

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

JOÃO VICTOR FELICIO NOGUEIRA

**EFICÁCIA DE DIFERENTES ÓLEOS ESSENCIAIS E DOS COMPOSTOS
EUGENOL E AITC NO CONTROLE DE *ASPERGILLUS FLAVUS* POR CONTATO
DIRETO *IN VITRO***

**VIÇOSA – MG
2021**

JOÃO VICTOR FELICIO NOGUEIRA

**EFICÁCIA DE DIFERENTES ÓLEOS ESSENCIAIS E DOS COMPOSTOS
EUGENOL E AITC NO CONTROLE DE *ASPERGILLUS FLAVUS* POR CONTATO
DIRETO *IN VITRO***

Relatório final, apresentado a Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências para a obtenção do título de Engenheiro Agrícola e Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Ernandes Rodrigues Alencar

**VIÇOSA – MG
2021**


JOÃO VICTOR FELICIO NOGUEIRA


**EFICÁCIA DE DIFERENTES ÓLEOS ESSENCIAIS E DOS COMPOSTOS
EUGENOL E AITC NO CONTROLE DE *ASPERGILLUS FLAVUS* POR CONTATO
DIRETO *IN VITRO***

Relatório final, apresentado a Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências, para obtenção do título de Engenheiro Agrícola e Ambiental.

APROVADO: 13 de maio de 2021.

Assentimento:


João Victor Felício Nogueira
Autor


Ernandes Rodrigues de Alencar
Orientador

*A Deus, os bons espíritos, Giovanna, Andréia e
Thatiane, meus familiares e amigos pelo
incentivo, força e paciência durante minha
trajetória.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos bons espíritos por me auxiliarem todos os dias, por nunca me negarem conforto, calma e paciência, mas peço ainda para continuarem me dando clareza e sabedoria para conquistar meus objetivos.

A minha mãe Andréia e irmã Thatiane, que nunca mediram esforços para que esse sonho de me tornar engenheiro agrícola e ambiental pudesse acontecer, nunca deixando faltar nada e sempre me apoiando. Sendo meus exemplos de caráter, fé, garra e honestidade.

Ao meu pai, avó, tios, tias e outros irmãos, por serem sempre presentes e proporcionar momentos felizes e serem exemplos de pessoas boas.

Aos meus professores que com sabedoria e dedicação ajudaram a construir a pessoa quem sou, tanto a nível profissional como também pessoal.

Ao Professor Ernandes Alencar pela confiança, a Professora Lêda Faroni pela grande oportunidade de estágio e orientação.

Ao grande companheiro de pesquisa, expoente de muitos conhecimentos Marcus Vinícius pelas inúmeras ajudas, valiosos ensinamentos, suporte e orientação.

Aos amigos da área de armazenagem do Departamento de Engenharia Agrícola: Arthur, Daniel, Grazi e Kesleyane, pela ótima convivência.

Aos meus amigos da república Kero Kero Matheus, Víctor, Luís Filipe, Jonathas, Geraldo, Lorhan, Paulo e Carlos, que me propiciaram momentos, histórias, causos, alegrias, e mais uma infinidade de bons sentimentos.

Aos meus amigos de curso, que tive a honra de conhecer em Viçosa. Em especial Marcella e Lucas, meus grandes irmãos das batalhas da graduação e dos momentos de paz. Também ao Víctor pelos materiais e dicas, Sávio e Laura pela linda amizade que temos.

Por fim agradeço a cidade de Viçosa e a Universidade Federal de Viçosa (UFV) que me acolheram nesses melhores anos da minha vida. A UFV deixa uma marca muito forte em todos que passam por suas generosas mãos, comigo não é diferente, sinto e sentirei para sempre marcado em meu coração ter feito parte com orgulho dessa universidade.

Não me tronarei somente Engenheiro Agrícola e Ambiental, mas sim, Engenheiro Agrícola e Ambiental da Universidade Federal de Viçosa.

*“Na vida existem extremos para tudo, não tenha eles em sua vida,
absolutamente nenhum”*

(Autor desconhecido)

RESUMO

Os óleos essenciais são compostos voláteis extraídos de plantas aromáticas, condimentares e medicinais, alguns óleos essenciais apresentam ação fungicida. Dentre os principais fungos micotoxigênicos encontrados em alimentos, destacam-se as espécies do gênero *Aspergillus*, em especial *Aspergillus flavus*. A espécie *A. flavus* se destaca pela capacidade de produzir as aflatoxinas, que são compostos que causam doenças em seres humanos e animais. Objetiva-se com o trabalho determinar a eficácia dos óleos essenciais de tomilho, de menta e de pimenta, do eugenol e do AITC (Isotiocianato de alila) no controle de *Aspergillus flavus* in vitro por contato direto. Os óleos essenciais de tomilho, de menta e de pimenta, o eugenol e o AITC foram incorporados no meio de cultura *A. flavus* e parasitucus Agar, nas concentrações de 0 (controle), 100, 400, 700 e 1000 $\mu\text{L/L}$, os volumes de óleo ou composto foram calculadas em relação ao volume de meio de cultura. Os diâmetros das colônias foram medidos em intervalos constantes de 12 horas, até o tempo máximo de 120 horas. A partir dos resultados, foram geradas equações de regressão que relacionam diâmetro das colônias e o tempo do tratamento, assim como o percentual de Inibição do Crescimento Micelial (ICM). Observou-se que os óleos essenciais de menta e de pimenta longa não foram efetivos no controle de *Aspergillus flavus* em concentrações de até 1000 $\mu\text{L/L}$. Na concentração de 1000 $\mu\text{L/L}$, os valores de ICM foram iguais a 18,0% e 12,6% para os óleos essenciais de menta e de pimenta longa, respectivamente, depois de 120 h. Por outro lado, o óleo essencial de tomilho e o eugenol apresentaram ICM de 92,4 e 93,3 respectivamente, na concentração de 400 $\mu\text{L/L}$. Em concentrações superiores a 400 $\mu\text{L/L}$ de óleos essencial de tomilho e de eugenol não houve crescimento de *A. flavus*. No que se refere ao AITC, foi observado ICM de 100% na concentração de 1000 $\mu\text{L/L}$. Diante dos dados obtidos, concluiu-se que o óleo essencial de tomilho e o eugenol, são eficientes para o controle de *A. flavus*, em concentrações a partir de 400 $\mu\text{L/L}$.

Palavras-chave: Tomilho, menta, pimenta longa, controle de fungos.

ABSTRACT

Essential oils are volatile compounds extracted from aromatic, condiment and medicinal plants, some essential oils have a fungicidal action. Among the main mycotoxigenic fungi found in food, the species of the genus *Aspergillus*, especially *Aspergillus flavus*, stand out. The species *A. flavus* stands out for its ability to produce aflatoxins, which are compounds that cause disease in humans and animals. The aim of this work is to determine the effectiveness of essential oils of thyme, spearmint and long pepper, eugenol and AITC (allyl isothiocyanate) in the control of *Aspergillus flavus* in vitro by direct contact. The essential oils of thyme, spearmint and long pepper, eugenol and AITC were incorporated into the culture medium *A. flavus* and *parasiticus* Agar, in the concentrations of 0 (control), 100, 400, 700 and 1000 $\mu\text{L} / \text{L}$, the volumes of oil or compost were calculated in relation to the volume of culture medium. Colony diameters were measured at constant 12-hour intervals, up to a maximum time of 120 hours. From the results, regression equations were generated that relate colony diameter and treatment time, as well as the percentage of mycelial growth inhibition (ICM). It was observed that the essential oils of spearmint and long pepper were not effective in controlling *Aspergillus flavus* in concentrations up to 1000 $\mu\text{L} / \text{L}$. At a concentration of 1000 $\mu\text{L} / \text{L}$, the ICM values were equal to 18.0% and 12.6% for essential oils of spearmint and long pepper, respectively, after 120 h. On the other hand, the essential oil of thyme and eugenol presented ICM of 92.4 and 93.3 respectively, at a concentration of 400 $\mu\text{L} / \text{L}$. At concentrations above 400 $\mu\text{L} / \text{L}$ of essential oils of thyme and eugenol, there was no growth of *A. flavus*. With regard to the AITC, 100% ICM was observed at a concentration of 1000 $\mu\text{L} / \text{L}$. In view of the data obtained, it was concluded that the essential oil of thyme and eugenol, are efficient for the control of *A. flavus*, in concentrations from 400 $\mu\text{L} / \text{L}$.

Keywords: Thyme, spearmint, long pepper, fungi control

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Plantas medicinais, aromáticas e condimentares.....	11
2.2 Óleos essenciais e seus compostos.....	11
2.2.1 Óleo essencial de <i>Mentha spicata</i>.....	12
2.2.2 Óleo essencial de <i>Piper hispidinervum</i>.....	13
2.2.3 Óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i>.....	13
2.2.4 Isotiocianato de alila (AITC)	14
2.2.5 Eugenol	14
2.3 Deterioração ocasionada por fungos em alimentos.....	14
2.3.1 <i>Aspergillus flavus</i>	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Óleos essenciais, eugenol e AITC.....	17
3.2 Isolado de <i>Aspergillus flavus</i>	17
3.3 Determinação da eficácia dos óleos essenciais, do AITC e do eugenol, no controle de <i>Aspergillus flavus</i>	17
3.4 Determinação do percentual de inibição do crescimento micelial.....	18
3.5 Delineamento Experimental.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
Fonte: Autores.....	21
5 CONCLUSÃO.....	25
6 REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais podem ser definidos como compostos voláteis resultantes do metabolismo secundário de plantas aromáticas, condimentares e medicinais os quais são caracterizados por um complexo de compostos voláteis com forte odor (BAKKALI et al., 2008). Esses materiais podem ser extraídos de diversas partes das plantas, através de processos físicos, tais como: destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida, dentre outros métodos adequados (BRASIL, 2006). Os óleos essenciais possuem grande importância nas indústrias de perfumaria, cosmética, alimentícia e farmacêutica (TRANCOSO, 2013).

No que se refere aos alimentos, os óleos essenciais tem sido cada vez mais estudados, seja no controle de insetos-pragas ou de microrganismos (OOTANI et al., 2013; SAROJ et al., 2020). Dentre as vantagens da utilização dos óleos essenciais no controle de microrganismos, tem-se que esses compostos apresentam baixa toxicidade ao homem e os animais, degradam-se rapidamente e não deixam resíduos nos alimentos (FIRENZUOLI et al., 2014). Outra vantagem no que tange ao Brasil, é que o país se destaca entre os maiores produtores de óleos essenciais, tanto em relação ao volume de produção quanto na diversidade de matéria-prima (BIZZO, 2013). Dessa forma, o uso dos óleos essenciais é uma alternativa para o controle de microrganismos nos alimentos, seja na inibição do crescimento ou na inativação dos microrganismos.

O controle dos microrganismos nos alimentos é fundamental, tendo em vista as perdas ocasionadas ou as toxinas geradas nos produtos agrícolas, sobretudo pelos fungos, que podem se desenvolver em grãos de cereais, leguminosas e até frutos (MAZIERO et al., 2010). Dentre os principais danos causados por fungos em alimentos destacam-se: perda do valor nutricional, alteração de propriedades físicas dos produtos e contaminação por micotoxinas (MOHAPATRA et al., 2017; FLEURAT-LESSARD, 2017). As perdas nos alimentos ocasionadas por fungos causam prejuízos aos produtores, a indústria e aos consumidores.

Dentre as alterações ocasionadas por fungos em produtos agrícolas, a que mais é objeto de estudos é a contaminação por micotoxinas, que são metabólitos secundários produzidos por fungos, e que podem apresentar efeito tóxico para seres humanos e animais (FREIRE et al., 2007; MAZIERO et al., 2010). Uma das principais espécies de fungos micotoxigênicos que colonizam produtos de origem vegetal é o *Aspergillus flavus*, o qual é capaz de sintetizar aflatoxinas (MANGAN, 2004). As aflatoxinas são consideradas potentes hepato carcinógenos naturais, que podem ser encontrados em alimentos (WU, 2015). Dessa forma, uma maneira de

diminuir a contaminação de produtos agrícolas por aflatoxinas é inativar os fungos que as produzem.

Atualmente métodos inovadores para controlar fungos em alimentos são alvo de estudos, dentre eles o armazenamento hermético, aquecimento por microondas, aplicação de ozônio gasoso, plasma frio, radiação ionizante, luz pulsada, dentre outros (MOHAPATRA et al., 2017). Dentre os métodos alternativos para o controle de microrganismos, destaca-se a utilização dos óleos essenciais (MONTES-BELMONT et al., 1998; SAROJ et al., 2020). No que se refere aos óleos essenciais já estudados no controle de fungos em geral, tem-se o de menta (*Mentha spicata*) (KEDIA et al., 2014), o de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) (ZACARONI et al., 2009) e o de tomilho (*Thymus vulgaris*) (KUMAR et al., 2008). É importante salientar que a partir dos óleos essenciais, é possível obter diferentes compostos, como o isotiocianato de alila (AITC) e o eugenol, extraídos do óleo essencial de mostarda e de cravo respectivamente. Esses dois compostos também foram alvo de testes no controle de microrganismos em alimentos (ABBASZADEH et al., 2014; NAZARETH et al., 2018).

Apesar de serem encontrados estudos em que óleos essenciais ou compostos como eugenol e AITC foram testados sobre fungos (PASTER et al., 1995; AOUDOU et al., 2012; TARAZONA et al., 2018), o controle de *A. flavus* e consequentemente a prevenção da síntese de aflatoxinas ainda é um desafio. Nesse cenário, é fundamental a realização de estudos, inicialmente *in vitro*, para que sejam determinadas concentrações nas quais os tratamentos com óleos essenciais ou compostos como eugenol e AITC, sejam eficientes para a inativação desses microrganismos. A partir de estudos como este, poderão ser realizados teste com a aplicação dos óleos essências e compostos extraídos deles nos alimentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantas medicinais, aromáticas e condimentares

Atualmente, é crescente a demanda por produtos obtidos a partir de produção verde, natural e sustentável, tanto por parte dos consumidores, como das indústrias (CÔRTEZ et al., 2013). Com intuito de suprir essa crescente demanda por produtos com essas características, destacam-se as plantas medicinais, aromáticas e condimentares devido a suas infinidades de usos, com destaques para medicamentos, cosméticos, alimentos, sanitizações entre outros (CORRÊA et al., 2014).

De acordo com Neto e Simões (2016), plantas medicinais são aquelas que possuem substâncias com propriedades terapêuticas ou farmacêuticas. Por outro lado, as aromáticas são caracterizadas por possuírem substâncias de odor acentuado e característico. Já as plantas condimentares possuem compostos utilizados na elaboração e no preparo de alimentos. Na maioria dos casos, os efeitos de interesse alcançados ao utilizar-se das plantas medicinais, aromáticas e condimentares, são advindos de óleos essenciais que são sintetizados por esses organismos (BAKKALI et al., 2008).

2.2 Óleos essenciais e seus compostos

Não há relatos com data das primeiras utilizações dos óleos essenciais na história, porém, de forma indireta, sabe-se que o homem utiliza essas substâncias há muitos séculos. Acredita-se que os primeiros usos dos óleos essenciais tenham sido através de bálsamos, ervas aromáticas e resinas que eram usadas para embalsamar cadáveres em cerimônias religiosas há milhares de anos atrás (TRANCOSO, 2013). Antigas civilizações como a chinesa, tinham por hábito o uso de ervas e aromas como recurso terapêutico (MENTZ et al., 2004).

Com o passar do tempo, nos séculos XVI e XVII, o tema “óleo essencial” já havia ganhado destaque a nível mundial, devido à valorização de especiarias na Europa (BARBOSA, 2018). Já no Brasil, os primeiros relatos sobre estudos com óleos essenciais são do século XIX, com as pesquisas realizadas por um farmacêutico chamado Theodor Peckolt (SANTOS, 2005). Desde então, os estudos sobre os óleos essenciais se intensificaram, seja na medicina, culinária, microbiologia, entre outras áreas (BAKKALI et al., 2008; TARIQ et al., 2019; KUMAR et al., 2020).

Além dos estudos sobre os potenciais usos dos óleos essenciais, houve avanço com relação a extração desses compostos. Atualmente, a obtenção dos óleos essenciais é feita de diversas formas, como por destilação por arraste com vapor de água, extração supercrítica,

dentre outras (SANTOS et al., 2004). Além da extração, é possível isolar os diferentes compostos presentes em um determinado óleo essencial, de forma a determinar a ação dessas substâncias (BRASIL, 2006).

Diante de tantos avanços com relação a obtenção desses compostos, estima-se que existam mais de 3000 tipos de óleos essenciais, com as mais diversas utilidades (TARIQ et al., 2019). Referente as características dos óleos essenciais, pode-se descrevê-los como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com características odoríferas, sabor ácido e consistência oleosa (SIMÕES, 2016). A coloração pode ser levemente amarelada ou até incolor e quando recém extraídos, podem apresentar uma baixa estabilidade na presença de luz, calor, ar e umidade (AFFONSO et al., 2012).

De acordo com Bakkali et al (2008), um único óleo essencial pode conter em sua composição de 20 a 60 compostos diferentes, mas na maioria dos casos há um composto majoritário, o qual pode ser extraído da mistura e utilizado isoladamente. Nesse contexto, tem-se o isotiocianato de alila (AITC) (NAZARETH et al., 2018), que é o principal composto do óleo essencial extraído da mostarda.

Como já foi mencionado anteriormente, os óleos essenciais possuem diversas funções, uma delas é a atividade antifúngica. Dessa forma em muitos já estudos realizados, foi observado que os óleos essenciais apresentam potencial para controlar fungos deterioradores de alimentos (THOMPSON, 1989; BASER et al., 2015). Já foram avaliados os efeitos de diferentes óleos essenciais sobre espécies dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, produtoras de toxinas em alimentos, as micotoxinas (MAIA et al, 2015).

Algumas revisões de literatura foram realizadas no que se refere ao potencial antifúngico dos óleos essenciais (MAIA et al., 2015; TARIQ et al., 2019; SOLIS et al., 2020; SIL et al., 2020; KUMAR et al., 2020). Baseado nas informações levantadas nos trabalhos citados, esses autores concluíram que os óleos essenciais apresentam um amplo espectro de ação sobre diversas espécies de fungos. Esses compostos podem agir de diferentes formas, seja alterando a estrutura da membrana celular, ocasionando disfunção de mitocôndrias, na inibição de bombas de fluxo, dentre outras (KONG et al., 2019).

2.2.1 Óleo essencial de *Mentha spicata*

A menta (*Mentha spicata*) é originária do norte da Inglaterra, sendo atualmente cultivada em todo mundo. Consiste em um rizomatoso rastejante, com as folhas largas e bem serrilhadas, também reconhecidas por ter o caule em formato quadrado (KEE et al., 2017). A

menta pertence à família Lamiaceae, caracterizando-se por ser fonte rica de polifenóis e possuírem fortes propriedades antioxidantes (GULLUCE et al., 2007). As folhas possuem odor característico e sabor picante, e os compostos extraídos são utilizados como aromatizantes e condimentos (SASTRI, 1962).

O óleo essencial extraído da *Mentha spicata* vem sendo estudado na conservação de alimentos, por se apresentar efetivo no controle de bactérias (SHAHBAZI, 2015), como inseticida (GOVINDARAJAN et al., 2012) e também agente antifúngico (KEDIA et al., 2014). Tradicionalmente, o óleo essencial de menta é muito utilizado na medicina, culinária e na indústria de cosméticos (DE SOUSA BARROS et al., 2015). Quanto a sua composição esse óleo é formado em sua maioria por carvona, limoneno e bourboneno (SHAHBAZI, 2015).

2.2.2 Óleo essencial de *Piper hispidinervum*

Piper hispidinervum é uma espécie originária da Amazônia Brasileira, popularmente conhecida como pimenta longa (NUNES et al., 2007). Essa planta pertence à família Piperaceae, ao gênero *Piper*, o qual tem cerca de 700 espécies. Grande parte das plantas desse gênero se caracterizam pelo uso popular na medicina, pela importância econômica e também comercial, devido à produção de óleos essenciais utilizados pela indústria de condimentos, farmacêutica e também de inseticidas (SILVA et al., 1999; ALBIERO et al., 2005).

O óleo essencial extraído da *Piper hispidinervum* é objeto de estudos para muitos pesquisadores, com o objetivo de determinar o seu potencial como agente inseticida (ESTRELA et al., 2006) e fungicida (ZACARONI et al., 2009). Os óleos essenciais, como mencionado anteriormente, são compostos formados por diversas substâncias, e no caso do óleo extraído de pimenta longa, o componente majoritário é o safrol, com concentrações em torno de 80% (ANDRÉS et al., 2017).

2.2.3 Óleo essencial de *Thymus vulgaris*

Thymus vulgaris, popularmente conhecida como tomilho, é uma espécie de planta pertencente à família Lamiaceae (PEREIRA et al., 2013). É uma das famílias mais importantes na produção de óleos essenciais (NIETO, 2017). O óleo extraído do tomilho é utilizado há muito séculos, com registro de uso no antigo Império Romano (SHABNUM et al., 2011). Ainda de acordo com esses autores, atualmente, esse composto é utilizado na culinária, medicina e também em cosméticos.

Investigações recentes indicaram que o óleo essencial de tomilho com potencial biocida. Pavela et al (2018) observaram atividade inseticida desse óleo essencial, enquanto que Ridwan

et al (2021) verificaram ação antibacteriana e Moazeni et al. (2021), ação antifúngica. Em sua composição, o óleo essencial de tomilho apresenta cerca de 55% de timol e 17% de cimeno (JAKIEMIU et al., 2010).

2.2.4 Isotiocianato de alila (AITC)

O isotiocianato de alila (AITC) é o composto majoritário encontrado no óleo essencial extraído da mostarda preta (*Brassica nigra*) (MEJIA-GARIBAY et al., 2015). Essa planta é mundialmente conhecida por sua ampla utilização na culinária, seja em pó, óleo e também em molhos. Existem diversos estudos que evidenciaram o potencial biocida do óleo essencial de mostarda preta (REYES-JURADO et al., 2019).

Com o avanço nos processos químicos, atualmente é possível purificar compostos isolados nos óleos essenciais (BRASIL, 2006). Dessa forma, muitos pesquisadores optaram por utilizar o AITC purificado em relação ao óleo essencial de mostarda preta. Em diversos trabalhos que já foram realizados, foi verificado potencial biocida do AITC, seja no controle de pragas (DE SOUZA et al., 2018), bactérias (LIN et al., 2000) e também fungos (NAZARETH et al., 2018; DE MELO NAZARETH et al., 2020).

2.2.5 Eugenol

O cravo (*Syzygium aromaticum*) é utilizado há milhares de anos para fins medicinais e estimulantes, com registro desde os impérios egípcio e romano (DUKE, 2002). Estudos referentes ao uso do óleo essencial de cravo são realizados por diversos pesquisadores, os quais indicaram como composto majoritário o eugenol (AFFONSO et al., 2012). Dessa forma a indústria química concentra o princípio ativo eugenol, comercializando-o concentrado.

Em diversos trabalhos encontrados na literatura, o eugenol apresentou a ação biocida, como potencial bactericida (MARCHESE et al., 2017), inseticida (PRATES et al., 2019) e também antifúngico (CAMPANIELLO et al., 2010; ABBASZADEH et al., 2014).

2.3 Deterioração ocasionada por fungos em alimentos

De acordo com a Lei Orgânica de Segurança Alimentar Nutricional, LOSAN (Brasil, 2006), é direito de todo cidadão brasileiro acesso a alimentos seguros. A ingestão de alimentos com a qualidade comprometida pode causar danos à saúde humana (DE OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2019) e também animal (BORDINI et al., 2013). Dessa forma é de suma importância manter a qualidade dos alimentos.

Desde o momento em que são produzidos, os alimentos estão sujeitos a perdas de qualidade, sejam produtos processados ou *in natura*. As alterações na qualidade dos alimentos são ocasionadas por ações de insetos e de microrganismos (FARONI, 1998). Então, controlar os agentes causadores de perdas nos alimentos é essencial para garantia da qualidade. Nesse cenário, muito estudos indicaram alternativas para o controle de microrganismos em alimentos, como o uso do gás ozônio (PEZZI, 2010; FREITAS-SILVA et al., 2013), controle biológico (SOARES et al., 2011) e também os óleos essenciais extraídos de plantas (MARANGONI et al. 2013; SOLIS et al., 2020).

No que se refere às perdas ocasionadas por microrganismos, destaca-se a ação dos fungos contaminantes de alimentos, sendo responsáveis por perdas nutricionais, redução da massa específica, alterações na cor e na textura, e também são responsáveis pela contaminação por micotoxinas (MOHAPATRA et al., 2017, FLEURAT-LESSARD, 2017). Com relação as micotoxinas, é importante destacar que não são todos os fungos que produzem essas substâncias. Dentre os gêneros de fungos que possuem espécies com capacidade de produzir micotoxinas, destacam-se: *Penicillium*, *Fusarium* e *Aspergillus* (SWEENEY et al., 1998).

Espécies do gênero *Aspergillus*, como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, são capazes de produzir as aflatoxinas (IAMANAKA et al., 2010). As aflatoxinas causam problemas à saúde de humanos e animais, por serem altamente tóxicas e carcinogênicas (MADIGAM, 2016). Devido à alta toxicidade, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu limites máximos tolerados para presença aflatoxinas nos alimentos, tais como cereais e derivados, feijão, castanha-do-Brasil, amendoim, especiarias, dentre outros (BRASIL, 2011).

2.3.1 *Aspergillus flavus*

O gênero *Aspergillus* foi primeiramente descrito por Pier Antônio Michelli, em 1729, e com o avanço tecnológico Johan Heirich Friedrich, em 1809, e Rudolf Virchow, em 1856, aprimoraram os conhecimentos existentes sobre os *Aspergillus* (BOSSCHE et al., 1988). Atualmente o gênero é composto por mais de 250 espécies catalogadas (KLICH, 2002), e dentre estas muitas são encontradas em matérias orgânicos em decomposição. Dentre as espécies pertencente ao gênero *Aspergillus*, tem-se *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamarii*, dentre outras (IAMANAKA et al., 2010).

Dente as espécies de *Aspergillus* mitoxigênicas, destaca-se os *Aspergillus flavus*, uma espécie contaminante de alimentos, que se desenvolve em temperaturas entre 25 e 30 °C e atividade de água entre 0,80 e 0,99 (PEREIRA et al., 2002). A espécie *A. flavus* é capaz de

produzir aflatoxinas B1 e B2, sendo a primeira mais tóxica, comprovadamente carcinogênica, mutagênica e teragênica (DUARTE-VOGEL et al., 2006). Nesse sentido, é fundamental o controle de *A. flavus*, de tal forma a evitar a síntese de aflatoxinas nos alimentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Óleos essenciais, eugenol e AITC

No presente trabalho foram utilizados óleos essenciais de menta (*Mentha spicata*), de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) e de tomilho (*Thymus vulgaris*), além dos compostos isotiocianato de alila (AITC) e eugenol. Os óleos de menta e tomilho foram obtidos comercialmente da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda. O AITC e o eugenol foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich Co. Para a obtenção do óleo essencial de pimenta longa, foram utilizadas folhas do material vegetal provenientes do município de Rio Branco, Acre.

3.2 Isolado de *Aspergillus flavus*

O isolado *Aspergillus flavus* (CCUB 1405), utilizado no experimento, foi proveniente de amendoim comercial sintomático, isolado em meio de cultura seletivo para *Aspergillus flavus* e *parasiticus* ágar (AFPA). Esse isolado foi caracterizado molecularmente e a sua sequência genética foi depositada em banco de dados Genbank, sob número de acesso CCUB1505. Testes preliminares indicaram que esse isolado é aflatoxigênico.

3.3 Determinação da eficácia dos óleos essenciais, do AITC e do eugenol, no controle de *Aspergillus flavus*

Na determinação da eficácia dos óleos essenciais, do AITC e do eugenol no controle de *Aspergillus flavus*, utilizou-se o meio de cultura *Aspergillus flavus* e *parasiticus* ágar (AFPA). Esse meio de cultura é seletivo e específico, sendo que as colônias de *A. flavus* apresentam cor alaranjada característica.

Inicialmente, os diferentes compostos foram incorporados ao meio de cultura em diferentes concentrações, sendo estas 0 (controle), 100, 400, 700, 1000 µL/L. Os volumes de óleo ou composto foram calculadas em relação ao volume de meio de cultura. Em seguida, as amostras de meio de cultura, com as diferentes concentrações dos diferentes compostos, foram distribuídas em placas de Petri, de diâmetro interno de 54 mm. Então, com auxílio de alfinete entomológico, foi realizada a inoculação de *A. flavus* no centro de cada placa de Petri contendo o meio de cultura, de tal forma que possibilitasse o desenvolvimento de apenas uma colônia por placa.

Depois da etapa de inoculação, as placas foram mantidas a uma temperatura constante de 30 °C, em câmara climática tipo Biochemical Oxygen Demand (B.O.D.). Os diâmetros das

colônias foram medidos em intervalos constantes de 12 horas, até o tempo máximo de 120 horas. Foi possível obter equações de regressão que relacionavam o diâmetro das colônias e tempo de duração dos tratamentos.

3.4 Determinação do percentual de inibição do crescimento micelial

O percentual de inibição do crescimento micelial (ICM, %) foi determinado com os valores estimados obtidos a partir das equações de regressão para 120 h de exposição aos diferentes compostos. Para determinação do ICM, foi utilizada a Equação 1.

$$ICM(\%) = \frac{(D_{cm} - D_{mt}) \times 100}{D_{cm}} \quad (1)$$

Em que:

ICM é a inibição do crescimento micelial (%);

D_{cm} é o diâmetro estimado do controle (0 $\mu\text{L/L}$) depois de 120 h (mm);

D_{ct} é o diâmetro estimado do tratamento depois de 120 h (mm).

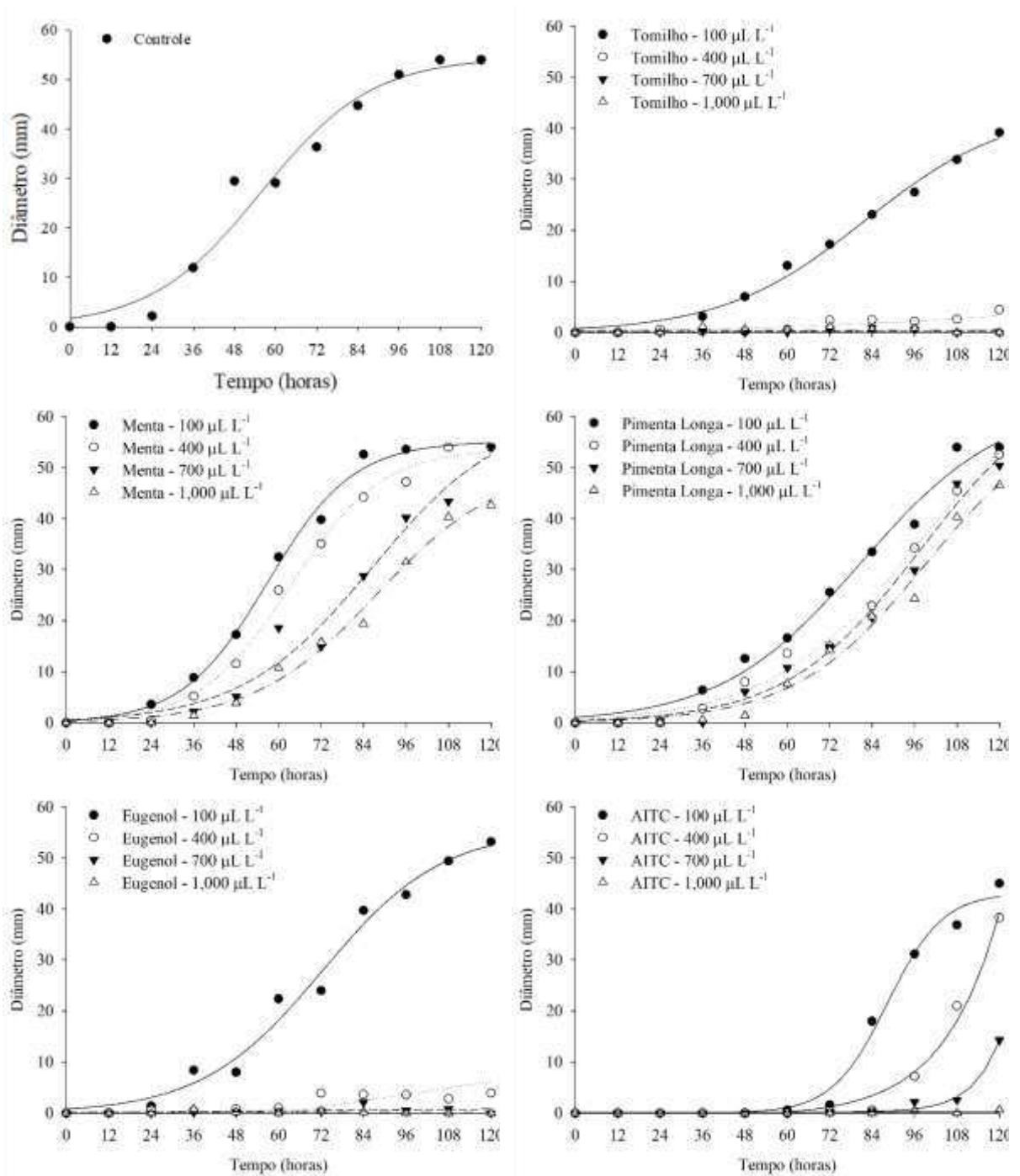
3.5 Delineamento Experimental

Adotou-se delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Para cada tratamento, foram adotadas cinco concentrações, sendo 0 (controle), 100, 400, 700, 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$. Para a plotagem dos gráficos e obtenção das equações de regressão, utilizou-se o software SigmaPlot v.10 (Systat Software Inc., Germany).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apresenta-se, na Figura 1, as curvas de regressão referentes aos diâmetros das colônias de *A. flavus* expostos por contato direto a diferentes concentrações dos óleos essenciais de tomilho, de menta e de pimenta longa e a eugenol e a AITC, durante 120 h.

Figura 1 - Curvas de regressão referentes aos diâmetros de *Aspergillus flavus* expostos por contato direto a diferentes concentrações dos óleos essenciais de tomilho, de menta e de pimenta longa e a eugenol e a AITC, durante 120 horas



Fonte: Autores

Na Tabela 1, são apresentadas as equações de regressão e os respectivos coeficientes de determinação (R^2) e erros padrões da estimativa (EPE). Foi possível o ajuste de modelo sigmoidal de três parâmetros. Salienta-se que os modelos sigmoidais são amplamente utilizados para descrever o crescimento de microrganismos, como por exemplo os fungos (CHANTER, 1984; AUGUSTINE et al., 2015).

Tabela 1 – Equações de regressão e respectivos coeficientes de determinação referentes aos diâmetros de *Aspergillus flavus*, expostos a diferentes concentrações dos óleos essenciais de tomilho, de menta, e de pimenta longa e a eugenol e a AITC, em função do tempo (x), e inibição do crescimento micelial (%) depois de 120 horas, a 30 °C

* Porcentagem da inibição do crescimento micelial, ** Erro padrão da estimativa, *** Coeficiente de determinação

Tratamento	Concentração ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Equações ajustadas	R^{2***}	EPE**	ICM (%)*
Controle	0	$\hat{y} = \frac{54,577}{1 + e^{\left(\frac{-(x - 55,819)}{16,224}\right)}}$	0,97	4,054	-
	100	$\hat{y} = \frac{43,960}{1 + e^{\left(\frac{-(x - 82,075)}{20,283}\right)}}$	0,99	1,397	28,9
Tomilho	400	$\hat{y} = \frac{7,408}{1 + e^{\left(\frac{-(x - 114,132)}{29,082}\right)}}$	0,87	0,587	92,4
	700	-	-	-	100,0
	1.000	-	-	-	100,0
Menta	100	$\hat{y} = \frac{56,163}{1 + e^{\left(\frac{-(x - 56,916)}{12,053}\right)}}$	0,99	1,684	0,0
	400	$\hat{y} = \frac{53,769}{1 + e^{\left(\frac{-(x - 63,327)}{12,805}\right)}}$	0,99	1,757	0,8
	700	$\hat{y} = \frac{61,195}{1 + e^{\left(\frac{-(x - 86,598)}{18,586}\right)}}$	0,98	3,360	2,0
	1.000	$\hat{y} = \frac{50,398}{1 + e^{\left(\frac{-(x - 87,720)}{17,245}\right)}}$	0,99	1,750	18,0

Pimenta longa	100	$\hat{y} = \frac{62,930}{1 + e^{\left(\frac{-(x - 80,939)}{20,002}\right)}}$	0,99	2,658	0,0
	400	$\hat{y} = \frac{72,588}{1 + e^{\left(\frac{-(x - 98,440)}{21,426}\right)}}$	0,99	1,855	0,7
	700	$\hat{y} = \frac{68,400}{1 + e^{\left(\frac{-(x - 97,973)}{19,179}\right)}}$	0,99	2,361	3,0
	1.000	$\hat{y} = \frac{62,113}{1 + e^{\left(\frac{-(x - 99,070)}{18,692}\right)}}$	0,99	2,224	12,6
Eugenol	100	$\hat{y} = \frac{55,657}{1 + e^{\left(\frac{-(x - 72,265)}{17,028}\right)}}$	0,99	2,766	2,0
	400	$\hat{y} = \frac{3,580}{1 + e^{\left(\frac{-(x - 60,213)}{0,224}\right)}}$	0,93	0,499	93,3
	700	-	-	-	100,0
	1.000	-	-	-	100,0
AITC	100	$\hat{y} = \frac{43,182}{1 + e^{\left(\frac{-(x - 88,352)}{7,891}\right)}}$	0,99	1,976	20,7
	400	$\hat{y} = \frac{48,399}{1 + e^{\left(\frac{-(x - 109,915)}{7,590}\right)}}$	0,99	0,388	28,5
	700	$\hat{y} = \frac{9,61 \times 10^9}{1 + e^{\left(\frac{-(x - 268,428)}{8,233}\right)}}$	0,99	0,570	73,5
	1.000	-	-	-	100,0

Fonte: Autores.

É importante mencionar que não houve crescimento de *A. flavus* quando se adotou a concentração de 700 $\mu\text{L L}^{-1}$, para o óleo essencial de tomilho e para eugenol, não sendo possível a obtenção de equações de regressão. Comportamento similar foi observado para o óleo essencial de tomilho e para eugenol e AITC na concentração de 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$.

Quando se utilizou o óleo essencial de tomilho, nas concentrações de 100 e 400 $\mu\text{L L}^{-1}$, os valores estimados referentes ao diâmetro da colônia de *A. flavus* foram equivalentes a 38,1 e 4,1 mm, depois de 120 h, a 30 °C. Esses valores foram inferiores ao obtido no tratamento controle, que foi estimado em 53,6 mm. Com relação ao óleo essencial de menta, os resultados mais expressivos foram obtidos quando se adotou a concentração de 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, depois de 120 h, estimou-se em 43,7 mm o diâmetro das colônias de *A. flavus*. Resultados similares aos

obtidos para o óleo essencial de menta, foram verificados quando se testou o óleo essencial de pimenta-longa. Verificou-se inibição expressiva do crescimento de *A. flavus* somente para a concentração de 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, com diâmetro das colônias estimados em 46,8 mm.

Quanto a efeito do eugenol sobre *A. flavus*, verificou-se crescimento expressivo quando se adotou a concentração de 100 $\mu\text{L L}^{-1}$, com diâmetro das colônias estimados em 52,48 mm. Por outro lado, para a concentração de 400 $\mu\text{L L}^{-1}$, apesar de ter ocorrido crescimento do microrganismo, o diâmetro estimado foi de 3,6 mm. No que tange ao AITC, os diâmetros estimados das colônias de *A. flavus* foram iguais a 42,5, 38,3 e 14,2 mm, para as concentrações de 100, 400 e 700 $\mu\text{L L}^{-1}$.

No que tange o percentual de inibição do crescimento micelial (ICM) (Tabela 1), depois de 120 h de exposição, foram obtidos valores iguais a 28,9, 92,4, 100,00 e 100,00%, para concentrações de óleo essencial de tomilho de 100, 400, 700 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, respectivamente. Entretanto, os valores de ICM para os óleos essenciais de menta e pimenta longa foram inferiores a 20%. Quanto ao eugenol, foram obtidos valores estimados do ICM superiores a 90%, para concentrações iguais ou superiores a 400 $\mu\text{L L}^{-1}$. Com relação ao AITC, destacaram-se as concentrações de 700 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, com valores de ICM iguais a 73,5 e 100,0%, respectivamente.

No presente estudo foi possível determinar a eficácia por contato direto de diferentes óleos essenciais, além de eugenol e AITC, sobre *A. flavus*. Dentre os óleos essenciais, o de tomilho foi o que apresentou maior eficácia no controle de *A. flavus*, com ICM de 100,00, para concentrações de 700 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$. A eficácia do óleo essencial de tomilho pode ser justificada pela sua composição. Dentre os compostos presentes no óleo essencial de tomilho, destaca-se o timol. O timol é capaz de afetar a permeabilidade da membrana celular, o que implica em perda do potencial da membrana, além de interagir com proteínas da membrana celular, por interações hidrofílicas e hidrofóbicas (XU et al., 2008; PASQUA et al., 2010; JAFRI et al., 2019).

Ownagh et al. (2010) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho sobre *A. flavus* e também observaram que esse óleo essencial controla o desenvolvimento desse microrganismo. Resultados similares foram obtidos Zampieri et al. (2016), que obtiveram aumento da eficácia do óleo essencial de tomilho sobre *A. flavus*, à medida que se elevou a concentração. Por outro lado, os óleos essenciais de menta e de pimenta longa foram menos efetivos no controle de *A. flavus*, nas condições adotadas no presente estudo.

Com relação ao óleo essencial de menta, Kedia et al (2014) também observaram que esse óleo essencial não ocasionou inibição completa do desenvolvimento do *A. flavus*. Entretanto, esses autores verificaram que o óleo essencial de menta foi capaz de inibir a produção de aflatoxina B₁. França et al (2018) avaliaram diferentes concentrações de essencial de menta (4000, 6000, 8000 e 10000 µL/L) no controle de *Alternaria alternata*. O maior ICM entrado por esses autores foi de 41,67% para concentração de 10000 µL/L. Dentre os compostos presentes no óleo essencial de menta, tem-se o carvone, definido como agente fungistático para *Penicillium hirsutum*, por Smid et al. (1995), o que corrobora com os resultados no presente estudo para a concentração de 1.000 µL/L.

No que se refere ao óleo essencial de pimenta longa, os resultados obtidos no presente estudo são semelhantes aos obtidos por Giviziez et al. (2011), que determinaram a eficácia do óleo essencial de pimenta longa sobre espécies de bactérias e de fungos, dentre eles o *A. flavus*. Os autores não obtiveram resultados satisfatórios no controle do fungo. Por outro lado, outros autores obtiveram resultados satisfatórios no controle de *Alternaria alternata* com óleo essencial de pimenta longa na concentração de 912 µL/L (NASCIMENTO et al., 2008). Zacaroni et al. (2009) também obtiveram resultados satisfatório com óleo essencial de pimenta longa na contração de 912 µL/L, no controle de *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

Com relação ao eugenol, composto majoritário do cravo, verificou-se que é mais eficiente no controle de *A. flavus* por contato direto que o AITC, obtido da mostarda. Para o eugenol, verificou-se inibição parcial nas concentrações de 100 e 400 µL L⁻¹. Jahanshiri et al (2015) adotaram diferentes concentrações de eugenol (14,7, 29,5, 59, 118, 236 e 472 µL/L) no controle de *Aspergillus parasiticus*. Esses autores observaram aumento da eficácia do eugenol no controle de *A. parasiticus* à medida que se elevou a concentração. Maior ICM (95,83%) foi obtido quando adotada a concentração de 472 µL/L, resultado similar ao obtido no presente estudo quando se testou a concentração de 400 µL L⁻¹ (93,3%) (Tabela 1).

Abbaszadeh et al. (2014) também verificaram aumento da eficácia do eugenol no controle de *A. flavus* à medida que elevou a concentração. No que se refere a inibição total de *A. flavus*, nas concentrações de eugenol de 700 e 1.000 µL/L, outros autores também obtiveram resultados similares (BILGRAMI et al., 1992; LÓPEZ-MALO et al., 2005; TRAJANO et al., 2012). É importante destacar que além da capacidade do eugenol de inibir parcialmente ou totalmente os fungos, ele é capaz inibir a produção de toxinas por *A. flavus* (LIANG et al., 2015) e por *A. parasiticus* (JAHANSHIRI et al., 2015).

No que diz respeito ao AITC, os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os obtidos por outros autores, em que a eficácia desse composto no controle de microrganismos aumenta à medida que se eleva a concentração (HEREYAMA et al., 2019). Manyes et al. (2015) inibiram completamente o crescimento de *Aspergillus parasiticus* com AITC por contato direto, na concentração mínima que testaram de 50000 µL/L. Da mesma forma que o autor de presente trabalho, outros autores observaram inibição total ou parcial de *Fusarium verticillioides*, *A. flavus* e *A. parasiticus* em decorrência da exposição ao AITC (NAZARETH et al., 2018; DE MELO NAZARETH et al., 2020).

Estudos posteriores são necessários para o aprimoramento da utilização do óleo essencial de tomilho, do eugenol e do AITC no controle de *A. flavus*. Uma alternativa promissora é a realização de testes não mais em meios de cultura, mas sim sobre a superfície de alimentos comumente atacados por *A. flavus*.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nas condições adotadas no presente estudo, é possível concluir que:

1. Os óleos essenciais de tomilho, de menta e de pimenta longa, o eugenol e o AITC são capazes de inibir o crescimento de *A. flavus* por contato direto.
2. O óleo essencial de tomilho é mais eficiente no controle de *A. flavus* que os óleos essenciais de menta e de pimenta longa quando aplicado por contato direto.
3. O eugenol é mais eficiente que o AITC no controle de *A. flavus*, nas concentrações de 400 e 700 $\mu\text{L L}^{-1}$, quando aplicado por contato direto.
4. O óleo essencial de tomilho, assim como o eugenol e o AITC demonstraram-se promissores no controle de *A. flavus* por contato direto.

6 REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, S. et al. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 24, n. 2, p. e51-e56, 2014.
- AFFONSO, R. S. et al. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012.
- ALBIERO, A. L. M. et al. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper crassinervium* HB & K. (Piperaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 2, p. 305-312, 2005.
- ANDRÉS, M. F. et al. Biocidal effects of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil and synergism among its main components. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1086-1092, 2017.
- AOUDOU, Yaouba et al. Inhibition of fungal development in maize grains under storage condition by essential oils. **International Journal of Biosciences (IJB)**, v. 2, n. 6, p. 41-48, 2012.
- AUGUSTINE, A. et al. Growth kinetic profiles of *Aspergillus niger* S14 a mangrove isolate and *Aspergillus oryzae* NCIM 1212 in solid state fermentation. **Indian Journal of Fisheries**, v. 62, n. 3, p. 100-106, 2015.
- BANSOD, S.; RAI, M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. **World Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 81-88, 2008.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARBOSA, E. de J. S. Extração de Óleos Essenciais para Aplicação como Biopesticidas—Estratégias de Prevenção da Contaminação Ambiental. **Repositório aberto**, U. PORTO. 2018.
- BASAK, S.; GUHA, P.. Use of predictive model to describe sporocidal and cell viability efficacy of betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil on *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* and its antifungal activity in raw apple juice. **LWT**, v. 80, p. 510-516, 2017.
- BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. (Ed.). **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. CRC press, 2015.
- BILGRAMI, K. S.; SINHA, K. K.; SINHA, A. K. Inhibition of aflatoxin production & growth of *Aspergillus flavus* by eugenol & onion & garlic extracts. **The Indian journal of medical research**, v. 96, p. 171-175, 1992.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BORDINI, J. G. et al. Impacto das Fumonisinias, aflatoxinas e ocratoxina a na avicultura. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 1, p. 68-88, 2013.

BOSSCHE, H. V. et al. Estudos de modo de ação: bases para a busca de novos antifúngicos. **Anais da Academia de Ciências de Nova York**, v. 544, n. 1, pág. 191-207, 1988.

BRASIL; BRASIL. Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional-SISAN com vistas em assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, v. 143, n. 179, 2006.

BRASIL. Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União** Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011.

CAMPANIELLO, D.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M. Antifungal activity of eugenol against *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 6, p. 1124-1128, 2010.

CHANTER, D. O. curtailed sigmoid dose-response models for fungicide experiments. **Journal of Applied Statistics**, v. 11, n. 1, p. 2-11, 1984.

CORRÊA JÚNIOR, C.; SCHEFFER, M. C. As plantas medicinais, aromáticas e condimentares e a agricultura familiar. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 376-376, 2014.

CÔRTEZ, P. L.; DO AMARAL MORETTI, Sergio Luiz. Consumo verde: um estudo transcultural sobre crenças, preocupações e atitudes ambientais. **Revista Brasileira de Marketing**, v. 12, n. 3, p. 45-76, 2013.

DE MEDEIROS, E. V.; JÚNIOR, R. S.; MICHEREFF, S. J. Eficiência de fungicidas no controle “in vitro” de *Monosporascus cannonballus*. **Revista Caatinga**, v. 19, n. 4, 2006.

DE MELO NAZARETH, T. et al. Effect of allyl isothiocyanate on transcriptional profile, aflatoxin synthesis, and *Aspergillus flavus* growth. **Food Research International**, v. 128, p. 108786, 2020.

DE OLIVEIRA RIBEIRO, R. et al. Consequências Da Ingestão De Alimentos Contaminados: Uma Revisão De Literatura. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 9, n. 2, 2019.

DE SOUSA BARROS, A. et al. Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 557-564, 2015.

DE SOUZA, L. P. et al. Toxicity and sublethal effects of allyl isothiocyanate to *Sitophilus zeamais* on population development and walking behavior. **Journal of Pest Science**, v. 91, n. 2, p. 761-770, 2018.

DUARTE-VOGEL, S.; VILLAMIL-JIMÉNEZ, L. C. Micotoxinas en la salud pública. **Revista de salud publica**, v. 8, p. 129-135, 2006.

DUKE, J. A. (Ed.). **CRC handbook of medicinal spices**. CRC press, 2002.

ESTRELA, J. L. V. et al. Toxicity of essential oils of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* against *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 217-222, 2006.

FARONI, L. R. D. Fatores que influenciam a qualidade dos grãos armazenados. **Postcosecha**, v. 5, p. 34-41, 1998.

FLEURAT-LESSARD, F. Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins—An update. **Journal of Stored Products Research**, v. 71, p. 22-40, 2017.

FIRENZUOLI, Fabio et al. Essential oils: new perspectives in human health and wellness. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol.2-4, 2014.

FRANÇA, K. R. S. et al. In vitro effect of essential oil of peppermint (*Mentha x piperita* L.) on the mycelial growth of *Alternaria alternata*. **Journal of Experimental Agriculture International**, p. 1-7, 2018.

FREIRE, F. das C. O. et al. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. **Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical**, v. 48, 2007.

FREITAS-SILVA, O.; MORALES-VALLE, H.; VENÂNCIO, A. Potential of aqueous ozone to control aflatoxigenic fungi in Brazil nuts. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, 2013.

GARCÍA-DÍAZ, M. et al. A novel niosome-encapsulated essential oil formulation to prevent *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin contamination of maize grains during storage. **Toxins**, v. 11, n. 11, p. 646, 2019.

GIVIZIEZ, C. R. et al. Biocidal potential of essential oils of *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* and *Syzygium aromaticum* on important pathogenic and toxigenic microorganisms important for food. In: **Microorganisms In Industry And Environment: From Scientific and Industrial Research to Consumer Products**. 2011. p. 291-293.

GOVINDARAJAN, M. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. **Parasitology research**, v. 110, n. 5, p. 2023-2032, 2012.

GULLUCE, M. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1449-1456, 2007.

HAREYAMA, Y. et al. Efeitos comparativos de isotiocianatos de alila e metila na produção de aflatoxina e no crescimento de *Aspergillus flavus*. **JSM Mycotoxins**, v. 69, n. 2, pág. 81-83, 2019.

IAMANAKA, B. T. et al. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 7, p. 138-161, 2010.

JAFRI, H. et al. Prospects of essential oils in controlling pathogenic biofilm. In: **New look to phytomedicine**. Academic Press, 2019. p. 203-236.

JAHANSHIRI, Z. et al. Inhibitory effect of eugenol on aflatoxin B 1 production in *Aspergillus parasiticus* by downregulating the expression of major genes in the toxin biosynthetic pathway. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 7, p. 1071-1078, 2015.

JAKIEMIU, E. A. R. et al. Estudo da composição e do rendimento do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 683-688, 2010.

KEDIA, A. et al. Antifungal, antiaflatoxigenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 89, p. 29-36, 2014.

KEE, L. et al. Bioactivity and health effects of *Mentha spicata*. **Integrative Food, Nutrition and metabolism**. p. 1-2, 2017.

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

KOHIYAMA, C. Y. et al. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1006-1010, 2015.

KONG, Jie et al. Antifungal effects of thymol and salicylic acid on cell membrane and mitochondria of *Rhizopus stolonifer* and their application in postharvest preservation of tomatoes. **Food chemistry**, v. 285, p. 380-388, 2019.

KUMAR, A. et al. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 9, n. 4, p. 575-580, 2008.

KUMAR, U. et al. Antimicrobial Activity of Essential Oils Against Plant Pathogenic Fungi: A Review. **International Journal of Inclusive Development**, v. 1, n. 6, p. 37-44, 2020

LIANG, D. et al. Inhibitory effect of cinnamaldehyde, citral, and eugenol on aflatoxin biosynthetic gene expression and aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus*. **Journal of food science**, v. 80, n. 12, p. M2917-M2924, 2015.

LIN, C. et al. Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate. **Journal of food protection**, v. 63, n. 6, p. 727-734, 2000.

LÓPEZ-MALO, A et al. *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 2, p. 119-128, 2005.

MADIGAN, M. T. et al. Microbiologia de Brock-14ª Edição. **Artmed Editora**, 2016.

MAIA, T. F.; DONATO, A.; FRAGA, Marcelo Elias. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, n. 1, p. 105-116, 2015.

MAGAN, N.; OLSEN, M. (Ed.). **Mycotoxins in food: detection and control**. Woodhead Publishing, 2004.

MANYES, L. et al. In vitro antifungal activity of allyl isothiocyanate (AITC) against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum* and evaluation of the AITC estimated daily intake. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 293-299, 2015.

MARANGONI, C.; DE MOURA, N. F.; GARCIA, F. R. M.. Utilização De Óleos Essenciais E Extratos De Plantas No Controle De Insetos. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 6, n. 2, p. 92-112, 2013.

MARCHESE, A. et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 668-689, 2017.

MATASYOH, J. C. et al. Chemical composition and antifungal activity of *Piper capense* oil against mycotoxigenic *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 7, n. 4, p. 1441-1451, 2013.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. Dos S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista brasileira de produtos agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.

MEJIA-GARIBAY, B. et al. Composition, diffusion, and antifungal activity of black mustard (*Brassica nigra*) essential oil when applied by direct addition or vapor phase contact. **Journal of food protection**, v. 78, n. 4, p. 843-848, 2015.

MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento 5. ed. **Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS-UFSC**, 2004.

MOAZENI, M. et al. In vitro Antifungal Activity of *Thymus vulgaris* Essential Oil nanoemulsion. **Journal of Herbal Medicine**, p. 100452, 2021.

MOHAPATRA, D. et al. Critical factors responsible for fungi growth in stored food grains and non-Chemical approaches for their control. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 162-182, 2017.

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

MORETTIN, P. A.; BUSSAB, W. O. Estatística básica. **Saraiva Educação SA**, 2017.

MUÑOZ CASTELLANOS, L. et al. In vitro and in vivo antifungal activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) and pepper (*Piper nigrum* L.) essential oils and functional extracts against *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus niger* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **International journal of microbiology**, v. 2020, 2020.

NASCIMENTO, F. R. et al. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **Acta Amazonica**, v. 38, n. 3, p. 503-508, 2008.

- NAZARETH, T. M. et al. Evaluation of gaseous allyl isothiocyanate against the growth of mycotoxigenic fungi and mycotoxin production in corn stored for 6 months. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 14, p. 5235-5241, 2018.
- NAZZARO, F. et al. Essential oils and antifungal activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 86, 2017.
- NETO, F. C.; SIMÕES, M. T. F. As Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares da Terra Fria Transmontana. **Bragança: DRAP-Norte**. 2016
- NIETO, G. Biological activities of three essential oils of the Lamiaceae family. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 63, 2017.
- NUNES, J. D. et al. Cytogenetics of *Piper hispidinervum* and *Piper aduncum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 7, p. 1049-1052, 2007.
- OOTANI, M. A. et al. Use of essential oils in agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-175, 2013.
- OWNAGH, A O et al. Antifungal effects of thyme, agastache and satureja essential oils on *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani*. In: **Veterinary Research Forum**. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, 2010. p. 99-105.
- PASQUA, R. et al. Alterações no proteoma de *Salmonella enterica* sorovar Thompson como adaptação ao estresse a concentrações subletais de timol. **Proteômica**, v. 10, n. 5, pag. 1040-1049, 2010.
- PASTER, N. et al. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 1, p. 81-85, 1995.
- PAVELA, R.; SEDLÁK, P. Post-application temperature as a factor influencing the insecticidal activity of essential oil from *Thymus vulgaris*. **Industrial Crops and Products**, v. 113, p. 46-49, 2018.
- PEREIRA, L. A. A. et al. Fungitoxicidade in vitro de iprodione sobre o crescimento micelial de fungos que se associam a sementes de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 67-70, 2002.
- PEREIRA, M. M. G. et al. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 1, 2002.
- PEREIRA, R.; DOS SANTOS, O. G. Plantas condimentares: cultivo e utilização. **Embrapa Agroindústria Tropical-Documentos (INFOTECA-E)**, 2013.
- PEZZI, E. O uso do ozônio como sanitizante em pós-colheita de produtos agrícolas. **LUME repositório digital**. UFRGS. 2010.
- PRATES, L. H. F. et al. Eugenol diffusion coefficient and its potential to control *Sitophilus zeamais* in rice. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

TARAZONA, A. et al. Risk management of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in maize grains by bioactive EVOH films containing individual components of some essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 269, p. 107-119, 2018.

TARIQ, S. et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 134, p. 103580, 2019.

THOMPSON, D. P. Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. **Mycologia**, v. 81, n. 1, p. 151-153, 1989.

TRANCOSO, M. D. Projeto Óleos Essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano. **Revista Práxis**, v. 5, n. 9, 2013.

REYES-JURADO, Fatima et al. Antimicrobial activity of Mexican oregano (*Lippia berlandieri*), thyme (*Thymus vulgaris*), and mustard (*Brassica nigra*) essential oils in gaseous phase. **Industrial Crops and Products**, v. 131, p. 90-95, 2019.

RIDWAN, R. D.; SIDARNINGSIH, U. W. The Anti-Bacterial Activity of Gingival Mucoadhesive Patch from *Thymus vulgaris* Essential Oil towards *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Fusobacterium nucleatum*. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 14, n. 2, p. 645-649, 2021.

SANTOS, A. S. et al. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Embrapa Amazônia Oriental- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2004.

SANTOS, N. P. dos. Theodoro Peckolt: a produção científica de um pioneiro da fitoquímica no Brasil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 12, n. 2, p. 515-533, 2005.

SASTRI, B. N. The wealth of India, raw materials. **CSIR, New Delhi**, v. 6, p. 439, 1962.

SAROJ, A. et al. Phytochemicals of plant-derived essential oils: A novel green approach against pests. In: **Natural remedies for pest, disease and weed control**. Academic Press, 2020. p. 65-79.

SHABNUM, S.; WAGAY, M. G. Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses. **Journal of Research and Development**, v. 11, p. 83-94, 2011.

SHAHBAZI, Y. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Mentha spicata* essential oil against common food-borne pathogenic bacteria. **Journal of Pathogens**, v. 2015, 2015.

SIL, A. et al. Essential oils: A boon towards eco-friendly management of phytopathogenic fungi. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 8, p. 1884-1891, 2020.

SILVA, E. et al. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 22, n. 2, p. 117-124, 1999.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016.

SMID, E. J. et al. Secondary plant metabolites as control agents of postharvest *Penicillium* rot on tulip bulbs. **Postharvest Biology and Technology**, v. 6, n. 3-4, p. 303-312, 1995.

SOARES, M. A. et al. Controle biológico de pragas em armazenamento: uma alternativa para reduzir o uso de agrotóxicos no Brasil?. **Unimontes Científica**, v. 11, n. 1/2, p. 52-59, 2011.

SOLIS, J. B. et al. Current status of the effectiveness of essential oils for controlling phytopathogenic fungi, a review. **Acta Agrícola y Pecuaria**, v. 6, n. 1, 2020.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. DW. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International journal of food microbiology**, v. 43, n. 3, p. 141-158, 1998.

TRAJANO, V. N. et al. Antifungal activity of the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* Blume and eugenol on *Aspergillus flavus*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 15, n. 5, p. 785-793, 2012.

WU, F. Global impacts of aflatoxin in maize: trade and human health. **World Mycotoxin Journal**, v. 8, n. 2, p. 137-142, 2015.

XU, J. et al. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 174-179, 2008.

ZACARONI, L. M. et al. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta amazônica**, v. 39, n. 1, p. 193-197, 2009.

ZAMPIERI, N. S. et al. Efeito do óleo essencial de tomilho sobre o fungo *Aspergillus flavus*. **VEAIC Jr.** 2016.