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

Potencial antifúngico de extratos de folhas de *Eucalyptus staigeriana F. Muell.* sobre *Aspergillus flavus*

Valmir Carneiro Ceschini

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

Piracicaba
2011

Valmir Carneiro Ceschini
Engenheiro de Alimentos

Potencial antifúngico de extratos de folhas de *Eucalyptus staigeriana F. Muell.* sobre *Aspergillus flavus*

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

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

Piracicaba
2011

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

Ceschini, Valmir Carneiro
Potencial antifúngico de extratos de folhas de *Eucalyptus staigeriana F. Muell.* sobre *Aspergillus flavus* / Valmir Carneiro Ceschini. - - Piracicaba, 2011.
97p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Agentes antimicrobianos 2. Aspergillus 3. Eucalipto 4. Micologia 5. Microbiologia de alimentos 6. Óleos essenciais - Extração 7. Solvente I. Título

CDD 576.163
C421p

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

DEDICATÓRIA

À minha querida avó Zélia Lopes Vidal (*in memorian*),

por seus sábios ensinamentos e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe pelo amor incondicional, sábios ensinamentos, incentivo aos estudos, apoio e força em todos os momentos da minha vida e confiança na minha evolução.

À minha namorada Renata Kazuko Sakai pelo apoio, estímulo e amor.

À todos os meus familiares que me apoiaram nos meus estudos e sempre me deram forças para continuar, em especial a meu primo Wagner Carneiro Junior pela amizade a grandes conversas.

À toda a turma da vila da graduação da ESALQ/USP, pela grande amizade e companheirismo conquistados nesse período.

À toda turma das repúblicas biosfera e atecubanos, pelas grandes amizades.

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

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

À todos os funcionários da limpeza, portaria, manutenção e técnicos do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP, pela amizade e companheirismo.

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

À todos os amigos do Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/ USP, pela convivência diária, amizade, companheirismo, conversas e cafezinhos.

À toda a turma do mestrado em Ciência de Alimentos, pela grande amizade conquistada nesse período.

À todos que participaram direta e indiretamente e que me apoiaram durante a realização desse trabalho, MUITO OBRIGADO!

EPÍGRAFE

"Em minhas preces de todo dia, sempre peço coragem e paciência.
Coragem para continuar superando as dificuldades do caminho naqueles que não me compreendem.
E paciência, para não me entregar ao desânimo
diante das minhas fraquezas!"

Chico Xavier

SUMÁRIO

RESUMO.....13
ABSTRACT.....15
LISTA DE FIGURAS.....16
LISTA DE TABELAS.....18
1 INTRODUÇÃO.....20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....23
2.1 Importância dos fungos no armazenamento de grãos.....23
2.2 Alternativas para o controle do desenvolvimento fúngico.....30
2.3 Emprego de extratos vegetais ou óleos essenciais no meio agrícola.....34
2.4 Utilização de extratos vegetais e óleos essenciais como antifúngicos.....38
2.5 A cultura do eucalipto e o uso de extratos e óleos essenciais de eucalipto como pesticidas.....42
2.6 Uso de extratos e óleos essenciais de eucalipto como antifúngicos.....49
2.7 Métodos de obtenção de extratos vegetais visando obtenção de antifúngicos.....52
3 MATERIAL E MÉTODOS.....55
3.1 Obtenção das folhas de eucalipto.....55
3.2 Preparo do material para extração.....56
3.3 Metodologia de preparo dos extratos.....57
3.3.1 Obtenção dos extratos sobre folhas frescas, liofilizadas e folhas secas no ambiente.....57
3.4 Concentração dos extratos.....59
3.5 Avaliação da capacidade antifúngica.....60
3.5.1 Inoculo fúngico 60
3.5.2 Seleção inicial dos extratos quanto à capacidade antifúngica.....61
3.5.3 Avaliação da Mínima Concentração Inibitória (MIC).....62
3.6 Metodologia de análise estatística.....64
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....64
4.1. Repetitividade entre as extrações.....64
4.2. Tipo de processamento da Matéria-prima.....64
4.3. Solventes Extratores.....65

4.4. Tempo de extração em horas.....66
4.5. Influência dos extratos sobre o estágio de crescimento fúngico durante o tempo.....67
4.6. Influência da combinação da matéria-prima, solvente extrator e tempo de extração.....69
4.7. Mínima Concentração Inibitória (MIC).....71
5 CONCLUSÕES.....73
REFERÊNCIAS.....74
ANEXOS.....87

RESUMO

Potencial antifúngico de extratos de folhas de *Eucalyptus staigeriana F. Muell.* sobre *Aspergillus flavus*

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antifúngico contra o fungo *Aspergillus flavus*, dos extratos de folhas de *Eucalyptus staigeriana F. Muell.,* preparados a partir de folhas frescas, liofilizadas e secas ao ambiente, sob diferentes tempos de extração e por diferentes solventes extratores, tais como metanol, etanol e água a temperatura ambiente e água a 60ºC. Para mensurar o potencial antifúngico foi utilizada a técnica de "poisoned food" em meio BDA e o crescimento radial fúngico foi avaliado por seis dias. O percentual de inibição foi avaliado comparando-se as medidas do diâmetro radial de crescimento fúngico dos extratos com as placas controle contendo apenas os solventes. Como controle positivo foi utilizado o óleo essencial de *E. staigeriana*. Os extratos metanólicos apresentaram o melhor potencial antifúngico, seguido pelos extratos etanólicos e aquosos. A utilização das folhas frescas mostrou-se a melhor forma de preparação e não houve diferença significativa entre os tempos de extração 1h e 24h, indicando como processamento mais viável a extração em 1h. A Concentração Inibitória Mínima (MIC) foi mensurada para o extrato de melhor desempenho pela técnica de micropoços, aonde o crescimento fúngico foi monitorado por fluorescência derivada da reação da esterase fúngica com o diacetado de fluorescina. E o extrato que obteve o melhor resultado foi o extrato metanólico, com 1h de extração, a partir de folhas liofilizadas de *E. staigeriana*, e sua MIC foi de 26,75 µL/mL, enquanto a do seu óleo essencial foi de 12,5 µL/mL, demonstrando a eficiência relativa da extração com solventes extratores e sua praticidade e operacionalidade, quando se comparam com a extração de óleos essenciais.

.

Palavras-chave: *Eucalyptus staigeriana*; Extratos de folhas; Solventes extratores;

Inibição fúngica, Tempo de extração, *Aspergillus flavus*

ABSTRACT

Antifungal potential of *Eucalyptus staigeriana F. Muell.* leaf extracts against *Aspergillus flavus*

This study aimed to evaluate the antifungal potential of *Eucalyptus staigeriana F. Muell*. leaf extracts against *Aspergillus flavus*. The extracts were prepared using fresh, lyophilized, and air-dried leaves, different extraction times, and different solvents, such as methanol, ethanol, water at room temperature, and water at 60ºC. To measure the antifungal potential, the “poisoned food” technique was used in PDA medium, and the radial growth of the fungus was evaluated for six days. The percentage of inhibition was assessed by comparing the measurements of the radial growth diameter of the fungus in the extracts with the control plates containing only the solvents. The essential oil of E. staigeriana was used as a positive control. The methanolic extracts presented the best antifungal potential, followed by the ethanolic and aqueous extracts. The use of fresh leaves was the best type of preparation and no statistically significant difference between 1-h and 24-h solvent extraction was found, indicating the 1-h extraction process as the most feasible. The extract presenting the best performance using the microwell technique had the minimum inhibitory concentration (MIC) measured, and the fungal growth was monitored by fluorescence derived from the fungal esterase reaction with fluorescein diacetate. The extract that achieved the best result the methanolic extract, with 1-h extraction from lyophilized leaves of E. staigeriana, and the MIC was 26.75 µL/mL, while the essential oil was 12.5 µL/mL, demonstrating the relative efficiency of the solvent extraction and its practicality and easy implementation when compared with the extraction of essential oils.

Keywords: *Eucalyptus staigeriana*. Leaf extracts. Solvents. Fungal inhibition. Extraction time. *Aspergillus flavus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foto com folhas da espécie *Eucalyptus staigeriana*.....56
Figura 2 - Fluxograma de obtenção dos extratos sobre folhas frescas, liofilizadas e secas no ambiente.....58
Figura 3 - Gráfico descrevendo a variação da %inibição com o tempo de crescimento em dias.....68
Figura 4 - Gráfico descrevendo a variação da %inibição com as doses do extrato metanólico de folhas liofilizadas (Met_1_FL).....72
Figura 5 - Gráfico descrevendo a variação da %inibição com as doses do óleo essencial de E. staigeriana.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Comparação das áreas de plantio de eucalipto com as de outras culturas no Brasil.....43
Tabela 2 - Codificação dos extratos quanto aos solventes, tempos de extração e tipo de processamento.....59
Tabela 3 - Classificação do material segundo o tipo de preparação em relação ao percentual de inibição.....65
Tabela 4 - Classificação dos solventes extratores em relação ao percentual de inibição.....66
Tabela 5 - Classificação dos tempos de extração em relação ao percentual de inibição.....67
Tabela 6 - Classificação dos tempos de crescimento em dias, em relação ao percentual de inibição.....68
Tabela 7 - Classificação dos extratos em relação a influência da combinação da matéria-prima, solvente extrator e tempo de extração sobre o percentual de inibição.....70
Tabela 8 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 1.....88
Tabela 9 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 2.....88
Tabela 10 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 3.....89
Tabela 11 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 4.....89
Tabela 12 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 5.....89
Tabela 13 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 6.....90
Tabela 14 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 7.....90
Tabela 15 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 8.....90
Tabela 16 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 9.....91
Tabela 17 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 10.....91
Tabela 18 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 11.....91
Tabela 19 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 12.....92
Tabela 20 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 13.....92

Tabela 21 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 14.....92
Tabela 22 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 15.....93
Tabela 23 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 16.....93
Tabela 24 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 17.....93
Tabela 25 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 18.....94
Tabela 26 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 19.....94
Tabela 27 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 20.....94
Tabela 28 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 21.....95
Tabela 29 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 22.....95
Tabela 30 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 23.....95
Tabela 31 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 24.....96

1 Introdução

O problema das micotoxinas nos alimentos e a deterioração causada por fungos desde o campo até a hora do consumo já é bastante antiga e vem causando diversos problemas à sociedade. Principalmente a perda de alimentos e rações devido à deterioração causada por esses microorganismos além do desenvolvimento de doenças como carcinomas, problemas renais, hepáticos, no sistema nervoso central e até mesmo alergias, pneumonias e problemas respiratórios (CULLEN; NEWBERNE, 1994).

Dentre os fungos produtores de micotoxinas o *Aspergillus flavus* se destaca por sua ubiquidade e alta resistência as intempéries e condições de armazenamento, e por produzir uma das mais tóxicas micotoxinas existentes, as aflatoxinas, que são um grave problema mundial, principalmente nas áreas tropicais, como é o caso do Brasil (PITT; HOCKING, 1997).

A utilização dos antifúngicos químicos vendidos no mercado, além de gerar custos para o produtor gera também um alto custo ambiental, visto a toxicidade destas substâncias e seus efeitos para a fauna e a microflora do ambiente, sem falar na contaminação do solo e dos cursos d'água.

Os óleos essenciais possuem um importante papel na preservação de produtos alimentícios contra fungos, em aplicações antifúngicas em plantas como fitossanitários e também no combate a várias doenças causadas por infecções fúngicas em humanos e animais. Os óleos essenciais possuem também vantagens sobre outros antimicóticos químicos devido a sua baixa toxicidade em mamíferos, seu status de ecologicamente correto e sua habilidade de não desenvolver resistência microbiana (PANDEY; RAI, 2003).

Todavia para a obtenção dos óleos essenciais normalmente são utilizados processos complexos e onerosos o que torna a sua produção mais difícil para o produtor rural, tornando-os dependentes de fornecedores externos, além do baixo rendimento dos processos (por volta de 1 a 2% em massa). Trabalhos recentes desenvolvidos no Laboratório de Micotoxinas e Micologia da USP/ESALQ têm mostrado

capacidade antifúngica para o óleo essencial proveniente de folhas de *Eucalyptus staigeriana* (MENGAI, 2010).

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de extratos antifúngicos a partir de solventes mais fáceis de serem adquiridos e manuseados, como o etanol, água e o metanol, que apesar de sua toxicidade é considerado um bom solvente extrator para plantas secas e liofilizadas.

Este trabalho avaliou a influência dos processos de preparo das folhas, do tipo de solvente de extrator utilizado e do tempo de extração, na capacidade antifúngica dos extratos de folhas de *Eucalyptus staigeriana* contra o fungo *Aspergillus flavus*.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Importância do controle dos fungos no armazenamento de grãos

Os fungos filamentosos, também conhecidos como bolores ou mofos, são microrganismos eucariotos, heterotróficos e multicelulares, presentes em todos os ambientes e economicamente importantes no campo da medicina, da fitopatologia e da indústria. Além de serem ecologicamente importantes decompositores na cadeia alimentar. Entretanto, podem causar graves problemas por contaminar os alimentos, causando sua deterioração, reduzindo seu valor nutricional, alterando suas qualidades sensoriais e tornando-se, em alguns casos, um problema de saúde pública (RAVEN et. al., 2001).

No Brasil, as perdas relacionadas com cereais, grãos de leguminosas, como feijões, e outros grãos secos, que constituem os alimentos deterioráveis, não são exatamente conhecidos, mas segundo alguns pesquisadores, as perdas devem situar-se entre 10 a 20% (PUZZI, 1999). Nos países desenvolvidos, os problemas da colheita, armazenamento e manuseio (secagem, limpeza, movimentação, etc.) de grãos, constituem objeto de estudo permanente, visando prolongar a vida comercial dos produtos. No Brasil, existem poucas pesquisas para avaliar as perdas que ocorrem pelas infestações de fungos no armazenamento de produtos agrícolas. Entretanto, no armazenamento de grãos algumas constatações identificam que as perdas que ocorrem, na qualidade dos grãos e subprodutos, são altamente significativas, principalmente pela inadequação de grande parte de nosso aparelhamento armazenador (PUZZI, 1999).

Os fungos como deterioradores significantes em alimentos e grãos são importantes causadores de prejuízos, seja por reduzir seu valor nutritivo, sua qualidade para comercialização ou mesmo pela formação de micotoxinas (MARIN et. al., 1999; JANARDHANA et. al., 1998).

Dentre os grãos agrícolas, aonde o desenvolvimento fúngico representa um problema sério, o milho é o grão de grande preocupação seja por sua susceptibilidade ao desenvolvimento fúngico, como por sua importância econômica.

Nos últimos 15 anos, a produção de milho praticamente dobrou, passando de 24 para 42 milhões de toneladas, com um aumento de produtividade de cerca de 1.800 Kg/ha para mais de 3.000 Kg/ha em 2009, e a produção brasileira de milho, esperada para a safra 2010/11 é de 56,73 milhões de toneladas, originada pela soma de 35,03 milhões de toneladas da primeira safra e 21,70 milhões de toneladas da segunda safra (CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2011). Entretanto, a produtividade média brasileira, de 3.500 kg/ha, ainda é considerada baixa se comparada à de outros países produtores, como China (5.000 kg/ha), Argentina (7.000 kg/ha) e Estados Unidos (9.000 kg/ha). E dentre os fatores que têm contribuído para a baixa produtividade da cultura do milho no Brasil, as doenças são consideradas, atualmente, um dos mais importantes aspectos (PEREIRA et. al., 2005).

O milho possui uma importante função na produção de rações para a avicultura, chegando a compor cerca de 60% de uma ração inicial de frangos de corte e, aproximadamente, 65% da energia metabolizável, além de aproximadamente 22% da proteína na fase inicial de crescimento (DALE, 1994).

A indústria de rações é um dos mais amplos segmentos do agronegócio brasileiro, e é responsável pelo consumo de mais de 60% da produção de milho, 35% da produção de soja e grandes quantidades de outros grãos, além de sua importância para a indústria química, pois demanda a produção de grandes quantidades de vitaminas, aminoácidos e microingredientes para alimentação animal. Conforme dados da Sindirações (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL) a avicultura de corte manteve forte crescimento, cresceu quase 9% em 2010 e consumiu mais de 30 milhões de toneladas de ração e mais de 18 milhões de toneladas de milho. Considerando-se a produção total de rações, o consumo de milho pelo setor de rações chegou a 36.480.528 toneladas, e tem previsão de consumo de quase 38 milhões de toneladas em 2011 (SINDIRAÇÕES, 2010).

O desenvolvimento fúngico no milho resulta entre outras consequências na alteração da aparência dos grãos, o que pode depreciá-los para comercialização, pois

muitas das alterações provocadas pelo desenvolvimento fúngico são consideradas nas normas de classificação dos grãos estabelecidas pelo MAPA (BRASIL).

No Brasil, a classificação do milho e de outros grãos como arroz, feijão e trigo é feita com base em normas ditadas por portarias ou instruções normativas do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), e seu objetivo é determinar a qualidade do produto, garantindo a comercialização por um preço justo e para cada tipo, há um valor correspondente, pagando-se mais por um produto de melhor qualidade e penalizando-se o de qualidade inferior (BRASIL, 1976, 2001, 2005, 2006, 2008).

O milho, por exemplo, segundo a sua qualidade, é classificado em Tipo1, Tipo 2 e Tipo 3, conforme o seguinte padrão: TIPO 1 - constituído de milho seco, sadios, de grãos regulares e com umidade máxima de 14,5% com tolerância máxima de 1,5 % de matérias estranhas impurezas e fragmentos e 11 % de grãos avariados, com no máximo 3% de grãos ardidos e brotados (percentagem em peso); TIPO 2 - constituído de milho seco, são de grãos regulares e com umidade máxima de 14,5% com tolerância máxima de 2% de matérias estranhas impurezas e fragmentos e 18% de grãos avariados, com no máximo 6% de grãos ardidos e brotados (percentagem em peso); TIPO 3 - constituído de milho seco, são, de grãos regulares e com umidade máxima de 14,5% com tolerância máxima de 3% de matérias estranhas impurezas e fragmentos e 27% de grãos avariados, com no máximo 10% de grãos ardidos e brotados (BRASIL, 1976).Um lote de grãos de milho que, pelas suas características, não se enquadrar em nenhum dos tipos descritos será classificado como Abaixo do Padrão - AP e, contanto que este apresente bom estado de conservação, o milho classificado como AP poderá, conforme o caso, ser rebeneficiado, eliminando alguns defeitos e podendo se enquadrar num dos tipos anteriores (BRASIL, 2006). Além disso, será desclassificado todo o milho que apresente mal estado de conservação, aspecto generalizado de mofo e ou fermentação, sementes de mamona ou outras que possam ser prejudiciais à utilização normal do produto, odor estranho, de qualquer natureza, impróprio ao produto e prejudicial à sua utilização normal (BRASIL, 1976).

São considerados como grãos avariados os grãos ou pedaços de grãos, chochos (enrugados por deficiência de desenvolvimento) e imaturos, os atacados por animais,

roedores e parasitas, os fermentados até ¼ (um quarto) do tamanho do grão bem como os prejudicados por diferentes causas. E segundo a portaria n°11, de 12 de abril de 1996 do Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (BRASIL, 1996), para os grãos fermentados até ¼ , considerar como fermentado até ¼ , o grão que apresentar pontos de coloração escura, de qualquer tamanho, desde que sejam visíveis a olho nu, em até ¼ da área do grão, e reiterando que ¼ de área do grão do milho corresponde aproximadamente a área do germe. São classificados como grãos ardidos, todos aqueles que possuem pelo menos um quarto de sua superfície com descolorações, cujo matiz pode variar de marrom claro a roxo (principalmente por ataque do fungo *Stenocarpella maydis*) ou de vermelho claro a vermelho intenso (principalmente pelo ataque do fungo *Fusarium verticillioides*), porém para mensuração visual da área atingida, considerar como mais de ¼ de grão fermentados ou ardido, o grão alterado em sua cor ou visivelmente fermentado em toda a área do germe e mais qualquer parte do endosperma, e também serão considerados como ardidos devido a semelhança de aspecto, os grãos queimados, ou seja, aqueles que apresentarem alteração na coloração normal por ação de altas temperaturas dos secadores. Os grãos ardidos em milho são o reflexo das podridões de espigas, causadas principalmente pelos fungos presentes no campo e esses fungos podem ser divididos em dois grupos: aqueles que apenas produzem grãos ardidos; e aqueles que, além da produção de grãos ardidos, são biossintetizadores de micotoxinas (BRASIL, 2005).

Os grãos de cereais, inclusive o milho, podem ser danificados por fungos em duas condições específicas, em pré-colheita e em pós-colheita, durante o beneficiamento, o armazenamento e o transporte, gerando a formação de grãos mofados ou embolorados (BRASIL, 2005).

Além dos problemas na aparência dos grãos, os fungos podem causar perdas de nutrientes, como degradação das matérias graxas e consequente rancificação, reduções nos conteúdos de carboidratos, de proteínas e de açúcares totais, perda das características sensoriais, dificultar o aproveitamento industrial dos grãos e seus subprodutos, causar aquecimento da massa de grãos, e dependendo das cepas presentes, promover a produção de micotoxinas. É importante ressaltar que a presença do fungo toxigênico não implica necessariamente na produção de micotoxinas, as quais

estão intimamente relacionadas à capacidade de biossíntese do fungo e das condições ambientais existentes, como a alternância das temperaturas diurna e noturna em algumas regiões (PUZZI, 1999; BRASIL, 2005).

Segundo Jarvis (1971) a produção de micotoxinas em um substrato como os grãos é dependente de fatores físicos, tais como, temperatura, aeração, luz, danos mecânicos, tempo de armazenamento, existência de regiões quentes na massa de grãos, produzidas pelo desenvolvimento de insetos e microrganismos; fatores químicos como a composição do substrato, pH, presença de fungistáticos ou fungicidas, teor de O_2 e CO_2 do ambiente; fatores biológicos como linhagem toxigênica, quantidade de esporos viáveis, competição microbiana, degradação microbiana e presença de insetos. Bullerman et. al. (1984) acrescentam a estes fatores a presença de danos em grãos, a ocorrência de estresse no vegetal e a resistência genética da variedade plantada.

Segundo Cole e Cox (1981) existiam, naquela época, aproximadamente 300 substâncias reconhecidas como micotoxinas. Entretanto, segundo estimativa do CAST - Council for Agricultural Science and Technology (2003) deve existir de 20.000 a 300.000 micotoxinas.

Os sinais e sintomas das micotoxicoses vão desde lesões de pele, sintomas de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hematoxicidade ou genotoxicidade, podendo chegar à morte. As micotoxinas podem ainda apresentar efeitos mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos e imunossupressores (COLE; COX, 1981; CAST, 2003).

A severidade das micotoxicoses depende da toxidez da micotoxina, da extensão da exposição, idade, estado nutricional individual e possíveis efeitos sinérgicos de outros agentes químicos para os quais o indivíduo foi exposto (PERAICA et. al., 1999).

As aflatoxinas são as micotoxinas mais estudadas devido ao seu potencial tóxico e por serem a primeira micotoxina identificada no mundo. As aflatoxinas são produzidas na natureza por *Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, sendo elas as aflatoxinas do tipo B_1, B_2, G_1, e G_2, com as letras ‘B’ e ‘G’ se referindo a coloração azul (blue) e verde (green) produzidas sob luz UV em cromatografia de camada delgada, enquanto os números 1 e 2 referem-se a posição das mesmas em desenvolvimento em placa de cromatografia de camada delgada (PITT; HOCKING,

1997). Dentre os estudos sobre os efeitos de fatores físicos sobre a produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* verifica-se que este a produz numa faixa de temperatura entre 13-37ºC e com atividade de água (Aa) acima de 0,82 Aa, com condições ótimas entre 16-31ºC e 0,95-0,99 Aa (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF, 1996).

Danos agudos na estrutura e funcionalidade do fígado, o principal órgão afetado pelas aflatoxinas, têm sido relatados e reproduzidos experimentalmente na maioria dos animais de laboratórios e em várias espécies de animais domésticos, entretanto dados clínicos sobre aflatoxicoses em humanos ainda são limitados, embora haja ampla evidência de exposição em grupos de populações humanas em diversas partes do mundo (CULLEN; NEWBERNE, 1994).

Além das aflatoxinas do tipo B (AFB_1 e AFB_2) e G (AFG_1 e AFB_2), a aflatoxina M_1 (AFM_1) é um potente hepatocarcinógeno, que é excretado no leite de vacas que tenham se alimentado com rações e silagens contaminadas com AFB_1, que são absorvidas pelo trato gastrointestinal dos animais e biotransformadas no fígado principalmente, por diversas vias, mas principalmente por epoxidação e hidroxilação (GERMANO; GERMANO, 2003).

A presença de aflatoxinas é relatada nos mais diversos tipos de produtos agrícolas, entretanto o milho mostra ser o cereal aonde esta micotoxina é mais frequentemente encontrada (CAST, 2003).

Estudos realizados no Brasil e no exterior constataram o milho e produtos derivados como principal substrato aonde as aflatoxinas podem ser encontradas (ALI et. al., 1998; MACHINSKI et. al., 2001; SCUDAMORE; PATEL, 2000; VAN DER WESTHUIZEN et. al., 2003).

2.2 Alternativas para o controle do desenvolvimento fúngico

O problema do crescimento fúngico e da deterioração causada por fungos pode surgir tanto no campo ou pré-colheita, como no armazenamento e distribuição ou pós-colheita. (SAUER, 1992).

A cultura do milho é muito vulnerável à ocorrência de pragas e de doenças em grãos recém-colhidos e armazenados, pois o processo de infecção pelos fungos nos grãos começa ainda no campo, principalmente durante a fase de maturação fisiológica, e prossegue nas etapas seguintes de colheita, secagem, armazenamento, transporte e processamento, demandando monitoramento constante (LAZZARI, 1997).

Os fungos de campo, como são chamados, invadem as plantas durante seu desenvolvimento e podem causar diversos problemas para os grãos, como perda da cor natural ou brilho e assim reduzir seu valor comercial, além de serem levados para o armazenamento, aonde podem também se desenvolver caso encontrem condições favoráveis. Os principais representantes dessa classe são os gêneros: *Alternaria, Cladosporium, Fusarium* e *Helmintosporium,* e requerem grãos com alta umidade (> 20%) para se multiplicarem, enquanto os fungos de armazenamento, representados principalmente pelos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, são os que proliferam com maior frequência nos armazéns e silos, e têm a capacidade de viver associados a grãos com teor de umidade mais baixo (13 a 13,5%) e temperaturas mais elevadas (25°C). Os principais fatores que afetam a atividade dos fungos nos grãos armazenados são: umidade, temperatura, taxa de oxigênio, danos mecânicos, impurezas e ataque de insetos. A infestação de insetos provoca danos ao tegumento dos grãos, produz gás carbônico (CO_2) e água (H_2O), contribuindo para o aumento do teor de umidade, que por sua vez, aumenta a respiração dos grãos e, consequentemente, a temperatura, facilitando a multiplicação dos fungos (BRASIL, 2006).

A fase pré-colheita no milho compreende o período que vai da maturação fisiológica, caracterizada pelo surgimento da “camada preta” (grão com cerca de 32% de umidade) até a realização da colheita, que quando é realizada logo após a fase da maturação fisiológica, propicia o mais alto rendimento de grãos, entretanto, não é recomendável colher nessa fase, pois os grãos ainda estão com alto teor de umidade

(32%), requerendo a secagem complementar por métodos artificiais resultando num excessivo consumo de energia e com a possibilidade de comprometer a qualidade dos grãos, provocando-lhes quebras e trincas, devido a secagem e tornando-os mais vulneráveis a serem atacados por insetos (gorgulhos e traças), além disso, pássaros, chuva e ventos contribuem para aumentar as perdas e causar atraso na colheita. A ocorrência de chuva na pré-colheita, com a consequente penetração de água na espiga, é a principal causa de perdas, portanto para o aumento da produtividade, é necessário um aprimoramento no processo de colheita e nas condições de armazenagem de grãos (SANTOS, 2006).

As podridões da espiga (PEs), que originam os grãos ardidos, caracterizados por sintomas de descoloração devida à infecção de fungos, são as principais responsáveis pela baixa qualidade dos grãos, especialmente na região Sul, onde as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento da doença (PEREIRA, 1995).

A prevenção contra a infecção dos grãos de milho por fungos produtores de grãos ardidos deve levar em consideração um conjunto de medidas, como a utilização de cultivares de milho com grãos mais resistentes aos fungos dos gêneros *Fusarium* e *Stenocarpella*, a realização de rotação de culturas com espécies de plantas não suscetíveis aos fungos dos gêneros *Fusarium* e *Stenocarpella*, interrupção do monocultivo do milho utilizando a rotação de culturas, controle das plantas daninhas hospedeiras dos fungos do gênero *Fusarium*, uso de sementes de alta qualidade sanitária, evitar altas densidades de plantio, utilização de cultivares de milho com espigas que dobram para baixo após a maturidade fisiológica dos grãos, não colher espigas atacadas por insetos, pássaros e roedores, não colher espigas de plantas tombadas, não retardar a colheita dos grãos, e realizar o enterramento de restos de culturas de milho infectados com fungos causadores de grãos ardidos (BRASIL, 2005).

Trento et. al. (2002), avaliaram o efeito de sistemas de rotação de culturas, de monocultura e de densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho (*Zea mays*), e a maior incidência de grãos ardidos ocorreu em monocultura, com média de 10,02%, enquanto sob rotação de culturas a média foi de 4,81%, além disso, a incidência de grãos ardidos foi maior, à medida que a densidade de plantas aumentou para os dois sistemas.

No Brasil, a prática de armazenagem de milho a granel nas fazendas não era muito utilizada, todavia com a evolução tecnológica da cultura do milho, os agricultores, em grande parte, já colhem o milho a granel, e como no pico da safra, o preço tende a reduzir, acaba por criar um problema de comercialização. Desta forma, os silos situados nas fazendas, embora simples e de baixo custo, devem permitir a adoção de boas práticas de armazenagem, como a aeração e o controle de pragas, seja pelo expurgo com fosfina ou outro método, como aplicação direta de inseticida registrado para esta finalidade. A aeração tem por objetivo renovar o ar no interior da massa de grãos, mantendo a temperatura entre os grãos e a umidade dos grãos dentro da faixa ideal, e desta forma uniformizando a temperatura no interior do silo, a fim de evitar pontos de aquecimento e concentração de umidade, o que promove como consequência o desenvolvimento de fungos e produção de micotoxinas. O expurgo com fosfina tem por objetivo o controle de insetos-pragas de grãos armazenados evitando perdas em peso e em qualidade. (SANTOS, 2004).

A armazenagem na fazenda permite ao produtor ter maior controle na comercialização de seu milho, postergando a venda para obter preços melhores, ou ao produtor como manter seu estoque de grãos para uso contínuo da propriedade ração para suínos e/ou para aves (SANTOS, 2006).

Cerca de 70% do milho produzido no mundo e entre 70% e 80% do milho cultivado no Brasil são consumidos na cadeia produtiva de suínos e aves (SILVA, 2007; GARCIA et. al., 2008).

Os métodos empregados para *evitar* a ação da microflora fúngica, nos grãos armazenados, consistem em manter o teor de umidade, temperatura e taxa de oxigênio em níveis desfavoráveis para o desenvolvimento de mofos e bolores (PUZZI, 1999).

Como alternativa à secagem, os grãos podem ser protegidos da infecção e do desenvolvimento fúngico por tratamento com determinados produtos químicos inibidores fúngicos. Estes produtos químicos têm sido largamente utilizados há muitos anos em uma enorme variedade de produtos, tais como produtos alimentares forneados, queijos, massas refrigeradas e alimentos para animais e na maioria dos casos, mesmo em pequenas quantidades, os sais dos ácidos propiônico e sórbico propionato e sorbato, são adicionados para prorrogar o prazo de validade ou proteger

cereais e seus produtos, que podem ser armazenados em segurança, mesmo com teores mais altos de umidade. Uma grande mudança na tecnologia de usar inibidores fúngicos ocorreu no final dos anos 60, quando o propionato começou a ser comercializado para preservação de cereais com alta umidade, ou seja, esse tratamento era utilizado não apenas para grãos com conteúdos de umidade na faixa de 14-18%, mas também para aqueles com 30% ou mais de umidade. A prática começou na Europa e no início dos anos 70 foi utilizada no Canadá e nos Estados Unidos. O ácido propiônico é um dos compostos mais comumente utilizados e é aplicado ao grão na forma pura ou numa mistura contendo ácido acético, ácido isobutírico, formaldeído ou outros materiais. O ácido é tipicamente borrifado nos grãos que são então armazenados. As doses variam de acordo com o teor de umidade dos grãos e em certa medida, com os tempos de armazenamento esperados. Algumas das doses de aplicação típicas, expressas em percentagem para certos teores de umidade, são 0,3-0,6% no teor de umidade 18%, 0,5-0,8% em 22%, 0,6-1,0% em 26%, e 0,8-1,2% em 30%. Os agricultores que utilizam tratamento ácido citam vantagens sobre outros vários métodos de manejo de grãos, pois muitos sentem que manter a alta umidade do grão é melhor do que secar o grão para alimentar animais, especialmente os ruminantes, seja em termos de eficiência de alimentação, taxa de ganho, ou ambos (SAUER, 1992).

O uso de ácidos orgânicos e seus sais são amplamente difundidos como uma forma de proteger matérias-primas e rações destinadas à alimentação animal contra a contaminação fúngica e bacteriana (LIN; CHEN, 1995; GOULD, 1996; ALBUQUERQUE et. al., 1998, GUYNOT et. al., 2005). O uso da mistura de ácidos orgânicos e seus sais possibilitam baixos níveis de inclusões com médio prazo de efetividade na proteção contra bolores e leveduras (SAVARD et. al., 2002). Entre os ácidos e sais comumente utilizados estão o ácido propiônico, o ácido acético, o ácido lático, o propionato de cálcio, acetato de sódio e sorbato de potássio (SUHR; NIELSEN, 2004; NAZER et. al., 2005).

Um antifúngico ideal para grãos deve ser barato, não-corrosivo, com baixa toxicidade animal, e ter boas propriedades antifúngicas. Os inibidores disponíveis para utilização prática são principalmente ácidos orgânicos como os ácidos propiônico, acético, benzóico, sórbico e o ácido fórmico, e suas eficácias são dependentes do pH e

da taxa de umidade do substrato, por exemplo, o benzoato de sódio tem uma atividade máxima na faixa de pH de 2,5-4,0, o ácido sórbico é mais eficaz do que o benzoato de sódio em pH >4,0 e o ácido propiônico e o cristal de violeta foram mais eficientes em retardar o crescimento de *Aspergillus spp*. do que o sulfato de cobre e o propionato de sódio (LIN; CHEN, 1995).

Desde Segunda Guerra Mundial, práticas agrícolas tradicionais têm sido substituídas pela utilização de produtos químicos sintéticos para controle de patógenos, pragas e plantas daninhas, e este foi, sem dúvida, um grande avanço e gerou uma maior produção de culturas, porém com certa deterioração da qualidade ambiental e da saúde humana (CUTLER; CUTLER, 1999).

A busca de substitutos para estes produtos encontra nas plantas uma alternativa de interesse econômico e ecológico bastante promissor. O uso de extratos vegetais e óleos essenciais, por exemplo, têm sido fonte de inúmeras pesquisas que validam sua eficácia (HERNANDEZ et. al., 1998; MORAIS, 2004; OWOLADE et. al., 2000; SOUZA et. al., 2002; BATISH, et. al., 2008)

2.3 Emprego de extratos vegetais ou óleos essenciais no meio agrícola

Dentre as diferentes alternativas para o problema no controle dos fungos estão os produtos vegetais naturais, que são mais facilmente biodegradáveis e ecologicamente sustentáveis. Estes produtos estão atraindo a atenção dos cientistas ao redor do mundo, pois são provenientes das plantas superiores e relativamente de amplo espectro, eficazes, econômicos e ambientalmente seguros podendo se tornar candidatos ideais para utilização como agroquímicos (MACIAS et. al., 1997; CUTLER, 1999).

As plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituíram modelos para a síntese de um grande número de fármacos. No Brasil, existem cerca de 100.000 espécies vegetais catalogadas, mas somente 8% destas foram estudadas quanto a sua química, e estima-se que apenas 1.100 espécies tenham sido avaliadas quanto às suas propriedades

terapêuticas e antimicrobianas. Dentre os produtos biologicamente ativos derivados de plantas, os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (SIQUI et. al., 2000).

Extratos vegetais são soluções concentradas, obtidas a partir de partes de plantas, como por exemplo, folhas, raízes, flores e cascas, que podem ou não passar por tratamento prévio, (como moagem, secagem, inativação enzimática) e preparados com o uso de solventes (água, etanol, metanol, hexano) ou mistura destes, e utilizados processos de extração, como maceração, infusão, decocção, digestão, percolação, CO_2 supercrítico ou outro processo de extração (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010).

Óleos essenciais são líquidos concentrados, hidrofóbicos que contém compostos aromáticos voláteis extraídos de plantas e podem ser potenciais alternativas aos agentes de controle utilizados atualmente, pois são ricos em produtos químicos bioativos, que são comumente utilizados como agentes perfumantes e de aromatização para alimentos e bebidas, porém podem ter usos mais nobres, tanto na agricultura como na indústria farmacêutica e de alimentos (ISMAN, 2000). Os óleos essenciais já foram citados por terem atividades biológicas como antifúngicos (SOLIMAN; BADEAA, 2002), antibacterianos (DORMAN et. al., 2000), como inseticidas (ISMAN, 2000) e por possuir efeitos nematicida (PANDEY et. al., 2000).

Os extratos vegetais são uma importante fonte de compostos bioativos, pois diversos compostos secundários presentes em plantas medicinais podem desempenhar funções importantes em interações planta-patógeno, através de ação antimicrobiana direta ou ativando mecanismos de defesa de plantas que venham a ser tratadas com esses compostos. Por exemplo, Bonaldo et. al. (2004) verificaram o potencial do *Eucalyptus citriodora* no controle alternativo de antracnose em pepino (*Cucumus sativus*), na indução de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo (*Sorghum bicolor*) e em cotilédones de soja (*Glycine max*). O *E. citriodora d*emonstrou possuir toxicidade sobre fungos *in vitro* e sobre conídios de *Colletotricum lagenarium*. Causando também indução de resistência local ou sistêmica em plantas de pepino. Os resultados indicaram que os extratos induziram a síntese de fitoalexinas em sorgo,

síntese de gliceolina em soja, inibição total na germinação de esporos e formação de apressórios de *C. lagenarium,* indicando potencial para induzir resistência local em pepino contra *C. lagenarium* pelo extrato aquoso de *E. citriodora*.

Os primeiros inseticidas botânicos utilizados foram a nicotina, extraída do fumo *Nicotiana tabacum*, a piretrina extraída do crisântemo *Chrysanthemum cinerariaefolium*, a rotenona extraída de *Derris* spp. e *Lonchocarpus* spp., a sabadina e outros alcaloides extraídos de *Schoenocaulon officinale* e a rianodina extraída de *Rhyania speciosa* (LAGUNES; RODRÍGUEZ 1992).

Segundo Vieira e Fernandes (1999) as principais plantas das quais são obtidas substâncias com atividade inseticida pertencem aos gêneros *Nicotiana* (*Solanaceae*), produtoras de nicotina e nornicotina; gêneros *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia* e Mundulea (*Leguminoseae*), produtoras de rotenóides, gênero *Chrysanthemum* (*Asteraceae*), produtoras de piretrinas e gênero *Azadirachta* (*Meliaceae*), produtoras de azadiractina.

Por apresentarem metabólitos secundários com significativa toxicidade, alguns autores citam trabalhos referentes à utilização de Solanáceas no controle de insetos, tais como: *Nicandra physaloides* – contra moscas (SMITH; DOWNS 1966); *Nicotiana tabacum*– contra vários insetos; *Datura stramonium* – controle da cigarrinha verde, *Empoasca kraemer*; *Lycopersicum esculentum* – folhas utilizadas para o controle da mariposa branca (GOMERO, 1994).

Economicamente, segundo Viegas Jr., (2003) o grupo mais importante de inseticidas naturais é o das piretrinas, representado por seis ésteres com estruturas químicas semelhantes que são extraídos das flores do piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). A rotenona e os rotenóides têm também sido utilizados há longo tempo como inseticidas e como anestésicos temporários, auxiliando na captura de peixes, e a partir dos anos 50, mais de 3,5 mil toneladas anuais de raízes *Derris lonchocarpus e Tephrosia spp* contendo estes inseticidas foram importados pelos EUA.

Dentre os alcalóides naturais mais importantes utilizados no controle de pragas estão a nicotina (MARICONE, 1963) e a *nor*-nicotina (MARICONE, 1981). O uso destes alcalóides iniciou-se no século XVI e atingiu 2,5 mil toneladas na metade do século XIX. Desde então a produção anual vem declinando e, atualmente, abrange cerca de 1250

toneladas de sulfato de nicotina e 150 toneladas de nicotina, em virtude do alto custo de produção, odor desagradável, extrema toxicidade a mamíferos e atividade inseticida limitada (VIEGAS JR., 2003).

Balbinot-Junior (2004) conseguiu suprimir a emergência e o crescimento de plantas de picão-preto através da aplicação de extrato aquoso de *Mucuna spp*. como herbicida de pré-emergência em vasos. O extrato de *Brachiaria plantaginea* inibiu a germinação e provocou a redução do sistema radicular de *Commelina bengalensis* sob condições de laboratório (VOLL et. al., 2004).

O neem (*Azadirachta indica A Juss.)* tem sido usado em diferentes maneiras nas pesquisas visando o controle de fitonematóides, como: cobertura do solo com folhas frescas ou secas, extratos foliares aplicados ao solo, exsudatos radiculares, pó-de-serra, cobertura de sementes com extratos ou óleo, pó de semente para aplicação no solo ou como cobertura de sementes de interesse na agricultura, tratamento de raízes de plantas por imersão em extratos foliares, e outras, sendo que esta última técnica já foi testada em várias espécies de plantas tais como tomate, berinjela, repolho, couve-flor e pimenta, com resultados muito significativos para *M. incognita, M. javanica, Rotylenchulus reniformis, Tylenchorhynchus brassicae* e outros nematóides (RAO et. al., 1997).

Trindade et. al. (2000), estudaram o efeito tóxico do extrato metanólico da amêndoa da semente de neem, obtido pelo aparelho de Soxhlet, na mortalidade de ovos e lagartas de *Tuta absoluta*, e verificaram que os extratos metanólicos da amêndoa da semente de neem causam elevada mortalidade em lagartas da traça-do-tomateiro, todavia o extrato da amêndoa da semente de neem não afeta a viabilidade de ovos e o período de incubação da traça-do-tomateiro.

Almeida et.al.(1999), avaliaram a eficácia de dez extratos vegetais de plantas da flora Paraibana no controle do inseto adulto *Sitophilus* spp, bem como as formas de aplicação diretamente sobre o inseto e por meio de *vapor*. Os extratos foram obtidos pelo método a frio com casca do fruto de *Citrus vulgaris*, sementes de *Helianthus annus*, *Piper nigrum*, folhas de *Eucalyptus* spp., *Ruta graveolens*e, *Coriandrum sativum*, flores e folhas de *Tagetes patula* e *Chrysanthemum* e flores de *Croton tiglium* e *Anthemis* spp. A avaliação da eficácia dos extratos em matar *Sitophilus* spp., foi feita

pela contagem do número de insetos adultos sobreviventes e como conclusões, pôde-se verificar que os extratos aplicados na forma de *vapor* mataram com uma eficiência de 96 a 100% os insetos adultos enquanto quando estes são aplicados diretamente sobre os insetos, não provocam mortalidade.

2.4 Utilização de extratos vegetais e óleos essenciais como antifúngicos

O uso extratos naturais de plantas como agentes de biocontrole proporciona a oportunidade de evitar conservantes químicos sintéticos, e utilizar novos materiais provenientes de fontes naturais como antifúngicos a fim de melhor conservar alimentos e rações. Extratos vegetais provenientes das mais diversas plantas, têm demonstrado possuir propriedades antifúngicas e também afetar a produção de micotoxinas (BULLERMAN,1974; GONÇALEZ, et. al. ,2003; MAHESH; SATISH, 2008; SHUKLA et. al. ,2007).

Bullerman (1974) verificou uma grande inibição na produção de aflatoxinas e no crescimento micelial de *Aspergillus parasiticus* em pães, chegando à inibição de 100% na produção de aflatoxinas com extrato etanólicos de canela a 20%.

Gonzalez et. al. (2003) avaliaram o extrato em etanol (EE) das folhas da batata originária dos Andes *Polymnia sonchifolia* conhecida como yacon e suas frações em hexano (HE), em clorofórmio (CL), em acetato de etila (EA) e em metanol (ME) sobre o crescimento e a produção de aflatoxinas B1 (AFB1) e B2 (AFB2) por *Aspergillus flavus*. Em todas as concentrações de EE, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 µg/mL e nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 µg/mL para HE, CL, EA e ME houve a inibição da produção de aflatoxinas B1 e B2. Demonstrando a possibilidade desta planta em ser uma opção para o controle da produção de AFB1 pelo fungo *Aspergillus flavus.*

Extratos metanólicos de folhas de *Acacia nilotica, Sida cordifolia, Tinospora cordifolia, Withania somnifer* e *Ziziphus mauritiana* demonstraram uma significante atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Pseudomonas fluorescens, Staphylococcus aureus* e *Xanthomonas axonopodis pv. Malvácea rume*

atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus, Dreschlera turcica* and *Fusarium verticillioides* (MAHESH; SATISH, 2008).

Shukla et. al. (2008) caracterizou a eficácia antifúngica e antiaflatoxigênica de um extrato aquoso de *Adenocalymma alliaceum* contra isolados de fungos que causam biodeterioração de grãos de cereais, sementes de leguminosas, frutas secas e ervas medicinais frescas durante o armazenamento e transporte. Foi observado que a Concentração Inibitória Mínima (MIC) e a Concentração Fungicida Mínima (MCF) dos extratos contra os dois fungos dominantes sobre o armazenamento, *Aspergillus flavus* (15,0 mg/mL e 20,0 mg/mL) e *Aspergillus niger* (17,5 mg/mL e 20,0 mg/mL) foram inferiores aquelas dos antifúngicos sintéticos Wettasul-80 (27,5 mg/mL e >30 mg/mL) e Carbendazim-50 (16,5 mg/mL e 20 mg/mL).

O efeito de extratos de hexano e clorofórmio de cascas de *Garcinia cowa* e *Garcinia pedunculata* sobre o crescimento e produção de toxinas por *Aspergillus flavus* foi estudado utilizando amendoim em pó como uma matriz de alimento. O crescimento de *A. flavus* foi completamente inibido pelos extratos de hexano e clorofórmio de G. cowa e G. pedunculata a 3000ppm, e esta foi considerada como a Concentração Inibitória Mínima (MIC). Ambos os extratos (hexano e clorofórmio) de *G. cowa* inibiram a produção de aflatoxina B1 em até 100% a uma concentração de 2000 ppm. Outra observação importante foi que a concentrações inferiores (100ppm) houve inibição pelos extratos de *G. cowa* e *G. pedunculata* e o grau de inibição da produção de aflatoxina foi maior do que o grau de crescimento fúngico (JOSEPH, 2005).

Oliveira et. al.(2007) avaliaram a atividade antioxidante e antifúngica de extratos de polpas e cascas de laranja, limão, maçã, banana, batata, berinjela, arroz e trigo e verificaram que os extratos das polpas de limão, laranja e banana e das cascas de maçã apresentaram atividade antioxidante maior que a atividade antifúngica avaliada sobre *Aspergillus flavus*, porém todos os extratos vegetais, excetuando-se a polpa da batata, puderam inibir totalmente a produção de aflatoxinas.

Extratos brutos de *Nigella sativa*, óleo de *N. sativa*, café moído e cafeína foram testados quanto a seus efeitos sobre a produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus*. O extrato bruto de *N. sativa* inibiu a produção de três tipos de aflatoxinas (B1, B2 e G1) a

uma concentração de 5% (p/v), enquanto o óleo de *N. sativa* inibiu todos os quatro tipos de aflatoxinas utilizando-se uma concentração de 3% (v/v). Entretanto, o café inibiu a produção das aflatoxinas B1, G1 e G2 a 6% (p/v), enquanto a cafeína inibiu somente a aflatoxina G1 e G2 (MARAQA, et. al., 2007).

Mahmoud (1999) estudou o efeito de cinco diferentes concentrações (2, 4, 6, 8 e 10 mg/ml) de extratos aquosos de *Lupinus albus*, *Ammi visnaga* e *Xanthium pungens* sobre o crescimento e produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus,* e verificou que todas as plantas inibiram o crescimento micelial e formação de aflatoxinas. O efeito inibitório foi proporcional a concentração aplicada e o crescimento e produção de aflatoxina aparentaram ser processos correlatos.

Souza, Araújo e Nascimento (2007) avaliaram a atividade antifúngica de diferentes concentrações dos extratos de alho (*Allium sativum* L.) e capim-santo (*Cymbopogon citratus* Stapf.) visando o controle de *F. proliferatum* em sementes de milho e observaram os efeitos dos tratamentos sobre a germinação de sementes, sanidade e desenvolvimento das plântulas. A partir de grãos de milho, foi feito o isolamento de *F. proliferatum*, que foi cultivado em meio BDA. Foram avaliados os efeitos dos extratos de alho e capim santo sobre crescimento micelial, nas concentrações 0,5%, 1,0%, 2,5%, 5,0% e 10,0%, medindo-se os diâmetros das colônias do fungo durante oito dias. Esporos de *F. proliferatum* foram imersos em soluções dos extratos, nas concentrações mencionadas, e avaliados, quanto à germinação de conídios, às 6, 12, 18 e 24 horas de imersão. Sementes de milho foram tratadas em soluções dos extratos e inoculadas com *F. proliferatum*, sendo avaliadas quanto à incidência do fungo, percentagem de germinação e incidência de tombamento e podridão do colmo das plântulas. Os extratos empregados reduziram a taxa de crescimento micelial e a germinação dos esporos, como também a incidência de *F. proliferatum* em grãos de milho. O extrato de alho, a partir da concentração 2,5%, mostrou maior eficiência em relação aos demais tratamentos. Os produtos vegetais aumentaram a germinação das sementes e também controlaram o tombamento e a podridão do colmo das plântulas de milho.

Prasad, Sahay e Masood, (1994) observaram uma completa inibição na produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* em concentrações acima de 45mg/mL do extrato das folhas de *Amorphophallus campanulatus (OL)*. A supressão no crescimento foi também bem pronunciada (81 % á 8,0 mg/mL). A eficácia do extrato do rizoma da planta comparado ao da folha foi menor. O oxalato de cálcio, um importante constituinte da 'OL', restringiu completamente o crescimento e biossíntese de toxina a uma concentração de 0,4 mg/mL.

Os chamados óleos essenciais, não são exatamente óleos e sim líquidos oleosos, menos densos que a água e com aroma e sabor muito acentuados, são sensíveis à luz, muito voláteis e insolúveis na água, dissolvendo-se bem no álcool e em óleos vegetais. Pesquisadores tem estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (BHAVANANI; BALLOW, 1992).

A toxicidade apresentada pelos óleos essenciais sobre alguns microrganismos pode ser devida à alta complexidade de sua composição química, pois a composição química de um óleo essencial varia de acordo com família da planta aromática, e uma mesma planta, porém com espécies diferentes, também produz diferentes tipos de substâncias químicas e em concentrações diferentes (BRUNETON, 1999).

Thanaboripat et.al. (2007) estudaram os efeitos de 16 óleos essenciais de plantas aromáticas para avaliar seu efeito inibitório sobre *Aspergillus flavus* IMI242684 em meio de cultura BDA. Os resultados mostraram que o óleo essencial de madeira branca (*Melaleuca cajeputi*) teve o maior poder de inibição dentre os óleos essenciais estudados, seguido pelo de canela (*Cinnamomum cassia*) e alfazema (*Lavandula officinalis*), respectivamente. Além disso, os efeitos inibitórios destes três óleos essenciais em diferentes concentrações foram examinados, e foi constatado que o óleo essencial de madeira branca em 1, 5625% (v/v) e de canela e alfazema em 50% (v/v) foram as concentrações ótimas para inibição do crescimento fúngico, e o óleo essencial de madeira branca em 25% (v/v) inibiu completamente o crescimento de *A. flavus* IMI242684 em meio BDA por 28 dias.

Singh e Tripathi (1999) avaliaram os efeitos dos óleos essenciais extraídos de diferentes partes de alguns angiospermas, tanto coletados na localidade de Gorakhpur como no mercado local, para avaliar sua fungitoxicidade contra o crescimento micelial de *Aspergillus niger* e *Curvularia ovoidea*, os dois fungos de armazenagem encontradas no blackgram (*Vigna mungo L*) (tipo de feijão comum no sul da Ásia).Os óleos essenciais de cavacos de *Cedrus deodara* e os de sementes de *Trachyspermum ammi (L.) Sprague* mostraram absoluta toxidez, inibindo completamente o crescimento micelial de ambos os fungos no estudo. A Concentração Inibitória Mínima (MIC) encontrada nos óleos de *C. deodara* e *T. ammi* foi de 1000 ppm e 500 ppm, respectivamente, nível em que foram fungicidas, e ambos os óleos mostraram um amplo espectro antifúngico inibindo o crescimento micelial de 10 e 12 dentre os 15 (todos isolados de sementes de blackgram) nas suas respectivas MICs, além disso, a fungitoxicidade dos óleos não foi destruída pela autoclavagem (15 lb/in^2 em tubos fechados 20 min) e em armazenagem (até 90 dias).

Singh et. al.(2004) analisaram por GC e GC-MS o óleo essencial de ajwain *(Trachyspermum ammi (L.) Sprague)* e revelaram a presença de 26 elementos identificados que representam 96,3% do total, sendo timol (39,1%) que foi encontrado como o principal componente junto com p-cimeno (30,8%), γ-terpineno (23,2%), β-pineno (1,7%), terpineno-4-ol (0,8%) enquanto o extrato de acetona de ajwain revelou a presença de 18 elementos identificados que representam 68,8% do total, sendo o principal componente o timol (39,1%) seguido pelo ácido oleico (10,4%), ácido linoleico (9,6%), γ-terpineno (2,6%), p-cimeno (1,6%), ácido palmítico (1,6%) e xileno (0,1%). Além disso, o óleo apresentou um amplo espectro de comportamento antifúngico contra todos os fungos testados como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus orizae*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum, Penicillium citrium, Penicillium viridicatum, Penicillium madriti*, e *Curvularia lunata* e com uma zona miceliar de inibição na concentração de 6 µL de óleo. No entanto, o extrato de acetona mostrou uma melhor atividade antioxidante em óleo de linhaça em comparação com antioxidantes sintéticos, tais como BHT e BHA.

Benjilali et. al. (1984) testaram o efeito de seis óleos essenciais em 39 espécies de fungos do gênero *Penicillium*, *Aspergillus* e outros, e o óleo de tomilho foi o mais eficiente, seguido por estragão, alecrim e eucalipto.

2.5 A cultura do eucalipto e o uso de extratos e óleos essenciais de eucalipto como pesticidas

A família *Myrtaceae Juss*. pertence à ordem *Myrtales*, e conta com aproximadamente 133 gêneros e mais de 3800 espécies (WILSON et. al. 2001), sendo tradicionalmente dividida em duas subfamílias, uma com centro de distribuição na Oceania, chamada de *Leptospermoideae*, e outra com distribuição pantropical, chamada de *Myrtoideae*. A primeira é representada por suas folhas alternas e seus frutos secos, enquanto a segunda apresenta folhas opostas e frutos carnosos (LEGRAND; KLEIN 1978). Depois de estudos com dados moleculares, o que era chamado de subfamília *Myrtoideae*, hoje é preferencialmente chamado de tribo *Myrteae*, formando um grupo filogeneticamente mais coeso (WILSON et. al. 2001).

Além da sua grande importância nos ecossistemas brasileiros, membros dessa família apresentam propriedades farmacológicas (BARROSO et.al., 2004).

Existem centenas de espécies do gênero *Eucalyptus*, no entanto, poucas são destinadas ao plantio em grande escala, por não apresentarem características comerciais desejáveis, e segundo a FAO (2005), *Eucalyptus grandis* e*. E. urophylla* são as espécies mais utilizadas no plantio extensivo, sendo que a espécie *Eucalyptus urophylla* é nativa de algumas ilhas orientais do arquipélago de Sonda, situadas ao norte da Austrália (SCARPINELLA, 2004). Existem também cultivos florestais que utilizam híbridos de espécies como, por exemplo, *E. urograndis*, que é um híbrido de *E. urophylla* e *E. grandis,* amplamente utilizado em plantios florestais em Minas Gerais e algumas espécies atingem alturas superiores a 70 m tanto que *E. grandis* pode atingir até 100 m de altura e é considerada a espécie florestal latifoliada mais alta do mundo (PRYOR, 1976).

O eucalipto começou a ser trazido para o Brasil na segunda metade do século XIX, com o objetivo de ajudar na produção de dormentes para as linhas férreas que se

instalavam no país, e a partir dessa época, o eucalipto passou a fazer parte da paisagem brasileira, ao lado de outros estrangeiros conhecidos, como o café e o trigo (do Oriente Médio), o arroz e a soja (da Ásia), o feijão, o coco, a cana-de-açúcar e gramíneas forrageiras (da África), o milho (do México) e a banana (do Caribe), como pode ser visto na tabela 1, abaixo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF, 2010).

Tabela 1.- Comparação das áreas de plantio de eucalipto com as de outras culturas no Brasil

Produtos Agrícolas	Área (ha)
Pastagens	177.500.000
Soja	16.326.000
Milho	12.096.000
Cana-de-açúcar	5.034.000
Feijão	4.186.000
Arroz	3.186.000
Plantio de eucalipto	2.499.000
Café	2.362.000

Adaptado de Silva J. C., 2003

O setor florestal já responde pela segunda posição na balança comercial do agronegócio brasileiro, e de setembro de 2002 a setembro de 2003, celulose e papel, e produtos sólidos de madeira acumularam exportações de US$ 5,1 bilhões, e estima-se que o setor florestal no Brasil seja responsável pela existência de 500 mil empregos diretos e outros 2 milhões indiretos (ABRAF, 2010).

O eucalipto possui diversas utilidades, dentre elas, a produção de celulose, que pode ser utilizada para produção de papéis diversos (impressão, cadernos, revistas), absorvente íntimo, papel higiênico, guardanapo, fralda descartável, viscose, tencel

(roupas), papel celofane, filamento (pneu), acetato (filmes), ésteres (tintas), cápsulas para medicamentos, espessantes para alimentos e componentes eletrônicos, serve como carvão vegetal para siderurgia, na construção de painéis de aglomerados de madeira, MDF, HDF, chapa de fibra e compensados, como madeira serrada para produção de móveis, na construção civil e na confecção de brinquedos, para lenha e biomassa como fontes de energia, na produção de extratos e óleos essenciais (fármacos, perfumaria, produtos de higiene e limpeza, conservantes e inseticidas), como postes e mourões, e para utilização como pasto apícola, permitindo a obtenção de mel, própolis, geleia real, pólen e outros produtos apícolas (ABRAF, 2010). Além disso, o eucalipto também remove gás carbônico (CO_2) da atmosfera, contribuindo para minimizar o efeito estufa e melhorando o microclima local, protege os solos contra processos erosivos, conferindo-lhes características de permeabilidade, aumentando a taxa de infiltração das águas pluviais e regularizando o regime hidrológico nas áreas plantadas (NOVAIS, 1996).

Os óleos essenciais isolados de *Eucalyptus* ocorrem principalmente nas folhas aonde são produzidos e armazenados em células secretoras, e seu óleo essencial é um líquido incolor ou amarelado, por vezes acastanhado ou esverdeado, fluido, com cheiro forte, aromático e de sabor picante, apresentando como principais compostos isolados, o 1,8-cineol (eucaliptol), piperitona, felandreno e aldeídos voláteis, e além disso, as propriedades medicinais e aromáticas normalmente associadas com o eucalipto são devido aos seus componentes voláteis, ou óleos essenciais, por isso, o número de compostos voláteis ultrapassa de longe o número de não-voláteis, sendo que as folhas são as partes mais frequentemente investigadas da planta, todavia constituintes interessantes também foram isolados a partir da casca e da madeira (COPPEN, 2002).

Segundo (CHAGAS et. al., 2002) no Brasil as principais espécies de eucaliptos que têm seus óleos essenciais comercializados são *E. citriodora, E. globulus* e *Eucalyptus staigeriana*

A espécie *E. staigeriana F. Muell. ex Bailey (Syn. Queensl. fl. 176. 1883)* – Lemon-scented Ironbark*, é* uma árvore de tamanho médio a pequeno, normalmente de forma pequena em seu habitat natural, que é o granito ou as encostas de arenito da Península de Cape York, no extremo norte em Queensland, Austrália. A casca é típica,

dura, preta e enrugada, a copa é conspicuamente azulada devido ao azul-esverdeado para glauco, de suas folhas adultas normalmente amplas, e as numerosas espécies “ironbark” pertencem a três grupos taxonômicos. O *E. staigeriana* é o maior grupo, que se distingue pela perda prematura do opérculo externo e dos estames, que são todos férteis. (TAYLOR; FRANCIS, 2002).O eucalipto *E. staigeriana* é uma das duas espécies que são importantes para a óleos com essência-limão, sendo a outra o *E. citriodora.* Esta espécie é cultivada para a produção de óleos ricos em citral, principalmente no Brasil, e Weiss (1997) afirma que é também produzido para tais fins na Guatemala, nas ilhas Seychelles e no antigo Zaire (agora a República Democrática do Congo) (BROOKER, 2002).

Segundo Pinto et. al., (1976) a espécie *Eucalyptus staigeríana F. Muell*. foi introduzida no Brasil em 1943, por iniciativa do Departamento de Genética do Horto Florestal da Companhia Paulista de Estradas de Ferro, em Rio Claro, SP, e sua essência possui aroma agradável a limão, sendo empregada na indústria de sabões, perfumes e cosméticos. Seu componente mais importante é o citral, mas ainda contém limoneno, geraniol, acetato de linalila e sesquiterpenos.

Vitti e Brito (2003), verificaram que dentre as aproximadamente 600 espécies de *Eucalyptus*, pouco mais de 200 já foram estudadas em relação à produção e ao rendimento do óleo volátil, e as principais espécies produtoras de óleo essencial no Brasil, considerando o rendimento foliar a partir de folhas secas, são *E. citriodora* (1,0 a 1,6%), *E. globulus* (1,7 a 5%) e o *E. staigeriana* (1,2 a 1,5%).

O monoterpeno 1,8-cineol, por ser um produto natural produzido no metabolismo secundário de plantas e ser um constituinte também do óleo essencial das folhas de várias espécies de *Eucalyptus spp*. (Myrtaceae), sua concentração nas folhas de eucalipto pode ser bem maior do que a presente no capim-gordura, variando bastante com a espécie: *Eucalyptus citriodora* (55%), *Eucalyptus globulus* (71%), *Eucalyptus punctata* (66%), *Eucalyptus maculata* (51%), *Eucalyptus maidesii* (70%) e *Eucalyptus smithii* (84%). (CHALCHAT, 1997).

Além do seu rendimento em óleo e biomassa, o fator mais importante para determinar o valor comercial de um óleo é a sua composição química, e entre a numerosa e diversificada gama de compostos encontrados nos óleos de eucalipto, o

mais importante é o éter monoterpênico 1,8-cineol, que é utilizado para medicamentos, aromas e fragrâncias e tem importantes efeitos bioativos, como repelência contra mosquitos (KLOCKE et. al., 1987), e compõe mais de 90%do óleo em algumas espécies de *E. bakeri* (BROPHY;BOLAND, 1989), *E. kochii* (GARDNER;WATSON,1947, 1948), *E. oblonga* (BAKER; SMITH, 1920), *E. plenissima* (BROOKER et. al., 1988), *E. polybractea* (BOLAND et. al., 1991), *E. sparsa* (BROPHY; LASSAK; 1986) e *E. sturgissiana* (BOLAND et. al., 1991), com a exceção de *E. polybractea*. O *E. globulus* continua a ser a principal fonte de 1,8-cineol mundialmente, embora o seu óleo contenha uma proporção menor do que o *E. polybractea* e algumas outras espécies de eucalipto.

Os constituintes mais comuns co-ocorrendo com o 1,8-cineol são o limoneno e o α-terpineol, (CROTEAU, 1987; CROTEAU et. al., 1994).

Embora os óleos de eucalipto (medicinais) a dominar a produção mundial continuem a ser do tipo cineol, (estimado por COPPEN; HONE (1992) entre 2500 e 3100 t em 1991, e por LAWRENCE (1993) em 3700 t), são também produzidos óleos com essência de limão (perfumaria). A produção mundial de óleos com citronelol por *E. citriodora* e de citral (por exemplo neral e geraniol) produzidos a partir de *E. staigeriana* foi estimado em 320t e 70 t respectivamente por Lawrence (1985). O acetato de geranil foi produzido no passado a partir das folhas e da casca de *E. macarthurii* e eram utilizados como um constituinte em fragrâncias, (LASSAK, 1988), e ainda existe um pequeno mercado para óleos ricos em piperitona e α-felandreno (p. ex. *E. dives*), pois a piperitona tem sido utilizada na síntese de mentol para aromatização e o felandreno tem sido utilizado como uma fragrância (CURTIS et. al., 1990).

Diversos estudos demonstram atividade dos extratos e dos óleos essenciais de eucalipto como pesticidas, por exemplo, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (CHAGAS et. al., 2002),com atividade inseticida sobre *Musca domestica* (HALIM; MORSY, 2005), sobre os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus (*CHENG et. al., 2009), sobre *Pediculus humanus capitis* (YANG et. al., 2004), além dos coleópteros *Acanthoscelides obtectus* (PAPACHRISTOS; STAMOPOULOS, 2004), *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* (BRITO et. al., 2006), no controle de nematóides gastrintestinais como o *Haemonchus contortus* (MACEDO et.al., 2009).

Maciel et. al. (2010), estudaram três óleos essenciais de eucalipto que demonstraram serem eficazes sobre as fases do desenvolvimento de *L. longipalpis* em laboratório. As composições foram diferentes para cada óleo, sendo os principais constituintes do óleo de *E. staigeriana* o (+) limoneno (28,82%), Z-citral (10,77%) e E-citral (14,16%); o *E. citriodora* continha b-citronelal (71,77%) e o *E. globulus* continha 1,8-cineol (83,89%), os principais componentes foram testados em outros insetos e mostraram boa atividade. O óleo de *E. staigeriana* foi o mais eficaz em todas as fases deste inseto e constitui uma alternativa viável para controle do vetor da leishmaniose visceral.

A principal praga que incide sobre os grãos armazenados do feijão *Vigna unguiculata* (L.) Walp. é o caruncho *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). Brito et. al.(2006) avaliaram os efeitos dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* Hook., *Eucalyptus globulus* Labill e *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. ex Bailey, sobre a mortalidade de adultos deste inseto, e o processo de fumigação com óleos essenciais de plantas do gênero *Eucalyptus* mostrou-se eficiente no controle de *C. maculatus*. Os Tempos Letais (TL) e as Doses Letais (DL) diminuíram conforme houve um aumento na dose aplicada de cada óleo ou no tempo de exposição do inseto, respectivamente; e o óleo de *E. citriodora* foi o mais eficiente para essa espécie de caruncho.

Macedo et.al. (2009) avaliaram o efeito do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre a eclosão e desenvolvimento de larvas de *Haemonchus contortus*, e a uma concentração de 8,3 $mg.mL^{-1}$ ele inviabilizou 50% dos ovos e a 6,92 $mg.mL^{-}1$as larvas do parasito, assim apresentando atividade ovicida e larvicida *in vitro* sobre *H. contortus*, e podendo ser uma alternativa para utilização no controle de nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos.

Efeitos larvicida de duas espécies de eucalipto, *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus urophylla*, contra duas espécies de mosquitos, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, foram revelados por Cheng et. al. (2009), e os resultados demonstraram um excelente efeito inibitório contra as duas espécies de mosquitos, além disso, dentre os constituintes dos óleos o α-terpineno demonstrou o melhor efeito larvicida.

Kohli et. al. (1998) verificaram que o óleo essencial de *E. tereticornis* e *E. citriodora* na forma de vapor reduziram significantemente a germinação da erva daninha *Parthenium hysterophorus*, tendo o *E. citriodora* sido o mais toxico e com maior potencial para ser usado como herbicida, e isso foi atribuído a variabilidade de sua constituição química.

Prates *et. al.* (1998) avaliou os efeitos do 1,8-cineol derivado de plantas do gênero *Eucalyptus* sobre insetos adultos de *T. castaneum* e *Rhyzopertha dominica* (Fab.) (Bostrichidae: Coleoptera), e este levou a mortalidade de 100% em *R. Dominica* e 58% de *T. castaneum*, podendo ser um potente aliado no combate a esses insetos.

Ahmed e Eapen (1986), examinaram o efeito dos vapores do óleo essencial de eucalipto e do cineol sobre os insetos pestes em cereais e seus produtos, *S. Oryzae, Callosobruchus chinensis (L.) (Bruchidae: Coleoptera)* e *Stegobium paniceum (L.) (Anobiidae: Coleoptera),* e estes óleos demonstraram ter um bom controle sobre as três espécies de insetos, sendo este controle maior sobre os bruchídeos do que sobre os outros insetos.

Almeida et. al. (1999) avaliaram a eficácia de dez extratos vegetais (casca do fruto de *Citrus vulgaris*, sementes de *Helianthus annus*, *Piper nigrum*, folhas de *Eucalyptus* spp., *Ruta graveolens* e *Coriandrum sativum*, flores e folhas de *Tagetes patula* e *Crysanthemum* e flores de *Croton tiglium* e *Anthemis* spp.) de plantas da flora Paraibana no controle do inseto adulto *Sitophilus* spp, em aplicação diretamente sobre o inseto e por meio de *vapor*, e sua eficácia em matar *Sitophilus* spp, foi feita pela contagem do número de insetos adultos sobreviventes. Foi verificada uma eficiência nos extratos de 96 a 100% na mortalidade sobre os insetos adultos (eucalipto 85,75%), quando aplicados na forma de *vapor*, e quando aplicados diretamente sobre os insetos, não provocam mortalidade.

Outra peste importante que ataca cereais e suas farinhas é o ácaro *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acarina: Acaridae), assim sendo, Gulati e Mathur (1995) avaliaram a ação do pó de folhas de eucalipto adicionado a farinhas de trigo em proporções entre 5 e 75% (p/p), e observaram uma relação linear entre a dosagem e o número de insetos da progenia vivos, porém mesmo na dose de 5% houve uma redução de 50% em relação ao controle. Entretanto, quando o pó de folhas a 5% foi

aplicado na farinha e grãos de milho, este pareceu não demonstrar efeitos nem sobre a eclosão dos ovos nem emergência de adultos.

2.6 Uso de extratos e óleos essenciais de eucalipto como antifúngicos

O potencial de extratos de plantas (Extratos de plantas viz. ,*Allium cepa*, trevo de *Allium sativum*, folhas de *A. indica*, *Eucalyptus terticornis*, *Ocimum sanctum*, grãos de *Annona squamosa* e *Pongamia glaberima*, rizoma de *Curcuma longa* e botões de flores de *Syzigium aromaticum* foram secas em estufa com ar quente de 4 a 7 dias à 60°C, e as plantas secas foram pulverizadas e utilizadas para tratamento de sementes) e agentes de biocontrole para a redução de aflatoxina B1 (AFB1) em arroz armazenado foi investigado. Dentre os extratos de plantas testadas, *Syzigium aromaticum* (5 g/kg) demonstrou completa inibição sobre o crescimento de *Aspergillus flavus* e produção de AFB1. *Curcuma longa, Allium sativum* e *Ocimum sanctum* efetivamente inibiram o crescimento de *A. flavus* (65 78%) e a produção de AFB1 (72,2-85,7%) na concentração de 5 g/kg (REDDY et. al., 2009).

Sharma et. al. (2009) caracterizaram o potencial antifúngico do extrato bruto de folhas de diferentes plantas contra linhagens de *Aspergillus* produtoras de aflatoxina, e 15 plantas foram usadas para a preparação do extrato aquoso bruto, 100% etanólico e 50% hidroetanólico de folhas. A técnica “poisoned food” (alimento envenenado) foi adotada para avaliar o efeito inibitório dos extratos contra o crescimento dos fungos testados, e dentre as quinze plantas testadas *Lawsonia inermis, Oreganum majorana, Adathoda vasica, Emblica officinalis, Eucalyptus globulus, Euphorbia pulcherima, Murraya koenigii, Azadirachta indica* e *Phycus elasticus* deram uma significativa inibição sobre o crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

Satish et. al., (2007) estudaram os extratos aquosos de cinquenta e duas plantas de diversas famílias para avaliar suas características antifúngicas contra oito importantes espécies de *Aspergillus,* como *A. candidus, A. columnaris, A. flavipes, A. flavus, A. fumigatus, A. niger, A. ochraceus* e *A. tamarii* isoladas de sementes de sorgo, milho e arroz. Os fungos testados foram principalmente os associados com a biodeterioração de sementes durante o armazenamento, e entre as cinquenta e duas plantas testadas,

os extratos aquosos de *Acacia nilotica, Achras zapota, Datura stramonium, Emblica officinalis, Eucalyptus globulus, Lawsonia inermis, Mimusops elengi, Peltophorum pterocarpum, Polyalthia longifolia, Prosopis juliflora, Punica granatum*e *Sygigium cumini* apresentaram importantes atividades antifúngicas contra uma ou todas as espécies de *Aspergillus* testadas, tendo o *A. flavus* registrado uma alta suscetibilidade, e daí em diante os extratos dos solventes éter de petróleo, benzeno, clorofórmio, metanol e etanol, de todas as doze plantas, foram testados para avaliar sua antifúngica. Entre os extratos testados, o solvente metanol se mostrou mais eficaz do que o etanol, o clorofórmio, o benzeno e o éter de petróleo, exceto para o extrato de *Polyalthia longifolia*, aonde o éter de petróleo registrou uma atividade antifúngica altamente significativa em relação aos outros solventes.

Foi realizado um estudo por Ramezani et. al. (2002) para explorar o efeito dos óleos voláteis de *Eucalyptus citriodora* e seu principal constituinte o citronelol contra dois conhecidos patógenos, do arroz *Rhizoctonia solani*e *Helminthosporium oryzae.* O crescimento radial e peso seco de ambos os fungos foram drasticamente reduzidos em resposta aos voláteis dos óleos, e uma completa inibição de *R. solani* e *H. oryzae* foi observada em 10 e 20 ppm, respectivamente, e o citronelol sozinho foi mais eficaz do que os óleos de eucalipto.

Num outro estudo de Lee et. al. (2007), um total de 39 óleos essenciais foram testados para as atividades antifúngicas de seus compostos voláteis contra cinco fungos fitopatogênicos em uma dose de 1 µl por placa, e os cinco óleos essenciais mostraram atividades inibitórias contra o crescimento micelial de pelo menos um fungo fitopatogênico. O óleo essencial de *Origanum vulgare* inibiu o crescimento micelial de todos os cinco fungos testados, os óleos de *Cuminum cyminum* e *Eucalyptus citriodora* demonstraram atividades antifúngicas *in vitro* contra quatro dos fungos fitopatogênicos, a exceção foi *Colletotrichum gloeosporioides*, e o óleo essencial de *Thymus vulgaris* suprimiu o crescimento micelial de *C. gloeosporioides, Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* e o óleo de *Cymbopogon citratus* foi efetivo apenas para *F. oxysporum*.

O efeito inibitório de fumos de fezes de bovinos (cowdung), Captana, pó de folhas de *Withania somnifera*, *Hyptis suaveolens*, *Eucalyptus citriodora*, pó de casca de

Citrus sinensis, Citrus medica e *Punica granatum*, torta de neem e pongamia, e suspensão de esporos de *Trichoderma harzianum* e *Aspergillus niger* foi investigado sobre a produção de aflatoxina B1 por cepas toxigênicas de *Aspergillus flavus* isoladas de sementes de soja, e todos os tratamentos com os produtos naturais aplicados foram significativamente eficazes, e demostraram atividade inibitória sobre a produção de Aflatoxina B1em sementes de soja por *A. flavus* (KRISHNAMURTHY; SHASHIKALA, 2006).

Jayashree e Subramanyam (1999) estudaram as propriedades do eugenol, e este inibiu a produção de aflatoxina pelo *Aspergillus parasiticus NRRL 2999* dose-dependentemente, em uma concentração acima de 0,75 $mmol.L^{-1}$, sem inibir o seu crescimento, e quando o mofo cresceu por 3 dias na presença de 0,45$mmol.L^{-1}$de eugenol, este inibiu a produção de aflatoxina em 50%. As atividades *in vivo* dos componentes de monoxigenase polisubstrato diminuíram na idiofase, concomitantemente com as atividades enzimáticas envolvidas com a remoção de radicais livres, peroxidação lipídica e manutenção do potencial redox, indicando que a ação antiaflatoxigênica do eugenol deve estar relacionada à inibição dos passos ternários na biossíntese de aflatoxina envolvendo peroxidação lipídica e oxigenação.

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.*

Vilela et. al. (2009) realizaram um trabalho que avaliou o efeito do óleo essencial de *E. globulus* contra espécies fúngicas 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, aonde foi elaborada uma solução contendo o composto 1-8-cineol e o solvente dimetilsulfóxido. As placas para ambos os modos de ação, foram incubadas 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 e foi observado 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 e nem inibição total na produção de aflatoxinas.

Su et. al. (2006), extraíram os óleos essenciais de quarto espécies de eucaliptos, *E. urophylla, E. grandis, E. camaldulensis,* e *E. citriodora por hidrodestilação* e testou contra *Aspergillus clavatus (ATCC 1007), A. niger (ATCC 6275), Chaetomium globosum (ATCC 6205), Cladosporium cladosporioides (ATCC 13276), Myrothecium verrucaria (ATCC 9095), Penicillium citrinum (ATCC 9849),* e *Trichoderma viride (ATCC 8678),* e o óleo de *E. citriodora* demonstrou o melhor resultado contra os fungos testados enquanto *E. urophylla*, demonstrou o pior resultado nos testes. O resultado foi atribuído aos monoterpenos oxigenados como citronelal e citronelol que foram particularmente efetivos contra as atividades fúngicas.

2.7 Métodos de obtenção de extratos vegetais visando obtenção de antifúngicos

A obtenção de extratos vegetais com o intuito de se obter substâncias biologicamente ativas como antioxidantes, antimicrobianos e anticarcinógenos é um trabalho de prospecção e de tentativas e erros. Conforme observado por Pettit e Cragg (1978) “O isolamento de compostos bioativos é quase sempre cheio de percalços e cada passo requer julgamento, improvisação e descoberta”.

A prática padrão na química para o isolamento de produtos naturais de plantas visando à descoberta de drogas pode ser discriminada em cinco etapas, que são a coleta do organismo, extração, isolamento do composto, determinação da estrutura e bioensaio. As plantas são identificadas taxonomicamente e extraídas com os solventes de escolha e os extratos resultantes são então selecionados contra alvos farmacologicamente relevantes. Uma vez que um resultado positivo é alcançado, os estudos de isolamento continuam, sendo guiados pelos estudos dos bioensaios mais relevantes (BAHAR et. al., 2008).

A escolha dos processos de extração e qual solvente utilizar é o passo inicial para o processo de isolamento de compostos bioativos, na literatura tem-se visto utilizar diversos processos e solventes com o objetivo de se obter produtos antifúngicos, como por exemplo, a utilização de extratos aquosos (SATISH et. al., 2007; MAHMOUD, 1999; SHUKLA et. al., 2007), extratos aquosos, etanólicos e hidroetanólicos (SHARMA et. al., 2009), extratos hexânicos e clorofórmicos (JOSEPH, 2005), extratos de acetato de etila e hexano (ALINEZHAD et. al., 2010) extratos metanólicos (MAHESH; SATISH, 2008) e extratos etanólicos (GONÇALEZ, et. al., 2003), a utilização de extrator de Sohxlet (DIKBAS et. al., 2008; BENNY et. al., 2010), pulverização e agitação em erlenmeyers (ALINEZHAD et. al., 2010), pulverização e repouso deixando somente a difusão agir (PUNDIR; JAIN; SHARMA, 2010), além de outros métodos e solventes.

Takahashi, Kokubo e Sakaino. (2004), investigaram as propriedades de extratos de 26 espécies de *Eucalyptus* e os extratos foram preparados a partir de 10g de folhas, que foram secas à vácuo, imersas em 200 mL de uma solução (1:1) de metanol-diclorometano a temperatura ambiente, deixados em repouso por 2 dias e então separados por filtração e concentrados gerando assim os extratos. Os extratos de *Eucalyptus globulus, E. maculata* e *E. viminalis* inibiram significantemente o crescimento de seis bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, MRSA, *Bacillus cereus, Enterococcus faecalis, Alicyclobacillus acidoterrestris, Propionibacterium acnes*) e do fungo (*Trichophyton mentagrophytes*), mas não mostraram atividade antibactericida contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli, Pseudomonas putida*).Os compostos 2’,6’-dihidroxi-3’-metil-4’-metoxi-dihydrochalcona, eucaliptina e 8-desmetil-eucalyptina, isolados dos extratos de *E. maculata* exibiram atividades antimicrobianas contra sete microorganismos com sua Concentração Inibitória Mínima (MIC) variando entre 10 e 31 mg/L.

Celoto et. al. (2008) avaliou o efeito fungitóxico de extratos vegetais de 22 espécies de plantas, obtidos a partir de plantas secas e moídas, utilizando-se de água e etanol como meio extrator, sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*. Os extratos foram avaliados por meio da incorporação de 20% do extrato em meio BDA, antes ou após a autoclavagem do mesmo. Verificou-se que os extratos hidroetanólicos proporcionaram a maior inibição do crescimento

micelial de *C. gloeosporioides*, enquanto a maior inibição da germinação foi obtida com os extratos aquosos. Os extratos não auto clavados foram mais eficientes na redução do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* que os extratos auto clavados, e os extratos aquoso e hidroetanólico de melão-de-são-caetano e o extrato hidroetanólico de eucalipto proporcionaram maiores inibições do crescimento micelial. Os extratos aquosos de *Luffa acutangula* , *Eucalyptus citriodora*, *Chenopodium ambrosioides* e *Bauhinia*, e os extratos hidroetanólicos de *Ruta graveolens*, *Eucalyptus citriodora, Zingiber officinale* e *Chenopodium ambrosioides* inibiram mais de 90% da germinação de esporos.

Souhaili et. al. (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes extratos da alga marinha *Cystoseira tamaricifolia* e sobre o crescimento de bolores e leveduras, e formação de micotoxinas. Os extratos etanólicos proporcionaram uma inibição total (100%) sobre todas as espécies a uma concentração de 10%. O extrato aquoso demonstrou atividade somente sobre algumas linhagens utilizadas, e nenhuma atividade foi observada sobre bolores e leveduras nos extratos aquosos e metanólicos. Os extratos de clorofórmio e hexano não demonstraram nenhuma atividade antimicrobiana. A formação de micotoxinas por *Aspergillus flavus* foi inibida pelos extratos etanólicos a 5%.

Mahmoud, (1999) estudou o efeito de cinco diferentes concentrações (2, 4, 6, 8 e 10 mg/ml) de extratos aquosos de *Lupinus albus*, *Ammi visnaga* e *Xanthium pungens* sobre o crescimento e produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus*. Os extratos foram preparados a partir das folhas das plantas, que após serem lavadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 2% e água destilada estéril, foram postas em um liquidificador na proporção de 20g de folhas para cada 100mL de água destilada, logo depois de filtradas e utilizadas para os testes. Todas as plantas apresentaram atividade antifúngica proporcional à concentração utilizada, com o extrato aquoso de *Lupinus albus* demonstrando o melhor resultado.

Rosal et. al. (2009) avaliaram o efeito do extrato aquoso de folhas de *Salvia officinalis L.,* sobre o desenvolvimento micelial e esporulação do fungo *Penicillium sp*. O extrato foi preparado a partir da infusão de folhas secas de sálvia adicionando-se de 200 mL de água destilada a 100ºC sobre 40 g de folhas secas de

sálvia em recipiente fechado por 15 minutos após os quais foram adicionados em meio de cultura BDA nas concentrações de 0%; 20%; 40% e 80% (v/v). Foi verificada eficácia dos extratos de sálvia à medida que foi aumentada a concentração do extrato aplicado ao meio de cultivo, reduzindo-se o crescimento micelial a zero, na concentração 80% após 144 horas de incubação.

Satish et. al.(2007) estudaram o extrato aquoso de cinquenta e duas plantas de diversas famílias para avaliar suas características antifúngicas contra oito importantes espécies de *Aspergillus* incluindo o *A. flavus*. Os extratos foram preparados da seguinte forma: Para os extratos aquosos, 100g de todas as folhas foram lavadas, secas e maceradas com 100 mL de água destilada num liquidificador por 10min, logo após foram filtradas e então centrifugadas a 4000g por 30min. O sobrenadante foi filtrado em filtro Whatmann Nº1 e esterilizados a 120ºC por 30 min., servindo como extrato mãe. Para os extratos com os solventes, após as folhas serem lavadas, estas foram secas a sombra e então pulverizadas em um liquidificador, 25g do pó foram colocados em para extração sucessiva com éter de petróleo, benzeno, clorofórmio, metanol e etanol em um extrator de Sohxlet por 48h, logo após, foram concentrados em rotaevaporador e mantidos a 5ºC em vidro âmbar ate o momento do uso. Dentre os extratos testados, o solvente extrator metanol se mostrou mais eficaz do que o etanol, seguido pelo clorofórmio, o benzeno e o éter de petróleo, tendo o *A. flavus* registrado uma alta suscetibilidade aos extratos testados.

3.Materiais e Métodos

3.1 Obtenção das folhas de eucalipto

As folhas de *Eucalyptus staigeriana*, figura 01, foram obtidas de representantes da espécie cultivados no talhão 07 e 29, experimento 41, no horto florestal do Departamento de Ciência Florestal da Esalq/USP, localizado em Itatinga-SP . O material foi colhido no dia 19 de novembro de 2010 e enviado imediatamente ao laboratório de Micotoxinas e Micologia, do Departamento de Agroindústria, Alimentos e

Nutrição da Esalq/USP, para preparo dos extratos e avaliação da capacidade antifúngica.

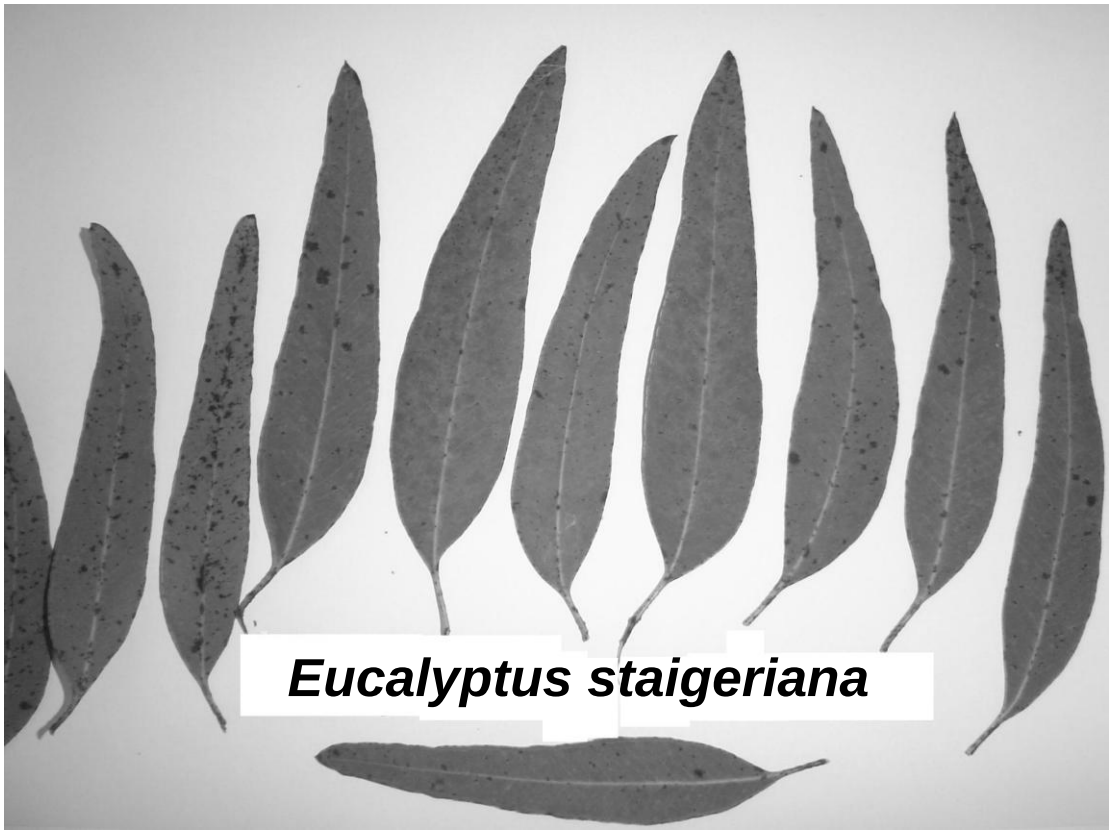

Figura 1 - Foto com folhas da espécie *Eucalyptus staigeriana*

As folhas recebidas no laboratório foram processadas como descrito no item a seguir.

3.2 Preparo do material para extração

As folhas coletadas foram empregadas para extração utilizando-se três procedimentos:

A) Folhas frescas – as folhas coletadas foram armazenadas, acondicionadas em sacos plásticos, sob refrigeração por três dias até o preparo dos extratos.

B) Folhas liofilizadas – as folhas coletadas foram congeladas em freezer a -18°C por 24h e colocadas em um liofilizador (Liptop, modelo L101), operando a -45°C e a

pressão de vácuo de 120mm de Hg, por aproximadamente cinco dias. Após isto, as folhas foram armazenadas acondicionadas em recipientes plásticos à -18ºC até o preparo dos extratos.

C) Folhas secas ao ambiente – as folhas coletadas, que estavam inicialmente com uma Aa=0,897, foram desidratadas até atividade de água aproximada de 0,500. A desidratação foi processada, ao abrigo da luz solar e a temperatura ambiente, que apresentou-se variando entre 23 e 32°C e a umidade relativa entre 37 e 70%. Decorrido o período (9 dias) para atingir-se a atividade de água desejada, as folhas foram armazenadas acondicionadas em recipientes plásticos em refrigerador até o momento de serem utilizadas.

3.3 Metodologia de preparo dos extratos

3.3.1 Obtenção dos extratos sobre folhas frescas, liofilizadas e folhas secas no ambiente

Cinco gramas de folhas (frescas, liofilizadas ou folhas secas no ambiente) de eucalipto foram transferidos para um copo de liquidificador (Oster, mod.6805) de capacidade de 200 mL e 25 mL do solvente extrator foi adicionado para as folhas frescas (FF) e 50 mL para as folhas liofilizadas (FL) e secas no ambiente (FS). Os solventes extratores avaliados foram Metanol P.A., Etanol P.A. e Água destilada. Após o tempo em liquidificador (1 min.), todo o material foi transferido para um erlenmeyer de 250 mL para prosseguir com a extração. Todas as extrações foram realizadas sob agitação mecânica e no caso da água a extração prosseguiu com agitação em temperatura ambiente e sob banho-maria mantido a 60°C. Para cada solvente avaliado 3 repetições de extrações foram realizadas simultaneamente. A separação dos extratos do material sólido residual foi realizada por filtração utilizando papel de filtro de poros de tamanho de 3 µm, diâmetro de 12,5 cm e gramatura de 80 g/m^{2}. O extrato filtrado obtido foi armazenado em tubo de centrífuga plástico sob refrigeração até o momento da utilização.

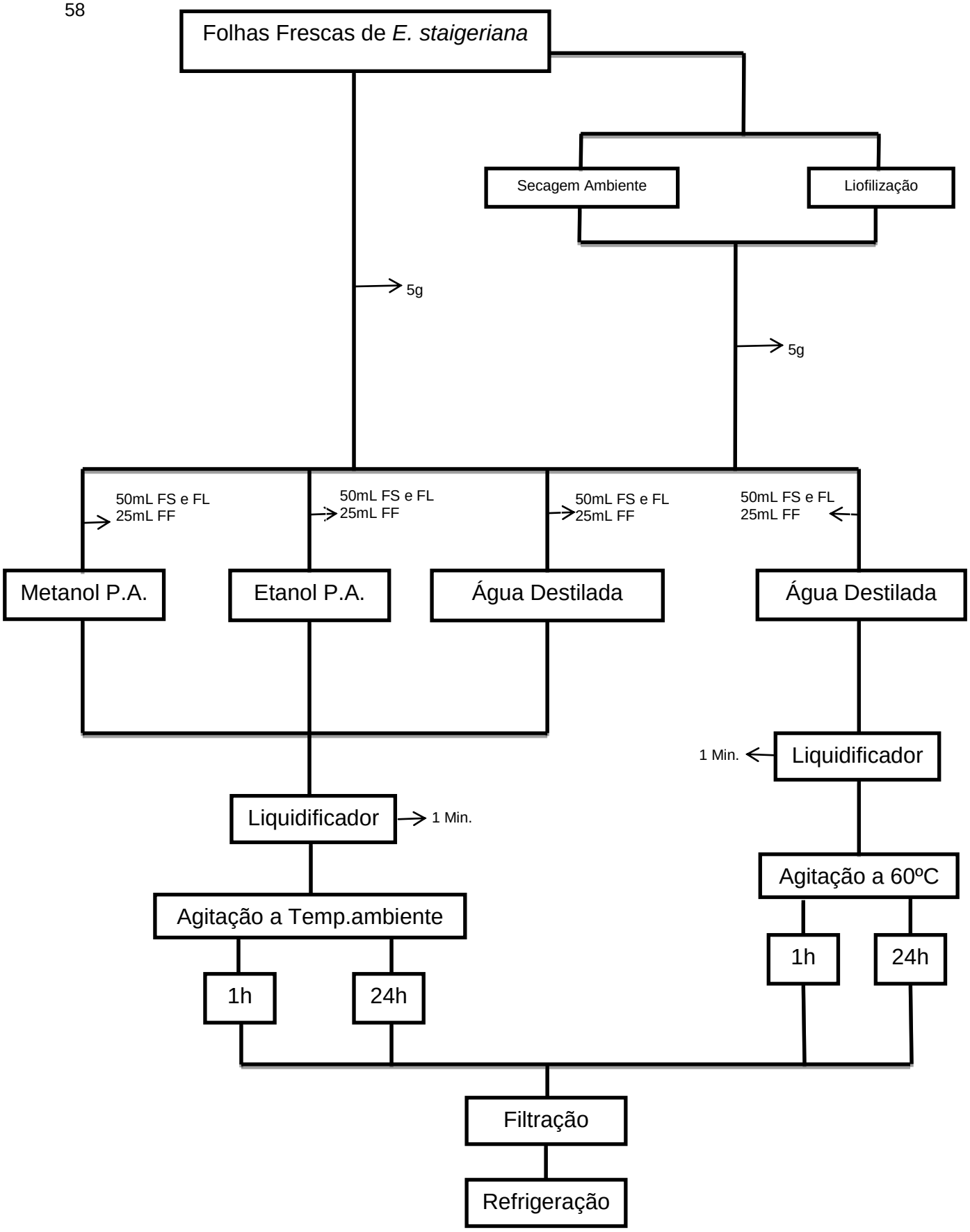

Figura 2 - Fluxograma de obtenção dos extratos sobre folhas frescas, liofilizadas e secas no ambiente

Para facilitar a identificação dos extratos eles receberam uma codificação com letras e números como descrita na Tabela 02.

Tabela 2 - Codificação dos extratos quanto aos solventes, tempos de extração e tipo de processamento

Extrato Nª	Solvente	Tempo Extração	Tipo de Processamento	Código
1	Etanol	1h	Folhas Frescas	Et_1_FF
2	Etanol	24h	Folhas Frescas	Et_24_FF
3	Metanol	1h	Folhas Frescas	Met_1_FF
4	Metanol	24h	Folhas Frescas	Met_24_FF
5	Água	1h	Folhas Frescas	Ag_1_FF
6	Água	24h	Folhas Frescas	Ag_24_FF
7	Água 60°C	1h	Folhas Frescas	Ag60_1_FF
8	Água 60°C	24h	Folhas Frescas	Ag60_24_FF
9	Etanol	1h	Folhas Secas Ambiente	Et_1_FS
10	Etanol	24h	Folhas Secas Ambiente	Et_24_FS
11	Metanol	1h	Folhas Secas Ambiente	Met_1_FS
12	Metanol	24h	Folhas Secas Ambiente	Met_24_FS
13	Água	1h	Folhas Secas Ambiente	Ag_1_FS
14	Água	24h	Folhas Secas Ambiente	Ag_24_FS
15	Água 60°C	1h	Folhas Secas Ambiente	Ag60_1_FS
16	Água 60°C	24h	Folhas Secas Ambiente	Ag60_24_FS
17	Etanol	1h	Folhas Liofilizadas	Et_1_FL
18	Etanol	24h	Folhas Liofilizadas	Et_24_FL
19	Metanol	1h	Folhas Liofilizadas	Met_1_FL
20	Metanol	24h	Folhas Liofilizadas	Met_24_FL
21	Água	1h	Folhas Liofilizadas	Ag_1_FL
22	Água	24h	Folhas Liofilizadas	Ag_24_FL
23	Água 60°C	1h	Folhas Liofilizadas	Ag60_1_FL
24	Água 60°C	24h	Folhas Liofilizadas	Ag60_24_FL

3.4. Concentração dos extratos

Os extratos obtidos foram concentrados antes de sua utilização nas avaliações da capacidade antifúngica. Para isto, 6 mL de cada extrato foi transferido para um tubo de ensaio plástico de capacidade de 15 mL e a secagem total dos mesmos realizada com auxílio de um concentrador tipo bloco seco (Marconi, MA4006) operando com temperatura de secagem de 55ºC. Os extratos necessitaram de um período de

secagem variável dependendo do solvente utilizado na preparação do extrato, entretanto o tempo máximo foi de 24 horas. Após a secagem dos extratos os mesmos foram reconstituídos com 1,5 mL do solvente original.

Desta forma, a concentração final dos extratos de folhas liofilizadas e secas ao ambiente, preparados a partir de 5g de material com 50mL do solvente, foi de 0,4mg/µL, e o de folhas frescas, preparados a partir de 5g de material com 25mL do solvente, foi de 0,8mg/µL.

3.5 Avaliação da capacidade antifúngica

3.5.1 Inoculo fúngico

Como cultura teste foi utilizada uma linhagem do fungo produtor de aflatoxinas *Aspergillus flavus*, depositada na micoteca do laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP.

Para obter colônias da linhagem selecionada foram realizados cultivos em placas de Petri, contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar - BDA (Himedia). O crescimento foi realizado com as placas de Petri incubadas a 28ºC (±0,3ºC), por 9 dias, na ausência de luz, após o qual ficaram aptas a serem utilizadas como fonte de inoculo para os tratamentos.

O preparo dos inóculos foi realizado raspando-se a superfície das placas apresentando crescimento fúngico com auxílio de uma alça de Drigalski e imergindo esta em uma solução aquosa estéril contendo 1% de Tween 80 (Sigma-Aldrich). A raspagem e imersão foi repetida três vezes. Após isto, a concentração de esporos foi avaliada em câmara de Neubauer e, quando necessário, o número de esporos ajustados para uma contagem na faixa de 10^6 esporos por mL.

3.5.2 Seleção inicial dos extratos quanto à capacidade antifúngica

Visando realizar uma seleção, entre os 24 tratamentos, daquele com melhor ação antifúngica um procedimento de triagem foi empregado. Neste procedimento a técnica denominada “food poisoned” descrita por Grove e Moore (1962) foi utilizada.

Nesta técnica o extrato a ser checado é colocado em volume adequado, para obter-se a concentração desejada, no meio que servirá para desenvolvimento do fungo. A adição é realizada com o meio de cultura resfriando, mais ainda líquido, visando obter-se uma boa homogeneização do extrato com o meio.

Placas de Petri de diâmetro interno de 3,0 cm foram utilizadas e cada tratamento foi repetido 5 vezes. O volume de meio Batata Dextrose Ágar utilizado foi de 2 mL por placa. A dose única dos extratos checada foi de 200 µL/mL. Cinco placas contendo a mesma quantidade dos solventes puros (200 µL/mL) utilizados nos extratos foram também inoculadas para crescimento junto com os extratos em estudo, para serem utilizados como controle negativo (testemunha) de cada extrato. Como controle positivo o óleo essencial de *E. staigeriana* na dose de 200 µL/mL foi utilizado.

Depois de solidificado, o meio foi inoculado com auxílio de um estilete fino de metal com diâmetro aproximado de 2 mm e cumprimento de 12 cm. O estilete após esterilização em fogo foi resfriado e imerso na solução do inoculo. A inoculação foi realizada uma única vez no ponto central da placa. Todo o procedimento de incorporação do extrato no meio e inoculação foi realizada em uma cabine de segurança biológica classe II tipo A1, com 70% de recirculação e 30% de renovação de ar (Pachane, PA400).

A placa inoculada foi incubada em câmara de germinação a 28ºC±0,3ºC(Tecnal, TE-4012), na ausência de luz, por até 6 dias.

As mensurações do crescimento radial foram realizadas aos 2, 4 e 6 dias com auxílio de um paquímetro (Starret, 125MEA-6/150). A mensuração do crescimento radial foi realizada em duas direções separadas em 90°. O crescimento foi reportado como a média aritmética em mm das duas mensurações.

Com base na média do crescimento observado nos tratamentos foi calculado o parâmetro percentual de inibição do crescimento fúngico, oferecido por cada extrato frente ao seu controle negativo.

A variável percentual de inibição (%inibição) foi calculada a partir da razão entre a média de crescimento das placas do controle e das placas com os extratos, conforme a fórmula a seguir:

$$\%\ \boldsymbol{inibição} = \left(1 - \left(\frac{Valor\ Placa\ com\ o\ Extrato}{Média\ das\ Placas\ controle}\right)\right) X\ 100$$

3.5.3 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

O tratamento que apresentou maior inibição de crescimento fúngico frente à linhagem do fungo *A. flavus* utilizada foi selecionado para avaliação de sua Concentração Inibitória Mínima (MIC). O óleo essencial de *E. staigeriana* foi utilizado como um controle positivo.

A metodologia utilizada para avaliar a MIC do extrato foi a metodologia proposta por Hadacek &Greger (2000). Nesta metodologia o crescimento fúngico é mensurado pela quantidade de esterase produzida pelo fungo de interesse. Quanto o maior crescimento micelial maior é a quantidade de esterase produzida e liberada no caldo de crescimento. A quantidade de esterase presente no caldo de crescimento após o período de incubação é mensurada pela reação desta com o diacetato de fluorescina que produz a fluorescina, que fluoresce quando excitada. A leitura da fluorescência foi realizada no leitor de microplacas com comprimento de onda de excitação de 435 nm e emissão de 685 nm, utilizando o equipamento leitor de microplacas (PerkinElmer, VictorX3).

A avaliação foi realizada em microplacas contendo 12 colunas com 8micropoços cada, totalizando 96 micropoços por placa. A microplaca utilizada foi própria para leitura de fluorescência (PerkinElmer, mod. OptiPlate-96F).

Oito doses (0 µL/mL, 1,67 µL/mL, 3,34 µL/mL, 13,38 µL/mL, 26,75 µL/mL, 53,30 µL/mL, 107,00 µL/mL e 214,00 µL/mL) do extrato selecionado foram avaliadas para mensurar a MIC. As doses avaliadas foram dissolvidas em 50 µL de caldo extrato de malte (Himedia) e 50 µL do caldo contendo inoculo foi adicionado a cada micropoço. O inoculo foi obtido usando o procedimento descrito no item 3.5.1, entretanto utilizando extrato de malte com meio diluente adicionado do agente emulsificante DMSO (Dimetil Sulfóxido, Marca Nuclear) a 5,0 %. Os testes foram realizados em triplicata. Para evitar o efeito dos compostos sobre a mensuração da fluorescência o branco do teste e o branco da testemunha foram elaborados. Assim, no branco do teste todos os compostos contidos no teste (caldo, extrato, solvente e solução de falso inoculo) estavam presentes, com exceção do fungo. Já no branco da testemunha todos os compostos presentes na testemunha estavam presentes (caldo e solução de falso inoculo), com exceção do fungo.

A incubação da placa foi realizada a 25°C por 20 a 24 horas e após isto, 5 µL de uma solução 2,5% em acetona grau cromatográfico de diacetato de fluorescina foi adicionada a cada micropoço. A placa foi agitada por 30 segundos, no equipamento Victor X3, e incubada durante 90 minutos a 37°C. Após isto a leitura foi realizada.

A percentagem de inibição de cada dose foi calculada conforme a fórmula a seguir:

$$\%\ \boldsymbol{Inibição} = \left(1 - \left(\frac{Média\ branco\ teste - Média\ teste}{Média\ branco\ testemunha - Média\ testemunha}\right)\right)\ X\ 100$$

3.6 Metodologia de análise estatística

Para analisar a variável percentual de inibição ***(%inibição)***, foi utilizado o modelo de efeitos principais aditivos e interação entre estes efeitos, em que os efeitos foram material (Folhas frescas, liofilizadas e secas ao ambiente), solvente (Etanol, Metanol, Água e Água a 60°C), tempo de extração (1h e 24h) e tempo de crescimento (2, 4 e 6 dias).

A análise da variância estatística foi realizada para determinar diferenças significativas ($p<0,05$) pelo teste de Tukey, utilizando-se o sistema computacional do SAS Institute Inc., Cary, NC, USA (2008).

4. Resultados e Discussões

4.1. Repetitividade entre as extrações

O preparo dos extratos foi uniforme, com praticamente todos os extratos (exceção dos extratos 12 (Met_24_FS) e 21 (Ag_1_FL)), pois não apresentaram diferença significativa entre as repetições. Isto indica que o processo de extração é robusto, ou seja, sofre pouca influência de fatores ambientais. O que pode ser observado no Anexo, aonde são apresentados os resultados das repetições das extrações, com seus respectivos agrupamentos conforme teste de Tukey demonstrando diferenças significativas ou não.

4.2. Tipo de processamento da Matéria-prima

Como pode ser visto na Tabela 03, o tipo de processamento do material que estatisticamente ($p<0,05$) proporcionou extratos com maior capacidade antifúngica foi a folha fresca, seguido pelas folhas liofilizadas e por último as folhas secas ao ambiente. Korukluoglu et. al. (2008), que estudaram óleos essenciais e extratos de folhas frescas e secas de orégano, contra *Alternaria alternata, Aspergillus flavus* (duas cepas),*Aspergillus niger (duas cepas), Aspergillus parasiticus, Fusarium semitectum,*

Fusarium oxysporum, Mucor racemosus e *Penicillium roqueforti*, verificaram que a atividade antifúngica das folhas frescas foi maior do que para as folhas secas.

Os processos de secagem costumam alterar a composição química dos produtos extraídos devido a processos enzimáticos, principalmente por oxidases, peroxidases, hidrolases e isomerases (FENNEL et. al. 2004), e as variações em relação a composição original dependem das condições de temperatura, irradiação, velocidade da circulação do ar e umidade do ar às quais o material é submetido (SILVA, 2005).

Desta forma a diminuição na capacidade antifúngica dos extratos pode ser explicada pelas perdas que ocorrem nos processos de secagem, principalmente devido à perda dos compostos mais voláteis, que com os processos de secagem e liofilização se perdem para o ambiente. O fato da liofilização ter ficado acima das folhas secas ao ambiente é devido ao processo de liofilização, que é feito sob baixa temperatura e em um ambiente fechado, o que pode ter preservado mais compostos e consequentemente ter obtido um maior percentual de inibição sobre o crescimento fúngico.

Tabela 3 –Classificação do material segundo o tipo de preparação em relação ao percentual de inibição

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Processamento do Material
A	36.2	Folhas frescas
B	29.2	Folhas liofilizadas
C	24.8	Folhas secas ao ambiente

4.3. Solventes Extratores

Com relação aos solventes, o metanol se mostrou mais eficiente ($p<0,05$) em extrair os compostos antifúngicos, seguido pelo etanol, ambos com as mais altas atividades antifúngicas. Os extratos metanólicos e etanólicos proporcionaram percentuais de inibição superiores a 49%, como pode ser visto na Tabela 04, corroborando com os achados de Satish et. al., (2007) e Korukluoglu et. al. (2008).

Satish et. al. (2007) estudaram extratos de 52 plantas inclusive *Eucalyptus globulus* verificaram que entre os extratos testados, o solvente metanol se mostrou mais eficaz do que o etanol, o clorofórmio, o benzeno e o éter de petróleo. Korukluoglu et. al. (2008) estudaram os extratos de folhas de orégano verificaram a maior atividade antifúngica nos extratos metanólicos de folhas frescas. Todavia Souhaili et. al. (2004) ao avaliarem a atividade antimicrobiana de diferentes extratos da alga marinha *Cystoseira tamaricifolia e* verificaram que os extratos etanólicos proporcionaram uma inibição total (100%) sobre as espécies estudadas a uma concentração de 10%, enquanto o extrato aquoso demonstrou atividade somente sobre algumas cepas utilizadas na mesma concentração. Nenhuma atividade foi observada sobre bolores e leveduras nos extratos aquosos e metanólicos, além disso os extratos de clorofórmio e hexano não demonstraram nenhuma atividade antimicrobiana.

No presente estudo, os extratos aquosos demonstraram uma atividade antifúngica pequena, com os percentuais inibição situando-se entre de 5 e 3%, como pode ser observado na Tabela 04. A água a temperatura ambiente ou aquecida apresentaram desempenho antifúngico reduzido em relação aos outros solventes e semelhantes estatisticamente, com uma diferença estatística de aproximadamente 2% entre si, com a água a 60ºC apresentando o melhor valor.

Tabela 4 – Classificação dos solventes extratores em relação ao percentual de inibição

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Solvente
A	63.3	Metanol
B	49.6	Etanol
C	5.0	Água a 60°C
C	3.0	Água

4.4. Tempo de extração em horas

Em geral, não houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os tempos de extração 1 e 24h como pode ser observado na Tabela 05, desconsiderando o solvente

utilizado. Este resultado é interessante, pois mostra que o para os solventes e matérias-primas utilizadas o tempo de 1 ou 24 horas não alterou o desempenho antifúngico dos extratos.

Tabela 5 – Classificação dos tempos de extração em relação ao percentual de inibição

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Tempo de Extração
A	30.5	24
A	29.8	1

4.5. Influência dos extratos sobre o estágio de crescimento fúngico durante o tempo

Como pode ser visto na Tabela 06 e Figura 03, o potencial antifúngico dos extratos foi mais pronunciado no estágio inicial do crescimento fúngico e foi decrescendo no decorrer dos tempos de leitura. Resultados parecidos com os obtidos por Basílico e Basílico (1999), que estudaram os efeitos inibitórios de óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), menta (Menta arvensis), manjericão (*Ocimum basilicum*), sálvia (*Salvia officinalis*) e coentro (*Coriandrum sativum*), sobre o crescimento micelial e formação de ocratoxina A por *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 e verificaram que orégano e a menta inibiram o crescimento micelial por mais de 21 dias a 1000ppm, enquanto na mesma concentração, o manjericão apesar de ter sido completamente efetivo inicialmente (7 dias) permitiu o crescimento após este período, assim como a sálvia, que também teve sua efetividade decrescida com o tempo.

Diante disso pode-se concluir que os extratos tenham uma ação fungistática de inibição sobre a germinação provocando um atraso inicial no desenvolvimento fúngico em comparação ao tratamento testemunha e, portanto, resultando em uma inibição maior nos primeiros 2 dias do experimento. Entretanto, este atraso foi sendo reduzido fazendo com que a o fungo, na leitura aos 6 dias, apresentasse um desenvolvimento próximo a testemunha, ou seja, os extratos parecem

não ter apresentado uma ação inibitória satisfatória sobre o crescimento micelial e o fungo tendeu a compensar o atraso inicial no crescimento no decorrer do tempo.

Tabela 6 – Classificação dos tempos de crescimento em dias, em relação ao percentual de inibição

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Dia de Leitura
A	50.8	2
B	25.3	4
C	14.3	6

Figura 3 — Gráfico descrevendo a variação da %inibição com o tempo de crescimento em dias

4.6. Influência da combinação da matéria-prima, solvente extrator e tempo de extração

O tratamento que obteve melhor resultado significativo ($p<0,05$) foi o extrato 19 (Met_1_FL) de metanol, com 1h de extração, a partir de folhas liofilizadas, como pode ser visto na Tabela 07. Este extrato não diferiu significativamente dos extratos 4 (Met_24_FF), 3 (Met_1_FF) e 20 (Met_24_FL), que juntamente com o extrato 12 (Met_24_FS), todos preparados com metanol como solvente extrator obtiveram os melhores resultados. Estes foram seguidos pelos extratos de etanol 2(Et_24_FF), 10(Et_24_FS) e 9(Et_1_FS), que por sua vez estão no mesmo agrupamento de Tukey que os extratos 1(Et_1_FF) e 17(Et_1_FL). Isto sugere que os extratos de metanol, seguidos por extratos de etanol, proporcionaram os tratamentos com melhor potencial antifúngico frente à linhagem fúngica estudada. Podemos verificar também que os extratos 4 (Met_24_FF) e 3 (Met_1_FF), com folhas frescas, apesar de não diferirem estatisticamente dos extratos 19 (Met_1_FL) e 20 (Met_24_FL), utilizam menor quantidade de matéria-prima na sua preparação, o que pode colocá-los, como melhores extratos. Desta forma verificou-se que os extratos metanólicos de folhas frescas, apresentam maior potencial antifúngico independentemente do tempo de extração, assim como foi verificado por Korukluoglu et. al. (2008) com extratos metanólicos de folhas frescas de orégano.

Tabela 7 – Classificação dos extratos em relação a influência da combinação da matéria-prima, solvente extrator e tempo de extração sobre o percentual de inibição

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extrato
A	73.0	19 (Met_1_FL)
B A	66.6	4 (Met_24_FF)
B A	66.4	3 (Met_1_FF)
B A	66.3	20 (Met_24_FL)
B	63.3	12 (Met_24_FS)
C	55.9	2 (Et_24_FF)
C	54.0	10 (Et_24_FS)
C	53.6	9 (Et_1_FS)
D C	50.2	1 (Et_1_FF)
D C	49.1	17 (Et_1_FL)
D	44.3	11 (Met_1_FS)
E	34.8	18 (Et_24_FL)
F	13.4	8 (Ag60_24_FF)
F	12.9	7 (Ag60_1_FF)
F	12.2	6 (Ag_24_FF)
F	11.7	5 (Ag_1_FF)
G	3.1	16 (Ag60_24_FS)
G	3.0	24 (Ag60_24_FL)
G	-0.4	23 (Ag60_1_FL)
G	-0.7	22 (Ag_24_FL)
G	-1.1	21 (Ag_1_FL)
G	-1.7	15 (Ag60_1_FS)
G	-2.5	14 (Ag_24_FS)
G	-2.6	13 (Ag_1_FS)

4.7 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

O extrato 19 (Met_1_FL), teve sua MIC atingida a uma dose de 26,75 µL/mL, um pouco mais que o dobro (2,14 vezes) da dose necessária para atingir a MIC do óleo essencial, que foi de 12,5 µL/mL, como pode ser visto nas Figuras 04 e 05. Entretanto, o rendimento do óleo e a mão-de-obra e equipamentos extratores utilizados em sua preparação tornam o processo de extração com solvente mais prático, rápido e econômico, em comparação com a hidrodestilação em aparelho de clevenger, demonstrando a eficiência relativa da extração com solventes extratores e sua praticidade e operacionalidade, quando se comparam as metodologias.

Os valores de MIC encontrados por Korukluoglu et. al. (2008) para os extratos metanólicos de folhas frescas de orégano foram de 150 µL/mL, e do óleo essencial de de orégano 8,5 µL/mL. O que pode indicar a eficiência do extrato metanólico 19(Met_1_FL), de folhas liofilizadas de *E. staigeriana,* em comparação aos extratos metanólicos de folhas frescas de orégano, todavia levando em consideração as diferenças na preparação e no processamento do material.

No trabalho de Aligiannis et. al. (2001), uma classificação dos extratos quantificando a atividade biológica de produtos naturais, baseada nos resultados obtidos pela MIC, descreve como inibidores fortes compostos com MIC menor que 0,5 mg/mL, moderados entre 0,6 e 1,5 mg/mL e fracos acima de 1,6 mg/mL. Dentro dessa classificação, o extrato 19(Met_1_FL), acaba por cair na faixa de inibidor fraco, já que sua MIC foi 10,7mg/mL (26,75 µL/mL do extrato com concentração de 0,4mg/ µL).

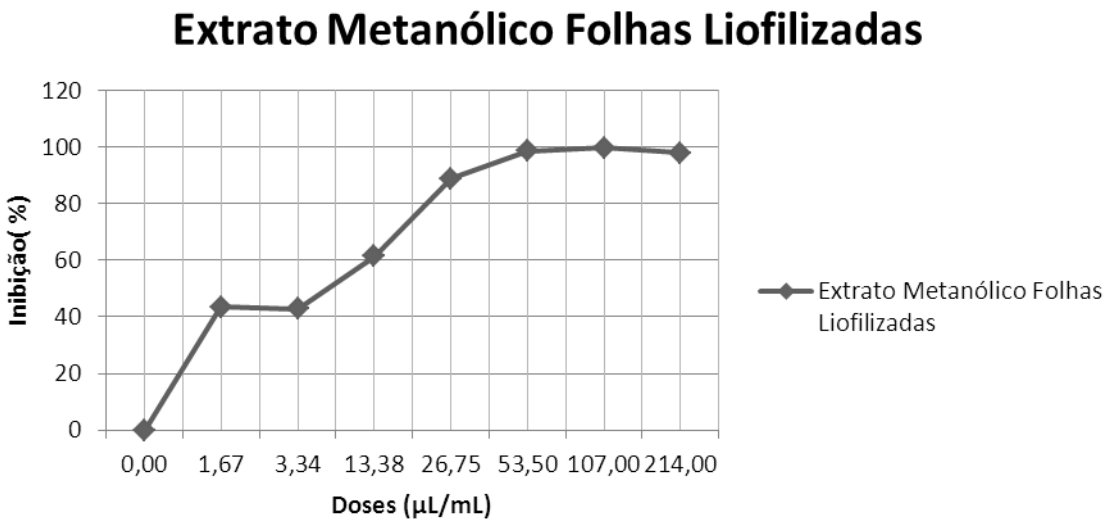

Figura 4 - Gráfico descrevendo a variação da % inibição com as doses do extrato metanólico de folhas liofilizadas (Met_1_FL).

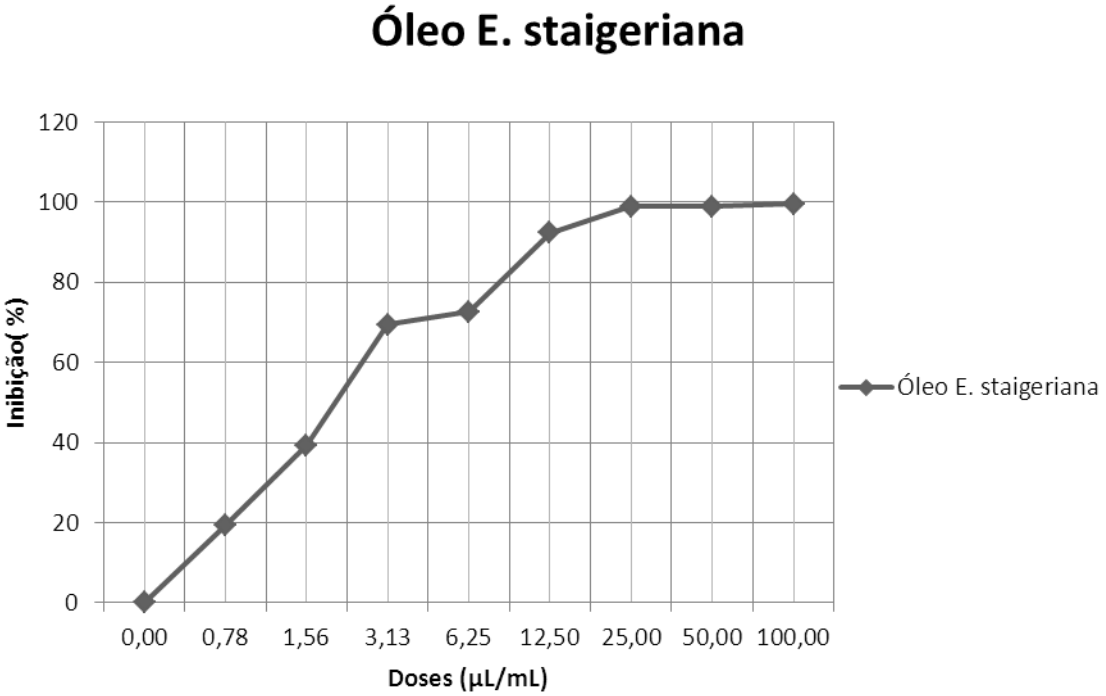

Figura 5 - Gráfico descrevendo a variação da % inibição com as doses do óleo essencial de *E. staigeriana.*

5 Conclusões

O melhor solvente extrator para os compostos antifúngicos estudados foi o metanol, seguido pelo etanol, entretanto, como o etanol se situou logo abaixo do metanol, e devido a sua baixa toxicidade, menor custo e mais fácil acesso, pode ser considerado um solvente mais prático para uma extração realizada fora do ambiente laboratorial e com resultados bastante eficientes como solvente extrator.

A melhor forma de processamento da matéria-prima foi a utilização do material fresco, visto que a quantidade de material na produção dos extratos é a metade da utilizada para o preparo, em comparação com os extratos de folhas secas e liofilizadas, além da menor mão-de-obra e equipamentos necessários para os processos de secagem.

Não havendo diferença estatística ($p<0,05$) entre os tempos de extração 1 e 24h, o tempo de extração de uma hora, é a forma mais econômica de processamento do material, e a extração pode ser feita com segurança, pois a repetitividade é consistente e as variações são discretas;

Todavia mais estudos são necessários para o isolamento dos compostos responsáveis pelas inibições no crescimento do fungo e avaliação das concentrações ideais e diferentes formas para seus usos.

Na comparação com o óleo essencial, a utilização dos extratos de folhas se mostrou eficiente, visto que apesar da MIC dos extratos serem menores que as do óleo essencial, a facilidade e segurança na preparação de extratos em liquidificador, torna o processo muito mais acessível a população e proporcionando um maior rendimento, por grama de material.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS – ABRAF. **Anuário estatístico da ABRAF 2010 ano base 2009** . Brasília, 2010.Disponivel em: <http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF10-BR.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2011.

AHMED, S.M. AND EAPEN, M. Vapour toxicity and repellency of some essential oils to insect pests. **Indian Perfumer,** New Deli, v.30, p.273–278, 1986.

ALBUQUERQUE, R.; ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I. Tratamento de rações de aves com ácidos orgânicos: estudo da atividade bacteriana e avaliação de técnicas de recuperação de *Salmonella spp*. **Brazilian Journal of Veterinarian Research Animal Science,** São Paulo, 1998, v. 35, n. 6, p. 279-282.

ALI, N.; SARDJONO; YAMASHITA, A.; YOSHIZAWA, T. Natural co-occurrence of aflatoxins and *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 15, n. 4, p. 377-384, 1998.

ALMEIDA, F. de A.C.; GOLDFARB, A.C.; GOUVEIA,J.P.G. Avaliação de extratos vegetais e métodos de aplicação no controle de Sitophilus spp. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.1, n.1, p.13-20, 1999.

BAKER, R.T. AND SMITH, H.G. A **Research on the eucalypts, especially in regard to their essential oils.** 2 nd ed.Sydney:NSW Government Printer, 1920.

BALBINOT-JUNIOR, A. A. Manejo das plantas daninhas pela alelopatia. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 17, n. 1, p. 61-64, 2004.

BARROSO, G. M.; GUIMARÃES E. F.; INCHASO, C. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L.; LIMA, H. C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil.** Viçosa: Imprensa UFV, 2004. v. 27, 916 p.

BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K.; KUR, S. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, Amsterdan, v. 256, p. 2166 - 2174, 2008.

BENJILALI, B. et al. Method to study antimicrobial e effects of essential oils: application to the antifungal activity of six moroccan essences. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 47, n. 10, p. 748-752, Oct. 1984.

BHAVANANI SM, BALLOW CH New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion Microbiology**, London, v.13, p. 528-534, 1992.

BONALDO, S.M., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., STANGARLIN, J.R., TESSMANN, D.J. ;SCAPIM, C.A**.** Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium,* pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v.29, p.128-134, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento e Pecuária **Grãos ardidos em milho**, dez. 2005. (Circular Técnica Nº 66).

_____. Ministério da Agricultura e do Abastecimento e Pecuária. **Instrução Normativa Nº 7**, de 15 de agosto de 2001.

_____. Ministério da Agricultura e do Abastecimento e Pecuária. **Instrução Normativa Nº 12**, de 28 de março de 2008.

_____. Ministério da Agricultura e do Abastecimento e Pecuária. **Portaria Nº 845** de 08 de novembro de 1976.

BRITO, J. P.; OLIVEIRA, J. E. M.; DE-BORTOLI, S. A. Toxicidade de óleos essenciais de Eucalyptus spp. Sobre Callosobruchus maculatus (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 96-103, 2006.

BROOKER I. Botany of the eucalypts. In: COPPEN, J.J.W. **Eucalyptus** :The Genus Eucalyptus**.** Cornwall : TJ International, 2002.

BROOKER, M.I.H., BARTON, A.F.M., ROCKEL, B.A. ; TJANDRA, J. The cineole content and taxonomy of *Eucalyptus kochii* Maiden & Blakely and *E. plenissima* (Gardner) Brooker, with an appendix establishing these two taxa as subspecies. **Australian Journal Botanic**, Sidney, v.36, p. 119–129, 1988.

BROPHY, J.J.; BOLAND, D.J Leaf essential oil of *Eucalyptus bakeri*. In: BOLAND, D.J. (Ed.). **Trees for the tropics.**, Canberra: ACIAR, 1989. p. 205–207.

BRUNETON J.; **Elementos de fitoquimica y de farmacognosia**, Zaragoza: Acribia, 1992.

_____. **Pharmacognosie** : phytochimie, plantes médicinales, 3ed. Paris: Ed. TEC & DOC, 1999.

BULLERMAN, L. B. Inhibition of aflatoxin production by cinamon. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 39, p. 1163-1165, 1974.

BULLERMAN, L. B.; SCHROEDER, L. L.; PARK, K. Y. Formation and control of micotoxins in foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v.47,n.8, p.637-46, 1984.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY- CAST. **Mycotoxins**: risks in plant, animal, and human systems. 2003. n.139.

CHAGAS, A. C. 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, 2002.

CHALCHAT, J.C. Aromatic plants of Rwanda. II. Chemical composition of essential oils os tem Eucalyptus species growing in Ruhande arboretum, Butare, Rwanda. **Journal of Essential Oil Research,** Messina, v. 9, p. 159-165, 1997.

COLE, R. J.; COX, R. M. **Handbook of Toxic Fungal Metabolites**. New York: Academic Press, p. 937, 1981.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB **Acompanhamento de safra brasileira:** grãos, nono levantamento, junho 2011. Brasilia, 2011.

COPPEN, J.J.W. **Eucalyptus :** the genus eucalyptus. Cornwall: TJ International, 2002.

CULLEN; NEWBERNE, Acute hepatotoxity of aflatoxinas. In: EATON; GROOPMAN **Toxicology of aflatoxins,** San Diego : Academic Press, 1994.

CUTLER, H.G.; CUTLER, S.J.; **Biological active natural products:** agrochemicals. Boca Raton : CRC Press, 1999. 299 p.

DALE, N. Matching corn quality and nutritional value. **Feed Mix - The International Journal on Feed, Nutrition And Technology**, Oxford, v. 2, n.1, p. 26-29, 1994.

DORMAN HJD, DEANS SG Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford v.88, n.1, p. 308-316, 2000.

FENNEL, C.W.; LIGHT, M.E.; SPARG, S.G.; STAFFORD, G.I.; VAN STADEN, J. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices. **Journal of Ethnopharmacology**. V.95, p. 113-121, 2004.

FAO. **The global forest resources assessment 2005**: summary report. Rome, 2005. 166 p. Disponivel em: <http://www.fao.org/forestry/fra>. Acesso em 08 mar. 2010.

FOOD INGREDIENTS BRASIL, nº11, 2010, Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/120.pdf>. Acesso em: 15 set. 2010.

GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J.; DUARTE, J. O.; CRUZ, J. C.; PADRÃO, G. de A. Aspectos econômicos da produção e utilização do milho. In: CRUZ, J. C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHAES, P. C. (Ed.). **A cultura do milho.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. cap. 1, p. 21-46.

GARDNER, C.A. AND WATSON, E.M. The western australian varieties of *Eucalyptus* oleosa and their essential oils. **Journal and Proceedings. Royal Society of New South Wales,** Wales, v.34, p 73–86, 1947/48.

GERMANO P.M.L.; GERMANO M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** 2. ed. São Paulo: Varela, 2003.

GOMERO, O.L. **Plantas para proteger cultivos, tecnologías para controlar plagas y enfermedades** Lima: RAAA. 1994. 239 p.

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

GONZÁLEZ, E. R.; ANDRADE, A.; BERTOLO, L.; LACERDA, G.; CARNEIRO, R.; DEFÁVARI, V.; LABATE, M.; LABATE, C.; Constituintes químicos e efeito ecotoxicológico do óleo volátil de folhas de *Eucalyptus urograndis* (mirtaceae). **Química Nova,** São Paulo, Vol. 33, No. 7, p.1510-1513, 2010.

GOULD, G.W. Methods for preservation and extension of shelf life .International **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam : Elsevier Science, v.33, n.1, p.51-64, 1996.

GULATI, R. AND MATHUR, S. Effect of *Eucalyptus* and *Mentha* leaves and Curcuma rhizomes on *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acarina: Acaridae) in wheat. **Experimental and Applied Acarology,** Amsterdam : Elsevier Science v.19, p.511–518, 1995.

GUYNOT, M.E. et al. Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5–5.5). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam : Elsevier Science, v.101, n.2, p.161-168, 2005.

HALIM, A. S. A.; MORSY, T. A. The insecticidal activity of Eucalyptus globulus oil on the development of Musca domestica third stage larvae. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, Cairo, v. 35, n. 2, p. 631-636, 2005.

HERNANDEZ, A.A.M., ROSAS, R.M., AGUILERA, P. M.M. & LAGUNES, T.A. Use of plant and mineral powders as an alternative for the control of fungi in stored maize grain. **Agrociência**, Chapingo, v.32, p.75- 79, 1998.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods, **Microorganis in foods 5. Characteristics of microbial pathogens**, London: Blackie academic & professional, 1996.

ISMAN, M. B., Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection** Guildford : Butterworth Scientific v.19, p.603-608, 2000.

JANARDHANA, G.R.; RAVEESHA, K.A.; SHETTY, H.S. Modified atmosphere storage to prevent mould-induced nutritional loss in maize. **Journal of Science Food and Agriculture,** London : Blackwell Scientific, v. 76, p. 573 – 578, 1998.

JARVIS, B. Factors affecting the production of mycotoxins. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v.34, p. 199, 1971.

JAYASHREE, T.; SUBRAMANYAM, C. Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford : The Society, n.28, p.179–183, 1999.

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

KLOCKE, J.A., DARLINGTON, M.V. AND BALANDRIN, M.F. 1,8-Cineole (eucalyptol), a mosquito feeding and ovipositional repellent from volatile oil of *Hemizonia fitchii* (Asteraceae). **Journal of Chemical Ecology,** New York : Kluwer Academic, v.13, p. 2131–2141, 1987.

KORUKLUOGLU,M.; GURBUZ,O.;SAHAN,Y.; YIGIT,A.; KACAR,O.; ROUSEFF,R. Chemical characterization and antifungal activity of *origanumonitesL*. essential oils and extracts. **Journal of Food Safety.** Westport : Food & Nutrition, v.29, p.144–161, 2009.

KRISHNAMURTHY, Y.L.; SHASHIKALA, J. Inhibition of aflatoxin B1 production of Aspergillus flavus, isolated from soybean seeds by certain natural plant products, **Letters in Applied Microbiology** Amsterdam : Elsevier, v.43, p. 469–474, 2006.

LAGUNES T., A. & C. RODRÍGUEZ H. Los extractos acuosos vegetales com actividad insecticida: el combate de laconchuela del frijol. **Temas Selectos de Manejo de Insecticidas Agrícolas**, Mexico, v.3, 57p., 1992.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações.** 2a Edição. Curitiba, Ed. do Autor, 140p. 1997

LEGRAND, C. D. & KLEIN, R. M. Mirtáceas – Myrciaria, Pseudocaryophyllus, Blepharocalyx, espécies suplementares, espécies cultivadas, generalidades. In: REITZ, P. R. **Flora Ilustrada Catarinense**, Santa Catarina, 876p., 1978.

LIN, C.D.; CHEN, T.C. Relative antifungal efficacies of phosphoric acid and other compounds on fungi isolated from poultry feed. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam : Elsevier, v.54, n.3, p.217-226, 1995.

MACHINSKI JR, M.; VALENTE SOARES, L. M.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J. L.; BORTOLLETO, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 81, n. 10, p. 1001-1007, 2001.

MACIAS, F.A.; CASTELLANO, D.; OLIVA, R.M.; CROSS, P.; TORRES, A., Potential use of allelopathic agents as natural agrochemicals. **BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE** – Weeds, Bringhton p.33-38, 1997.

MACIEL, M. V.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; SILVA, R. A.; BARROS, R. S.; SOUSA R. N.; SOUSA, L. C.; MACHADO, L. K. A.; BRITO, E. S.; SOUZA-NETO, M. A. Atividade inseticida in vitro do óleo de sementes de nim sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 7-11, 2010.

MAHESH, B.; SATISH, S., Antimicrobial Activity of Some Important Medicinal Plant Against Plant and Human Pathogens. **World Journal of Agricultural Sciences** Amsterdam : Elsevier, v.4, p.839-843, 2008.

MAHMOUD, A.-L.E. Inhibition of growth and aflatoxin biosynthesis of Aspergillus flavus by extracts of some Egyptian plants., **Letters in Applied Microbiology**, Amsterdam : Elsevier, n. 29, p.334–336, 1999.

MARAQA, A. et al., Effect of nigella sativa extract and oil on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* **Turkish Journal of Biology**, Ankara, n.31, p.155-159, 2007.

MARICONI, F. A. M.; **Inseticidas e seu Emprego no Combate às Pragas**, 5 ed., São Paulo : Nobel, v. 1, 235p., 1981.

MARICONI, F. A.; **Inseticidas e seu Emprego no Combate às Pragas**, 2 ed., São Paulo: Agronomia Ceres, 1963.

MARIN. S., HOMEDES, V., SANCHIS, V., RAMOS, A.J. AND MAGAN, N., Impact of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* colonisation of maize on calorific losses and fumonisin production under different environmental conditions. **Journal of Stored Product Research** Amsterdam : Elsevier , v.35, p.15 – 26, 1999.

MENGAI, B. **Efeito dos óleos essenciais de diferentes espécies de *Eucalyptus* sobre a microflora do milho em pós-colheita.** 2010, 113p, Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MORAIS, M.S. **Efeito de dois extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* e da incidência da murcha em feijão-vagem**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba, Areia PB, 2004.

NAZER , A. I.; KOBILINSKY. A.; THOLOZAN, J.L.;DUBOIS-BRISSONNET, L. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of Salmonella sv.Typhimurium: a synergistic effect? **Food Microbiology**, Amsterdam : Elsevier, v. 22, n. 4, p. 391-398, 2005.

NOVAIS, R.F. Aspectos nutricionais e ambientais do eucalipto. **Revista Silvicultura**. São Paulo : O Instituto, v.68, p.10-17, 1996.

OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; BADIALE-FURLONG, E. Atividade Antioxidante e Antifúngica de Extratos Vegetais. **Alimentos e Nutrição,** Araraquara**,** v.18, n.3, p. 267-275, 2007.

OWOLADE, O.F., AMUSA, A.N. & OSIKANLU, Y.O.Q. Efficacy of certain indigenous plant extracts against seed-borne infection of *Fusarium moniliforme* on maize (*Zea mays* L.) in south western Nigeria. **Cereal Research Communications**, Hungary, v.28, p.323-27, 2000.

PANDEY R, KALRA A, TANDON S, MEHROTRA N, SINGH HN, KUMAR S Essential oils as potent sources of nematicidal compounds. **Journal of Phytopathology**, Göttingen, v. 148, p. 501-502, 2000.

PANDEY, A.K.; RAI, M.K.; ACHARYA, D. Chemical composition and antimycotic activity of the essential oils of corn mint (*Mentha arvensis*) and lemon grass (*Cymbopogon flexuosus*) against human pathogenic fungi. **Pharmaceutical Biology** v.4, p.421–425, 2003.

PAPACHRISTOS, D. P.; STAMOPOULOS, D.C. Fumigant toxicity of three essential oils on the eggs of *Acanthos celides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam , v. 40, n. 5, p. 517-525, 2004.

PERAICA, M.; RADIĆ, B.; LUCIĆ, A.; PAVLOVIĆ, M. Toxic effects of micotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**, New York, v.77, p.754-766, 1999.

PEREIRA, O. A. P.; CARVALHO, R. V.; CAMARGO, L. E. A. Doenças do milho. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia.** São Paulo: Ceres, v. 2, p. 477- 488. 2005.

PEREIRA, O. A. P. Situação atual de doenças da cultura do milho no Brasil e estratégias de controle. In: _____.**Resistência genética de plantas a doenças**.

Piracicaba. Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, p.25-30, 1995.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D., **Fungi and food spoilage**, Madison : Blackie Academic & Professional, Universidade de Wisconsin, 1997.

PRASAD; G. SAHAY S. S.; MASOOD, A. Inhibition in aflatoxin biosynthesis by the extract of Amorphophallus campanulatus (OL) and calcium oxalate. **Letters in Applied Microbiology**, Amsterdan, v.18, p.203-205, 1994.

PRATES, H. T. et al. Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 34, n. 4, p.243-249, 1998.

PRYOR, L. D.; **Biology of *Eucalyptus***. studies in biology. London : Edward Arnold Ed.:, 1976.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenagem de grãos**. Campinas : Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. 1999.

RAO, M. S., P. P. REDDY & M. NAGESH. Integration of Paecilomy ceslilacinus with neem leaf suspension for the management of root-knot nematodes on egg plant. **Nematologia Mediterrânea.** Bari : L'istituto v. 25, n.2, p.249-252, 1997.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal.** 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001.

REDDY, K.R.N., C.S. REDDY, K. MURALIDHARAN, Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains **Food Control**, Guildford, v.20, p.173–178, 2009.

SALGADO, A. P. S. P. **Estudo dos constituintes químicos a 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.

SANTOS, J. P. **Armazenagem de milho a granel na fazenda**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. (Circular Técnica Nº 55)

SANTOS, J. P. Controle de pragas durante o armazenamento de milho. In: CRUZ, J. C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHÃES, P. C. **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008, p. 25-302.

SANTOS, J. P. **Controle de pragas durante o armazenamento de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. (Circular Técnica Nº 84).

SATISH, S., MOHANA, D.C., RANHAVENDRA, M.P. AND RAVEESHA, K.A.; Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus sp.* **Journal of Agricultural Technology,** Wellington v.3, n.1,p. 109-119, 2007.

SAUER, D.B. **Storage of cereal grains and their products**. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1992. 607 p.

SAVARD, T.; BEAULIEU C.; GARDNER, N. J.; CHAMPAGNE, C. P. Characterization of spoilage yeasts isolated from fermented vegetables and inhibition by lactic, acetic and propionic acids. **Food Microbiology**, Amsterdam, v.19, n.3, p.363-373, 2002.

SCARPINELLA, G. D.; **Reflorestamento no Brasil e o protocolo de Quioto.** 2002. 182p. Dissertação (Mestrado em Energia) – Instituto de Eletrotecnica e Energia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

SCUDAMORE, K. A.; PATEL, S. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. **Food Additives and Contaminants**, London, ,v. 17, n. 5, p. 407-416, 2000.

SHUKLA, R.; KUMAR A.; PRASAD C.S.; SRIVASTAVA B.; DUBEY N.K. Antimycotic and antiaflatoxigenic potency of Adenocalym maalliaceum Miers. on fungi causing

biodeterioration of food commodities and raw herbal drugs. **International Biodeterioration & Biodegradation**, New York, v.62 p.348–351, 2008.

SILVA, F. **Avaliação do teor e da composição química do óleo essencial de plantas medicinais submetidas a processos de secagem e armazenamento.** 2005. 152 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade de Campinas, Campinas, 2005.

SILVA, M. **Avaliação da presença de fungos e micotoxinas na tecnologia de pós-colheita do milho**. 2007. 110p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL – SINDIRAÇÕES. **Boletim Informativo do Setor - Março 2011** Disponível em <http://www.sindiracoes.org.br/images/stories/noticias/boletim%20mar%E7o%20%202011%20final.pdf> Acesso em: 30 jun. 2011.

SINGH, G.; MAURYA, S.; CATALAN, C.; LAMPASONA M. P. Chemical Constituents, Antifungal and Antioxidative Effects of Ajwain Essential Oil and Its Acetone Extract **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v.52, n.11, p. 3292–3296, 2004.

SINGH, J.; TRIPATHI, N. N. Inhibition of storage fungi of blackgram (Vignamungo L.) by some essential Oils, **Flavour and Fragrance Journal**.,New York, v.14, p.1-4 ,1999.

SIQUI A.C, SAMPAIO, A.L.F, SOUSA M.C, HENRIQUES M.G.M.O., RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais – potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, São Paulo, v.16, p. 38-43, 2000.

SOLIMAN, K. M. AND BADEAA, R. I. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food Chemistry and Toxicology,** Amsterdan, v.40, p.1669-1675, 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 isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, São Paulo, n.32, p. 465-471, 2007.

SOUZA, M. A. A.; BORGES, R. S. O. S.; STARK, M. L. M. ; SOUZA, S. R. Efeito de extratos aquosos, metanólicos e etanólicos de plantas medicinais sobre a germinação de sementes de alface e sobre o desenvolvimento micelial de fungos fitopatogênicos de interesse agrícola. **Revista Universidade Rural,** Seropédica, v. 22, p.181-185, 2002.

SUHR, K.I.; NIELSEN, P.V. Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdan, v.95, n.1, p.67-78, 2004.

TAKAHASHI,T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts andflavonoids from Eucalyptus maculata. **Letters in Applied Microbiology**, 39, p. 60–64, 2004.

THANABORIPAT, D.; SUVATHI, Y.; SRILOHASIN, P.; SRIPAKDEE, S.; O. PATTHANAWANITCHAI; S. CHAROENSETTASILP Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus.* **The KMITL Science and Technology Journal**, Bangkok, v. 7 n.1, p. 1-7, 2007.

TRENTO, S.M., IRGANG, H. ; REIS, E.M. Efeito de rotação de culturas, de monocultura e de densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho. **Fitopatologia Brasileira**, n. 27, p. 609-613, 2002

TRINDADE, R. C.; MARQUES, I. M. R.; XAVIER,H. S.; OLIVEIRA, J. V. Extrato metanólico da amêndoa da semente de nim e a mortalidade de ovos e lagartas da traça-do-tomateiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 407- 413, 2000.

VAN DER WESTHUIZEN, L.; SHEPHARD, G. S.; SCUSSEL, V. M.; COSTA, L. L. F.; VISMER, H. F.; RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O. Fumonisin contamination and Fusarium incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 18, p. 5574-5578, 2003.

VIEGAS Jr.,C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quim. Nova,** São Paulo,v. 26, n.3, p.390-400, 2003.

VIEIRA, C.P.; FERNANDES, B.J. Plantas inseticidas. In: SIMÕES, C.M. et al. (Org.). **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. p.739–754.

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, Apr. 2009.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O.; **Óleo essencial de eucalipto.**, São Paulo : Ed. USP, 2003.

VOLL, E.; FRANCHINI, J. C.; CRUZ, R. T.; GAZZIERO, D. L. P.; BRIGHENTI, A. M.; ADEGAS, F. S. Chemical interations of *Brachiaria plantaginea* with *Commelina bengalensis* and *Acanthos permunhispidum* in soybean cropping systems. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 30, n. 7, p. 1467-1475, 2004.

WEISS, E.A. **Essential oil crops**. New York.: CAB International, 1997.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; GADEK, P. A.; QUINN, C. J. Myrtaceae Revisited: A Reassessment of Infrafamilial Groups. **American Journal of Botany,** New York, v.88, n.11, p.2013-2025, 2001.

WYATT, R.D.. Formas prácticas para diminuir exitosamente las pérdidas por micotoxicosis. I. Aflatoxinas. **Avicultura Profesional**, Athens, v.11, n.2, p.64-67, 1993.

YANG, Y; CHOI, H.; CHOI, W.; CLARK J. M., AHN Y. Ovicidal and adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, New York, v. 52, n. 9, p. 2507-2511, 2004.

ANEXO

Variações do percentual de inibição no Preparo dos extratos

Extrato 1 - Etanol -1h – Folhas Frescas

Tabela 8 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 1

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	50.73	2
A	50.46	3
A	49.45	1

Extrato 2 - Etanol -24h – Folhas Frescas

Tabela 9 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 2

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	56.99	2
A	56.67	1
A	54.32	3

Extrato 3 – Metanol -1h – Folhas Frescas

Tabela 10 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 3

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	70.445	3
A	70.223	2
A	58.777	1

Extrato 4 – Metanol -24h – Folhas Frescas

Tabela 11 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 4

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	74.111	2
A	63.555	3
A	62.333	1

Extrato 5 – Água - 1h – Folhas Frescas

Tabela 12 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 5

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	12.020	1
A	11.755	3
A	11.517	2

Extrato 6 – Água -24h – Folhas Frescas

Tabela 13 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 6

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	13.260	1
A	11.813	3
A	11.591	2

Extrato 7 – Água 60°C -1h – Folhas Frescas

Tabela 14 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 7

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	14.095	
A	12.714	
A	12.111	

Extrato 8 – Água 60°C -24h – Folhas Frescas

Tabela 15 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 8

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	14.633	3
A	13.326	1
A	12.491	2

Extrato 9 – Etanol -1h – Folhas Secas Ambiente

Tabela 16 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 9

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	56.58	1
A	55.62	2
A	48.83	3

Extrato 10 - Etanol -24h – Folhas Secas Ambiente

Tabela 17 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 10

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	55.06	1
A	53.93	3
A	53.30	2

Extrato 11 – Metanol -1h – Folhas Secas Ambiente

Tabela 18 — Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 11

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	54.79	2
A	44.68	3
A	33.62	1

Extrato 12 – Metanol -24h – Folhas Secas Ambiente

Tabela 19 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 12

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	64.437	3
A	62.325	2
B	28.667	1

Extrato 13 – Água -1h – Folhas Secas Ambiente

Tabela 20 — Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 13

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	-0.907	2
A	-3.253	1
A	-3.882	3

Extrato 14 – Água -24h – Folhas Secas Ambiente

Tabela 21 — Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 14

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	-1.887	3
A	-2.743	2
A	-3.137	1

Extrato 15 – Água 60°C -1h – Folhas Secas Ambiente

Tabela 22 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 15

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	-1.645	1
A	-1.761	2
A	-1.887	3

Extrato 16 – Água 60°C -24h – Folhas Secas Ambiente

Tabela 23 — Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 16

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	4.360	1
A	3.308	2
A	1.779	3

Extrato 17 – Etanol -1h – Folhas Liofilizadas

Tabela 24 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 17

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	51.53	1
A	49.89	3
A	46.04	2

Extrato 18 – Etanol -24h – Folhas Liofilizadas

Tabela 25 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 18

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	37.58	3
A	36.12	2
A	30.76	1

Extrato 19 – Metanol -1h – Folhas Liofilizadas

Tabela 26 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 19

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	74.234	3
A	74.145	2
A	70.657	1

Extrato 20 – Metanol -24h – Folhas Liofilizadas

Tabela 27 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 20

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	81.29	1
A	59.85	3
A	57.84	2

Extrato 21 – Água -1h – Folhas Liofilizadas

Tabela 28 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 21

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	5.910	1
B	-0.392	3
B	-1.851	2

Extrato 22 – Água -24h– Folhas Liofilizadas

Tabela 29 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 22

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	1.095	1
A	-1.629	2
A	-1.834	3

Extrato 23 – Água 60°C -1h – Folhas Liofilizadas

Tabela 30 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 23

Agrupamento de Tukey	**Inibição Media (%)**	**Extração**
A	1.084	3
A	-0.370	1
A	-2.159	2

Extrato 24 – Água 60°C-24h – Folhas Liofilizadas

Tabela 31 - Diferenças no percentual de inibição entre as extrações no extrato 24

Agrupamento de Tukey	Inibição Media (%)	Extração
A	3.729	1
A	2.818	2
A	2.471	3