

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
ESCOLA DE ENGENHARIA INDUSTRIAL METALÚRGICA DE VOLTA REDONDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL

LEONARDO DOS SANTOS MARIA

AVALIAÇÃO DO USO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Mentha spicata* L. E *Citrus aurantium* L. subesp. *dulcis* COMO ALTERNATIVA NATURAL NO CONTROLE DE FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* EM GRÃOS DE MILHO (*Zea mays* L.)
ARMAZENADOS

VOLTA REDONDA
2017

LEONARDO DOS SANTOS MARIA

AVALIAÇÃO DO USO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Mentha spicata* L. E *Citrus aurantium* L. subesp. *dulcis* COMO ALTERNATIVA NATURAL NO CONTROLE DE FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* EM GRÃOS DE MILHO (*Zea mays* L.)
ARMAZENADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Paula Martinazzo
Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo de Souza Teodoro

VOLTA REDONDA, RJ
2017

M332 Maria, Leonardo dos Santos.

Avaliação do uso dos óleos essenciais de *Mentha spicata* L. e *Citrus aurantium* L. subesp. *dulcis* como alternativa natural no controle de fungos do gênero *Aspergillus* em grãos de milho (*Zea mays* L.) armazenados / Leonardo dos Santos Maria - Volta Redonda, 2017.

74 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal Fluminense.

Orientadora: Ana Paula Martinazzo.

Co-orientador: Carlos Eduardo de Souza Teodoro.

1. Fungos na agricultura. 2. *Aspergillus brasiliensis*. 3. *Aspergillus flavus*. 4. Biofungicida. I. Martinazzo, Ana Paula. II. Teodoro, Carlos Eduardo de Souza. III. Título.

CDD 632.4

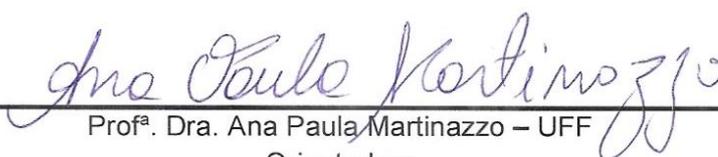
LEONARDO DOS SANTOS MARIA

AVALIAÇÃO DO USO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Mentha spicata* L. E *Citrus aurantium* L. subesp. *dulcis* COMO ALTERNATIVA NATURAL NO CONTROLE DE FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* EM GRÃOS DE MILHO (*Zea mays* L.)
ARMAZENADOS

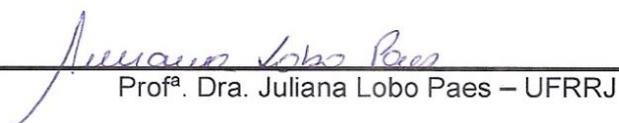
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental

Aprovada em 23 de outubro de 2017.

BANCA EXAMINADORA


Profª. Dra. Ana Paula Martinazzo – UFF
Orientadora


Profª. Dra. Nathália Ramos de Melo – UFF


Profª. Dra. Juliana Lobo Paes – UFRRJ

VOLTA REDONDA, RJ
2017

Dedico este trabalho a todos aqueles que se empenham em garantir às futuras gerações um Meio Ambiente ecologicamente equilibrado.

AGRADECIMENTOS

A vida, assim como a Natureza, é feita de ciclos. A exemplo dos seres vivos, que ao final de sua existência se transformarão em nutrientes, os quais, por sua vez, alimentarão e darão continuidade a outros magníficos ciclos vitais. E é assim que quero me lembrar deste período, agora que se encerra meu ciclo na Cidade do Aço.

Há quase 8 anos, eu chegava aqui como calouro, cheio de dúvidas em relação ao futuro. Além de Engenheiro, hoje saio Mestre, convicto de que fiz as melhores escolhas possíveis. Quero agradecer, neste espaço, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma nesta empreitada.

À minha mãe Wanda, meu exemplo maior de garra e determinação, e aos meus tios, Lourdes e Silvio, minha base e meus valores, pelo incentivo constante e pelo apoio irrestrito. Aos meus tios e primos, aqueles que sempre torceram pelo meu sucesso. Às minhas avós, Hilda e Regina (*in memoriam*), que sempre se lembraram de mim em suas orações.

À minha orientadora, Professora Ana Paula, que acompanhou minha evolução ao longo de toda graduação, e agora foi presença constante no Mestrado. Agradeço pelo suporte, não só de âmbito acadêmico neste projeto especificamente, mas por toda ajuda ao longo destes anos. Agradeço pelas conversas, pelos conselhos e até pelos puxões de orelha, daí. Parte do profissional, e do ser humano que sou, se deve a você!

Ao meu co-orientador, Professor Carlos Eduardo, pelos ensinamentos e pela paciência, e ao técnico Mateus pela ajuda, ao longo de todo o experimento.

As professoras Nathália (*que me acompanhou desde os primeiros passos; e agora, tenho certeza que está cheia de orgulho, por me ver caminhar com minhas próprias pernas*) e Juliana, pelas excelentes contribuições ao presente trabalho.

Aos coordenadores do PGTA, professores Fabiana e Wellington, e a secretária Karine, agradeço de forma especial, por se mostrarem solícitos em todas as ocasiões que foi necessário. Aos professores do PGTA, pelos ensinamentos. Aos funcionários da UFF, pelo convívio.

Aos colegas das diversas turmas do PGTA, que tive a grata oportunidade de conviver ao longo destes anos, em especial a Lundo, minha companheira de pesquisa, que se tornou minha amiga, quem dividiu comigo as alegrias e as angústias deste período.

À PROAES/UFF pela oportunidade de participar do Programa de Altos Estudos, e pelo auxílio financeiro concedido.

Aos alunos de IC que me auxiliaram em algum momento neste projeto, agradeço imensamente: Ronald, Filipe, Ítalo, Rodrigo, Gabriel, Renie, Marina e Patrícia. E também a Ana Laura, Jonatas, Victor, Natália e Yago. À Sabrina, que merece um agradecimento especial, pois foi meu braço direito durante o experimento. Mais que ensinar a ela, eu também aprendi muito. Aprendi, que quando se ama o que se faz, não existe cansaço ou fome que atrapalhem. Sua perseverança e comprometimento diário com as atividades, me deixaram orgulhoso. Nem se eu escrevesse 10⁶ vezes “Muito Obrigado”, seria suficiente para lhe agradecer!

Aos meus amigos, antigos e novos, por estarem ao meu lado em todas as ocasiões e pela torcida de sempre.

À Deus, que me conduziu até aqui e me amparou nos momentos mais difíceis ao longo de todos estes anos, agradeço por toda a bondade que tem manifestado em minha vida. *“Porque dEle, por Ele, para Ele são todas as coisas”* (Rm. 11:36).

À todos que contribuíram de maneira direta e indireta a realização deste trabalho, o meu sincero muito obrigado!

“Havia, ali, um estranho silêncio. Os pássaros, por exemplo – para onde é que tinham ido? Aquela era uma primavera sem vozes. (...) Nenhuma obra de feitiçaria, nenhuma ação de inimigo, havia silenciado o renascer de uma nova vida naquele mundo golpeado pela morte. As próprias pessoas haviam feito isso.”

(Rachel Carson)

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

(Eleanor Roosevelt)

RESUMO

A produção agrícola mundial passa por um grande desafio: alimentar um contingente populacional crescente a cada dia. O aumento da produção pode se dar de duas formas: via aumento de área cultivada ou via aumento da produtividade. Ampliar a área de cultivo, hoje não é visto com bons olhos, pois se preconiza a conservação dos recursos naturais e o desenvolvimento sustentável. A saída é então elevar-se a produtividade, o que também pode ser feito reduzindo-se as perdas ao longo das cadeias produtivas. Os grãos representam as principais fontes alimentares para os seres humanos, seja indiretamente, pelo consumo de animais que foram alimentados com os mesmos, ou pelo seu consumo direto e de seus derivados. Um dos fatores que compromete a qualidade dos grãos, acarretando perdas, é o desenvolvimento de fungos durante o armazenamento. Esses fungos podem produzir substâncias nocivas aos seres humanos e aos animais que consomem produtos contaminados, estas são denominadas micotoxinas, o que faz do seu controle uma preocupação tanto do ponto de vista econômico, quanto de saúde pública. Nesse sentido, os óleos essenciais surgem como uma alternativa natural para o controle desses fungos, em detrimento dos fungicidas sintéticos, amplamente utilizados na atualidade. Esse trabalho objetivou avaliar o efeito inibitório dos óleos essenciais (OE) de laranja-doce (*Citrus aurantium* L. subesp. *dulcis*) e hortelã (*Mentha spicata* L.) no desenvolvimento de fungos das espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus brasiliensis* em grãos de milho armazenado, para propor uma tecnologia ambiental para o controle fúngico. Realizou-se a identificação dos principais componentes dos OE, por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, constatando que o Limoneno e a Carvona foram os principais compostos encontrados no OE de *M. spicata*, e no OE de *C. aurantium* o componente majoritário foi o Limoneno. Foram realizados também testes *in vitro*, por difusão em ágar, com as dosagens 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 $\mu\text{L/mL}$ de OE de *M. spicata*, e 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10 $\mu\text{L/mL}$ de OE de *C. aurantium*, avaliando a atividade antifúngica no decorrer do tempo, sendo utilizado o Teste de Scott-Knott a 5% de significância para análise dos resultados. O OE de *M. spicata* se mostrou mais eficiente que o OE de *C. aurantium*, uma vez que em dosagens 2,0 $\mu\text{L/mL}$ para o *A. flavus* e 2,5 $\mu\text{L/mL}$ para o *A. brasiliensis* já houve completa inibição, enquanto para o OE de *C. aurantium* para os mesmos microrganismos constatou-se inibições inferiores a 50% ao fim do experimento. Foram realizados testes *in vivo* em grãos de milho, previamente contaminados, simulando condições de armazenamento, com o OE de *M. spicata* (1,25, 2,50 e 5,00 $\mu\text{L/mL}$), verificando-se uma maior inibição do *A. flavus*, frente ao *A. brasiliensis*. A aplicação do OE de *M. spicata*, no que tange a produção de aflatoxinas totais, se mostrou eficaz para o *A. brasiliensis* até a dosagem 2,5 $\mu\text{L/mL}$, enquanto que para o *A. flavus* não se observou diferença estatística significativa entre as dosagens do OE.

Palavras-chave: *Aspergillus brasiliensis*; *Aspergillus flavus*; Biofungicida; Hortelã; Laranja-doce; Tecnologia Ambiental.

ABSTRACT

World agriculture faces a major challenge: to feed a growing population every day. Increase in production can occur in two ways: either by increasing the cultivated area or by increasing yields. Expanding the cultivation area is currently not considered a good alternative, because strong public concern seeks to promote the conservation of natural resources and sustainable development. The answer is then to raise yields, which can also be done by reducing the losses along the productive chains. Grains are among the main food sources for humans, either indirectly, by the consumption of grain-fed animals or by their direct consumption and their derivatives. The development of fungi during grain storage compromises the quality of grains and leads to losses. Fungi can produce harmful mycotoxins to humans and animals that consume contaminated products, and controlling these substances concerns both the economic and public health sectors. In this context, essential oils appear as a natural fungal control alternative to the widely used synthetic fungicides. The objective of this study was to evaluate the inhibitory effect of essential oils (EO) extracted from sweet orange (*Citrus aurantium* L. subsp. *dulcis*) and mint (*Mentha spicata* L.) on the development of the fungal species *Aspergillus flavus* and *Aspergillus brasiliensis* in stored maize grains, aiming to propose an environmental technology for fungal control. Analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry identified that Limonene and Carvone were the main compounds in the *M. spicata* EO and Limonene was the main compound in the *C. aurantium* EO. *In vitro* tests were performed using agar diffusion with the concentrations of 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; and 3.0 $\mu\text{L/mL}$ of *M. spicata* EO, and 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 4.0; 6.0; 8.0; and 10 $\mu\text{L/mL}$ of *C. aurantium* EO to evaluate antifungal activity over time. The results were analyzed by the Scott-Knott's test at 5% significance level. The EO of *M. spicata* was more efficient than the OE of *C. aurantium*, since there was complete growth inhibition of *A. flavus* at 2.0 $\mu\text{L/mL}$ and of *A. brasiliensis* at 2.5 $\mu\text{L/mL}$, while the EO of *C. aurantium* showed inhibitions of the same microorganisms below 50% at the end of the experiment. *In vivo* tests with *M. spicata* EO (1.25; 2.50; and 5.00 $\mu\text{L/mL}$) performed on maize grains, previously contaminated, simulating storage conditions, showed higher inhibition of *A. flavus* than of *A. brasiliensis*. The application of *M. spicata* EO, regarding the production of total aflatoxins, was effective against *A. brasiliensis* up to 2.5 $\mu\text{L/mL}$, whereas no significant difference was found between the EO concentrations against *A. flavus*.

Keywords: *Aspergillus brasiliensis*; *Aspergillus flavus*; Biofungicide; Mint; Sweet-orange; Environmental Technology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Estrutura química da Carvona.....	30
Figura 02. Estrutura química do Limoneno.....	32
Figura 03. Cromatograma do óleo essencial de <i>M. spicata</i>	39
Figura 04. Cromatograma do óleo essencial de <i>C. aurantium</i>	41
Figura 05. Crescimento micelial médio (mm) diário do <i>A. brasiliensis</i> segundo cada dosagem ($\mu\text{L/mL}$) aplicada do OE de <i>M. spicata</i>	42
Figura 06. Crescimento micelial médio (mm) diário do <i>A. flavus</i> segundo cada dosagem ($\mu\text{L/mL}$) aplicada do OE de <i>M. spicata</i>	45
Figura 07. Crescimento micelial médio (mm) diário do <i>A. brasiliensis</i> segundo cada dosagem ($\mu\text{L/mL}$) aplicada do OE de <i>C. aurantium</i>	48
Figura 08. Crescimento micelial médio (mm) diário do <i>A. flavus</i> segundo cada dosagem ($\mu\text{L/mL}$) aplicada do OE de <i>C. aurantium</i>	51
Figura 09. Curva analítica de leitura dos valores de absorvância e correlação com os teores totais de aflatoxinas do teste de ELISA para o <i>A. brasiliensis</i>	58
Figura 10. Curva analítica de leitura dos valores de absorvância e correlação com os teores totais de aflatoxinas do teste de ELISA para o <i>A. flavus</i>	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Limites Máximos Tolerados (LMT) de Micotoxinas para algumas classes de alimentos segundo a RDC nº 7/2011	23
Tabela 02. Principais componentes do óleo essencial (OE) de <i>M. spicata</i> determinados por CG-EM.....	39
Tabela 03. Comparação dos principais componentes do OE de <i>M. spicata</i> , identificados neste trabalho, em relação a outros trabalhos.....	40
Tabela 04. Principais componentes do OE de <i>C. aurantium</i> determinados por CG-EM	41
Tabela 05. Comparação dos principais componentes do OE de <i>C. aurantium</i> , identificados neste trabalho, em relação a outros trabalhos.....	42
Tabela 06. Resumo da ANOVA dos dados obtidos do efeito do OE de <i>M. spicata</i> , durante o período de incubação (dias), sobre o crescimento micelial do fungo <i>A. brasiliensis</i>	43
Tabela 07. Inibição média percentual, <i>in vitro</i> , no crescimento do fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> em diferentes doses ($\mu\text{L}/\text{mL}$) de OE de <i>Mentha spicata</i>	43
Tabela 08. Resumo da ANOVA dos dados obtidos do efeito do OE de <i>M. spicata</i> , durante o período de incubação (dias), sobre o crescimento micelial do fungo <i>A. flavus</i>	45
Tabela 09. Inibição média percentual, <i>in vitro</i> , no crescimento do fungo <i>A. flavus</i> em diferentes doses ($\mu\text{L}/\text{mL}$) de OE de <i>M. spicata</i>	46
Tabela 10. Resumo da ANOVA dos dados obtidos do efeito do OE de <i>C.aurantium</i> , durante o período de incubação (dias), sobre o crescimento micelial do fungo <i>A. brasiliensis</i>	49
Tabela 11. Inibição média percentual, <i>in vitro</i> , no crescimento do fungo <i>A. brasiliensis</i> em diferentes doses ($\mu\text{L}/\text{mL}$) de OE de <i>C. aurantium</i>	50
Tabela 12. Resumo da ANOVA dos dados obtidos do efeito do OE de <i>C. aurantium</i> , durante o período de incubação (dias), sobre o crescimento micelial do fungo <i>A. flavus</i>	52
Tabela 13. Inibição média percentual, <i>in vitro</i> , no crescimento do fungo <i>A. flavus</i> em diferentes doses ($\mu\text{L}/\text{mL}$) de OE de <i>C. aurantium</i>	52
Tabela 14. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do OE de <i>M. spicata</i> , durante o período de armazenagem (dias) sobre o número de colônias do fungo <i>A. brasiliensis</i> nos grãos de milho.	55
Tabela 15. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do OE de <i>M. spicata</i> , durante o período de armazenagem (dias) sobre o número de colônias do fungo <i>A. flavus</i> nos grãos de milho.	55

Tabela 16. Inibição percentual média do desenvolvimento do fungo <i>A. brasiliensis</i> em grãos de milho para diferentes doses do OE de <i>M. spicata</i> e períodos de armazenamento.....	56
Tabela 17. Inibição percentual média do desenvolvimento do fungo <i>A. flavus</i> em grãos de milho para diferentes doses do OE de <i>M. spicata</i> e períodos de armazenamento.....	56
Tabela 18. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do OE de <i>M. spicata</i> , durante o período de armazenagem (30 dias) sobre a produção de aflatoxinas totais nos fungos <i>A. brasiliensis</i> e <i>A. flavus</i>	60
Tabela 19. Teores de Aflatoxinas Totais (ppb) aferidos em grãos de milho, armazenados sob diferentes dosagens de OE de <i>M. spicata</i> por 30 dias.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µL	Microlitros
AFB1	Aflatoxina B1
ANAVA	Análise de variância
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDA	Batata-dextrose-ágar
CFCs	Clorofluorcarbonos
CG	Cromatografia gasosa
CO₂	Dióxido de carbono
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CV	Coeficiente de variação
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DON	Desoxinivalenol
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	Espectometria de massas
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
GL	Grau de liberdade
IK	Índice de Kovats
ISO	<i>International Standard Organization</i>
LMT	Limite Máximo Tolerado
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitros
OE	Óleo essencial
ONU	Organização das Nações Unidas
P	valor-P
PGTA	Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental
PI	Percentual inibitório
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
QM	Quadrado médio
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFF	Universidade Federal Fluminense
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1 O milho (<i>Zea mays</i> L.) no contexto da produção mundial de alimentos.....	19
3.2 Fungos e Micotoxinas.....	21
3.2.1 <i>Aspergillus flavus</i>	24
3.2.2 <i>Aspergillus brasiliensis</i>	25
3.3 A agricultura no caminho da Sustentabilidade.....	26
3.4 Óleos essenciais.....	28
3.4.1 Hortelã (<i>Mentha spicata</i> L.).....	29
3.4.2 Laranja-doce (<i>Citrus aurantium</i> L. subesp. <i>dulcis</i>)	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Obtenção do material.....	34
4.2 Análise dos constituintes dos óleos essenciais.....	34
4.3 Testes <i>in vitro</i>	35
4.4 Testes nos grãos.....	36
4.5 Análises estatísticas.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Análise dos constituintes dos óleos essenciais.....	39
5.1.1 Óleo essencial de hortelã (<i>Mentha spicata</i> L.).....	39
5.1.2 Óleo essencial de laranja-doce (<i>Citrus aurantium</i> L. subesp. <i>dulcis</i>).....	40
5.2 Testes <i>in vitro</i>	42
5.2.1 <i>Mentha spicata</i> L. x <i>Aspergillus brasiliensis</i>	42
5.2.2 <i>Mentha spicata</i> L. x <i>Aspergillus flavus</i>	44
5.2.3 <i>Citrus aurantium</i> L. subesp. <i>dulcis</i> x <i>Aspergillus brasiliensis</i>	48
5.2.4 <i>Citrus aurantium</i> L. subesp. <i>dulcis</i> x <i>Aspergillus flavus</i>	51
5.3 Testes nos grãos de milho.....	54
5.4 Quantificação das Aflatoxinas Totais.....	58
6 CONCLUSÃO.....	63
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

A demanda mundial por alimentos cresce a cada dia. Estudos apontam que em 2050 o número de habitantes na Terra superará a cifra de 9 bilhões, e para alimentar esse imenso contingente populacional, estima-se que a oferta de alimentos deverá crescer cerca de 70% a nível mundial, e em 100% nos países em desenvolvimento (GODFRAY et al., 2010; FAO, 2011). Os grãos são os elementos mais importantes nesse processo. Além de serem a base da alimentação humana, os mesmos também são fontes alimentares para as criações animais, perfazendo a maior parte das calorias da dieta humana (ALMEIDA et al., 2005; AUGUSTIN et al., 2016).

Dentre as grandes culturas agrícolas de grãos, merecem destaque as espécies da família das leguminosas (*Fabaceae*), tais como a soja, o feijão, a ervilha e a lentilha, e da família das gramíneas (*Poaceae*), cujos grãos são conhecidos como “cereais”, a exemplo do arroz, o trigo, a aveia, o centeio, o sorgo e o milho.

Esta última espécie, o milho (*Zea mays* L.), é considerado por muitos especialistas como a principal cultura agrícola mundial. Segundo dados da FAO (2015), considerando apenas o ano de 2013, a produção global foi de 1,02 trilhões de toneladas, o que o coloca em primeiro lugar no *ranking* de espécies agrícolas mais produzidas no planeta, seguido do arroz e do trigo.

No Brasil, o produto é direcionado principalmente as indústrias produtoras de ração animal. O país é o terceiro maior produtor mundial desta *commodity*¹, totalizando 66,98 milhões de toneladas na safra de 2015/2016 (CONAB, 2016; MAPA, 2016).

Dentre os fatores que podem influenciar a produção de grãos, está o acometimento de pragas e doenças, as quais podem ocorrer tanto na fase de pré-

¹ *Commodity* é um termo definido por Goldberg (1968) para designar produtos em estado bruto, ou ainda, com baixo grau de industrialização, padronizados, produzidos em larga escala por uma diversidade de produtores, os quais podem ser armazenados por determinado período de tempo sem perda significativa de qualidade.

colheita, quanto na pós-colheita. Os cuidados devem ser constantes ao longo de todo o processo produtivo, porém, é na fase de pós-colheita que a maior atenção deve ser dada. Isto porque, nesta etapa se encontram os elos da cadeia produtiva mais próximos ao consumidor, cujas operações tem um impacto crucial na qualidade final do produto (CARDOSO FILHO et al., 2015; NOURBAKHSI et al., 2016).

Pragas de grãos armazenados podem acometer estes produtos, reduzindo sua qualidade, tornando-os nocivos ao consumidor em alguns casos. Dentre estas pragas merecem destaque os fungos, dentre os quais encontram-se os grupos produtores das chamadas micotoxinas. Estas são substâncias metabólicas secundárias produzidas por estes micro-organismos, que levam a vários efeitos negativos no organismo de quem as ingere, culminando em alguns casos com a morte (PINTO, 2005; PEREIRA et al., 2002; MAY, 2005; CARDOSO FILHO et al., 2015).

Existem mais de 400 tipos de micotoxinas conhecidos na atualidade. No entanto, são quantificados cerca de 20 tipos, apenas. Dentre estes, estão as aflatoxinas, muito conhecidas pelo seu potencial de nocividade (MAY, 2005; CARDOSO FILHO et al., 2015).

O controle do desenvolvimento fúngico em armazéns de grãos se dá majoritariamente pelo uso de agentes fumigantes sintéticos. Esses, além de representarem um risco à saúde humana (teratogênicas, cancerígenas, etc.), também podem causar uma série de problemas ambientais. Como por exemplo a degradação da camada de ozônio, além de induzirem a resistência em determinadas espécies de insetos, causando um grave desequilíbrio ecológico (VARMA e DUBEY, 2001; SCHIESARI, 2012; KEDIA et al., 2014; ANŽLOVAR et al., 2017).

Além das pressões pelo aumento da produtividade na agricultura, haja vista a crescente demanda por alimentos, busca-se também um modelo de produção que prime pela conservação dos recursos naturais, evidenciado no conceito de Desenvolvimento Sustentável². Assim sendo, surge nas últimas décadas, uma preocupação da comunidade científica no desenvolvimento de processos e produtos que compatibilizem o incremento de produtividade, e o desenvolvimento sustentável

² Desenvolvimento Sustentável é um termo cunhado no Relatório *Our Common Future* da Comissão de Meio Ambiente da ONU, que de forma sucinta, estabelece que o desenvolvimento das nações deve ser pautado na utilização racional dos recursos naturais no presente, de modo a garantir sua disponibilidade às futuras gerações (BRUNDTLAND, 1991). John Elkington, definiu que para o caminho para o Desenvolvimento Sustentável deveria abarcar produtos e/ou atividades que compatibilizassem aspectos positivos nos pilares ambiental, social e econômico (ELKINGTON, 2012).

no seu mais amplo sentido, desde a conservação dos recursos naturais até a segurança alimentar da população (MILLER JR., 2013).

A tendência pela utilização de produtos naturais é crescente. Sendo assim, este trabalho visa propor a utilização de substâncias naturais, os óleos essenciais de laranja-doce (*Citrus aurantium* L. subesp. *dulcis*) e hortelã (*Mentha spicata* L.), como uma alternativa “ambientalmente correta” no controle de fungos do gênero *Aspergillus*, o *A. flavus*, um notório infestante de grãos (incluindo-se o milho), e o *A. brasiliensis*, uma espécie recentemente descoberta e que tem potencial para infestar os mesmos, o que justifica a relevância do seu estudo.

A utilização do óleo de hortelã (*M. spicata*) se justifica, por ser uma das espécies medicinais das mais cultivadas em todo território brasileiro, e o óleo de laranja-doce (*C. aurantium* subesp. *dulcis*), devido a sua produção se originar da casca do fruto, subproduto da produção nacional de cítricos, possibilitando mais uma destinação à este resíduo. Além disto, outros trabalhos da literatura indicam que estas espécies podem apresentar efeito fungicida.

Buscando propor a utilização de uma substância natural para controle fúngico na pós-colheita de grãos, este trabalho vem de encontro à solução de dois gargalos da agricultura na atualidade: a segurança de alimentos, devido ao controle das micotoxinas, e as questões ambientais, pela alternativa de uso desta substância em detrimento dos fungicidas sintéticos.

Observou-se nesta área, a necessidade de estudos mais completos, que avaliem a eficiência dos óleos essenciais não só por meio de testes *in vitro*, mas, principalmente, por meio de testes realizados diretamente nos gêneros alimentícios, que avaliem os potenciais fungicidas e anti-aflatoxicogênicos dos óleos essenciais.

Neste sentido, este estudo apresenta caráter inédito, uma vez que propõe a utilização dos óleos essenciais de *M. spicata* e *C. aurantium* subesp. *dulcis*, para inibir o crescimento e a produção de aflatoxinas por fungos do gênero *Aspergillus*, utilizando como substrato para crescimento do mesmo os grãos de milho, valendo-se de técnicas de fumigação, em ambientes que simulam condições presentes em um silo de armazenagem de grãos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito inibitório dos óleos essenciais de laranja-doce (*Citrus aurantium* L. subesp. *dulcis*) e de hortelã (*Mentha spicata* L.) no desenvolvimento de fungos das espécies *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus flavus*, através de testes *in vitro* e em grãos de milho (*Zea mays* L.) armazenados.

3.2 Objetivos Específicos

- i. Identificar os principais compostos constituintes dos óleos essenciais utilizados;
- ii. Verificar a inibição fúngica em diferentes doses dos óleos essenciais e períodos de incubação, por meio de testes *in vitro*;
- iii. Verificar a inibição fúngica em diferentes doses do óleo essencial mais eficiente, por meio de testes em grãos de milho (*Zea mays* L.), em diferentes períodos de armazenamento;
- iv. Verificar a produção de micotoxinas (aflatoxinas totais) nos grãos de milho armazenados tratados com óleos essenciais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O milho (*Zea mays* L.) no contexto da produção mundial de alimentos

Dados da FAO, Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, apontam que a produção mundial de grãos em 2013 foi de aproximadamente 2,8 trilhões de toneladas, representando um aumento de cerca de 46% da produção registrada duas décadas antes, o que evidencia a busca constante, do modelo agrícola atual, pelo aumento da produtividade. Quase metade da produção concentra-se no continente Asiático, principalmente na China e na Índia (FAO, 2015). São várias as espécies agrícolas produtoras de grãos, mas este trabalho se aterá em uma das mais importantes, senão a mais importante espécie agrícola conhecida, o milho.

O milho foi classificado taxonomicamente por Lineu como: reino *Plantae*, divisão *Anthophta*, classe *Monocotiledoneae*, ordem *Poales*, família *Poaceae* (Gramineae), gênero *Zea*, espécie *Zea mays* (FREITAS, 2001).

É uma espécie nativa do continente americano. Indícios arqueológicos apontam que provavelmente, uma espécie vegetal selvagem conhecida como *teosinte* (*Zea mexicana*), tenha começado a ser domesticada pelos povos que habitavam a bacia do Rio Balsas, em algum lugar entre o sul do México e a Guatemala, por volta de 8.700 a.C. Este processo de domesticação durou alguns milhares de anos, fazendo com que a espécie selvagem, cuja espiga produzia apenas alguns poucos grãos, se transformasse na espécie que hoje chamamos de *Zea mays* L., com alta produtividade e adaptabilidade aos mais distintos ambientes de cultivo (DOEBLEY, 1990; VARGAS, 2013).

A cultura se disseminou por toda América Central e, por volta de 1200 a 300 a.C., se consolidou como a base da alimentação dos povos mesoamericanos (VARGAS, 2013). Ao mesmo tempo era difundida pelo resto do continente, como

indicam vestígios arqueológicos (GOLOUBINOFF et al., 1993). Na América do Sul, sobretudo na região andina, o milho já era uma cultura expressiva em 1.600 a.C. juntamente com a batata, os feijões e a quinoa; assim como no sudoeste dos Estados Unidos já era também cultivado nesta mesma época (VARGAS, 2013).

Quando da chegada de Cristóvão Colombo na América, em 1492, o vegetal já era cultivado praticamente em todo o continente americano. Foram os espanhóis que levaram as primeiras sementes de milho a Europa, e segundo relatos do próprio Colombo, em 1498 a espécie já crescia em abundância nas terras de *Castilla* (DOEBLEY, 1990; VARGAS, 2013).

No Brasil, antes mesmo da chegada dos portugueses, o milho também já era cultivado pelos índios, sobretudo os Guaranis, que tinham no cereal o principal ingrediente de sua dieta. Foram os portugueses, que provavelmente levaram as sementes de milho à África e a Ásia, sendo sua produção nestes locais rapidamente expandida (VARGAS, 2013; ARAÚJO, 2008).

O cultivo de milho está disseminado em praticamente todo o globo. O cereal é cultivado desde a Rússia, no extremo norte, até a Argentina, no extremo sul do planeta (DUARTE et al., 2015). Dados da FAO (2015) apontam que em 2013, foi o cereal mais produzido no mundo, com 1,02 trilhões de toneladas, seguido pelo arroz com 740,9 bilhões de toneladas e o trigo com 715,9 bilhões de toneladas. Neste cenário, ocupam lugar de destaque Estados Unidos, China e Brasil, os maiores produtores mundiais da *commodity*.

Nos Estados Unidos, o milho é o grão de maior produção, tendo sua principal destinação a alimentação animal. São cultivados cerca de 80 milhões de hectares, principalmente na região de *Heartland*. Além da alimentação animal, no país o milho é convertido em uma ampla gama de subprodutos, incluindo amido, adoçantes, óleo de milho, bebidas e etanol combustível (USDA, 2015).

A cultura é representativa no que tange a alimentação animal, já que cerca de 70% do total do milho produzido no mundo é destinado a esse fim (DUARTE et al., 2015). Mas essa importância se faz mais evidente no que tange a alimentação humana. Hoje existem mais de 500 produtos derivados do milho (PINTO, 2005), e muito além de uma fonte barata de energia, é parte fundamental da gastronomia e da cultura de muitos povos, sendo por exemplo ingrediente principal de pratos nacionais, como as *“Tortillas”* no México, as *“Pupusas”* em El Salvador, os *“Tamales”* em toda

América Central, as “*Arepas*” na região norte da América do Sul, o “*Pastel de Choclo*” no Chile, dentre vários outros (VARGAS, 2013).

No Brasil também não é diferente. Com a chegada dos portugueses a princípios do século XVI, o consumo do milho aumentou e novos produtos à base do cereal incorporaram-se aos hábitos alimentares (ARAÚJO, 2008).

A área plantada no Brasil é de 15,92 milhões de hectares, e a produção de 66,98 milhões de toneladas (Safrá 2015/2016). O clima do país favorece a produção de duas safras ao ano: a safra de verão (primeira safra) e a safra de inverno, mais conhecida como safrinha (segunda safra), na qual a cultura é semeada imediatamente após a colheita de uma cultura principal anteriormente plantada na área. Merecem destaque as regiões Centro-Oeste e Sul, com respectivamente 42,5 e 34,5% da produção nacional (CONAB, 2016).

Os fungos constituem um dos principais problemas à produção de milho, podendo afetar o produto tanto antes da colheita, quanto durante as etapas de beneficiamento, armazenamento e transporte. Diante disto, para o incremento de produtividade da cultura, o controle destas pragas se faz cada vez mais necessário (PINTO, 2005; ABBAS et al., 2017).

3.2 Fungos e Micotoxinas

O Reino *Fungi* é composto por mais de 70 mil espécies, as quais englobam seres eucariotos, unicelulares (leveduras) ou pluricelulares, aeróbios ou anaeróbios facultativos. A reprodução destes indivíduos pode se dar de maneira assexuada, por brotamento nos fungos unicelulares ou fragmentação da estrutura micelial nos pluricelulares, ou ainda de forma sexuada, pela multiplicação de estruturas reprodutivas denominadas esporos (GOMPERTZ et al., 2008).

Os fungos são os responsáveis pela maioria da contaminação e deterioração encontrada em alimentos. Isso se deve ao fato, de seus esporos encontrarem-se dispersos, em grande quantidade, pelos mais diversos ambientes. Eles podem estar presentes desde cereais até suco de maçã, de queijos a bacon, de presunto curado às sementes de cacau, dentre inúmeros outros produtos (MAY, 2005).

Cardoso Filho et al. (2015) afirmam que os alimentos, por serem ricos em nutrientes, são excelentes substratos para o desenvolvimento fúngico, desde que

haja as condições ambientais ideais para que isto ocorra. Estes seres, ao degradarem a biomassa dos alimentos, acabam por comprometer suas características organolépticas, causando perdas na qualidade nutricional e graves perdas econômicas.

Várias espécies de fungos podem produzir substâncias tóxicas, denominadas micotoxinas. Essas substâncias são metabólitos secundários produzidos durante a fase de crescimento exponencial destes fungos, as quais não são necessárias aparentemente ao seu metabolismo, mas podem, no entanto, causar danos severos aos consumidores dos alimentos nas quais estão presentes, sejam humanos ou animais. Dentre esses danos, os mais representativos são as micotoxicoses, nome dado às doenças/síndromes resultantes da ingestão de alimentos contaminados, que provocam a redução do crescimento, interferências nas funções vitais metabólicas, surgimento de tumores malignos, dentre outros (MAY, 2005; GREGORI et al., 2013; MARKOV et al., 2015; ABBAS et al., 2017).

Vale ressaltar que a presença dos fungos em determinado alimento não é condição obrigatória da presença de micotoxinas; pode haver fungos e não ser constatada a presença destas substâncias, assim como pode haver micotoxinas e não haverem fungos. Isso porque, o crescimento fúngico e a produção das micotoxinas requerem condições específicas do meio em que se encontram para serem favorecidos. Além disto, as micotoxinas são na sua maioria termorresistentes, ou seja, são capazes de se manter nos alimentos, mesmo com tratamentos térmicos severos utilizados para a conservação dos produtos, objetivando a remoção de micro-organismos (PEREIRA et al., 2002; GREGORI et al., 2013).

São conhecidos atualmente mais de 400 tipos de micotoxinas, mas comumente são quantificadas apenas 20, dentre as quais estão as ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas e aflatoxinas. Destas as mais conhecidas as denominadas aflatoxinas, dado seu potencial de nocividade (MAY, 2005; CARDOSO FILHO et al., 2015).

As aflatoxinas começaram a ser estudadas na década de 60, no Reino Unido, quando mais de 100 mil perus foram dizimados após consumirem ração a base de amendoim importado que continha a micotoxina, oriundo da América do Sul e África. Na época, por não se saber o que levou a morte destes animais, o fato ficou conhecido como “Doença X”, posteriormente os cientistas se debruçaram sobre o problema, conseguindo isolar de amostras dessa ração contaminada a espécie *Aspergillus*

flavus, a qual produzia uma substância que foi batizada como A-fla-toxina, ou seja, toxina do *Aspergillus flavus* (MAY, 2005).

Devido a problemática em relação às intoxicações por micotoxinas, há legislações vigentes por todo o mundo em relação aos teores máximos permitidos destas substâncias para uma série de alimentos. Internacionalmente os teores são recomendados pelo *Codex Alimentarius* e no Brasil são regidos pela Resolução RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, da ANVISA (BRASIL, 2011) (Tabela 01).

Tabela 01. Limites Máximos Tolerados (LMT) de Micotoxinas para algumas classes de alimentos segundo RDC nº 7/2011 da ANVISA.

Classe de alimento	LMT (µg/kg)		
	Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2)	Desoxinivalenol (DON)	Fumonisinias (B1 e B2)
Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	5	1000* (trigo e derivados) 750*	---
Feijão	5	---	---
Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1	200	200
Especiarias	20	---	---
Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20	---	---
Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20	3000* (grãos) 1250* (derivados)	5000* (grão) 1500* (farinha) 1000* (amido)

*O prazo para adequação é 1º de janeiro de 2017, segundo a RDC nº 59 da ANVISA, de 26 de dezembro de 2013. (---) = LMT não estabelecido.

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2011.

Os fungos toxigênicos na cultura do milho são grandes produtores de micotoxinas. Como a dieta de suínos, bovinos e aves é composta em grande parte por milho, essas micotoxinas representam um perigo tanto para os próprios animais, quanto para a saúde dos consumidores de carne, leite e outros produtos derivados destes animais intoxicados (PINTO, 2005; ABBAS et al., 2017).

Os fungos que acometem os grãos podem ser classificados em dois grupos, segundo suas características: fungos de campo, destacando-se espécies dos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* e *Fusarium*, que requerem teores de

umidade relativa do ar próximos a 90%, e teor de umidade do grão entre 20 e 21%; e os fungos de armazenamento, representados principalmente por espécies de *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.*, as quais necessitam de teores de umidade mais baixos para seu desenvolvimento, entre 13 e 18% (ALMEIDA et al., 2005).

Apesar da deterioração dos grãos acometidos por fungos ser um processo irreversível e de difícil controle, devido tanto a fatores climáticos, quanto de carências tecnológicas e de conhecimento técnico, é possível mediante técnicas adequadas de cultivo, processamento e, principalmente armazenamento, retardar esse processo, reduzindo assim a insegurança alimentar e as perdas econômicas (ALMEIDA et al., 2005; MALLMANN et al., 2015).

3.2.1. *Aspergillus flavus*

O *Aspergillus flavus* é, sem dúvidas, a espécie do gênero *Aspergillus* mais estudada. Esta fama se deve ao episódio da “Doença X” anteriormente relatado no item 3.2, quando a aflatoxina foi descoberta, na década de 60, e desde então muitos estudos têm sido realizados com esta espécie (HEDAYATI et al., 2007).

Este fungo, juntamente com o *Aspergillus parasiticus*, *A. nomius*, *A. tamarii* e *A. bombysis*, compõe o grupo dos *Aspergillus* seção *flavi* que são toxicogênicos, capazes de produzir metabólitos secundários tais como a aflatoxina. As espécies deste grupo podem causar uma série de prejuízos a várias *commodities* agrícolas como milho, amendoim e sementes de algodão (BLUMA e ETCHEVERRY, 2008). A primeira descrição deste micro-organismo foi feita em 1809, por H.F. Link (HEDAYATI et al., 2007).

A espécie tem uma ampla distribuição mundial assim como outras do gênero. É comumente encontrado nos solos, onde atua como micro-organismo saprófito, reciclando os nutrientes, pela decomposição de animais e plantas. Assim como outros fungos filamentosos, o *A. flavus* é capaz de se reproduzir assexuadamente por estruturas chamadas esporângios, as quais produzem os esporos, que por sua vez são facilmente dispersos no solo e pelo ar nos mais variados ambientes (HEDAYATI et al., 2007).

A temperatura ótima para o crescimento do *A. flavus* gira em torno de 37°C, mas o mesmo pode crescer na faixa de 12 a 48°C. Já em relação à atividade de água

(a_w), seu crescimento é máximo em substratos cuja a_w seja entre 0,86 e 0,96 (VUJANOVIC et al., 2001; HEDAYATI et al., 2007). Para que haja a produção de aflatoxinas, o fungo deve estar em ambiente contendo as seguintes condições: 80% de umidade relativa do ar, temperatura de aproximadamente 27°C, e substrato com atividade de água (a_w) na faixa de 0,78 a 0,87 (GIMENO e MARTINS, 2011).

São descritos na literatura vários métodos de controle e inibição da produção de micotoxinas pelo *A. flavus*. Podem ser citadas, por exemplo, técnicas que utilizam controle biológico através do uso de bactérias (AL-SAAD et al., 2016) e outras espécies fúngicas competidoras, fungicidas sintéticos como o carbendazim, extratos de plantas, óleos essenciais, conservantes, e pelo uso de atmosfera modificada (LÓPEZ-MALO et al., 2005; MOUSA et al., 2016).

3.2.2. *Aspergillus brasiliensis*

O *Aspergillus brasiliensis* é uma espécie fúngica, da qual se sabe que pode acometer grãos no período da pós-colheita, durante a estocagem. Este micro-organismo faz parte do grupo de *Aspergillus* negros, popularmente conhecidos como “mofo preto”, juntamente com o *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus aculeatus* (MYCOCOSM, 2016).

A espécie foi identificada por Varga et al. (2007), quando ao se depararem com uma espécie de *Aspergillus* da seção *nigri*, viram que era distinta das demais conhecidas. Esta espécie, ainda que guardasse notórias semelhanças com o *Aspergillus niger*, possuía características fenotípicas e genotípicas distintas. Esta nova espécie identificada foi isolada de amostras de solos do Brasil, recebendo por isso o nome em homenagem ao país. Além disto, foram identificados indivíduos desta mesma espécie em solos da Austrália, Estados Unidos e Países Baixos, além de uvas em Portugal (VARGA et al., 2007).

Os fungos do grupo dos *Aspergillus* negros são conhecidos por causar a deterioração de alimentos, a exemplo de grãos, derivados de uva, café e coco, podendo produzir micotoxinas, como a ocratoxina (JIANG et al., 2014) e aflatoxina (FONSECA et al., 1974). Além disso, devido à alta capacidade de degradação de biomassa, estas espécies tem sido estudadas com intuito de aplicações industriais, tanto para produção de enzimas, quanto de ácidos orgânicos (VARGA et al., 2007; MICOCOSM, 2016).

Comparativamente ao *A. flavus*, o *A. brasiliensis* é uma espécie ainda pouco estudada, dado que sua descoberta foi há cerca de 10 anos. Em uma busca simples em artigos científicos no Portal ScienceDirect (SCIENTEDIRECT, 2017), para o termo “*Aspergillus flavus*” retornou 11.239 resultados, enquanto que para “*Aspergillus brasiliensis*” apenas 1.939 resultados, os quais remetem a outros micro-organismos em sua maioria, ou mostram a utilização do micro-organismo para produção de enzimas, não expressando claramente formas de controle do mesmo. Tal fato, evidencia a importância de se estudar formas de controle da espécie.

3.3 A agricultura no caminho da Sustentabilidade

“As vozes da primavera se silenciaram”. É assim através de uma fábula, que Rachel Carson (1962), de forma magistral, apresentou ao mundo os efeitos nocivos dos agrotóxicos no meio ambiente. O livro “*Primavera Silenciosa*”, lançado pela autora no início da década de 60, relata a história de uma cidadezinha no coração dos Estados Unidos, na qual a aplicação de agrotóxicos fez com que toda as formas de vida fossem silenciadas - desde os pássaros, os peixes e até mesmo as crianças -, devido aos graves efeitos que os mesmos desencadeavam nos seres vivos, e no próprio meio ambiente. A obra teve grande repercussão, e logo, o clamor das massas forçou que o uso DDT (Dicloro-difenil-tricloroetano), agrotóxico que trata este livro especificamente, fosse banido dos Estados Unidos e de outros países. Além disto, também acirrou as discussões em torno da temática ambiental e fomentar leis de proteção ao meio ambiente (JACOBI, 2005).

Algumas décadas se passaram desde o lançamento do livro de Carson, mas a polêmica em torno do uso de agrotóxicos na agricultura ainda persiste. Sustentabilidade, na atualidade, é uma palavra de ordem. No entanto, os agrotóxicos ainda são utilizados massivamente nas culturas agrícolas, de modo a erradicar pragas e doenças, aumentando a produção e reduzindo custos. Temos então, nesta questão, um empasse: como a agricultura será capaz de produzir alimentos a uma população que, em 2050 atingirá o patamar de 9 bilhões (FAO, 2011), e ao mesmo tempo priorizará técnicas que não sejam danosas ao meio ambiente, como a não utilização de agrotóxicos e devastação de florestas para novas áreas de cultivo? A resposta a

essa pergunta não é tão simples, e vem tirando o sono de muitos pesquisadores ao redor do planeta.

O Brasil, por exemplo, convive de perto com esse dilema, por ser um dos maiores produtores e exportadores de *commodities* agrícolas do mundo, segundo dados da ABRASCO (2015), ocupa a liderança do *ranking* mundial do consumo de agrotóxicos, e ainda de acordo com a fonte, cerca de 70% dos alimentos *in natura* consumidos no país estão contaminados por estas substâncias, 28% das quais não são autorizadas pela Anvisa.

Já com relação a devastação de áreas florestais no país, de acordo com o IBGE entre 2000 e 2010, uma área equivalente ao Estado de São Paulo (cerca de 236.000 km²) de florestas foi devastada no Brasil para dar lugar a novas lavouras, cifra que representa 65% do total do desmate neste período, e torna a agricultura campeã do desmatamento nacional, seguido das áreas de pastagens destinadas a pecuária, com 25% (PLANALTO, 2015).

Já na pós-colheita, os efeitos da aplicação de substâncias não-naturais também são visíveis. No armazenamento de grãos, por exemplo, utiliza-se ainda no Brasil a fosfina no expurgo dos mesmos, objetivando o controle de insetos e fungos principalmente. No entanto, segundo Varma e Dubey (2001), o uso desta substância está suspenso em alguns países, pois certas espécies de insetos tem desenvolvido resistência à esse agente ativo, causando um grave desequilíbrio ecológico. Outra substância destinada para o mesmo fim no país é o brometo de metila, que ainda utilizada em menor quantidade³, contribui diretamente para a depleção da camada de ozônio (VARMA e DUBEY, 2001).

Uma alternativa possível à tal empasse seria o incremento da produtividade agrícola, de forma sustentável, sem comprometer ainda mais os recursos naturais. Este incremento pode se dar, por sua vez, com a diminuição das perdas ao longo das cadeias produtivas, e com a utilização da chamada agroecologia⁴, cada vez mais visada na atualidade.

³ Devido ao fato do Brasil ser um signatário do Protocolo de Montreal, há uma cota de utilização de substâncias degradadoras da camada de ozônio, tais como o brometo de metila, o que faz com que no país o produto seja destinado a usos "mais nobres", ou seja, a produtos com maior valor agregado, como o café em grão destinado à exportação (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2016).

⁴ De acordo com Altieri (1998), a perspectiva agroecológica leva a utilização mínima possível de insumos agroquímicos e energéticos externos, de modo que os próprios sistemas agrícolas, através de interações ecológicas e sinergismos entre os seres vivos, criem por si mesmos, a fertilidade dos solos, produtividade e proteção das culturas.

Neste sentido, a utilização de substâncias naturais em detrimento dos agrotóxicos na agricultura, vem de encontro e esse movimento por uma agricultura sustentável, nos moldes agroecológicos.

Este trabalho visa propor exatamente isto, a utilização de substâncias naturais, os óleos essenciais de espécies abundantes no país, como uma alternativa “ambientalmente correta”, como uma “tecnologia ambiental”, no controle de pragas de grãos.

3.4 Óleos Essenciais

O poder conservante dos óleos essenciais de especiarias é conhecido pelo Homem desde a Antiguidade. Os egípcios já utilizavam óleos essenciais de cravo, canela folha e canela cássia na mumificação de seus mortos. Soube-se, a partir de 1920, quando começaram a se estudar as propriedades dos óleos essenciais com mais afinco, que esse poder conservante é devido à alta atividade bactericida e fungicida de determinados compostos presentes nos mesmos (SHELF, 1983; PEREIRA et al., 2006).

A ISO (*International Standard Organization*) define óleo essencial como produto aromático oriundo de espécies vegetais, obtido através de destilação, compressão mecânica ou separação de fase aquosa por processos físicos (SIMÕES et al., 2003; MARTINAZZO, 2006).

Na extração dos óleos essenciais, segundo Martinazzo (2006), as técnicas mais utilizadas são: extração por arraste de vapor, hidrodestilação, extração com solventes orgânicos, prensagem a frio e extração com fluído super crítico.

Os óleos essenciais são oriundos de compostos atraentes ou repelentes produzidos pelas plantas, que apresentam baixo peso molecular e são voláteis, na sua maioria pertencente ao grupo dos terpenos, que por sua vez são compostos aromáticos produzidos como metabólitos secundários pelos vegetais (KNAAK e FIUZA, 2010).

Os principais componentes dos óleos essenciais são os monoterpenos, seguidos pelos sesquiterpenos e por outros componentes de baixo peso molecular, como álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, entre outros (SIMÕES et al., 2003). Os monoterpenos são o grupo de substâncias mais abundante e potente encontrado

na natureza, que segundo diversos autores apresentam atividade sobre insetos, fungos e bactérias (KNAAK e FIUZA, 2010).

A constituição química dos óleos essenciais pode variar de acordo com o clima, a estação do ano, do local geográfico onde está situada a planta, do período de colheita e da técnica de extração dos mesmos (MACIEL et al., 2002).

Knaak e Fiuza (2010) apontam que os óleos essenciais apresentam um longo histórico de aplicação industrial nos mais diversos segmentos, tais como o de alimentos, de fragrâncias, farmacêutica, de aromaterapia, e mais recentemente no controle de pragas agrícolas.

Nos últimos anos vem sendo preconizada a utilização de substâncias naturais, sobretudo de origem vegetal, nos alimentos, tornando-os mais atrativos aos olhos do consumidor (BURT, 2004; PEREIRA et al., 2006). Assim, os óleos essenciais surgem como uma arma no combate a pragas e doenças que acometem grãos armazenados, sendo uma alternativa aos pesticidas sintéticos utilizados para o mesmo fim (ADEGOKE e ODESOLA, 1996; BURT, 2004; SINGH et al., 2010a; TATSADJIEU et al., 2010; KEDIA et al., 2014).

3.4.1. Hortelã (*Mentha spicata* L.)

A *Mentha spicata* L., popularmente conhecida como hortelã-verde, é uma espécie pertencente à família *Lamiaceae*, gênero *Mentha*, o qual por sua vez compreende cerca de 19 espécies e 13 híbridos naturais, originárias da Europa, África, Ásia, Austrália e América do Norte (KUMAR et al., 2011). É um híbrido natural, resultado do cruzamento das espécies *Mentha longifolia* e *Mentha rotundifolia*, nativa da Europa central (LORENZI e MATOS, 2008), Ásia temperada e África (KEDIA et al., 2014).

A planta é perene, herbácea e possui caule de tipo rizoma, podendo alcançar entre 40 e 130 cm de altura (KEDIA et al., 2014). Apesar de ser nativa de outras regiões do planeta, encontrou no Brasil condições favoráveis de clima e solo para seu desenvolvimento, uma vez que no país há abundância de solos úmidos e alta taxa de incidência de luz solar, características ideais requeridas pela espécie. Diante disto, a espécie é amplamente cultivada no país, sendo utilizada como condimento ou para fins medicinais (LORENZI e MATOS, 2008).

O óleo essencial extraído da planta representa entre 0,5 e 0,7% do seu peso fresco, e cerca de 97% do mesmo é constituído por 13 compostos. A Carvona (Figura 01) é o constituinte majoritário, seguido do Limoneno (Figura 02) (KEDIA et al., 2014). Estudos indicam que o óleo essencial de *M. spicata* tem efeito antifúngico contra algumas espécies de fungos que causam intoxicação alimentar (SOKOVIC et al., 2009), e algumas espécies de insetos que acometem grãos armazenados (LEE et al., 2002).

Kedia et al. (2014) avaliaram o efeito deste óleo essencial no desenvolvimento e produção de aflatoxinas (AFB1) pelo *Aspergillus flavus*, por meio de testes *in vitro*, e concluíram que sete dias após a incubação, a dosagem 1,0 µL/mL inibiu completamente o desenvolvimento fúngico, enquanto que já na dosagem 0,9 µL/mL não foi constatada a presença de aflatoxinas (AFB1). Os mesmos autores avaliaram ainda a eficiência da fumigação deste óleo em relação ao desenvolvimento da espécie de inseto *Callosobruchus chinensis*, concluindo que a concentração de 0,1 µL/mL de óleo no ar era capaz de inibir 98.46% da oviposição, 100% da atividade ovicida, 88.84% da atividade larvicida, 72.91% da atividade das pupas, e 100% da rejeição a alimentos contendo o mesmo.

De acordo com Oigman (2016), a carvona, principal constituinte, é um composto da família dos monoterpenos, líquido com ponto de ebulição a 231°C, aromático e incolor. Possui propriedades antifúngicas contra as espécies *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*, e também é utilizada como repelente para mosquitos. Além disto, também é utilizada comercialmente na elaboração de produtos para higiene oral, em essências para purificadores de ar e em repelentes.

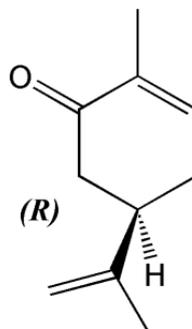


Figura 01. Estrutura química da Carvona.
Fonte: OIGMAN, 2016.

Apesar de todos estes estudos realizados, se faz necessário a realização de mais estudos *in vivo* com esta substância, que simulem condições reais encontradas no dia-a-dia.

3.4.2. Laranja-doce (*Citrus aurantium* L. subesp. *dulcis*)

O gênero *Citrus*, pertencente à família *Rutaceae*, é um dos mais conhecidos entre as espécies vegetais. Nele se encontram as laranjas comuns (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata* e *Citrus deliciosa*), limões (*Citrus limon*), limão-Tahiti (*Citrus latifolia*), limão-Galego (*Citrus aurantiifolia*), lima da Pérsia (*Citrus limettioides*), pomelo (*Citrus paradisi*), cidra (*Citrus medica*), toranjas (*Citrus grandis*), laranja-azeda (*Citrus aurantium* subesp. *amara*) e laranja-doce (*Citrus aurantium* subesp. *dulcis*) (LOPES et al., 2011).

A variedade Laranja-doce (*Citrus aurantium* L. subesp. *dulcis*), é originária do leste asiático, e foi introduzida na Europa pelos árabes durante a expansão muçulmana durante a Idade Média. É cultivada na Espanha, Portugal, e em outras partes do mundo, como no Brasil. A árvore é de pequeno porte, perenifólia, com folhas ovais, tronco com casca lisa e com muitos espinhos, e o fruto é mais áspero e rugoso que aqueles de outras espécies do gênero *Citrus*. Além do nome popular laranja-doce, a variedade também é conhecida como Laranja da terra, Laranja Bigarade, Laranja de Sevilha, Laranja de Portugal, Laranja da China e *Citrus dulcis* (BOTANICAL.COM, 2016).

Os óleos essenciais das variedades do gênero *Citrus* são extraídos das cascas dos frutos, nas quais existe uma quantidade muito superior destes compostos em relação a outras espécies frutíferas. Apesar disso, as cascas são consideradas um resíduo agroindustrial da produção de suco de laranja (WU et al, 2017).

O Brasil é detentor de 50% da produção mundial de suco de laranja, 98% do que o país produz é exportado, o que faz com que a produção nacional consiga 85% de participação no mercado mundial. A cadeia da produtiva brasileira de suco de laranja movimentava bilhões de dólares e produz bilhões de toneladas a cada safra, gerando também uma grande quantidade de resíduos (NEVES, 2010). Apesar da forte valorização econômica destes resíduos pelo setor, comercializados como subprodutos – farelo de polpa cítrica, óleo essencial, etc. – no exterior, dado o alto

volume produzido no país, o desenvolvimento de novas tecnologias para o emprego do excedente destes resíduos, na indústria nacional, se faz cada vez mais necessário. Tal fato garante que as indústrias cítricas estejam em consonância com o estabelecido pela Política Nacional de Resíduos Sólidos – PNRS (BRASIL, 2010), pois permite que estes resíduos agrossilvopastoris, dotados de valor econômico, sejam utilizados como insumos em outros processos produtivos, reduzindo assim o passivo ambiental deste setor.

O óleo essencial de laranja-doce é usado como aromatizante na produção de alimentos, na produção de cosméticos, e ainda pode ser utilizado com fins medicinais, como no tratamento de bronquite. É um líquido de coloração amarela escura, com densidade que varia entre 0,842 a 0,846 g/mL a temperatura ambiente, conhecido popularmente como “Óleo de Portugal”. Seu principal constituinte é o Limoneno (Figura 02), cujo percentual pode chegar a níveis superiores a 90% (BOTANICAL.COM, 2016).

O Limoneno é um monoterpreno cíclico formado apenas por átomos de carbono e hidrogênio. É uma substância volátil, com temperatura de ebulição de 176°C. É usado como inseticida, e, além disso, devido a sua natureza química apolar, vem sendo usado há mais de trinta anos como agente de limpeza industrial, pois apresenta afinidade por graxas à base de petróleo. É utilizado em vários processos industriais, como por exemplo, na produção de mentol, um composto que dá o sabor “refrescante” a vários alimentos e bebidas (BURNHAM, 2008).

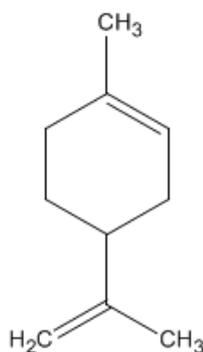


Figura 02. Estrutura química do Limoneno.
Fonte: BURNHAM, 2008.

A principal justificativa para o uso do limoneno como solvente industrial, é poder utilizá-lo substituindo substâncias tóxicas, tais como a butanona, o xileno e os

clorofluorcarbonos (CFCs), sendo uma alternativa natural. Outra vantagem do componente é ser biodegradável e rapidamente convertido em gás carbônico (CO₂) e água (BURNHAM, 2008).

O limoneno também é sugerido na literatura como agente fungicida. Singh et al. (2010b), por exemplo, avaliaram a eficácia do composto frente ao *Aspergillus flavus*, a 28°C por 10 dias, e concluíram que dosagens superiores a 500 ppm eram capazes de inibir o desenvolvimento do micro-organismo, e que dosagens superiores a 250 ppm já inibiam a produção da aflatoxina B1. Os referidos autores também avaliaram a eficácia dos óleos essenciais de *Citrus maxima* e *Citrus sinensis*, e concluíram, que para ambos, dosagens superiores a 750 ppm inibiram o crescimento micelial, enquanto que em dosagens acima de 500 ppm não havia a produção de AFB1.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do material

Os óleos essenciais de Hortelã (*Mentha spicata* L.) (China) e Laranja-doce (*Citrus aurantium* L. subesp. *dulcis*) (Brasil) foram adquiridos da empresa Ferquima® (São Paulo – SP).

As cepas do fungo da espécie *Aspergillus flavus* foram doadas pelo acervo de fungos filamentosos da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (Rio de Janeiro – RJ). As cepas do fungo *Aspergillus brasiliensis* foram adquiridas da empresa Didática SP® (São Paulo – SP).

Os grãos de milho utilizados nos testes *in vivo* foram adquiridos na Distribuidora Ugobom Cerealista Ltda. (São Lourenço – MG).

4.2 Análise dos constituintes dos óleos essenciais

As análises dos constituintes dos óleos essenciais foram realizadas por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (modelo CGMS-QP2010 Plus, Shimadzu®). A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo capilar de sílica fundida com fase estacionária DB-5 (0,25 µm de espessura, 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno). Foi utilizado hélio como gás carreador a um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. A temperatura de 220 °C no injetor e 240 °C no detector. A temperatura inicial do forno mantida a 60 °C por dois minutos, sendo programado um acréscimo de 3 °C.min⁻¹ até a temperatura de 240 °C, na qual foi mantida por 30 minutos, totalizando 91 minutos de análise. A razão de split utilizada foi de 1:20 e o tempo de corte do solvente de 5 minutos. Injetou-se 1 µL da amostra, na concentração de 10.000 ppm, utilizando como solvente o hexano.

A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massas obtidos com os do banco de dados do equipamento e pelo Índice de Retenção de Kovats (IK) de cada componente, segundo padrão utilizado (LANÇAS, 1993). A análise quantitativa dos principais constituintes dos óleos essenciais, dada em percentual, foi realizada pelo método de normalização de integração de área dos picos, descrito por Zhang et al. (2006).

4.3 Testes *in vitro*

Nos testes *in vitro* foi utilizada a metodologia difusão em ágar, na qual os óleos essenciais foram dissolvidos com o agente surfactante DMSO (dimetilsulfóxido), a 1% v/v, em meio BDA (batata-dextrose-ágar).

As dosagens utilizadas para o óleo essencial foram:

- *M. spicata*: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 µL/mL;
- *C. aurantium*: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 µL/mL.

Os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus brasiliensis* foram cultivados em Placas de Petri contendo meio BDA por 10 dias a 28±2 °C. Ao fim do período de incubação, discos de micélio (7,0 mm de diâmetro) foram transferidos para recipientes contendo solução salina (NaCl 0,9%).

Os discos de micélio, previamente preparados, foram dispostos no centro da placa contendo o meio de cultura com as diferentes dosagens de óleos essenciais, de modo que a parte do disco de micélio contendo os esporos estivesse em contato direto com o meio. Para cada tratamento foram realizadas 5 repetições.

As placas foram incubadas em BOD, a 30±2 °C, e realizou-se medições diárias do halo de crescimento radial dos micro-organismos (com auxílio de paquímetro digital), até que o tratamento controle (0,0 µL/mL de OE) ocupasse todo o espaço da placa de Petri (90,00 mm de diâmetro).

De posse destes dados, foram calculados os halos médios do tratamento controle a cada dia, os quais se tomaram por base para calcular o percentual inibitório de cada tratamento, segundo a equação (01) proposta por Prakash et al. (2013):

$$\text{Inibição} = \left(1 - \frac{\phi_t}{\phi_c}\right) \times 100 \quad \text{Equação (01)}$$

Em que:

φ_c – diâmetro médio do tratamento controle (mm);

φ_t – diâmetro médio dos tratamentos (dosagens) (mm).

4.4 Testes nos grãos de milho

Para avaliar a eficiência do uso dos óleos diretamente nos grãos, realizou-se testes utilizando a metodologia descrita por Tatsadjieu et al. (2010), com adaptações.

As cepas dos fungos foram cultivadas em Ágar Sabouraud-Dextrose, incubadas em BOD a 30 °C por 10 dias. Os esporos foram coletados e mantidos em suspensão (solução salina – NaCl 0,9%). Realizou-se a contagem dos mesmos em câmara de Neubauer, e ajustada a concentração para 1×10^7 esporos.mL⁻¹.

Previamente a montagem do experimento, amostras dos grãos de milho tiveram seu teor de água determinado pelo método padrão da estufa, mantidas a 105°C por 24 h (BRASIL, 2009).

Foram acondicionados 300 g dos grãos de milho em recipientes de vidro, de volume de 2 L, previamente esterilizados. Posteriormente, para cada recipiente, foi inoculada 3 mL da suspensão de esporos de uma espécie de fungo correspondente, revolvendo a massa de grãos de forma padronizada. Mantiveram-se estes recipientes a temperatura de 30 ± 2 °C, por 2 dias, para promover o crescimento do fungo.

Discos de papel filtro foram embebidos com diferentes doses (0,00; 1,25; 2,50 e 5,00 µL/mL) do óleo essencial de *M. spicata* e introduzidos no interior de cada garrafa contendo a massa de grãos inoculada com os respectivos fungos. Estes discos se encontravam suspensos na garrafa, de modo a que não tivessem contato direto com os grãos. As dosagens utilizadas nesta etapa foram definidas com base nos resultados dos testes *in vitro*, previamente realizados (metodologia descrita na seção 4.3). Sendo assim, apenas o óleo essencial que demonstrou maior eficiência frente as espécies fúngicas – *M. spicata* L.- foi utilizado nos testes aplicados nos grãos. Os volumes de óleo essencial aplicados nos discos de papel filtro foram calculados tomando como referência o volume total de cada garrafa (2 L). Para cada tratamento foram preparadas 3 repetições.

Após o preparo do material, as garrafas foram incubadas em BOD a 30 ± 2 °C, durante 10, 20 e 30 dias de armazenamento. Após esses períodos foram realizadas

amostragens de cada tratamento, para quantificação dos fungos (UFCs - Unidades Formadoras de Colônia).

Amostras de 10 g de grãos foram acondicionadas em recipientes contendo 90 mL de solução salina (NaCl 0,9%) estéril, esta foi mantida sob agitação por 30 minutos. Foi dispersa um volume de 1 mL da solução em placa de Petri contendo meio BDA, posteriormente incubada em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48h, quando então foi realizada a contagem de UFCs de fungos na placa. Para cada amostra de grãos foram preparadas 3 repetições (3 placas).

A amostragem foi destrutiva, ou seja, uma vez aberto o recipiente contendo os grãos, o mesmo não era mais considerado no experimento. Assim foram preparados inicialmente recipientes para cada tratamento (4 tratamentos, incluindo o controle), considerando os três períodos de armazenamento (10, 20 e 30 dias), e as três repetições (recipientes) para cada um, totalizando assim 36 unidades para cada fungo.

O percentual de inibição do número de colônias fúngicas foi calculado segundo equação (02) descrita por Tatsadjieu et al. (2010):

$$\text{Inibição} = \frac{C_0 - C_T}{C_0} \times 100 \quad \text{Equação (02)}$$

Em que:

C_0 – número de colônias do tratamento controle;

C_T – número de colônias dos tratamentos com óleo essencial.

A presença de Aflatoxinas Totais foi verificada nos grãos tratados com óleo essencial ao final do experimento (30 dias), pelo método de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), baseado na interação de anticorpos e antígenos em um substrato específico (MALLMAN et al., 2015). Para tal, foi utilizado um kit comercial para detecção de Aflatoxinas Totais, denominado “*Total Aflatoxin ELISA Kit Low Matrix (Quant.) SE120007*”, da empresa Sigma-Aldrich® (Saint Louis – EUA).

Os procedimentos para quantificação das Aflatoxinas Totais foram integralmente realizados segundo o Boletim Técnico que acompanha o Kit adquirido na empresa Sigma-Aldrich®.

4.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas segundo delineamento inteiramente casualizado (DIC). Nos testes *in vitro*, analisou-se a inibição percentual média em relação às variáveis: período de incubação (em dias), a dosagem do óleo essencial, e a interação entre o período de incubação (dias) e a dosagem de óleo, para cada fungo e óleo utilizados. A Análise de Variância (ANOVA) foi realizada, e os resultados foram comparados pelo Teste de Scott-Knott a um nível de 5% de significância. Para a relação entre a dosagem de óleo essencial aplicada e a inibição percentual média foi realizada uma análise de regressão, também a um nível de 5% de significância.

Nos testes nos grãos de milho foi utilizado o DIC, e montada a ANOVA. Avaliou-se o percentual de inibição fúngica em relação ao controle para cada dosagem de óleo aplicada, pelo Teste de Scott-Knott a um nível de 5% de significância.

No que tange a análise da presença de Aflatoxinas Totais, elaborou-se a ANOVA, na qual foi comparada o teor de Aflatoxinas em função das dosagens de óleo essencial aplicadas e da espécie de fungo produtora, segundo o Teste de Scott-Knott a 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise dos constituintes dos óleos essenciais

5.1.1. Óleo essencial de hortelã (*M. spicata* L.)

Apresenta-se na Figura 03 o cromatograma do OE de *M. spicata* L. utilizado no trabalho.

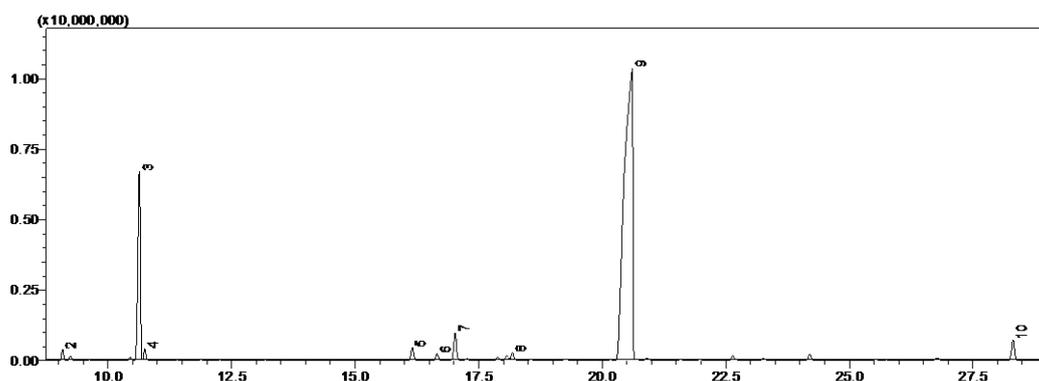


Figura 03. Cromatograma do OE de *M. spicata* utilizado no experimento.

Apresenta-se na Tabela 02 o tempo médio de retenção e o índice de Kovats dos componentes identificados pelo cromatograma apresentado na Figura 03.

Tabela 02. Principais componentes do OE de *M. spicata*, determinados por CG-EM.

Pico	Componente	Tempo de retenção (min)	Índice de Kovats*		
			Obtido no presente trabalho	Adams (1995)	Outros Autores
1	Beta pineno	8,621	989	980	981 ⁽¹⁾ /978 ⁽²⁾ /979 ⁽³⁾
2	Mirceno	9,083	996	991	994 ⁽⁴⁾
3	Limoneno	10,640	1033	1031	1039 ⁽¹⁾ /1032 ⁽²⁾ /1031 ⁽³⁾
4	1,8 Cineol (Eucaliptol)	10,745	1035	1033	1035 ⁽²⁾
5	Menthona	16,162	1152	1154	1154 ⁽⁵⁾
9	Carvona	20,629	1251	1242	1260 ⁽²⁾ /1246 ⁽³⁾

*Coluna DB-5. ⁽¹⁾ Choi (2003); ⁽²⁾ Boukhebt et al. (2011); ⁽³⁾ Scherer et al. (2013); ⁽⁴⁾ Högnadottir e Rouseff (2003); ⁽⁵⁾ Abderrezak et al. (2014).

Apresenta-se na Tabela 03 a identificação dos principais componentes do óleo essencial de *M. spicata* utilizado neste trabalho, em comparação com outros estudos. Verifica-se em todos a identificação dos principais componentes considerados para a espécie, carvona e limoneno.

Tabela 03. Comparação dos principais componentes do OE de *M. spicata*, identificados neste trabalho, em relação a outros trabalhos publicados.

Componente	Óleo essencial de <i>M. spicata</i> utilizado	Hussain et al. (2010)	Boukhebti et al. (2011)	Scherer et al. (2013)	Chowdhury et al. (2007)
Beta pineno	x		x	x	
Mirceno	x		x	x	
Limoneno	x	x	x	x	x
1,8 Cineol	x	x	x		x
Mentona	x	x			
Carvona	x	x	x	x	x

A concentração quantificada de carvona na composição do OE foi de 61,89%, seguida pelo limoneno com 30,83%. A carvona tem sido identificada como principal constituinte de plantas, como o cominho – *Carum carvi* L. (BUCHBAUER et al., 2005), e a *M. spicata* L. (BOUKHEBTI et al., 2011; SCHERER et al., 2013; KEDIA et al., 2014), o que vai de encontro aos dados obtidos no presente estudo.

A composição dos óleos essenciais pode variar segundo a sua localização de cultivo, assim como de acordo com a época de coleta da planta, estágio de desenvolvimento, condições climáticas durante seu desenvolvimento, temperatura, umidade, radiação e tipo de solo (SIMÕES et al., 2003; SCHERER et al., 2013).

5.1.2 Óleo essencial de *C. aurantium* L. subesp. *dulcis*

Apresenta-se na Figura 04 a identificação dos principais componentes do OE de *C. aurantium*, por meio do equipamento CG-EM.

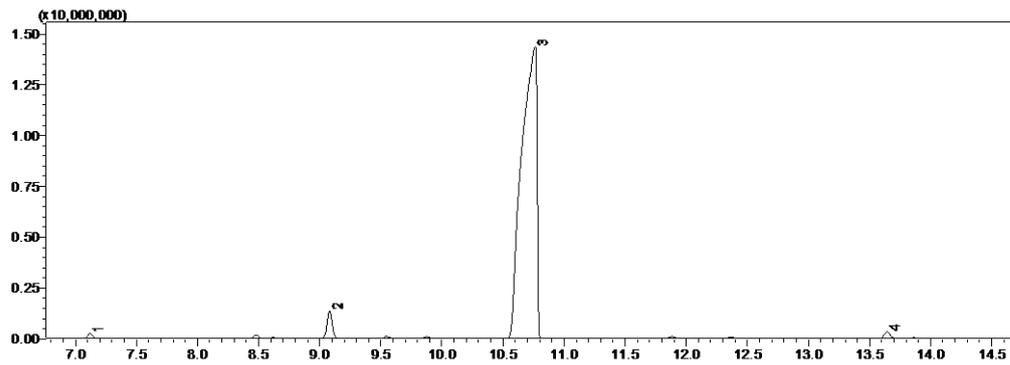


Figura 04. Cromatograma do OE de *C. aurantium* L. subesp. *dulcis*

Apresenta-se na Tabela 04 o tempo médio de retenção e o Índice de Kovats (IK) dos componentes identificados pelo cromatograma apresentado na Figura 06.

Tabela 04. Principais componentes do OE de *C. aurantium* L. subesp. *dulcis*, determinados por CG-EM.

Pico	Componente	Tempo de retenção (min)	Índice de Kovats*		
			Obtido no presente trabalho	Adams (1995)	Outros Autores
1	n.i.	7,123	964	-	-
2	Mirceno	9,085	996	991	994 ⁽³⁾
3	Limoneno	10,770	1036	1031	1039 ⁽¹⁾ /1028 ⁽²⁾
4	Linalol	13,648	1094	1098	1095 ⁽²⁾

* n.i. – não identificado. Coluna DB-5. ⁽¹⁾ Choi (2003); ⁽²⁾ Abderrezak et al. (2014); ⁽³⁾ Högnadottir e Rouseff (2003).

A Tabela 05 traz a identificação dos principais componentes do OE de *C. aurantium* L. subesp. *dulcis*, utilizado neste trabalho, em comparação com outros publicados. Verifica-se em todos a identificação do principal composto considerado para a variedade, o limoneno.

A concentração de limoneno quantificada na composição do OE foi de 94,71%. O limoneno, assim como nesse trabalho, tem sido identificado como principal constituinte dos OEs de outras espécies do gênero *Citrus*: *C. limon*, *C. aurantifolia*, *C. limonia*, *C. latifolia* (SIMAS et al., 2017), *C. medica* (LOU et al., 2017), *C. deliciosa* (SILVESTRE et al., 2016), *C. sinensis* (SHARMA e TRIPATHI, 2008), *C. reticulata* (TAO et al., 2014).

Tabela 05. Comparação dos principais componentes do OE de *C. aurantium* L. subesp. *dulcis* identificados neste trabalho, com relação à outros trabalhos publicados.

Componente	Óleo essencial de <i>C. aurantium</i> utilizado	Pultrini et al. (2006)	Abderrezak et al. (2014)	Zarrad et al. (2015)
Mirceno	x	x		x
Limoneno	x	x	x	x
Linalol	x		x	x

5.2 Testes *in vitro*

5.2.1 *Mentha spicata* L. x *Aspergillus brasiliensis*

O crescimento micelial médio diário da espécie *A. brasiliensis* em relação a diferentes dosagens do OE de *M. spicata* está representado na Figura 05.

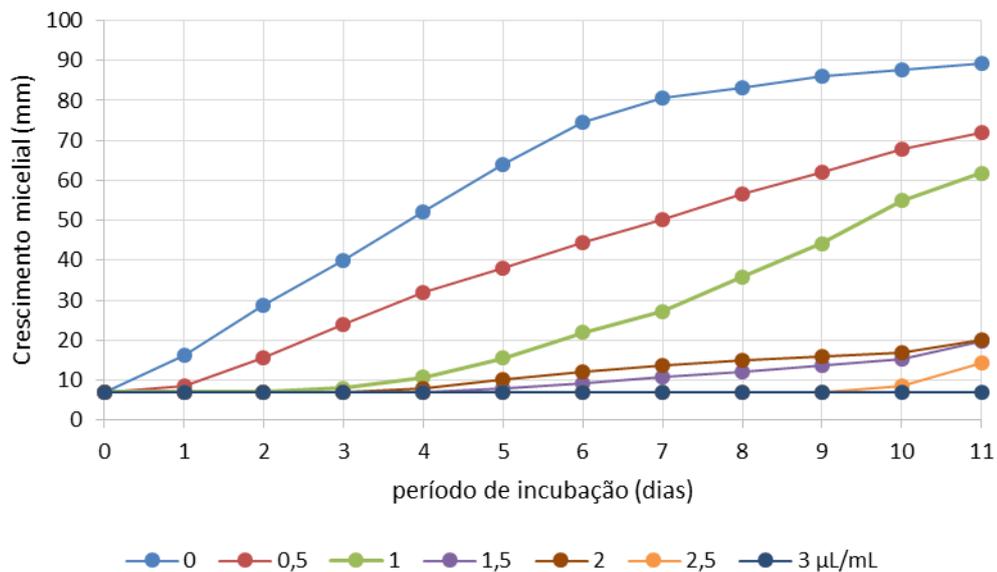


Figura 05. Crescimento micelial médio (mm) diário do *A. brasiliensis* segundo dosagens ($\mu\text{L/mL}$) aplicadas do OE de *M. spicata*

Percebe-se que o tratamento controle (sem óleo essencial) atingiu o diâmetro máximo da placa (90,00 mm) no décimo-primeiro dia de incubação. Nota-se também que há um decréscimo em função do aumento das dosagens. Na dosagem 3 $\mu\text{L/mL}$ observa-se que não houve crescimento.

Na literatura são escassos os trabalhos que avaliem o crescimento micelial fúngico diariamente. Nos trabalhos de Riahi et al. (2013), Manganyi et al. (2015), dentre outros autores, apresenta-se o crescimento ao final de um período pré-

determinado, geralmente de 7 dias, realizando cálculos do percentual de inibição, comparando os tratamentos (dosagens) ao controle.

Na Tabela 06 apresenta-se o resumo da análise de variância do efeito do óleo essencial de *M. spicata* e do tempo de incubação no crescimento micelial do fungo *A. brasiliensis*.

Tabela 06. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do OE de *M. spicata*, durante o período de incubação (dias) sobre o crescimento micelial do fungo *A. brasiliensis*.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Dose de óleo essencial (D)	5	26272,07	*
Período de incubação (P)	10	2349,52	*
D x P	50	475,75	*
Erro	264	109,41	-
Total	329	-	-
CV = 12,48%			

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Na Tabela 06 tem-se apontado que houve diferença significativa para as diferentes doses (D), período de incubação (P), assim como para a interação (D x P), indicando que a variação do percentual de inibição depende da interação entre a dose de óleo essencial aplicada e período de exposição do fungo ao óleo.

Os valores médios do percentual inibitório para a interação período de incubação e dose de óleo essencial (OE) são apresentados na Tabela 07.

Tabela 07. Inibição média percentual, *in vitro*, no crescimento do fungo *A. brasiliensis* em diferentes doses ($\mu\text{L/mL}$) de OE de *M. spicata*

Dia	Dosagem ($\mu\text{L/mL}$)					
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
1	83 ^{aA}	100 ^{bA}				
2	60 ^{aB}	100 ^{bA}				
3	49 ^{aC}	97 ^{bA}	100 ^{bA}	100 ^{bA}	100 ^{bA}	100 ^{bA}
4	45 ^{aC}	92 ^{bA}	98 ^{bA}	98 ^{bA}	100 ^{bA}	100 ^{bA}
5	45 ^{aC}	85 ^{bB}	96 ^{bA}	95 ^{bA}	100 ^{bA}	100 ^{bA}
6	45 ^{aC}	78 ^{bB}	94 ^{cA}	92 ^{cA}	100 ^{cA}	100 ^{cA}
7	41 ^{aC}	73 ^{bB}	93 ^{cA}	91 ^{cA}	100 ^{cA}	100 ^{cA}
8	35 ^{aD}	62 ^{bC}	91 ^{cA}	90 ^{cA}	100 ^{cA}	100 ^{cA}
9	30 ^{aD}	53 ^{bC}	89 ^{cB}	89 ^{cA}	100 ^{cA}	100 ^{cA}
10	25 ^{aD}	41 ^{bD}	84 ^{cB}	88 ^{cA}	98 ^{dA}	100 ^{dA}
11	21 ^{aD}	33 ^{aD}	80 ^{bB}	84 ^{bA}	91 ^{cA}	100 ^{cA}

*As médias seguidas de uma mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Percebe-se que a eficácia do óleo essencial na inibição do fungo foi decrescendo ao longo do período de incubação. Até o quinto dia de incubação, nota-se que houve máxima inibição para todas as dosagens (estatisticamente), à exceção da dosagem 0,5 µL/mL. Este fato pode ser útil em períodos menores de armazenamento (com conseqüente aplicação do OE), o que representaria uma economia significativa do produto (OE) para se alcançar o efeito desejado, reduzindo os custos da aplicação.

A dosagem 3,0 µL/mL mostrou eficácia de 100% no controle do fungo até o último dia, não diferindo estatisticamente da dosagem 2,5 µL/mL no decorrer do experimento, tanto em eficácia quanto em relação aos períodos de análise. A dosagem 1,0 µL/mL demonstrou alta eficiência até o quarto dia, enquanto que a dosagem 1,5 µL/mL foi altamente eficaz até o oitavo dia.

Não há evidências na literatura de estudos que utilizem o óleo essencial de alguma das espécies do gênero *Mentha* no controle do *A. brasiliensis*. No entanto, pode-se citar outros trabalhos que utilizaram óleos essenciais destas espécies no controle de outros fungos filamentosos. Riahi et al. (2013), por exemplo, verificaram que dosagens de 4,0 µL/mL de óleo essencial de *Mentha rotundifolia* foi capaz de inibir o crescimento do fungo *Aspergillus niger*, enquanto que dosagens de 8,0 µL/mL tinham atividade fungicida, ou seja, eram letais a estes seres.

Manganyi et al. (2015), também analisaram o efeito inibitório de óleos essenciais e alguns princípios ativos, dentre os quais o óleo de *M. spicata*, no controle de outra espécie, o *Fusarium oxysporum*. Os autores observaram que dosagens superiores a 2,0 µL/mL mostraram 100% de eficácia para o fungo estudado em sete dias de análise.

5.2.2 *Mentha spicata* L. x *Aspergillus flavus*

O crescimento micelial médio diário da espécie *Aspergillus flavus* em relação a diferentes dosagens do óleo essencial de *Mentha spicata* L. está apresentado na Figura 06.

Percebe-se que o tratamento controle (sem óleo essencial) atingiu o diâmetro máximo da placa (90,00 mm) no décimo-segundo dia de análise, diferentemente do que ocorreu com o *A. brasiliensis*, que atingiu seu ápice no décimo-primeiro dia.

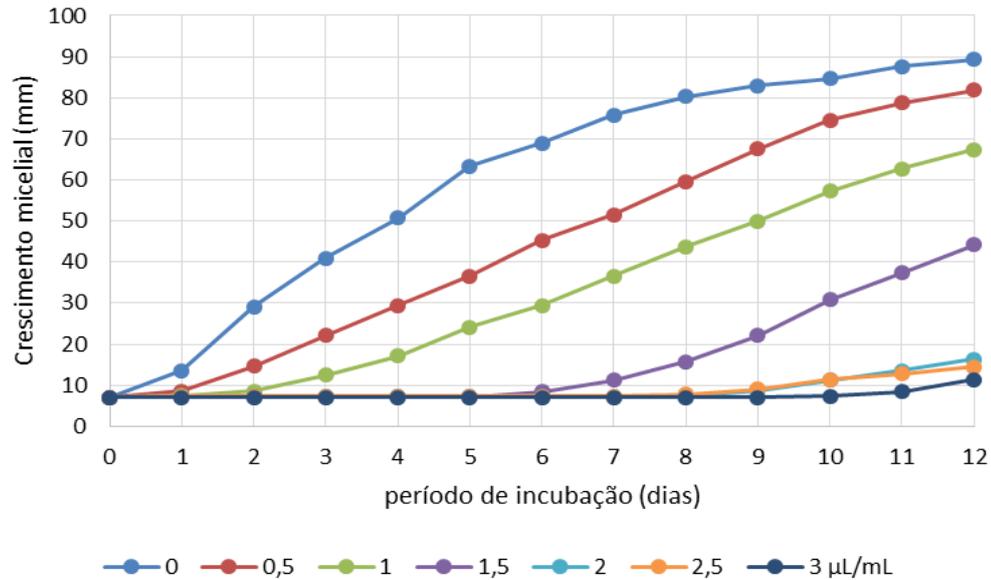


Figura 06. Crescimento micelial médio (mm) diário do *A. flavus* segundo dosagens ($\mu\text{L/mL}$) aplicadas do OE de *M. spicata*

Na Tabela 08 apresenta-se o resumo da análise de variância do efeito do óleo essencial de *M. spicata* e do tempo de incubação no crescimento micelial do fungo *A. flavus*.

Tabela 08. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do OE de *M. spicata*, durante o período de incubação (dias) sobre o crescimento micelial do fungo *A. flavus*.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Dose de óleo essencial (D)	5	36927,61	*
período de Incubação (P)	11	3756,34	*
D x P	55	619,25	*
Erro	288	52,29	-
Total	359	-	-

CV = 9,04%

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Na Tabela 08 pode-se verificar que houve diferença significativa para as diferentes doses (D) utilizadas, para o período de incubação (P), assim como para a interação (D x P), indicando que a variação do percentual de inibição depende da interação entre a dose de óleo essencial aplicada e período de exposição do micro-organismo ao óleo.

Os valores médios do percentual de inibição para a interação período de incubação e dose de óleo essencial são apresentados na Tabela 09.

Tabela 09. Inibição média percentual, *in vitro*, no crescimento do fungo *A. flavus* em diferentes doses ($\mu\text{L/mL}$) de OE de *Mentha spicata* L.

Dia	Dosagem ($\mu\text{L/mL}$)					
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
1	74 ^{aA}	93 ^{bA}	100 ^{bA}	100 ^{bA}	100 ^{bA}	100 ^{bA}
2	69 ^{aA}	94 ^{bA}	100 ^{bA}	100 ^{bA}	100 ^{bA}	100 ^{bA}
3	59 ^{aB}	85 ^{bA}	100 ^{cA}	100 ^{cA}	100 ^{cA}	100 ^{cA}
4	52 ^{aB}	78 ^{bB}	100 ^{cA}	100 ^{cA}	100 ^{cA}	100 ^{cA}
5	51 ^{aB}	72 ^{bB}	100 ^{cA}	100 ^{cA}	100 ^{cA}	100 ^{cA}
6	40 ^{aC}	65 ^{bC}	98 ^{cA}	100 ^{cA}	100 ^{cA}	100 ^{cA}
7	36 ^{aC}	58 ^{bD}	94 ^{cA}	100 ^{cA}	100 ^{cA}	100 ^{cA}
8	28 ^{aD}	50 ^{bE}	88 ^{cA}	100 ^{dA}	100 ^{dA}	100 ^{dA}
9	21 ^{aE}	44 ^{bE}	80 ^{cB}	98 ^{dA}	97 ^{dA}	100 ^{dA}
10	14 ^{aF}	36 ^{bF}	69 ^{cC}	95 ^{dA}	95 ^{dA}	100 ^{dA}
11	11 ^{aF}	31 ^{bF}	62 ^{cD}	92 ^{dA}	93 ^{dA}	98 ^{dA}
12	9 ^{aF}	27 ^{bF}	55 ^{cD}	87 ^{dA}	91 ^{dA}	95 ^{dA}

*As médias seguidas de uma mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Assim como para o efeito do OE de *M. spicata* para o *A. brasiliensis*, pode-se observar um decréscimo da atividade inibitória do óleo frente ao fungo ao longo do período de incubação. Até o segundo dia observa-se que todas as dosagens, à exceção de 0,5 $\mu\text{L/mL}$, apresentaram 100% de eficácia, o que pode ser proveitoso, pensando no produto final, para períodos curtos de armazenamento.

A dosagem 0,5 $\mu\text{L/mL}$ não é viável para aplicação em nenhum período, pois já no primeiro dia de incubação apresenta apenas 74% de inibição, chegando ao final dos 12 dias a 9% de inibição.

Verifica-se que nenhuma dosagem demonstrou 100% de inibição até o último dia de análise. No entanto, de acordo com a análise estatística realizada, a um nível de 5% de significância, as dosagens 2,0; 2,5 e 3,0 $\mu\text{L/mL}$ demonstraram estatisticamente a mesma eficácia ao longo dos dias de análise. Já a dosagem 1,5 $\mu\text{L/mL}$ não apresentou crescimento fúngico até o quinto dia, mantendo sua eficácia até o oitavo dia.

Sokovic et al. (2009) avaliaram a eficácia da aplicação do OE de *M. spicata* (49,5% de carvona, 5,8% de limoneno). Os pesquisadores concluíram, através do método da difusão em ágar, após 3 semanas de incubação a temperatura ambiente, que concentrações próximas a 2,5 $\mu\text{L/mL}$ eram capazes de inibir totalmente o crescimento das espécies: *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*.

Apesar do OE de *M. spicata* utilizado por Sokovic et al. (2009) apresentar um teor inferior de carvona ao do OE utilizado neste estudo, e o período de incubação e temperatura também variarem, os resultados vão de encontro aos observados no presente trabalho, e apontam a eficiência da aplicação do OE de *M. spicata* para fungos do gênero *Aspergillus*.

Kedia et al. (2014) também analisaram o efeito inibitório de diferentes dosagens do óleo essencial de *M. spicata* (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0 $\mu\text{L/mL}$) aplicadas ao *Aspergillus flavus*, em testes in vitro, e constataram que ao final de 7 dias de experimento, apenas a dosagem 1,0 $\mu\text{L/mL}$ apresentou 100% de eficiência frente ao fungo. A mesma dosagem também foi testada em outros fungos do gênero (*A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. luchensis*, *A. niger*, *A. terreus* e *A. unguis*), constatando 100% de eficácia em todos eles, à exceção das espécies *A. luchensis* e *A. terreus*, os quais apresentaram respectivamente, 91,7 e 75,7 de inibição percentual.

Os resultados aqui obtidos diferem de Kedia et al. (2014). Os referidos autores verificaram uma inibição de 100% para o fungo com a dosagem de 1,0 $\mu\text{L/mL}$, no sétimo dia de análise, no presente trabalho observou-se apenas 58% de inibição para mesma dosagem e período de incubação. Isto pode estar relacionado a composição dos óleos essenciais, ainda que a composição da carvona neste trabalho seja próxima ao dos referidos autores, a composição de limoneno no OE usado neste trabalho (30,83%) é superior ao utilizado por Kedia et al. (2014) (25,59%). Como foi mencionado anteriormente, o limoneno se degrada facilmente (BURNHAN, 2008), podendo refletir na inibição fúngica ao longo do período de incubação.

Outro fato interessante a ser analisado é que, na composição do OE utilizado neste estudo, a carvona e o limoneno perfazem 92,72% da composição do mesmo, enquanto que para o OE utilizado no trabalho de Kedia et al. (2014), os componentes em questão somam 85,19% do total. Isto pode ser um indício que outros componentes, presentes em menor quantidade, podem estar ligados ao poder antimicrobiano do OE de *M. spicata*.

Por questões de ordem prática, para que haja uma padronização dos testes nos grãos realizados posteriormente, optou-se por tomar como referência a dosagem 2,5 $\mu\text{L/mL}$, na qual o óleo essencial de *M. spicata* se mostrou eficaz frente tanto ao *A. brasiliensis*, quanto ao *A. flavus*.

5.2.3 *Citrus aurantium* L. subesp. *dulcis* x *Aspergillus brasiliensis*

O crescimento micelial médio diário da espécie *Aspergillus brasiliensis* em relação a diferentes dosagens do óleo essencial de *C. aurantium* subesp. *dulcis* está apresentado na Figura 07.

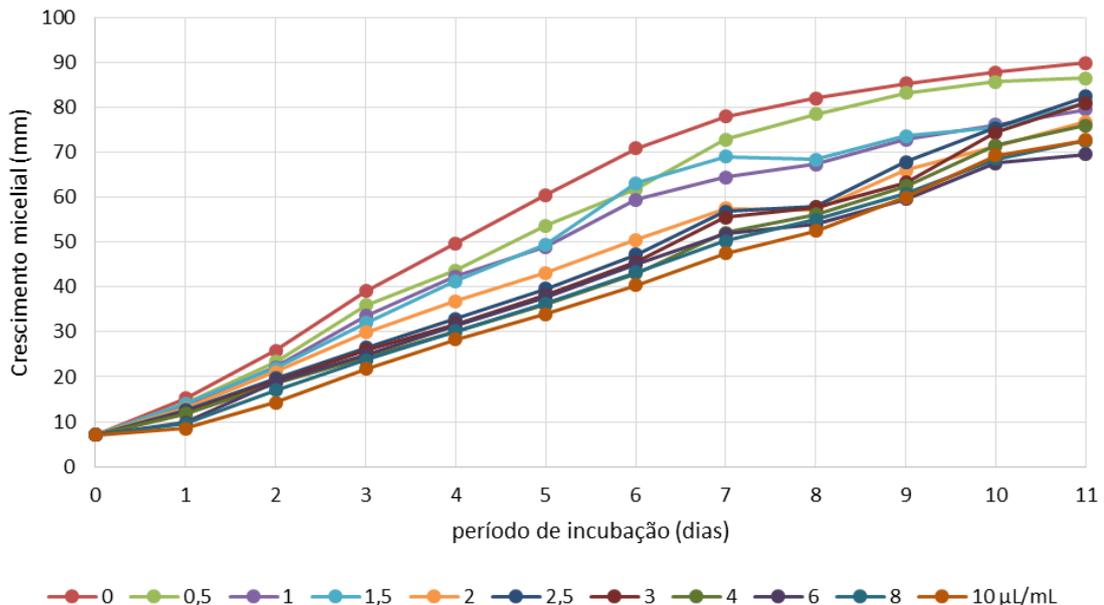


Figura 07. Crescimento micelial médio (mm) diário do *A. brasiliensis* segundo dosagens ($\mu\text{L/mL}$) aplicadas do OE de *C. aurantium* subesp. *dulcis*.

Observa-se que o tratamento controle (sem óleo essencial) atingiu o diâmetro máximo da placa (90,00 mm) no décimo-primeiro dia de análise, demonstrando similaridade com o resultado obtido para a inibição do *A. brasiliensis* com o OE de *M. spicata*.

Na Figura 07, pela proximidade das curvas de crescimento, pode-se supor que, independentemente da dosagem de OE de *C. aurantium* L. subesp. *dulcis* aplicada, o crescimento do fungo ocorre dentro de parâmetros próximos.

Na Tabela 10 apresenta-se o resumo da análise de variância do efeito do óleo essencial de *C. aurantium* subesp. *dulcis* e do período de incubação no crescimento micelial do fungo *A. brasiliensis*.

Tabela 10. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do OE de *C. aurantium*, durante o período de incubação (dias) sobre o crescimento micelial do fungo *A. brasiliensis*.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Dose de óleo essencial (D)	9	7724,33	*
Período de Incubação (P)	10	3229,93	*
D x P	90	199,32	*
Erro	440	74,86	-
Total	549	-	-
CV = 29,04%			

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Houve diferença significativa para as diferentes doses (D) utilizadas, para as repetições, para o período de incubação (P), assim como para a interação (D x P), indicando que a variação do percentual de inibição depende da interação entre a dose de óleo essencial aplicada e período de exposição do fungo ao óleo.

Verifica-se também que, o coeficiente de variação (CV), a relação entre o desvio padrão e a média geral, é 29,04%, número notadamente superior àqueles encontrados para a aplicação do OE de *M. spicata* frente ao *A. brasiliensis* (12,48%) e ao *A. flavus* (9,04%). Diante deste dado, pode-se inferir que para o OE de *C. aurantium* houve maior variação dos resultados em relação ao OE de *M. spicata*, o que por sua vez pode estar relacionado com a facilidade de degradação do seu principal componente, o limoneno (BOTANICAL.COM, 2016), interferindo nos resultados obtidos.

Os valores médios do percentual de inibição para a interação período de incubação e dose de óleo essencial são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Inibição média percentual, *in vitro*, no crescimento do fungo *A. brasiliensis* em diferentes doses ($\mu\text{L/mL}$) de OE de *C. aurantium*.

Dia	Dosagem ($\mu\text{L/mL}$)									
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	4,0	6,0	8,0	10,0
1	14 ^{aA}	20 ^{aA}	15 ^{aA}	27 ^{bA}	32 ^{bA}	40 ^{cA}	42 ^{cA}	65 ^{dA}	69 ^{dA}	82 ^{eA}
2	13 ^{aA}	19 ^{aA}	20 ^{aA}	25 ^{aB}	33 ^{bA}	36 ^{bA}	38 ^{bA}	37 ^{bB}	47 ^{bB}	61 ^{cB}
3	10 ^{aA}	17 ^{aA}	22 ^{bA}	29 ^{bA}	39 ^{cA}	41 ^{cA}	46 ^{cA}	44 ^{cB}	48 ^{cB}	54 ^{cB}
4	14 ^{aA}	17 ^{aA}	20 ^{aA}	30 ^{bA}	40 ^{cA}	42 ^{cA}	46 ^{cA}	43 ^{cB}	46 ^{cB}	50 ^{cB}
5	13 ^{aA}	22 ^{aA}	21 ^{aA}	32 ^{bA}	39 ^{bA}	42 ^{bA}	46 ^{bA}	43 ^{bB}	45 ^{bB}	49 ^{bB}
6	14 ^{aA}	18 ^{aA}	11 ^{aA}	32 ^{bA}	37 ^{bA}	40 ^{bA}	44 ^{bA}	41 ^{bB}	43 ^{bB}	48 ^{bB}
7	12 ^{aA}	23 ^{aA}	17 ^{aA}	33 ^{bA}	34 ^{bA}	35 ^{bA}	40 ^{bA}	40 ^{bB}	42 ^{bB}	46 ^{bB}
8	5 ^{aB}	20 ^{bA}	18 ^{bA}	33 ^{cA}	32 ^{cA}	32 ^{cA}	35 ^{cA}	37 ^{cB}	36 ^{cC}	39 ^{cC}
9	3 ^{aB}	16 ^{bA}	15 ^{bA}	25 ^{cB}	22 ^{cB}	28 ^{cA}	29 ^{cB}	33 ^{cC}	31 ^{cC}	32 ^{cC}
10	3 ^{aB}	14 ^{bA}	15 ^{bA}	20 ^{bB}	15 ^{bB}	17 ^{bB}	20 ^{bB}	25 ^{bC}	24 ^{bD}	23 ^{bD}
11	4 ^{aB}	12 ^{aA}	11 ^{aA}	16 ^{bB}	9 ^{aB}	11 ^{aB}	17 ^{bB}	25 ^{bC}	21 ^{bD}	21 ^{bD}

*As médias seguidas de uma mesma letra, nas colunas letras maiúsculas e nas linhas letras minúsculas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que assim como nos demais casos, há uma perda da eficiência do óleo frente ao fungo no decorrer do período de incubação. O OE de *C. aurantium*, porém, se mostrou muito menos eficaz em relação ao OE de *M. spicata*. Nenhuma das dosagens aplicadas, mesmo as dosagens superiores (4,0 a 10,0 $\mu\text{L/mL}$), apresentou 100% de inibição em nenhum dos tempos avaliados.

O valor máximo de inibição obtido neste teste foi para a maior dosagem, 10 $\mu\text{L/mL}$, no primeiro dia, de 82%. Esta, por sua vez, não se manteve ao longo do tempo, reduzindo para 21% de inibição do fungo ao final do 11^o dia.

Não foram encontrados na literatura estudos que utilizassem o OE de *C. aurantium* no controle do *A. brasiliensis*, no entanto, assim como nos outros casos, pode-se comparar com trabalhos que utilizaram espécies do mesmo gênero.

Sharma e Tripathi (2008) avaliaram o efeito do óleo essencial de *Citrus sinensis* no controle do *Aspergillus niger*, e verificaram que dosagens de 3,0 e 3,5 $\mu\text{L/mL}$ eram capazes de inibir completamente o crescimento fúngico até sete dias, e que dosagens superiores a 1,5 $\mu\text{L/mL}$ já eram capazes de inibir a germinação de esporos nesta espécie fúngica. O OE utilizado pelos referidos autores apresentava 84,2% de limoneno em sua composição, enquanto que no OE utilizado no presente estudo a composição de limoneno quantificada foi de 94,71%, ou seja, mais de 10% superior.

Corroborando para isto, a explicação de Maróstica Júnior e Pastore (2007), que afirmam que o Limoneno, principal constituinte do óleo essencial de laranja-doce, tem baixa solubilidade em água, alta tendência a se oxidar, além da polimerização (não mantém, portanto, sua estrutura), podendo auxiliar na explicação do ocorrido.

Este último dado, aliado ao fato do teste ser realizado com espécies do mesmo gênero, mas distintas, fisiologicamente e quimicamente, podem explicar de certa forma a discrepância dos resultados aqui obtidos com o obtido na literatura.

5.2.4 *Citrus aurantium* L. subesp. *dulcis* x *Aspergillus flavus*

O crescimento micelial médio diário da espécie *Aspergillus flavus* em relação a diferentes dosagens do óleo essencial de *C. aurantium* L. subesp. *dulcis* está apresentado na Figura 08. Percebe-se que o tratamento controle (sem óleo essencial) atingiu o diâmetro máximo da placa (90,00 mm) no décimo-segundo dia de análise, fato que também ocorreu no tratamento controle do teste utilizando o OE de *M. spicata* frente ao *A. flavus*.

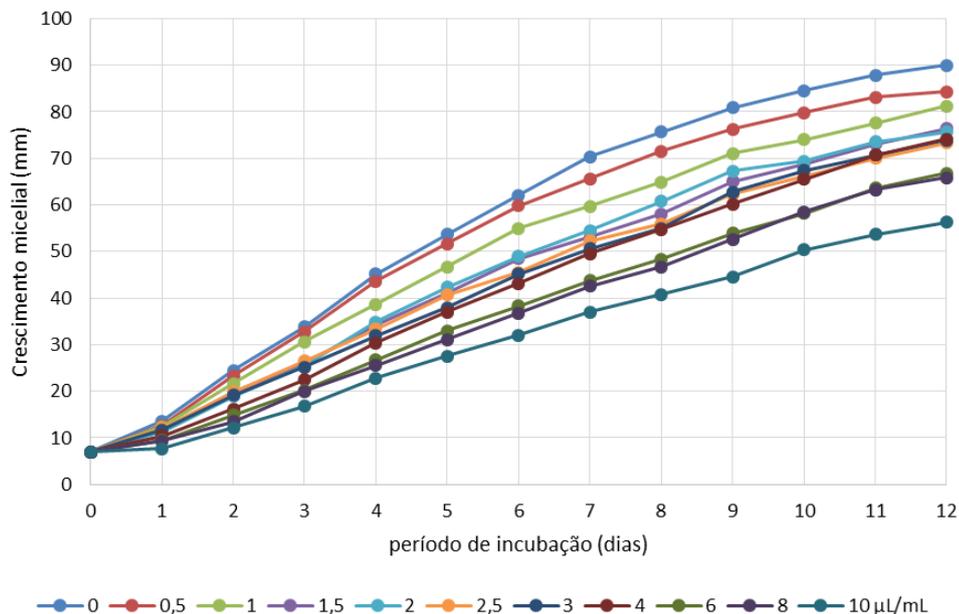


Figura 08. Crescimento micelial médio (mm) diário do *A. flavus* segundo dosagens ($\mu\text{L/mL}$) aplicadas do OE de *C. aurantium* L. subesp. *dulcis*.

Observa-se que há uma pequena variação de crescimento micelial médio diário entre as dosagens de OE aplicadas. Isso se reflete, na proximidade das curvas no gráfico da Figura 08.

Na Tabela 12 apresenta-se o resumo da análise de variância do efeito do óleo essencial de *C. aurantium* L. subesp. *dulcis* e do tempo de incubação no crescimento micelial do fungo *A. flavus*.

Tabela 12. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do OE de *C. aurantium*, durante o período de incubação (dias) sobre o crescimento micelial do fungo *A. flavus*.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Dose de óleo essencial (D)	9	13157,43	*
Tempo de Incubação (t)	11	1890,35	*
D x t	99	134,06	*
Erro	480	51,57	-
Total	599	-	-
CV = 23,88%			

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Houve diferença significativa para as doses (D) utilizadas, para o período de incubação (P), assim como para a interação (D x P), indicando que a variação do percentual de inibição depende da interação entre a dose de óleo essencial aplicada e período de exposição do fungo ao óleo. Assim como na avaliação do OE de *C. aurantium* para o *A. brasiliensis*, o CV foi elevado, sendo um indício que as variações obtidas nos resultados estão atreladas ao OE utilizado.

Os valores médios da inibição fúngica para a interação período de incubação e dose de OE estão representados na Tabela 13.

Tabela 13. Inibição média percentual, *in vitro*, no crescimento do fungo *A. flavus* em diferentes doses ($\mu\text{L/mL}$) de OE de *C. aurantium*.

Dia	Dosagem ($\mu\text{L/mL}$)									
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	4,0	6,0	8,0	10,0
1	13 ^{aA}	18 ^{aA}	27 ^{bA}	33 ^{bA}	23 ^{bA}	28 ^{bA}	48 ^{cA}	62 ^{dA}	65 ^{dA}	90 ^{eA}
2	7 ^{aA}	16 ^{bA}	27 ^{cA}	32 ^{cA}	27 ^{cA}	31 ^{cA}	47 ^{dA}	54 ^{dB}	63 ^{eA}	70 ^{eB}
3	4 ^{aA}	12 ^{aA}	29 ^{bA}	32 ^{bA}	27 ^{bA}	32 ^{bA}	43 ^{cA}	51 ^{dB}	52 ^{dB}	63 ^{eC}
4	4 ^{aA}	17 ^{bA}	29 ^{cA}	27 ^{cA}	31 ^{cA}	35 ^{cA}	39 ^{dB}	48 ^{eB}	51 ^{eB}	59 ^{eC}
5	4 ^{aA}	15 ^{bA}	27 ^{cA}	24 ^{cB}	28 ^{cA}	34 ^{dA}	36 ^{dB}	44 ^{eC}	48 ^{eB}	56 ^{fC}
6	4 ^{aA}	13 ^{aA}	25 ^{bA}	24 ^{bB}	30 ^{bA}	31 ^{bA}	34 ^{cB}	43 ^{dC}	46 ^{dC}	54 ^{eC}
7	7 ^{aA}	17 ^{bA}	27 ^{cA}	25 ^{cB}	29 ^{cA}	31 ^{cA}	33 ^{cB}	42 ^{dC}	44 ^{dC}	53 ^{eC}
8	6 ^{aA}	16 ^{bA}	26 ^{cA}	22 ^{cB}	29 ^{cA}	30 ^{cA}	30 ^{cC}	40 ^{dC}	42 ^{dC}	51 ^{eC}
9	6 ^{aA}	13 ^{aA}	22 ^{bB}	19 ^{bB}	25 ^{bA}	25 ^{bB}	28 ^{bC}	37 ^{cC}	38 ^{cC}	49 ^{dD}
10	6 ^{aA}	14 ^{aA}	20 ^{bB}	19 ^{bB}	24 ^{bA}	22 ^{bB}	25 ^{bC}	34 ^{cD}	33 ^{cD}	44 ^{dD}
11	6 ^{aA}	13 ^{aA}	18 ^{bB}	18 ^{bB}	22 ^{bA}	21 ^{bB}	21 ^{bC}	30 ^{cD}	30 ^{cD}	42 ^{dD}
12	6 ^{aA}	10 ^{aA}	16 ^{bB}	17 ^{bB}	20 ^{bA}	19 ^{bB}	19 ^{bC}	27 ^{cD}	29 ^{cD}	40 ^{dD}

*As médias seguidas de uma mesma letra, nas colunas letras maiúsculas e nas linhas letras minúsculas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Na Tabela 13 pode-se observar, que assim como para o *A. brasiliensis*, tal OE não se mostrou eficiente, de acordo com os parâmetros deste trabalho. Em nenhuma das dosagens analisadas foi observada 100% de inibição, sendo a máxima de 90%, para a maior dosagem (10 µL/mL) por 24h, a qual por sua vez, não se manteve ao longo dos dias de exposição, reduzindo-se a 40% ao final do 12º dia. Este valor foi superior ao observado para o *A. brasiliensis*, o que indica que o *A. flavus* é mais sensível à este OE que o micro-organismo anterior.

Singh et al. (2010a) testaram a eficiência do óleo essencial de *Citrus reticulata* frente ao mesmo micro-organismo, e constataram que dosagens superiores a 0,75 µL/mL eram capazes de inibir o crescimento do fungo ao final de 7 dias de incubação. Eles utilizaram também a metodologia da difusão em ágar, porém utilizando como solvente a acetona, o que aliado ao fato de se tratar de distintas espécies vegetais produtoras de OEs (ainda que do mesmo gênero), pode explicar a discrepância dos resultados. Apesar de não terem quantificado os componentes do OE de *C. reticulata* neste trabalho, os autores apontam que Chutia et al. (2009), identificaram apenas 46,7% de limoneno na composição do OE da espécie, o que frente aos 94,71% identificados no presente trabalho, assim como explicado anteriormente nos outros casos, pode explicar o ocorrido.

Singh et al. (2010b), em outro estudo, verificaram que os OEs de *Citrus máxima* e *Citrus sinensis*, na dosagem 0,75 µL/mL, inibiram 100% o crescimento deste fungo. O percentual de limoneno identificado no OE de *C. máxima* foi de 31,83%, enquanto que para o OE de *C. sinensis* foi de 69,78%, mais uma vez, menores que o OE da espécie utilizada no presente estudo.

Simas et al. (2017) avaliaram o efeito dos OEs de espécies do gênero *Citrus* e de alguns dos seus compostos majoritários sob o desenvolvimento de algumas espécies fúngicas, através do método da microdiluição, a temperatura ambiente, durante 7 dias. Eles constataram que o limoneno – principal constituinte do OE de *C. aurantium* (item 5.1.2) - ao invés de inibir o desenvolvimento da espécie *Penicillium digitatum*, era capaz de estimular o crescimento da mesma com o aumento das dosagens aplicadas. Cada fungo pode responder de maneira distinta a aplicação do OE, seu desenvolvimento pode ser inibido ou estimulado, em maior ou menor grau.

Já Bento (2016), ao avaliar a eficiência de OEs e seus compostos majoritários no controle de fungos em grãos de feijão e milho pelo método da fumigação *in vitro*, em ambientes saturados de armazenamento, constatou que as dosagens aplicadas

de limoneno (1 e 2,5 $\mu\text{L/mL}$) não apresentaram nenhuma ação fungistática sobre os fungos naturalmente presentes nos produtos, mais uma evidência de que OEs constituídos majoritariamente por Limoneno não são indicados para o controle fúngico.

Diante do avaliado, o OE de *C. aurantium* se mostrou pouco eficiente no controle de ambas as espécies fúngicas, sob as condições experimentais testadas. Isto pode estar relacionado com o fato do principal constituinte do mesmo, o Limoneno, se degradar muito rapidamente (MARÓSTICA JÚNIOR e PASTORE, 2007; BURNHAM, 2008), e não conseguir manter suas propriedades fungicidas ao longo do tempo.

Optou-se, neste trabalho, devido a baixa eficiência, por não se realizar os testes nos grãos com o OE de *C. aurantium*, pois seriam demandadas altas quantidades do mesmo para se obter resultados similares aos obtidos com pequenas dosagens do OE de *Mentha spicata* L. No entanto, para estudos futuros, sugere-se que se avalie a eficiência do OE de *C. aurantium* no controle de outras espécies micro-organismos, pois apesar de não atender a proposta deste trabalho, o mesmo apresentou uma inibição, ainda que pequena, no controle das espécies fúngicas.

5.3. Testes nos grãos de milho

Os teores de água dos grãos de milho foram de 10,7% para os grãos a serem inoculados com *A. brasiliensis* e 9,9% para os grãos a serem inoculados com *A. flavus*, valores dentro da faixa em que os grãos costumeiramente são armazenados no Brasil (LORINI et al., 2002).

Na tabela 14 está apresentado o quadro resumo da análise de variância do efeito inibitório da aplicação do OE de *M. spicata* em grãos de milho inoculados com *Aspergillus brasiliensis*, segundo diferentes dosagens e períodos de armazenamento.

Tabela 14. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do OE de *M. spicata*, durante o período de armazenagem (dias) sobre o número de colônias do fungo *A. brasiliensis* nos grãos de milho.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Dose de óleo essencial (D)	2	4987,12	*
Período de Armazenagem (PA)	2	575,19	n.s.
D x PA	4	1231,41	*
Erro	72	270,86	-
Total	80	-	-
CV = 25,87%			

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. n.s.=não significativo.

Nota-se que houve diferença significativa para as diferentes doses (D) utilizadas e para a interação entre doses utilizadas e períodos de armazenagem (D x PA), indicando que a variação do percentual de inibição do *A. brasiliensis* depende da interação entre a dose de óleo essencial aplicada e período de armazenagem do grão de milho. Já para o período, não houve diferença significativa.

A Tabela 15 apresenta o quadro resumo da análise de variância do efeito inibitório da aplicação do OE de *M. spicata* em grãos de milho inoculados com *A. flavus*, segundo diferentes dosagens e períodos de armazenamento.

Tabela 15. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do OE de *M. spicata*, durante o período de armazenagem (dias) sobre o número de colônias do fungo *A. flavus* nos grãos de milho.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Dose de óleo essencial (D)	2	41,64	n.s.
Período de Armazenagem (PA)	2	920,80	*
D x PA	4	14,20	n.s.
Erro	72	14,29	-
Total	80	-	-
CV = 3,95%			

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. n.s.=não significativo.

Na Tabela 15 tem-se apontado que houve diferença significativa para o período de armazenagem (PA). Isto indica que a variação do percentual de inibição (PI) do *Aspergillus flavus* varia somente em função do período de exposição deste micro-organismo ao óleo essencial de *M. spicata* aplicada, nas condições de armazenamento.

Nota-se que no teste realizado com o *A. brasiliensis*, o coeficiente de variação foi superior (25,87%) ao obtido para o teste do *A. flavus* (3,95%). Diante disto, aliado aos testes *in vitro* realizados anteriormente, pode-se aferir que o *A. brasiliensis* é mais

“resistente” que o *A. flavus* no que se refere aos OEs empregados neste estudo, e ainda, que apresenta um comportamento de crescimento “irregular”, enquanto o *A. flavus* apresenta um comportamento “padrão”.

Como evidenciado por Varga et al. (2007), o *A. brasiliensis* é utilizado a nível industrial para degradação de substratos para produção de enzimas. Essa aplicação talvez se deva ao fato do micro-organismo apresentar essa resistência e maior crescimento.

A Tabela 16 traz os dados referentes ao percentual médio de inibição do desenvolvimento do fungo *A. brasiliensis* em grãos de milho (*Zea mays* L.) em diferentes dosagens do OE de *M. spicata* e períodos de armazenamento.

Tabela 16. Inibição percentual média do desenvolvimento do fungo *A. brasiliensis* em grãos de milho (*Zea mays* L.) para diferentes doses do OE de *M. spicata* e períodos de armazenamento.

Período de armazenamento (dias)	Percentual de inibição do desenvolvimento fúngico em relação as dosagens do OE de <i>M. spicata</i> ($\mu\text{L}/\text{mL}$)		
	1,25	2,50	5,00
10	52 ^{aA}	58 ^{aA}	68 ^{aA}
20	52 ^{aA}	71 ^{bA}	66 ^{bA}
30	44 ^{aA}	66 ^{bA}	95 ^{cB}

*As médias seguidas de uma mesma letra, nas colunas letras maiúsculas e nas linhas letras minúsculas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

A Tabela 17 traz os dados referentes ao percentual médio de inibição do desenvolvimento do fungo *Aspergillus flavus* em grãos de milho (*Zea mays* L.) em diferentes dosagens do OE de *M. spicata* e períodos de armazenamento.

Tabela 17. Inibição percentual média do desenvolvimento do fungo *A. flavus* em grãos de milho (*Zea mays* L.) para diferentes doses do OE de *M. spicata* e períodos de armazenamento.

Período de armazenamento (dias)	Percentual de inibição do desenvolvimento fúngico em relação as dosagens do OE de <i>M. spicata</i> ($\mu\text{L}/\text{mL}$)		
	1,25	2,50	5,00
10	88 ^{aA}	88 ^{aA}	92 ^{bA}
20	97 ^{aB}	98 ^{aB}	100 ^{aB}
30	100 ^{aB}	100 ^{aB}	100 ^{aB}

*As médias seguidas de uma mesma letra, nas colunas letras maiúsculas e nas linhas letras minúsculas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

O OE de *M. spicata* foi mais eficaz no controle do *A. flavus* que no *A. brasiliensis*, em todas as dosagens aplicadas e todos os períodos de armazenamento.

No caso do *A. brasiliensis*, as dosagens de 1,25 e 2,50 $\mu\text{L/mL}$ apresentaram inibições sem diferença significativa, durante todo o período de armazenagem. Já na maior dosagem, 5,00 $\mu\text{L/mL}$, houve um acréscimo da inibição no 30º dia de análise, atingindo 95%.

Com relação ao *A. flavus*, já ao fim de dez dias de aplicação da menor dosagem avaliada (1,25 $\mu\text{L/mL}$) do OE de *M. spicata*, foi verificada uma inibição de 88%, o que demonstra que o mesmo apresenta um elevado potencial para o controle deste micro-organismo, mesmo em baixas dosagens e períodos de aplicação menores. Para todas as dosagens avaliadas, a partir do 20º dia de armazenamento houve completa inibição (100%) do desenvolvimento fúngico nos grãos, não diferindo estatisticamente entre si as dosagens pelo Teste de Scott-Knott a um nível de 5% de significância.

Tatsadjieu et al. (2010), em experimento semelhante, avaliaram a aplicação combinada dos OEs de *Ocimum gratissimum*, *Lippia rugosa* e *Xylopia aethiopica* em grãos de milho infestados com *A. flavus*. Os autores concluíram que dosagens mais baixas de *O. gratissimum* (60 $\mu\text{L}/200\text{g}$) e dosagens mais altas de *L. rugosa* (310 $\mu\text{L}/200\text{g}$) e *X. aethiopica* (250 $\mu\text{L}/200\text{g}$) eram capazes de inibir, em média, 89,9% o desenvolvimento fúngico após 2 semanas de armazenamento. Após 6 semanas de armazenagem este valor diminuiu para 34,6%, o que segundo os autores pode ser explicado pelo fato de durante longos períodos de armazenamento, alguns componentes dos OEs tendem a volatilizar, diminuindo assim sua concentração nos mesmos, prejudicando sua eficácia.

Lee (2017) avaliou o efeito da aplicação do OE de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) frente as espécies *A. brasiliensis* e *A. flavus* em grãos de trigo (*Triticum aestivum*), durante períodos de 10, 20 e 30 dias de armazenagem. Para todas as dosagens do OE avaliadas (0,6; 0,8 e 1,6 $\mu\text{L}/200\text{g}$), em todos os períodos, houve inibição superior a 80%, o que demonstra alta eficiência no controle das espécies fúngicas em questão nos grãos. A autora observou ainda que o OE apresentou uma inibição maior no *A. flavus*, se comparada ao *A. brasiliensis*, o que vai de encontro aos resultados obtidos no presente trabalho com o OE de *M. spicata*.

VARMA e DUBEY (2001) avaliaram a eficiência da aplicação dos OEs de *Caesulia axillaris* (1500 ppm v/v) e *Mentha arvensis* (1000 ppm v/v) no controle do *A.*

flavus em grãos de trigo, sob condições ambientais de armazenamento durante 12 meses. Estes autores constataram, que o OE de *Caesulia* foi capaz de inibir o desenvolvimento do *A. flavus* em 95% em grãos inoculados com a suspensão de esporos do micro-organismo, e 100% em grãos que não foram inoculados. Já o OE de *Mentha* inibiu em 96% o desenvolvimento fúngico em grãos inoculados, e em 100% nos grãos não-inoculados. Percebe-se que em grãos que continham apenas a microbiota natural (sem inoculação do *A. flavus*), o controle foi muito mais eficiente, e é uma variável sugerida de ser testada em estudos futuros.

5.4 Quantificação das Aflatoxinas Totais

As curvas analíticas de leitura dos teores totais de aflatoxinas nos grãos contaminados após 30 dias de armazenamento obtidos pelo teste de ELISA (Sigma-Aldrich®) para o *A. brasiliensis* e *A. flavus*, obtida através dos valores de absorvância dos padrões, estão apresentadas nas Figura 09 e 10, respectivamente.

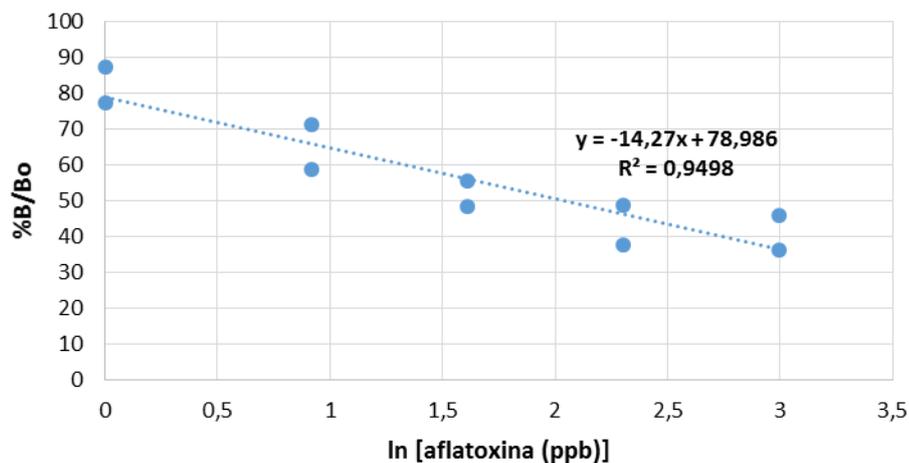


Figura 09. Curva analítica de leitura dos valores de absorvância e correlação com os teores totais de aflatoxinas do teste de ELISA para o *A. brasiliensis*. (B/Bo = Absorvância do padrão quantificado/absorvância do padrão zero).

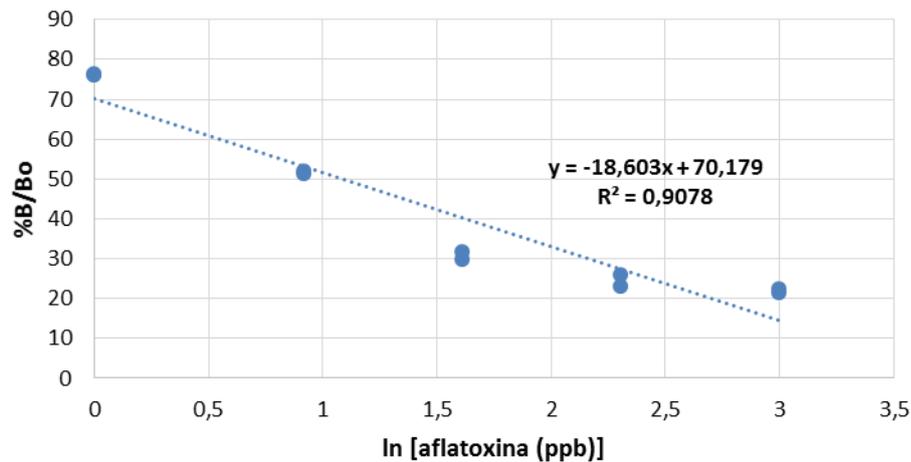


Figura 10. Curva analítica de leitura dos valores de absorvância e correlação com os teores totais de aflatoxinas do teste de ELISA para o *A. flavus*. (B/Bo = Absorvância do padrão quantificado/absorvância do padrão zero).

Foram estabelecidas duas curvas padrão de leitura, uma para cada fungo, pois os testes foram realizados em períodos distintos, e segundo o fabricante dos kits de leitura de Aflatoxinas Totais (Sigma-Aldrich®), a cada análise se faz necessário realizar a leitura dos padrões e estabelecer a curva-padrão de leitura, pois podem haver pequenas variações.

Observa-se nas Figuras 09 e 10 que os modelos ajustados de acordo com a regressão apresentam coeficiente de correlação superior a 90%, o que indica que estão bem ajustados de acordo com o estabelecido pelo Teste (SOUZA et al., 1999).

Souza et al. (1999) ao avaliarem a eficiência dos kits comerciais de ELISA na detecção de Aflatoxinas do Tipo M1 em leite no Estado de Minas Gerais, também constataram que houve linearidade na curva analítica de leitura do teste, com coeficiente de correlação também superior a 90% ($R^2=0,9494$).

De posse dos valores de leitura das absorvâncias das amostras, para cada um dos fungos, nas respectivas dosagens de OE de *M. spicata*, ao final do 30º dia de armazenamento, foram quantificados os valores de aflatoxinas totais através da interpolação dos dados nas respectivas curvas padrão. Foi realizada uma análise de variância dos resultados (Tabela 18), e comparados, segundo o Teste de Scott-Knott a produção de aflatoxinas totais em função de cada um dos fungos e dosagens de OE aplicadas no referido período de armazenagem.

Tabela 18. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do OE de *M. spicata*, durante o período de armazenagem (30 dias) sobre a produção de aflatoxinas totais nos fungos *A. brasiliensis* e *A. flavus*

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Espécie fúngica (F)	1	142,80	*
Dose de óleo essencial (D)	3	12,27	*
F x D	3	12,95	*
Erro	40	1,05	-
Total	47	-	-
CV = 54,07%			

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Observa-se na Tabela 18 que os fungos, as dosagens de óleo essencial aplicadas, bem como a interação entre os fungos e as dosagens, apresentaram diferenças estatísticas significativas a um nível de 5% de significância. Isto indica que a variação da produção de aflatoxinas totais depende da espécie de fungo, da dosagem de OE aplicada e também do efeito combinado entre espécie fúngica e dosagem de OE.

Os testes de detecção de micotoxinas que utilizam a técnica de ELISA tem uma série de fatores de imprecisão atrelados, tais como o preparo dos reagentes, os volumes de aplicação, a homogeneização, e a diferença entre os micropoços causada pela cobertura irregular com anticorpos (WARD e MORGAN, 1991; SOUZA et al., 1999). Todos estes fatores, aliados a casualidade natural dos resultados, acabam refletindo no coeficiente de variação da ANOVA.

Na Tabela 19 são apresentados os valores quantificados de Aflatoxinas Totais (em ppb).

Tabela 19. Teores de Aflatoxinas Totais (ppb) aferidos em grãos de milho, armazenados sob diferentes dosagens de OE de *M. spicata* por 30 dias.

Dosagens (µL/mL)	Teores de Aflatoxinas Totais (ppb)	
	<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. flavus</i>
0,00	4,40 ^{aB}	0,25 ^{bA}
1,25	2,54 ^{aC}	0,14 ^{bA}
2,50	1,44 ^{aC}	0,20 ^{bA}
5,00	6,09 ^{aA}	0,09 ^{bA}

*As médias seguidas de uma mesma letra, nas colunas letras maiúsculas e nas linhas letras minúsculas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Para as condições do presente experimento, o *A. brasiliensis* produziu quantidade superior de aflatoxinas totais ao *A. flavus*, tanto no controle, quanto nos tratamentos (dosagens), fato que ainda não havia registros na literatura.

Observando estes resultados, aliados aqueles obtidos nos testes nos grãos de milho (item 5.3), uma justificativa é que como houve 100% de inibição do desenvolvimento da espécie *A. flavus*, para todas as dosagens, no 30º dia (quando foi avaliado os teores de aflatoxinas totais), o que resulta em uma produção de micotoxinas baixa. Enquanto que para o *A. brasiliensis*, cujos percentuais de inibição para as doses 1,25; 2,50 e 5,00 µL/mL foram respectivamente 44, 66 e 95%, a tendência é que houvesse teores superiores ao *A. flavus*, como foi constatado no presente estudo.

El-Aziz et al. (2015) avaliaram a eficácia da aplicação dos OEs de canela, alho, alecrim, hortelã e tomilho, em testes *in vitro*, no controle do desenvolvimento de fungos das espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, bem como na produção de aflatoxinas dos tipos B e G, constatando que a eficácia do controle varia com de acordo com o OE e concentração aplicada. Os OEs que demonstraram maior eficiência foram o de canela e tomilho.

Sonker et al. (2015) avaliaram, por meio de testes *in vitro*, a aplicação do OE de *Artemisia nilagirica* na produção de aflatoxina B1 pelas espécies *A. flavus*, *A. niger* e *A. ochraceus*, e também verificaram que com o aumento da concentração de OE há uma redução da produção de AFB1, até que na dosagem 1,6 µL/mL há completa inibição da produção para as três espécies fúngicas testadas.

Kedia et al. (2016) testaram a efetividade da aplicação do OE de *M. spicata* em sementes de grãos-de-bico, no controle de *A. flavus*, sob condições ambientais de armazenagem durante 12 meses, verificando ao final, que a dosagem de 1,0 µL/mL foi capaz de inibir em mais de 50% o desenvolvimento e em 100% a produção de AFB1. Os autores constataram ainda que as sementes tratadas com esta dosagem de OE durante 1 ano de armazenamento, mantiveram seu poder germinativo em 100%.

Nos trabalhos anteriormente descritos, constatou-se a efetiva inibição da produção de aflatoxinas, sob dosagens crescentes de OEs. No entanto, no presente trabalho, de acordo com exposto na Tabela 19, para o *A. brasiliensis*, a inibição da produção de aflatoxinas ocorreu até a dosagem 2,5 µL/mL, e na maior dosagem avaliada, 5,0 µL/mL, o teor de aflatoxinas foi superior as menores dosagens, inclusive

o controle. Na literatura são escassos os exemplos em que tal comportamento se assemelha.

Jantapan et al. (2017), no entanto, ao avaliarem os efeitos da aplicação de diversos OEs na produção de AFB1 pelo *A. parasiticus*, verificaram comportamento similar para o OE de *Moringa oleifera*, na maior concentração (4 mg/mL) foi constatado um teor de AFB1 superior ao controle (0 mg/mL), e nas dosagens intermediárias (1 e 2 mg/mL) houve uma redução de AFB1 se comparadas ao controle. No entanto, estes autores não apontam uma justificativa para o ocorrido.

Uma teoria aqui levantada é que existe uma concentração de OE de *M. spicata*, entre 2,50 e 5,00 $\mu\text{L/mL}$, em que o OE deixa de ser efetivo no controle da produção de aflatoxinas pelo *A. brasiliensis*, e passa a ser então um estimulante da mesma. Situações de estresse oxidativo podem induzir a produção de aflatoxinas por fungos do gênero *Aspergillus* (JAYASHREE e SUBRAMANYAM, 2000), tal como supõe-se que ocorre no experimento. Dosagens elevadas de OE, em ambiente hermético de armazenamento, somados as demais condições ambientais presentes, podem causar estresse oxidativo nos fungos, e os mesmos, como mecanismo de defesa acabam produzindo as micotoxinas. No entanto, estas são suposições que precisam ser confirmadas, portanto, é uma sugestão para trabalhos futuros.

6 CONCLUSÃO

Os principais componentes do OE de *M. spicata* identificados e calculados foram a Carvona (61,89%) e o Limoneno (30,83%), e o principal constituinte do OE de *C. aurantium* identificado e calculado foi o Limoneno (94,71%).

Nos testes *in vitro* realizados, o OE de *M. spicata* se mostrou muito mais eficiente no controle fúngico do que o OE de *C. aurantium*. Sendo que dosagens de 2,5 µL/mL para o *A. brasiliensis*, e 2,0 µL/mL para o *A. flavus*, do OE de *M. spicata* foram capazes de inibir totalmente o crescimento dos micro-organismos durante o período de incubação. Enquanto que para o OE de *C. aurantium*, a máxima dosagem testada (10 µL/mL), alcançou apenas 21% de inibição do *A. brasiliensis* e 40% do *A. flavus*, no fim do período de incubação. Para os objetivos almejados nesse trabalho, o OE não se mostrou muito eficiente, porém não se descarta as possibilidades de seu uso no controle de outras espécies de micro-organismos, sob outras condições experimentais, sugerindo-se estes testes para trabalhos futuros.

Para os testes realizados nos grãos de milho, com o aumento das dosagens e maiores períodos de exposição ao OE de *M. spicata*, observou-se um aumento da inibição do crescimento tanto do *A. brasiliensis*, quanto do *A. flavus*. No entanto, a aplicação do OE de *M. spicata* foi mais efetiva no *A. flavus*, que no *A. brasiliensis*. Ao fim de 20 dias de armazenamento, para a menor dosagem do OE (1,25 µL/mL), houve 100% de inibição do *A. flavus*. Para o *A. brasiliensis*, na maior dosagem do OE (5,00 µL/mL), ao fim de 30 dias de armazenamento, verificou-se 95% de inibição.

A aplicação do OE de *M. spicata*, no que tange a produção de aflatoxinas totais, se mostrou eficaz para o *A. brasiliensis* nas dosagens de 0,0 a 2,5 µL/mL, para o período de 30 dias de armazenamento. Na maior dosagem, de 5,0 µL/mL, para esse micro-organismo observou-se o aumento da produção de aflatoxinas, o que pode estar relacionado ao denominado estresse oxidativo. Para o *A. flavus*, ao final de 30

dias de armazenamento, não se observou diferença estatística significativa entre as dosagens do OE.

A aplicação de OEs se desponta como uma tecnologia ambiental promissora no controle de pragas e doenças na pós-colheita de grãos. No entanto, *a priori*, os custos da efetiva aplicação dos mesmos no produto pode ser um pouco onerosa, dada a pequena escala de produção dos OEs, e elevado preço de mercado, se comparado a tecnologias já consolidadas para a mesma finalidade. Faz-se necessários investimentos na indústria de OEs, de modo a garantir economias de escalas, barateando os custos e tornando essa tecnologia mais acessível.

O primeiro passo foi dado. Os testes em nível de laboratório foram realizados. Agora, sugere-se para trabalhos futuros o estudo da aplicação *in situ*, nos armazéns graneleiros, dos OEs, bem como a análise da viabilidade econômico-financeira deste processo.

As tecnologias ambientais não surgem da noite para o dia. São fruto de exaustivos trabalhos, da consolidação de produtos e processos, da união de pesquisadores de várias áreas do conhecimento que têm algo em comum: a preservação do Meio Ambiente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS; H.K.; SHIER, W.T.; PLASENCIA; WEAVER, M.A.; BELLALLOUI, N.; KOTOWICZ, J.K.; BUTLER, A.M.; ACCINELLI, C.; TORRE-HERNANDEZ, M.E.; ZABLOTOWICZ, R.M. Mycotoxin contamination in corn smut (*Ustilago maydis*) galls in the field and in the commercial food products. **Food Control**, v. 71, p. 57-63, 2017.

ABDERREZAK, M.K.; ABAZA, I.; ABURJAI, T.; KABOUICHE, A.; KABOUICHE, Z. Comparative compositions of essential oils of *Citrus aurantium* growing in different soils. **Journal of Materials and Environmental Science**. v. 5, n. 6, 1913-1918, 2014.

ABRASCO. **Dossiê ABRASCO**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. 624 p.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography mass spectroscopy**. DuPage: Allured Publishing Corporation, 1995, 469 p.

ADEGOKE, G.O.; ODESOLA, B. Storage of maize and cowpea and inhibition of microbial agents of biodeterioration using the powder and essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus*). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 37, n. 1-2, p. 81–84, 1996.

ALMEIDA, A. P. de; SABINO, M.; FONSECA, H.; CORRÊA, B. Milho recém-colhido no Brasil: interação da microbiota fúngica, fatores abióticos e ocorrência de fumonisinás. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n.1, p. 1-9, 2005.

AL-SAAD, L.A.; AL-BADRAN, A.I.; AL-JUMAYLI, S.A.; MAGAN, N.; RODRÍGUEZ, A. Impact of bacterial biocontrol agents on aflatoxin biosynthetic genes, aflD and aflR expression, and phenotypic aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus* under different environmental and nutritional regimes. **International Journal of Food Microbiology**. v. 217, p. 123–129, 2016.

ALTIERI, M. **Agroecologia**: a dinâmica produtiva da agricultura sustentável. 4. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2004. 117 p.

ANŽLOVAR, S.; LIKAR, M.; KOCE, J.D. Antifungal potential of thyme essential oil as a preservative for storage of wheat seeds. **Acta Botanica Croatica**. v. 76, n. 1, p. 64–71, 2017.

ARAÚJO, C. **Milho: História e arte**. Brasil, 2008. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/grao/7_edicao/grao_em_grao_materia_03.htm> Acesso em: 02. abr. 2015.

AUGUSTIN, M.A.; RILEY, M.; STOCKMANN, R.; BENNETT, L.; KAHL, A.; LOCKETT, T.; OSMOND, M.; SANGUANSRI, P.; STONEHOUSE, W.; ZAJAC, I.; COBIAC, L. Role of food processing in food and nutrition security. **Trends in Food Science & Technology**. v. 56, p. 115-125, 2016.

BENTO, M.G.R. **Avaliação da atividade fungicida de óleos essenciais e suas substâncias ativas no controlo de fungos de armazenamento**. Lisboa, 2016. 121 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônômica). Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa. Lisboa, 2016.

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

BOTANICAL.COM. A Modern Herbal by Mrs. M. Grieve. **Orange, Sweet**. Disponível em: <<http://www.botanical.com/botanical/mgmh/o/oraswe12.html>>. Acesso em: 30 out. 2016.

BOUKHEBTI, H.; CHAKER, A.N.; BELHADJ, H.; SAHLI, F.; RAMDHANI, M.; LAOUER, H.; HARZALLAH, D. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. **Der Pharmacia Lettre**. v. 3, n. 4, p. 267-275, 2011.

BRASIL. Resolução – RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 09 mar. 2011. Seção 1. p. 66-67.

BRASIL. Lei Nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 3 ago. 2010. Seção 1. p. 3.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNPV/CLAV, 2009. p. 309.

BRAUN, J. von. **The World Food Situation: New Driving Forces and Required Actions**. Washington: International Food Policy Research Institute, 2007.

BRUNDTLAND, G. H. **Nosso futuro comum**. Rio de Janeiro: Editora da Fundação Getúlio Vargas, 1991.

BUCHBAUER, G.; JÄGER, W.; GRUBER, A.; DIETRICH, H. R-(+)- and S-(-)-Carvone: influence of chirality on locomotion activity in mice. **Flavour and fragrance Journal**, v. 20, p. 686–689, 2005.

BURNHAM, P.M. Limonene: The industrial degreasing agent found in orange peel. **The Molecule of the Month**. University of Bristol: School of Chemistry, 2008.

Disponível em: <<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/limonene/limonenejm.htm>>. Acesso em: 30 out. 2016.

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

CARDOSO FILHO, F.C.; CALDAS, M.L.; MURATORI, M.C.S. Fungos e aflatoxinas em cereais: Uma revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**. v. 2, n. 2, p.122-130, 2015.

CARSON, R. **Silent Spring**. Boston: Houghton Mifflin, 1962. 358 p.

CHOI, H.S. Character impact odorants of citrus hallabong [(*C. unshiu* Marcov x *C. sinensis* Osbeck) x *C. reticulata* Blanco] cold-pressed pell oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 2687-2692, 2003.

CHOWDHURY, J.U.; NANDI, N.C.; UDDIN, M.; RAHMAN, M. Chemical Constituents of Essential Oils from Two Types of Spearmint (*Mentha spicata* L. and *M. cardiaca* L.) Introduced in Bangladesh. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**. v. 42, n. 1, p. 79-82, 2007.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Séries Históricas. Milho**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=&Pagina_objcmsconteudos=3#A_objcmsconteudos>. Acesso em: 02. abr. 2014.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra brasileira de Grãos. v. 2 – Safra 2014/2015**, n. 10, 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_07_09_08_59_32_boletim_graos_julho_2015.pdf>. Acesso em: 15 out. 2016.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra brasileira de Grãos. v. 3 – Safra 2015/2016**, n. 12, 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_09_09_15_18_32_boletim_12_setembro.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2017.

DOEBLEY, J.F. Molecular evidence for gene flow among *Zea* species. **Bioscience**. v. 40, p. 443-448, 1990.

DUARTE, J.O.; MATTOSO, M.J.; GARCIA, J.C. **Árvore do Conhecimento – Milho: Importância Socioeconômica**. Ageitec. Embrapa. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONTAG01_8_1682005_11157.html>. Acesso em: 02. abr. 2015.

EL-AZIZ, A.R.M.A.; MAHMOUD, M.A.; AL-OTHMAN, M.R.; AL-GAHTANI, M.F. Use of Selected Essential Oils to Control Aflatoxin Contaminated Stored Cashew and Detection of Aflatoxin Biosynthesis Gene. **The Scientific World Journal**, v. 2015. 13 p. 2015.

ELKINGTON, J. **Sustentabilidade**: Canibais com garfo e faca. Edição Histórica de 12 anos. São Paulo: MBooks, 2012. 488 p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistics Division**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 01. abr. 2015.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW)**: Managing systems at risk. London: Earthscan, 2011.

FONSECA, H.; MARTINELLI FILHO, A.; DEL NERY, H.; RONCATTO, E. Espécies de *Aspergillus* produtoras de aflatoxina, na região Araraquarense, SP. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 31, p. 519-536, 1974.

FREITAS, F.O. **Estudo genético-evolutivo de amostras modernas e evolutivas de Milho (*Zea mays mays*, L.) e Feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.)**. Piracicaba, 2001. 144 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – ESALQ, Universidade de São Paulo, 2001.

GIMENO, A.; MARTINS, M. L. **Mycotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos**. 3. ed. Miami: Special Nutrients, 2011. 129 p.

GODFRAY, H.C. J.; BEDDINGTON, J.R.; CRUTE, I.R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, J.F.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, S.M.; TOULMIN, C. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. **Science**. v. 327, n. 5967, p. 812-818, 2010.

GOLDBERG, R.A. **Agribusiness coordination: a systems approach to the wheat, soybean and Florida orange economies**. Division of research. Graduate School of Business Administration. Boston, Harvard University, 1968.

GOLOUBINOFF, P.; PÄÄBO, S.; WILSON, A.C. Evolution of maize inferred from sequence diversity of an *Adh2* gene segment from archaeological specimens. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 90, p. 1997-2001, 1993.

GOMPERTZ, O.F.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; CORRÊA, B. Características Gerais dos Fungos. In: TRABULSI, L.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 65.

GREGORI, R.; MERIGGI, P.; PIETRI, A.; FORMENTI, S.; BACCARINI, G.; BATTILANI, P. Dynamics of fungi and related mycotoxins during cereal storage in silo bags. **Food Control**. v. 30, p. 280-287, 2013.

GRIFFIN, S.G.; MARKHAM, J.L.; LEACH, D.N. An Agar Dilution Method for the Determination of the Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils. **Journal of Essential Oil Research**. v. 12, p. 249-255, 2000.

HEDAYATI, M.T.; PASQUALOTTO, A.C.; WARN, P.N.; BOWYER, P.; DENNING, D.W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**. v. 153, p. 1677-1692, 2007.

HÖGNADÓTTIR, Á.; ROUSEFF, R.L. Identification of aroma active compounds in Orange essence oil using gas chromatography – olfactometry and gas chromatography – mass spectrometry. **Journal Chromatography A**. v. 998, p. 201-211, 2003.

HUSSAIN; A.I; ANWAR, F.; SHAHID, M.; ASHRAF, M.; PRZYBYLSKI, R. Chemical Composition, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of Spearmint (*Mentha spicata* L.) from Pakistan. **Journal of Essential Oil Research**. v. 22, n. 1, p. 78-84, 2010.

IBGE. Sala de imprensa. **Estudo inédito do IBGE mostra as mudanças na cobertura e uso da terra e aponta redução nas pastagens naturais e florestas**. Disponível em: <<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias.html?view=noticia&id=1&idnoticia=2996&busca=1&t=estudo-inedito-ibge-mostra-mudancas-cobertura-uso-terra-aponta-reducao-pastagens-naturais>>. Acesso em: 16 mai. 2017.

JACOBI, P.R. Educação ambiental: o desafio da construção de um pensamento crítico, complexo e reflexivo. **Educação e pesquisa**, v. 31, n. 2, p. 233-250, 2005.

JANTAPAN, K.; POAPOLATHEP, A.; IMSILP, K.; POAPOLATHEP, S.; TANHAN, P.; KUMAGAI, S.; JERMNAK, U. Inhibitory Effects of Thai Essential Oils on Potentially Aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. **Biocontrol Science**, v. 22, n. 10, p. 31-40, 2017.

JAYASHREE, T.; SUBRAMANYAM, C. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 10, p. 981–985, 2000.

JIANG, C.; SHI, J.; CHENG, Y.; LIU, Y. Effect of *Aspergillus carbonarius* amounts on winemaking and ochratoxin A contamination. **Food Control**. v. 40, p. 85-92, 2014.

KEDIA, A.; PRAKASH, B.; MISHRA, P.K.; CHANOTIYA, C.S.; DUBEY, N.K. Antifungal, antiaflatoxigenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 89, p. 29–36, 2014.

KEDIA, A.; DWIVEDY, A.K.; JHA, D.K.; DUBEY, N.K. Efficacy of *Mentha spicata* essential oil in suppression of *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in chickpea with particular emphasis to mode of antifungal action. **Protoplasma**, v. 253, n. 3, p. 647-653, 2016.

KNAAK, N.; FIUZA, L.M. Potential of essential plant oils to control insects and microorganisms. **Neotropical Biology and Conservation**. v. 5, n. 2, p. 120-132, 2010.

KUMAR, P.; MISHRA, S.; MALIK, A.; SATYA, S. Insecticidal properties of *Mentha* species: a review. **Industrial Crops and Products**. v. 34, p. 802-817, 2011.

LANÇAS, F. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Editora Acta, 1993, 254p.

LEE, B.; LEE, S.; ANNIS, P.C.; PRATT, S.J.; PARK, B.; TUMAALII, F. Fumigation toxicity of essential oils and monoterpenes against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst. **Journal of Asia-Pacific Entomology**. v. 5, p. 237-240, 2002.

LEE, L.T. **Avaliação do potencial fungicida do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) no controle dos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus flavus* na conservação de grãos de trigo (*Triticum aestivum*)**. Volta Redonda, 2017. 76 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal Fluminense, Volta Redonda, 2017.

LOCKWOOD, G.B. Techniques for gas chromatography of volatile terpenoids from a range of matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 936, p. 23 - 31, 2001.

LOPES, J.M.S; DÉO, T.F.G; ANDRADE, B.J.M; GIROTO, M.; FELIPE, A.L.S.; JUNIOR, C.E.I.; BUENO, C.E.M.S.; SILVA, T.F.; LIMA, F.C.C. Importância Econômica do Citrus no Brasil. **Revista Científica Eletrônica De Agronomia**, v. 10, n. 20, p. 1-2, 2011.

LÓPEZ-MALO, A.; MARIS-ALZAMORA, S.; PALOU, E., *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. **International Journal of Food Microbiology**. v. 99, p. 119-128, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil**. 2.ed. Plantarum: Nova Odessa, 2008. 544p.

LORINI, I.; MIIKE, L. H.; SCUSSEL, V. M. (Ed.). **Armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Bio Geneziz, 2002. 983 p.

LOU, Z.; CHEN, J.; YU, F.; WANG, H.; KOU, X.; MA, C.; ZHU, S. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. **LWT - Food Science and Technology**. v. 80, p. 371-377, 2017.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.E.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MAIZE. CGIAR Research Program MAIZE. **Challenges and opportunities**. Disponível em: <<http://maize.org/challenges-and-opportunities/>>. Acesso em: 20 out. 2016.

MALLMANN, C.A.; VASCONCELLOS, T.G.; TYSKA, D.; MARTINS, A.C. Laboratório de Análises Micotoxicológicas. Universidade Federal de Santa Maria. **Comparação de metodologias analíticas e de amostragem para micotoxinas**. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/papers/AMENA.pdf>>. Acesso em: 09 abr. 2015.

MANGANYI, M. C.; REGNIER, T.; OLIVIER, E. I. Antimicrobial activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* isolates and their biofilms. **South African Journal of Botany**. v. 99, p. 115-121, 2015.

MAPA. **Cadeia produtiva do milho** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura; coordenador Luiz Antonio Pianazza. Brasília: IICA, MAPA/SPA: 2007.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Culturas. **Milho**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>>. Acesso em: 20 out. 2016.

MARKOV, K.; MIHALJEVIĆ, B.; DOMIJAN, A.M.; PLEADIN, J.; DELAŠ, F.; FRECE, J. Inactivation of aflatoxigenic fungi and the reduction of aflatoxin B1 in vitro and in situ using gamma irradiation. **Food Control**. v. 54, p. 79-85, 2015.

MARÓSTICA JÚNIOR, M.R.; PASTORE, G.M. Biotransformação de Limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 382-387, 2007.

MARTINAZZO, A.P. **Secagem, Armazenamento e Qualidade de folhas de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf**. Viçosa, 2006. 156 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MAY, James M. Micotoxinas. In:_____. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. [trad.] Eduardo Cesar Tondo et al. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p. cap. 30, p. 633-649.

MILLER JR., G.T. Alimentos, Solo e Manejo de Pragas. In:_____. **Ciência Ambiental**. 11. ed. [trad.] All Tasks. São Paulo: Cengage Learning, 2013. 501 p. cap. 10, p. 229-264.

MOUSA, W.; GHAZALI, F.M.; JINAP, S.; GHAZALI, H.M.; RADU, S.; SALAMA, A.E. Temperature, water activity and gas composition effects on the growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* on paddy. **Journal of Stored Products Research**. v. 67, p. 49-55, 2016.

MYCOCOSM. **The Fungal Genomics Resource**. *Aspergillus brasiliensis*. Disponível em: <<http://genome.jgi.doe.gov/Aspbr1/Aspbr1.home.html>>. Acesso em: 25 out. 2016.

NEVES, M.F. **O Retrato da Citricultura brasileira**. CitrusBR. 2010. 138p. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/download/Retrato_Citricultura_Brasileira_MarcosFava.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2017.

NOURBAKHS, S.M.; BAI, Y.; MAIA, G.D.N.; OUYANG, Y.; RODRIGUEZ, L. Grain supply chain network design and logistics planning for reducing post-harvest loss. **Biosystems Engineering**, v. 151, p.105-115, 2016.

OIGMAN, S.S. Química Nova Interativa. **Carvona**. Disponível em: <<http://qnint.sbq.org.br/novo/index.php?hash=molecula.235>>. Acesso em: 30 out. 2016.

PEREIRA, M.C.; VILELA, G.R.; COSTA, L.M.A.S.; SILVA, R.F.; FERNANDES, A.F.; FONSECA, E.W.N.; PICOLLI, R.H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da

utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**. v.30, n.4, p. 731-738. 2006.

PEREIRA, M.M.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. B. **CEPPA**, v. 20, n. 1, p. 141-156. 2002.

PIMENTEL, D.; PIMENTEL, M. Global environmental resources versus world population growth. **Ecological Economics**. v. 59, n. 2, p. 195-198, 2006.

PINTO, N.F.A. Grãos Ardidos em Milho. **Circular Técnica 66**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2005.

PORTAL DO AGRONEGÓCIO. Notícias. **Brometo de Metila não está proibido**. 29 fev. 2016. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/noticia/brometo-de-metila-nao-esta-proibido-140925>>. Acesso em: 04 jun. 2017.

PRAKASH, B.; SINGH, P.; YADAV, S.; SINGH, S.C.; DUBEY, N.K. Safety profile assessment and efficacy of chemically characterized *Cinnamomum glaucescens* essential oil against storage fungi, insect, aflatoxin secretion and as antioxidant. **Food and Chemical Toxicology**. v. 53, p.160–167, 2013.

PULTRINI, A. de M.; GALINDO, L.A.; COSTA, M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. **Life Sciences**. v. 78, p.1720–1725, 2006.

RIAHI, L.; ELFERCHICHI, M., GHAZGHAZI, H.; JEBALI, J.; ZIADI, S.; AOUADHI, C.; CHOGRANIF, H.; ZAOUALIF, Y.; ZOGHLAMI, N.; MLIKI, A. Phytochemistry, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of *Mentha rotundifolia* L. in Tunisia. **Industrial Crops and Products**. v. 49, p. 883–889, 2013.

SCHERER, R.; LEMOS, M.F.; LEMOS, M.F.; MARTINELLI, G.C.; MARTINS, J.D.L.; SILVA, A.G. Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). **Industrial Crops and Products**. v. 50, p. 408– 413, 2013.

SCHIESARI, L. **Defensivos Agrícolas**: como evitar danos à saúde e ao meio ambiente. Ca-narana: Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia, 2012. 13 p. (Série Boas Práticas, v. 8). Disponível em: <http://www.ifc.org/wps/wcm/connect/4a761f00437b4db7b3afbb869243d457/IPAM_Del15+_Agrochemical+booklet.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 13 abr. 2016.

SCIENCEDIRECT. **Explore scientific, technical, and medical research on ScienceDirect**. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/>>. Acesso em: 20 abr. 2017.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**. v. 163, p. 337—344, 2008.

SHELEF, L.A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**. n. 6, p. 29-44, 1993.

SILVESTRE, W.P.; AGOSTINI, F.; MUNIZ, L.A.R.; PAULETTI, G.F. Fractionating of green mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore) essential oil by vacuum fractional distillation. **Journal of Food Engineering**. v. 178, p. 90-94, 2016.

SIMAS, D.L.R.; DE AMORIM, S.H.B.M.; GOULART, F.R.V.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S.; DA SILVA, A.J.R. Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 98, p.108–115, 2017.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC. 2003. 821p.

SINGH, P.; SHUKLA, R.; KUMAR, A.; PRAKASH, B.; SINGH, S.; DUBEY, N.K. Effect of *Citrus reticulata* and *Cymbopogon citratus* essential oils on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production on *Asparagus racemosus*. **Mycopathologia**, v. 170, n. 3, p. 195–202, 2010a.

SINGH, P.; SHUKLA, R.; PRAKASH, B.; KUMAR, A.; SINGH, S.; MISHRA, P.K.; DUBEY, N.K. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. **Food and Chemical Toxicology**. v. 48, p. 1734–1740, 2010b.

SISVAR. **Software Sisvar**. Versão 5.6. Daniel Furtado Ferreira. Departamento de Ciências Exatas. Lavras: UFLA, 2016. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/programas/sisvar.html>>. Acesso em: 01 fev. 2016.

SOKOVIC, M.D.; VUKOJEVIC, J.; MARIN, P.D.; BRKIC, D.D.; VAJS, V.; GRIENSVEN, L.J.L.D. Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. **Molecules**. v. 14, p. 238-249, 2009.

SONKER, N.; PANDEY, A.K.; SINGH, P. Efficiency of *Artemisia nilagirica* (Clarke) Pamp. essential oil as amycotoxicant against postharvest mycobiota of table grapes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 1932–1939, 2015.

SOUZA, S.V.C.; VARGAS, E.; JUNQUEIRA, R.G. Eficiência de um *kit* de ELISA na detecção e quantificação de aflatoxina M1 em leite e investigação da ocorrência no estado de Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.19, n.3, p. 401-405, 1999.

TAO, N.; JIA, L.; ZHOU, H. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, v. 153, p. 265–271, 2014.

TATSADJIEU, N.L.; YAOUBA, A.; NUKENINE, E.N.; NGASSOUM, M.B.; MBOFUNG, C.M.F. Comparative study of the simultaneous action of three essential oils on

Aspergillus flavus and *Sitophilus zeamais* Motsch. **Food Control**. v. 21. p.186-190, 2010.

USDA. United States Department of Agriculture. Economic Research Service. **Crops. Corn**. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/topics/crops/corn.aspx>>. Acesso em: 06 abr. 2015.

VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; TÓTH, B.; FRISVAD, J.C.; PERRONE, G.; SUSCA, A.; MEIJER, M.; SAMSON, R.A. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 1925–1932, 2007.

VARGAS, L.A. Maíz: Un Viajero Sin Equipaje. **Anales de Antropología**., v. 48, n. 1, p.123-137, 2013.

VARMA, J.; DUBEY, N.K. Efficacy of essential oils of *Caesulia axillaris* and *Mentha arvensis* against some storage pests causing biodeterioration of food commodities. **International Journal of Food Microbiology**. v. 68, p. 207–210, 2001.

VUJANOVIC, V.; SMORAGIEWICZ, W.; KRZYSZTYNIAK, K. Airborne fungal ecological niche determination as one of the possibilities for indirect mycotoxin risk assessment in indoor air. **Environmental Toxicology**. v. 16, p.1–8, 2001.

WARD, C. M., MORGAN, M. R. A. Reproducibility of a commercially available kit utilizing enzyme-linked immunosorbent assay for determination of aflatoxin in peanut butter. *Food Addit. Contam.*, v. 8, p. 9-15, 1991.

WU, F.; JIN, Y.; XU, X.; YANG, N. Electrofluidic pretreatment for enhancing essential oil extraction from citrus fruit peel waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 159, p. 85-94, 2017.

ZHANG, H.; CHEN, F.; WANG, X.; YAO, H.Y. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. **Food Research International**, v.39, p.833-839, 2006.

ZARRAD, K.; HAMOUDA, A.B.; CHAIEB, I.; LAARIF, A.; JEMÂA, J.M. Chemical composition, fumigant and anti-acetylcholinesterase activity of the Tunisian *Citrus aurantium* L. essential oils. **Industrial Crops and Products**. v. 76, p. 121–127, 2015.