando a homogeneidade celular através de interação direta com a parede celular ou membranas citoplasmáticas.

Quanto à constituição química, a tabela 3 mostra os principais componentes do óleo de mentrasto. Estes resultados são os mesmos encontrados por Castro et al. (2004), os quais estudaram a constituição química de óleo essencial de diferentes acessos de *A. conyzoides*, onde o precoceno I e o precoceno II são os compostos majoritários, exceto no acesso coletado em Piratininga-MG.

Os estudos conduzidos em culturas de *A. flavus* com as subfrações mostraram que o princípio ativo do óleo essencial de *A. conyzoides* é o precoceno II, pois apenas frações cuja constituição principal trata-se deste composto são ativas. As frações inativas não são constituídas de precoceno II (tabela 7, 9 e 10), exceto a fração 6 que apresenta em sua constituição 92,64% de cumarina e apenas 7,36% de precoceno II (tabela 8), sendo este

teor muito baixo quando comparada com as frações ativas, cuja porcentagem desse composto é de 46,25%, 100% e 76,31% frações 2, 3 e 4, respectivamente.

Embora o constituinte ativo seja o precoceno II, observa-se também um sinergismo entre os constituintes do óleo essencial, visto que após o fracionamento as subfrações ativas, estas não apresentam a mesma ou maior porcentagem de inibição do crescimento do fungo quando comparado ao óleo essencial bruto. Outro fato que corrobora para uma maior atividade do óleo bruto é a existência na sua constituição química do acetato de bornila (0,20%), já relatado como fungicida por Rasooli et al. (2008). É importante ressaltar que a atividade biológica do óleo essencial de qualquer planta está relacionada com os seus constituintes e seu teor no óleo essencial, por isso deve-se sempre fazer um estudo avaliando tanto a atividade biológica como a constituição do óleo essencial.

A utilização deste óleo essencial constituído de substâncias muito voláteis, no controle de fungos, poderá colaborar para a diminuição de resíduos de fungicida no ambiente, nos produtos agrícolas além da proteção do meio ambiente e minimizar a exposição humana aos defensivos, visto que se trata de uma planta medicinalmente utilizada, sem efeitos colaterais (MARQUES NETO et al., 1988) e não tóxica (MOURA et al., 2005).

Apesar do vasto uso medicinal de *A. conyzoides* pesquisas científicas buscando o uso medicinal e na agricultura deverão ainda ser desenvolvidas, para que esta espécie seja usada como um biocida ou pesticida natural. Mesmo com atividades biológicas comprovadas, o vegetal não se encontra em cultivo comercial.

7. CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Ageratum conyzoides* apresenta atividade inibidora do crescimento de *A. flavus* e além de um efeito inibidor de 100% na biossíntese de aflatoxina, acarretando alterações morfológicas deletérias dependentes da concentração utilizada. A constituição química do óleo de mentrasto estudado mostra-se similar as discutidas por outros autores. O precoceno II, principal constituinte, parece ser o princípio ativo do óleo essencial, mas seu efeito é maior no óleo bruto.

Deve-se ressaltar que o efeito inibidor da produção de aflatoxina em concentrações baixas (0,01 µg/mL e 0,02 µg/mL) permite concluir que o óleo essencial de *A. conyzoides* pode vir a ser uma alternativa ecológica para a proteção de produtos agrícolas contra a contaminação de *A. flavus*, colaborando assim na resolução de um grande obstáculo para o agronegócio, principalmente no armazenamento de grãos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBIW, D.K. Useful plants of Ghana - West African use of wild and cultivated plants. **Intermediate Technology Publications and the Royal Botanic Gardens Kew**, Richmond, p. 207, 1990.

ABENA, A. A.; OUAMBA, J. M.; KEITA, A. Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of Essencial Oil of *Ageratum conyzoides*. **Phytotherapy Research**, v.10, p.164-165, 1996.

ABYANEH, M.R.; GHAFAROKHI, M.S.; YOSHINARI, T.; REZAEI, M.B.; JAIMAND, K.; NAGASAWA, H.; SAKUDA, S. Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **International Journal of Food Microbiology**, Grugliasco, v.123, p.228-233, 2008.

ADAMS, R.P. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography and Mass Spectroscopy. **Allured Publishing Corporation**, USA, 1995.

AHLUWALIA, K.S. **Medicinal plants of Kerala-V**. Nagarjun, v.11, p.63-69, 1968.

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

AMARAL, K.A.S.; NASCIMENTO, G.B.; SEKIYAMA, B.L.; JANEIRO, V.; MACHINSKI JUNIOR, M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p.336-342, 2006.

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária - REGULAMENTO TÉCNICO MERCOSUL SOBRE LIMITES MÁXIMOS DE AFLATOXINAS ADMISSÍVEIS NO LEITE, AMENDOIM E MILHO (REVOGAÇÃO DA RES. GMC Nº 56/94). Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/mercosul/alimentos/25_02.pdf. Acesso em 25 ago 2008.

ASTHANA, A.; CHANDRA, H.; DIKSHIT, A.; DIXIT, S.N. Volatile fungitoxicants from leaves of some higher plants against *Helminthosporium oryzae*. **Pflanzenkr Pflanzenschutz**, v.89, p.475-479, 1982.

ATANDA, O.O.; AKPAN, I.; OLUWAFEMI, F. The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. **Food Control**, Reading, v.18, p.601-607, 2007.

BADEAA, R.I.; SOLIMAN, K.M. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology**, Richmond, v.40, p.1669-675, 2002.

BANERJEE, A.K.; BANERJEE, I. A Survey of Medicinal Plants in Shevaroy hills. **Journal of Economic and Taxonomic Botany**, Jodhpur, v.8, p.271-290, 1986.

BANSAL, G.L. Weed biology of Lantana and Ageratum species. In: SINGH, C.M., ANGIRAS, N.N. Proceedings of Seminar on Control of Lantana and Ageratum Species, **Himachal Pradesh Agricultural University**, India, p. 10–13, 1988.

BASÍLICO M. Z.; BASÍLICO J.C. Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 238 – 241, 1999.

BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E. Aflatoxin biosynthesis: developments in chemistry, biochemistry and genetics. In: SHOTWELL, O. L.; HUBURGH, C. R. Aflatoxin in corn: New Perspectives. **Iowa: Research Bulletin 599**, Iowa, p.391-405, 1991.

BHATNAGAR, D.; EHRLICH, K.C.; CLEVELAND, T.E. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.61, p.83–93, 2003.

BIEHL, M.L.; BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v.50, p.1058-1073, 1987.

BLUMA, R.; ETCHEVERRY, M. Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section Flavi growth parameters and aflatoxin accumulation **Food Microbiology**, v.25, p.324–334, 2008.

BOWERS, W. S.; OHTA, T.; CLEERE, J. S.; MARSELLA, P. A.. Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants. **Science**, v.193, p.542-547, 1976.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry e molecular biology of plants, **American Society of Plant Physiologists**, Rockville, Maryland, 1367p, 2000.

BU'LOCK, J. D. Secondary metabolism in fungi and its relationship to growth and development, J. E. Smith and D. R. Berry (ed.), **The filamentous fungi**, New York. v.1, p.33-58, 1975.

BURKILL, H. M. The useful plants of west tropical Africa. **Royal Botanical Gardens Kew**, London, p. 960, 1985.

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

CALVO, A.M.; BOK, J.; BROOKS, W.; KELLER, N.P. “veA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*”, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, N. 8, p. 4733-4739,2004.

CARDENAS-ORTEGA, N.C.; ZAVALA-SANCHEZ, M.A.; AGUIRRE-RIVERA, J.R.; PEREZ-GONZALEZ, C.; PEREZ-GUTIERREZ, S. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactinia mexicana* gray, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.11, p. 4347– 4349, 2005.

CARVALHO, A.; NOGUEIRA, J.H.C.; GONÇALEZ, E.; FELICIO, R.C.; ROSSI, M.H.; SILVA, R.T.M.; FELICIO, J.D. Atividade de duas espécies de óleo essencial de Eucalipto em cultura de *Aspergillus flavus*. VIII Jornada Paulista de Plantas Medicinais, **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, São Paulo, v. 5, p.147, 2007.

CASTRO, H.G. ; SILVA, D.J.H. ; OLIVEIRA, L.O ; FERREIRA, F.A ; SAKIYAMA, N.S ; BARBOSA, L..C.A. ; RIBEIRO JÚNIOR, J.I. Diversidade genética entre acessos de mentrasto avaliada por características botânico-agronômicas, moleculares e fitoquímicas, **Revista CERES**, Viçosa, v. 51, n. 294, p. 227-241, 2004a.

CASTRO, H.G.; SILVA, D.J.H.; FERREIRA, F.A.; OLIVEIRA, L.O.; MOSQUIM, P.R.; RIBEIRO JUNIOR, J.I. Interação Genótipo x Ambiente de Cinco Acessos de Mentrasto, **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 6, n. 2, p. 52-59, 2004b.

CASTRO, H.G.; OLIVEIRA, L.O.; BARBOSA, L.C.A ; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R.; NASCIMENTO, E.A. Teor e Composição do Óleo Essencial de Cinco Acessos de Mentrasto, **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 55-57, 2004c.

CHAO, S.C.; YOUNG, D.G. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oil Research**. v.12 , p. 630–649, 2000.

COULOMBE, R.A. Aflatoxins. *In*: SHARMA R.P.; SALUNKHE, D.K. **Mycotoxins and Phytoalexins**, London, p. 103-144, 1991.

CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, Amsterdam, n. 1/2, p. 1-10, 2002.

DAGAR, H.S.; DAGAR, J.C. Some folk lore medicinal claims on plants of CarNicobar Island, **Bulletin of Medico-Ethnobotanical Research**, Delhi, v.17, p.8-17, 1996.

DAVIDSON, P.M.; NAIDU, A.S. Phyto-phenols, **Natural Food Antimicrobial Systems**, USA, p. 265–294, 2000.

DAVIS, N. D.; DINNER, U. L.; ELDRIDGE, D.W. Production of aflatoxina B₁ and G₁ by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. **Applied Microbiology**, v.14, p.378-380, 1966.

DEMAIN, A. L. Mutation and the production of secondary metabolites. **Advances Applied Microbiology**, v.16, p.177-202, 1973.

DHASMANA, H. Medicinal plants of Pauri town (Garhwal) and adjacent forest regions (part 1: family compositae). **Journal of Scientific Research in Plant Medicine**, v.6, p.45-49, 1985.

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

DUTTA, M.L.; NATH, S.C. Ethno-medico botany of Deories of Assam, India. **Fitoterapia**, v.69, p.147-54, 1998.

DUTTON, M. F. Enzymes and aflatoxin biosynthesis. **Microbiological Reviews**, v. 52, p. 274-295, 1988.

EKUNDAYO, O.; LAAKSO, I.; HILTUNEN, R. Essential oil of *Ageratum conyzoides*. **Planta Medica**, v.54, p.55-57, 1988.

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

ELSEWORTHY, G. C., J. S. E. HOLKER, J. M. MCKEOWN, J. B. ROBINSON, AND L. J. MULHERIN. 1970. The biosynthesis of the aflatoxin. **Journal of Chemical Society: Chemical Communications**, p. 1069-1070, 1970.

FERNANDES, P.C.; MALAGUIDO, A.; SILVA, A.V. O risco das Micotoxinas. 2006. Disponível em: <http://www.engormix.com/o_risco_das_micotoxinas_p_artigos_30_MYC.htm>. Acesso 08 nov. 2008.

FERREIRA, H.; PITTNER, E.; SANCHES, H.F.; MONTEIRO, M.C. Aflatoxinas: Um Risco a Saúde Humana e Animal, **Ambiência (UNICENTRO)**, São Paulo, v.2, n.1, p. 113-127, 2006.

FAO - Food and Agriculture Organization Manual on the Application of the HACCP System in mycotoxin Prevention and Control. FAO Food and Nutrition Paper 73, 2001.

GANGWAR, A.K.; RAMAKRISHNAN, P.S. Ethnobiological notes on some tribes of Arunachal Pradesh, **Economic botany**, India, v.44, p.94-105, 1990.

GBOLADE, A.A.; ONAYADE, O.A.; AYINDE, B.A. Insecticidal activity of *Ageratum conyzoides* L. volatile oil against *Callosobruchus chinensis* F. in seed treatment and fumigation laboratory tests. **Insect Science and its Application**, v.19, n. 2–3, p. 237, 1999.

GITHENS, T.S. Drug Plants of Africa. **African Handbooks**, Philadelphia, v. 8, p. 59, 1948.

GONÇALEZ, E; FELICIO, J.D; PINTO, M.M; ROSSI, M.H; MEDINA, C.; FERNANDES, M.J.B.; SIMONI, I.C. Inhibition of aflatoxin production by *Polymnia sonchifolia* and its *in vitro* cytotoxicity. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.2, p. 159-163, 2003.

GREENE-MCDOWELLE, D.M.; INGBER, B.; WRIGHT, M.S.; ZERINGUE, J.R. H. J.. BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.E. The effects of selected cotton-leaf volatiles on growth, development and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*. **Toxicon**, New Orleans, v.37, p. 883–893, 1999.

GUYNOT, M.E.; MARIN, S.; SETO, L. ; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. Screening for antifungal activity of some essential oils against common spoilage fungi of bakery products, **Food science and technology international**, Espanha, v. 11, n.1, p. 25-32 ,2005.

HARBORNE, J.B. Plant phenolics. E.A. Bell B.V. Charlwood (eds) **Secondary Plant Products**, Germany, p. 329-402, 1980.

HELAL, G.A.; SARHAN, M.M.; ABU SHAHLA, A.N.K.; ABOU EL-KHAIR, E.K. Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* ML2-strain. **Journal of Basic Microbiology**, v.47, n. 1, p. 5 – 15, 2007.

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

International Agency for Research on Cancer (IARC), Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human, vol. 56. **IARC**, France, p. 257–263, 1993.

IRKIN, R.; KORUKLUOGLU, M. Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion and leek extracts, **African Journal of Biotechnology**, Turkey, v.6, n.4, p. 384-387, 2007.

JAIMEZ, J.; FENTE, C. A.; VAZQUEZ, B. I.; FRANCO, C. M.; CEPEDA, A.; MAHUZIER, G.; PROGNON, P. Review: Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography**, v. 882, p.1-10, 2000.

JAIN, P.; SAHU, T.R. An ethnobotanical study of Noradehi sanctuary park of Madhya Pradesh, India: Native plant remedies for scorpion sting and snake bite. **Journal of Economics Tax Botanical**, v.17, p.315-328, 1993.

JAIN, S.; PAND PURI, H.S. Ethnomedicinal plants of Jaunsar-Bawar hills, Uttar Pradesh. **Indian Journal Ethnopharmacology**, v.12, p.213-222, 1984.

JAMIR, N.S. Some interesting medicinal plants used by Nasas. **Journal Research Education Indian Medicinal**, v.9, p.81-87, 1990.

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

JHA, S.; DHAKAL, M. Allelopathic effects of various extracts of some herbs on rice and wheat. **Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science**, v.11, p.121–123, 1990.

JOUANY, J.P. The impact of mycotoxins on performance and health of dairy cattle, **Alltech's 17th Annual Symposium**, p.191-222, 2001.

JUVEN, B. J.; KANNER, J.; SCHVED, F. E WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal Applied Bacteriology**, v.76, p.626-631, 1994.

KAPUR, S.K. Ethnomedico plants of Kangra valley (Himachal Pradesh). **Journal of Economic and Taxonomic Botany**, Jodhpur, v.17, p.395-408, 1993.

KATEWA, S.S.; ARORA, A. Some plants in folk medicines of Udaipur district (Rajasthan), **Ethnobotany**, v.9, p.48-51, 1997.

KERHARO, J.; ADAM, J.G. La pharmacopée senegalaise traditionnelle: **Plantes. Medicinales et toxiques**, Paris, v. 1, p. 101, 1974.

KIRTIKAR, K.R.; BASU, M.D. Indian Medicinal Plants, vol. 2, **Periodical Express Book Agency**, New Delhi, p. 1330–1331. 1991.

KOTEPPA, P.; RAO, J.P.; SUBRAHMANYAM, B.; RASTHOGI, J.N.; DEVA KUMAR, C.; PARI, K. Benzofuran and other constituents of the essential oil of *Ageratum conyzoides*. **Phytochemistry**, v.49, n.5, p.1385, 1998.

KOUTSOUMANIS, K.; TASSOU, C.C.; TAOUKIS, P.S.; NYCHAS, G.J.E.; Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella enteritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements, **Journal of Applied Microbiology** v.84, p. 981–987, 1998.

KUMAR, V.; JAIN, S.K. A contribution to ethnobotany of Surguja district in Madhya Pradesh, **Ethnobotany**, India, v.10, p.89-96, 1998.

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

LADEIRA, A. M.; ZAIDAN, L. B. P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. *Ageratum conyzoides* L. (Compositae): germinação, floração e ocorrência de derivados fenólicos em diferentes estádios de desenvolvimento. **Hoehnea**, v.15, p.53-62, 1987.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Curitiba, p. 134, 1997.

LINDNER, E. **Toxicología de los alimentos**. 2ªed. Zaragoza, Espanha: Acribia, 1995. 251p.

LÓPEZ, C.; RAMOS, L.; RAMADÁN, S.; BULACIO, L.; PEREZ, J. Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from milk artificially contaminated. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p.211–215, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 512p., 2002.

LUO, M.; JIANG, L. K.; HUANG, Y.X.; ZUO, G.L. Effects of citral on *Aspergillus flavus* spores by Quasi-elastic light scattering and multiplet microanalysis techniques. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 46, n. 4, p. 277-283, 2004.

MAGALHÃES, J.F.G.; VIANA, C.F.G.; ARAGÃO JÚNIOR, A.G.M.; MORAIS, V.G.; RIBEIRO, R.A.; VALE, M.R. Analgesic and antiinflammatory activities of *Ageratum conyzoides* in rats. **Phytotherapy Research**, v.11, p.183-188, 1997.

MAGAN, N.; ALDRED D. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain **International Journal of Food Microbiology**, v.119, n.1-2, p.131-139, 2007.

MAHESHWARI, J.K.; SINGH, K.K.; SAHA, S. Ethnomedicinal uses of plants by the Tharus of Kheri district, **Bulletin of Medico-Ethnobotanical Research**, v.1, p.318-337, 1980.

MAHMOUD A.L., Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents, **Letters in Applied Microbiology**, v.2, p.110–113, 1994.

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

MALIK, V.S. Genetics and biochemistry of secondary fungal metabolites. **Advances Applied Microbiology**, v.28, p.27-116, 1982.

MALLOZZI, M.; CORREA, B. Fungos toxigênicos e micotoxinas. **Boletim do Instituto Técnico de Biologia**, São Paulo, v.3, p.5-26, 1998.

MAPA. Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento. **SISLEGIS** – Sistema de legislação agrícola federal. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=5633>. Acesso em: 22 ago 2008.

MARQUES NETO, J.F.; COSTALLAT, L.T.V.; FERNANDES, S.R.M.; DE NAPOLI, M.D.M.; SAMARA, A.M. Efeito do *Ageratum conyzoides* Lin. no tratamento da artrose. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo v.28, n.4, p.109–114, 1988.

MARTELLI, G.P.; RUSSO, M. The use of thin sectioning for visualization and identification of plant viruses. In: Maramorosch, K.; KOPROWSKI, H. (Eds.). New York, **Methods in Virology**, v.8, p.143-192, 1984.

MCLAFFERTY, F.W.; STAUFFER, D.B. *The wiley INBS registry of mass spectral data*. Wiley, 1989.

MELO, M.M.; NASCIMENTO, E.F.; OLIVEIRA, N.J.F. Intoxicação de bovinos por aflatoxina B₁ presente em polpa cítrica: relato de um surto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v.51, n.6, p.555-558, 1999.

MENUT, C.; SHARMA, S.; LUTHRA C. Aromatic plants of tropical central Africa, Part X—Chemical composition of essential oils of *Ageratum houstonianum* Mill. and *Ageratum conyzoides* L. from Cameroon. **Flavour and Fragrance Journal**, v.8, n.1, p.1–4, 1993.

MING, L.C. *Ageratum conyzoides*: A tropical source of medicinal and agricultural products. In: JANICK, J. Perspectives on new crops and new uses. **Alexandria**. p. 469–473, 1999.

MING, L.C.; FIGUEIREDO, R.O.; MACHADO, S.R.; ANDRADE, R.M.C. Yield of essential oil of and citral content in different parts of lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf.) Poaceae. **Acta Horticulturae**, n.426, p.555–559, 1996.

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

MOREIRA, M.D.; PICANÇO, M.C.; BARBOSA, L.C.A.; GUEDES, R.N.C.; SILVA, É. M. Toxicity of leaf extracts of *A. conyzoides* to lepidóptera pests of horticultural crops. **Biological Agriculture and Horticulture**, v.22, p. 251-60, 2004.

MOSS, M.O. Mycotoxic fungi. **Microbial Food Poisoning**, Adrian R. Eley, 2ª edição, London, p.75-93, 1996.

MOTHES, K. Historical introduction. E. A. Bell & B. V. Charlwood (eds) **Secondary Plant Products**, Germany, p. 1-10, 1980.

MOURA, A.C.A.; SILVA, E.L.F.; FRAGA, M.C.A; WANDERLEY, A.G.; AFIATPOUR, P.; MAIA, M.B.S. Antiinflammatory and chronic toxicity study of the leaves of *Ageratum conyzoides* L. in rats. **Phytomedicine**, Muenchen, v.12, p.138–142, 2005.

NEOGI, B.; PRASAD, M.N.; RAO, R.R. Ethnobotany of some weeds of Khasi and Garo hills, **Ecology Botanical**, Northeastern India, v.43, p.471-479, 1989.

NERI, F.; MARI, M.; BRIGATI, S.; Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds. **Plant Pathology** v.55 n.1, p.100–105, 2006.

NOGUEIRA, J.H.C.; GONÇALEZ, E.; FACANALI, R.; MARQUES, M.O.; FELICIO, J.D. Inibição do crescimento de *Aspergillus flavus* por cromenos constituintes do óleo de mentrasto (*Ageratum conyzoides*). VIII Jornada Paulista de Plantas Medicinais, **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**. São Paulo, v.5, p.176, 2007a.

NOGUEIRA, J.H.C.; GONÇALEZ, E.; MARQUES, M.O.; Facanali, R.; ROSSI, M.H.; FELICIO, J.D. Quimioprevenção do crescimento de *Aspergillus flavus* pelo óleo essencial de mentrasto (*Ageratum conyzoides*). **32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007b.

NOGUEIRA, J.H.C.; GONÇALEZ, E.; ROSSI, M.H.; FELÍCIO, J.D. Avaliação do óleo essencial e extrato de *Ageratum conyzoides* no crescimento de *Aspergillus flavus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, p.171-174, 2006.

NORTHOLT, M. D.; EGMOND, H. P.; PAULSCH, W. E. Differences between *Aspergillus flavus* in growth and aflatoxin B₁ production in relation to water activity and temperature. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 40, p. 778-781, 1977.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

OKUNADE, A.D. *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae), **Fitoterapia**, v.73, p.1-16, 2002.

OLIVEIRA, C.A.F.; GERMANO, P.M.L. Aflatoxina M₁ em leite e derivados: ocorrência no Brasil e aspectos relativos à legislação. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 48, p. 22-25, 1997.

OLIVEIRA, F.; LÚCIA, M.; GARCIA, L.O. Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de mentrasto – *Ageratum conyzoides*, **Lecta**, Bragança Paulista, v.11, p.63-100, 1993.

OMIDBEYGI, M.; BARZEGAR, M.; HAMIDI, Z.; NAGHDIBADI, H. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. **Food control**, v.18, p. 1518-1523, 2007.

OMS (Organização Mundial da Saúde). **Medicion del Cambio del Estado Nutricional. Ginebra**: OMS, 1983.

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

PASTER, N.; BULLERMAN, L.B. Mould spoilage and mycotoxins formation in grains as controlled by physical means. **International Journal of Food Microbiology**, v.7, p. 257-265, 1988.

PAYNE, G.A. Molecular approaches for studying aflatoxin biosynthesis. In: SHOTWELL, O.L.; HUBURGH, C.R. Aflatoxin in Corn: New Perspectives. **Iowa: Research Bulletin 599**, Iowa, p. 383-390, 1991.

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

PIER, A.C. Major biological consequence of aflatoxicosis in animal production. **Journal of Animal Science**, v. 70, p.3964–3967, 1992.

PINTO, E.; PINA-VAZ, C.; SALGUEIRO, L.; GONCALVES, M.J.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; CAVALEIRO, C.; PALMERIA, A.; RODRIGUES, A.; MARTINEZ-DE-OLIVERIA, J. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, n.10, p.1367–1373, 2006.

PINTO, M.M.; GONÇALEZ, E.; ROSSI, M.H.; FELICIO, J.D.; MEDINA, C.S.; FERNANDES, M.J.B.; SIMONI, I.C. Activity of the aqueous extract from *Polymnia sonchifolia* leaves on growth and production of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.127-129, 2001.

RAJWAR, G.S. Low altitude medicinal plants of south Garhwal (Garhwal Himalaya). **Bulletin of Medico-Ethnobotanical Research**, v.4, p.14-28, 1983.

RAMACHANDRAN, V.S.; NAIR, N.C. Ethnobotanical observations on Irulars of Tamil Nadu (India). **Journal of Economic Tax Botanical**, v.2, p.183-190, 1981.

RASOOLI, I.; FAKOOR, M.H.; YADEGARINIA, D.; GACHKAR, L.; ALLAMEH, A.; REZAEI, M.B. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils, **International Journal of Food Microbiology**, v.122, n.1-2, p.135-139, 2008.

REIB, J. Development of *Aspergillus parasiticus* and formation of aflatoxin B₁ under the influence of conidiogenesis affecting compounds, **Archive of Microbiology** v.133, p. 236–238, 1982.

ŞAHİN, F.; KARAMAN, İ.; GÜLLÜCE, M.; ÖĞÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A.; ÖZTÜRK, S.; KOTAN, R. Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L., **Journal of Ethnopharmacology**, v.87, p.61–65, 2003.

SAHOO, A.K.; MUDGAL, V. Ethnobotany of South Chotanagpur (Bihar). **Bulletin Botanical Surv** ,India, v.35, p.40-59, 1993.

SANKARAN, S.; ALAGESABOOPATHI, C. Some Medicinal plants used by the tribals of Shevaroy hills, **Flora Fauna**, v.1, p.137-138, 1995.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**, Insular, p. 19-22, 2002.

SCUSSEL, V. M. **Fungos em grãos armazenados** in: Armazenagem de grãos, p. 675-787, 2002.

SHARMA, G.P.; JAIN, N.K.; GARG, B.D. Antibacterial activity of some essential oils. **Indian Drugs**, v.17, p.14-15, 1979a.

SHARMA, G.P.; JAIN, N.K.; GARG, B.D. Antibacterial activity of some essential oils, **Science Cult**, v.45, p.327-328, 1979b.

SHARMA, G.P.; JAIN, N.K.; GARG, B.D. Antifungal activity of some essential oils-I. **Indian Drugs**, v.16, p.21, 1978.

SHARMA, P.C.; MURTI, K.S.; BHAT, A.V.; NARAYANAPPA, D; KISHORE, P. Medicinal-lores of Orissa-I-Skin diseases. **Bulletin of Medico-Ethnobotanical Research**, v.6, p.93-101, 1985.

SHARMA, R.P.; SALUNKHE, D.K. Introduction to mycotoxins. **Mycotoxins and Phytoalexins**. Londres, p. 3-12, 1991.

SIAME, B.A.; MPUCHANE, S.F.; GASHE, B.A.; ALLTEY, J. ; TEFFERA, G. Occurrence of aflatoxins, fumonisin B₁ and zearalenone in foods and feeds in Botswana. **Journal Food Protection**, v.61, n.12, p.1670-1673, 1998.

SIDDIQUI, M.B.; ALAM, M.M.; HUSAIN, W. Traditional treatment of Skin diseases in Uttar Pradesh, **India Economic Botanical**, v.43, p.480-406, 1989.

SILVA, J.O. Ocorrência de aflatoxina B₁ em arroz consumido por militares do exército brasileiro por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência, Dissertação de mestrado Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005

SILVA, R.T.M.; NOGUEIRA, J.H.C.; ROSSI, M.H.; GONÇALEZ, J.D. Constituição química e atividade biológica em cultura de *Aspergillus flavus* dos óleos essenciais de *Pittosporum*

undulatum VENT. **6º Congresso de Iniciação científica em Ciências Agrárias, Biológicas e Ambientais**, CD ROOM, 2008.

SILVA, W.C.; RIBEIRO, J.D.; SOUZA, H.E.M.; CORRÊA, R.S. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas, **Acta Amazonica**, v.37, n.2, 2007.

SINGH, H. Ethnobiological treatment of Piles by Bhoxas of Uttar Pradesh. **Ancient Science Life**, v.8, p.167-170, 1988.

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**, v.17, p.269–271, 1993.

SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Phytotoxic interference of *Ageratum conyzoides* with wheat (*Triticum aestivum*). **J. Agron. Crop Sci**, v.189, p.341–346, 2003.

SINGH, P.P.; SHUKLA, H.S.; SINGH, R.S.; TRIPATHI, S.C. Antifungal properties of essential oil of *Ageratum conyzoides* L., **Nat Acad Sci Lett**, v.9, p.97, 1986.

SMITH, JE; MOSS, MO. Mycotoxins: formation, analysis and significance. Chichester, **Journal Wiley**, p.148, 1985.

Sood VK. Chemical examination of the flower oil of *Ageratum conyzoides* L. *Flav Ind* 1973;4:77.

STUSSI, J.S.P.; CUNHA, M.C.P.; FERREIRA, L.R.V.; FLORIDO, P.S.S.; OLIVEIRA, L.A.T. Fungos em bacon: uma revisão. **Higiene Alimentar**, v.17, n.113, p.28-32, 2002.

SUDHAKAR, A.; CHETTY, K.M. Medicinal importance of some angiospermic weeds used by the rural people of Chittoor district of Andhra Pradesh, **Fitoterapia**, v.69, p.390-400, 1998.

SURESH, B.; DHANASEKARAN, S.; KUMAR, R.V.; BALASUBRAMANIAN, S. Ethnopharmacological studies on the medicinal plants of Nilgiris. **Indian Drugs**, v.32, p.340-352, 1995.

SWAIN, T.. Secondary compounds as protective agents. **Annual Review of Plant Physiology**, v.28, p.479-501, 1977.

TEISSEDE, P.L.; WATERHOUSE, A.L. Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington v.48, p. 3801–3805, 2000.

TROMBETA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SIJA,.; MAZZANTI, G.; BISIGNANANO, G. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n.6, p. 2474-2478, 2005.

TSIGARIDA, E.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G.J.E.; Behaviour of *L. monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere

packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.901-909, 2000.

TURNER, W. B. Commercially important secondary metabolites, In J. E. Smith and D. R. Berry (ed.), **The filamentous fungi**, vol. 1, Industrial mycology. Edward Arnold, New York. p. 122-139, 1975.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied Environment Microbiology**, v.68, p.1561-1568, 2002.

UPADHAY, O.P.; KUMAR, K.; TIWARI, R.K. Ethnobotanical study of skin treatment uses of medicinal plants of Bihar. **Pharmaceutica Biology**, v.36, p.167-172, 1998.

VAN DEN DOOL H & KRATZ D. J. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography, **Journal Chromatography**, v.11, p. 463-467, 1963.

VELLUTI, A.; MARIN, S.; GONZALEZ, P.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. **Food Microbiology**, v.21, p.649-656, 2004.

VELLUTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; EGIDO, J.; MARÍN, S. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, orégano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B₁ production by *Furarium proliferatum* in maize grain. **Food Microbiology**, v. 89, p. 145-154, 2003.

VERA, R. Chemical composition of essential oil of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) from Reunion. **Flavour and Fragrance Journal**, v.8, n.5, pu .257– 260, 1993.

VIEIRA, S.L. Micotoxinas e produção de ovos, **Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Micotoxicoses em aves**, Curitiba, p.65-80, 1995.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ, N.J.; FERNANDEZ, L., PEREZ A,J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) ando range (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Food control**, v.18, p.45-49, 2007.

WANDJI, J.; BISSANGOU, M.F.; OUAMBRA, J.M.; SILOU, T.; ABENA, A.; KEITA, A. Allelochemicals from *Ageratum conyzoides* L. and *Oryza sativa* L. and their effects on related Pathogens. **Fitoterapia** ,v.67, p.427,1996.

WEINBERG, E. D. Secondary metabolism control by temperature and inorganic phosphate. **Developments in industrial microbiology**., v.15, p.70-81, 1974.

WOLFFENBÜTTEL, A.N. Artigo publicado no Informativo CRQ-V, ano XI, n.º105, págs. 06 e 07, 2007.

WYATT, R.D. Poultry. In: SMITH, J.E.; HENDERSON, R.S. (Ed.). **Mycotoxins and animal foods**. Boca Raton: CRC, p.553-605, 1991.

YAMAMOTO, L.A.; SOLDERA, J.C.; EMIM, J.A.; GODINHO, R.O.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Pharmacological Screening of *Ageratum conyzoides* L. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.86, p.145-147, 1991.

YOGANARNARASIMHAM, S.N.. Medicinal Plants of India—Tamil Nadu, vol. 2. **Regional Research Institute**, Bangalore, p. 27, 2000.

YOUSEF, A.E.; MARTH, E.H. Stability and Degradation of Aflatoxin M1 in Mycotoxins in Dairy Products. Hans P.Van Egmond (Ed.) **Elsevier Applied Science** v.5, p.127-161, 1989.

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](#)