

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Efeito dos óleos essenciais de diferentes espécies de *Eucalyptus* sobre a
microflora do milho em pós-colheita**

Bruna Mengai

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

**Piracicaba
2010**

Bruna Mengai
Engenheira Agrônoma

Efeito dos óleos essenciais de diferentes espécies de *Eucalyptus* sobre a microflora do milho em pós-colheita

Orientador:
Dr. **EDUARDO MICOTTI DA GLORIA**

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

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Mengai, Bruna

Efeito dos óleos essenciais de diferentes espécies de *Eucalyptus* spp sobre a microflora do milho em pós-colheita / Bruna Mengai. - - Piracicaba, 2010.
111 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Antifúngicos 2. Armazenamento agrícola 3. Controle 4. Eucalipto 5. Fungos 6. Grãos 7
Óleos essenciais I. Título

CDD 665.33
M544e

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

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ricardo Mengai e Marie José Mengai, ao meu irmão, André Mengai e minha madrinha, Joanna Rahal, pelo amor incondicional, ensinamentos e força em todos os momentos.

Ao Dr. Eduardo Micotti da Gloria, pela oportunidade, orientação, compreensão e amizade.

Ao amigo Gustavo Steffen de Almeida, pela amizade e companheirismo na realização desse projeto.

Ao Prof. Dr. Carlos Tadeu Santos Dias do Departamento de Ciências Exatas da ESALQ/ USP, pela realização das análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Cláudio Gallo, pela disponibilidade do uso do Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP, necessário à pesquisa.

Ao Dr. Sebastião Cruz Silva e à Prof^a Dra. Maria Fátima das Graças F. da Silva, do Departamento de Química da UFSCar, pela realização da análise da composição dos óleos essenciais.

Ao Rildo Moreira e Moreira, Israel Gomes Vieira e Edson, responsáveis pela coleta das folhas de *Eucalyptus*.

À Dra. Beatriz Thie Iamanaka, do Departamento de Microbiologia do ITAL, pelo auxílio na identificação dos gêneros fúngicos desse projeto.

À Dra. Maria Antônia Calori Domingues, Ivani Valarini Zambello e a todos os amigos do Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/ USP, pela convivência diária, amizade, companheirismo, motivação, conversas e muitas risadas.

À toda a turma do mestrado em Ciência de Alimentos, em especial à Daniele Almeida, Marina Marquezi e Zilmar Pimenta pela grande amizade conquistada nesse período.

Às amigas, Camila Maitan, Fabiana Menezes do Nascimento, Mariele Piovesan, Marilise Piovesan e Ana Cristina Ensinas Oliva, pela amizade sincera, carinho, força e por estarem presentes em todos os momentos independente da distância.

À todos que participaram direta e indiretamente e que estiveram ao meu lado durante a realização desse trabalho, MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 DESENVOLVIMENTO.....	13
2.1 Importância da cultura do milho.....	13
2.2 Armazenamento de grãos.....	14
2.3 Microflora de grãos armazenados.....	16
2.4 Óleos essenciais.....	22
2.5 A cultura do <i>Eucalyptus</i> spp.....	26
2.6 Óleo essencial de <i>Eucalyptus</i> spp.....	28
2.6.1 Aspectos gerais do óleo essencial de <i>Eucalyptus</i> spp.....	28
2.6.2 Composição química do óleo essencial de <i>Eucalyptus</i> spp.....	29
2.6.3 Uso dos óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> spp.....	31
2.7 Metodologias para avaliação do potencial antifúngico dos óleos essenciais.....	34
2.8 Material e métodos.....	38
2.8.1 Obtenção dos óleos essenciais.....	38
2.8.2 Identificação dos compostos do óleo essencial por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa.....	40
2.8.3 Caracterização do lote de milho utilizado nas avaliações com substrato natural.....	41
2.8.4.1 Avaliação inicial do potencial antifúngico dos óleos essenciais.....	43
2.8.4.2 Avaliação inicial do potencial antifúngico dos óleos essenciais por contato direto com os grãos de milho.....	44
2.8.4.3 Avaliação inicial do potencial antifúngico dos óleos essenciais por exposição do milho aos compostos voláteis.....	44
2.8.4.4 Critérios utilizados para classificação dos óleos na avaliação inicial.....	45
2.8.5.1 Avaliação da eficiência utilizando uma simulação de armazenamento.....	46
2.8.5.2 Modo de ação via aplicação por contato.....	47
2.8.5.3 Modo de ação via exposição aos voláteis.....	48
2.8.5.4 Avaliação da ocorrência dos fungos.....	50

2.8.6.1 Avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre espécies produtoras de aflatoxinas.....	54
2.8.6.2 Modo de ação por contato.....	54
2.8.6.3 Modo de ação por exposição aos voláteis.....	55
2.8.6.4 Modo de avaliação.....	55
2.8.7 Análise estatística.....	56
2.9 Resultados e Discussão.....	57
2.9.1 Obtenção dos óleos essenciais.....	57
2.9.2 Identificação dos compostos do óleo essencial por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa.....	58
2.9.3 Caracterização do lote de milho utilizado nas avaliações com substrato natural.....	62
2.9.4.1 Avaliação inicial do potencial antifúngico dos óleos essenciais por contato direto com os grãos de milho.....	62
2.9.4.2 Avaliação inicial do potencial antifúngico dos óleos essenciais por exposição do milho aos compostos voláteis.....	64
2.9.5.1 Avaliação da eficiência utilizando uma simulação de armazenamento no modo de ação por contato.....	66
2.9.5.2 Avaliação da eficiência utilizando uma simulação de armazenamento via exposição aos compostos voláteis.....	72
2.9.5.3 Avaliação de micotoxinas nas amostras de milho.....	75
2.9.6.1 Avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre espécies produtoras de aflatoxinas por contato direto com o meio.....	79
2.9.6.1.1 <i>A. flavus</i>	79
2.9.6.1.2 <i>A. parasiticus</i>	80
2.9.6.2 Avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre espécies produtoras de aflatoxinas via exposição aos compostos voláteis.....	82
2.9.6.2.1 <i>A. flavus</i>	82
2.9.6.2.2 <i>A. parasiticus</i>	84
2.9.6.3 Avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre a produção de aflatoxinas por <i>A. flavus</i> e <i>A. parasiticus</i> para os modos de ação por contato e exposição aos voláteis.....	87
3 CONCLUSÃO.....	93
REFERÊNCIAS.....	95

RESUMO

Efeito dos óleos essenciais de diferentes espécies de *Eucalyptus* sobre a microflora do milho em pós-colheita

Os óleos essenciais de plantas representam uma fonte de potenciais princípios ativos que podem ser utilizados como defensivos agrícolas para combate de insetos, bactérias e fungos. Vários estudos científicos relatam o potencial fungitóxico de óleos essenciais inclusive de óleos provenientes de algumas espécies de *Eucalyptus*. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial dos óleos provenientes de diferentes espécies de *Eucalyptus*, sobre a microflora natural do grão de milho em pós-colheita. Utilizou-se para isto três diferentes avaliações: a) a avaliação inicial que consistiu em avaliar o potencial antifúngico dos óleos de dez espécies de *Eucalyptus* sobre grãos de milho plaqueados sobre papel de filtro umedecido e considerando a microflora natural dos grãos; b) a avaliação da simulação de armazenamento dos grãos com apenas os óleos que se mostraram com maior potencial antifúngico na avaliação inicial e com misturas deles. Essa avaliação simula as condições dos grãos armazenados considerando a microflora natural e c) a avaliação em meio de cultura utilizando o meio Maize Meal Extract Agar e os fungos produtores de aflatoxinas, *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Em todas as avaliações foram avaliados os modos de exposição aos voláteis e por contato com os óleos. Os óleos de *E. grandis*, *E. citriodora*, o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* e o *E. staigeriana*, que apresentaram melhor eficiência antifúngica, na avaliação inicial, sobre a microflora natural dos grãos de milho da amostra utilizada, foram analisados quanto a sua composição por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e utilizados nas demais avaliações. Na avaliação de armazenamento para o modo de ação por contato, a mistura *E. grandis* + *E. staigeriana* obteve o melhor resultado e no modo de ação por exposição aos voláteis, o melhor óleo foi o *E. citriodora*. Comparando os dois modos de ação, o por contato teve o melhor potencial antifúngico. Na avaliação em meio de cultura no modo de ação por contato, a mistura *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*) obteve melhor potencial antifúngico para ambos os fungos e para o modo de ação por exposição aos voláteis, o melhor potencial antifúngico foi com o óleo de *E. staigeriana*. Ambos os modos de ação foram estatisticamente iguais nesta avaliação para maioria dos tratamentos. Observou-se que os tratamentos apresentaram uma ação diferenciada sobre o crescimento e a produção de aflatoxinas que foi dependente do óleo, do modo de ação e da espécie aflatoxigênica avaliada.

Palavra-chave: Óleo essencial, Eucalipto, Fungos, Controle, Grãos, Armazenamento, Antifúngico.

ABSTRACT

Effect of essential oils of different species of *Eucalyptus* on the microflora of postharvest corn

The essential oils of plants are a potential source of active ingredients that can be used as pesticides to combat insects, bacteria and fungi. Several studies have been reported in the literature on the fungitoxic potential of essential oils, including oils from some species of *Eucalyptus*. This study aimed to evaluate the potential of essential oils from different species of *Eucalyptus* on the natural microflora of post-harvest corn. Three different assessments were used for this study: a) the initial assessment was used to grade ten *Eucalyptus* oils relating to its antifungal potential. In this assessment the effect of oil was checked on corn grains that were placed on moistened filter paper, considering the natural microflora of the grains, b) the second assessment was carried out just on higher antifungal potential oils observed in the initial evaluation and their binary blends. This evaluation simulates the conditions of grain storage considering the natural microflora of grain and c) the third assessment was carried out using basal medium (Maize Meal Extract Agar) and aflatoxigenic species, *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. In all assessments, two assays were evaluated, headspace volatile exposure assay and contact assay. The oils of *E. grandis*, *E. citriodora*, the hybrid of *E. grandis* x *E. urophylla* and *E. staigeriana* which had the best antifungal efficiency in the initial evaluation on the natural microflora of corn were analyzed by gas chromatography with mass spectrometry for their composition. In the evaluation of grain storage for the contact assay, the mixture of *E. grandis* + *E. staigeriana* obtained the best result and for the headspace volatile exposure assay the best oil was *E. citriodora*. Comparing the two assays, contact and headspace volatile exposures, the contact assay had the best antifungal potential. In the evaluation using the basal medium in the contact assay, the mixture of *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*) achieved the best antifungal potential for both fungal species, and in the headspace volatile exposure assay, the best antifungal potential was achieved with the oil of *E. staigeriana*. Both assays of this assessment were statistically identical to most treatments. It was observed that the treatments had a different influence over the fungal growth and aflatoxin production. And these depended on the oil, the assays and the aflatoxigenic species.

Keyword: Essential oil, *Eucalyptus*, Fungi, Control, Grains, Storage, Antifungal.

1 INTRODUÇÃO

O combate a pragas e doenças que atingem a pré e pós-colheita das culturas de interesse ao homem vem sendo realizado quase exclusivamente pelo uso de produtos químicos sintéticos, via moléculas sintetizadas em laboratório.

Entretanto, estes produtos têm apresentado algumas desvantagens como toxidez a mamíferos e aquisição de resistência da população de organismos envolvidos.

Dessa forma, vêm se buscando alternativas aos pesticidas sintéticos, entre eles os fungicidas, que são usados para o controle de doenças de plantas. Segundo Penteado (2001) são considerados defensivos alternativos todos os produtos químicos, biológicos, orgânicos ou naturais que possuam as seguintes características: praticamente não tóxicos (grupo toxicológico IV), baixa ou nenhuma agressividade ao homem e à natureza, eficientes no controle de insetos e microrganismos nocivos, biodegradáveis e não favorecedores de resistência de pragas e microrganismos.

Plantas superiores muitas vezes são vistas como fontes úteis de substâncias fungitóxicas, as quais, quando comparadas com fungicidas sintéticos, mostram-se praticamente inofensivas para o ambiente, podendo até superá-los em sua ação fungitóxica (FAWCETT; SPENCER, 1970). Os óleos essenciais além de apresentarem propriedades antibacterianas, possuem compostos com potencial antifúngico, antitoxigênico e inseticida. Os óleos essenciais têm sido utilizados em alimentos, fármacos, perfumes e repelente de insetos (BURT, 2004).

No que diz respeito aos estudos biológicos, a pesquisa de novos compostos biologicamente ativos tem sido uma das maiores tarefas dos fitoquímicos em todo mundo, pois o processo da escolha da planta até a obtenção de uma substância biologicamente ativa é longo e multidisciplinar. Assim, existe um longo caminho desde a descoberta de compostos naturais com diferentes ações até a aplicação prática dos compostos ou frações desses (PENTEADO, 2001).

A International Standard Organization (ISO) define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas por meio de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por prensão dos pericarpos de frutos cítricos (SIMÕES et al, 2000). Já Woolf (1999) define óleos essenciais como qualquer classe de óleos voláteis que compõe uma mistura de hidrocarbonetos complexos (normalmente terpenos) e outras substâncias químicas extraídas de uma planta, normalmente por um método de destilação. Os óleos essenciais dão para a planta seu aroma característico e evaporam rapidamente sobre a pele ou outra superfície.

A cultura do *Eucalyptus* spp. no Brasil se destaca por ser intensivamente utilizada a ponto de representar a espécie florestal com maior área plantada. No Brasil o *Eucalyptus* spp. é utilizado pela indústria de papel e celulose, indústria siderúrgica (carvão vegetal), para extração de óleo essencial das folhas e pela indústria moveleira (GARLIPP, 2009).

Os óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. possuem diversas funções, como repelente de insetos que se alimentam de suas folhas, inibidores da germinação e de crescimento de outras plantas, controladores da atividade microbiológica de alguns fungos e bactérias, entre outros (BOLAND et al., 1991).

Entretanto, os relatos de avaliação da utilização do óleo essencial de espécies de *Eucalyptus* para inibir fungos que ocorrem em grãos armazenados apresentam algumas características: praticamente todos os trabalhos relatados foram efetuados sobre espécies fúngicas isoladas, ou seja, não atentaram para a microflora natural do grão em pós-colheita, não empregaram como substrato para desenvolvimento fúngico meios de cultura e não o grão de interesse e também não contemplaram o efeito sinérgico dos óleos.

Este trabalho avaliou a eficiência isolada e sinérgica de óleos essenciais, provenientes de diferentes espécies de *Eucalyptus* cultivadas no Brasil, utilizando o grão de milho como substrato teste para desenvolvimento fúngico e, também, considerando os fungos naturalmente existentes na microflora de uma amostra de milho. Assim, para essa finalidade foram realizadas três avaliações e todas foram avaliadas nos modos de exposição aos voláteis e por contato com os óleos. A avaliação inicial que consistiu em avaliar o potencial antifúngico dos óleos de dez espécies de *Eucalyptus* sobre grãos de milho plaqueados sobre papel de filtro umedecido; a simulação de armazenamento dos grãos com apenas os óleos que se mostraram com maior potencial antifúngico na avaliação inicial e com misturas deles, simulando as condições dos grãos armazenados, e em meio de cultura utilizando o meio Maize Meal Extract Agar com os fungos produtores de aflatoxinas, *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*.

Este trabalho foi a primeira etapa de uma linha de pesquisa com óleos essenciais, no qual se propõem avaliar o potencial dos óleos para a inibição de crescimento fúngico e produção de aflatoxinas. Outros estudos nas áreas de toxicologia, poder residual dos compostos influenciando no odor e paladar do milho, fracionamento do óleo, avaliações dessas frações e testes de campo serão assuntos de futuros projetos nessa linha de pesquisa.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 A importância da cultura do milho

O milho é uma monocotiledônea encontrada em qualquer parte do mundo.

Botanicamente pertence à família das gramíneas (*Poaceae*), tribo *Maydeae*, gênero *Zea*, cientificamente denominado de *Zea mays* L. O seu plantio provavelmente se originou no México, de onde se estendeu para a Europa, África e Ásia (FANCELLI, 1983).

A cultura do milho (*Zea mays* L.) é de grande importância econômica e social, cultivada em uma ampla área de produção no Brasil. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a área plantada de milho foi de 14,1 milhões de hectares na safra 2008/09, com uma produção total de 52,5 milhões de toneladas (CONAB, 2009).

O milho é um dos principais grãos no mundo, sendo utilizado para alimentação humana como matéria-prima do óleo, farinha, fubá, canjica, farelo, amido, *snacks*, cereais matinais e tortilhas. Porém é destinado, principalmente, para a alimentação animal (ROONEY; SERNASALDIVAR, 1994). É responsável por fornecer nutrientes para o homem e os animais, como carboidratos, lipídios, proteínas e vitaminas, fibras, minerais como ferro, potássio e cálcio, magnésio e zinco (WATSON, 1994).

O consumo de milho no Brasil no ano de 2009 do total de 52,5 milhões de toneladas produzido dividiu-se em alimentação animal com 39,6 milhões toneladas, indústria com 4,8 milhões de toneladas, consumo humano com 756 mil toneladas, perdas na ordem de 453 mil toneladas e exportação 6,8 milhões de toneladas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MILHO - ABIMILHO, 2009).

O milho apresenta uma grande versatilidade para o aproveitamento na alimentação humana. Pode ser consumido “*in natura*” ou na forma de produtos industrializados. É também a matéria-prima principal de vários pratos culinários como cuscuz, polenta, bolos, canjicas, mingaus, cremes, entre outros (ABIMILHO, 2009).

A cadeia produtiva do milho é um dos segmentos econômicos mais importantes do setor agrícola no Brasil, não apenas pela produção em grande escala, que corresponde a 37% da produção nacional de grãos, mas também em todo o relacionamento que a cultura tem com a produção agropecuária, sendo insumo básico para a avicultura e suinocultura, como base da composição da ração, representando 63,5% na ração de frangos de corte, 59,5% na ração de

poedeiras, 65,5% na suinocultura e 23% para pecuária de leite (PINAZZA, 2009; ABIMILHO, 2009).

2.2 Armazenamento de grãos

A agricultura brasileira vem apresentando, nos últimos anos, expressivas taxas de crescimento, sobretudo no setor de grãos. Segundo levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a produção de grãos no ano de 2008/2009 foi de 134,3 milhões de toneladas em uma área plantada de 47,7 milhões de hectares. Desse total, a cultura da soja possui a maior em área plantada com 21,7 milhões de ha, seguido do milho com 14,1 milhões de ha, do feijão com 4,1 milhões de ha, do arroz com 2,9 milhões de ha, do trigo com 2,4 milhões de ha, do algodão com 842,3 mil de ha e das demais culturas com 1,4 milhões de ha (CONAB, 2009).

Dados da Conab (2009) mostram que há uma disponibilidade armazenadora total do país é de 94.080.431 toneladas, sendo que apenas 69.348.512 toneladas é destinada ao armazenamento a granel em silos e graneleiros, o que representa um valor extremamente baixo e insuficiente para a produção nacional de aproximadamente 134,3 milhões de toneladas.

A rede armazenadora de grãos é um sistema destinado para receber a produção de grãos, conservá-los em condições adequadas e redistribuí-los. O armazenamento de grãos em sacos, nos armazéns, apresenta algumas desvantagens como ficar sujeito à variação de temperatura e à infestação de fungos e pragas, que podem provocar perdas de até 10% ao ano. Já o armazenamento em silos, é a forma mais adequada de evitar as perdas pós-colheita, pois a higienização é facilitada evitando a infestação de fungos, pragas e roedores. Este tipo de armazenamento preserva melhor a qualidade e permite armazenar por longos períodos de tempo, além de ser mais econômico pela menor necessidade de mão-de-obra, maior velocidade de recebimento e expedição, eliminação do custo de sacaria e possibilidade do uso do sistema de aeração para melhor conservação dos grãos (PUZZI, 2000).

Os silos podem ser classificados pelo tipo de fundo. Assim, podem ser de fundo plano com aeração sem túnel, plano com aeração e túnel, com fundo semi-“v” e com túnel, em “v” com túnel e com fundo elevado em “v”. Podem ser de concreto, onde é construída uma torre, onde se localizam os elevadores, secadores, exaustores, máquina de limpeza e distribuição e conjunto de células, para a descarga dos grãos. Já os silos metálicos, são equipados com sistema de aeração para evitar a condensação do vapor d’água, termometria, que tem como objetivo captar e

transmitir informações sobre as condições de temperatura em pontos estratégicos da massa de grãos através de sensores e outros equipamentos mecânicos como elevadores de caçamba, para carregamento e descarga dos grãos. Os silos podem ser horizontais e verticais. Os horizontais são quando o comprimento é maior que a altura e os verticais, quando a altura é maior que o diâmetro (WEBER, 2001).

O sistema de aeração em silos é fundamentado na movimentação do ar ambiente através da massa de grãos para controlar a temperatura, reduzir focos de aquecimento, reduzindo assim o risco de deterioração dos grãos. Os seus objetivos incluem impedir a migração e a condensação da umidade, resfriamento da massa de grãos, aplicação de fumigantes e remoção de maus odores, conservando a qualidade nutricional e matéria-seca. É constituído por condutos perfurados para conduzir e distribuir o ar através da massa, tubos de conexão e ventiladores (FOSTER; TUIE, 1992).

No Brasil as perdas com os produtos alimentícios ocorrem antes de chegar ao consumidor, o total dessa perda pode chegar a 12 bilhões de reais. As perdas relacionadas aos grãos segundo alguns pesquisadores são em torno de 10 a 20 % deste montante. Os principais fatores de perdas e deterioração dos grãos armazenados são a infestação por insetos, deterioração por fungos e ataque por roedores e pássaros. Segundo o centro de pesquisa milho e sorgo da EMBRAPA, (2009) a cultura do milho tem uma perda de 17,07% da produção, sendo que na colheita é de 4,4% e no armazenamento é de 7,8%. As principais causas são a colheita tardia, tempo prolongado do produto na lavoura, tratamento pós-colheita inadequado ou ausente, falha na colheita mecânica, insuficiência de estrutura de secagem e localização inadequada da rede de armazenamento (ATHIÉ, 1998; WEBER, 2001).

As perdas pós-colheita podem ser divididas em dois tipos, a perda física, quando o produto sofre uma queda no peso por danos, causado principalmente por roedores ou insetos e a perda da qualidade, quando as características do produto são alteradas pela presença de fungos, fermentações, modificações organolépticas e contaminações por matérias estranhas (PUZZI, 2000).

Os fatores climáticos onde os grãos são produzidos e as condições de armazenamento são os principais elementos que favorecem o desenvolvimento de determinadas espécies de microorganismos. Os fungos são a principal causa de deterioração e perdas durante o armazenamento. Outros fatores são o ataque de insetos principalmente de carunchos e traças, que

pertencem à ordem *Coleóptera* e ordem *Lepidóptera*, respectivamente. A infestação de roedores, da família dos *Murideos*, além de ser extremamente destruidora, causa prejuízo e são fontes de moléstias ao homem e animais domésticos (PUZZI, 2000).

2.3 Microflora de grãos armazenados

A microbiota dos grãos armazenados é constituída basicamente de fungos e é considerada a principal causa de deteriorações e perdas durante esse período (PUZZI, 2000).

Os principais fatores que favorecem o desenvolvimento dos fungos de armazenamento são: teores elevados de umidade nos grãos, temperatura do ambiente elevada, alta taxa de oxigênio, infestação de insetos, presença de impurezas na massa de grãos e condições do tegumento do grão. Assim, para a conservação da qualidade dos grãos no período de armazenamento é necessário reduzir número de grãos danificados, remover impurezas acumuladas e manter o teor de umidade nos grãos e temperatura do ambiente abaixo do índice de multiplicação dos fungos de armazenamento, utilizando os métodos de secagem e aeração (PUZZI, 2000).

Segundo Sauer e Christensen (1992), existem mais de 150 espécies de fungos filamentosos e leveduras que foram relatados em grãos armazenados. Christensen (1974) dividiu os fungos filamentosos em dois grupos, o primeiro em fungos de campo que incluem *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp. e *Helminthosporium* spp., que necessitam de um alto teor de umidade dos grãos, acima de 20%. O segundo, fungos de armazenamento como, por exemplo, *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., que crescem com teor umidade do grão de 13 a 18%.

Sauer e Christensen (1992) observaram, para algumas espécies fúngicas, o nível de umidade mínimo para o desenvolvimento sobre cereais. Para *Aspergillus flavus* é de 17 a 18%, para *A. ochraceus* de 15,5 a 16%, para *A. candidus* de 15,5 a 16% e para espécies de *Penicillium* de 16,5 a 20%.

O controle da temperatura do ar entre a massa de grãos é fundamental para a conservação por longos períodos e para a qualidade dos grãos. Diferenças de temperaturas dentro da massa dos grãos causam o deslocamento do ar intergranular de um microambiente mais quente para o mais frio, aumentando o vapor d'água que condensa e cria condições para o crescimento dos fungos. A aeração é responsável por manter a uniformidade e a temperatura da massa de grãos e prevenir a transferência de umidade (SAUER; CHRISTENSEN, 1992).

O ataque de fungos é uma das causas que acelera o processo de deterioração, produzindo grãos ardidos e mofados, reduzindo o peso do grão, reduzindo a qualidade nutritiva e o valor comercial e, além disto, pode ocorrer a contaminação por micotoxinas que causam danos à saúde dos animais e do homem (RICHARDSON; BACON, 1995).

O termo micotoxina descreve um grupo bastante diversificado de compostos químicos, com diferentes fórmulas estruturais, propriedades químicas, físicas e toxicológicas, tendo em comum somente o fato de serem produtos de biossíntese fúngica, metabólitos secundários capazes de produzir efeitos agudos ou crônicos nos homens e nos animais, quando ingeridos (COUNCIL FOR AGRICULTURE SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).

Os principais fungos toxigênicos pertencentes aos gêneros são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são amplamente distribuídos no ecossistema brasileiro. Os fungos do gênero *Aspergillus* são amplamente distribuídos, embora ocorram com maior frequência em regiões subtropicais e tropicais, sua capacidade de crescer em condições de alta temperatura e baixa atividade de água permite a colonização em extensa variedade de substratos, sendo encontrados comumente no período de armazenamento e são os mais preocupantes economicamente. Os fungos do gênero *Penicillium* crescem e produzem micotoxinas preferencialmente em climas temperados, como citrinina, ocratoxinas e ácido ciclopiazônico e também estão associados aos períodos de estocagem de matéria-prima. Os fungos do gênero *Fusarium* é um dos grupos de patógenos mais importante associado às plantas e várias espécies são produtoras de várias micotoxinas como tricotecenos, fumonisinas e zearalenona (PITT et al., 1997).

A produção de micotoxinas assim como, o crescimento fúngico, são dependentes de uma série de fatores tais como, temperatura, presença de oxigênio, atividade de água do produto, composição do substrato, tempo para o crescimento fúngico, lesões à integridade dos grãos causados por insetos ou dano mecânico e térmico, quantidade de inóculo fúngico, bem como a prevalência de linhagens toxigênicas e interações microbiológicas (JAYAS; WHITE, 2003; TANIWAKI; SILVA, 2001; ABRAMSON et al., 1999).

Segundo Wilson e Abramson (1992), os grãos armazenados são considerados perigosos à saúde humana e animal quando apresentam atividade de água superior a 0,65, pois a maioria dos fungos toxigênicos necessita de uma atividade de água de 0,7 para seu crescimento. Para *Fusarium* spp. a atividade de água mínima para seu crescimento é de 0,9; *Aspergillus flavus* é de 0,8; *A. niger* é de 0,85; *Penicillium* spp. varia de 0,78 a 0,84.

A contaminação por micotoxinas ocasiona perdas consideráveis do ponto de vista econômico e da saúde. Os prejuízos estão diretamente associados à diminuição da produtividade e/ou perda de produtos agrícolas, redução na velocidade de crescimento, diminuição da produtividade e mortalidade de animais, doenças em humanos e rejeição de produtos pelo mercado importador (SCUSSEL, 1998).

Os principais substratos para a produção dessas toxinas são os cereais, cujas perdas, segundo estimativa da FAO situam-se ao redor de 25% dos grãos produzidos. As micotoxinas consideradas importantes do ponto de vista de saúde pública são aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), ocratoxina A, patulina, fumonisina B1, desoxinivalenol e zearalenona (FAO, 2003).

Existem legislações internacionais que estabeleceram limites para micotoxinas em alguns produtos. Uma delas é da União Européia que estabeleceu para amendoim, nozes em geral, frutas secas e cereais para consumo direto ou como ingrediente de alimentos o limite de contaminação por aflatoxina B1 igual a 2 µg/kg e aflatoxina total (B1+B2+G1+G2) de 4 µg/kg. Cereais crus com contaminação por ocratoxina o limite é de 5 µg/kg. Produtos derivados de cereais para consumo direto o limite de contaminação por ocratoxina é de 3 µg/kg (OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION, 2003).

Nos Estados Unidos, o FDA (Food and Drug Administration) estabeleceu limites de 20 µg/kg para contaminação em alimentos por aflatoxinas (B1+B2+G1+G2). Para os alimentos prontos de trigo o limite para desoxinivalenol é de 1000 µg/kg e para produtos lácteos contaminados com M1 é de 0,5 µg/kg (FAO, 1995).

No Brasil está em vigor a resolução RDC n.274, 15/10/2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde e publicada no Diário Oficial da União, de 16/10/2002, que estabeleceu o limite de 20 µg/kg (ppb) para contaminação por aflatoxinas (B1+B2+G1+G2) para amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado) e pasta de amendoim (pasta de amendoim ou manteiga de amendoim). Para milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído, farinhas e sêmolos) o limite é de 20 µg/kg (ppb). Para leite fluído o limite é de 0,5 µg/L (ppb) e para leite em pó o limite é de 5,0 µg/L (ppb) (BRASIL, 2002). A Portaria n.183 de 21/03/1996, do Ministério da Agricultura e publicada no Diário Oficial da União, de 25/03/1996, internalizou as normas do MERCOSUL GMC/RES. No. 56/94. O valor de tolerância máxima permitida para os quatro tipos de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) em amendoim e milho é de 20 µg/kg (BRASIL, 1996).

Além da contaminação com micotoxinas, a ação da microflora sobre os grãos armazenados pode afetar a qualidade nutricional e organoléptica, a coloração dos grãos e afetar o bom aproveitamento industrial dos grãos e seus subprodutos (PUZZI, 2000).

Certamente, o melhor método para controlar a contaminação por micotoxinas e os outros males em alimentos é prevenir o crescimento dos fungos. Assim, é necessário que procedimentos como a diminuição da umidade dos grãos colhidos e o armazenamento dentro dos padrões ideais, mantendo o teor de umidade, a temperatura e a taxa de oxigênio em níveis desfavoráveis para o desenvolvimento de microrganismos sejam adotadas visando tornar os fungos inativos. No caso do milho, na colheita os grãos apresentam-se com teor de umidade favorável ao crescimento fúngico, desta maneira o procedimento primordial é passar este cereal por um processo de secagem. Entretanto, pode-se utilizar como um processo complementar, o tratamento dos grãos com produtos químicos para prevenir o desenvolvimento de fungos (PUZZI, 2000; SAUER; CHRISTENSEN, 1992).

No Brasil, o consumo de agrotóxicos encontra-se em franca expansão. O país é responsável pelo consumo de cerca de 50% da quantidade de agrotóxicos utilizados na América Latina. As vendas de defensivos agrícolas em 2008 cresceram 24% em relação ao ano anterior, totalizando R\$12,7 bilhões, de acordo com dados do Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas (SINDAG). Em termos de quantidade física, foram vendidas 673.892 toneladas de produto comercial (acréscimo de 12,3% em relação a 2007), correspondendo a 312.637 toneladas de princípio ativo (incremento de 2,8%, no período). A classe dos fungicidas apresentou acréscimo nas vendas de 12,9% (em termos de valor), passando de R\$ 1,365 bilhões para R\$ 1,541 bilhões, no referido período. Isso se deve principalmente ao bom desempenho na comercialização para as culturas da soja, feijão, milho, tomate, batata e algodão (SINDAG, 2009).

Os fungicidas registrados para o tratamento de semente milho no Brasil são vários. O Euparen M 500 WP, utilizado contra *Aspergillus* spp., *Fusarium verticillioide* e *Penicillium oxalicum* é um fungicida de contato e seu ingrediente ativo é o Tolyfluanid. Sua aplicação é direta e é produzido pela Bayer S.A. O Tecno 100 e o Tecno 600 têm como ingrediente ativo o Benzimidazol e são utilizados contra *Aspergillus* spp., *Fusarium moniliforme*, *Penicillium digitatum* e *Penicillium oxalicum*. São fungicidas sistêmicos e usados no tratamento de sementes imediatamente após a colheita, produzidos pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. O Thiram

480 TS possui como ingrediente ativo o Thiram, que é um fungicida de contato para tratamento de sementes para o armazenamento e para o plantio contra *Acremonium strictum*, *Aspergillus* spp., *Fusarium moniliforme*, *Penicillium oxalicum* e *Rhizopus* spp, produzido pela Chemtura Indústria Química do Brasil Ltda. O Vitavax-Thiram 200 SC tem como ingrediente ativo o Carboxin + Thiram, fungicida com ação sistêmica e de contato para tratamento de sementes antes da semeadura ou para armazenamento contra *Acremonium strictum*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium oxalicum* e é produzido pela Chemtura Indústria Química do Brasil Ltda (BRASIL, 2005).

Os estudos utilizando ácidos orgânicos, entre eles o ácido propiônico, como inibidores do desenvolvimento fúngico em armazenamento, confirmam a inibição fúngica e conseqüentemente menor produção de micotoxinas (BRITO, 2009).

Segundo Adams (1999), os ácidos orgânicos têm sido considerados os responsáveis pela quebra no metabolismo de aminoácidos, síntese do DNA e metabolismo energético dos microrganismos. Os ácidos láctico, acético ou propiônico tem a capacidade de atravessar a membrana celular de microrganismos em seu estado não dissociado e dissociam-se no interior da célula, produzem íons H⁺, diminuindo o pH da célula. As células reagem eliminando os prótons tentando manter o pH constante, fazendo com que o gasto energético seja maior, reduzindo assim o crescimento celular microbiano. Os ânions RCOO⁻ do ácido impedem a replicação de DNA fazendo com que proteínas não sejam sintetizadas (CHOCT, 2009).

As primeiras formulações dos fungicidas a base de ácido propiônico que saíram no mercado foram utilizadas para o tratamento de grãos de milho com alto teor de umidade (20 a 30%) para a ração de bovinos, porém o uso deste ácido apresenta a desvantagem de ser altamente corrosivo e volátil. As vantagens especiais da utilização de sais orgânicos com base no ácido propiônico e no propionato de amônio são que esses produtos são menos corrosivos que os ácidos puros, não geram gases nocivos que poderiam causar intoxicações nas pessoas que os aplicam e previnem de forma eficaz o desenvolvimento de fungos e micotoxinas em grãos armazenados (SAUER, 1992).

Encontra-se no mercado atualmente outras formas do ácido propiônico para evitar a contaminação por fungos nos grãos armazenados e nas rações animais. Por exemplo, ácido propiônico produzido por processos especiais de modo a formar um complexo (dipropionato de amônio, com dois íons propionato e um íon amônio), que proporciona uma maior capacidade

"tampão". Este complexo dissocia-se na presença de umidade dos alimentos e grãos liberando o propionato livre, que proporciona uma máxima inibição de fungos (BRITO, 2009).

O armazenamento de grãos com alta umidade, utilizando a aplicação de ácidos orgânicos, para posterior uso em rações animais tem sido objeto de pesquisa em vários países do mundo. O ácido acético e o ácido propiônico, devido ao seu baixo peso molecular, são os mais empregados por fatores intrínsecos (odor, toxicidade, estabilidade), econômicos e de eficiência (BAIRD-PARKER, 1980).

Higgins e Brnkhaus (1999) mostraram que uma variedade de ácidos orgânicos como o ácido acético, ácido láctico, ácido propiônico são usados no controle do crescimento fúngico em grãos armazenados. Em um estudo realizado pelos mesmos autores, mostraram que o ácido propiônico e o ácido butírico foram igualmente eficazes na inibição do crescimento fúngico de *Aspergillus* spp., *Geotrichum* spp., *Mucor* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Scopulariopsis* spp. em um ensaio de laboratório e foram superiores a vários outros ácidos orgânicos testados. Devido a sua alta eficácia, seu custo relativamente baixo, o ácido propiônico pode razoavelmente ser considerado um dos mais econômicos ácidos orgânicos para aplicações, pois são necessários apenas 0,1 a 0,2% para apresentar efeito de inibição quase total dos fungos.

Engelmann et al. (2008) avaliaram três doses (2, 4 e 6 litros) da mistura de ácidos orgânicos e seus sais (ácido propiônico, ácido acético, propionato de cálcio, acetato de sódio e sorbato de potássio) por tonelada de grão de soja e mostraram que a dosagem de seis litros da mistura por tonelada de grão de soja foi eficiente no controle da contaminação e desenvolvimento fúngico, mesmo em condições favoráveis de umidade e atividade de água para o crescimento de bolores e leveduras.

Vandegraft et al. (1975) trataram grãos de milho com 2% de amônia e 1% de ácido propiônico. No tratamento com ácido propiônico observaram que não houve crescimento dos fungos *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *P. vividicatum* e conseqüentemente não ocorreu a produção de aflatoxina e ocratoxina. O tratamento com amônia foi eficaz inicialmente, porém permitiu o crescimento de fungos durante o armazenamento. A produção de aflatoxina e de ocratoxina foi inibida em todas as cepas selecionadas no estudo que apresentaram crescimento fúngico.

Gomez et al. (2009) avaliaram o desenvolvimento fúngico em milho contaminado, durante sete semanas. Os testes foram em nível de laboratório, com uso de três produtos que

tinham como base o ácido propiônico e propionato de amônio e foram testadas em quatro concentrações, 0,05%, 0,10%, 0,15% e 0,20%. A técnica utilizada foi de plaqueamento em profundidade para análise de bolores e leveduras. Todos os produtos utilizados no controle foram eficientes na redução dos fungos presentes no milho em todas as doses e conseqüentemente de suas micotoxinas por um período de 7 semanas.

Os fungicidas são muito utilizados, porém há uma tendência mundial limitando sua utilização em grãos e alimentos. Extratos de plantas podem oferecer uma alternativa a esses produtos. Muitos esforços têm sido dedicados à pesquisa de novos produtos antifúngicos de fontes naturais e muitos têm mostrado efeitos na produção de micotoxinas (PASTER et al., 1995).

A facilidade de aplicação dos fungicidas e os resultados imediatos obtidos os tornaram amplamente difundidos. Porém, o uso contínuo pode promover a seleção de fungos fitopatogênicos resistentes, colocando em risco a eficiência do método. A sociedade também é prejudicada, visto que uma maior quantidade de fungicidas é aplicada, contaminando o ambiente (GHINI, 2009).

Com as desvantagens geradas pelo uso de fungicidas, com todos os riscos ao meio ambiente e a saúde humana, a sociedade está exigindo cada vez mais métodos alternativos de controle, que não agrida o meio ambiente. Como alternativa ao uso de agrotóxicos, têm sido pesquisados produtos naturais, como extratos e óleos essenciais de origem vegetal, que podem apresentar propriedades antimicrobianas capazes de controlar a microflora associada às sementes e grãos (SALVADORI et al., 2003).

Vários estudos têm comprovado o efeito de compostos isolados extraídos de óleos essenciais de plantas que atuam como fungicidas naturais inibindo a atividade fúngica e um número significativo destes constituintes tem se mostrado eficaz (CHAO; YOUNG, 2000).

2.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais voláteis ou etéreos são definidos como substâncias voláteis, isoladas da planta por meio de destilação a vapor ou por processos mecânicos, são insolúveis em água, separando-se espontaneamente da fase aquosa, geralmente odoríferos, líquidos e são encontradas nas flores, folhas, raízes ou caule (BOLAND et al., 1991).

Segundo Cardoso et al. (2009) o papel dos óleos essenciais encontrados nas plantas está relacionado com a sua volatilidade, pois agem como sinais de comunicação química com o reino

vegetal e como arma de defesa contra o reino animal. Assim, considera-se a existência de funções ecológicas, especialmente como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na atração de polinizadores, na proteção contra a perda de água.

A composição química dos óleos essenciais consiste na mistura de hidrocarbonetos (terpenos, sesquiterpenos, entre outros) e de compostos oxigenados (álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis, éteres fenólicos, entre outros). As características físicas são que os óleos são insolúveis em água, porém solubilizam em álcool, éter e outros solventes orgânicos (GUENTHER, 2008; SIMÕES et al., 2000).

Nas plantas, os óleos apresentam-se em misturas de diferentes concentrações, tendo normalmente, um composto majoritário e aqueles que apresentarem em baixas concentrações são denominados componentes traço (VITTI; BRITO, 2003).

Os óleos essenciais são encontrados em folhas, flores, frutos, sementes, caule, rizomas e raízes podendo ser armazenados em estruturas especiais de secreção como cavidades, canais oleíferos, pêlos glandulares e células parenquimáticas diferenciadas. Os fatores que podem interferir na composição do óleo são: a época de coleta, as condições climáticas e de solo, localização geográfica, ciclo vegetativo da espécie e o processo de obtenção (GOTTLIEB, 1987 apud FABROWSKI, 2002).

Plantas ricas em óleos voláteis são abundantes em angiospermas dicotiledôneas, tais como nas famílias *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Myristaceae*, *Piperaceae*, *Rutaceae*, entre outras (SIMÕES et al., 2000).

Os métodos de extração do óleo variam conforme a localização do óleo na planta, sendo os mais utilizados, o arraste por vapor d'água, hidrodestilação, enfloração, extração por solventes orgânicos, prensagem e extração com CO₂ supercrítico (SIMÕES et al., 2000).

Os óleos essenciais são fontes importantes de aromatizantes em perfumaria e especiarias e apresentam atividades farmacológicas, antisépticas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, entre outras. São muito utilizados na medicina popular e para a fabricação de medicamentos, nas áreas de alimentos (condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas) e cosméticos (perfumes e produtos de higiene) (CARDOSO et al., 2009).

Os óleos essenciais, por serem uma mistura complexa de compostos, não apresentam um mecanismo de ação antimicrobiana exatamente definido. Existem alguns mecanismos propostos, como desnaturação proteica, inibição enzimática e desintegração da membrana, ocorrendo uma

provável interação entre os componentes do óleo, acarretando em sinergismo e/ou antagonismo (JANSSEN, 1989).

Janssen (1989) ainda comenta que os ensaios antimicrobianos com óleos essenciais seguem objetivos específicos, tais como: verificar a atividade antimicrobiana de um determinado óleo ou de seus constituintes, determinar a atividade anti-séptica ou desinfetante e de propriedades conservantes de alimentos, estudar o possível papel dos óleos essenciais em interações biológicas e suas ações terapêuticas.

Vários estudos documentam as propriedades antifúngicas dos óleos essenciais de plantas (DAFERERA et al., 2003). As pesquisas com extratos de produtos naturais podem promover uma alternativa para proteção de alimentos contra fungos contaminantes (PASTER et al., 1995). Além disso, pesquisas com extratos vegetais estão sendo realizadas visando obter novas alternativas para os fungicidas e pesticidas sintéticos, que possam ser menos prejudiciais ao ambiente e a saúde humana (ADDOR, 1995).

Amaral et al. (2005) estudaram a atividade antifúngica do rizoma do açafrão, folhas de coração negro e essência de cravo-da-índia contra *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. Dessas plantas estudadas, o cravo-da-índia apresentou um potencial antifúngico significativo contra fitopatógenos acrescentados a meio de cultura ou presentes em sementes diversas.

A atividade de frações voláteis dos óleos essenciais de frutas cítricas (laranja, limão, tangerina e laranja azeda) foi testada para inibir crescimento de *Penicillium digitatum* e *P. italicum* em concentrações variando de 250 a 500 ppm. O *P. italicum* mostrou maior resistência à atividade antifúngica que o *P. digitatum*. O óleo essencial de limão mostrou ação fungistática e os óleos essenciais de laranja tiveram o mais baixo nível de atividade antifúngica. Análise dos óleos em cromatografia gasosa mostrou uma correlação significativa entre o efeito antifúngico e a quantidade de monoterpenos (com a exceção de limoneno) presentes em óleos essenciais (CACCIONI et al., 1998).

Singh et al. (1992) concluíram em seus estudos, que o óleo essencial de menta, além de antifúngico, desempenha um papel antibacteriano, controlando o crescimento de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* spp. e entre os fungos controlou *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Cochiliobolus sativus*, *Sclerotum rolfsi* e *Aspergillus parasiticus*. Os autores sugerem o uso direto sobre grãos e alimentos armazenados, visando o controle de microrganismos e insetos.

O efeito inibitório no crescimento do *A. niger* pelo óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) foi estudado por Billerbeck et al. (2001). O crescimento micelial foi completamente inibido a 800 ppm. A concentração de 400 ppm do óleo essencial causou inibição do crescimento em 80% após 4 dias de incubação. Observações microscópicas relataram modificações estruturais nas hifas de *A. niger* depois do tratamento com o óleo, a principal mudança observada foi no diâmetro das hifas e na parede delas estavam visivelmente mais finas. Estas modificações em estruturas citológicas poderiam ser causadas pela interferência do óleo essencial em enzimas responsáveis pela síntese de parede afetando o desenvolvimento normal. Além disso, o óleo essencial causou rompimento da membrana do protoplasma e desorganização nas estruturas das mitocôndrias.

Bluma et al. (2008) estudaram o efeito antifúngico dos óleos essenciais de *Pimpinella anisum* (anis), *Peumus boldus* (boldo), *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) e *Minthostachys verticillata* (peperina) contra *Aspergillus* seção *Flavi* e *Aspergillus parasiticus*. Observaram um efeito fungitóxico nos óleos essenciais de boldo e anis.

O óleo essencial de *Chrysanthemum coronarium* foi estudado por Alvarez-Castellanos et al. (2001) que observaram uma eficiência destes contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Pythium ultimum*, porém os fungos *Penicillium digitatum* e *Fusarium moniliforme* foram resistentes ao óleo.

Nguefack et al. (2004) extraíram óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Monodora myristica*, *Ocimum gratissimum*, *Thymus vulgaris* e *Zingiber officinale* e estudaram o efeito inibitório contra os fungos produtores de toxinas *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*. Os óleos essenciais de *O. gratissimum*, *T. vulgaris* e *C. citratus* foram os mais efetivos e inibiram a germinação dos conídios e o crescimento dos fungos nas concentrações 800, 1000 e 1200 ppm, respectivamente.

Bullerman (1974) analisou o crescimento de fungos em pães brancos adicionados ou não de uva passa e canela e verificaram que neste último houve uma inibição acentuada de aflatoxinas e do crescimento micelial de *Aspergillus parasiticus*, chegando a 100% quando utilizado extrato alcóolico de canela a 20%. Em concentrações menores o extrato de canela foi mais eficiente na inibição de aflatoxinas do que no crescimento micelial do fungo.

Soliman e Badeaa (2002) testaram doze óleos essenciais em fungos produtores de toxinas: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *Fusarium moniliforme*. Os resultados

mostraram que os fungos foram sensíveis a todos os óleos testados e que os óleos de tomilho, canela, erva-doce e hortelã reduziram a produção de micotoxinas em testes realizados sobre grãos de trigo.

Apesar dos óleos essenciais serem produtos naturais, eles podem ser tóxicos ao homem e animais. Os óleos essenciais puros apresentam uma toxicidade elevada e as recomendações de uso são em pequenas doses. Os efeitos tóxicos dos óleos podem ser decorrentes de intoxicações agudas ou crônicas. A toxicidade é normalmente, dose-dependente, isto é, quanto maior a dose, maior a toxicidade. Porém muitas reações de alergias e fototoxicidade podem ocorrer em baixas dosagens. Muitos óleos voláteis possuem substâncias químicas que são agentes fotossensibilizadores. Como exemplo, temos as frutas cítricas que devem essa ação à presença de defuranocumarinas. Os óleos ricos em tujona (sálvia), fechona (funcho), cânfora e pinocanfona (manjeriço) são neurotóxicos em altas doses, podendo ocasionar convulsões, distúrbio sensoriais e psíquicos. O óleo volátil de noz-moscada pode produzir alucinações, excitações devido à presença de miristicina e elemicina (CARDOSO et al., 2009).

O óleo de *Eucalyptus* spp. possui compostos fenólicos e terpenos que podem ser tóxicos. Muitas reações podem ser atribuídas ao uso ou contato com o óleo, extrato ou material fresco de *Eucalyptus* spp. Os compostos que podem ter esse efeito tóxico são, 1,8- cineol, taninos e glicosídeos cianogênicos (CORNELL UNIVERSITY, 2010).

Os óleos essenciais podem apresentar toxicidade em doses elevadas, porém são muito utilizados na indústria de alimentos, medicamento e cosméticos em baixas concentrações (CARDOSO, et al., 2009; BURT, 2004).

2.5 A cultura do *Eucalyptus* spp.

O gênero *Eucalyptus* pertence à família das *Myrtaceae*, composto de mais de 700 espécies catalogadas e encontradas em diversas partes do mundo. O *Eucalyptus* spp. é uma árvore nativa da Austrália, Nova Guiné, Indonésia e Timor Leste. Os primeiros plantios experimentais foram na Europa, mais especificamente, na Espanha e Portugal em 1854 e as primeiras plantações em escala comercial foram na Índia em 1856, no Chile em 1823 e no Brasil em 1903 (VIANA, 2005).

As primeiras mudas de *Eucalyptus* spp. que chegaram ao Brasil foram plantadas no Rio Grande do Sul em 1868. No mesmo ano, também foram plantados alguns exemplares no Rio de Janeiro. Sua utilização para fins econômicos só teve início em 1903 quando passou a ser

empregado na produção de dormentes ferroviários e lenha para alimentar as locomotivas da época (RIBEIRO et al, 2002).

O Brasil se destaca no cenário mundial por apresentar um excelente desempenho no setor florestal, condições climáticas favoráveis e tecnologia adequada. Apesar de serem descritas cerca de 700 espécies do gênero *Eucalyptus*, os plantios são restritos a poucas espécies, podendo-se citar, principalmente, *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla*, *E. saligna*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. viminalis*, *E. deglupta*, *E. citriodora*, *E. exserta*, *E. paniculata*, *E. robusta* e o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*. Ressalta-se que, no Brasil, as espécies *E. cloezina* e *E. dunnii* são consideradas promissoras para as regiões central e sul, respectivamente. As espécies de *Eucalyptus* que são indicadas para a produção de óleo essencial são *E. camaldulensis*, *E. citriodora*, *E. exserta*, *E. globulus* e *E. smithii* (INSTITUTO DE PESQUISA E ESTUDOS FLORESTAIS - IPEF, 2009).

Vitti e Brito (2003) destacam como as principais espécies produtoras de óleo essencial no Brasil, o *E. citriodora*, *E. staigeriana* e *E. globulus*.

Segundo dados da Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (ABRAF, 2009), as plantações de *Eucalyptus* spp. no Brasil ocupam 4.258.704 hectares. O setor florestal responde por 3,5% do nosso Produto interno bruto (PIB) e gera 4,6 milhões de empregos diretos e indiretos. A exportação de produtos derivados de florestas plantadas, em 2007, somou 6,1 bilhões de dólares, dos quais 70% foram resultantes do cultivo do *Eucalyptus* spp. Toda a cadeia é responsável por vários produtos como papéis, móveis, energia, carvão vegetal, construção civil e óleos essenciais. Porém, o *Eucalyptus* spp. brasileiro se destina basicamente à produção de celulose e papel e ao carvão que abastece as siderúrgicas.

As Florestas Plantadas estão distribuídas estrategicamente, em sua maioria, nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo. Essas florestas plantadas visam a garantia do suprimento de matéria-prima para as indústrias de papel e celulose, siderurgia a carvão vegetal, lenha, serrados, compensados e lâminas e painéis reconstituídos (aglomerados e chapas de fibras) (EMBRAPA FLORESTAS, 2009).

Na prática, na área da plantação comercial de *Eucalyptus* spp., onde a produção é destinada para papel e celulose, as folhas ficam depositadas no solo servindo de adubo, sem utilização comercial. As folhas apenas são utilizadas para a produção de óleo essencial quando a produção é destinada para essa finalidade.

2.6 Óleo essencial de *Eucalyptus* spp.

2.6.1 Aspectos gerais do óleo essencial de *Eucalyptus* spp.

O óleo essencial de *Eucalyptus* spp. ocorre principalmente nas folhas, onde são produzidos em pequenas cavidades globulares, denominadas glândulas e são distribuídas em todo parênquima das folhas de varias espécies de *Eucalyptus*. Em algumas espécies é possível visualizar essas glândulas como pequenos pontos quando se observa a folha contra a luz (VITTI; BRITO, 2003).

O óleo essencial das folhas de *Eucalyptus* spp. é um líquido incolor ou amarelado ou esverdeado, fluído com odor forte, aromático, de misturas complexas de compostos orgânicos voláteis, de hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, sendo constituídos de monoterpenos (C₁₀) e sesquiterpenos (C₁₅) (GUENTHER, 1977).

A origem biossintética dos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. está relacionada com seu metabolismo secundário, que não é considerado fundamental para a manutenção da vida do organismo, porém confere às plantas a capacidade de adaptação às condições do meio em que vivem. No caso especificamente dos *Eucalyptus* spp., as referências são de que as ocorrências de óleos essenciais estariam relacionadas com a defesa da planta contra insetos, resistência ao frio quando no estagio de plântula, ao efeito alelopático e à redução da perda de água, resultados estes que dependem ainda de mais estudos comprobatórios (VITTI; BRITO 2003).

A primeira destilação de óleo essencial de *Eucalyptus* spp. foi realizada na Austrália pelo cirurgião inglês John White, no fim do século XXIII, para a substituição do óleo de menta indicado como sedativo. White designou como “peppermint-tree” a planta produtora de óleo, naquela data, ainda, botanicamente desconhecida (PERRUZZO, 1993).

A extração do óleo essencial de *Eucalyptus* spp. pode ser feita pelo processo de destilação por arraste a vapor. No laboratório, as folhas de *Eucalyptus* spp. são colocadas num balão com água e levadas para o destilador. Quando a água é aquecida inicia-se a produção de vapor que arrasta o óleo contido nas glândulas das folhas, que sobe pelo equipamento, condensa-se, sendo recuperado em um separador. Como o óleo é mais leve, ele posiciona-se na parte superior. Na indústria as folhas não entram em contato com a água. Elas recebem o vapor produzido em uma caldeira que fica na parte abaixo às folhas, levando cerca de 50 minutos para extrair o óleo (LIMA, 2009).

As exportações brasileiras de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp., no período de 2005 a 2008, somaram US\$ 9,6 milhões relativos a 1.237 toneladas, sendo 66% no estado de São Paulo e 33% em Minas Gerais. O principal importador foi a União Européia (45%), especificamente, Espanha (24%), Reino Unido (13%) e Suíça (10%), seguido dos EUA (33%) (BIZZO, 2009).

2.6.2 Composição química do óleo essencial de *Eucalyptus* spp.

A investigação dos óleos essenciais levou ao descobrimento de hidrocarbonetos isoméricos denominados terpenos, porém, os óleos essenciais são misturas muito complexas e muito variáveis em seus constituintes, sendo encontrados somente os terpenos mais voláteis, dentre os quais destacam-se aqueles de baixo peso molecular, como os monoterpenos com 10 carbonos e sesquiterpenos com 15 carbonos (DORAN; BROPHY, 1990).

A composição química dos óleos essenciais difere para cada espécie ou subespécie devido ao ambiente, sazonalidade, tratos culturais, formas de extração e outros fatores, influenciando no efeito antimicrobiano de cada óleo (DAFERERA et al., 2002).

Muller e Brito (2006) observaram variação na quantidade de óleo essencial de *Eucalyptus* spp., sendo que na época da seca a quantidade de óleo é menor quando comparado com a época de chuvas, porém não foi observado alteração na composição do óleo.

A análise de produtos naturais, especialmente os óleos essenciais, constitui-se uma tarefa árdua e de difícil execução devido ao grande número de constituintes e semelhança de propriedades físicas. A cromatografia em camada delgada (CCD) é um método bastante usado na análise de óleos voláteis, já que permite obter várias informações sobre um óleo volátil em curto espaço de tempo, utilizando pouca amostra e o custo é baixo. A análise através de CCD pode revelar alguns dados sobre a composição do óleo, como a presença de duplas ligações, complexidade de sua constituição ou, no caso de comparação com padrões, confirmação de identidade ou detecção de falsificações. Outra aplicação da CCD seria no monitoramento do fracionamento dos óleos voláteis em coluna cromatográfica. Geralmente, são usadas placas de gel de sílica como fase fixa e, como fase móvel, existe uma grande variedade de sistemas de solvente. A revelação pode ser feita sob luz ultravioleta ou com reagente adequado para cada caso, como por exemplo, o ácido sulfúrico. A cromatografia em fase gasosa é uma técnica conhecida há longa data e que mostrou ser a ferramenta ideal para análise de misturas complexas e principalmente de óleos essenciais. É um método moderno de separação de compostos de

propriedades físicas semelhantes, e que facilita o isolamento de substâncias. A identificação dos compostos individuais pode ser realizada através da comparação do tempo de retenção relativo da amostra com padrões (SIMÕES, 2000).

Para se ter mais segurança na identificação dos picos individuais e controlar a pureza de um pico cromatográfico, são recomendáveis analisar um óleo volátil também por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS). Este método permite a separação dos componentes e fornecer um espectro de massas para cada pico. O espectro de massas geralmente indica a massa molecular e o padrão de fragmentação o qual pode ser comparado com aqueles constantes da biblioteca de espectros, que é instalada no computador (SIMÕES, 2000).

Zrira et al. (2004) analisaram, utilizando CG/MS, nove espécies de *Eucalyptus* (*E. inérea*, *E. baueriana*, *E. smithii*, *E. bridgesiana*, *E. microtheca*, *E. foecunda*, *E. pulverulenta*, *E. propinqua*, *E. erythrocorys*) de origem marroquina. Um total de 83 componentes foram identificados e todas as espécies eram ricas em 1,8-cineol (>68%). Em cinco espécies (*E. inérea*, *E. baueriana*, *E. smithii*, *E. bridgesiana* e *E. microtheca*) o 1,8-cineol excedeu 80%.

Alitonou et al. (2004) identificaram 23 compostos químicos do óleo essencial de *E. tereticornis*, representando 91% do óleo essencial. O componente em maior quantidade foi p-cimeno com 31,4% seguido por β -felandreno (9,77%), espatulenol (8,13%), γ -terpeneno (7,03%) e α -felandreno (6,78%).

Rao et al. (2003) estudaram o óleo essencial de *E. citriodora* comparando duas formas de extração do óleo das folhas do *Eucalyptus* spp., utilizaram óleo essencial decantado (obtido diretamente por destilação a vapor das folhas) e óleo recuperado (extraído da água de destilação usando hexano). O óleo decantado era mais rico em citronelal (70,3%), citronelol (8,8%), acetato de citronelilo (1,3%) e β -cariofileno (2,6%). O óleo recuperado era rico em isopulegol (53,0%), borneol (10,0%), mentol (5,3%), neral (6,9%), geraniol (1,4%) e eugenol (4,6%). Citronelal, o componente principal do óleo decantado estava ausente no óleo recuperado. Diferente do óleo essencial de *E. citriodora* encontrado por Fandohan et al. (2004), que continha em maior quantidade citronelal (66%) junto a uma pequena quantidade de citronelol (12%).

Ogunwande et al. (2003) trabalharam com óleo essencial de *E. microtheca*, *E. tereticornis* e *E. grandis*, oriundos da Nigéria, e observaram que no *E. microtheca* o composto 1,8 cineol foi predominante (53,8%) seguido do α -pineno (6,8%) e α -terpineol (5,6%), porém nas

outras espécies de *Eucalyptus* não encontraram 1,8 cineol. O composto predominante foi o β -pineno (39,4%) e α -pineno (30,4%) no *E. tereticornis* e *E. grandis*, respectivamente.

2.6.3 Uso dos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp.

Os óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. são divididos basicamente em três grupos principais, em função do seu uso final: óleos destinados para produtos medicinais, óleos industriais e óleos de perfumaria (PENFOLD; WILLIS, 1961; BOLAND et al., 1991). As principais espécies de *Eucalyptus* produtoras de óleos essenciais estão relacionadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais espécies de *Eucalyptus* utilizadas para produção de óleo essencial

Espécies	Componente Principal	
Óleos medicinais	Nome	Teor
<i>E. camaldulensis</i>	Cineol	80-90%
<i>E. globulus</i>	Cineol	60-85%
<i>E. smithii</i>	Cineol	70-80%
<i>E. tereticornis</i>	Cineol	45%
<i>E. viridis</i>	Cineol	70-80%
Óleos industriais		
<i>E. dives</i> var. felandreno	Felandreno	60-80%
<i>E. dives</i> var. piperitona	Piperitona	45-56%
<i>E. elata</i> var. piperitona	Piperitona	40-56%
<i>E. radiata</i> var. felandreno	Felandreno	35-40%
Óleos para perfumaria		
<i>E. citriodora</i> var. citronelal	Citronelal	65-80%
<i>E. staigeriana</i>	Citral	16-40%

Fonte: Boland et al. (1991); Salgado, (2001).

Segundo Salgado (2001), os óleos para fins industriais contêm, principalmente, piperitona e α -felandreno. Óleos ricos em felandreno são utilizados quase que exclusivamente para aromatizar desinfetantes e na indústria de sabonetes líquidos, enquanto que a piperitona é usada para a síntese do timol e mentol, ambos são usados como flavorizantes, como aditivos em várias preparações medicinais e para síntese de fungicidas (PENFOLD; WILLIS, 1961; FERREIRA; SANTOS, 2009).

O óleo de *Eucalyptus* spp. têm sido considerado útil em várias áreas tais como ambiental, econômica, farmacêutica e medicinal. Suas propriedades terapêuticas são antifúngica,

antibacteriana, antisséptica, cicatrizante, antiinflamatória e um desinfetante de grande potencialidade (SIMÕES et al., 2000).

Alguns trabalhos têm demonstrado a atividade antibacteriana e antifúngica de diferentes espécies de *Eucalyptus* frente a vários microorganismos (NASCIMENTO et al., 2000).

Os óleos essenciais de várias espécies de *Eucalyptus* provenientes da República do Congo foram avaliados frente a microorganismos de origem patológica por Cimanga et al. (2002), sendo as espécies *E. camaldulensis* e *E. terticornis* as mais ativas, principalmente frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Este estudo ainda atribui a atividade observada a componentes presentes em menor concentração no óleo essencial.

Salgado (2001) avaliou a atividade fungitóxica de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. Nas concentrações de 500 ppm dos óleos foram observadas inibições significativas no crescimento micelial das espécies fúngicas, no entanto, o óleo essencial de *Eucalyptus urophylla* foi o que apresentou maior ação fungitóxica, que foi atribuída à presença do composto denominado globulol, ausente no *E. camaldulensis* e no *E. citriodora*.

Segundo Fandohan et al. (2004), os óleos de *Lantana camara* e *E. citriodora* inibiram completamente o crescimento micelial do fungo *Fusarium verticillioides* em concentrações de 4 e 4,7 ppm, respectivamente.

Baruah et al. (1996) testaram óleos essenciais de *Cymbopogon martinii* var. *motia*, *Eucalyptus citriodora*, *Cinnomomum tamala* e *Mentha piperita* contra *F. verticillioides*, e observaram que o óleo de *E. citriodora* foi menos efetivo que o óleo de *Cymbopogon* spp.

Óleos essenciais de *Romarinus officinalis*, *E. globulus*, *Thymus capitatus* e três tipos de *Artemisia herba alba* foram testados por Benjilali et al (1984) em 39 linhagens de fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e outros gêneros. Em geral, o óleo essencial de *Thymus capitatus* foi o mais eficiente, seguido por três tipos de óleos de *Artemisia herba alba* e por fim o óleo essencial de *E. globulus*. Segundo o autor, o composto químico 1,8 cineol predominou no óleo essencial de *E. globulus* (69%).

Alfazairy (2004) verificou a eficiência dos óleos essenciais de *Cupressus sempervirens*, *Eucalyptus citriodora* e *Taxodium distichum* sobre os fungos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. e *Mucor* spp., fungos que atacam a madeira da árvore *Casuarina timber*. Os óleos essenciais de *E. citriodora* e *Taxodium distichum* inibiram tanto o crescimento micelial quanto a

esporulação dos quatro fungos. Na concentração 30 µL/15 mL do óleo de *E. citriodora* inibiu completamente todos os fungos.

Segundo Alitonou et al. (2004), o óleo essencial de *E. tereticornis* tem amplo poder inibitório. Esse óleo apresentou atividade fungicida (destruiu completamente *Saccharomyces* spp., *Sporobolomyces* e *Hansenula* spp.), bactericida (destruiu *Corynebacteriaceae* spp.) e fungistática (inibiu o crescimento de *Torulopsis candida*).

Estanislau et al. (2001) realizaram um estudo sobre a composição química e a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *E. cloeziana*, *E. citriodora*, *E. saligana*, *E. grandis*, *E. microcorys* contra microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*. Os óleos que apresentaram maior efeito contra as bactérias foram *E. citriodora*, *E. grandis* e *E. saligna*, enquanto que *E. cloeziana* e *E. microcorys* não apresentaram resultados satisfatórios de inibição desses microrganismos.

Tantaoui-Elaraki et al. (1993) estudaram os efeitos dos óleos essenciais de orégano, estragão e *Eucalyptus* spp. na germinação de esporos, crescimento micelial e esporulação dos fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium italicum* e *Zygorrhynchus* spp. Os autores concluíram que todos os óleos afetaram o crescimento micelial, a germinação de esporos e a esporulação.

Papachristos e Stamopoulos (2004) testaram os óleos essenciais de *Lavandula hybrida* (flores), *Rosmarinus officinalis* (folhas) e *Eucalyptus globulus* (folhas verdes) na inibição de ovos de *Acanthoscelides obtectus*. Os autores observaram que a exposição de ovos em vapores dos óleos essenciais aumentou a mortalidade pós-embrionária da larva emergida. Os óleos de lavanda e de rosa mostraram um potencial semelhante, enquanto que o óleo essencial de *Eucalyptus* spp. foi menos tóxico. É possível que os óleos essenciais atuem em insetos como neurotóxicos, pois a atividade ovocida só é aparente quando o sistema nervoso começa a se desenvolver.

Brito et al. (2006) avaliaram os efeitos dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus staigeriana*, sobre a mortalidade de adultos da principal praga encontrada no armazenamento de grãos de feijão, o *Callosobruchus maculatu*, conhecido como caruncho. Esse trabalho mostrou um controle eficiente desta praga, sendo que os tempos letais e as doses letais diminuíram conforme o aumento da dose aplicada de cada óleo ou o tempo de exposição do inseto. O óleo do *Eucalyptus citriodora* foi o mais eficiente no controle.

Chagas et al. (2002) estudaram a ação biocida dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus staigeriana* sobre o carrapato, *Boophilus microplus*,

e os resultados mostraram que o *E. citriodora* eliminou 100% dos carrapatos em uma concentração de 17,5%, o óleo de *E. globulus* a 15% e o *E. staigeriana* a 12,5%. Nesse estudo foi analisada a composição do óleo de *E. citriodora* e determinou-se que o citronelal como principal componente do óleo, sendo responsável pela ação acaricida. O mesmo ocorreu com o 1,8-cineol em *E. globulus*. Em *E. staigeriana* existem vários compostos que agem sinergicamente contra o carrapato.

Vilela et al. (2009) realizaram um trabalho que avaliou o efeito do óleo essencial de *E. globulus* contra espécies fungicas produtoras de aflatoxina, *A. flavus* e *A. parasiticus*, nas doses de 2,5, 25, 100, 200, 500, 1000, 1500 µl para 20 mL de meio de cultura por placa de Petri. Foram realizados dois modos de ação, um para avaliar o efeito do óleo via exposição dos voláteis e outro via contato direto do óleo adicionado ao meio e foi também analisado a eficiência do composto majoritário do óleo essencial, onde foi elaborada uma solução contendo o composto 1-8-cinelol e o solvente dimetilsulfóxido. As placas para ambos os modos de ação, foram incubados por 10 dias e após esse período foram realizadas medidas do crescimento micelial dos fungos e avaliações sobre a produção de aflatoxina, pela técnica de cromatografia em camada delgada. Observaram também que o óleo apresentou uma eficiência contra os fungos estudados nas doses mais elevadas, principalmente os compostos voláteis e que o *E. globulus* e o 1-8-cineol não apresentaram eficiência antifúngica. Ambos também não apresentaram inibição total na produção de aflatoxinas.

2.7 Metodologias para avaliação do potencial antifúngico dos óleos essenciais

Atualmente várias metodologias são relatadas na literatura científica como possíveis de serem utilizadas na avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais e óleos essenciais. Os mais conhecidos métodos são o de difusão em disco, diluição em ágar e diluição em caldo.

O método de diluição em caldo consiste em adicionar a um caldo ou meio de cultura, que servirá de substrato ao microrganismo de interesse, o extrato vegetal, óleo essencial ou composto a ser checado quanto ao seu potencial antifúngico. Várias concentrações podem ser checadas concomitantemente e assim, pode-se obter a CIM (Concentração Inibitória Mínima), definida como a menor concentração do composto capaz de inibir completamente o crescimento fúngico. Os ensaios utilizando esta técnica podem ser em escala de macro ou microdiluições. A

macrodiluição é conduzida em tubos de ensaio e a micro em micropoços. Tanto na macrodiluição como na microdiluição o substrato é inoculado com uma suspensão padrão do microrganismo a ser testado. O período e a temperatura de incubação podem variar conforme a espécie fúngica e outros fatores adotados pelo interessado (HADACEK; GREGER, 2000).

O crescimento fúngico na macrodiluição pode ser detectado por diferentes técnicas. O aparecimento e extensão do tubo germinativo é uma das possibilidades utilizadas para determinação da CIM em fungos filamentosos e permite a detecção de deformações morfológicas, como inchaço e enrolamento. A observação da turbidez, que pode ser realizada visualmente ou através da densidade óptica, pode também indicar a presença de crescimento do micélio. Outras técnicas existentes são baseadas na observação colorimétrica, espectrofotométrica ou fluorométrica, com adição de corantes e reagentes que auxiliam ou tornam possível as leituras (HADACEK; GREGER, 2000).

Na técnica de microdiluição em caldo o crescimento fúngico é avaliado por leitoras de absorvância, fluorescência ou visualmente. Como vantagens desta técnica, em relação à macrodiluição, podem ser citadas a possibilidade de automatizar a leitura do crescimento fúngico, a redução dos gastos de insumos (caldo) e economia das quantidades dos compostos a serem testados (HADACEK; GREGER, 2000).

O método de diluição em caldo foi o método escolhido pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), antigo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, localizado no Estado da Pensilvania, Estados Unidos da América, como técnica utilizada na Norma M38-A, de 2002, destinada a avaliação da capacidade antifúngica de compostos. Esta metodologia descreve procedimentos para testar a sensibilidade dos fungos filamentosos aos agentes antifúngicos. Segundo este comitê o método pode ter vantagens, como facilidade de execução, economia, ou resultados mais rápidos (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2009).

Helal e Stelato (2009) utilizaram o método de microdiluição para determinar o efeito antifúngico do óleo essencial de *Origanum vulgare* contra *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*. Zgoda (2001) utilizou a microdiluição com extratos orgânicos das plantas *Lemna minor* e *Ilex cornuta* para pesquisar novos compostos com atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos. Simié et al. (2004) estudaram a atividade antifúngica de alguns óleos essenciais de *Lauraceae* determinando a CMI por microdiluição. Khan e Katiyar

(2000) testaram a atividade antifúngica do extrato de alho (*Allium sativum*) usando a microdiluição. Xavier et al. (2007), avaliaram a eficácia “in vitro” dos agentes químicos, iodóforo, amônia quaternária e clorexidina, frente a isolados de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus terreus* com a técnica de microdiluição em caldo. Espinel-Ingroff et al. (1995) utilizaram o método de macrodiluição para determinar o CIM de anfotericina B, fluconazol, itraconazol, miconazol e cetoconazol contra *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Pseudallescheria boydii*, *Rhizopus arrhizus*, e *Sporothrix schenckii*. Pinto et al. (2007) testaram com o método de macrodiluição o óleo essencial de *Salvia officinalis*, contra os fungos filamentosos *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp. e *Fusarium* spp.

O teste de diluição em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método no qual um microrganismo é exposto a uma substância biologicamente ativa presente no meio de cultura que serve como substrato. A extensão do crescimento radial do fungo inoculado com uma suspensão padrão em um ponto do meio de cultura após um período de incubação é comparado entre o tratamento contendo o composto testado e a testemunha sem o composto. O crescimento radial é mensurado visualmente com auxílio de um instrumento de medição, tal como uma régua ou um paquímetro (HADACEK; GREGER, 2000).

Na literatura existem vários exemplos de pesquisas que utilizaram a metodologia de difusão em ágar. Salgado et al. (2003) estudaram o potencial do óleo essencial de *Eucalyptus* de três espécies, *E. urophylla*, *E. citriodora* e *E. camaldulensis* contra *Fusarium oxysporum* e *Bipolaris sorokiniana*. Amaral et al. (2005) investigaram a atividade antifúngica dos extratos de açafreão (*Curcuma longa*), do coração de negro (*Albizzia lebeck Benth*) e óleo essencial de cravo-da-índia (*Sizygium aromaticum*) contra fungos fitopatogênicos, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. Nesci e Etcheverry (2006) realizaram um estudo com *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* e os compostos fenólicos usados no controle dos fungos foram ácido trans-cinâmico e ácido ferúlico. Fandohan et al. (2004) extraiu óleo essencial de nove espécies de plantas, incluindo o *E. citriodora* e estudaram o seu efeito antifúngico sobre *Fusarium verticillioides*. Bluma e Etcheverry (2008) utilizaram óleos essenciais de anis, boldo, tomilho, cravo e poleo, contra *Aspergillus* seção *Flavi*. Alves et al. (2006) avaliaram o efeito antifúngico do extrato de folha de goiabeira contra leveduras do gênero *Cândida* spp.

A metodologia da difusão em disco foi desenvolvida primeiramente para teste com bactérias (De Beer e Sherwood, 1945) e depois foi modificado para fungos filamentosos e o método foi padronizado por Bauer et al. (1966) e Ericson e Sherris (1971) e depois modificado em um relatório do World Health Organization (1977).

Esse método consiste em avaliar a ação antifúngica oferecida por um composto presente em um disco de papel filtro de pequeno diâmetro (4 a 15 mm) colocado sobre um meio de cultura contido em uma placa de Petri e inoculado com um microrganismo. O halo de inibição do crescimento fúngico ao redor do disco de papel mensurado com auxílio de um instrumento de medição, régua ou paquímetro, permite identificar o potencial antifúngico do composto (extrato vegetal ou óleo essencial). Uma variação desta metodologia consiste na perfuração do meio de cultura, no centro da placa de Petri, onde são colocados anéis de porcelanas de pequeno diâmetro onde será depositado um pequeno volume da solução dos compostos a serem avaliados (HADACEK; GREGER, 2000).

Lee et al. (2008) empregaram a técnica de difusão em disco para testar 11 espécies de *Myrtaceae*, incluindo *E. citriodora*, *E. smithii*, *E. globulus*, *E. radiata* e *E. dives* e foram utilizadas três espécies fúngicas, *Phytophthora cactorum*, *Cryponectria parasítica* e *Fusarium circinatum*. Yin e Tsao (1999) avaliaram o efeito de sete extratos de *Allium* spp. contra *Aspergillus niger*, *A. flavus* e *A. fumigatus*. Chandrasekaran e Venkatesalu (2004) utilizaram o extrato de sementes de *Syzygium jambolanum* contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus* spp., *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum gypseum*.

Segundo Ostrosky et al. (2008) o método de diluição em Agar é o mais utilizado, devido à simplicidade de execução e ao baixo custo. Já na determinação da CIM, o método da microdiluição, desenvolvido por Eloff em 1998, vem sendo bastante utilizado, principalmente devido à sua sensibilidade e quantidade mínima de reagentes, o que possibilita um maior número de réplicas, aumentando a confiabilidade dos resultados.

2.8 Material e Métodos

A Figura 1 apresenta o fluxograma com a sequência de avaliações utilizadas no desenvolvimento da pesquisa.

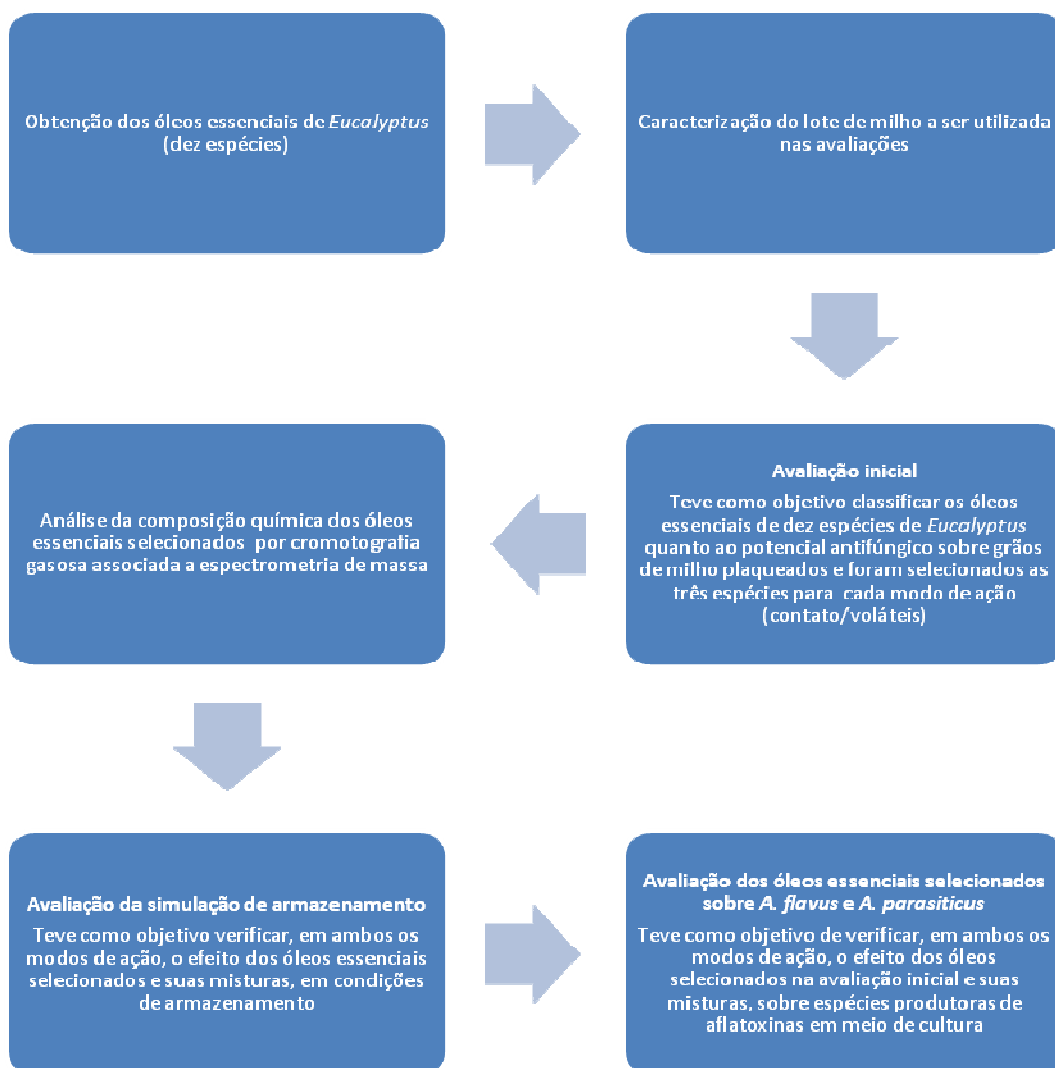


Figura 1 – Fluxograma da metodologia utilizada no projeto

2.8.1 Obtenção dos óleos essenciais

Dez espécies de *Eucalyptus* pertencentes à coleção existente na Estação Experimental de Ciências Florestais, localizada na cidade de Itatinga - SP, do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ-USP, foram selecionadas para extração de óleo essencial das folhas. As espécies foram: *Eucalyptus citriodora*, *E. smithii*, *E. staigeriana*, *E. globulus*, *E. exserta*, *E.*

camaldulensis, *E. tereticornis*, *E. grandis*, *E. urophylla* e o híbrido das espécies *E. grandis* x *E. urophylla*.

A seleção das espécies foi realizada através de dados do IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais), da ABRAF (Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas) e de informações de especialistas na área em relação às espécies mais cultivadas no Brasil e à indicação de uso para cada espécie. Os dados mostraram que as espécies que apresentam maior área plantada são: *E. grandis*, *E. urophylla* e o híbrido *E. urophylla* x *E. grandis*. As demais espécies selecionadas também têm grande destaque no país e são as espécies indicadas para a produção de óleo.

A obtenção dos óleos essenciais foi realizada por hidrodestilação em um equipamento tipo Clevenger (Figura 3). Utilizou-se em cada destilação 200 g de folha fresca que foram lavadas, picadas e colocadas em um balão volumétrico de capacidade de 5 L. Ao balão foram adicionados 2,1 L de água destilada e procedeu-se o aquecimento com auxílio de uma manta aquecedora. O tempo de destilação foi de 4 horas computadas a partir do início da ebulição da água. A separação dos compostos volatilizados e condensados foi realizada com auxílio do Dean Stark graduado com capacidade de 5 mL (Figura 2).

Após a hidrodestilação, o óleo foi desidratado através da passagem por uma camada de sulfato de sódio anidro. Este procedimento foi realizado utilizando uma seringa plástica de capacidade de 3 mL, onde foi colocado 1 mL de sulfato de sódio anidro compartimentado entre duas camadas de algodão. As amostras de óleo foram forçadas, por pressão positiva, a passar pela camada de sulfato e recolhidas em um tubo de ensaio de capacidade de 15 mL com tampa. O material assim preparado foi armazenado sob refrigeração até o momento de uso.



Figura 2 – Dean Stark graduado com capacidade de 5 mL



Figura 3 - Equipamento tipo Clevenger utilizado para extração do óleo

2.8.2 Identificação dos compostos do óleo essencial por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa

Os quatro óleos essenciais que apresentaram maior inibição na avaliação inicial do potencial antifúngico dos óleos essenciais, *E. grandis*, *E. staigeriana*, *E. citriodora* e o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*, como descrita no item 2.8.4.1, foram caracterizados quanto a sua composição através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa realizada no Laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Química, da Universidade Federal de São Carlos.

A caracterização dos óleos das espécies de *Eucalyptus* foi feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, utilizando um equipamento QP5000 (SHIMADZU) com uma coluna capilar Atm 54ms. A temperatura foi programada para iniciar e ficar por 3,5 minutos a 50°C, aumentando 7,0°C/min até 100°C e depois aumentando 10°C/min até 250°C, ficando nessa temperatura durante 3,5 minutos. Utilizou-se o gás Hélio como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min, temperatura do detector a 280°C e injeção no modo split. O espectro de massas foi feito em 70eV e o intervalo da relação massa/carga (m/z) foi de 50 a 500.

Os compostos voláteis foram identificados através da comparação entre os índices de Kovats (IK) calculados para cada substância e os IK's da literatura e entre os respectivos espectros de massa.

A obtenção dos IK's foi realizada através dos tempos de retenção dos compostos detectados e dos tempos de retenção dos alcanos contidos em uma solução padrão (nonano, decano, dodecano, tetradecano, hexadecano, octadecano, eicosano, docosano, tetracosano).

Equação para obtenção dos IK's.

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

Onde:

IK = índice de Kovats do composto detectado

t_x = tempo de retenção do composto detectado

t_{n-1} = tempo de retenção do alcano de menor cadeia, com tempo de retenção mais próximo ao composto detectado

t_n = tempo de retenção do alcano de maior cadeia, com tempo de retenção mais próximo do composto detectado

C_{n-1} = quantidade de carbonos do alcano de menor cadeia, com tempo de retenção mais próximo ao composto detectado

ΔC = diferença entre a quantidade de carbonos entre o alcano de maior e menor cadeia, com tempos de retenção mais próxima do composto detectado.

A solução padrão contendo os nove alcanos foi injetada separadamente no CGMS. Após a injeção do óleo no CGMS, fez-se o cálculo do índice de Kovats e em seguida foram comparados com os encontrados na literatura e os picos foram identificados de acordo com a Tabela 3.2.

Foram consideradas identificadas as substâncias com espectro de massas idêntico aos da literatura ou similares. A faixa de tolerância entre os valores de IK calculados e entre os valores tabelados foi de ± 10 unidades, exceto para os compostos majoritários (ADAMS, 2001).

2.8.3 Caracterização do lote de milho utilizado nas avaliações com substrato natural

A avaliação inicial do potencial antifúngico e a avaliação da simulação de armazenamento descritas nos itens 2.8.4.1 e 2.8.5.1, respectivamente, foram realizadas utilizando como substrato os grãos de milho sem esterilização, ou seja, considerando as espécies fúngicas naturalmente presentes nos grãos de milho.

A caracterização da amostra de milho foi realizada avaliando-se a contaminação com aflatoxinas pré-existente nos grãos de milho, que deveria ser inexistente. Posteriormente, foi avaliada a presença de fungos produtores de aflatoxinas, que deveria ser positiva.

A avaliação da ausência de contaminação prévia com aflatoxinas foi realizada através da análise de 10 subamostras de 50 g retiradas de um lote de 50 kg de milho. As subamostras foram moídas e submetidas ao procedimento de extração e detecção de aflatoxinas por cromatografia de camada delgada (thin layer chromatograph - TLC), segundo metodologia descrita por Soares e Rodriguez-Amaya (1989).

Uma vez confirmada a ausência de contaminação com aflatoxinas foi necessário comprovar a presença, em meio à micoflora naturalmente presente no milho, de espécies aflatoxigênicas para que o milho pudesse ser utilizado como substrato para os posteriores testes com os óleos essenciais. Assim, para confirmar a existência de espécies produtoras de aflatoxinas no milho foi realizado um teste simples de produção de aflatoxinas. Neste teste três subamostras de 50 g cada uma foram retiradas da amostra de milho. O teor de água das subamostras foi mensurado e ajustado, adicionando-se água destilada, a fim obter-se uma atividade de água de 0,9 considerada ótima para o desenvolvimento dos fungos aflatoxigênicos em grãos. Os grãos de milho umedecidos foram dividido em seis subamostras de 50 g que foram colocados em béqueres de vidro com capacidade de 100 mL e cada béquer consistiu em uma repetição. O teste consistindo de seis béqueres, foi colocado em um recipiente plástico com comprimento de 45 cm, largura de 30 cm e altura de 12 cm contendo 1 L de solução de NaCl com concentração de 14%, utilizada para manter a umidade relativa do recipiente em 90%. Conseqüentemente, a atividade de água nos grãos de milho após equilíbrio permaneceu em torno de 0,9. O recipiente foi armazenado em câmara de germinação modelo TE- 4012, da marca Tecnal, com temperatura controlada em $28 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ também ótima para o crescimento fúngico e produção de aflatoxinas, onde permaneceu incubado por 10 dias. Decorrido o período de incubação as amostras foram moídas e analisadas para detecção de aflatoxinas conforme procedimentos da metodologia de detecção já citados.

Na amostra selecionada foi realizado um levantamento dos gêneros fúngicos presentes. A identificação dos gêneros foi realizada com base na visualização das características microscópicas, utilizando aumento de 400 vezes, (forma, tamanho e rugosidade dos esporos e forma e tamanho de estruturas específicas) e macroscópicas (coloração, aspecto da colônia, forma

de crescimento e tipo de esporulação) utilizando as placas das diluições que foram utilizadas na contagem de bolores. Essa avaliação foi realizada em parceria com a pesquisadora Dra. Beatriz Thie Iamanaka, do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas-SP.

2.8.4.1 Avaliação inicial do potencial antifúngico dos óleos essenciais

O objetivo dessa avaliação foi selecionar, dentre as dez espécies de *Eucalyptus* estudadas, as três cujos óleos essenciais apresentaram os melhores resultados no controle da microflora natural do milho, para cada modo de ação. Dois modos de ação foram empregados nesta avaliação, a ação por contato direto do óleo no milho e a exposição aos compostos voláteis dos óleos essenciais.

A metodologia utilizada para realizar esta avaliação foi a de plaqueamento de grãos sobre papel de filtro com congelamento indicada por Lucca Filho (1987), modificada. Esta metodologia consistiu em dispor sobre duas camadas de papel de filtro embebidas em água e acomodadas em uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro, 10 grãos de milho (Figura 4). As placas foram vedadas com um filme plástico e colocadas em câmara de germinação modelo TE- 4012, da marca Tecnal por 24 horas a $28 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, sem fotoperíodo. Após esse período, as placas foram submetidas à temperatura de -18°C , também por 24 horas. Este procedimento foi necessário para a inativação do potencial germinativo do milho, o que poderia vir a intervir no desenvolvimento fúngico. Decorrido o período de congelamento as placas voltaram para a câmara a $28 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, começando a ser, neste momento, contado o real tempo de incubação. No experimento o período de incubação foi de 27 dias, com acompanhamento dos resultados realizado a cada 9 dias. Os óleos foram testados em triplicata, sendo cada repetição constituída por 50 grãos de milho dispostos em cinco placas com 10 grãos. Para cada modo de exposição aos óleos foi realizada uma metodologia diferente, conforme descrito nos itens 2.8.4.2. e 2.8.4.3.



Figura 4 - Disposição dos grãos de milho sobre o papel de filtro umedecido e acomodado na placa de Petri

2.8.4.2 Avaliação inicial do potencial antifúngico dos óleos essenciais por contato direto com os grãos de milho

O objetivo desta avaliação foi verificar a eficiência dos óleos quando estes, na forma líquida, são adicionados a massa de grãos, podendo exercer uma ação por contato, além da ação por exposição aos compostos voláteis, derivada de sua volatilização para a atmosfera interna da placa de Petri.

Os 50 grãos de milho utilizados para cada repetição provieram de uma amostra inicial de 100 g de milho, sobre a qual foi pulverizada com uma alíquota de 3 mL de calda (óleo + acetona). A calda foi obtida misturando-se 960 μL de óleo e 2040 μL de acetona, obtendo-se uma dosagem única de concentração de 320 μL de óleo essencial por mL da calda. Para pulverização da calda utilizou-se um pulverizador, de maneira que o contato dos grãos com o óleo fosse uniforme (Figura 5). Esse procedimento foi feito para cada um dos 10 óleos essenciais. A testemunha consistiu do milho pulverizado com apenas 3 mL de acetona. A pulverização da solução foi realizada antes dos grãos serem distribuídos nas placas e submetidos ao congelamento para inativação da capacidade de germinação dos grãos.



Figura 5 – Pulverização realizada na amostra de milho

2.8.4.3 Avaliação inicial do potencial antifúngico dos óleos essenciais por exposição do milho aos compostos voláteis.

O objetivo desta avaliação foi verificar a eficiência dos óleos oferecida exclusivamente pela exposição aos voláteis do óleo. Neste caso os grãos de milho não entraram em contato com o óleo na forma líquida e sim com os compostos voláteis deste.

Os 50 grãos de milho utilizados em cada repetição desta avaliação foram dispostos nas placas de Petri contendo o papel de filtro umedecido. Estes grãos não foram tratados com as caldas contendo os óleos essenciais. Os grãos nesta avaliação foram expostos aos compostos

voláteis dos óleos. Para promover esta exposição aos óleos foram aplicados 158 μL da calda de cada óleo, preparada como no item anterior, sob um disco de papel de filtro de 3 cm de diâmetro, colocado na tampa da placa de Petri (Figura 6). O volume de 158 μL foi calculado para propiciar aos grãos contidos na placa de Petri a exposição proporcional oferecida na avaliação por contato. O tratamento testemunha foi elaborado da mesma maneira sendo que ao papel de filtro foi aplicado 158 μL de acetona. A montagem dos tratamentos foi realizada antes do processo de congelamento para inativação da capacidade de germinação dos grãos.

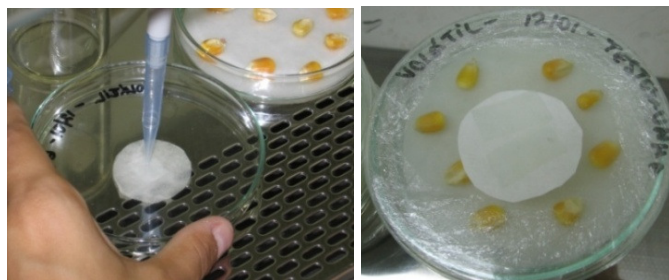


Figura 6 – Montagem da placa de Petri utilizado no modo de ação por exposição aos compostos voláteis

2.8.4.4 Critérios utilizados para classificação dos óleos na avaliação inicial

Para possibilitar a classificação dos óleos quanto ao potencial antifúngico foram adotados dois parâmetros: a) o número de grãos sem crescimento fúngico visível a olho nú e b) a nota de intensidade de crescimento fúngico visível.

A observação do número de grãos sem crescimento fúngico visível foi realizada a olho nú sobre os 50 grãos de cada tratamento e o valor observado foi tabulado para utilização na classificação.

A nota de intensidade de crescimento fúngico visível foi dada avaliando-se a presença do crescimento fúngico nos grãos e a extensão do mesmo sobre os grãos. Assim, as notas foram: nota 1 concedida aos grãos com 0 a 33% de cobertura fúngica em sua superfície, nota 2 concedida aos grãos com 34 a 66% de cobertura fúngica e nota 3 concedida aos grãos com 67 a 100% de cobertura fúngica. As notas 1, 2 e 3 receberam uma ponderação de 1, 2 e 3, respectivamente. Para o cálculo da média representativa do tratamento foi calculada a média ponderada das notas e suas respectivas ponderações.

As avaliações por número de grãos com crescimento fúngico visível e intensidade de crescimento foram realizadas a cada 9 dias até o 27^o dia após a incubação. A cada avaliação

foram descartados os tratamentos que atingiram 100% dos grãos com crescimento fúngico visível (Figura 7).



Figura 7 – Exemplo de placa incubada por 9 dias e com 100% dos grãos com crescimento fúngico visível no tratamento testemunha

2.8.5.1 Avaliação da eficiência utilizando uma simulação de armazenamento

O objetivo dessa avaliação foi verificar a eficiência dos três óleos selecionados previamente na avaliação inicial, utilizando o milho em uma condição de simulação de armazenamento.

Os óleos foram aqui também avaliados quanto a sua atividade antifúngica em dois modos de ação, por contato e por exposição aos voláteis.

A simulação de armazenamento foi executada tentando-se aproximar as condições do teste às condições de um silo vertical de armazenamento. Para isto, inicialmente, foi retirada da amostra inicial do milho uma subamostra de 350 g de grãos. Desta subamostra foram retiradas três porções de 50 g de milho para caracterização da contagem de bolores inicial do milho, conforme procedimentos descritos no item 2.8.5.4.. A atividade de água do restante da amostra foi avaliada, sendo mensurada pelo aparelho do modelo 650, da marca Testo. Com base nesta determinação e em uma curva de equilíbrio higroscópico do milho (American Society of Agricultural Engineering, 1999) foi calculada a quantidade teórica de água a ser adicionada nesta massa de amostra para elevar a atividade de água a 0,9.

Como a atividade de água da amostra de milho foi de 0,55, a curva de equilíbrio higroscópico mostrou que o teor de água deste milho era de aproximadamente 11%. Sendo assim, como a atividade de água desejada era de 0,90, ou seja, teor de água de aproximadamente 18%, seria necessário adicionar a 100 g deste milho 7 mL de água para elevar seu teor de água de 11 para 18%, ou a Aa de 0,55 para 0,90.

O total da amostra de milho inicial necessária nessa avaliação foi de 10,5 kg de grãos para cada modo de ação. O umedecimento da amostra foi realizado dividindo esse total em sacos plásticos transparentes com 2 kg de milho, onde foram aplicados 140 mL de água esterelizada em cada saco plástico. Na última amostra, com 2,5 kg, foram aplicados 175 mL. O total de água foi dividido em três partes iguais e estes foram adicionados individualmente ao saco contendo milho seguindo-se de uma homogeneização manual após a adição de cada parte.

Após o umedecimento das amostras estas foram armazenadas em câmaras de germinação modelo TE- 4012, da marca Tecnal por 24 h a $28 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ e em seguida, submetidas à temperatura de -18°C por 24 h, visando promover para inativação da capacidade de germinação dos grãos.

2.8.5.2 Modo de ação via aplicação por contato

O modo de ação por contato tem como objetivo simular a pulverização realizada nos grãos armazenados nos silos, onde a pulverização dos produtos químicos ocorre em esteiras por onde o grão percorre antes de ser armazenado.

Do milho umedecido e submetido ao tratamento de congelamento foi retirada uma amostra de 350 g para aplicação dos óleos de cada tratamento.

Os tratamentos consistiram dos óleos individuais de *E. grandis*, *E. staigeriana* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* e das misturas contendo metade de cada um destes óleos, ou seja, o híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) + *E. grandis*, o híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) + *E. staigeriana*, *E. grandis* + *E. staigeriana*. As doses utilizadas nessa etapa foram 30 μL , 60 μL , 240 μL , 480 μL , 1260 $\mu\text{L}/100$ g de milho, para cada óleo ou mistura de óleos.

Para aplicação das doses foi mantida a proporção de calda (óleo + acetona) utilizada na avaliação inicial, ou seja, 3 mL/100 g de milho. Como cada dose foi realizada com seis replicatas de 50 g, um total de 350 g de milho foi utilizado para a aplicação de cada dose. Assim, um volume total de calda de 10,5 mL/dose foi preparado para a aplicação de cada dose. O preparo das caldas foi realizado considerando o volume de óleo ou mistura necessário para cada dose e completando o volume até 10,5 mL com acetona. A calda foi pulverizada gradativamente sobre 350 g de milho, dentro de um saco plástico. Durante a aplicação foram realizadas três homogeneizações manuais do milho. O milho assim tratado foi dividido em seis subamostras de 50 g que foram acondicionadas em béquer de vidro com capacidade de 100 mL. Cada béquer consistiu em uma repetição da dose. O teste de cada dose consistindo de seis béqueres, foi

colocado em um recipiente plástico com comprimento de 45 cm, largura de 30 cm e altura de 12 cm contendo 1 L de uma solução aquosa de NaCl a 14%, com o objetivo de manter a umidade relativa da atmosfera interior a 90%.

Como controle positivo foram realizados dois tratamentos com um produto comercial a base de propionato de amônia. Os tratamentos com este produto consistiram da aplicação do produto puro na dose recomendada pelo fabricante, ou seja, 100 μL / 100g e a aplicação do produto diluído com acetona, como realizado com os óleos essenciais, na dosagem de 1050 μL / 100g de milho. Ambos foram pulverizados na amostra de milho como preparada para os demais tratamentos. O milho tratado foi dividido em seis subamostras de 50 g que foram acondicionadas em béquer de vidro de capacidade de 100 mL e esses béqueres foram colocados em recipiente plástico (Figura 8).

O recipiente plástico contendo os béqueres foi incubado em câmara de germinação modelo TE- 4012, da marca Tecnal, a $28 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, sem exposição à luz durante 15 dias.



Figura 8 – Forma de acondicionamento da amostra no modo de ação por contato

2.8.5.3 Modo de ação via exposição aos voláteis

O objetivo desta avaliação foi simular uma possível aplicação do óleo via sistema de aeração, que é atualmente um equipamento normal em instalações de armazenamento de milho e é utilizado para insuflar ar através da massa de grãos armazenado. Uma vez que, uma possível ação eficaz dos óleos essenciais está vinculada aos compostos voláteis do mesmo é interessante uma simulação do emprego do sistema de aeração como veículo de transporte dos voláteis do óleo através da massa de grãos.

Para esse modo de ação uma amostra de milho previamente umedecida e submetida ao tratamento de congelamento foi retirada uma amostra de 300 g para aplicação dos óleos de cada tratamento.

Os tratamentos constituíram dos óleos individuais de *E. grandis*, *E. staigeriana* e *E. citriodora* e das misturas contendo metade de cada um destes óleos, ou seja, *E. grandis* + *E. staigeriana*, *E. grandis* + *E. citriodora* e *E. staigeriana* + *E. citriodora*. As doses e a forma de preparo da calda foram iguais para o modo de ação por contato, descritas no item 2.8.5.2.

O milho assim tratado foi dividido em seis subamostras de 50 g que foram acondicionadas em béquer de vidro de capacidade de 100 mL. Cada béquer consistiu em uma repetição da dose. O acondicionamento do milho nos béqueres foi realizado colocando no fundo do mesmo um disco de papel de filtro com o mesmo diâmetro do béquer e neste foi aplicado 1,5 mL da solução de acetona contendo a dose de óleo ou combinação de óleos a ser testada. No caso da testemunha foi adicionado somente 1,5 mL de acetona. Em cima do disco de papel foi colocada uma rede plástica perfurada que permitiu a circulação dos voláteis do óleo contido no papel de filtro e evitou o contato dos grãos de milho com o papel umedecido com óleo. Sobre esta rede foi, então, acondicionado os 50 g de milho da subamostra (Figura 9).

O teste de cada dose consistindo de seis béqueres, foi colocado em um recipiente plástico com comprimento de 45 cm, largura de 30 cm e altura de 12 cm contendo 1 L de uma solução aquosa de NaCl a 14%. Este volume de solução, neste recipiente, foi capaz de manter a umidade relativa da atmosfera do interior a 90%. O recipiente plástico contendo os béqueres foi incubado em câmara de germinação modelo TE- 4012, da marca Tecnal a $28 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, sem exposição à luz durante 15 dias.



Figura 9- Forma de acondicionamento da amostra no modo de ação via exposição aos compostos voláteis

2.8.5.4 Avaliação da ocorrência dos fungos

Após o período de 15 dias de incubação foi realizada a mensuração da atividade de água pelo aparelho modelo 650, da marca Tecto, de uma amostra escolhida aleatoriamente.

O parâmetro utilizado para classificar os óleos essenciais e misturas nessa avaliação de simulação após o período de 15 dias de incubação foi a contagem de bolores. Assim, se o óleo avaliado apresentou contagem de UFC (unidades formadoras de colônia) menor do que a testemunha, isto significou que o óleo ou mistura apresentou eficiência no controle da microflora natural da amostra de milho e se o valor da contagem foi igual ou maior mostrou que o óleo ou mistura não apresentou eficiência no controle. Outro parâmetro utilizado foi a análise para detecção de aflatoxinas, fumonisina B1, zearalenona e ocratoxina A.

Foram avaliadas, inicialmente, as amostras de milho dos tratamentos testemunhas da amostra inicial do milho. Caso não houvesse presença da micotoxina específica na testemunha, não se prosseguiria a análise da micotoxina para os demais tratamentos. No caso das análises de fumonisina B1, por ser uma ocorrência comum em milho foi avaliado o nível de contaminação entre a amostra inicial e a testemunha dos testes para observar se houve aumento no nível de contaminação da testemunha em relação ao milho inicial.

A metodologia de contagem de bolores utilizada seguiu o recomendado por Silva et al. (1997). O procedimento consistiu em retirar três repetições com 50 g de milho de cada tratamento e as três repetições restantes foram utilizadas para análise de micotoxinas. As amostras de 50 g de milho foram colocadas em erlenmeyer com 450 mL de água peptonada a 0,1% e agitadas mecanicamente por cinco minutos. Após a agitação, uma alíquota de 1 mL foi retirada para iniciar as diluições seriadas até 1×10^{-4} em tubos de vidro com tampa, com capacidade de 15 mL que já continham 9 mL de água peptonada. Destas quatro diluições, 1 mL foi retirado para plaqueamento em profundidade em meio BDA (batata dextrose ágar) em placas de Petri. As placas foram incubadas a $28 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ e avaliadas após 7 dias de incubação realizando a contagem de UFC (unidades formadoras de colônia).

A contagem foi realizada nas placas que apresentavam contagem de 25 a 250 colônias, e foi calculado o número de UFC/ mL multiplicando o número de colônias pelo inverso da diluição inoculada ($\text{UFC/mL} = \text{N}^{\circ} \text{ de colônias/diluição}$) (SILVA, 2001). Em todos os tratamentos foram realizados um levantamento dos gêneros fúngicos presentes. A identificação dos gêneros foi realizada com base na visualização das características microscópicas, utilizando aumento de 400

vezes, (forma, tamanho e rugosidade dos esporos e forma e tamanho de estruturas específicas) e macroscópicas (coloração, aspecto da colônia, forma de crescimento e tipo de esporulação) utilizando as placas das diluições que foram utilizadas na contagem de bolores. Essa avaliação foi realizada em parceria com a pesquisadora Dra. Beatriz Thie Iamanaka, do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas-SP.

Na avaliação quanto à contaminação com aflatoxinas, fumonisina B1, zearalenona e ocratoxina A, as amostras de milho foram moídas em moinho para pequenas massas, da marca Tecnal, modelo TE 020, utilizando uma peneira de crivos circulares de diâmetro de 0,84 mm (20 mesh).

A extração e purificação das amostras visando a detecção e quantificação das micotoxinas foram realizadas com o emprego de colunas de imunoafinidade. Os procedimentos de extração e passagem do extrato pela coluna seguiram as recomendações do fabricante da coluna com algumas modificações.

Para análise de aflatoxinas os procedimentos de extração e passagem do extrato pela coluna foram os seguintes. Foi retirada uma amostra de 25 g do material moído com granulometria inferior a 0,84 mm (20 mesh) e realizada a extração com 135 mL de metanol e 15 mL de solução de cloreto de potássio 4%, sob agitação em agitador mecânico por 30 minutos. A filtração foi feita em papel tipo qualitativo e deste filtrado foram retirados 10 mL que foram diluídos com 40 mL de uma solução tampão fosfato salino a pH 7,4. Em seguida, foi realizada a filtração em filtro de microfibra com tamanho de poros de 1,5 µm e deste filtrado foram coletados 25 mL que foram passados pela coluna de imunoafinidade. As colunas de imunoafinidade foram lavadas com 20 mL de solução água: metanol (3:1) e a eluição da toxina presa aos anticorpos foi realizada com 2 mL de metanol. O eluído foi recolhido em frasco âmbar lavado a ácido sulfúrico. A filtração da solução eluída foi feita em filtros de Millex – GV com membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) com poros de 0,22 µm, onde foram coletados 1.500 µL de cada amostra, os quais foram secos e rediluídos com 500 µL de fase móvel constituído de Água MilliQ: Acetonitrila: Metanol (60: 20: 20). Para detecção e quantificação das aflatoxinas foi empregada a cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de fluorescência e coluna cromatográfica de fase reversa. As condições de operação do cromatógrafo foram: fluxo da fase móvel de 0,9 mL/minuto, detecção por fluorescência com comprimento de onda de excitação de 365 e emissão de 435 nm, após reação de derivação pós-coluna por intermédio de fotoreator modelo KRC 25-

25, da marca Aura Industries, New York, EUA, pré-coluna e coluna cromatográfica modelo Synergi Fusion, da Phenomenex, EUA de 150 x 4.6 mm, com tamanho das partículas de 4 µm. A quantificação dos picos cromatográficos de aflatoxinas foi realizada pela equação de regressão linear obtida pela construção da curva de calibração com padrões analíticos das aflatoxinas. A curva de calibração foi construída com 5 diferentes concentrações dos padrões utilizando concentrações na faixa de interesse de trabalho. A linearidade da faixa de trabalho foi checada pelo cálculo do coeficiente de determinação da equação da curva de calibração.

Para a análise de fumonisina B1 as amostras de milho foram moídas com granulometria inferior a 0,84 mm (20 mesh). A extração foi realizada pesando 10 g da amostra em um erlenmeyer de 500 mL e adicionando-se 50 mL de solvente extrator água destilada: acetonitrila: metanol (2: 1: 1). A extração foi realizada sob agitação em agitador mecânico por 2 horas. Após esse período o extrato foi filtrado em papel filtro qualitativo e coletado 10 mL do filtrado ao qual adicionou-se 40 mL de uma solução tampão fosfato salino de pH 7,4. Este extrato diluído foi filtrado em filtro de microfibras e coletou-se 10 mL do filtrado. A purificação da amostra foi realizada com a passagem dos 10 mL do filtrado na coluna de imunoafinidade específica para fumonisina B1. A lavagem da coluna de imunoafinidade foi feita com 10 mL de solução tampão fosfato salino pH 7,4 e a eluição da toxina presa aos anticorpos foi realizada com 3,0 mL de metanol. O eluído foi recolhido em frasco âmbar lavado a ácido sulfúrico. A filtração da solução eluída foi realizada em filtros de Millex – GV com membrana de PVDF de poro 0,22 µm e coletado 2.200 µL. O eluído foi seco e rediluído com 400 µL de fase móvel constituído de água MilliQ: acetonitrila: ácido acético (59: 41: 1). Para detecção e quantificação de fumonisina B1 foi empregada a cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de fluorescência e coluna cromatográfica de fase reversa. As condições de operação do cromatógrafo foram: fluxo de 0,240 mL/ minuto da fase móvel, detecção por fluorescência com comprimento de onda de excitação de 335 nm e emissão de 440 nm, pré-coluna e coluna cromatográfica modelo Luna (PFP) de 100 x 2.0 mm e dimensão das partículas de 3 µm. A quantificação dos picos cromatográficos foi realizada pela equação de regressão linear obtida pela construção da curva de calibração com padrões analíticos de fumonisina B1. A curva de calibração foi construída com 5 diferentes concentrações dos padrões utilizando concentrações na faixa de interesse de trabalho. A linearidade da faixa de trabalho foi checada pelo cálculo do coeficiente de determinação da equação da curva de calibração.

Para análise de zearalenona foi retirada uma amostra de 25 g que foi colocada em erlenmeyer de 500 mL, onde adicionou-se 125 mL de solução metanol 80% sob agitação por 30 minutos. Após esse período de agitação o extrato foi filtrado em papel de filtro qualitativo e deste filtrado foram coletados 10 mL aos quais foram adicionados 40 mL de uma solução tampão fosfato salino pH 7,4. O material foi filtrado em filtro de microfibras e coletou-se 25 mL do filtrado. A purificação foi realizada em coluna de imunoafinidade ao qual passou-se 25 mL do filtrado. A lavagem da coluna de imunoafinidade foi feita com 20 mL de água destilada e a eluição da toxina presa aos anticorpos foi realizada com 3 mL de metanol. O eluído foi recolhido em frasco âmbar lavado com ácido. A filtração da solução eluída foi realizada em filtros de Millex – GV com membrana de PVDF de poro 0,22 µm e coletado 2.500 µL. O eluído foi seco e rediluição da amostra foi com 250 µL de fase móvel constituído de água MilliQ: acetonitrila: ácido acético (49: 40: 1) e para detecção e quantificação de zearalenona foi empregado a cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de fluorescência e coluna cromatográfica de fase reversa. As condições de operação do cromatógrafo foram: fluxo da fase móvel de 0,220 mL/ minuto, detecção por fluorescência com comprimento de onda de excitação de 274 nm e emissão de 465 nm, pré-coluna e coluna cromatográfica de fenil modelo Luna (PFP) de 100 x 2.0 mm e tamanho das partículas de 3 µm. A quantificação dos picos cromatográficos foi realizada pela equação de regressão linear obtida pela construção da curva de calibração com padrões analíticos de zearalenona.

Para análise de ocratoxina A foi retirada uma amostra de 30 g que foi colocada em erlenmeyer de 500 mL, onde adicionou-se 5 de NaCl e 100 mL de solução metanol 80% sob agitação por 30 minutos. Após o período de agitação o extrato foi filtrado em papel de filtro qualitativo de 24 cm de diâmetro, coletado 10 mL do filtrado, adicionado 40 mL de solução tampão constituído de NaCl: NaHCO₃: Tween 20 (25: 5: 0,1) ao filtrado. O material foi filtrado em filtro de microfibras e coletou-se 10 mL do filtrado. A purificação foi realizada em coluna de imunoafinidade. A lavagem da coluna de imunoafinidade foi feita com 10 mL de solução Tampão e 10 mL de água destilada e a eluição da toxina presa aos anticorpos foi realizada com 1,5 mL de metanol. O eluído foi recolhido em frasco âmbar lavado a ácido sulfúrico. A filtração da solução eluída foi realizada em filtros de Millex – GV com membrana de PVDF de poro 0,22 µm e coletado 1,5 mL. O eluído foi seco e rediluído com 1000 µL de fase móvel constituído de água: acetonitrila: ác. acético (99: 99: 2). Para detecção e quantificação de fumonisina foi

empregada a cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de fluorescência e coluna cromatográfica de fase reversa. As condições de operação do cromatógrafo foram: fluxo da fase móvel de 0,220 mL/ minuto, detecção por fluorescência com comprimento de onda de excitação de 330 nm e emissão de 470 nm, pré-coluna coluna cromatográfica de fenil modelo Luna (PFP) de 100 x 2.0 mm e dimensão das partículas de 3 µm. A quantificação dos picos cromatográficos foi realizada pela equação de regressão linear obtida pela construção da curva de calibração com padrões analíticos utilizando 5 diferentes concentrações de ocratoxina A.

2.8.6.1 Avaliação do efeito dos óleos essenciais selecionados sobre espécies fúngicas produtoras de aflatoxinas

Essa avaliação teve como objetivo verificar o efeito dos óleos que foram selecionados na avaliação inicial, sobre as espécies produtoras de aflatoxinas, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* em meio de cultura. Foram realizados ensaios com dois modos de ação, por contato e por exposição aos compostos voláteis.

Para os ensaios com os dois modos de ação os óleos de *E. citriodora*, *E. staigeriana*, *E. grandis* e o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*, foram utilizados. Destes óleos, foram feitas seis misturas, *E. citriodora* + *E. staigeriana*, *E. citriodora* + híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*), *E. citriodora* + *E. grandis*, *E. staigeriana* + híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*), *E. staigeriana* + *E. grandis* e *E. grandis* + híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*).

Foram utilizadas seis doses para cada óleo ou mistura de óleos, 0, 2, 4, 16, 32 e 84 µL/20 mL do meio de cultura. O meio de cultura utilizado foi o MMEA (Maize Meal Extract Agar) preparado conforme Marín et al (1995). As doses avaliadas foram individualmente diluídas com 200 µL de acetona e à testemunha foi aplicado apenas 200 µL de acetona. Foram feitas três repetições para cada dose de cada óleo ou mistura.

2.8.6.2 Modo de ação por contato

Essa avaliação teve como objetivo mensurar o potencial antifúngico dos óleos sobre as espécies produtoras de aflatoxinas, adicionando-se os óleos individualmente ao meio de cultura utilizado como substrato ao crescimento fúngico.

Para isto foram aplicados 200 µL da solução do óleo ou mistura dos óleos, diretamente no meio de cultura esterilizado, com temperatura de 50⁰C, ainda líquido, e procedeu-se a

homogeneização manual. Após o endurecimento do meio, este foi perfurado com auxílio de uma agulha, previamente mergulhada em suspensão de cada espécie fúngica que continha 10^6 esporos/mL. As suspensões de esporos foram obtidas retirando os esporos por raspagem superficial, com auxílio de uma alça de Drigalski, das colônias de *A. flavus* e *A. parasiticus*, espécies previamente conhecidas como produtores de aflatoxinas e que estavam mantidas em câmara de germinação a $28 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ por 10 dias em meio de cultura YES (Yeast Extract Sucrose Agar). Os esporos foram transferidos para béquer com capacidade de 100 mL, contendo uma solução de 50 mL de água destilada autoclavada e 500 μL de DMSO (dimetilsulfoxido). A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer.

As placas de Petri inoculadas foram seladas com filme plástico e incubadas invertidas na câmara de germinação modelo TE- 4012, da marca Tecnal, a $28 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ por 9 dias.

2.8.6.3 Modo de ação por exposição aos voláteis

Essa avaliação teve como objetivo mensurar o potencial antifúngico dos óleos por exposição aos compostos voláteis sobre as espécies produtoras de aflatoxinas, *A. flavus* e *A. parasiticus* em meio de cultura, assim, o óleo não entrou em contato com o meio de cultura e nem com os fungos inoculados.

A exposição aos voláteis dos óleos foi conseguida pela aplicação de 200 μL de uma solução de óleo ou mistura destes, sobre discos de papel filtro com 7 cm de diâmetro foram colocados nas tampas das placas de Petri. A inoculação dos fungos foi realizada com o meio já endurecido e este foi perfurado com auxílio de uma agulha, previamente mergulhada em suspensão de espécie fúngica que continha 10^6 esporos/mL. A suspensão utilizada foi a mesma utilizada no item 2.8.6.2. As placas de Petri inoculadas foram seladas com filme plástico e incubadas invertidas na câmara de germinação modelo TE- 4012, da marca Tecnal a $28 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ por 9 dias.

2.8.6.4 Modo de avaliação

Após o período de 9 dias de incubação foram realizadas três medições, por placa de Petri, do crescimento radial dos fungos, *A. flavus* e *A. parasitus*, utilizando um paquímetro (Figura 10).

Com as três medidas do crescimento radial dos fungos foram realizadas as médias aritméticas para cada dose e estas foram comparadas com a testemunha. Com base nessa avaliação

observou-se a última dose antes da qual houve inibição total dos fungos. Esta dose foi utilizada como referência para um novo ensaio, no qual foi repetida a avaliação na dose selecionada, para avaliar-se a presença de aflatoxinas.

Para a análise de aflatoxinas foi retirada da placa de Petri a região do meio de cultura que continha o fungo e foi registrado o peso que foi utilizado na extração. Em seguida o material foi transferido para um erlenmyer com capacidade de 500 mL, onde foi adicionado 25 mL de clorofórmio e mantido sob agitação mecânica por 30 minutos. A filtração foi realizada em filtro de microfibras e coletado 10 mL do filtrado. O filtrado foi armazenado em tubo de centrífuga de capacidade de 15 mL. Em seguida, foi realizada a secagem do filtrado, a redissolução com 600 μ L de clorofórmio e homogeneização no vórtex por 30 segundos. O filtrado foi transferido para o frasco de vidro com 1,5 mL de capacidade, onde foi seco e rediluído com 500 μ L de fase móvel constituído de água MilliQ: acetonitrila: ác. acético (99: 99: 2). A detecção de aflatoxinas foi realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência, como descrita no item 2.8.5.4.

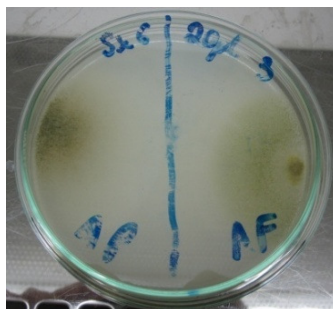


Figura 10 – Exemplo da placa de Petri depois de 9 dias de incubação com *A. flavus* e *A. parasiticus* no tratamento com a mistura dos óleos de *E. staigeriana* + *E. grandis* na dose de 20 μ L

2.8.7 Análise estatística

O delineamento empregado em todas as avaliações foi inteiramente ao acaso e as médias foram avaliadas estatisticamente através da análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O instrumento estatístico utilizado foi o Statistical Analyses System (SAS, 2004)

2.9 RESULTADOS

2.9.1 Obtenção dos óleos essenciais

As espécies de *Eucalyptus* possuem uma variação considerável entre si quanto ao rendimento do óleo essencial obtido. A Tabela 2 apresenta a média final do rendimento observado em todas as destilações.

A variação no rendimento e composição dos óleos foi observada por Vitti e Brito (2003) que mostraram que essa variação ocorre devido à variabilidade genética, idade da folha e condições ambientais.

Os rendimentos dos óleos observados por Bolland (1991) foram semelhantes aos encontrados nesse trabalho, exceto para a espécie de *E. camaldulensis*, que o autor obteve um rendimento de 2% e neste estudo o rendimento foi de 0,4%. Porém, o trabalho realizado por Muller et al. (2006), o rendimento do *E. camaldulensis*, *E. citriodora* e *E. tereticornis* foram semelhantes ao obtido neste trabalho. Confirmando assim, a eficiência do método da hidrodestilação utilizado para a extração dos óleos essenciais.

Tabela 2 - Rendimento do processo de hidrodestilação para obtenção dos óleos essenciais das diferentes espécies de *Eucalyptus*

Espécie	Rendimento médio (%)
<i>E. grandis</i>	0,4
<i>E. tereticornis</i>	0,7
<i>E. urophylla</i>	0,5
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	0,5
<i>E. smithii</i>	2,5
<i>E. exserta</i>	1,0
<i>E. camaldulensis</i>	0,4
<i>E. citriodora</i>	2,0
<i>E. staigeriana</i>	2,0
<i>E. globulus</i>	2,0

2.9.2 Identificação dos compostos do óleo essencial por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa

A Tabela 3.1 mostra o número de picos detectados e identificados em cada óleo essencial selecionado na avaliação inicial, descrita no item 2.8.4.1 A Tabela 3.2. apresenta os componentes identificados dos óleos essenciais e suas respectivas porcentagens na composição dos óleos.

Foram detectados vários picos nos cromatogramas dos óleos essenciais, mas apenas no óleo de *E. staigeriana* foi possível identificar a maioria deles, como observado na Tabela 3.1 O grande número de compostos presentes, provavelmente, foi devido ao tempo de 4 horas da hidrodestilação que permitiu obter monoterpenos e sesquiterpenos das folhas (VITURRO et al., 2003).

Tabela 3.1 - Números de picos detectados e identificados nos óleos analisados por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa

Espécies	Picos detectados	Picos identificados
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	47	21 (44,6%)
<i>E. grandis</i>	37	20 (54 %)
<i>E. staigeriana</i>	39	38 (97,4%)
<i>E. citriodora</i>	40	21 (52,5%)

A composição do óleo de *E. citriodora* mostrou como compostos majoritários o citronelal e o citronelol com a presença de 19,45 e 4,18%, respectivamente. Os mesmos compostos majoritários foram observados por Boland (1991) para o óleo de *E. citriodora*, porém com diferentes porcentagens, ou seja, 80,10 e 4,18%, respectivamente.

A composição do óleo de *E. grandis* mostrou que os compostos majoritários foram o α -pineno e o 1,8-cineol com a presença de 26,97% e 10,52% ,respectivamente. Resultados s emelhante os resultados obtido por Boland (1991).

Para o óleo de *E. staigeriana*, os compostos majoritários foram o limoneno e o geranial com 17,66% e 10,84%, respectivamente. Porém no estudo realizado por Boland (1991), os compostos majoritários foram geranial, acetato de geranil e limoneno com 17,50%, 14,20% e 13,63%, respectivamente.

A composição do híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* apresentou como compostos majoritários o p -cimeno, o leptospermono e o 1,8-cineol com 41,32%, 7,33% e 4,78%,

respectivamente. Porém, no estudo realizado por Nascimento et al. (2009), mostraram que os compostos majoritários foram o 1,8-cineol e o α -pineno com 47% e 36,6%, respectivamente.

Os principais compostos do óleo de *E. staigeriana* foram o limoneno e o geranial. Esses compostos já foram observados o potencial antifúngico por Adegoke et al. (2000) que estudaram os compostos α -terpineno, limoneno, α -pineno, 1,8-cineol do óleo essencial de *Aframomum danielli*, contra *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e algumas leveduras e mostraram que a mínima dose inibitória contra *Aspergillus* foi de 78 μ g/ml. Lee et al. (2008) estudaram o efeito dos compostos geranial, geraniol, neral e citronelal obtidas dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Melaleuca quinquenervia* contra *Phytophthora cactorum*, *Cryphonectria parasitica* e *Fusarium circinatum* e mostraram que esses compostos foram eficazes na inibição desses microrganismos.

Nos óleos de *E. grandis*, *E. citriodora* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*, os compostos majoritários foram α - pineno, citronelal e p-cimeno, respectivamente.

Nakahara et al. (2003) avaliaram o α -pineno e o citronelal e mostraram o efeito antifúngico contra *Aspergillus* spp., *Eurotium* spp. e *Penicillium* spp. Jardim et al. (2008) avaliaram individualmente por bioautografia alguns compostos do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L, incluindo o p-cimeno contra *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium semitectum* e observaram atividade antifúngica desse composto.

No entanto o potencial antifúngico de um óleo essencial pode ser devido a outros compostos presentes em menor quantidade no óleo, individual ou sinergicamente, como já observado por Vilela et al. (2009) e Burt (2004).

Tabela 3.2 - Compostos voláteis identificados e suas porcentagens nos óleos de *E. grandis* x *E. urophylla*, *E. grandis*, *E. staigeriana* e *E. citriodora*.

(continua)

Composto	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. staigeriana</i>	<i>E. citriodora</i>
Butanoato de isopropila	0,24	-	-	-
α-pineno	0,66	26,97	2,70	0,04
ρ-cimeno	41,32	0,84	1,00	-
Limoneno	2,27	-	17,66	-
1,8-cineol	4,78	10,92	3,89	0,33
δ-terpineno	3,56	0,32	-	-
Exo-fenchol	0,47	-	-	-
Trans-óxido de limoneno	0,23	-	-	-
Trans-pinocarveol	0,94	-	-	-
Borneol	1,16	-	-	-
Terpinen-4-ol	2,60	-	-	-
α-terpineol	2,82	3,58	-	-
Piperitona	0,34	-	-	-
Timol	0,65	-	-	-
Carvacrol	0,39	-	-	-
Drima-7,9-(11)-diene	0,14	-	-	-
Flavesona	4,00	3,80	-	-
Globulol	1,59	-	-	-
Sesquiterpeno	0,99	-	-	-
Leptospermono	9,96	5,14	-	-
β-eudesmol	0,83	-	-	-
Campeno	-	0,74	-	-
β-pineno	-	0,06	5,56	0,05
o-cimeno	-	5,91	-	-
Trans-verbenol	-	0,75	-	-
Hidrato de canfeno	-	0,40	-	-
Pinocarvona	-	0,53	-	-
Acetato de bornil	-	0,17	-	-
Trans-β-guaiano	-	0,10	-	-

Tabela 3.2 - Compostos voláteis identificados e suas porcentagens nos óleos de *E. grandis* x *E.urophylla*, *E. grandis*, *E. staigeiriana* e *E. citriodora*

(continuação)

Composto	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E.staigeirian</i> <i>a</i>	<i>E. citriodora</i>
β-atlantol	-	0,30	-	-
Khusimore	-	0,88	-	-
Mirane	-	-	0,59	-
α-felandreno	-	-	4,37	-
α-terpineno	-	-	0,18	-
β-E-ocimeno	-	-	0,21	-
δ-terpineno	-	-	1,53	-
Trans-oxido linanol	-	-	0,08	-
ρ-meta-2,4(8)-dieno	-	-	6,68	-
Linalol	-	-	1,72	-
1-terpineol	-	-	0,13	-
Trans-para-meta-2-en-1-ol	-	-	0,17	0,02
Neoiso-3-tujanol	-	-	0,18	-
Isso-isopulegol	-	-	0,23	-
Neoiso-isopulegol	-	-	0,11	-
ρ-meta-1,5-dien-8-ol	-	-	1,02	-
Terpinen-4-ol	-	-	1,65	-
Meta-cimen-8-ol	-	-	0,28	-
α-terpineol	-	-	5,39	0,26
Trans-piperitol	-	-	0,17	-
Citronellol	-	-	2,36	14,81
Neral	-	-	9,34	-
Geraniol	-	-	4,31	-
Geranial	-	-	10,84	-
Lavandulil Acetato	-	-	0,40	-
Metil geranato	-	-	5,62	-
Acetato de citronelila	-	-	1,02	0,02
Neril acetato	-	-	2,81	-
Acetato de geranil	-	-	5,05	-
β-Z-farneseno	-	-	0,14	2,99
Germacreno A	-	-	0,07	-
α-E,E-farneseno	-	-	0,12	-
Globulol	-	-	0,17	-
Espatulenol	-	-	0,43	-
Z-sesquelavandulol	-	-	0,40	-

Tabela 3.2 - Compostos voláteis identificados e suas porcentagens nos óleos de *E. grandis* x *E. urophylla*, *E. grandis*, *E. staigeriana* e *E. citriodora*

(conclusão)

Composto	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. staigeriana</i>	<i>E. citriodora</i>
δ-pineno	-	-	-	0,09
ρ-meta-3,8-dieno	-	-	-	0,04
Terpinoleno	-	-	-	0,07
Trans-óxido rose	-	-	-	0,03
Citronelal	-	-	-	19,45
3-tujanol	-	-	-	6,25
Formato de citronelila	-	-	-	0,02
Dehidro-anomadendrano	-	-	-	0,20
α-muuroleno	-	-	-	0,17
Trans-β-guaiano	-	-	-	0,16
α-cardineno	-	-	-	0,29
7-epi-α-eudesmol	-	-	-	0,51

2.9.3 Caracterização do lote de milho utilizado nas avaliações com substrato natural

Os resultados das análises para detecção de aflatoxinas, realizadas na caracterização da amostra de milho para ser utilizada no teste de avaliação do potencial antifúngico, mostraram a ausência de contaminação nas dez subamostras do milho inicial analisadas.

A avaliação da presença de fungos produtores de aflatoxinas na amostra de milho foi positiva. Utilizando-se os dados obtidos nestas duas etapas pode-se selecionar a amostra de milho para utilizá-la nos experimentos, pois esta se mostrou livre de contaminação inicial por aflatoxinas e demonstrou que a microflora nela presente possuía potencial para produzi-las.

2.9.4.1 Avaliação inicial do potencial antifúngico dos óleos essenciais por contato direto com os grãos de milho

A Tabela 4.1 apresenta os resultados de acordo com o critério de intensidade do crescimento fúngico e a Tabela 4.2 mostra os resultados observados em função do número de grãos que não apresentaram crescimento fúngico visível, ambas para cada óleo essencial no modo de aplicação por contato.

Com os dados da Tabela 4.2 observou-se que os óleos de *E. staigeriana*, *E. grandis* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* são estatisticamente iguais entre si e diferentes dos demais

tratamentos e da testemunha, para o valor total de grãos que não apresentaram crescimento fúngico visível. Já para as médias das notas (Tabela 4.1) os óleos de *E. staigeriana*, *E. grandis*, o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. citriodora* se mostraram estatisticamente diferentes da testemunha e dos demais tratamentos. Porém o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* e o *E. citriodora* apresentaram-se estatisticamente iguais, mas como o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* também foi selecionado no quisito anterior, esse óleo foi escolhido para prosseguir na avaliação.

Através dos critérios de contagem do número de grãos que não apresentaram crescimento fúngico visível e das notas de intensidade do crescimento fúngico chegou-se às três espécies de *Eucalyptus* cujos óleos demonstraram maior potencial inibitório ao desenvolvimento de fungos para o modo de ação por contato, que foram os óleos *E. staigeriana*, *E. grandis*, o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*.

Tabela 4.1 – Notas de intensidade do crescimento fúngico (1 – 150) observadas na avaliação inicial no modo de ação por contato

Tratamento	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Nota Média
<i>E. staigeriana</i>	100 (III)	99 (III)	103 (III)	100,6 c
<i>E. grandis</i>	112 (III)	99 (III)	127 (III)	112,6 bc
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	116 (III)	130 (III)	119 (III)	121,6 b
<i>E. citriodora</i>	132 (III)	105 (III)	127 (III)	121,3 b
<i>E. camaldulensis</i>	150 (II)	150 (II)	150 (II)	150 a
<i>E. tereticornis</i>	150 (I)	150 (I)	150 (I)	150 a
<i>E. smithii</i>	150 (I)	150 (I)	150 (I)	150 a
<i>E. globulus</i>	150 (I)	150 (I)	150 (I)	150 a
<i>E. exserta</i>	150 (I)	150 (I)	150 (I)	150 a
<i>E. urophylla</i>	150 (I)	150 (I)	150 (I)	150 a
Testemunha	150 (I)	150 (I)	150 (I)	150 a

Notas: As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de significância. (I), (II) e (III): Leitura final realizada aos 9, 18 e 27 dias, respectivamente.

Tabela 4.2 – Número de grãos sem crescimento fúngico visível na avaliação inicial no modo de ação por contato

Tratamento	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Total
<i>E. staigeriana</i>	6 (III)	4 (III)	7 (III)	5,6 c
<i>E. grandis</i>	10 (III)	9 (III)	3 (III)	7,3 c
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	4 (III)	2 (III)	3 (III)	3 c
<i>E. citriodora</i>	1 (III)	1 (III)	1 (III)	1 b
<i>E. camaldulensis</i>	0 (II)	0 (II)	0 (II)	0 a
<i>E. smithii</i>	0 (I)	0 (I)	0 (I)	0 a
<i>E. tereticornis</i>	0 (I)	0 (I)	0 (I)	0 a
<i>E. globulus</i>	0 (I)	0 (I)	0 (I)	0 a
<i>E. exserta</i>	0 (I)	0 (I)	0 (I)	0 a
<i>E. urophylla</i>	0 (I)	0 (I)	0 (I)	0 a
Testemunha	0 (I)	0 (I)	0 (I)	0 a

Notas: As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

(I), (II) e (III): Leitura final realizada aos 9, 18 e 27 dias, respectivamente.

2.9.4.2 Avaliação inicial do potencial antifúngico dos óleos essenciais por exposição do milho aos compostos voláteis

Os mesmos critérios do item 2.9.4.1 foram utilizados nessa avaliação. A Tabela 5.1 mostra os resultados observados de acordo com o critério de intensidade do crescimento fúngico e a Tabela 5.2 mostra os resultados observados em função do número de grãos que não apresentaram crescimento fúngico visível, ambas para cada óleo essencial no modo de aplicação por exposição aos compostos voláteis.

Os dados das Tabelas 5.1 e 5.2 mostram que os óleos de *E. staigeriana* e *E. citriodora* são significativamente iguais, porém diferentes dos demais e da testemunha, tanto para o total de grãos não infectados quanto para as notas, sendo, portanto escolhidos como de maior potencial antifúngico. No entanto, os óleos *E. grandis* e o *E. exserta* são significativamente iguais entre si, porém o *E. grandis* por ter sido escolhido no modo de ação por contato foi também selecionado para o modo de ação dessa avaliação. Assim, selecionou-se às três espécies de *Eucalyptus* cujos óleos demonstraram maior potencial inibitório ao desenvolvimento de fungos para o modo de ação por exposição aos voláteis, que foram os óleos de *E. grandis*, *E. staigeriana* e *E. citriodora*.

Tabela 5.1 - Notas de intensidade do crescimento fúngico (1-150) observadas na avaliação inicial no modo de ação por exposição aos voláteis

Tratamento	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Nota Média
<i>E. citriodora</i>	106 (III)	115 (III)	92 (III)	104,3 c
<i>E. staigeriana</i>	127 (III)	111 (III)	125 (III)	121 c
<i>E. grandis</i>	130 (III)	121 (III)	131 (III)	127,3 b
<i>E. exserta</i>	147 (III)	128 (III)	145 (III)	140 b
<i>E. camaldulensis</i>	150 (I)	150 (I)	150 (I)	150 a
<i>E. smithii</i>	150 (I)	150 (I)	150 (I)	150 a
<i>E. tereticornis</i>	150 (I)	150 (I)	150 (I)	150 a
<i>E. globulus</i>	150 (I)	150 (I)	150 (I)	150 a
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	150 (I)	150 (I)	150 (I)	150 a
<i>E. urophylla</i>	150 (I)	150 (I)	150 (I)	150 a
Testemunha	150 (I)	150 (I)	150 (I)	150 a

Notas: As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

(I), (II) e (III): Leitura final realizada aos 9, 18 e 27 dias, respectivamente.

Tabela 5.2 – Número de grãos sem crescimento fúngico visível na avaliação inicial no modo de ação por exposição aos voláteis

Tratamento	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Total
<i>E. staigeriana</i>	6 (III)	10 (III)	4 (III)	6,6 c
<i>E. citriodora</i>	4 (III)	1 (III)	6 (III)	3,6 c
<i>E. grandis</i>	1 (III)	1 (III)	0 (III)	0,6 b
<i>E. exserta</i>	0 (III)	1 (III)	1 (III)	0,6 b
<i>E. camaldulensis</i>	0 (I)	0 (I)	0 (I)	0 a
<i>E. smithii</i>	0 (I)	0 (I)	0 (I)	0 a
<i>E. tereticornis</i>	0 (I)	0 (I)	0 (I)	0 a
<i>E. globulus</i>	0 (I)	0 (I)	0 (I)	0 a
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	0 (I)	0 (I)	0 (I)	0 a
<i>E. urophylla</i>	0 (I)	0 (I)	0 (I)	0 a
Testemunha	0 (I)	0 (I)	0 (I)	0 a

Notas: As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

(I), (II) e (III): Leitura final realizada aos 9, 18 e 27 dias respectivamente.

Dois óleos estiveram presentes entre os três melhores para os dois modos de ação, sendo eles os óleos de *E. staigeriana* e *E. grandis*, mostrando um potencial antifúngico independente do modo de aplicação.

A avaliação realizada nos diferentes períodos mostrou que o tratamento testemunha e os óleos de *E. tereticornis*, *E. smithii*, *E. urophylla*, *E. globulus* e *E. exserta* para o modo de exposição por contato e com os óleos de, *E. tereticornis*, *E. smithii*, *E. urophylla*, *E. globulus*, *E. camaldulensis* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*, para o modo de exposição aos voláteis

apresentaram, já aos 9 dias, todos os grãos com crescimento fúngico visível e obtiveram nota máxima de intensidade de crescimento. Aos 18 dias o óleo de *E. camaldulensis*, para o modo de exposição por contato e nenhum óleo para o modo de exposição por voláteis mostraram todos os grãos com crescimento fúngico visível. Já os óleos selecionados como os mais eficientes, tanto para a avaliação por contato quanto por exposição aos compostos voláteis, mesmo aos 27 dias não apresentaram 100% dos grãos com crescimento fúngico, mostrando que esses óleos possuem um efeito residual sobre o crescimento fúngico maior que os demais avaliados.

Os resultados mostram que os óleos essenciais não controlaram 100% o crescimento fúngico da microflora natural dos grãos. Este resultado foi diferente do observado por Vilela et al. (2009) que observaram inibição total do crescimento das espécies fúngicas *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* em meio de cultura com o óleo de *E. globulus* na dose de 500 µL. Este fato sugere que uma grande diferença nos resultados pode existir quando diferentes tipos de avaliação são utilizados com variações no tipo de substrato utilizado e nas espécies fúngicas consideradas.

2.9.5.1 Avaliação da eficiência dos óleos essenciais selecionados utilizando uma simulação de armazenamento no modo de ação por contato.

Observou-se com a análise de variância, como mostra a Tabela 6.1, que houve variação entre os tratamentos, doses e interação entre tratamentos e doses. Desse modo, realizou-se uma comparação dos tratamentos e doses utilizando o teste de Tukey.

Tabela 6.1 - Análise de variância (ANOVA) dos resultados de UFC/mL (unidades formadoras de colônia) para o modo de ação por contato

Fator de variação	<i>f</i> calculado	Valor P ⁽¹⁾
Tratamento	105,90	<,0001
Dose	369,60	<,0001
Trat. x Dose	14,57	<,0001

Nota: (1) Probabilidade ao nível de 5%.

A Tabela 6.2 apresenta a comparação da contagem de UFC/mL (unidades formadoras de colônia) para os tratamentos com os óleos e a testemunha para o modo de ação por contato. Com os resultados pode-se constatar que o óleo de *E. staigeriana* apresentou inibição parcial do crescimento fúngico apenas na dose 1260 µL, porém, na avaliação inicial, o controle parcial foi

obtido já na dose de 960 µL, mostrando que a capacidade de inibição parcial do crescimento fúngico se encontra entre essas duas doses. Para o óleo do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* a inibição parcial foi obtida a partir da dose de 240 µL. Para as misturas com os óleos de *E. grandis* x *E. urophylla* + *E. staigeriana* e de *E. grandis* x *E. urophylla* + *E. grandis* foi a partir da dose de 60 µL e para o óleo de *E. grandis* foi a partir da dose de 30 µL. O tratamento que apresentou o melhor resultado foi a mistura com os óleos de *E. grandis* + *E. staigeriana*, pois apresentou inibição parcial na dose de 30 µL e inibição total a partir da dose de 60 µL.

Quando os tratamentos consistindo de óleos individuais, desta avaliação, foram comparados com os tratamentos com óleos individuais da avaliação inicial, que utilizou apenas a dose de 960 µL, foi possível observar que a inibição parcial foi atingida em doses mais baixas.

Observou-se também, que as misturas dos óleos de *E. grandis* + *E. staigeriana* e *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*) apresentaram melhores resultados quando comparados com os seus óleos individuais. A mistura dos óleos de *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*) apresentou potencial antifúngico inferior ao óleo individual de *E. grandis* e superior ao óleo do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*.

Nesta avaliação o tratamento que apresentou o melhor controle da microflora dos grãos foi a mistura com os óleos de *E. grandis* + *E. staigeriana*, porém analisando-se apenas os óleos individuais nessa avaliação, o óleo de *E. grandis* foi que apresentou o melhor resultado e o óleo de *E. staigeriana* foi o que apresentou o pior resultado. Já na avaliação inicial o melhor resultado foi obtido com o tratamento utilizando o óleo individual de *E. staigeriana*. Isso pode ser explicado pela diferença da metodologia das duas avaliações, sendo que na avaliação inicial a atividade de água permaneceu por 27 dias em torno de 0,99 e na avaliação da simulação permaneceu por 15 dias a 0,88. Esta diferença na disponibilidade de água pode ter influenciado a microflora dominante de cada avaliação e conseqüentemente no potencial antifúngico de cada óleo, pois cada espécie fúngica tem uma faixa de Aa que é favorável para seu crescimento, como mostra o INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF, 1996).

Tabela 6.2 – Comparação das médias de UFC/mL (unidades formadoras de colônia) considerando a interação dose ($\mu\text{L}/100\text{g}$ de milho) x tratamento para modo de ação por contato

Trat/ Dose	Testemunha (0)	30	60	240	480	1260
G + S ⁽¹⁾	1,8x10 ⁶ Aa	1,2x10 ⁴ Bb	6,0x10 ¹ Cc	8,0x10 ¹ Cc	0,0x10 ¹ Cb	0,0x10 ¹ Cb
G + (G x U) ⁽²⁾	1,8x10 ⁶ Aa	1,5x10 ⁵ Ab	3,5x10 ⁴ Bb	2,0x10 ³ Bbc	1,2x10 ³ Bab	6,5x10 ² BCb
S + (G x U) ⁽³⁾	1,8x10 ⁶ Aa	1,9x10 ⁵ Ab	8,3x10 ⁴ BCb	9,9x10 ³ Cb	1,3x10 ³ Cb	6,0x10 ¹ CDb
G ⁽⁴⁾	1,8x10 ⁶ Aa	2,5x10 ⁴ Bb	5,3x10 ³ Bb	2,4x10 ³ Bb	1,9x10 ³ Ba	2,3x10 ² Cb
S ⁽⁵⁾	1,8x10 ⁶ Aa	3,5x10 ⁵ Ab	2,6x10 ⁵ Aa	6,8x10 ⁴ Aa	5,9x10 ⁴ Aa	1,8x10 ³ Ba
G x U ⁽⁶⁾	1,8x10 ⁶ Aa	5,2x10 ⁵ Aa	1,8x10 ⁵ Aa	6,6x10 ⁴ Ba	8,3x10 ² Ca	6,3x10 ² Ca

Nota: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

(1) G + S = *E. grandis* + *E. staigeriana*, (2) G + (G x U) = *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), (3) S + (G x U) = *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), (4) G = *E. grandis*, (5) S = *E. staigeriana*, (6) G x U = híbrido do *E. grandis* x *E. urophylla*.

A Tabela 6.3 apresenta a comparação da contagem de UFC/mL entre os tratamentos com os óleos, a misturas de óleos, a testemunha e o milho inicial para o modo de ação por contato. Os resultados mostram que os óleos de *E. staigeriana*, *E. grandis*, o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* e a mistura com os óleos de *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*) tiveram médias de UFC igual ao milho inicial e inferior a testemunha, mostrando que esses óleos apresentaram uma inibição no número de colônias, indicando efeito antifúngico. Já as misturas com os óleos de *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*) e *E. grandis* + *E. staigeriana*, mostraram efeito fungicida, pois a contagem de UFC foi inferior ao milho inicial.

Tabela 6.3 - Comparação das médias de UFC/mL (unidades formadoras de colônia) dos tratamentos em relação ao milho inicial para o modo de ação por contato

Tratamento	Médias
Testemunha	1,8x10 ⁶ A
S ⁽¹⁾	4,3x10 ⁴ B
G x U ⁽²⁾	4,2x10 ⁴ B
G ⁽³⁾	3,0x10 ⁴ B
Milho inicial	5,7x10 ⁴ B
S + (G x U) ⁽⁴⁾	3,4x10 ⁴ B
G + (G x U) ⁽⁵⁾	3,2x10 ³ C
G + S ⁽⁶⁾	3,0x10 ³ D

Notas: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade na coluna.

(1)S = *E. staigeriana*, (2) G x U = híbrido do *E. grandis* x *E. urophylla*, (3) G = *E. grandis*, (4) S + (G x U) = *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), (5) G + (G x U) = *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), (6) G + S = *E. grandis* + *E. staigeriana*.

A Tabela 6.4 apresenta a comparação da contagem de UFC/mL entre a primeira dose que apresentou inibição parcial nos tratamentos com os óleos individuais, misturas, testemunha e os dois tratamentos com o produto comercial (controle positivo), diluído com acetona e puro. Os resultados mostram que os tratamentos com produto comercial não apresentaram inibição fúngica, ao contrário, estimularam o crescimento. Nos demais tratamentos com os óleos e misturas foram observados inibição parcial do crescimento fúngico. Esse aumento da população fúngica pode ser devido à elevada atividade de água que permaneceu em torno de 0,88, o que pode não ter sido favorável para a boa eficiência do produto comercial.

Um estudo realizado por Ni e Streett (2005) testaram diferentes concentrações (0, 1, 10 e 20 µmol) de dois fungicida comerciais (anfotericina B e traconazole) contra *A. niger* em diferentes Aa (0,994, 0,962, 0,921 e 0,854) e mostraram que a combinação da atividade de água mais baixa de 0,854 e a concentração de 1 µmol foi o que proporcionou o melhor controle da contaminação pelo fungo.

Holmquist et al. (2006) estudaram o efeito da temperatura, pH e atividade de água (0,85 a 0,99) com nove agentes antifúngicos (Botran, Orthocide, Poly-ram 80, topsin-M, Thiram, imazalil, propionato de sódio, sulfito de sódio e 2,2-diclorovinil fosfato) contra *A. flavus* e *A. parasiticus* e observaram que, com o aumento da atividade de água, o efeito antifúngico foi diminuído.

Tabela 6.4 - Comparação das médias de UFC/mL (unidades formadoras de colônia) da primeira dose que apresentou inibição parcial nos tratamentos em relação ao produto comercial (controle positivo) para o modo de ação por contato

Tratamento	Médias
Controle positivo + acetona	3,0x10 ⁶ A
Controle positivo puro	3,0x10 ⁶ A
Testemunha	1,8x10 ⁶ B
S + (G x U) ⁽¹⁾	8,3x10 ⁴ C
(G x U) ⁽²⁾	6,6x10 ⁴ C
G ⁽³⁾	2,5x10 ⁴ C
G + S ⁽⁴⁾	1,2x10 ⁴ C
G + (G x U) ⁽⁵⁾	3,5x10 ⁴ C
S ⁽⁶⁾	1,7x10 ⁴ C

Notas: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade na coluna.

(1) S + (G x U) = *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), (2) G x U = híbrido do *E. grandis* x *E. urophylla*, (3) G = *E. grandis*, (4) G + S = *E. grandis* + *E. staigeriana*, (5) G + (G x U) = *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), (6) S = *E. staigeriana*.

A identificação fúngica foi realizada a partir das placas utilizadas na contagem de bolores. Essa identificação teve o auxílio da Dra. Beatriz Thie Iamanaka, do Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL e foi realizada pela visualização das características microscópicas, utilizando aumento de 400 vezes, (forma, tamanho e rugosidade dos esporos e forma e tamanho de estruturas específicas) e macroscópicas (coloração, aspecto da colônia, forma de crescimento e tipo de esporulação), chegando à identificação dos gêneros fúngicos e em alguns casos chegou-se somente até a família.

As Tabelas 7 e 8 apresentam os fungos presentes na amostra de milho inicial, na testemunha e nos tratamentos do modo de ação por contato. Os resultados mostraram que não ocorreu grande variação dos fungos entre os tratamentos, com exceção do tratamento com o produto comercial, que ocorreu a presença do gênero *Mucor*, presente apenas nesse tratamento. Estes resultados não mostram uma seleção diferenciada dos fungos em função do tratamento utilizado.

Tanaka et al (2001) estudaram a microflora fungica de sementes de milho durante 12 meses de armazenamento e observaram que as espécies fúngicas predominantes foram *Alternaria alternata*, *Aspergillus* spp., *Bipolaris maydis*, *Cephalosporium acremonium*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., e *Trichoderma* spp.

Souza et al (2007) realizaram um estudo com grãos de milho, verificaram que nos grãos incubados, foram observados fungos dos gêneros *Penicillium* spp. (39,5%), *F. proliferatum* (30,0%), *Aspergillus* spp. (10,0%), *Rhizopus* spp. (6,5%), *Monilia* spp. (5,0%) e *Cladosporium* spp. (4,5%).

Moubasher et al (1972) verificaram a microflora natural de 3 tipos de grãos, milho, trigo e sorgo. Nos 3 tipos os fungos dominantes foram, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. e *Curvularia* spp. Nos grãos de milho, predominaram o *P. citrinum* e o *A. terreus*.

Os gêneros fúngicos encontrados em grãos e sementes de milho nos trabalhos citados mostram-se semelhantes aos encontrados nesse trabalho, com exceção do *Rhizopus* spp. e *Monilia* spp.

Tabela 7 – Fungos presentes na amostra de milho inicial

Milho Inicial
<i>Cladosporium</i>
<i>Penicillium</i>
<i>Fusarium</i>
Espécies da Família <i>Dematiacius</i>

Tabela 8 – Fungos presentes nas amostras de milho da testemunha, dos tratamentos com os óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus* e do produto comercial, no modo de ação por contato.

	<i>Penicillium</i>	<i>Eurotium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Peacylomyces</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Mucor</i>	Espécies da Família <i>Dematiaceae</i>
Test.	x	x						
G	x	x	x	x	x			x
S	x	x						x
GxU	x	x	x	x				x
G(GxU)	x	x				x		
S+GXU)	x	x	x			x		x
G+S	x	x						x
P.C.			x				x	

Nota: G- *E. grandis*, S- *E. staigeriana*, GxU- *E. grandis* x *E. urophylla*, G+(GxU) - *E. grandis* +(*E. grandis* x *E. urophylla*), S+(GxU) - *E. staigeriana* +(*E. grandis* x *E. urophylla*), G+S- *E. grandis* + *E. staigeriana*, P.C.- Produto comercial

2.9.5.2 Avaliação da eficiência utilizando uma simulação de armazenamento por exposição aos compostos voláteis

Observou-se com a análise de variância, como mostra a Tabela 9.1, que houve variação entre os tratamentos, doses e interação entre tratamentos e doses. Desse modo, realizou-se uma avaliação dos tratamentos e doses com uma comparação utilizando o teste de Tukey.

Tabela 9.1 - Análise de variância (ANOVA) da UFC/mL (unidades formadoras de colônia) para o modo de ação por exposição aos voláteis

Fator de variação	f calculado	Valor P⁽¹⁾
Tratamento	99,57	<,0001
Dose	28,36	<,0001
Trat x Dose	15,66	<,0001

Nota: (1) Probabilidade ao nível de 5%

A Tabela 9.2 apresenta a comparação da contagem de UFC/mL (unidades formadoras de colônia) para os tratamentos com os óleos e a testemunha para o modo de ação por exposição aos voláteis. Os resultados mostram que apenas o óleo de *E. citriodora* apresentou inibição parcial do crescimento fúngico a partir da dose 240 µL. Nos demais tratamentos não ocorreu inibição parcial e nem total do crescimento fúngico.

Constatou-se também que apenas o óleo *E. citriodora* foi melhor individualmente em relação a mistura com outros óleos. As demais misturas tiveram resultados iguais aos óleos individuais.

Nessa avaliação o tratamento que obteve o melhor controle da microflora dos grãos foi o óleo de *E. citriodora*. Já na avaliação inicial o melhor resultado foi obtido pelos óleos individuais de *E. staigeriana* e de *E. citriodora*. Os óleos selecionados na avaliação inicial obtiveram inibição parcial com a dose de 960 µL, porém nessa avaliação não ocorreu inibição em nenhuma dose, com exceção do óleo de *E. citriodora* que mostrou inibição parcial a partir da dose de 240 µL. Esse fato pode ser explicado pela diferença da metodologia das duas avaliações, já que na avaliação inicial a atividade de água permaneceu por 27 dias em torno de 0,99 e na avaliação da simulação de armazenamento permaneceu por 15 dias com atividade de água em torno de 0,88. Isso pode ter influenciando a microflora dominante de cada avaliação e conseqüentemente no potencial antifúngico de cada óleo, pois cada espécie fúngica tem uma faixa de atividade de água que é favorável para seu crescimento, como mostra o ICMSF (1996).

Tabela 9.2 – Comparação das médias de UFC/mL (unidades formadoras de colônia) considerando a interação dose ($\mu\text{L}/100\text{g}$ de milho) x tratamento para modo de ação por exposição aos voláteis

Trat/Doses	Testemunha (0)	30	60	240	480	1260
C ⁽¹⁾	1,8x10 ⁶ Aa	2,0x10 ⁶ Aa	1,1x10 ⁶ Aa	4,4x10 ⁵ Bb	2,9x10 ⁵ Cb	7,2x10 ⁵ Cc
G ⁽²⁾	1,8x10 ⁶ Aa	3,0x10 ⁶ Aa	3,0x10 ⁶ Aa	2,8x10 ⁶ Aa	2,7x10 ⁶ Aa	1,8x10 ⁶ Aa
G + C ⁽³⁾	1,8x10 ⁶ Aa	3,0x10 ⁶ Aa	3,0x10 ⁶ Aa	3,0x10 ⁶ Aa	2,3x10 ⁶ Aa	1,5x10 ⁶ Aa
S ⁽⁴⁾	1,8x10 ⁶ Aa	3,0x10 ⁶ Aa	3,0x10 ⁶ Aa	3,0x10 ⁶ Aa	3,0x10 ⁶ Aa	2,9x10 ⁶ Aa
S + C ⁽⁵⁾	1,8x10 ⁶ Aa	3,0x10 ⁶ Aa	3,0x10 ⁶ Aa	1,7x10 ⁶ Aa	1,2x10 ⁶ Aa	8,9x10 ⁵ Ab
S + G ⁽⁶⁾	1,8x10 ⁶ Aa	3,0x10 ⁶ Aa	3,0x10 ⁶ Aa	3,0x10 ⁶ Aa	3,0x10 ⁶ Aa	2,7x10 ⁶ Aa

Notas: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

(1)C = *E. citriodora*, (2) G = *E. grandis*, (3) G + C = *E. grandis* + *E. citriodora*, (4) S = *E. staigeriana*, (5) S + C = *E. staigeriana* + *E. citriodora*, (6) S + G = *E. staigeriana* + *E. grandis*.

A Tabela 9.3 apresenta a comparação da contagem de UFC/mL entre os tratamentos com os óleos, as misturas, a testemunha e o milho inicial para o modo de ação por exposição aos voláteis. Os resultados mostram que todos os óleos tiveram médias de UFC superior ao milho inicial, mostrando que nenhum óleo apresentou o efeito fungicida. O óleo de *E. citriodora* foi o único tratamento que apresentou potencial antifúngico.

Tabela 9.3- Comparação das médias de UFC/mL (unidades formadoras de colônia) dos tratamentos em relação ao milho inicial para o modo de ação por exposição aos voláteis

Tratamento	Médias
Testemunha	1,8x10 ⁶ A
S ⁽¹⁾	2,8x10 ⁶ A
S + G ⁽²⁾	2,7x10 ⁶ A
G ⁽³⁾	2,5x10 ⁶ A
G + C ⁽⁴⁾	2,4x10 ⁶ A
S + C ⁽⁵⁾	2,4x10 ⁶ A
C ⁽⁶⁾	9,2x10 ⁵ B
Milho inicial	5,7x10 ⁴ C

Notas: Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste tukey ao nível de 5% de probabilidade na coluna.

(1) S = *E. staigeriana*, (2) S + G = *E. staigeriana* + *E. grandis*, (3) G = *E. grandis*, (4) G + C = *E. grandis* + *E. citriodora*, (5) S + C = *E. staigeriana* + *E. citriodora*, (6) C = *E. citriodora*.

A Tabela 10 apresenta a comparação entre os modos de ação, por contato e por exposição aos voláteis, para os óleos de *E. grandis* e *E. staigeriana*, pois foram os únicos óleos selecionados para avaliação nos dois modos de ação. Os resultados mostram que houve diferenças significativas entre os modos de ação nessa avaliação. O modo de ação por contato obteve uma média de UFC/mL (unidades formadoras de colônia) menor, mostrando-se o mais eficiente no controle da microflora natural do grão de milho armazenado.

O trabalho realizado por Vilella et al. (2009) mostrou resultado contrário ao obtido nesse trabalho, pois no modo de ação por exposição aos voláteis apresentou inibição total dos fungos *A. flavus* e *A. parasiticus* em menor dose (500 μ L).

A diferença entre os resultados encontrados na avaliação da simulação desse trabalho e o trabalho realizado por Vilella et al. (2009), pode ser explicado pela diferença na metodologia empregada. Vilella et al. (2009), utilizou como substrato o meio de cultura YES, apenas duas espécies fúngicas, *A. flavus* e *A. parasiticus* e o óleo comercial de *E. globulus*. Já nesta avaliação por simulação foi utilizado como substrato o milho não esterilizado, com a presença da microflora natural e óleos essenciais de três espécies de *Eucalyptus* e suas misturas.

Tabela 10 - Comparação do efeito do modo de ação por contato e por exposição aos voláteis, para os tratamentos com os óleos de *E. grandis* e *E. staigeriana*

Modo de ação	Médias (UFC/mL)
Contato	8,1x10 ⁴ B
Voláteis	2,8x10 ⁶ A

Notas: Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste tukey ao nível de 5% de probabilidade na coluna.

A Tabela 11 apresenta a identificação dos fungos presentes nos grãos de milho da testemunha e dos tratamentos com os óleos essenciais no modo de ação por exposição aos voláteis. Os resultados mostraram que não houve grande variação dos fungos entre os tratamentos, prevalecendo os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em todos os tratamentos.

Tabela 11 – Fungos presentes nas amostras de milho da testemunha e dos tratamentos com os óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus*, no modo de ação por exposição aos voláteis.

	<i>Penicillium</i>	<i>Eurotium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Acremonium</i>	<i>Aspergillus</i>	Espécies da Família <i>Dematiaceae</i>
Testemunha	x	x			x	
G	x		x		x	
S	x		x		x	
C	x	x	x	x	x	x
G+C	x		x	x	x	
S+C	x		x	x	x	
G+S	x			x	x	

Nota: G- *E. grandis*, S- *E. staigeriana*, C- *E. citriodora*, G+C- *E. grandis* + *E. citriodora*, S+C- *E. staigeriana* + *E. citriodora*., G+S- *E. grandis* + *E. staigeriana*

2.9.5.3 Avaliação de micotoxinas nas amostras de milho

A análise de aflatoxinas nas amostras do tratamento testemunha para ambos os modo de ação e os resultados mostram que não houve presença detectável da contaminação por esta micotoxina. O limite de detecção foi de 1,0 µg.kg⁻¹ para cada aflatoxina e a recuperação média da metodologia de análise de aflatoxina B1 foi igual a 83%.

Este resultado foi contrário ao esperado uma vez que, as amostras iniciais de milho, como descrito no item 2.9.3, apresentam espécies produtoras de aflatoxinas no milho utilizado e as condições de disponibilidade de água e temperatura no armazenamento do milho (Aa=0,88 e T=28⁰C) foram propícias ao crescimento e produção de aflatoxinas por espécies aflatoxigênicas.

De acordo com o ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1996) para o crescimento do *A. flavus* a atividade de água requerida é de 0,80 a 0,99 e para produção de aflatoxinas os valores são de 0,86 a 0,99. Temperatura ótima para a produção por *A. flavus* na faixa de 12 a 43⁰C e para *A. parasiticus* 12 a 42⁰C, porém o crescimento ótimo encontra-se em torno de 30⁰C e Aa em torno de 0,98.

O milho que foi utilizado na avaliação inicial permaneceu armazenado em temperatura ambiente até o momento da análise. Nessas condições ocorreu infestação por caruncho (*Sitophilus zeamais*) e com a finalidade de eliminar essa infestação, o milho foi armazenado no congelador a temperatura de -18⁰C em um período de aproximadamente seis meses até o momento da análise. Esse fato pode ter ocasionado a inativação do *Aspergillus* spp. e

consequentemente a ausência de produção de aflatoxina, como mostra o estudo realizado por Demare et al. (2008) onde foi avaliada a germinação dos esporos de *Aspergillus* spp. em condições de águas profundas, sobre baixas temperaturas e alta pressão. Os resultados mostraram que a germinação dos esporos de *Aspergillus* spp. não foi afetada pela pressão, mas pela baixa temperatura de 4 a 5^oC e observaram que mais de 90% dos isolados de *Aspergillus* spp. perderam a viabilidade com 17 dias de incubação a 5^oC e causou danos irreversíveis nos esporos.

A análise de zearalenona nas amostras dos tratamentos testemunhas para ambos os modos de ação. Os resultados mostram que não foi detectada a contaminação por zearalenona. O limite de detecção foi de 3,0 µg.kg⁻¹ para zearalenona e a recuperação média da metodologia de análise de zearalenona foi igual a 89%.

Esse resultado era esperado, pois as condições de atividade de água e temperatura utilizada no armazenamento foram desfavoráveis ao crescimento e produção de zearalenona por espécies fúngicas.

Segundo Jimenez et al. (1996) entre as espécies de *Fusarium* conhecidos por produzirem zearalenona, *F. graminearum* e *F. culmorum* são as mais importantes. Esses mesmos autores estudaram a produção de zearalenona por 3 isolados de *F. graminearum*, 2 de *F. culmorum* e 2 de *F. oxysporum* em diferentes temperaturas. As condições de temperatura foram: a) temperatura ambiente variando de 16 a 25^oC; b) temperatura constante de 28^oC seguida por um período de incubação a 12^oC e c) temperatura constante de 37^oC. Os tratamentos com diferente temperaturas foram analisados com Aa de 0,95 e 0,97. A atividade de água que proporcionou maior produção foi a de 0,95. *F. graminearum* foi o que mais produziu a toxina na temperatura de 28^oC por duas semanas, seguido de uma incubação a 12^oC. Essa combinação de temperatura também foi favorável para o *F. oxysporum*.

De acordo com o ICMSF (1996) para o crescimento de *F. graminearum* a faixa de temperatura ótima é de 24 a 26^oC e a atividade requerida é de 0,90 a 0,99.

Não foram realizadas as análises para detecção de contaminação nas amostras iniciais, pois só seria justificável realizar estas análises caso fosse observado a contaminação na testemunha. Nesta situação, seria preciso verificar se a contaminação observada já estava presente no milho inicial ou era derivada do crescimento fúngico ocorrido no armazenamento.

As Tabelas 12.1 e 12.2 apresentam a análise de fumonisina B1 nas amostras de milho inicial e nos tratamentos testemunha para ambos os modos de ação. Os resultados mostram que

ocorreu contaminação por fumonisina B1 nas amostras iniciais e na maioria dos tratamentos da testemunha, porém os níveis de contaminação entre os dois tratamentos foram próximos, mostrando que a contaminação com fumonisina B1 detectada no milho do tratamento testemunha já estava presente na amostra inicial e não foi desenvolvida durante a avaliação de simulação. Estes resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que as condições de temperatura e atividade de água do milho durante a simulação de armazenamento não foram favoráveis ao crescimento e produção de fumonisina B1 por espécies fúngicas.

A fumonisina B1 é uma micotoxina produzida principalmente por *F. verticillioides*, com produção constatada em *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. nygamai*, *F. anthophilum* e *F. napiniiforme* (NELSON et al, 1993).

Segundo o ICMSF (1996) para o crescimento do *F. verticillioides* a temperatura requerida é bem variada de 2,5 a 37⁰C, porém a temperatura ótima é entre 22,5 a 27,5⁰C e a faixa de atividade de água é de 0,87 a 0,99.

Bacon e Nelson (1994) observaram uma faixa de temperatura ideal para o crescimento de isolados dos fungos *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, variando de 22,5 a 27,5 ⁰C, com a temperatura máxima variando entre 32 e 37⁰C e a temperatura mínima entre 2,5 e 5⁰C. Valores de atividade de água superiores a 0,90 foram ótimos para o crescimento sob condições de armazenamento.

A germinação dos conídios dos fungos produtores de fumonisina é influenciada pela atividade de água (Aa), temperatura e pH do substrato. Marín et al. (1995) estudaram isolados de *F. verticillioides* e *F. proliferatum* em diferentes temperaturas de 4 a 45⁰C, atividade de água de 0,90 a 0,994 e pH (3.6, 5.5, 7.0). Os fungos apresentaram crescimento com Aa de 0,90 a 0.994 e temperatura de 20 a 35⁰C.

Tabela 12.1 - Resultados da contaminação por fumonisina B1 para as amostras iniciais do milho

Repetições	Resultados (ppb)
amostra 1	515
amostra 2	399
amostra 3	553
amostra 4	426
amostra 5	504
amostra 6	363

Nota: Limite de detecção de 70,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para fumonisina B1. Recuperação média da análise de fumonisina B1 igual a 76%.

Tabela 12.2 - Resultados da contaminação por fumonisina B1, para os tratamentos testemunhas, nas avaliações da simulação de armazenamento considerando os modos de ação por contato e por exposição aos compostos voláteis

Tratamento/ Repetições	Resultados (ppb)
Test C 1 ⁽²⁾	618
Test C 2	39
Test C 3	723
Test V 1 ⁽³⁾	950
Test V 2	802
Test V 3	ND ⁽¹⁾

Nota: (1) N.D. = Nível de contaminação não detectável, para um limite de detecção de 70,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para fumonisina. Recuperação média da análise de fumonisina B1 igual a 76%.

(2) Test C = testemunha modo de ação por contato, (3) Test V = testemunha modo de ação por exposição aos voláteis.

A análise de ocratoxina A nas amostras dos tratamentos testemunha para ambos os modo de ação. Os resultados mostram que não foi detectada a contaminação por ocratoxina A. O limite de detecção foi de 1,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para ocratoxina A e a recuperação média da metodologia de análise de ocratoxina foi igual a 37%.

Segundo o ICMSF (1996) para o crescimento de *Penicillium verrucosum* e *Aspergillus ochraceus* responsáveis pela produção de ocratoxina A, as condições favoráveis são temperatura na faixa de 0°C a 31°C e atividade de água de 0,79 a 0,99. Apesar das condições dessa avaliação terem sido favoráveis para a produção de ocratoxina A não ocorreu contaminação nos tratamentos. Uma possível explicação pode ser a ausência das espécies produtoras *Penicillium verrucosum* e *Aspergillus ochraceus* nas amostras analisadas.

2.9.6.1 Avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre espécies produtoras de aflatoxinas por contato direto com o meio

2.9.6.1.1 *Aspergillus flavus*

Os dados da análise de variância, como apresentado na Tabela 13.1, mostraram que houve variação entre os tratamentos, doses e interação entre tratamentos e doses. Sendo assim, realizou-se uma comparação dos tratamentos e doses utilizando o teste de Tukey.

Tabela 13.1 - Análise de variância (ANOVA) para o diâmetro das colônias (mm) para *A. flavus* no modo de ação por contato

Fator de variação	<i>f</i> calculado	Valor P ⁽¹⁾
Tratamento	80,12	<,0001
Dose	914,21	<,0001
Trat x Dose	20,73	<,0001

Nota: (1) Probabilidade ao nível de 5%.

A Tabela 13.2 mostra a comparação do crescimento radial das colônias do *A. flavus* ocorrido no tratamento testemunha e em todos os tratamentos com os óleos no modo de ação por contato. Com os resultados pode-se constatar que ocorreu inibição parcial e total do crescimento do *A. flavus* em todos os tratamentos, porém em doses diferentes para cada óleo. A inibição fúngica foi total na dose de 420 µL para os óleos de *E. grandis*, *E. citriodora* e para as misturas dos óleos de *E. citriodora* + *E. grandis*, *E. citriodora* + (*E. grandis* x *E. urophylla*). Para o óleo do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* e a mistura de *E. citriodora* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), a inibição total foi na dose de 160 µL. Para as misturas de *E. staigeriana* + *E. grandis*, *E. staigeriana* + *E. citriodora* e para o óleo *E. staigeriana* a inibição foi na dose de 80 µL. A mistura dos óleos de *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*) apresentou o melhor resultado no controle do fungo *A. flavus*, pois atingiu a inibição total na dose de 20 µL.

Observou-se que as misturas dos óleos de *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*) e *E. grandis* + *E. citriodora* apresentaram os melhores resultados no controle do fungo quando comparado com os óleos individuais. As demais misturas apresentaram resultados iguais, inferiores aos óleos individuais ou foram melhores apenas para um dos óleos da mistura.

Tabela 13.2 - Comparação das médias do diâmetro das colônias (mm) considerando a interação tratamento x dose ($\mu\text{l}/20\text{mL}$ de meio), para o fungo *A. flavus*, no modo de ação por contato

Trat/ dose	Testemunha					
	(0)	10	20	80	160	420
G ⁽¹⁾	37,33 Aa	37,36 Aa	30,76 Aa	29,66 Aa	10,40 Bb	5,83 Ca
C ⁽²⁾	37,33 Aa	34,43 Aa	32,60 Aa	28,03 Aa	24,36 Ba	1,83 Cb
C + G ⁽³⁾	37,33 Aa	31,33 Aa	21,23 Bb	18,66 Bb	13,33 Bb	0 Cb
G + (G x U) ⁽⁴⁾	37,33 Aa	22,60 Bb	18,50 Bb	13,50 Cb	12,93 Cb	5,33 Da
(G x U) ⁽⁵⁾	37,33 Aa	25,96 Bb	20,46 Bb	16,70 Cb	4,06 Dc	2,00 Db
C + (G x U) ⁽⁶⁾	37,33 Aa	29,70 Ba	24,83 Bb	20,50 Bb	0,00 Cc	0,00 Cb
S + G ⁽⁷⁾	37,33 Aa	39,76 Aa	33,00 Aa	4,00 Bc	0,00 Bc	0,00 Bb
S + C ⁽⁸⁾	37,33 Aa	36,33 Aa	33,26 Aa	0,00 Bc	0,00 Bc	0,00 Bb
S ⁽⁹⁾	37,33 Aa	18,66 Bc	17,00 Bc	0,00 Cc	0,00 Cc	0,00 Cb
S + (G x U) ⁽¹⁰⁾	37,33 Aa	11,60 Bc	4,10 Cd	0,00 Cc	0,00 Cc	0,00 Cb

Notas: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

(1) G = *E. grandis*, (2) C = *E. citriodora*, (3) C + G = *E. citriodora* + *E. grandis* (4) G + (G x U) = *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), (5) G x U = híbrido do *E. grandis* x *E. urophylla*, (6) C + (G x U) = *E. citriodora* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), (7) S + G = *E. staigeriana* + *E. grandis*, (8) S + C = *E. staigeriana* + *E. citriodora*, (9) S = *E. staigeriana*, (10) S + (G x U) = *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*).

2.9.6.1.2 *Aspergillus parasiticus*

Com base nos resultados da análise de variância (Tabela 14.1) foi observada variação entre os tratamentos, doses e interação entre tratamentos e doses. Sendo assim, realizou-se comparação dos tratamentos e doses utilizando o teste de Tukey.

Tabela 14.1 - Análise de variância (ANOVA) para o diâmetro das colônias para *A. parasiticus* no modo de ação por contato

Fator de variação	f calculado	Valor P ⁽¹⁾
Tratamento	79,38	<,0001
Dose	1072,04	<,0001
Trat. x Dose	24,60	<,0001

Nota: (1) Probabilidade ao nível de 5%.

A Tabela 14.2 apresenta a comparação das medições dos diâmetros das colônias do *A. parasiticus* na testemunha e em todos os tratamentos com os óleos no modo de ação por contato. Com os resultados observou-se que ocorreu inibição parcial e total do crescimento do *A. parasiticus* em todos os tratamentos, porém em doses diferentes para cada óleo. A inibição fúngica foi parcial no óleo *E. citriodora* apenas na dose de 420 µL e no óleo *E. grandis*, na dose de 160 µL. Ocorreu inibição total nas misturas dos óleos de *E. citriodora* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), *E. citriodora* + *E. grandis* e *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), na dose de 160 µL. Nas misturas dos óleos de *E. staigeriana* + *E. grandis*, *E. staigeriana* + *E. citriodora* e para o óleo de *E. staigeriana* ocorreu inibição na dose de 80 µL. Apenas a mistura do óleo de *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*) apresentou inibição total na dose de 20 µL, mostrando-se o mais eficiente no controle do fungo nessa avaliação.

Observa-se que as misturas dos óleos de *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), *E. citriodora* + *E. grandis* e *E. citriodora* + (*E. grandis* x *E. urophylla*) apresentaram os melhores resultados no controle do fungo quando comparado com os óleos individuais. As demais misturas apresentaram resultados iguais, inferiores que os óleos individuais ou foram melhores apenas para um dos óleos da mistura.

Tabela 14.2 - Comparação das médias do diâmetro das colônias (mm) considerando a interação tratamento x dose (µl/20mL de meio), para o fungo *A. parasiticus*, no modo de ação por contato

Trat/ dose	Testemunha (0)	10	20	80	160	420
C ⁽¹⁾	36,00 Aa	34,00 Aa	30,76 Aa	25,36 Aa	22,53 Aa	5,00 Ba
G ⁽²⁾	36,00 Aa	35,83 Aa	28,86 Aa	24,86 Aa	10,40 Bb	5,56 Ba
G + (G x U) ⁽³⁾	36,00 Aa	22,33 Bb	16,26 Bb	12,03 Bb	11,50 Bb	4,66 Ca
G x U ⁽⁴⁾	36,00 Aa	24,36 Bb	17,16 Bb	14,33 Bb	4,16 Cc	2,66 Ca
C + G ⁽⁵⁾	36,00 Aa	22,00 Bb	12,16 Cb	12,36 Cb	6,83 CDc	0,00 Da
C + (G x U) ⁽⁶⁾	36,00 Aa	26,26 Bb	25,16 Ba	20,50 Ba	0,00 Cc	0,00 Ca
S + G ⁽⁷⁾	36,00 Aa	39,46 Aa	35,33 Aa	0,00 Bc	0,00 Bc	0,00 Ba
S + C ⁽⁸⁾	36,00 Aa	38,66 Aa	31,53 Aa	0,00 Bc	0,00 Bc	0,00 Ba
S ⁽⁹⁾	36,00 Aa	17,20 Bb	16,40 Bb	3,83 Cc	0,00 Cc	0,00 Ca
S + (G x U) ⁽¹⁰⁾	36,00 Aa	13,93 Bb	5,13 Cc	5,13 Cc	0,00 Cc	0,00 Ca

Notas: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

(1)C = *E. citriodora*, (2) G = *E. grandis*, (3) G + (G x U) = *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), (4) G x U = híbrido do *E. grandis* x *E. urophylla*, (5) C + G = *E. citriodora* + *E. grandis*, (6) C + (G x U) = *E. citriodora* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), (7) S + G = *E. staigeriana* + *E. grandis*, (8) S + C = *E. staigeriana* + *E. citriodora*, (9) S = *E. staigeriana*, (10) S + (G x U) = *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*).

Os resultados dos tratamentos da avaliação no modo de ação por contato realizados em meio de cultura mostraram que a mistura dos óleos de *E. staigeriana* + *E. grandis* x *E. urophylla* apresentou o melhor resultado no controle de ambos os fungos, seguido do óleo individual de *E. staigeriana*. Na avaliação por simulação de armazenamento o tratamento com óleo de *E. staigeriana* + *E. grandis* foi o que apresentou o melhor potencial antifúngico.

Isso pode ser explicado pela diferença da metodologia utilizada nas duas avaliações, sendo que avaliação de simulação foi utilizada como substrato o próprio milho, não esterilizado, com a microflora natural dos grãos e foi utilizada como critério de avaliação a metodologia de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) por bolores. Já na avaliação em placas foi utilizado como substrato o meio de cultura MMEA (maize meal extract agar), apenas as espécies fúngicas *A. flavus* e *A. parasiticus* e a técnica de mensurar o crescimento através da mensuração do diâmetro das colônias.

Por outro lado a comparação dos resultados da avaliação inicial e da avaliação em placas realizadas no modo de ação por contato mostrou concordância, com o óleo de *E. staigeriana* apresentando o melhor potencial antifúngico. Isto pode ser devido ao fato que ambas as avaliações, apesar das diferenças de metodologia, terem sido realizadas com Aa próximas, ou seja, de 0,99 e 0,97, respectivamente no milho e no meio de cultura.

2.9.6.2 Avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre espécies produtoras de aflatoxinas via exposição aos compostos voláteis

2.9.6.2.1 *A. flavus*

Os dados da análise de variância, como apresentado na Tabela 15.1, mostraram que houve variação entre os tratamentos, doses e interação entre tratamentos e doses. Deste modo, realizou-se uma avaliação dos tratamentos e doses com uma comparação utilizando o teste de Tukey.

Tabela 15.1 - Análise de variância (ANOVA) para o diâmetro das colônias para *A. flavus* no modo de ação por exposição aos voláteis

Fator de variação	<i>f</i> calculado	Valor P ⁽¹⁾
Tratamento	14,62	<,0001
Dose	1012,27	<,0001
Trat x Dose	9,69	<,0001

Nota: (1) Probabilidade ao nível de 5%.

A Tabela 15.2 apresenta a comparação das medições dos diâmetros das colônias do *A. flavus* na testemunha e em todos os tratamentos com os óleos no modo de ação por exposição aos voláteis. Com base nos resultados observou-se que a mistura *E. citriodora* + *E. grandis* apresentou inibição parcial na dose de 160 µL e a mistura *E. staigeriana* + *E. grandis* x *E. urophylla* obteve na mesma dose a inibição total do crescimento fúngico. Nos óleos, *E. citriodora*, *E. grandis*, o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* e nas misturas *E. staigeriana* + *E. citriodora*, *E. staigeriana* + *E. grandis*, *E. grandis* + *E. grandis* x *E. urophylla*, *E. citriodora* + *E. grandis* x *E. urophylla*, ocorreu inibição parcial na dose de 80 µL e inibição total a partir de 160 µL. Apenas o óleo *E. staigeriana* apresentou o melhor controle do crescimento fúngico pois a inibição total ocorreu a partir da dose de 80 µL.

Observou-se que nenhuma das misturas obtiveram melhores resultados no controle do fungo quando comparadas com os óleos individuais, todas elas apresentaram resultados iguais, inferiores que os óleos individuais ou foram melhores apenas para um dos óleos da mistura.

Tabela 15.2 - Comparação das médias do diâmetro das colônias (mm) considerando a interação tratamento x dose (µl/20mL de meio), para o fungo *A. flavus*, no modo de ação por exposição aos voláteis

Trat/dose	Testemunha (0)	10	20	80	160	420
C + G ⁽¹⁾	34,23 Aa	32,00 Aa	28,66 Aa	20,90 Aab	4,10 Bab	2,00 Ba
S + (G x U) ⁽²⁾	34,23 Aa	34,16 Aa	35,96 Aa	34,46 Aa	1,66 Bb	0,00 Ba
G + (G x U) ⁽³⁾	34,23 Aa	41,10 Aa	34,83 Aa	25,83 Aa	11,16 Ba	0,00 Ca
C + (G x U) ⁽⁴⁾	34,23 Aa	31,63 Aa	30,16 Aa	17,50 Bb	4,00 Cab	0,00 Ca
S + G ⁽⁵⁾	34,23 Aa	30,66 Aa	30,10 Aa	20,66 Bab	3,00 Cab	0,00 Ca
S + C ⁽⁶⁾	34,23 Aa	38,10 Aa	37,63 Aa	10,56 Bb	0,00 Cb	0,00 Ca
C ⁽⁷⁾	34,23 Aa	46,33 Aa	38,23 Aa	17,00 Bb	0,00 Cb	0,00 Ca
G ⁽⁸⁾	34,23 Aa	30,33 Aa	29,00 Aa	16,50 Bb	0,66 Cb	0,00 Ca
G x U ⁽⁹⁾	34,23 Aa	29,60 Aa	23,93 Aa	9,83 Bb	8,33 BCa	0,00 Ca
S ⁽¹⁰⁾	34,23 Aa	38,86 Aa	30,06 Aa	0,00 Bc	0,00 Bb	0,00 Ba

Notas: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

(1) C + G = *E. citriodora* + *E. grandis*, (2) S + (G x U) = *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), (3) G + (G x U) = *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), (4) C + (G x U) = *E. citriodora* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), (5) S + G = *E. staigeriana* + *E. grandis*, (6) S + C = *E. staigeriana* + *E. citriodora*, (7) C = *E. citriodora*, (8) G = *E. grandis*, (9) G x U = híbrido do *E. grandis* x *E. urophylla*, (10) S = *E. staigeriana*.

2.9.6.2.2 *A. parasiticus*

Os resultados da análise de variância, como apresentado na Tabela 16.1, mostraram que houve variação entre os tratamentos, doses e interação entre tratamentos e doses. Deste modo, realizou-se uma avaliação dos tratamentos e doses com uma comparação utilizando o teste de Tukey.

Tabela 16.1 - Análise de variância (ANOVA) para o diâmetro das colônias para *A. parasiticus* no modo de ação por exposição aos voláteis

Fator de variação	<i>f</i> calculado	Valor P ⁽¹⁾
Tratamento	18,43	<,0001
Dose	810,69	<,0001
Trat. X Dose	18,23	<,0001

Nota: (1) Probabilidade ao nível de 5%.

A Tabela 16.2 apresenta a comparação das medições dos diâmetros das colônias do *A. parasiticus* na testemunha e em todos os tratamentos com os óleos no modo de ação por exposição aos voláteis. Os resultados mostram que a inibição parcial e total do crescimento fúngico ocorreu em diferentes doses para cada óleo ou mistura. A inibição total para a mistura *E. citriodora* + *E. grandis*, ocorreu na dose de 420 µL. As misturas, *E. grandis* + *E. grandis* x *E. urophylla*, *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), *E. citriodora* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), *E. staigeriana* + *E. citriodora* e o óleo *E. grandis* a inibição total foi na dose de 160 µL. Nas misturas *E. staigeriana* + *E. citriodora* e nos óleos *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. citriodora* ocorreu na dose de 80 µL. O óleo *E. staigeriana* apresentou o melhor resultado no controle do *A. parasiticus* nessa avaliação, pois a inibição foi total na dose de 20 µL.

As misturas *E. staigeriana* + *E. grandis*, *E. citriodora* + *E. grandis* e *E. citriodora* + (*E. grandis* x *E. urophylla*) tiveram melhores resultados no controle do fungo quando comparado com os óleos individuais. As demais misturas apresentaram resultados iguais, inferiores ou foram melhores apenas para um dos óleos da mistura.

Tabela 16.2 – Comparação das médias do diâmetro das colônias (mm) considerando a interação tratamento x dose ($\mu\text{l}/20\text{mL}$ de meio), para o fungo *A. parasiticus*, no modo de ação por exposição aos voláteis

Trat/doses	Testemunha (0)	10	20	80	160	420
G + (G x U) ⁽⁶⁾	31,43 Aa	39,86 Aa	32,53 Aa	17,90 Ba	7,83 Cab	0,00 Ca
C + G ⁽⁵⁾	31,43 Aa	19,66 Bab	18,76 Bab	19,76 Ba	14,76 Ba	0,00 Ca
S + (G x U) ⁽¹⁰⁾	31,43 Aa	36,43 Aa	24,83 Aa	28,33 Aa	4,76 Bb	0,00 Ba
(G x U) ⁽¹⁾	31,43 Aa	28,43 Aa	14,66 Bab	6,83 Cb	7,23 Cab	0,00Ca
C + (G x U) ⁽⁷⁾	31,43 Aa	23,36 AB	17,96 Bab	18,46 Ba	1,53 Cb	0,00 Ca
G ⁽²⁾	31,43 Aa	28,83 Aa	25,13 Aa	18,86 Aa	2,66 Bb	0,00 Ba
S + G ⁽⁸⁾	31,43 Aa	17,36 Bab	16,00 Bab	20,26 Ba	1,00 Cb	0,00 Ca
C ⁽³⁾	31,43 Aa	29,50 Aa	29,90 Aa	8,80 Bb	0,00 Bb	0,00 Ba
S + C ⁽⁹⁾	31,43 Aa	40,84 Aa	39,53 Aa	0,00 Bb	0,00 Bb	0,00 Ba
S ⁽⁴⁾	31,43 Aa	33,56 Aa	2,56 Bb	0,00 Bb	0,00 Bb	0,00 Ba

Notas: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

(1)G x U = híbrido do *E. grandis* x *E. urophylla*, (2) G = *E. grandis*, (3)C = *E. citriodora*, (4)S = *E. staigeriana*. (5) C + G = *E. citriodora* + *E. grandis*, (6) G + (G x U) = *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), (7) C + (G x U) = *E. citriodora* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), (8) S + G = *E. staigeriana* + *E. grandis*, (9) S + C = *E. staigeriana* + *E. citriodora*, (10) S + (G x U) = *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*).

Os resultados dos tratamentos da avaliação no modo de ação por exposição aos voláteis realizados em meio de cultura mostraram que o óleo de *E. staigeriana* apresentou o melhor resultado no controle de ambos os fungos. Na avaliação por simulação de armazenamento o tratamento com óleo de *E. citriodora* foi o que apresentou o melhor potencial antifúngico.

Isso pode ser explicado pela diferença da metodologia utilizada nas duas avaliações, sendo que avaliação de simulação foi utilizada como substrato o próprio milho, não esterilizado, com a microflora natural dos grãos e foi utilizada como critério de avaliação a metodologia de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) por bolores. Já nessa avaliação foi utilizado como substrato o meio de cultura MMEA (maize meal extract agar), apenas as espécies fúngicas *A. flavus* e *A. parasiticus* e a técnica de mensurar o crescimento através da mensuração do crescimento radial das colônias.

Já na avaliação inicial no modo de ação por exposição aos voláteis, o óleo que apresentou o melhor resultado foi o *E. staigeriana* e o *E. citriodora*, mostrando uma coerência nos resultados

quando comparados com essa avaliação, pois apesar da diferença da metodologia das duas avaliações, a Aa da avaliação inicial se manteve em torno de 0,99 e o meio de cultura utilizado nessa avaliação a Aa é em torno de 0,97.

A Tabela 17 apresenta a comparação do efeito do modo de ação por contato e por exposição aos voláteis contra os fungos *A. flavus* e *A. parasiticus*. Os resultados mostram que o modo de ação por exposição aos voláteis pode ser considerado estatisticamente igual ao o modo de ação por contato para todos os óleos e misturas. As exceções foram os óleos de *E. grandis* para ambos os fungos e a mistura dos óleos de *E. grandis* x *E. urophylla*, para o *A. parasiticus*, que mostraram melhores resultados no modo de ação por contato. Na avaliação da simulação de armazenamento os modos de ação por contato e exposição aos voláteis foram comparados somente para os óleos *E. grandis* e *E. staigeriana*. Nesta avaliação o modo de ação que obteve o melhor resultado foi o por contato.

O trabalho realizado por Vilella et al. (2009) mostrou resultado contrário ao obtido nesse trabalho, pois no modo de ação por exposição aos voláteis apresentou inibição total dos fungos *A. flavus* e *A. parasiticus* em menor dose (500 μ L).

A diferença no desempenho entre as três avaliações pode ser explicada pela diferença da metodologia utilizada nas avaliações, sendo que avaliação de simulação foi utilizada como substrato o próprio milho, não esterilizado, com a microflora natural dos grãos e foi utilizada como critério de avaliação a metodologia de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) por bolores. Nessa avaliação foi utilizado como substrato o meio de cultura MMEA (maize meal extract agar), apenas as espécies fúngicas *A. flavus* e *A. parasiticus* e a técnica de mensurar o crescimento através da mensuração do crescimento radial das colônias. E no trabalho realizado por Vilella et al. (2009) utilizou-se como substrato o meio de cultura YES, as mesmas espécies fúngicas, o *A. flavus* e o *A. parasiticus*, mas o óleo de *E. globulus*, obtido comercialmente.

Tabela 17 - Comparação do efeito do modo de ação por contato e por exposição aos voláteis contra os fungos *A. flavus* e *A. parasiticus*

Tratamentos	<i>A. flavus</i> – Valor P ⁽¹⁾	<i>A. parasiticus</i> – Valor P
G ⁽²⁾	0,0049	0,0138
G x U ⁽³⁾	0,3455	0,0500
S ⁽⁴⁾	0,1783	0,3506
C ⁽⁵⁾	0,1828	0,7065
G + (G x U) ⁽⁶⁾	0,4116	0,3506
S + G ⁽⁷⁾	0,8449	0,2932
C + G ⁽⁸⁾	0,9008	0,3910
S + (G x U) ⁽⁹⁾	0,3632	0,3632
S + C ⁽¹⁰⁾	0,3434	0,8449
C + (G x U) ⁽¹¹⁾	0,2534	0,2048

(1) Probabilidade ao nível de 5%.

(2) G = *E. grandis*, (3) G x U = híbrido do *E. grandis* x *E. urophylla*, (4) S = *E. staigeriana*, (5) C = *E. citriodora*, (6) G + (G x U) = *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), (7) S + G = *E. staigeriana* + *E. grandis*, (8) C + G = *E. citriodora* + *E. grandis*, (9) S + (G x U) = *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), (10) S + C = *E. staigeriana* + *E. citriodora*, (11) C + (G x U) = *E. citriodora* + (*E. grandis* x *E. urophylla*).

2.9.6.3 Avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre a produção de aflatoxinas por *A. flavus* e *A. parasiticus* para os modos de ação por contato e exposição aos voláteis

As Tabelas 18.1 a 18.4 apresentam os resultados da produção de aflatoxinas por *A. flavus* e *A. parasiticus* da testemunha e todos os tratamentos com os óleos ou misturas dos óleos para ambos os modos de ação. Nessa avaliação foram selecionadas as doses anteriores à dose que teve inibição total do crescimento fúngico em cada tratamento. O objetivo dessa avaliação foi verificar se na última dose que apresentou crescimento fúngico, se havia ou não produção de aflatoxinas.

Com os resultados da Tabela 18.1 observou-se que no tratamento testemunha e nos tratamentos com os óleos de *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*) e *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*) foi detectada a produção de aflatoxina B1 por *A. flavus*, mostrando que a produção não foi inibida ou foi parcial nesses tratamentos. Para os demais tratamentos houve efeito inibidor total na produção de aflatoxina B1 pelo *A. flavus* mesmo antes da inibição total do crescimento fúngico.

Tabela 18.1 – Produção de aflatoxina por *A. flavus* ($\mu\text{g}/\text{kg}$), em meio de cultura para o tratamento com óleos essenciais através do modo de ação por contato.

Tratamentos	Peso do meio com o fungo (g)	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
Testemunha	9,65	0,75**	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. staigeriana</i> 20 μL	0,46	1,59*/ N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. citriodora</i> 420 μL	0,89	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. grandis</i> 420 μL	0,71	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> 420 μL	1,03	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
S + C 20 μL	0,89	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
S + G 20 μL	0,92	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
S + (G x U) 20 μL	1,03	1,12*	N.D.	N.D.	N.D.
G + (G x U) 420 μL	0,83	3,51*	N.D.	N.D.	N.D.
C + G 160 μL	4,65	N.D***	N.D.	N.D.	N.D.
C + (G x U) 80 μL	3,87	N.D***	N.D.	N.D.	N.D.

Nota: (1) AF = Aflatoxina (B1, B2, G1 e G2)

(2)N.D. = Nível de contaminação não detectável, para um limite de detecção de $0,02 \mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ para cada uma das aflatoxinas. Recuperação média da metodologia de análise de aflatoxina B1 igual a 84%.

* Valor da contaminação em 1 placa, **Média da contaminação em 2 placas, *** Média da contaminação em 3 placas.

S + C = *E. staigeriana* + *E. citriodora*, S + G = *E. staigeriana* + *E. grandis*, S + (G x U) = *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), G + (G x U) = *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), C + G = *E. citriodora* + *E. grandis*, C + (G x U) = *E. citriodora* + (*E. grandis* x *E. urophylla*).

Com os resultados da Tabela 18.2 observou-se que no tratamento testemunha para o modo de ação por contato ocorreu produção de aflatoxina B1, B2, G1 por *A. parasiticus* em duas das três repetições analisadas e aflatoxina G2 em apenas uma repetição.

Nos demais tratamentos houve inibição total, apenas o óleo *E. staigeriana* apresentou contaminação de aflatoxina B1.

Tabela 18.2 - Produção de aflatoxina por *A. parasiticus* ($\mu\text{g}/\text{kg}$), m meio de cultura para o tratamento com óleos essenciais através do modo de ação por contato.

Tratamentos	Peso do meio com o fungo				
	(g)	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
Testemunha	9,31	2,9**/ N.D.*	0,05**/N.D.*	0,49**/ N.D.*	0,02*/N.D.**
<i>E. staigeriana</i> 20 μL	0,43	9,86*/N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. citriodora</i> 420 μL	1,12	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. grandis</i> 420 μL	0,68	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> 420 μL	1,21	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
S + C 20 μL	1,1	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
S + G 20 μL	0,74	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
S + (G x U) 20 μL	1,24	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
G + (G x U) 420 μL	1,08	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
C + G 160 μL	0,83	N.D***	N.D	N.D	N.D
C + (G x U) 160 μL	0,96	N.D**	N.D	N.D	N.D

Nota: (1) AF = Aflatoxina (B1, B2, G1 e G2)

(2)N.D. = Nível de contaminação não detectável, para um limite de detecção de $0,02 \mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ para cada aflatoxina. Recuperação média da metodologia de análise de aflatoxina B1 igual a 84%.

* Valor da contaminação em 1 placa, **Média da contaminação em 2 placas, *** Média da contaminação em 3 placas.

S + C = *E. staigeriana* + *E. citriodora*, S + G = *E. staigeriana* + *E. grandis*, S + (G x U) = *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), G + (G x U) = *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), C + G = *E. citriodora* + *E. grandis*, C + (G x U) = *E. citriodora* + (*E. grandis* x *E. urophylla*).

Os resultados da Tabela 18.3 que apresenta a contaminação por *A. flavus* mostram que no tratamento testemunha do modo de ação por exposição aos voláteis e nos tratamentos com os óleos individuais de *E. citriodora* e *E. grandis* e nas misturas com os óleos de *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*) e *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*) ocorreu contaminação de aflatoxina B1. Nesses tratamentos os óleos não inibiram ou tiveram inibição parcial. Nos demais tratamentos não ocorreu produção de aflatoxinas, mostrando que os óleos inibiram totalmente a produção.

Tabela 18.3 - Produção de aflatoxina por *A. flavus* ($\mu\text{g}/\text{kg}$), m meio de cultura para o tratamento com óleos essenciais através do modo de ação por exposição aos compostos voláteis.

Tratamentos	Peso do meio com o fungo (g)	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
Testemunha	9,65	0,75**	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. staigeriana</i> 20 μL	0,36	N.D.**	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. citriodora</i> 80 μL	0,67	14,04*/N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. grandis</i> 160 μL	0,82	1,07 */N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> 160 μL	5,11	N.D.**	N.D.	N.D.	N.D.
S + C 20 μL	0,52	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
S + G 160 μL	0,54	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
S + (G x U) 160 μL	0,3	7,5*/N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
G + (G x U) 160 μL	1,18	19,8*	N.D.	0,91.	19,8
C + G 160 μL	0,64	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
C + (G x U) 160 μL	0,68	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.

Nota: (1) AF = Aflatoxina (B1, B2, G1 e G2)

(2) N.D. = Nível de contaminação não detectável, para um limite de detecção de 0,02 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para cada aflatoxina. Recuperação média da metodologia de análise de aflatoxina B1 igual a 84%.

* Valor da contaminação em 1 placa, **Média da contaminação em 2 placas, *** Média da contaminação em 3 placas

S + C = *E. staigeriana* + *E. citriodora*, S + G = *E. staigeriana* + *E. grandis*, S + (G x U) = *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), G + (G x U) = *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), C + G = *E. citriodora* + *E. grandis*, C + (G x U) = *E. citriodora* + (*E. grandis* x *E. urophylla*).

Com os resultados da Tabela 18.4 que apresenta contaminação por *A. parasiticus* mostra que no tratamento testemunha, do modo de ação por exposição aos voláteis, ocorreu contaminação de aflatoxina B1, B2 e G1 em duas das três repetições analisadas e também da aflatoxina G2 em apenas uma repetição. Nos demais tratamentos, a contaminação de aflatoxina B1 foi presente apenas nas misturas com os óleos de *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*) e *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), porém esse último apresentou também contaminação por aflatoxina B2 e G1. Nos demais tratamentos os óleos ou misturas destes inibiram totalmente da produção.

Tabela 18.4 - Produção de aflatoxina por *A. parasiticus* ($\mu\text{g}/\text{kg}$), m meio de cultura para o tratamento com óleos essenciais através do modo de ação por exposição aos compostos voláteis.

Tratamentos	Peso do meio com o fungo (g)	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
Testemunha	9,31	2,9**/ N.D.*	0,05**/N.D.*	0,49**/ N.D.*	0,02*/N.D.**
<i>E. staigeriana</i> 20 μL	0,36	N.D.**	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. citriodora</i> 80 μL	0,58	N.D.**	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. grandis</i> 160 μL	1,13	N.D.**	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> 160 μL	1,91	N.D.**	N.D.	N.D.	N.D.
S + C 20 μL	0,43	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
S + G 160 μL	0,73	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
S + (G x U) 160 μL	0,57	151,84*/N.D.*	0,6*/N.D.*	2,66*/N.D.*	N.D.**
G + (G x U) 160 μL	0,42	3,1*/N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
C + G 160 μL	0,83	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
C + (G x U) 160 μL	0,55	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.

Nota: (1) AF = Aflatoxina (B1, B2, G1 e G2)

(2)N.D. = Nível de contaminação não detectável, para um limite de detecção de $0,02 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ para cada aflatoxina. Recuperação média da metodologia de análise de aflatoxina B1 igual a 84%.

* Valor da contaminação em 1 placa, **Média da contaminação em 2 placas, *** Média da contaminação em 3 placas

S + C = *E. staigeriana* + *E. citriodora*, S + G = *E. staigeriana* + *E. grandis*, S + (G x U) = *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), G + (G x U) = *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*), C + G = *E. citriodora* + *E. grandis*, C + (G x U) = *E. citriodora* + (*E. grandis* x *E. urophylla*.)

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na avaliação inicial foram selecionados, quanto ao potencial antifúngico, os melhores óleos em cada modo de ação. No modo de ação por contato os óleos selecionados foram de *E. grandis*, o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* e o *E. staigeriana* e no modo de ação por exposição aos voláteis foram os óleos de *E. grandis*, *E. citriodora* e *E. staigeriana*, mostrando que nesta avaliação o modo de ação teve influência no potencial antifúngico dos óleos. Constatou-se também que os óleos selecionados apresentaram um efeito antifúngico residual, pois mesmo aos 27 dias o crescimento fúngico não foi detectado em 100% dos grãos.

Os quatro óleos essenciais selecionados como de melhor potencial antifúngico na avaliação inicial, *E. grandis*, *E. citriodora*, o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* e o *E. staigeriana*, apresentam na sua composição a prevalência dos compostos α -pineno, citrolenal, p-cimeno, limoneno e geranial, respectivamente. Todos estes compostos apresentam na literatura científica relatos dos seus efeitos antifúngicos. Entretanto, não é possível afirmar que o potencial antifúngico observado foi devido ao efeito isolado dos compostos majoritários presentes em cada óleo.

Na avaliação de simulação de armazenamento para o modo de ação por contato, a mistura com os óleos de *E. grandis* + *E. staigeriana* apresentou o melhor resultado, inibindo totalmente a microflora natural do milho a partir da dose de 60 μ L apresentando inclusive um efeito fungicida. Normalmente as misturas se mostraram mais eficazes do que seus óleos individuais, com exceção da mistura com os óleos de *E. grandis* + (*E. grandis* x *E. urophylla*) que foi melhor apenas para o óleo *E. grandis* x *E. urophylla*. O produto comercial, a base de propionato de amônia, utilizado como controle positivo nesse modo de ação não exerceu efeito inibitório frente à microflora no milho, pelo contrário, estimulou o crescimento fúngico, apresentando uma contagem de bolores maior do que a testemunha. Não houve variação perceptível da microflora entre os tratamentos com os óleos, em ambos os modos de ação.

No modo de ação por exposição aos voláteis, os tratamentos se mostraram menos eficientes, pois não foi observado um controle total da população fúngica, apenas inibição parcial a partir da dose de 240 μ L, somente, no tratamento com óleo de *E. citriodora*. Nessa avaliação, as misturas não se mostraram mais eficientes do que seus óleos individuais.

Para os óleos individuais no modo de ação por contato, na simulação de armazenamento, o óleo que apresentou melhor resultado foi o *E. grandis*, já na avaliação inicial, o melhor óleo foi

o *E. staigeriana*. Para o modo de ação por exposição aos voláteis na avaliação da simulação, o melhor óleo foi o *E. citriodora*, já na avaliação inicial, o melhor óleo foi o de *E. staigeriana* e *E. citriodora*.

Na avaliação de simulação de armazenamento, para os óleos de *E. grandis* e *E. staigeriana*, o modo de ação que teve o melhor potencial antigungico foi o por contato.

Na avaliação da simulação de armazenamento, não houve contaminação por aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), zearalenona, ocratoxina A nos tratamentos testemunha, mostrando que não ocorreram condições para crescimento e/ou produção destas micotoxinas. A contaminação por fumonisina B1 foi encontrada no tratamento testemunha, mas em níveis semelhantes ao milho inicial, mostrando que também para esta micotoxina não ocorreram condições favoráveis para crescimento e/ou produção desta micotoxina.

Na avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre espécies aflatoxigênicas, *A. flavus* e *A. parasiticus* em meio de cultura e para ambos os modos de ação, todos os tratamentos se mostraram com atividade antifúngica seja ela total ou parcial. No modo de ação por contato, a mistura com os óleos de *E. staigeriana* + (*E. grandis* x *E. urophylla*) foi o que obteve o melhor resultado para ambos os fungos, onde a inibição foi total na dose de 20 µL/20 mL de meio de cultura. Já para o modo de ação por exposição aos voláteis, o melhor resultado no controle de ambos os fungos foi alcançado pelo óleo de *E. staigeriana* onde a inibição total foi obtida na dose 80 e 20 µL/20 mL, para *A. flavus* e *A. parasiticus*, respectivamente. Nessa avaliação os resultados dos dois modos de ação foram estatisticamente iguais, exceto para o óleo de *E. grandis*, para ambos os fungos e para o óleo do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*, sobre o *A. parasiticus*, onde o modo de ação por contato foi melhor.

Observou-se que os tratamentos apresentaram uma ação diferenciada sobre o crescimento e a produção de aflatoxinas, que foi dependente do óleo, do modo de ação e da espécie aflatoxigênica avaliada. Pois, apesar da inibição parcial do crescimento ainda havia a produção de aflatoxinas em alguns tratamentos e nos demais tratamentos apesar da inibição parcial do crescimento houve a inibição total da produção de aflatoxinas.

A metodologia de avaliação utilizada influenciou no potencial antifúngico observado para os óleos e misturas. Pois, na avaliação da simulação de armazenamento observou-se que nem todos os tratamentos apresentaram uma inibição parcial ou total da microflora, no entanto na avaliação em meio de cultura isso foi observa.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MILHO - ABMILHO. Disponível em: www.abmilho.com.br. Acesso em: 18 ago. 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTOS DE FLORESTAS PLANTADAS- ABRAF. **Anuário estatístico 2009, com base 2008**. Brasília, 2009. 120 p.

ABRAMSON,D.;HULASARE,R.;WHITE,N.D.G.;JAYAS,D.S.;MARQUARDT,R.R. Mycotoxins formation in hulles in barley during granary storage at 15 and 19% moisture content. **Journal of Storage Products Research**, Elmsford, v. 35, p. 297-305, 1999.

ADAMS, C.A. **Nutricines food components in health and nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press, 1999.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectrometry**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001. 426 p.

ADDOR, R.W. **Agrochemical from natural products**. New York: Marcel Dekker, 1994.

ADEGOKE,G.O.; IWASHASHI,H.; OBUHI,K.; IWASHASHI,Y. Inhibition of food spoilage yeasts and aflatoxigenic moulds by monoterpenes of the spice, *Aframomum danielli*. **Flavor and Fragrance Journal**, Hoboken, v. 15, p. 147-150, June 2000.

ALFAZAIRY, A.A.M. Antimicrobial activity of certain essential oil against hidgut symbionts of the drywood termit *Kaloterme flavicollis* Fabr. and prevalent fungi on termite-infested wood. **Journal of Applied Entomology**, Chichester, v. 128, p. 554-560, Sept. 2004.

ALITONOU,G.;AVLESSI,F.;WOTTO,V.D.;AHOUSSE,E.; DANGOU,J.; SOHOUNHLOUÉ, D.C.K. Composition chimique, propriétés antimicrobiennes et activités sur les tiques de l'huile

essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* Sm. **Comptes Rendus Chimie**, Cotonou, v. 7, p. 1051-1055, Oct. 2004.

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

ALVES,P.M.; LEITE, P.H.A.S.; PEREIRA, J.V.;PEREIRA,L. F.;HIGINO, J.S.; LIMA,E.O. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação in vitro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 2, p. 192-196, jun. 2006.

AMARAL,M.F.Z.J.; BARA,M.T.F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v.2, p. 5-8, 2008.

AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERING. Moisture relationships of plant-based agricultural products: ASE D245.5. In:____.**American society of agricultural engineering standards 1999**: standards engineering practices data. 46 th ed. St. Joseph, 1999. 512 p.

ATHIÉ,I.; CASTRO,M.F.P.M.; GOMES,R.A.R.; VALENTINE,S.R.T. **Conservação de grãos**. Campinas: Fundação Cargill, 1998. 236 p.

BACON,C.W.; NELSON,P.E. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 57, n. 6, p. 514-521, June 1994.

BAIRD-PARKER,A.C. Ácidos orgânicos. In: INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Ecologia microbiana de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1980. v. 2, p.132-42.

BARUAH,P.; SHARMA,R.K.; SINGH,R.S.; GHOSH,A. C. Fungicidal activity of some naturally occurring essential oils against *Fusarium moniliforme*. **Journal of Essential Oil Research**, Winston-Salem, v. 8, p. 411-412, July 1996.

BAUER,A.W.; KIRBY,W.M.M.; SHERRIS,J.C.; TURCK,M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 45, p. 493-496, Jun. 1966.

BENJILALI,B;TANTAOUI-ELARAKI,A.;AYADI,A.;IHLAL,M. Method to study antimicrobial effects of essential oils: application to the antifungal activity of six Moroccan essences. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 47, p. 748-752, 1984.

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

BIZZO,H.R. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 3, p. 588-594, abr. 2009.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria n 183, de 21 de março de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 de março de 1996. Art. 1. Adotar Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Micotoxinas Admissíveis em Leite, Amendoim

e Milho, Aprovado pela Resolução do Grupo Mercado Comum do Sul, n 56/94, de 01 de janeiro de 1995.

_____. **Compêndio de defensivos agrícolas**: guia prático de produtos fitossanitário para uso agrícola. 7.ed. São Paulo: Andrei, 2005. 1141 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 out. 2002.

BRITO,C.B.M. **Efeito de diferentes níveis de umidade com e sem utilização de antifúngico em dietas para cães**. 2009. 51 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

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

BULLERMAN, L.B. Inhibition of aflatoxin production by cinnamon. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 39, p. 1163-1165, Aug. 1974.

BURT, S. Essential oils: their antimicrobial properties and potencial application in foods – a review. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, p. 223-253, Aug. 2004.

CACCIONI,D.R.L.;GUIZZARDI,M.;BIONDI,D.M.;RENDA,A.;RUBERTO, G. Relationship between volatile components of *citrus* fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 43, p. 73-79, Aug. 1998.

CARDOSO,M.G.;GAVILANES,M.L.M.A.;SHAN,A.Y.K.V.;MARQUES,M.C.S.; SANTOS, B.R.; BERTOLUCCI, S.K.V.; OLIVEIRA, A.C.B.;PINTO,A.P.S. **Extração de óleos essenciais**. Lavras: UFLA, 2000. Disponível em: http://www.editora.ufla.br/BolExtensao/pdfBE/bol_62.pdf. Acesso em: 10 jun. 2009.

CIMANGA,K.;KAMBU,K.;TONA,L.;APERS,S.;BRUYNE,T. D.;HERMANS, N.; TOTTÉ, J.;PIETERS,L.;VLIETINCK,A.J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 79, p. 213-220, Feb. 2002.

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

CHANDRASEKARAN, M; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v .91, n 1, p. 105-108, Mar. 2004.

CHRISTENSEN,C.M. **Storage of cereal grains and their products**. 2nd ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemistry, 1974. 549 p.

CHAO,S.C.;YOUNG,D.G. Screening for inhibitory activity of essential oils for selected bacteria, fungi and viruses. **Journal Essentials Oil Research**, Winston-Salem, v. 12, p. 630-649, Sept. 2000.

CHOCT, M. **Effects of organic acids, prebiotics and enzymes on control of necrotic enteritis and performance of broiler chickens**, University of New England, 2001. Disponível em: <http://www.aanro.net/VRESEARCH.html?s=1001,projectID=22950>. Acesso em: 24 ago. 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. **Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos**: norma aprovada M38-A, v. 22, n. 16, Wayne, 1995. 50 p. Disponível em: http://www.sbac.org.br/pt/pdfs /biblioteca/clsi_OPAS1M27-A2.pdf. Acesso em: 14 nov. 2009.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Avaliação da safra agrícola 2008/2009** – Décimo Levantamento – Julho/2009. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/>. Acesso em: 9 out. 2009.

CORNELL UNIVERSITY. **Medicinal plants for livestock**. Disponível em: <http://www.ansci.cornell.edu/plants/medicinal/introduction.html>. Acesso em: 18 mar. 2010.

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

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

DE BEER,E.J.; SHERWOOD,M.B. The paper-disk agar plate method for the assay of antibiotic substances. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.30, p. 459-468, Mar. 1945.

DEMARE,S.R.;NAGARAJAND,M.;RAGHUKUMAR,C. Spore germination of fungi belonging to *Aspergillus* species under deep-sea conditions. **Deep-Sea Research**, Greifswald, v. 55, p. 670–678, May 2008.

DORAN,J.C.;BROPHY,J.J. Tropical red gums: a source of 1, 8-cineole-rich *Eucalyptus* oil. **New Forest**, Dordrecht, n. 4, p. 157-178, Sept. 1990.

ELOFF,J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Plant Medical**, New York, v. 64, p. 711-713, Dec. 1998.

EMBRAPA FLORESTAS. **Sistemas de produções**. Disponível em: <http://www.cnpf.embrapa.br/>. Acesso em: 3 out. 2009.

ENGELMANN,A.L.; SKONIESKI, F. R.; GABBI, A.M.; PICCININ, I.; BENCKE, J.A.F.; VIEGAS,J. Aspectos físico-químicos e microbiológicos de grãos de soja tratados com ácidos orgânicos e seus sais. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 38, n. 6, p.1742-1747, Set. 2008.

ERICSSON,H.M.;SHERRIS,J.C. International collaborative study on antibiotic sensitivity testing. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, Sect B, Microbiology and immunology, Copenhagen, v. 217, p. 3-88, April 1971.

ESPINEL-INGROFF,A.;DAWSON,K.; PFALLER,M.ANAISSIE,E.; BRESLIN, E.; DIXON, D.;FOTHERGILL,A.;PAETZNICK,V.;PETER,J.;RINALDI,M. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.39, n.2, p. 314-319, Feb. 1995.

ESTANISLAU,A.A.;BARROS,F.A.S.;PEÑA, A. P.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; PAULA, J.R. Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 11, n 2, p. 95-100, 2001.

FANCELLI,A.L. Tecnologia da produção. In: FANCELLI, A. L.; LIMA, U. A. **Milho**: produção, processamento e transformação industrial. São Paulo: Secretaria da Indústria e Comércio, Ciência e Tecnologia. p. 1-68, 1983.

FANDOHAN,P.;GBENOU,J.D.;GNONLONFIN,B.;HELL,K.;MARASASW.F.O.; WINGFIELD,M.J. Effect of essential oils on the growth of *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in corn. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Davis, v. 52, p. 6824-6829, Oct. 2004.

FAO. **World regulations for mycotoxins, a compendium**. Rome, 1995. FAO Food and Nutrition Paper 64.

FAWCETT,C.H.;SPENCER,D.M. Plant chemotherapy with natural products. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 18, p. 403-418. 1970.

FERREIRA,M.;SANTOS,P.E.T. Melhoramento genético florestal dos *Eucalyptus* no Brasil, breve histórico e perspectivas. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF *Eucalyptus*, 1997, Salvador, **Anais...**Colombo: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisas Florestais, v.1, p.14-34.

FOSTER,G.H.;TUIITE.J. Aeration and stored grain management. In: SAUER, D. B. (ed.) **Storage of cereal grains and their products**. 4 th ed. St. Paul: A.A.C.C. 1992. chap. 7, p. 219-138.

GARLIPP,R. **Crescimento do setor florestal no Brasil** (Workshop on Forest Plantation), Piracicaba: ESALQ/ IPEF, 2007. Disponível em: <http://www.sbs.org.br/secure/g2/Crescimento%20do%20Setor%20Florestal%20no%20Brasil%20%20Rubens%20Garlipp.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2009.

GHINI,R. **Resistência de fungos a fungicidas**. FeSBE - Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Disponível em: www.fesbe.org.br. Acesso em: 8 out. 2009.

GOMEZ,D.G.J. **Efecto de las propiedades inhibitorias de mohos a escala de laboratorio de tres productos comerciales compuestos por sales derivados del acido propionico llamados fungitek dry, action y grain sobre los mohos presentes en El maíz (zea mays)**. Facultad de Salud, Cúcuta: Colombia, 2008. Disponível em: http://www.engormix.com/effecto_propiedades_inhibitorias_mohos_s_articulos_2042_MYC.htm. Acesso em: 26 nov. 2009.

GOTTLIEB,O.R; SALATINO,A. Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. In: FABROWSKI,F.J. ***Eucaliptus smithii* R. T. BAKER (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil**. 2002. 225 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

GUENTHER,E. History, origin in plants, production and analysis. In: **The essentials oils**. 4 th ed. New York: Van Nostrand. 2008. v. 1.

HADACEK,F.;GREGER.H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, West Sussex, v.11, p.137–147, April 2000.

HELAL,R.G.; STELATO,M.M. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essencial de *Origanum vulgare*. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA PUCCAMP, 14, 2009. Campinas. **Anais...**Disponível em: http://www.puccampinas.edu.br/pesquisa/ic/pic_2009/resumos/200991_14523_712244662_resDAE.pdf. Acesso em: 21 fev. 2009.

HOLMQUIST,G.U.; WALKER, H.W.; STAHR, H.M. Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, p. 778–782, Aug. 2006.

HIGGINS, C.; BRINKHAUS, F. Efficacy of several organic acids against molds. **Journal of Applied Poultry Research**, Stanford, v. 8, p. 480-487, Oct. 1999.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS – ICMSF. **Microorganismos de los alimentos**: características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Acribia, 1996. p. 403-428.

INSTITUTO DE PESQUISA E ESTUDOS FLORESTAIS – IPEF. Disponível em: www.ipef.br/. Acesso em: 23 out. 2009.

JANSSEN,A.M. **Antimicrobial activities of essential oils**: a pharmacognostical study. Amsterdam: The Netherlands. 1989, 182 p.

JARDIM,C.M.;; JHAM,G.N.;DHINGRA, O. D.; FREIRE, M.M. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Chemical Ecology**, Amsterdam, v.34, n. 9, p.1213-8, Aug. 2008.

JAYAS, D; WHITE, N.D. Storage and drying of grain in Canada: low cost approaches. **Food Control**, Guildford, v. 4, p. 255-261, Aug. 2003.

JIMENEZ, M.; MANEZ, M.; HERNANDEZ, E. Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 29, n.2-3, p. 417-421, Apr. 1996.

KHAN, Z.K.; KATIYAR, R. Potent antifungal activity of garlic (*Allium sativum*) against experimental murine disseminated cryptococcosis. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 38: p. 87-100, Apr. 2000.

LEE, Y.S.; JUNHEON, K.; SHIN, S.C.; LEE, S.G. Antifungal activity of *Myrtaceae* essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. **Flavour and Fragrance Journal**, Hoboken, v. 23, p. 23-28, Jan. 2008.

LIMA, I.L.; OLIVEIRA, C.L.F. Aspectos gerais do uso de óleos essenciais de Eucalipto. **Revista Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 1, n. 1, 2003. Disponível em: <http://www.revista.inf.br/florestal01/pages/artigos/artigo06.htm>. Acesso em: 5 mar. 2009.

LUCCA FILHO O.A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J., WETZEL, M.M.S. (Ed.) **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, p. 276-298, 1987.

MARÍN, S.; SANCHI, V.; MAGAN, N. Water activity, temperature and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 1063–1070, Dec. 1995.

MOUBASHER, A. H.; ELNAGHY, M. A.; ABDEL-HAFEZ, S. I. Studies on the fungus flora of three grains in Egypt. **Mycopathologia**, Amsterdam, v. 47, n 3, p. 261-274, Aug. 1972.

MULLER, P.H.; BRITO, J.O. Potencial de onze espécies de Eucalyptus para a produção de óleos essenciais. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n.1, fev. 2006.

NAKAHARA,K.; ALZOREKY , N. S.; YOSHIHASHI, T.; NGUYEN, H. T. T.; TRAKOONTIVAKORN, G. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella grass). **Japan Agricultural Research Quarterly**, Tokyo, v. 37, n. 4, p. 249-252, July 2003.

NASCIMENTO,G.G.F.;LOCATELLI,J.;FREITAS,P.C.;SILVA,G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 4, Oct. 2000.

NASCIMENTO, J. E. R.;RODRIGUES, C. L.;JACOB, R. G.,PERIN, G. LENARDÃO, E. J. Potencial de três espécies de Eucalipto para a produção de óleos essenciais na Metade Sul do Rio Grande do Sul. In: ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL, 17, **Anais...** FURG: Rio Grande, 2009.

NELSON,P.E.;DESJARDINS, A.E.;PLATTNER,R.D. Fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.31, p.233-252, Sept. 1993.

NESSI,A.V.;ETCHEVERRY,M.G. Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using natural maize phytochemicals under different conditions of water activity. **Pest Management Science**, London, p. 775-784, Sept. 2006.

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

NI,X;STREETT ,D.A. Modulation of water activity on fungicide effect on *Aspergillus niger* growth in Sabouraud dextrose agar mediums. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, vol. 41, n. 5, p. 428-433, 2005.

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION. Amending regulation (EC) 466/2001 as regard aflatoxins. 12 December 2003. **Commision Regulation (EC)** No. 2174/2003. L326/12.

OGUNWANDE,I.A.;OLAWOREN.O.;ADELEKE,K.A.;KONIG,W.A.Chemical composition of the essential oils from the leaves of three *Eucalyptus* species growing in Nigeria. **Journal of Essential Oil Research**, Winston-Salem, v.15, p. 297-301, 2003.

OSTROSKY, E. A.;MIZUMOTO, M. K.;LIMA, M. E. L.;KANEKO T. M.;NISHIKAWA, S. O.;FREITAS,B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.18, n.2, p. 301-307, jun. 2008.

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

PASTER,N.;MENASHEROV,M.;RAVID,U.;JUVEN,B. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking store grain. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 58, p. 81–85, 1995.

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

PENTEADO,S. Utilização dos defensivos alternativos na agricultura: histórico e perspectivas. In: ENCONTRO NACIONAL DE PROCESSOS, 2001, Botucatu. **Resumos...** Botucatu: Agroecológica, 2001.

PERUZZO,T.M.,CANTO,E.L. **Química na abordagem do cotidiano**. São Paulo: Ed. Moderna, 1993.

PINAZZA,L.A. **Cadeia produtiva do milho**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura; – Brasília: IICA: MAPA/SPA, Agronegócios, 2007, v. 1, 108 p. Disponível em: <http://www.iica.org.br/Docs/CadeiasProdutivas/Cadeia%20Produtiva%20do%20Milho.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2009.

PINTO, E; SALGUEIRO, L.R.; CAVALEIRO, C.; PALMEIRA, A.; GONÇALVES, M.J. *In vitro* susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. **Industrial Crops and Products**, New York, v. 26, p. 135 – 141, Aug. 2007.

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

PUZZI,D. **Abastecimento e armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensinos Agrícolas, 2000. 666 p.

RAO,B.R.R.;KAUL,P.N.; SYAMASUNDAR, K. V.; RAMESH, S. Comparative composition of decanted and recovered essential oils of *Eucalyptus citriodora* Hook. **Journal of Flavour and Fragrance**, Hoboken, v. 18, n.2, p. 133-135, Mar. 2003.

RIBEIRO,N.;SITOE,A.A.;GUEDES,B.S.;STAISS,C. **Manual de silvicultura tropical**. Maputo: UEM, 2002. 130 p.

RICHARDSON,M.D;BACON,C.W. Catabolism of 6-methoxy-benzoxazoline and 2-benzoxazoline by *Fusarium moniliforme*. **Mycologia**, New York. v. 87, p 510-517, 1995.

ROONEY,L.W.; SERNA-SALDIVAR,S.O. Food uses of whole corn and dry – milled fractions. In: WATSON, S. A.; RANSTAD, B. E. (Ed.) **Corn: chemistry and technology**. St Paul: A.A.C.C., 1994. Chap. 13, p. 399-427.

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

SALGADO,A.P.S.P.;CARDOSO,M.G.;SOUZA,P.E.;SOUZA, J. A.;ABREU, C. M.;PINTO, J.E.B.P. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporium*, *Botrytis cinérea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras. v. 27, n. 2, p. 249-254, Mar. 2003.

SALVADORI,R.K.;POVH,F.P.;SCHWANESTRADA,K.R.F.;STANGARLIN,J.R. Atividade antifúngica dos extratos brutos de *Corymbia citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v.28, n.2, p.420-425, out. 2003.

SAS Online Doc 9.1.3 SAS, 2004. **Statistical analysis system**. Cary: SAS Institute Inc, 2004.

SAUER,D.B.;MERONUCK,R.A.;CHRISTENSEN,C. M. Microflora. In: SAUER, D. B. (Ed.) **Storage of cereal grains and their products**. 4 th ed. St. Paul: A.A.C.C. 1992, Chap. 9, p. 313-338.

SCUSSEL,M.V.; **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Ed. Insular, 1998. 144 p.

SILVA,N.,JUNQUEIRA,V.C.A.,SILVEIRA,N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 317 p.

SIMIÉ,A.;SOKOVIC,M.;RISTIC,M.;GRUJIC-JOVANOVIC, S.;VUKOJEVIC, J.;MARIN, P. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research**, Chichester, v. 18, p. 713-717, Oct. 2004.

SIMÕES,C.M.O.;SHENKEL,E.P.;GOSMANN,G.;MELLO,J.C.P.;MENTZ,L.A.;PETROVICK,P .R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2000. 821 p.

SINDICATO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS – SINDAG. **Dados de mercado. 2009**. Disponível em: www.sindag.com.br. Acesso em: 7 nov. 2009.

SINGH, S.P.;CHAND,L.;NEGRI, S.;SINGH, A. K. Antibacterial and antifungal activities of *Mentha arvensis* essential oil. **Phytotherapy Research**, Chichester, v.1, p. 76-78, 1992.

SOARES,L.M.V.;RODRIGUEZ-AMAYA,D.B. Survey of aflatoxin, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian food by using multitoxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v. 72, p. 22-36, Jan. 1989.

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

SOUZA ,A.E. F.;ARAÚJO, E.;NASCIMENTO, L.C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolados de grão de milho. **Fitopatologia Brasileira**, João Pessoa, v. 32, p. 465-470, Nov. 2007.

TANAKA,M.A.S.;MAEDA,J.A.;PLAZAS, I.H.A.Z. Microflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento. **Sciencia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n.3, p. 501-508. Jul. 2001.

TANIWAKI,M.H.,SILVA,N. **Fungos em alimentos**: ocorrência e detecção. Campinas: ITAL/Núcleo de Microbiologia, 2001. 82 p.

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

VANDEGRAFT,E.E.;HESSELTINE, C. W.; SHOTWELL, O. L. Grain preservatives: Effects on aflatoxin and ochratoxin production. **Cereal Chemistry**, Chicago, v. 52, n. 1, p. 79-84, 1975.

VIANA, J. **História das florestas plantadas, análise, demandas e potencial do setor florestal**. In: Evento 100 Anos de Florestas Plantadas no Brasil. Brasília, 2005. Palestra.

VILELLA, G. R., ALMEIDA, G. S., D´ARCE, M. A. B. R., MORAES, M. H. D., BRITO, J. O., SILVA, M. F. G. F., SILVA, S. C., PIEDADE, S. M. S., CALORI-DOMINGUES, M. A., GLORIA,E.M. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. **Journal of Stored Products Research**, Elmsford, v. 45, p. 108-111, April 2009.

VITTI, A. M. S; BRITO, J. O. **Óleo essencial de *Eucalyptus***. Piracicaba: ESALQ, 2003. 26p.

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

XAVIER,M.O.;MADRID,I.M.;MEINERZ,A.R.M.;CLEFF,M.B.;SCHUCH, L.F.D.; NOBRE, M. O.,MEIRELES, M.C.A. Atividade “in vitro“ De três agentes químicos frente a diferentes espécies de *Aspergillus*. **Arquivo Instituto Biológico**. São Paulo, v.74, n.1, p.49-53, Jan. 2007.

WATSON, S. A. Structure and composition. In: WATSON, S. A.; RANSTAD, B. E. (Ed.) **Corn: chemistry and technology**. St Paul: A.A.C.C., 1994. Chap. 3, p. 55-78.

WILSON, D. M.;ABRAMSON. Mycotoxins. In: SAUER, D. B. (Ed.) **Storage of cereal grains and their products**. 4 th ed. St. Paul: A.A.C.C. 1992. Chap. 10, p. 341-376.

WEBBER, E.A. **Armazenagem agrícola**. 2 ed. Porto Alegre: Kleper Weber industrial, 2001. 400 p.

WOOLF, A. Essential oil poisoning. **Symposium on Natural Products Toxicology**. p. 721-727. Oct. 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the WHO Expert committee on antibiotics**. Inform no. 26. Technical Report series no. 610. Geneva, 1977.

YIN,M.;TSAO,S. Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 49, n 1-2, p. 49-56, Aug. 1999.

ZRIRA,S.; BESSIERE,J. M.; MENUT, C.; ELAMRANI, A.; BENJILALI, B. Chemical composition of the essential oil of nine *Eucalyptus* species growing in Morocco. **Journal of Flavour and Fragrance**, Hoboken, v. 19, n.2, p. 172-175, Feb. 2004.

ZGODA,J.R.;PORTER,J.R.A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 39, p. 221-225, June 2001.

