



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Cátia Filipa Araújo da Costa

**Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o
crescimento e acumulação de aflatoxinas
por *Aspergillus***

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Bioengenharia

Trabalho efetuado sob a orientação do

Doutor Armando Albino Dias Venâncio

AGRADECIMENTOS

Chegando ao final deste percurso, não poderia deixar de expressar o meu maior agradecimento e apreço a algumas pessoas que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Doutor Armando Venâncio, pela oportunidade e pela confiança que em mim depositou, por todos os conhecimentos que me transmitiu, pela compreensão, paciência e pelo interesse e prontidão a cada pedido de ajuda.

Gostaria de agradecer também ao Doutor Luís Abrunhosa, responsável pelo laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, pela simpatia, por todos os ensinamentos que me transmitiu e pela disponibilidade que sempre demonstrou para comigo.

Agradeço também ao Professor Doutor José Maria Oliveira por toda a disponibilidade e por todo o apoio e auxílio.

Não poderia deixar de agradecer a uma pessoa que conheci durante este percurso laboratorial e que se tornou muito importante para mim. Obrigado Thalita Calado! Pela simpatia, por todo o incentivo, pela ajuda preciosa, por todos os conselhos, por todas as conversas de apoio, por todas os momentos divertidos que passamos juntas e pela amizade que acabou por surgir. Sem ti nada disto era possível.

Agradeço também à Zlatina Genisheva pela disponibilidade que sempre me concedeu e por todo o apoio, encorajamento e auxílio.

À Ana Paula Santiago que se tornou uma grande amiga após estes dois anos juntas. Por todos os momentos que passamos juntas, por todas as risadas, por todas as tristezas, por todos os desesperos e por todas as vezes que estavas lá sempre que eu precisava.

Aos meus amigos de sempre, em especial ao Ricardo Araújo e à Sara Oliveira pela amizade, pela preocupação, pelas ajudas nos momentos mais difíceis, por partilharem comigo todos os momentos. Os verdadeiros amigos são para sempre.

Em último, mas não menos importante, aos meus pais, há minha irmã e ao Diogo, que são o suporte da minha vida. Por todo o apoio, por toda a compreensão e por todo o amor que me transmitem. Tudo o que sou devo-o a vocês

RESUMO

Os fungos filamentosos estão amplamente distribuídos na natureza, devido às suas exigências nutricionais simples, que garantem a sua fácil multiplicação e colonização. No entanto, embora a sua presença seja natural, nem sempre é desejável e inofensiva, dado que alguns destes fungos, como é o caso dos *Aspergillus*, produzem substâncias tóxicas (micotoxinas) em diversos produtos alimentares que colonizam, gerando problemas ao nível da segurança de alimentos. Um dos exemplos destas micotoxinas são as aflatoxinas (AFs) que, ao estarem presentes nos alimentos utilizados na dieta humana e na dieta animal, levam a efeitos tóxicos e adversos na saúde dos consumidores.

Assim, é de extrema importância encontrar metodologias para reduzir ou inibir o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas nos alimentos. Os óleos essenciais (OEs) de plantas são uma alternativa promissora, devido às suas propriedades antimicrobianas naturais, que suprimem quer o crescimento quer a biossíntese de micotoxinas.

O trabalho realizado teve como principal objetivo avaliar o crescimento de *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 e a conseqüente produção de AFs em condições *in vitro*, sob o efeito da fase volátil de oito OEs. O crescimento micelial foi monitorizado através da medição do diâmetro das colónias em crescimento, enquanto a AFs foram detetadas e quantificadas por HPLC. Realizaram-se ainda ensaios de avaliação do crescimento fúngico em meio sintético e em grãos de milho, através do doseamento do ergosterol e do peso seco.

Observou-se que os OEs de *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus*, *Melaleuca alternifolia* e *Melaleuca viridiflora* exibiram propriedades antifúngicas, quer ao nível do crescimento quer ao nível da produção de AFs, nas diversas quantidades estudadas. O teor de ergosterol permitiu avaliar o crescimento fúngico no meio sintético e nos grãos de milho. Além disso, em meio sintético verificou-se uma boa correlação entre o teor de ergosterol e o diâmetro da colónia fúngica, que indica que o doseamento do ergosterol representa uma alternativa eficaz na avaliação do grau de contaminação fúngica em diversos substratos.

Palavras - chaves: *Aspergillus*, micotoxinas, aflatoxinas, óleos essenciais, ergosterol.

ABSTRACT

The filamentous fungi are widely distributed in the nature due to its simple nutritional requirements which assure an easy multiplication and colonization. Although natural, the presence of these fungi is not always desirable and harmless. Some of these fungi, as is the case of *Aspergillus*, produce toxic compounds (mycotoxins) during the colonization of diverse food products, creating food security related problems. Examples of these mycotoxins are the aflatoxins (AFs), which create toxic and adverse effects in the consumers' health when present in the human and animal food.

The identification of methodologies that reduce or inhibit the fungi growth and the mycotoxins production in food is therefore a priority. The application of essential oils extracted from plants constitutes a promising option, given their natural antimicrobial properties that suppress either the fungi growth or the biosynthesis of the mycotoxins.

The present work aimed to evaluate the *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 growth and the consequent production of AFs in vitro, under the volatile action of eight essential oils. The mycelium growth was monitored measuring the diameter of the growing fungi colonies while the AFs were detected and quantified through HPLC. Additionally, the fungi growth was also characterized in synthetic media and in corn grains, measuring the ergosterol dosage and the dry weight.

We demonstrate the antifungal properties of the essential oils from *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus*, *Melaleuca alternifolia* and *Melaleuca viridiflora*, which prevent the fungi growth and the AFs production, at different concentrations. We were also able to evaluate the fungi growth in the synthetic media and in the corn through the ergosterol levels. In fact, we have confirmed a good correlation between the ergosterol level and the colony diameter, highlighting the ergosterol content as a good indicator of the fungi contamination in different substrates.

Keywords: *Aspergillus*, mycotoxins, aflatoxins, essential oils, ergosterol.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1.1 Enquadramento.....	3
1.2 Objetivos	5
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 Fungos.....	9
2.1.1 Características e Importância	9
2.1.2 O género <i>Aspergillus</i>	10
2.1.2.1 <i>Aspergillus</i> secção <i>Flavi</i>	12
2.2 Micotoxinas	14
2.2.1 Aflatoxinas (AFs)	19
2.2.1.1 <i>A. parasiticus</i> como produtor de AFs	21
2.3 Extratos de plantas como conservantes alimentares	22
2.3.1 Óleos essenciais	23
2.3.1.1 <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	25
2.3.1.2 <i>Citrus bergamia</i>	25
2.3.1.3 <i>Citrus sinensis</i>	26
2.3.1.4 <i>Cymbopogon nardus</i>	26
2.3.1.5 <i>Lavandula officinalis</i>	27
2.3.1.6 <i>Melaleuca alternifolia</i>	27
2.3.1.7 <i>Melaleuca viridiflora</i>	27
2.3.1.8 <i>Pogostemon cablin</i>	28
2.3.2 Potencial antifúngico dos óleos essenciais.....	28
CAPÍTULO 3: METODOLOGIA	33
3.1 Material biológico	35
3.2 Análise química dos óleos essenciais	35
3.3 Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais.....	36

3.3.1 Avaliação do crescimento fúngico	37
3.3.2 Análise da produção de AFs	38
3.4 Determinação do teor de ergosterol	40
3.4.1 Determinação do peso seco	42
3.4.2 Avaliação em matriz sólida	44
<u>CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	45
4.1 Composição química dos óleos essenciais	47
4.2 Atividade antifúngica dos óleos essenciais	51
4.2.1 Efeito dos óleos essenciais no crescimento de <i>A. parasiticus</i>	51
4.2.1.1 Modelação do crescimento fúngico	64
4.2.2 Efeito dos óleos essenciais na produção de AFs por <i>A. parasiticus</i>	68
4.3 O ergosterol como medida da biomassa fúngica	76
4.3.1 Correlação entre o teor de ergosterol e outras variáveis de medição fúngica	76
4.3.2 Teor de ergosterol em grãos de milho	78
<u>CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</u>	81
<u>CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	85
ANEXOS	a
Anexo I - Curvas de Calibração	c
Anexo II – Dados experimentais	j

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. parasiticus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus Fumigatus</i>
<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>A. sojae</i>	<i>Aspergillus sojae</i>
a _w	Atividade de água
OEs	Óleos essenciais
OE	Óleo essencial
<i>C. zeylanicum</i>	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>
<i>C. bergamia</i>	<i>Citrus bergamia</i>
<i>C. sinensis</i>	<i>Citrus sinensis</i>
<i>C. nardus</i>	<i>Cymbopogon nardus</i>
<i>M. alternifolia</i>	<i>Melaleuca alternifolia</i>
<i>M. viridiflora</i>	<i>Melaleuca viridiflora</i>
<i>P. cablin</i>	<i>Pogostemon cablin</i>
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
GRAS	<i>Generally Regarded as Safe</i>
AFs	Aflatoxinas
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFM1	Aflatoxina M1
AFQ1	Aflatoxina Q1
AFP1	Aflatoxina P1
MUM	Micoteca da Universidade do Minho
KOH	Hidróxido de Potássio
CH ₂ CL ₂	Diclorometano
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
GS-MS	Gas Chromatography- Mass Spectrometry
UV	Ultravioleta

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Representação de um cleistotécio, ascos e ascósporos soltos de um <i>Aspergillus</i> [1].	11
Figura 2.2: Principais características dos conidióforos de <i>Aspergillus</i> (Adaptado de [1]).	12
Figura 2.3: Fatores que afetam a ocorrência de micotoxinas na cadeia alimentar (Adaptado de [44]).....	15
Figura 2.4: Estruturas químicas de alguns componentes dos OEs (Adaptado de [76]).	24
Figura 3.1: Plantas produtoras de OEs: a- <i>C. zeylanicum</i> -; b- <i>C. bergamia</i> ; c- <i>C. sinensis</i> ; d- <i>C. nardus</i> , e- <i>L. officinalis</i> ; f- <i>M. alternifolia</i> ; g- <i>M. viridiflora</i> ; h- <i>P. cablin</i>	35
Figura 3.2: Esquema representativo das etapas utilizadas para avaliação do crescimento e produção de AFs por <i>A. parasiticus</i> , sob influência dos OEs.	39
Figura 3.3: Representação da mistura da solução de KOH e Metanol com o agar fragmentado.	40
Figura 3.4: Representação da separação das camadas e retirada do ergosterol presente na camada superior.	41
Figura 3.5: Crescimento de <i>A. parasiticus</i> sob um filtro estéril colocado no meio PDA.....	42
Figura 3.6: Filtros com colônias de <i>A. parasiticus</i>	43
Figura 3.7: Filtros contendo as colônias de <i>A. parasiticus</i> após secagem.	43
Figura 3.8: Colocação do milho nas placas de Petri.....	44
Figura 4.1: Crescimento fúngico de <i>A. parasiticus</i> durante 10 dias, sob o efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de <i>C. zeylanicum</i>	54
Figura 4.2: Crescimento fúngico de <i>A. parasiticus</i> durante 10 dias, sob o efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de <i>C. bergamia</i>	55
Figura 4.3: Crescimento fúngico de <i>A. parasiticus</i> durante 10 dias, sob o efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de <i>C. sinensis</i>	55
Figura 4.4: Crescimento fúngico de <i>A. parasiticus</i> durante 10 dias, sob o efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de <i>C. nardus</i>	56
Figura 4.5: Crescimento fúngico de <i>A. parasiticus</i> durante 10 dias, sob o efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de <i>L. officinalis</i>	56
Figura 4.6: Crescimento fúngico de <i>A. parasiticus</i> durante 10 dias, sob o efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de <i>M. alternifolia</i>	57
Figura 4.7: Crescimento fúngico de <i>A. parasiticus</i> durante 10 dias, sob o efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de <i>M. viridiflora</i>	57
Figura 4.8: Crescimento fúngico de <i>A. parasiticus</i> durante 10 dias, sob o efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de <i>P. cablin</i>	58
Figura 4.9: Inibição do crescimento de <i>A. parasiticus</i> , por diferentes quantidades dos vários OEs estudados. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05).	58
Figura 4.10: Valores médios da velocidade de crescimento de <i>A. parasiticus</i> , sob efeito de diferentes quantidades dos OEs estudados. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c, d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05). 64	
Figura 4.11: Valores médios do tempo de crescimento Lag de <i>A. parasiticus</i> , sob efeito de diferentes quantidades dos OEs estudados. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05). 65	

Figura 4.12: Inibição da produção de AFB1 por <i>A. parasiticus</i> , por diferentes quantidades dos OEs de <i>C. nardus</i> , <i>M. viridiflora</i> , <i>M. alternifolia</i> e <i>C. zeylanicum</i> . Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05).	71
Figura 4.13: Inibição da produção de AFG1 por <i>A. parasiticus</i> , por diferentes quantidades dos OEs de <i>C. nardus</i> , <i>M. viridiflora</i> , <i>M. alternifolia</i> e <i>C. zeylanicum</i> . Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05).	72
Figura 4.14: Correlação entre o diâmetro de crescimento de <i>A. parasiticus</i> e a produção da AFB1, com os vários OEs estudados.	74
Figura 4.15: Correlação entre o teor de ergosterol fúngico e o quadrado do diâmetro das colônias fúngicas.	76
Figura 4.16: Correlação entre o teor de ergosterol fúngico e o peso seco das colônias fúngicas.	77
Figura 4.17: Contaminação visível no milho não submetido a tratamento UV: a) proliferação fúngica e b) presença de insetos.	79
Figura A1.1: Curva de calibração da AFB1 a ganho 10.	c
Figura A1.2: Curva de calibração da AFB2 a ganho 10.	c
Figura A1.3: Curva de calibração da AFG1 a ganho 10.	d
Figura A1.4: Curva de calibração da AFG2 a ganho 10.	d
Figura A1.5: Curva de calibração da AFB1 a ganho 100.	e
Figura A1.6: Curva de calibração da AFB2 a ganho 100.	e
Figura A1.7: Curva de calibração da AFG1 a ganho 100.	f
Figura A1.8: Curva de calibração da AFG2 a ganho 100.	f
Figura A1.9: Curva de calibração da AFB1 a ganho 1000.	g
Figura A1.10: Curva de calibração da AFB2 a ganho 1000.	g
Figura A1.11: Curva de calibração da AFG1 a ganho 1000.	h
Figura A1.12: Curva de calibração da AFG2 a ganho 1000.	h
Figura A1.13: Curva de calibração do ergosterol.	i

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Alimentos suscetíveis a contaminação pelas principais micotoxinas e os seus efeitos patológicos (Adaptado de [41])	18
Tabela 2.1: Alimentos suscetíveis a contaminação pelas principais micotoxinas e os seus efeitos patológicos (Adaptado de [41])- continuação	19
Tabela 4.1: Componentes principais ($\geq 1\%$) dos OEs de <i>C. zeylanicum</i> , <i>C. bergamia</i> , <i>C. sinensis</i> , <i>C. nardus</i> , <i>L. officinalis</i> , <i>M. alternifolia</i> , <i>M. viridiflora</i> e <i>P. cablin</i>	47
Tabela 4.1: Componentes principais ($\geq 1\%$) dos OEs de <i>C. zeylanicum</i> , <i>C. bergamia</i> , <i>C. sinensis</i> , <i>C. nardus</i> , <i>L. officinalis</i> , <i>M. alternifolia</i> , <i>M. viridiflora</i> e <i>P. cablin</i> - continuação	48
Tabela 4.2: Crescimento fúngico visível nas placas que foram inoculadas com 5 e 50 μL dos OEs de <i>C. zeylanicum</i> , <i>C. bergamia</i> , <i>C. sinensis</i> , <i>C. nardus</i> , <i>L. officinalis</i> , <i>M. alternifolia</i> , <i>M. viridiflora</i> e <i>P. cablin</i>	51
Tabela 4.2: Crescimento fúngico visível nas placas que foram inoculadas com 5 e 50 μL dos OEs de <i>C. zeylanicum</i> , <i>C. bergamia</i> , <i>C. sinensis</i> , <i>C. nardus</i> , <i>L. officinalis</i> , <i>M. alternifolia</i> , <i>M. viridiflora</i> e <i>P. cablin</i> - continuação	52
Tabela 4.2: Crescimento fúngico visível nas placas que foram inoculadas com 5 e 50 μL dos OEs de <i>C. zeylanicum</i> , <i>C. bergamia</i> , <i>C. sinensis</i> , <i>C. nardus</i> , <i>L. officinalis</i> , <i>M. alternifolia</i> , <i>M. viridiflora</i> e <i>P. cablin</i> - continuação	53
Tabela 4.3: Produção de AFs por <i>A. parasiticus</i> , sob efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 μL do OE de <i>C. zeylanicum</i> . Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C ($P=0,05$)	68
Tabela 4.4: Produção de AFs por <i>A. parasiticus</i> , sob efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 μL do OE de <i>C. bergamia</i> . Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C ($P=0,05$)	69
Tabela 4.5: Produção de AFs por <i>A. parasiticus</i> , sob efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 μL do OE de <i>C. sinensis</i> . Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C ($P=0,05$)	69
Tabela 4.6: Produção de AFs por <i>A. parasiticus</i> , sob efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 μL do OE de <i>C. nardus</i> . Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C ($P=0,05$)	69
Tabela 4.7: Produção de AFs por <i>A. parasiticus</i> , sob efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 μL do OE de <i>L. officinalis</i> . Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C ($P=0,05$)	70
Tabela 4.8: Produção de AFs por <i>A. parasiticus</i> , sob efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 μL do OE de <i>M. alternifolia</i> . Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's ($P=0,05$)	70
Tabela 4.9: Produção de AFs por <i>A. parasiticus</i> , sob efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 μL do OE de <i>M. viridiflora</i> . Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c, d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's ($P=0,05$)	70
Tabela 4.10: Produção de AFs por <i>A. parasiticus</i> , sob efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 μL do OE de <i>P. cablin</i> . Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c, d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's ($P=0,05$)	71
Tabela 4.11: Teor de ergosterol de amostras de milho tratadas com radiação UV e sem qualquer tratamento	78
Tabela A1.1: Limites de quantificação das AFs.....	i
Tabela A1.2: Limites de deteção das AFs	i

Tabela A2.1: Inibição do crescimento de *A. parasiticus*, por diferentes quantidades dos OEs estudados. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c, e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05).....j

Tabela A2.1: Inibição do crescimento de *A. parasiticus*, por diferentes quantidades dos OEs estudados. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c, e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05)- continuação.....k

Tabela A2.2: Valores médios da fase lag e da taxa de crescimento de *A. parasiticus*, sob efeito de diferentes quantidades dos OEs estudados. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05)k

Tabela A2.2: Valores médios da fase lag e da taxa de crescimento de *A. parasiticus*, sob efeito de diferentes quantidades dos OEs estudados. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05)-continuação.....l

Tabela A2.3: Inibição da produção de AFs por *A. parasiticus* por diferentes quantidades dos OEs estudados. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05)..... m

Tabela A2.4: Valores médios do diâmetro de crescimento e da produção de AFs por *A. parasiticus* sob efeito de diferentes quantidades dos vários OEs m

Tabela A2.4: Valores médios do diâmetro de crescimento e da produção de AFs por *A. parasiticus* sob efeito de diferentes quantidades dos vários OEs- continuaçãon

Tabela A2.5: Dados experimentais do teor de ergosterol, diâmetro e peso seco fúngico.o

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento

Os fungos são organismos eucariotas com crescimento normalmente filamentosos e com ampla disseminação na natureza. Apresentam-se como quimiorganotróficos, geralmente com exigências nutricionais simples, que garantem a sua fácil colonização e multiplicação, sob condições favoráveis [2, 3].

Apesar da constante modernização das técnicas de produção e de preservação dos alimentos, a colonização fúngica durante as práticas de pré e pós-colheita e durante as fases de processamento e armazenamento de produtos agrícolas, tem sido um motivo de preocupação constante da indústria alimentar devido à possibilidade de produção de substâncias tóxicas, genericamente designadas de micotoxinas, que comprometem a segurança dos alimentos e conseqüentemente a saúde pública [4].

As micotoxinas são produzidas como metabolitos fúngicos secundários, sob adequados fatores físicos, químicos e biológicos, e originam uma diversidade de efeitos adversos à saúde humana e animal [5, 6]. São incluídas no grupo de contaminantes naturais e são produzidas por diversas espécies de fungos, geralmente agentes patogénicos saprófitas e oportunistas. A maioria das micotoxinas que são consideradas contaminantes alimentares importantes são produzidas principalmente por três géneros de fungos: *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* [7].

Algumas estirpes de *Aspergillus*, nomeadamente *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius*, sintetizam aflatoxinas (AFs) [8]. As aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2) têm sido bastante estudadas por serem altamente cancerígenas e pelo facto de contaminarem diversos alimentos utilizados na dieta humana e animal, sendo que a sua coprodução pode resultar num efeito tóxico aditivo ou sinérgico nos consumidores, aumentando o potencial toxigénico do fungo [9].

Deste modo, a prevenção da contaminação fúngica e da conseqüente produção de AFs nos alimentos ou em rações animais é considerada fundamental, dada a persistência destes compostos. Dessa forma, torna-se necessário encontrar métodos antifúngicos e de conservação alimentar, que permitam a redução ou inibição dos agentes patogénicos e das toxinas associadas, durante o tempo de vida e de “prateleira” dos produtos alimentícios [10].

Como cada vez mais existe uma preocupação crescente por parte dos consumidores em adquirir produtos mais naturais, torna-se essencial que ocorra a substituição dos antimicrobianos sintéticos, que acarretam desvantagens significativas, por antimicrobianos de origem natural.

Neste sentido, a aplicação dos óleos essenciais (OEs) de plantas tem ganhado elevada atenção nos últimos anos, devido ao seu elevado potencial como antimicrobianos em sistemas alimentares[11, 12]. Os OEs têm ainda mostrado a propensão de supressão da biossíntese de micotoxinas produzidas por fungos toxigênicos[13].

Torna-se assim essencial que ocorra uma investigação e recolha de informações referentes à atividade antimicrobiana dos OEs em alimentos, que podem auxiliar na otimização da atividade antifúngica, verificação e prevenção de efeitos secundários indesejáveis, oriundos da sua aplicação e finalmente determinar quais os conservantes naturais mais adequados para serem utilizados em sistemas de conservação de alimentos.

1.2 Objetivos

O objetivo geral do projeto consiste na avaliação do efeito antifúngico de vários OEs (*Cinnamomum zeylanicum*, *Citrus bergamia*, *Citrus sinensis*, *Cymbopogon nardus*, *Lavandula officinalis*, *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca viridiflora* e *Pogostemon cablin*) sobre o crescimento e a consequente produção de micotoxinas por *A. parasiticus*.

Assim, os objetivos específicos do projeto focam-se em três aspetos:

- Determinação da capacidade de colonização fúngica de *A. parasiticus*, com o ajuste de um modelo matemático ao crescimento;
- Avaliação do efeito de OEs na produção e acumulação de AFs;
- Avaliação do crescimento fúngico em milho através da extração e quantificação do ergosterol;

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungos

2.1.1 Características e Importância

Os microrganismos são utilizados pela humanidade há vários milênios, na condução de processos industriais com elevado interesse comercial, devido à forte capacidade de conversão de diversos compostos de natureza diversa numa grande variedade de metabolitos finais [14]. No entanto, os microrganismos podem constituir ameaças à sobrevivência humana, quando causadores de diversas doenças.

Os fungos são um grupo diverso de organismos, consistindo em cerca de 80 000 a 120 000 espécies, embora o número total de espécies seja estimado em cerca de 1,5 milhões [15]. Estes organismos são quimiorganotróficos e apresentam exigências nutricionais simples. Apresentam *habitats* relativamente diversos, mas a maioria dos fungos vive em *habitats* terrestres, solos ou em matéria vegetal morta, de onde obtêm energia. Como resultado do seu metabolismo, os fungos também disponibilizam produtos resultantes da degradação, para ação de outros microrganismos. Por essa razão desempenham um papel crucial na mineralização do carbono orgânico na natureza, participando ativamente nos ciclos de carbono, azoto e fósforo [16].

Segundo a classificação de fungos de Alexopoulos *et al.* [17], o Reino dos fungos está dividido em quatro filos: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Basidiomycota* e *Ascomycota*. Exibem reprodução sexuada e/ou assexuada de diversas formas, bem como o fenómeno de parassexualidade, que consiste na recombinação genética na mitose. As estruturas de reprodução, denominadas de esporos, são diferentes das estruturas somáticas, exibindo uma variedade de formas que são utilizadas na sua classificação. Os esporos dos fungos carecem de um embrião, mas contêm reservas necessárias para a germinação. Diversos fungos produzem mais de um tipo de esporos, como parte dos seus ciclos de vida [18].

As paredes celulares de alguns fungos são compostas por celulose mas, no entanto, a maioria dos fungos apresenta paredes não celulósicas. A quitina e os β -Glucanos são constituintes comuns da parede celular dos fungos, além de proteínas, polissacarídeos, lipídios, polifosfatos e íons inorgânicos [19]. A membrana celular é constituída por ergosterol, um importante indicador do crescimento fúngico [20].

Os fungos exibem uma série de características em relação a outros microrganismos, que permitem a sua ampla aplicação: a capacidade de adaptação sob diferentes condições ambientais, a

necessidade de baixa atividade de água, a maior resistência à pressão osmótica e acidez e consequente tolerância a uma ampla gama de temperaturas em relação a outros microrganismos [21,22]. Deste modo, alguns processos biotecnológicos baseiam-se no metabolismo dos fungos, para o fabrico de compostos específicos, com diversas aplicações (Enzimas, Ácidos Orgânicos, Antibióticos). Também muitos processos de produção de alimentos, como fabrico do pão, vinho, cerveja e queijo dependem da atividade fúngica [14].

Por outro lado, a natureza ubíqua dos esporos fúngicos, torna-os organismos com fortes capacidades contaminantes, causando distúrbios patológicos em diversas plantas com posterior deterioração dos alimentos, o que origina perdas económicas significativas [13]. No entanto, a colonização depende de vários fatores abióticos como o pH, atividade de água (a_w), concentração de soluto, atmosfera e temperatura [13].

De forma semelhante a outros grupos patogénicos de plantas, os fungos patogénicos propagam-se, infetam, crescem e reproduzem-se sob e dentro da planta [23]. Posteriormente, são responsáveis pela formação de um sabor desagradável e perda de matéria seca dos alimentos, devido à utilização de hidratos de carbono como fonte de energia, degradação de lípidos e proteínas, produção de metabolitos voláteis e produção de compostos alergénicos, que provoca a redução da qualidade dos alimentos.

2.1.2 O género *Aspergillus*

As espécies de *Aspergillus* sempre apresentaram elevada importância, devido ao seu reconhecimento como agentes ativos em processos de decomposição e em processos de biotransformação industriais. No entanto, as espécies de *Aspergillus* também são causadoras de diversas doenças [24, 25].

Aspergillus é um género que pertence à família Trichocomaceae, ordem Eurotiales, subclasse Eurotiomycetidae, classe eurotiomycetes e filo Ascomycota, que compreende diversas espécies [25].

As espécies de *Aspergillus* são frequentemente encontradas em habitats terrestres e são comumente isoladas do solo e de resíduos vegetais associados. O processo de decomposição realizado pelas mesmas é importante na condução cíclica natural de elementos químicos, particularmente no ciclo de carbono [26].

A terminologia utilizada para retratar as características morfológicas, que permite identificar e classificar o género *Aspergillus*, foi utilizada por Klich *et al.*[27]. A maioria dos membros do género

Aspergillus são anamorfos, no entanto, alguns membros do género são teleomorfos, designação dada à forma de um fungo capaz de se reproduzir sexuadamente e assexuadamente, respetivamente [28]. Este estado é caracterizado pela produção de estruturas especializadas designadas de ascos, que contêm ascósporos. Os ascos estão situados no interior dum ascocarpo, designadamente um cleistotécio [1] (Figura 2.1).

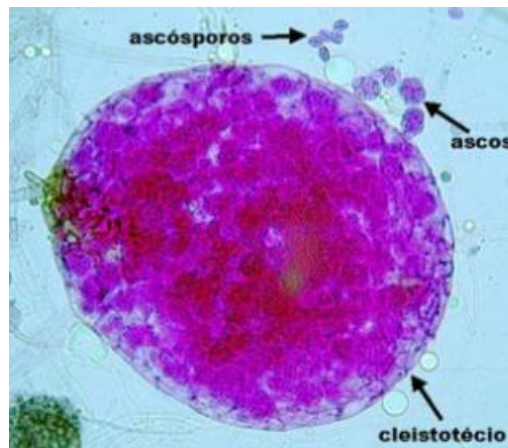


Figura 2.1: Representação de um cleistotécio, ascos e ascósporos soltos de um *Aspergillus* [1].

As espécies de *Aspergillus* que se reproduzem sexuadamente podem designar-se por homotáticas ou heterotáticas, consoante a necessidade de cruzamento com um parceiro compatível. As espécies homotáticas não exibem essa mesma necessidade, pois ambos os núcleos são derivados do mesmo indivíduo [29].

A reprodução assexuada é no entanto o seu modo mais comum de reprodução, sendo caracterizada pela produção de fiálides pelas hifas especializadas, inseridas na vesícula, sendo as fiálides responsáveis pela produção de esporos assexuais ou conídios em cadeia, que funcionam como estrutura de propagação [25] (Figura 2.2).

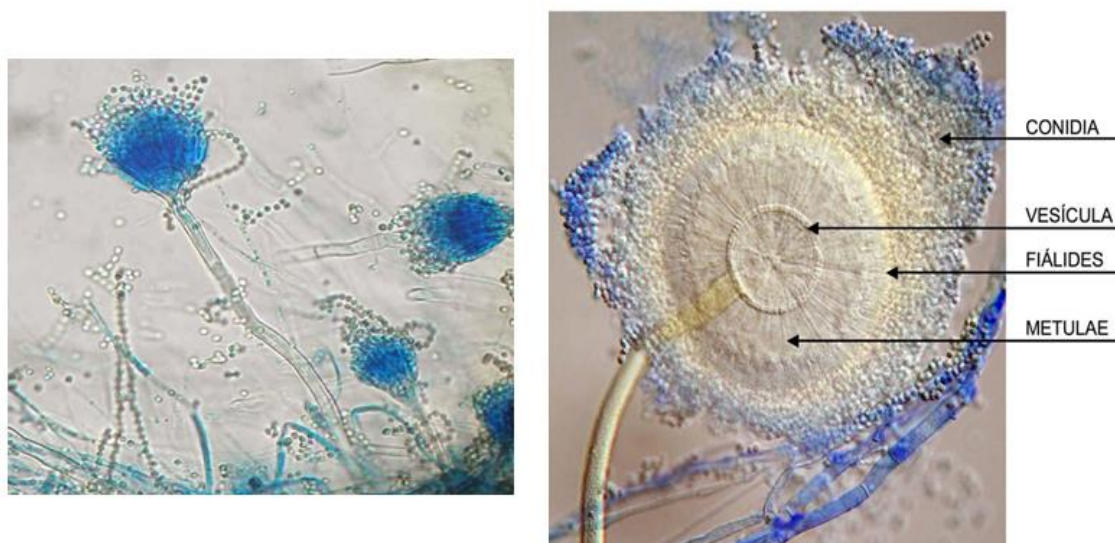


Figura 2.2: Principais características dos conidióforos de *Aspergillus* (Adaptado de [1]).

Os esporos são transportados pelo vento e são dispersos no ambiente, até que se depositam numa superfície. Se as condições forem favoráveis, o esporo pode germinar [26]. Alguns membros do género *Aspergillus* conseguem sobreviver e hibernar sob a forma de micélio ou de estruturas resistentes conhecidas como esclerócios. A germinação dos esclerócios pode realizar-se para o desenvolvimento de micélio, para a produção de esporos assexuais (conídios) ou para a produção dos corpos de frutificação sexuais (ascocarpos) [30].

A dispersão aérea dos seus conídios está associada a infeções de culturas como milho, amendoim, nozes, cereais, oleaginosas e frutos [7, 31]. A colonização é ainda reforçada pelas picadas presentes nas plantas, danos mecânicos e físicos, devido ao ataque de insetos e pássaros, ou por fatores climáticos que aumentam a suscetibilidade da planta, criando pontos de entrada ao fungo [1, 31].

Segundo Peterson *et al.* [32] o género *Aspergillus* é dividido em oito subgéneros, nomeadamente: *Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati*, *Nidulantes*, *Ornati*, *Candidi*, *Terrei* e *Warcupi*. Dentre destes subgéneros destaca-se o *Circumdati* secção *Flavi*, do qual fazem parte espécies com forte impacto económico e de saúde pública.

2.1.2.1 *Aspergillus* secção *Flavi*

Considerando a tradicional identificação, baseada na caracterização morfológica e bioquímica, o grupo *Aspergillus* subgénero *Circumdati* secção *Flavi* é constituído por várias espécies, sendo *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus zonatus*, *Aspergillus*

clavato-flavus, *Aspergillus tamaris*, *Aspergillus flavo-furcatis*, *Aspergillus subolivaceus*, *Aspergillus avenaceus* e *Aspergillus nomius*, consideradas como as espécies mais importantes [24].

Em 2012, surgiu um estudo de isolamento de três novas espécies a partir de milho e amêndoas, em Portugal, nomeadamente *Aspergillus mottae*, *Aspergillus sergii* e *Aspergillus transmontanensis* [33].

A taxonomia de *Aspergillus* secção *Flavi* é complexa e encontra-se em constante evolução. O rigor e a estabilidade da sua identificação é importante, de forma a manter um sistema taxonómico prático e confiável quer para fins industriais, regulamentares e económicos. Apesar dos avanços recentes na taxonomia fúngica, a identificação de estirpes de *Aspergillus* secção *Flavi* tem sido baseada nas suas características morfológicas e bioquímicas [34].

Assim, a secção *Flavi* está dividida em dois grandes grupos que inclui as espécies economicamente importantes, utilizadas em processos industriais/ fermentação, como *A. oryzae* e *A. sojae* e as espécies que acarretam impacto à saúde humana, como *A. parasiticus* e o *A. flavus*, por causarem danos nos produtos alimentares armazenados, sendo consideradas dessa forma, como as duas espécies com maior importância para a agricultura [28, 30, 35].

As colónias de *A. flavus* são geralmente de cor amarela-verde à superfície exterior e à superfície inferior apresentam coloração vermelho-castanho. Normalmente o crescimento das hifas ocorre por ramificação, com produção do micélio. Os conidióforos apresentam-se como incolores, de comprimento variável, ásperos, unisseriados ou bisseriados, produzindo conídios com paredes relativamente finas, com formas esféricas e elípticas [24, 36].

Devido à sua complexidade morfológica, *A. flavus* pode ser classificado em dois grandes grupos fenotípicos, com base nas características dos escleródios produzidos. O primeiro grupo consiste em estirpes L com pouca produção de escleródios, mas com diâmetros superiores a 400 µm. O segundo grupo consiste em estirpes S com produção de numerosos escleródios inferiores a 400 µm [37].

Relativamente ao *A. parasiticus*, as suas colónias apresentam-se verdes escuras, apresentando conidióforos de comprimento variável, produzindo conídios esféricos, com paredes bastante ásperas [28, 36].

Como já referido anteriormente, a composição atmosférica e as condições climáticas exercem um forte impacto sobre o crescimento fúngico, sendo a humidade e a temperatura as variáveis condicionantes mais importantes. Assim, *A. flavus* apresenta melhor crescimento com uma a_w em torno de 0,86 e 0,96 [38]. A temperatura ótima para o seu crescimento é normalmente 37°C, no

entanto, pode ainda ser observável crescimento em temperaturas que variam entre os 12 e os 48°C [24]. No caso do *A. parasiticus*, a temperatura ótima de crescimento encontra-se nos 31°C, podendo ser observável crescimento em temperaturas entre os 6 e os 42°C. A a_m mínima e máxima de crescimento ronda os 0,80 e 0,90, respetivamente [39].

Apesar de *A. parasiticus* ser mais limitado geograficamente do que *A. flavus*, ambos podem ser encontrados em diversos substratos alimentares, como amendoim, milho, sementes de algodão, sementes oleaginosas, trigo, girassol e sorgo [40].

A importância económica e toxicológica dada a *A. parasiticus* e *A. flavus* é devida ao facto de se apresentarem como os maiores produtores de compostos químicos com propriedades prejudiciais. Associado a essas propriedades dos fungos, existe uma preocupação acrescida, pois, ao infetarem importantes culturas, podem produzir concentrações suficientes destes compostos químicos indesejáveis, que são introduzidos na dieta alimentar animal e humana.

2.2 Micotoxinas

A colonização e infeção fúngica de produtos alimentícios utilizados na dieta humana e animal tem causado preocupação na indústria alimentar, não só pela degradação e perda de qualidade dos alimentos, que origina perdas económicas significativas, mas também devido à formação de substâncias metabólicas tóxicas, que podem originar efeitos adversos tanto à saúde humana como animal [25].

As substâncias metabólicas tóxicas, oriundas naturalmente do crescimento e infeção fúngica, são sintetizadas e removidas através de um conjunto de vias metabólicas secundárias, não essenciais ao crescimento e sobrevivência do fungo [1]. Esses metabolitos naturais contaminantes, produzidos por fungos, com propriedades tóxicas, são denominados de micotoxinas [41, 42].

O termo micotoxina foi conhecido em 1962, na sequência de uma crise veterinária incomum em Inglaterra, que originou a morte de cerca de 100 000 perus. A descoberta que a doença dos perus tinha sido causada por farinha de amendoins contaminados por uma micotoxina fúngica, impulsionou a micotoxicologia, devido à implicação destes metabolitos na saúde humana e animal [5, 6, 27].

Dependendo da estrutura e da origem biológica, as micotoxinas podem ser classificadas em quatro categorias: policétidos, terpenos, ciclopéptidos e metabolitos azotados [4]. As micotoxinas apresentam baixo peso molecular e são de difícil controlo em alimentos. A sua funcionalidade não

se encontra completamente estabelecida, no entanto, crê-se que são importantes na eliminação de outros microrganismos competidores, que funcionam como sinais químicos entre as espécies de um nicho ecológico e podem ainda desempenhar função no estabelecimento das espécies de um dado nicho [43].

Diversos fatores contribuem para a contaminação por micotoxinas (Figura 2.3), sendo que a exposição dos animais e humanos a estas substâncias tóxicas ocorre por todo o mundo, quer através de inalação e ingestão de alimentos contaminados ou através de absorção pela pele [24, 33, 41].

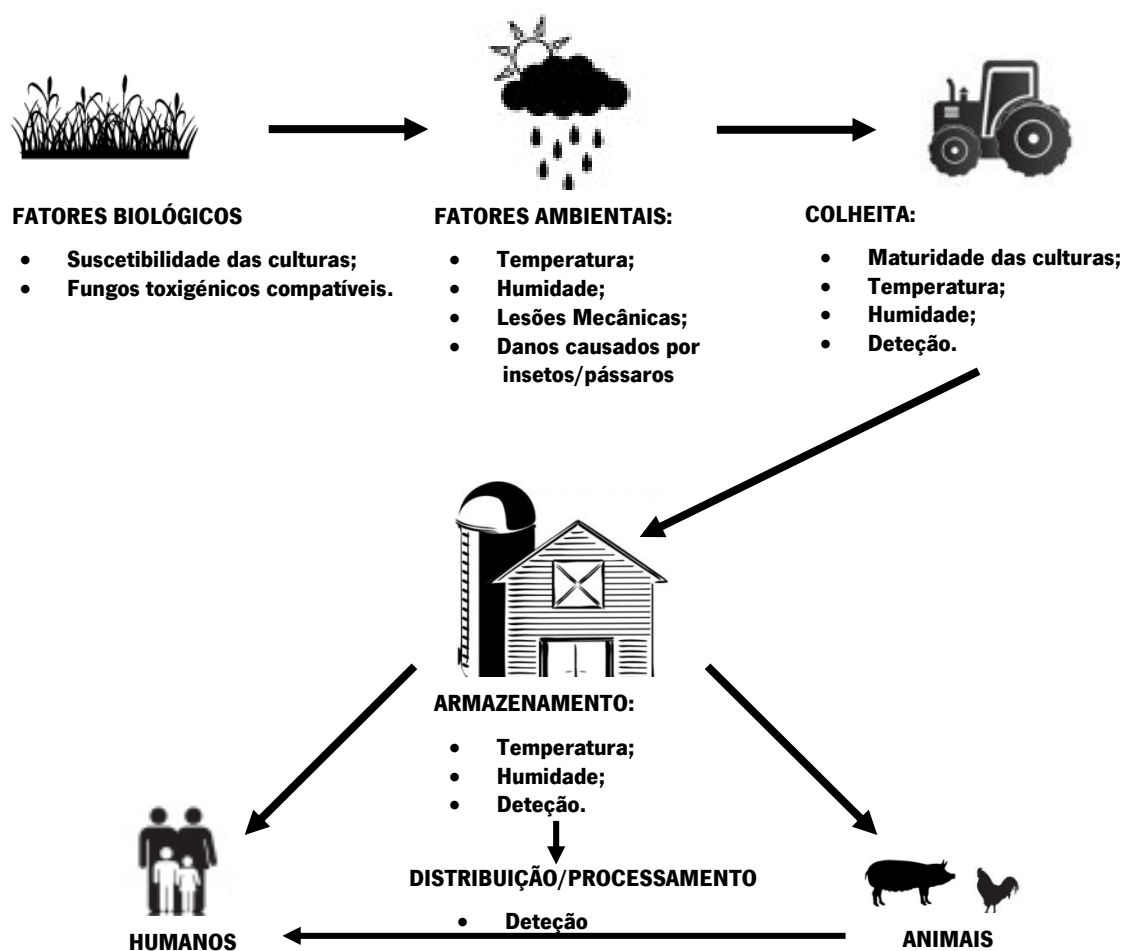


Figura 2.3: Fatores que afetam a ocorrência de micotoxinas na cadeia alimentar (Adaptado de [44]).

Assim, as micotoxinas entram na dieta humana e animal, essencialmente por contaminação direta ou indireta de cultivares de cereais, nozes, frutas secas, café, cacau, especiarias, sementes oleaginosas, ervilhas, feijões e frutos. Podem também afetar alimentos processados como sumos de fruta, cerveja, vinho, carne, ovos, leite e queijo, como resultado da utilização de matérias-primas

contaminadas ou até mesmo como resultado da utilização de ração animal contaminada, que conseqüentemente gera uma contaminação de produtos alimentares de origem animal [4, 45].

A contaminação de culturas por micotoxinas pode ocorrer de duas formas distintas, sendo a primeira caracterizada pelo crescimento dos fungos como patogênicos e a segunda caracterizada pelo crescimento saprófito dos fungos em culturas armazenadas [46]. Da mesma forma, a contaminação por micotoxinas pode ocorrer ao longo de fases distintas da produção alimentar: 1) no cultivo agrícola, em qualquer época do crescimento e durante a colheita; 2) durante o processamento, a desidratação, o embalamento, o armazenamento e o transporte dos alimentos. É importante referir que as micotoxinas podem permanecer no alimento mesmo após a destruição dos fungos produtores [3, 31, 47].

O conhecimento acerca das características ecofisiológicas dos fungos é outro fator de extrema importância na predição de contaminações por micotoxinas, sendo fatores como a temperatura, pH, teor de água no substrato, humidade relativa, concentrações de inóculo, interações microbianas e danos provocados por insetos ou mecânicos, considerados de extrema importância na produção de micotoxinas [48, 49]. Outros fatores como práticas de colheita pobres, secagens inadequadas, manuseio, embalamento, armazenamento e condições de transporte contribuem para o crescimento fúngico e para um aumento do risco de produção de micotoxinas [4].

Dessa forma, não é possível descrever um único conjunto de condições que favoreçam o crescimento e produção de micotoxinas por fungos, dado que estes diferem entre si nas características ecológicas, bioquímicas e nichos ecológicos.

Os fungos que produzem toxinas em alimentos são classificados em fungos de campo e fungos de armazenamento, com base nos requisitos ecológicos para o seu crescimento. Os fungos de campo colonizam os alimentos durante a fase de pré-colheita e requerem teores de humidade acima dos 20% e temperaturas entre 20 e 25°C. Para um crescimento ativo necessitam de a_w superiores a 0,85 e para um crescimento ótimo necessitam de a_w perto de 0,99. As mais importantes espécies de campo pertencem ao género *Alternaria*, *Cladosporium* e *Fusarium*. Os fungos de armazenamento requerem teores de humidade de 13 a 18%, equivalente a 70-90% de humidade relativa e temperaturas mais elevadas, sendo as espécies de fungos de armazenamento mais representantes, pertencentes aos géneros *Aspergillus* e *Penicillium* [6, 50]. A a_w mínima tolerada pela maioria das espécies varia entre 0,75-0,85, apresentando crescimento ótimo com a_w entre 0,93-0,98 [50].

A micotoxicose é o termo genérico utilizado para definir a doença causada por ingestão de alimentos ou rações, contaminados com micotoxinas. Embora a maioria dos relatos de micotoxicoses tenham sido devido à ingestão de alimentos contaminados, a inalação de micotoxinas e o contacto com a pele podem também originar a doença [27].

As micotoxinas são normalmente metabolizadas no fígado, nos rins e no trato digestivo. A exposição a micotoxinas pode originar efeitos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, citotóxicos, neurotóxicos, nefrotóxicos, estrogénicos e imunossupressores [50]. De forma geral causam *stress* nas células imunitárias e interferem na síntese de proteínas, produzindo efeitos que vão desde a sensibilidade da pele ou necrose. No entanto, o efeito da exposição a estas substâncias depende da dose de exposição e também de possíveis sinergias toxicológicas que possam advir da exposição a diversas micotoxinas simultaneamente. Assim, quando ingeridas em doses baixas, as micotoxinas geram morte ou apoptose celular, resultando num aumento da suscetibilidade a infeções por microrganismos patogénicos. Em elevadas doses de exposição, as micotoxinas podem originar lesões hepáticas, que interferem nas funções normais de alguns órgãos, e danos cerebrais [2, 5, 50]. A replicação do DNA pode também ser afetada, com efeitos mutagénicos e teratogénicos, que podem levar a morte [5]. Os sintomas gerais de micotoxicoses em humanos são vómitos, diarreia e outros problemas gastrointestinais [4].

No caso animal, o uso de ração contaminada com micotoxinas leva à diminuição da absorção de nutrientes no trato digestivo, diminuição da ingestão de alimentos, redução do peso corporal, redução da produtividade animal, danos em órgãos vitais, aumento da incidência da doença, devido à imunossupressão, interferência da capacidade de reprodução e finalmente a contaminação de alimentos de origem animal, utilizados na dieta humana, como carne e leite [3, 51].

As abordagens para prevenir micotoxicoses incluem estratégias de pré e pós-colheita [52]. A melhor forma seria em primeiro lugar, a prevenção da formação de micotoxinas no campo, suportada por rotação das culturas. Em caso de manifestação da toxina, são necessárias medidas específicas contra certos tipos e grupos de toxinas. A abordagem mais prevalente para diminuir as micotoxinas na indústria de alimentos para animais poderia partir pela inclusão de materiais adsorventes na alimentação, para uma remoção mais ou menos seletiva por meio de adsorção no interior do percurso trato -gastrointestinal, ou pela inclusão de enzimas ou microrganismos capazes de eliminar ou degradar determinadas micotoxinas [53].

Dependendo da definição utilizada e reconhecendo que a maioria das toxinas fúngicas ocorre em famílias de metabolitos quimicamente relacionados, cerca de 300 a 400 compostos são reconhecidos como micotoxinas [27]. No entanto, apenas algumas recebem regularmente atenção e são encontradas nos alimentos em quantidades suficientes para constituir ameaça à saúde pública [50]. Na tabela 2.1 estão representadas as principais classes de micotoxinas, os alimentos suscetíveis a contaminação e os efeitos patológicos oriundos da exposição.

Tabela 2.1: Alimentos suscetíveis a contaminação pelas principais micotoxinas e os seus efeitos patológicos (Adaptado de [41])

Micotoxina	Alimentos suscetíveis	Efeitos patológicos
Aflatoxinas (B1, B2, G1 G2, M1 e M2)	Amendoins, milho, arroz, trigo, algodão, copra, nozes, leite, ovos, queijo, figos.	Hepatoxicidade; Hiperplasia dos ductos biliares; Hemorragia renal e do trato intestinal; Carcinogénese (tumores no fígado).
Ocratoxina A	Cereais (trigo, cevada, aveia e miho), feijões desidratados, amendoins com bolor, queijo, tecidos porcinos, café, passas, uvas, frutos secos, vinho.	Nefrotoxicidade (necrose tubular do rim); Nefropatia porcina; Danos no fígado; Enterite; Teratogénese; Carcinogénese (tumores renais e tumores do trato urinário).
Zearalenona	Milho.	Efeitos estrogénicos (edema da vulva, prolapse da vagina, alargamento do útero); Atrofia dos testículos; Atrofia dos ovários; Aumento das glândulas mamárias; Aborto.
Fumonisinias	Milho e derivados, chá preto.	Leucoencefalomalacia e edema pulmonar Carcinogénese (cancro do esófago).
Tricotecenos (toxina T-2, diacetoxiscirpenol, neosolaniol, nivalenol, diacetilnivalenol, DON, toxina HT-2, fusarenona X)	Milho, trigo, cevada, aveia.	Perturbações digestivas (emesia, diarreia, recusa de alimentos); Hemorragias (estômago, coração, intestinos, pulmões, bexiga e rins); Edema; Lesões orais; Dermatite; Desordens sanguíneas (leucopenia).

Tabela 2.1: Alimentos suscetíveis a contaminação pelas principais micotoxinas e os seus efeitos patológicos (Adaptado de [41])- continuação

Micotoxina	Alimentos suscetíveis	Efeitos patológicos
Alcalóides do ergot (clavinas, ácidos lisérgicos, amidas de ácido lisérgico, ergopeptinas)	Cereias (trigo e centeio), milho miúdo.	Ergotismo (síndrome nervose e gangrena)

2.2.1 Aflatoxinas (AFs)

Dentre as toxinas encontradas nos alimentos, as AFs são consideradas como as mais importantes, devido ao seu elevado nível de toxicidade. As principais AFs naturais são denominadas de B1, B2, G1 e G2. A nomenclatura das AFs é baseada na coloração da sua fluorescência sob luz ultravioleta, quando adsorvidas em placas de sílica gel. Assim, as AFs B1 e B2 apresentam fluorescência azul e as AFs G1 e G2 apresentam fluorescência esverdeada. Os números indicam a distância de migração relativa através de cromatografia de camada fina [28, 47].

O crescimento de fungos aflatoxigénicos e a biossíntese de AFs é totalmente dependente das condições de crescimento e das condições atmosféricas. A combinação particular dos parâmetros de crescimento externo, como a temperatura, humidade no ambiente, pH, a_w , composição do substrato e atmosferas modificadas, apresenta bastante importância na produção de AFs [7]. As AFs têm uma elevada presença em regiões tropicais e subtropicais, onde as condições de humidade e temperatura são as ideais para a sua produção [4].

As AFs são encontradas numa ampla gama de produtos agrícolas importantes, incluindo cereais (milho, sorgo, cevada, arroz, trigo), especiarias (pimenta, pimenta preta, coentro, açafrão, gengibre), oleaginosas (soja, girassol, caroço de algodão), frutos de casca rija (amêndoas, pistachos, nozes, coco), leite (humano e animal), e manteiga [3, 4]. A contaminação de produtos agrícolas por AFs pode ser dividida em duas fases, sendo que na primeira fase ocorre a infeção das culturas e na segunda fase, após maturação, pode ocorrer a produção de AFs. Diversas condições ambientais afetam a fisiologia das plantas e favorecem a infeção e suscetibilidade das culturas [54]. Dentre elas é referido que o *stress* hídrico induz o aumento da produção de prolina nas plantas, sendo este composto relatado como um indutor da produção de AFs [55]. A suscetibilidade das culturas e do hospedeiro pode também dever-se a lesões nas culturas em desenvolvimento. Estas condições podem também favorecer a colonização fúngica em partes vegetais senescentes. A segunda fase, referente à contaminação por AFs pode ocorrer em qualquer momento desde a maturação da cultura até ao consumo do alimento processado. Esta

fase observa-se quando a cultura madura é exposta a ambientes quentes e húmidos, quer no campo, durante o transporte, armazenamento ou durante o próprio uso. Sob alta humidade as sementes secas adquirem conteúdo de água propício à contaminação e produção de AFs [54].

A aflatoxicose é caracterizada pelo envenenamento causado pela ingestão de AFs [56]. Como todas as síndromes toxicológicas, a contaminação por AFs pode ser classificada em aguda ou crónica. A toxicidade crónica é caracterizada por uma baixa exposição a AFs por um longo período de tempo, enquanto a toxicidade aguda apresenta um início rápido e uma reação tóxica óbvia.

A exposição a AFs fomenta a supressão do sistema imunitário, carcinogénese, teratogénese, mutagénese e em casos de exposição aguda grave até mesmo a morte [31, 54, 57]. A AFB₁, de entre todas as AFs, é usualmente a que apresenta maior ocorrência, toxicidade e concentração nos alimentos [5, 50]. Devido ao facto de ser bastante lipossolúveis, a AFB₁ é facilmente absorvida a partir do local de exposição (usualmente no trato gastrointestinal), para a corrente sanguínea que a distribui até ao fígado, onde é metabolizada, antes da sua excreção através da urina ou fezes. No fígado a AFB₁ é hidroxilada em outras toxinas, transmissíveis para produtos alimentares de origem animal, como as AFM₁, AFQ₁, AFP₁ e AFB₁ [6]. Como exemplo é referido que cerca de 1 a 6% da quantidade de AFB₁ absorvida por uma vaca leiteira é excretada no leite, sob a forma de AFM₁ [58]

A AFB₁ provoca alterações orgânicas que originam hemorragias, além de lesões nos hepatócitos, que pode induzir tumores em várias espécies de animais [59]. A ingestão de baixas quantidades por um longo período determina uma baixa conversão alimentar, imunodepressão, cancro hepático e efeitos teratogénicos [25]. Finalmente estas micotoxinas parecem ainda estar associadas a um tipo de encefalopatia que surge em crianças (Síndrome de Rey), cujos sintomas são febre, dor de garganta, tosse, rinorreia, vómitos e distúrbios do ritmo cardíaco [3, 27].

A contaminação por AFs antes e após a fase de colheita pode ser reduzida, através da alteração das condições de cultura e da introdução de boas práticas de produção e armazenamento, que limitem o desenvolvimento de fungos aflatoxigénicos [60]. Qualquer prática de gestão para maximizar o desempenho da planta e minimizar o *stress* exercido na mesma, diminuirá a contaminação por AFs.

Devem ser determinadas as práticas adequadas de colheita, o momento que deve ser efetuada, bem como as práticas adequadas de armazenamento. As culturas devem ser secas imediatamente à colheita, com limpeza do material em contacto com a cultura antes do transporte, de forma a

evitar fontes de inóculo posteriores. Em condições de armazenamento, o controlo de humidade e temperatura é essencial para prevenir a produção de AFs [1].

O nível máximo admissível de AFB1 em cereais, amendoins, frutos secos e nozes, quer para consumo humano direto ou como ingrediente em alimentos, foi definido pela comissão europeia como 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a totalidade de AFs (AFB1, AFG1, AFB2 e AFG2) e 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a AFB1. Para o leite estabeleceu-se 0,05 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para a AFM1. Novos limites foram estabelecidos para a AFB1 em alimentos para bebés (0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e alimentos para animais (1 $\mu\text{g kg}^{-1}$) [61, 62].

2.2.1.1 *A. parasiticus* como produtor de AFs

Com base na produção de AFs, Giorni *et al.*[22] propuseram a classificação de *Aspergillus* seção *flavi* em sete grupos distintos: o *chemotype* I produtor de AFB1 > AFB2 e CPA, o *chemotype* II produtor de AFB1 < AFB2 e CPA, o *chemotype* III produtor de AFB, o *chemotype* IV produtor de CPA, o *chemotype* V não-produtores, o *chemotype* VI produtores de AFB, AFG e CPA e o *chemotype* VII produtores de AFB e AFG.

A biossíntese de AFs é complexa e envolve aproximadamente 17 genes e os seus produtos. As vias de produção e os genes envolvidos são idênticos entre as espécies de *Aspergillus* mais produtoras de AFs, com a exceção do *A. parasiticus*, em que a AFB1 é convertida por monoxigenase nas AFG1 e AFG2 [63]. Assim, é relatado que quase toda a totalidade das linhagens de *A. parasiticus* conhecidas são produtoras das quatro AFs (B1, B2, G1 e G2) [64]. Além disso, vários autores indicam que isolados não toxigénicos de *A. parasiticus* são extremamente raros [63, 65].

Como já anteriormente retratado, a produção de AFs resulta da combinação de vários fatores como a espécie fúngica, o substrato de crescimento e o meio ambiente. Os fatores que afetam a produção de AFs podem ser de carácter físico, nutricional e biológico.

Os fungos produtores de AFs mostram elevadas variações nas necessidades de crescimento. No caso do *A. parasiticus*, a gama de temperaturas mínima para o crescimento e produção de AFs é de 6 a 8°C e o máximo de 44 a 66°C, sendo a temperatura ótima de 25 a 35 °C. Como esta temperatura ótima está presente em zonas de temperatura quente, o crescimento e produção de AFs por *A. parasiticus* são um problema muito maior nas regiões tropicais [3, 4]

Schmidt-Heydt *et al.*[66] estudaram a influência da combinação de fatores como a temperatura e a_w no crescimento e produção de AFs por *A. parasiticus*. Foi verificado que a temperatura ótima de crescimento foi de 35°C, mas no entanto, a temperatura ótima de produção de AFG1 e AFB1

apresentou-se entre 20 a 30°C no caso da AFG1 e 37°C no caso da AFB1. Estes resultados foram justificados pelo facto de as condições externas terem apresentado um efeito diferencial no crescimento do fungo e na produção das AFs estudadas.

A humidade do substrato e a humidade relativa constituem também pontos críticos na produção de AFs. Num estudo publicado em 2001, onde foi estudado o efeito da humidade inicial e a humidade relativa na produção de AFs por *A. parasiticus* em grãos de milho, verificou-se uma superior produção de AFs com teor de humidade de cerca de 12,7 a 14% e humidade relativa de 80% [67].

No entanto, a presença do fungo nos alimentos não implica obrigatoriamente a produção da micotoxina, além do facto de existir a possibilidade de a micotoxina poder estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo. Assim, tanto para o crescimento do fungo quanto para a produção das micotoxinas são necessárias condições especiais que favoreçam seu desenvolvimento e por conseguinte, a produção das mesmas [68].

2.3 Extratos de plantas como conservantes alimentares

Existe um crescente interesse por parte da indústria alimentar na exploração de novos métodos de redução e eliminação de agentes patogénicos contaminantes, de modo a evitar as implicações sociais e económicas de surtos de origem alimentar.

Os químicos sintéticos foram usados por décadas em diversos estudos, no controlo do crescimento de *Aspergillus* e na redução da produção de AFs em produtos agrícolas [69, 70]. No entanto, o seu uso indiscriminado e excessivo pode levar ao desenvolvimento de patogénicos resistentes, resultando na utilização de maiores quantidades destes compostos e consequentemente aumentando o teor de resíduos tóxicos presentes nos alimentos e no ambiente, acarretando efeitos nefastos na saúde humana [45].

Soma-se ao facto anteriormente descrito, a exigência da sociedade no consumo de produtos mais naturais, com menos aditivos, menos resíduos químicos e também com baixo impacto ambiental [12]. Todos estes factos associados às restrições impostas pelas agências reguladoras têm levado a pesquisa de novos agentes antimicrobianos, com imagens mais naturais e que oferecessem também uma melhor segurança dos produtos.

Os fitoquímicos e extratos naturais de plantas têm despertado o interesse da indústria alimentar, como antimicrobianos naturais, devido ao facto de serem reconhecidos como seguros (GRAS) e

serem ambientalmente amigáveis [71]. Assim, estes agentes antimicrobianos naturais poderão ser úteis na prevenção da proliferação de agentes patogênicos e assim, aumentar o tempo de prateleira dos alimentos [11].

Os metabolitos produzidos pelas plantas apresentam-se como uma alternativa promissora, dado que são sintetizados como parte do seu desenvolvimento, em resposta ao *stress* abiótico, interação com outros organismos ou em resposta ao ataque por patogênicos [72].

2.3.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais de plantas são uma complexa mistura de compostos aromáticos voláteis com baixo peso molecular. Podem ser extraídos de diversas partes das plantas, como as flores, raízes, folhas, sementes, cascas, frutos e madeira [12, 73].

A maior utilização de OEs na União Europeia tem sido em alimentos (aromatizantes), em perfumes (fragâncias e aftershaves) e na farmacêutica, devido às suas propriedades funcionais [12].

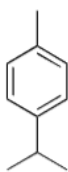
Os óleos voláteis de plantas são geralmente isolados a partir de plantas não lenhosas por métodos de destilação, normalmente vapor ou hidrodestilação, e podem ser categorizados de acordo com a estrutura química: os terpenos, os terpenóides, os alcaloides, os monoterpenos, os ácidos fenólicos, os carotenoides e as isoflavonas [11, 74, 75]. Os OEs podem conter entre 20- 60 componentes em diferentes concentrações, sendo caracterizados por apresentarem dois ou três componentes principais em concentrações relativamente elevadas (Terpenos e Terpenóides), em comparação com outros componentes presentes em quantidades vestigiais (alcaloides, ácidos fenólicos, carotenoides, isoflavonas) (Figura 2.4) [76, 77].

Os Terpenos são o maior grupo de compostos naturais de plantas e o mais valioso, caracterizados por uma elevada variedade de tipos estruturais [78]. Apresentam uma fórmula geral de hidrocarbonetos $(C_5H_8)_n$ formados a partir de unidades de isopreno. Estes compostos podem ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos ou tricíclicos [77]. Com base na diversidade da sua estrutura química, podem ser classificados em monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}) e diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}). A maioria dos componentes dos OEs (cerca de 90%) são monoterpenos [76].

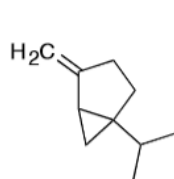
1. Terpenos Monoterpenos

Hidrocarbonetos monocíclicos

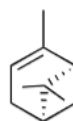
Cimeno



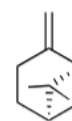
Sabineno



α - pineno

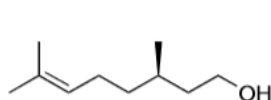


β - pineno

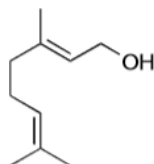


Álcoois acíclicos

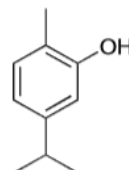
Citronelol



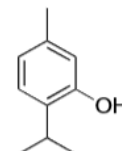
Geraniol



Carvacrol



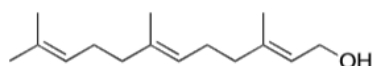
Timol



Sesquiterpenos

Hidrocarbonetos

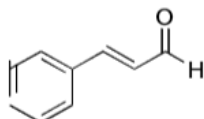
Farnesol



2. Compostos Aromáticos

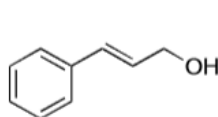
Aldeídos

Cinamaldeído



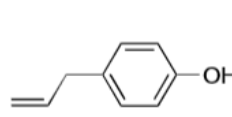
Álcoois

Álcool Cinamílico

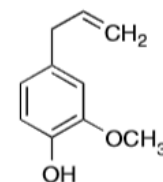


Fenóis

Chavicol

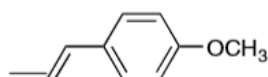


Eugenol

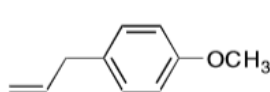


Metioxi derivative

Anetol

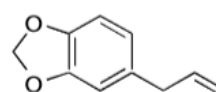


Estragol



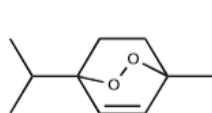
Dioxi metileno

Safrol



3. Terpenóides

Ascaridol



Mentol

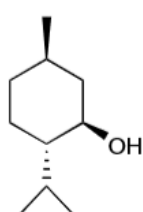


Figura 2.4: Estruturas químicas de alguns componentes dos OEs (Adaptado de [76]).

Assim, os vários componentes dos OEs desempenham um papel fundamental na definição da sua fragância, densidade, textura, cor e penetração [76, 79].

As plantas produtoras de OEs são classificadas em famílias, de acordo com as suas características comuns. Os OEs das plantas das famílias Asteraceae, Rutaceae, Liliaceae, Lamiaceae, Verbanaceae, Lauraceae, Cupressaceae, Apiaceae, Poaceae, Moringaceae, Zingiberaceae, Ranunculaceae, Theaceae, Meliaceae, Myrtaceae e Piperaceae, apresentam uma forte importância medicinal mas também antimicrobiana [80].

2.3.1.1 *Cinnamomum zeylanicum*

Cinnamomum zeylanicum é uma árvore selvagem que cresce na Índia, Madagascar, Sri Lanka e Indochina, pertencente à família Lauraceae [81].

O óleo essencial (OE) da folha de *C. zeylanicum* apresenta um vasto uso na perfumaria e na alimentação, devido às suas propriedades aromáticas e condimentares além de ser, popularmente utilizada como estimulante, tônico, carminativo e antiespasmódico [82].

Num estudo publicado em 2005, foram identificados os compostos que representavam o OE da folha de *C. zeylanicum*. Os maiores componentes identificados foram o eugenol (60%), o β -cariofileno (8,3%), o linalol (7,0%), o α -pineno (4,4%), o α -felandreno (4,1%), o limoneno (2,9%), o *p*-cimeno (2,4%), o α -humuleno (2,3%) e o β -pineno (1,9 %) [83].

2.3.1.2 *Citrus bergamia*

Citrus bergamia vulgarmente conhecida como Bergamota é uma variedade de laranja amarga, da família Rutaceae e nativa da Itália [84].

Os OEs de *Citrus* são obtidos como subprodutos do processamento de citrinos, apresentando-se como os mais utilizadas no mundo, em alimentos, bebidas e cosméticos. De facto, entre a grande variedade de OEs, os de *Citrus* e os seus principais componentes têm ganho forte aceitação na indústria alimentar, uma vez que são reconhecidos como seguros [85].

O OE de *C. bergamia* é composto por uma fração volátil e não-volátil, com forte aplicação em cosméticos, indústrias alimentícias e farmacêutica [86].

Sawamura *et al.* [84] detetaram 58 compostos no OE de *C. bergamia*, sendo 55 desses compostos identificados e quantificados. Na mesma análise, 57,1 % do óleo corresponderam a hidrocarbonetos: 13 monoterpenos (55,5%) e 8 sesquiterpenos (1,6%). Também foram detetados

8 ésteres (30,4%), 5 óxidos (0,27%), 10 álcoois (9,5%), 4 cetonas (0,21%) e 6 aldeídos (0,5%). O composto mais abundante do óleo foi o limoneno (37,2%), seguido do linalilo (30,1%), linalol (8,8%), γ -terpineno (6,8%) e β -pineno (6,2%).

2.3.1.3 *Citrus sinensis*

Citrus sinensis é uma planta aromática herbácea pertencente à família Rutaceae, vulgarmente conhecida como laranja doce. Presume-se que é originada do Sul da China, região nordeste da Índia ou talvez do Sudeste da Ásia [87].

Relativamente à sua composição química, o OE de *C. sinensis* apresenta como componente maioritário o limoneno (88,19%), seguindo-se o α -pineno (6,37%), o *p*-cimeno (2,37%), o citral (3%), o isopropanol (0,91%), o α -terpineol (0,71%), o metanol (0,37%) e o linalol (0,018%) [88].

Estudos indicam que o óleo oriundo da folha e da flor de *C. sinensis* apresentam atividade anticancerígena, anti-espasmódica, sedativa e tranquilizante. Já o OE oriundo da casca de *C. sinensis* apresenta um efeito tónico, redução do colesterol e estimulante vascular [89].

Os OEs de *C. sinensis* são ainda utilizados na transmissão de aroma e sabor a laranja para diversos produtos, tais como bebidas, gelados, purificadores de ar e perfumes [90]. Também é relatado que o óleo de *C. sinensis* apresenta propriedades fumigantes [91].

2.3.1.4 *Cymbopogon nardus*

Cymbopogon nardus vulgarmente conhecida como Citronela é uma das espécies de *Cymbopogon* da família Poaceae conhecida pelo aroma de limão das suas folhas. Normalmente é cultivada na Índia, Sri Lanka, Burma e Indonésia e o seu OE tem sido amplamente utilizado como repelente de mosquitos, fumigante doméstico, em alimentos, bebidas, perfumaria, produtos de higiene, corporais e farmacêuticos [92, 93].

Num estudo publicado em 2003, foram identificados 35 componentes no OE de *C. nardus*, dos quais 29 compunham 92,7% do óleo. O óleo continha 16 monoterpenos (79,8%), 9 sesquiterpenos (11,5%) e 4 compostos não terpénicos (1,4%). Os componentes maioritários identificados foram o citronelal (29,7%), geraniol (24,2%), terpineol (9,2%), *cis*-sabineno hidratado (3,8%), (*E*) – nerolidol (4,8%), β -cariofileno (2,2%) e germacreno-4-ol (1,5%) [92].

2.3.1.5 *Lavandula officinalis*

Lavandula officinalis vulgarmente conhecida como Alfazema pertence à família Lamiaceae e é nativa do Sul da Europa e da região do Mediterrâneo [94]. O OE de *L. officinalis* é geralmente produzido por destilação a vapor, sendo o óleo mais doce e aromático derivado da flor [95].

O OE é geralmente utilizado como anti-inflamatório, analgésico, antisséptico, cicatrizante, bactericida e fungicida [94]. No OE de *L. officinalis* mais de 100 componentes foram isolados, dos quais ésteres: acetato de linalil (17,6- 53%), acetato de lavandulil (15,95) e acetato de genaril (5,0%), álcoois: linalol (26-49%), α -terpineol (6,7%) e terpineno-4-ol (0,03-6,4%), sesquiterpenos: β -cariofileno (2,6-7,6%), monoterpénos: *cis*- β -oci-meno (1,3-10,9%) e óxidos: 1,8-cineol (0,5-2,5%) [96].

2.3.1.6 *Melaleuca alternifolia*

A *Melaleuca alternifolia* vulgarmente conhecida como a árvore do chá é uma espécie de arbusto da família Myrtaceae e subfamília Myrtoideae, nativa da Austrália [97].

O óleo de *M. alternifolia* é produzido por destilação a vapor das folhas e ramos terminais. Uma vez condensado, ocorre uma separação do destilado aquoso. Alguns métodos de extração alternativos como a tecnologia de micro-ondas têm sido utilizados, mas nenhum em escala comercial [98].

Relativamente à sua composição, o óleo de *M. alternifolia* é composto em grande parte por terpenos, principalmente monoterpénos, sesquiterpenos e os seus álcoois associados [99]. Assim, o OE de *M. alternifolia* é particularmente rico em terpineno-4-ol, μ -terpineno, α -terpineno, 1,8- cineol, p -cimeno, α -terpineol, α -terpinoleno, α -pineno, β -pineno, aromadendreno, ledeno, α -tujona, mirceno, aloaromadendreno, Δ -cadineno, Limoneno, Sabineno, Globulol e Viridiflorol [99, 100].

O OE tem sido muito utilizado como antisséptico e anti-inflamatório em medicina tradicional, no combate a feridas e infeções cutâneas, empiema, micoses, paranoquia, herpes labial, amigdalites, estomatite e infeções vaginais. As suas atividades antimicrobianas também têm sido relatadas [98, 99].

2.3.1.7 *Melaleuca viridiflora*

A *Melaleuca viridiflora* é um membro da família Myrtaceae, vulgarmente conhecida como Niauoli. É encontrada na Austrália, Nova Caledónia, Malásia, Filipinas, Vietname, Indonésia, Madagascar, Egito e Camarões e o seu OE é conhecido por apresentar diversos *chemotypes* [101].

O OE de Niaouli é caracterizado por apresentar propriedades farmacêuticas e antimicrobianas. Estudos indicam que o componente maioritário do OE de *M. viridiflora* é o 1,8-cineol, seguindo-se o viridiflorol, o α -terpineol, o α -pineno, o limoneno e o γ -terpineno [101, 102].

2.3.1.8 Pogostemon cablin

O óleo de patchouli é obtido a partir de folhas de *Pogostemon cablin*, uma planta da família Lamiaceae, originária da Malásia e da Índia [103].

O OE de *P. cablin* é obtido por destilação a vapor, estando as propriedades farmacológicas e terapêuticas do óleo diretamente correlacionadas com a sua composição qualitativa e quantitativa, que varia consoante a região de cultivo da planta [104]. É um OE bastante importante na perfumaria e é bastante apreciado pelo seu odor, bem como pelas suas propriedades fixadoras, sendo adequado para aplicação em produtos de higiene e cosméticos [105, 106]. É retratado ainda que o OE possui propriedades anti-depressivas, anti-inflamatórias, antissépticas, diuréticas, sedativas, tónicas, inseticidas e fungicidas [107].

O OE de *P. cablin* possui mais de 24 sesquiterpenos, sendo o patchoulol o constituinte principal e o responsável pelo aroma típico de patchouli. Num estudo publicado em 2013, em que se foi efetuada uma análise química ao OE de *P. cablin*, verificou-se que o componente maioritário identificado foi o patchoulol (36,60%), seguindo-se o α bulneseno (13,95%), o α guaieno (11,96%), o seicheleno (7,85%), o α - patcholeno (5,58%), o pogostol (3,11), o *E*-carofileno (2,62%) e o β - patcholeno (2,54) [108].

2.3.2 Potencial antifúngico dos óleos essenciais

Vários estudos têm demonstrado a inibição microbiana exercida por uma diversidade de OEs, com elucidação dos efeitos da aplicação dos óleos no crescimento, nos constituintes celulares, nas características morfológicas e no metabolismo dos microrganismos [10, 75, 109-111].

Considerando a diversidade de compostos químicos presentes nos OEs, a atividade antimicrobiana é imputável a vários alvos na célula e não a um mecanismo específico. No entanto, a atividade antimicrobiana inerente aos OEs é originada pela sua composição, estrutura química dos seus constituintes, nomeadamente a presença de grupos funcionais hidrófilos e a lipofilicidade e finalmente pela concentração e interação desses mesmos constituintes.

A hidrofobicidade destes compostos permite que atravessem as membranas celulares e interajam com compostos celulares, afetando tanto a membrana como as enzimas intracelulares. Alguns

compostos hidrófobos presentes em extratos de plantas podem alterar a permeabilidade das membranas através de cátions como H^+ e K^+ , causando uma alteração no fluxo de prótons, modificação do pH celular, modificação da composição química das células e da sua atividade. A capacidade dos compostos hidrófobos se dissolverem na fase lipídica da membrana citoplasmática é a chave para a sua atividade, mas uma maior solubilidade não significa sempre uma maior ação antimicrobiana. A perda de permeabilidade diferencial da membrana citoplasmática é geralmente considerada a causa da morte celular, originada por um desequilíbrio na pressão osmótica intracelular, subsequente ruptura dos organelos intracelulares e finalmente a libertação dos conteúdos citoplasmáticos. A interação com as membranas celulares pode também conduzir à saída de alguns componentes celulares, incluindo o ATP, a molécula principal de armazenamento de energia [13].

Assim, de uma forma geral a atividade antimicrobiana dos OEs é exercida através de: 1) danos no sistema celular enzimático, incluindo as células produtoras de energia e sintetizadoras de compostos estruturais [112, 113]; 2) interferência e desnaturação dos compostos e enzimas responsáveis pela germinação; 3) Mudanças irreversíveis e ruptura na parede celular, ruptura da membrana e danos em organelos celulares [114, 115].

A atividade microbiana de um determinado OE pode depender apenas de um ou dois componentes principais que formam o óleo. No entanto, a atividade inerente aos OEs não pode depender exclusivamente da proporção em que os componentes principais ativos estão presentes, mas também pode depender de interações desses componentes com os componentes presentes em menor quantidade no óleo [24].

Assim, torna-se necessário explorar combinações sinérgicas dos componentes presentes num determinado OE, de forma a descobrir o local e o modo de ação de cada componente, os mecanismos que resultam em sinergia ou antagonismo entre os vários compostos e como cada composto interage com os componentes da matriz alimentar, de forma a afetar os microrganismos [24].

Uma variada gama de OEs, em diversas concentrações, têm sido aplicada em diversos estudos, com o intuito da avaliação do seu efeito na inibição do crescimento de várias espécies fúngicas de *Aspergillus* secção *flavi* [114-120]. Segundo os mesmos estudos, os OEs apresentaram a capacidade de inibição do crescimento fúngico, com ação na germinação, na viabilidade dos esporos e na morfologia fúngica. Com a aplicação dos OEs, ocorreu de forma geral uma diminuição na biomassa, esporulação e crescimento micelial fúngico. Verificou-se ainda em alguns dos

estudos modificações do diâmetro e danos nas hifas, danos nos conidióferos, ruptura da membrana plasmática e modificações estruturais [114, 119, 120]. É ainda realçado nos mesmos estudos a existência de uma relação entre a concentração dos óleos e a atividade antifúngica visualizada.

O monitoramento do desenvolvimento fúngico pode ser efetuado através de métodos biológicos, químicos ou imunológicos. Alguns desses métodos incluem o uso de componentes bioquímicos específicos das células fúngicas, como o ergosterol [121, 122]. O ergosterol é um bom indicador de crescimento fúngico, dado que, como é um componente da membrana plasmática fúngica, proporciona uma correta correlação com a biomassa metabolicamente ativa [121]. Assim, a monitorização da quantidade de ergosterol apresenta-se como uma alternativa promissora para a avaliação das alterações do crescimento fúngico, relacionadas com a aplicação de agentes antifúngicos [121].

Além da inibição do crescimento fúngico, os OEs são bastante eficazes na redução ou até mesmo na completa inibição da produção de micotoxinas [114-119, 123-126]. Vários estudos mostram que há uma tendência geral para a diminuição da produção de AFs com a aplicação de vários óleos de essências [115, 118, 119, 124, 126]. A inibição da produção de micotoxinas está em parte relacionada com a inibição do crescimento fúngico. Os compostos fenólicos, como o eugenol, timol, presentes nos OEs, apresentam a capacidade de inibir a proliferação fúngica e assim a produção de algumas micotoxinas, nomeadamente as aflatoxinas [127]. Essa capacidade advém do facto de alterarem a permeabilidade da célula, interagirem com proteínas da membrana, afetarem a atividade enzimática e desnaturarem proteínas [128]. No entanto, esta redução está também envolvida com a inibição de etapas ternárias essenciais à biossíntese da micotoxina, que envolvem principalmente a peroxidação lipídica e a oxigenação [127]. Existe ainda a alusão que a regulação da síntese de micotoxinas e a conidiogénese pode apresentar-se interligadas [129]. Os OEs protegem ainda as células contra os efeitos nefastos das micotoxinas [57].

Apesar do forte potencial da aplicação de OEs como conservantes de alimentos, a sua utilização ainda permanece limitada, devido principalmente aos problemas de toxicidade de determinados componentes, aromas intensos e propriedades organolépticas modificadas, quando adicionados em quantidades suficientes que permitam o efeito antimicrobiano [10, 74].

A aplicação de OEs, como conservantes de alimentos requer conhecimento detalhado sobre as suas propriedades, a concentração mínima inibidora (MIC), a gama de organismos alvo, o modo de ação e o efeito dos componentes da matriz alimentar nas suas propriedades antimicrobianas [74].

Assim, torna-se essencial uma maior pesquisa acerca de todos os efeitos da aplicação dos OEs em alimentos, principalmente para uma maximização da atividade antifúngica e minimização das concentrações necessárias para alcançar esse mesmo efeito. É também necessário proceder-se a uma maior pesquisa acerca das possíveis consequências secundárias ou indiretas da aplicação dos mesmos, quer ao nível de mudanças nas características físicas e químicas dos alimentos mas principalmente ao nível da segurança de alimentos, implícita no consumo dos alimentos submetidos a tratamento com OEs.

Têm sido descritas algumas estratégias para contornar o problema da aplicação dos OEs nos alimentos. Uma das opções promissoras no campo da preservação dos alimentos é a utilização de embalagens ativas como veículos dos OEs, permitindo que os mesmos não sejam introduzidos como um ingrediente do produto alimentar [24]. Os OEs podem ser encapsulados em revestimentos biodegradáveis ou comestíveis e em saquetas, que para além de preservarem a cor, textura e a humidade do produto embalado, contribuem para a redução da poluição ambiental. A vantagem principal é que a taxa de difusão do agente antimicrobiano pode ser reduzida, libertando os compostos ativos voláteis na superfície do produto e no meio envolvente por períodos de tempo prolongados [130].

No entanto, uma desvantagem é que durante a fase de secagem da película, podem ocorrer perdas significativas dos compostos voláteis dos óleos. Dessa forma, a nanoencapsulação surge como outra alternativa, aumentando a estabilidade física das substâncias ativas, protegendo-as contra possíveis interações com os ingredientes alimentares e, devido ao seu tamanho, permite um aumento da bioatividade dos compostos voláteis [131].

CAPÍTULO 3: METODOLOGIA

3.1 Material biológico

Como cultura teste foi utilizado o fungo *A. parasiticus* MUM 92.02, depositado na Coleção de Culturas da Micoteca da Universidade do Minho e produtor de AFs do tipo B e G.

O meio de cultura PDA (15g L⁻¹ agar; 20g L⁻¹ dextrose; 4g L⁻¹ extrato de batata) foi o utilizado para o crescimento do fungo. A estirpe foi propagada em PDA durante 10 dias a 27°C, com posterior preparação de uma suspensão de esporos em solução de *Tween* 80 a 0,005%. Os esporos foram recuperados através da destruição da superfície de culturas puras e contados com auxílio de uma Câmara de Neubauer. As suspensões de esporos preparadas foram utilizadas nas metodologias descritas posteriormente.

3.2 Análise química dos óleos essenciais

Os OEs utilizados foram isolados a partir de oito plantas: *C. zeylanicum*, *C. bergamia*, *C. sinensis*, *C. nardus*, *L. officinalis*, *M. alternifolia*, *M. viridiflora*, *P. cablin* (Figura 3.1) e foram disponibilizados pelo Centro de Investigação e de Tecnologias Agro-Ambientais e Biológicas (CITAB), Pólo Universidade do Minho.

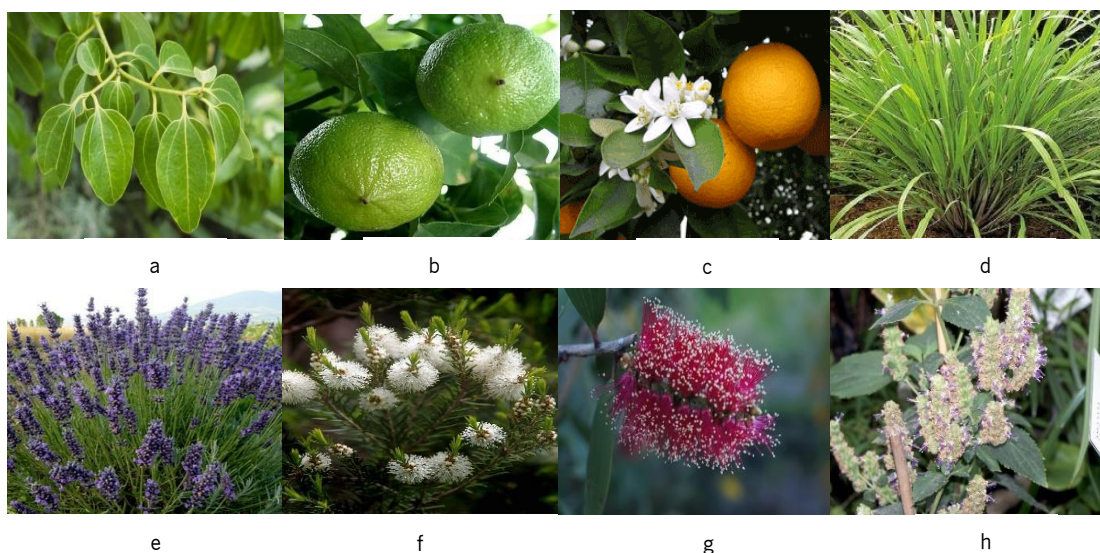


Figura 3.1: Plantas produtoras de OEs: a- *C. zeylanicum*-; b- *C. bergamia*; c- *C. sinensis*; d- *C. nardus*; e- *L. officinalis*; f- *M. alternifolia*; g- *M. viridiflora*; h- *P. cablin*.

Os compostos voláteis dos OEs foram analisados quimicamente com recurso a Cromatografia Gasosa (GC) e a Cromatografia Gasosa- Espectrometria de Massa (GC-MS). Na análise com GC-

MS, os OEs foram previamente diluídos 3:10 000, com exceção da Alfazema, diluída de 3:100) em CH₂Cl₂. A cada amostra assim preparada foram adicionados 100 µL de solução de 3-octanol (padrão interno) na concentração de 4,69 mg L⁻¹.

O GC-MS utilizado era constituído por um cromatógrafo gasoso Varian 3800 GC com um injetor 1079 e um espectrômetro de massas ion-trap Varian Saturn 2000. Injetou-se 1 µL de cada extrato, em modo *splitless* (30 s), numa coluna Teknokroma Sapiens-Wax MS (30 m × 0,15 mm; espessura de filme: 0,15 µm). O gás de transporte foi o Hélio a um caudal constante de 1,3 mL por minuto. O detetor foi usado em modo de impacto eletrónico, com energia de ionização de 70 eV e gama de aquisição de massas entre 35 m/z e 300 m/z, adquirindo a intervalos de 610 ms. A temperatura do forno foi inicialmente de 60 °C, durante 2 min, depois programada desde 60 °C até 234 °C, a 3°C por minuto, e posteriormente de 234°C até 260°C, a 5°C por minuto; finalmente foi mantida a 260 °C durante 5 minutos. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C durante o tempo de análise e o caudal de *split* em 30 mL por minuto. A identificação dos compostos voláteis foi efetuada com recurso ao software Star – Chromatography Workstation versão 6.9.3 (Varian) comparando os espectros de massas e os índices de retenção com os de compostos de referência puros ou, nalguns casos, com dados publicados na literatura. A quantificação foi feita como equivalentes de 4-nonanol (análise semiquantitativa).

3.3 Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais

Os ensaios realizados com os OEs foram levados a cabo em condições *in vitro*, com a avaliação do efeito das fases voláteis dos oito óleos no crescimento micelar e na produção de AFs.

A metodologia empregue nos ensaios correspondeu a uma adaptação da metodologia usada por Guynot *et al.* [132]. Quatro diferentes quantidades dos OEs (5, 10, 25 e 50 µL) foram analisadas. Para cada OE, nas várias quantidades, um papel de filtro esterilizado (quadrados de 1 x 1 cm e 1,5 x 1,5 cm) foi colocado no centro da tampa de uma placa de Petri esterilizada e o OE puro foi adicionado ao papel. De seguida, inoculou-se 5 µL da suspensão de esporos previamente preparada (10⁶ esporos mL⁻¹) no centro das placas de Petri, anteriormente usadas na inoculação dos OEs. As placas foram hermeticamente seladas com parafilme, de forma a minimizar a perda de compostos voláteis dos OEs e seguidamente foram incubadas invertidas durante 10 dias a 25°C. Para cada quantidade de cada óleo, foram utilizados triplicados.

3.3.1 Avaliação do crescimento fúngico

Durante os 10 dias de crescimento, foi registado o diâmetro das colónias para posterior modelação e tratamento estatístico pelo software SPSS (IBM SPSS Statistics 22).

Os parâmetros de crescimento determinados, como a taxa de crescimento fúngico (μ) e a fase lag (λ) foram avaliados utilizando o modelo de Baranyi e Roberts [133] em que, o crescimento fúngico (expresso como o aumento no diâmetro da colónia) é empiricamente modelado em função do tempo, utilizando um modelo desenvolvido originalmente para o crescimento bacteriano. Este modelo tem sido utilizado com sucesso para o ajuste do crescimento de alguns fungos filamentosos. O modelo primário de Baranyi e Roberts [133], foi ajustado para os valores de diâmetro de colónias por regressão não linear. Neste modelo, a expressão logarítmica D_{max} (diâmetro máximo) foi eliminado de forma a omitir a assíntota superior, tal como sugerido por Valík *et al.* [134].

Assim, procedeu-se à construção de uma regressão não linear dos diâmetros obtidos em cada dia de crescimento, através da expressão do modelo de Baranyi e Roberts [133] (equação 1.1).

$$D = \mu \left[t + \frac{1}{\mu} \left[\ln \left[\exp(-\mu t) + \exp(-\mu \lambda) - \exp(-\mu t - \mu \lambda) \right] \right] \right] \quad [1.1]$$

Onde D , μ , t e λ são o diâmetro das colónias (cm), a taxa de crescimento (cm / dia), o tempo (dias), e a fase lag (dias), respetivamente.

A comparação das médias foi realizada por Análise Unidirecional de Variância (ANOVA), em que as variâncias iguais presumidas foram analisadas segundo o teste de DUNCAN e as variâncias iguais não presumidas foram analisadas segundo o teste de DUNNETT C. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Com os diâmetros obtidos, procedeu-se ainda ao cálculo da inibição fúngica observada nas placas submetidas às várias quantidades dos OEs, comparativamente ao controlo, que não foi inoculado com OEs. Assim, a inibição fúngica observada ao oitavo dia de crescimento, com cada quantidade de óleo avaliada foi obtida através da equação 1.2:

$$\% \text{ inibição fúngica} = \left(1 - \frac{\text{diâmetro com OE}}{\text{diâmetro sem OE}} \right) \times 100 \quad [1.2]$$

3.3.2 Análise da produção de AFs

Na análise da produção de AFs, procedeu-se inicialmente a uma extração, efetuada após completos os 10 dias de crescimento fúngico.

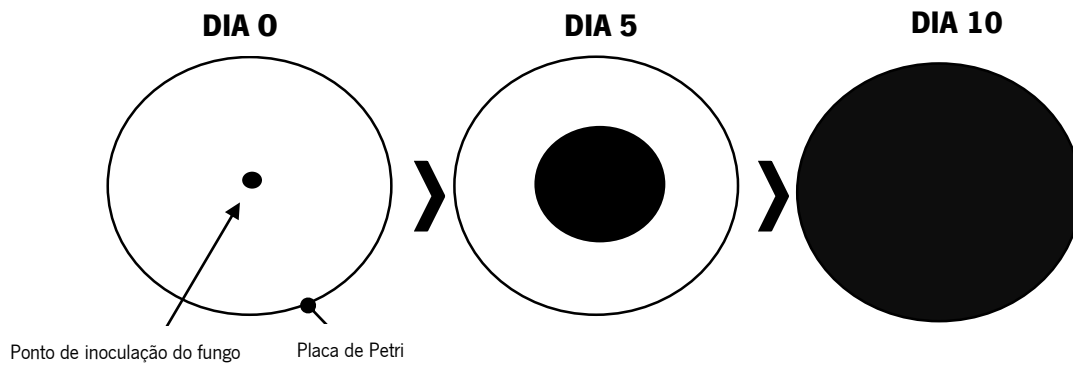
A metodologia da extração iniciou-se com o corte do agar contendo a colónia fúngica, seguido de uma transferência das porções cortadas para tubos falcon de 50 mL. Aos mesmos tubos foram adicionados 30 mL de solução de extração composta por Acetonitrilo, Metanol e Ácido Acético na proporção de 78:20:2 v/v/v, com posterior agitação. Após dois dias de contacto entre as porções de agar contendo a colónia fúngica e a solução de extração, procedeu-se à filtração de 1,8 mL presente nos tubos de falcon, através de seringas e filtros de polipropileno 0,45 µm.

A quantificação de AFs foi efetuada tal como descrito por Rodrigues *et al.* [7], usando um HPLC equipado com derivatização fotoquímica pós-coluna (PHRED - Aura Industries, USA), detetor de fluorescência Jasco FP- 920 (Excitação 265 nm, Emissão 435 nm) e um injetor Varian Prostar Model 410. As separações cromatográficas foram realizadas com uma coluna C18 de fase reversa YMC Pack ODS-AQ (4,6 mm x 250 mm; 5 µm), equipada com uma pré-coluna com a mesma fase estacionária. A fase móvel utilizada foi composta por água: acetonitrilo: metanol (3:1:1 v/v/v) (filtrada e degaseificada). Utilizou-se um fluxo de a 1 mL por minuto e com um ciclo isocrático de 30 minutos.

Nas condições cromatográficas adotadas foram construídas curvas de calibração, para cada aflatoxina, sendo determinadas e apresentadas em anexo as respetivas retas de calibração, bem como os limites de deteção e limites de quantificação (Figura A1.1 a A1.12 e Tabela A1.1 e A1.2, Anexo I). Os resultados obtidos foram sujeitos a uma análise estatística, realizada por Análise Unidirecional de Variância (ANOVA), em que as variâncias iguais presumidas foram analisadas segundo o teste de DUNCAN e as variâncias iguais não presumidas foram analisadas segundo o teste de DUNNETT C. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A figura 3.2 representa de forma esquematizada todas as etapas utilizadas para a avaliação da atividade fúngica (crescimento e produção de AFs por *A. parasiticus*), sob influência da presença dos OEs.

1ª FASE



2ª FASE

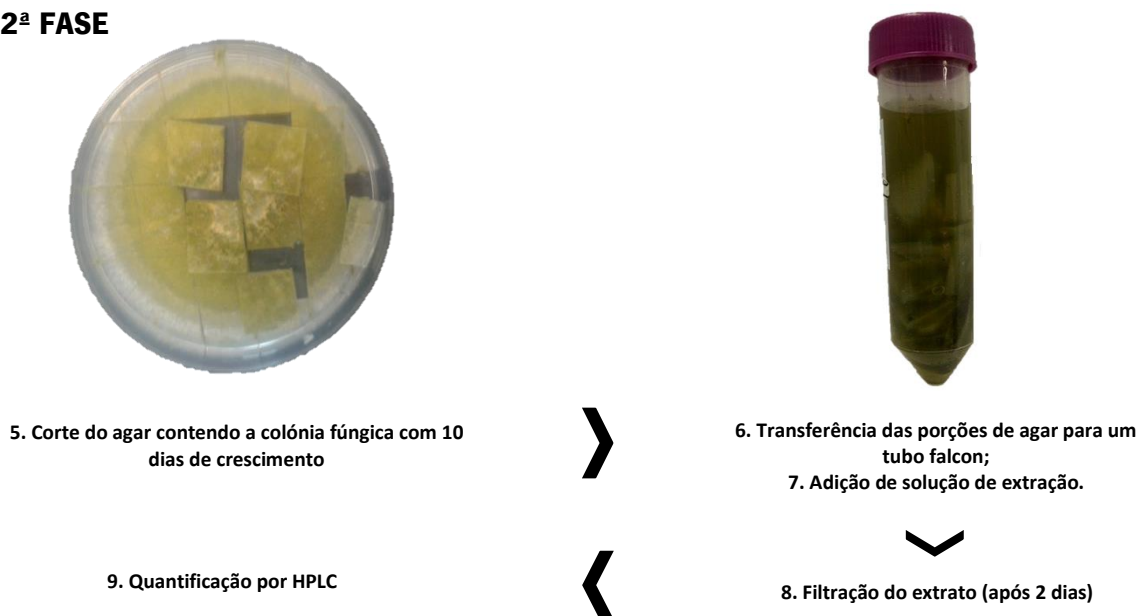


Figura 3.2: Esquema representativo das etapas utilizadas para avaliação do crescimento e produção de AFs por *A. parasiticus*, sob influência dos OEs.

3.4 Determinação do teor de ergosterol

O protocolo utilizado para estimar o teor de ergosterol fúngico foi uma modificação do método descrito por Gourama e Bullerman [135].

Assim, para a realização dos ensaios, procedeu-se inicialmente à inoculação de 5 μL da suspensão de esporos preparada previamente (10^6 esporos mL^{-1}) em placas de Petri contendo meio de cultura PDA estéril. As placas inoculadas foram armazenadas a 25°C por 8 dias. Após 3, 5 e 8 dias de crescimento procedeu-se à extração do ergosterol.

Antes da iniciação do processo de extração do ergosterol procedeu-se à avaliação do diâmetro das colónias, de forma a relacionar o teor de ergosterol das colónias, com o seu diâmetro.

No processo de extração do ergosterol, primeiramente o agar contendo a colónia fúngica foi cortado em pequenos pedaços e transferido para um copo. Seguidamente adicionou-se 40 mL de uma solução de KOH a 10% em Metanol e procedeu-se a uma agitação magnética durante 30 minutos (Figura 3.3).



Figura 3.3: Representação da mistura da solução de KOH e Metanol com o agar fragmentado.

Após os 30 minutos de agitação, uma alíquota de 10 mL foi transferida para um tubo com tampa de rosca e os tubos foram isolados com parafilme. Posteriormente colocou-se os tubos num banho de água quente ($55\text{-}60^\circ\text{C}$) durante 20 minutos. Os tubos foram arrefecidos à temperatura ambiente.

Seguidamente, 3 mL de água ultra-pura e 2 mL de hexano foram adicionados aos tubos, os quais foram cuidadosamente misturados durante 1 minuto.

Após a separação das camadas, a camada superior contendo hexano e ergosterol extraído foi transferida para um vial de 4 mL (Figura 3.4).

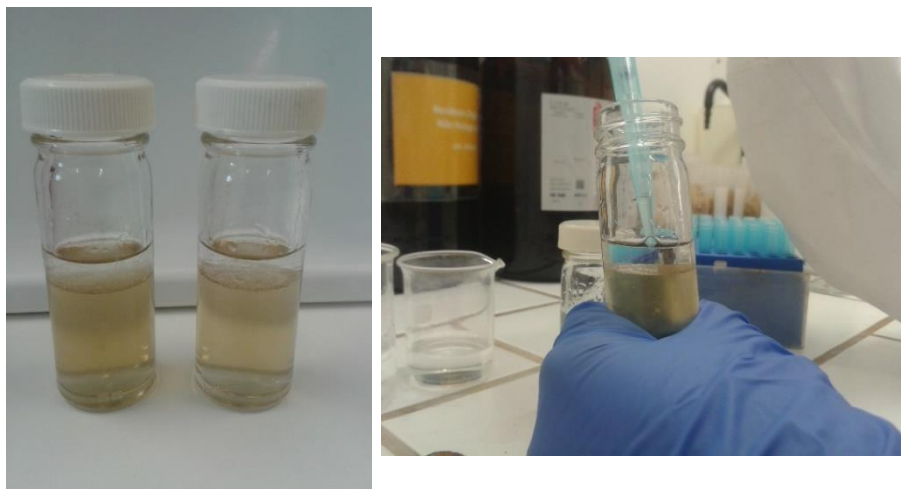


Figura 3.4: Representação da separação das camadas e retirada do ergosterol presente na camada superior.

A extração com adição de 2 mL de hexano foi repetida por mais duas vezes. Os extratos combinados (6 mL) foram evaporados até à secura sob uma corrente de azoto, através da utilização de um evaporador. Os extratos secos foram dissolvidos em metanol e forçados através de filtros de polipropileno 0,45 μm .

O ergosterol foi doseado através de cromatografia líquida de ultra pressão (UPLC) com deteção de UV (comprimento de onda de emissão de 282 nm). O aparelho de UPLC era composto por um detetor de fluorescência DAD Shimadzu, e um sistema de dados de cromatografia LAB Solutions. Injetou-se 5 μL de cada extrato e a separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Kinetex 2,6 μm C18 100A (100 mm x 3,0 mm), equipada com uma pré-coluna com a mesma fase estacionária. A fase móvel utilizado foi composta por metanol filtrado e desgaseificado com um filtro de membrana de polipropileno 0,2 μm e foi bombeada a 0,7 mL por minuto. Foi utilizado com um ciclo isocrático de 4 minutos e a temperatura do forno foi mantida a 30°C.

Para a determinação do teor de ergosterol, foi construída a respetiva curva de calibração, representada na figura A1.13 do Anexo I.

3.4.1 Determinação do peso seco

De forma a relacionar o teor de ergosterol com o peso fúngico, procedeu-se à avaliação do peso seco das colónias inoculadas em meio de cultura PDA.

De forma a conseguir transportar a colónia total crescida em meio PDA para a estufa de secagem, procedeu-se à colocação de um filtro estéril de celulose 0,45 µm sobre o agar.

Inicialmente inoculou-se 5 µ L da suspensão de esporos de *A. parasiticus* preparada previamente (10^6 esporos mL⁻¹) no centro do filtro estéril colocado sobre o agar.

As placas após inoculadas foram armazenadas a 25°C durante 8 dias. Ao 3º, 5º e 8º dia de crescimento procedeu-se à retirada da estufa de armazenamento (Figura 3.5). Procedeu-se à inoculação de três placas de Petri por cada dia de crescimento avaliado, de forma a garantir triplicados.

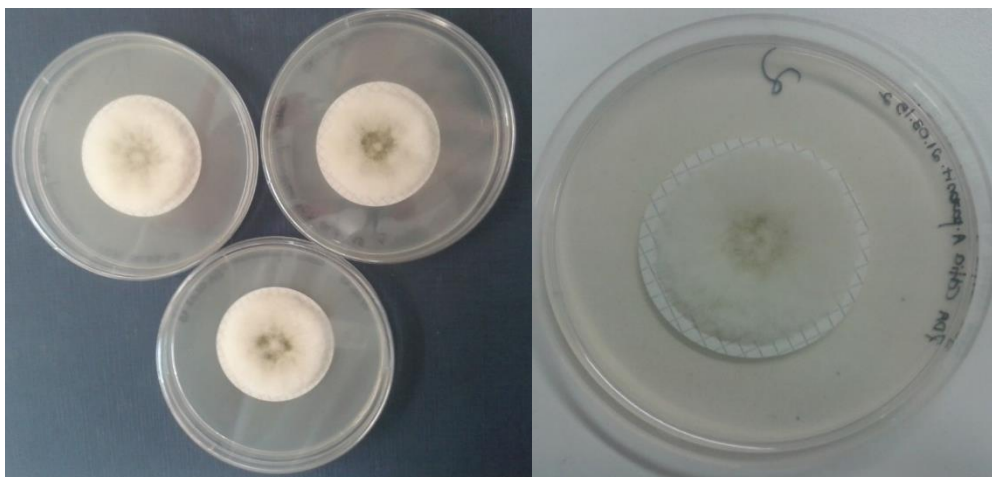


Figura 3.5: Crescimento de *A. parasiticus* sob um filtro estéril colocado no meio PDA.

Seguidamente, os filtros contendo as colónias foram pesados em condições de assepsia (Figura 3.6). Procedeu-se também à avaliação do diâmetro das colónias agregadas aos filtros, para posterior relacionamento com o peso seco e o teor de ergosterol.

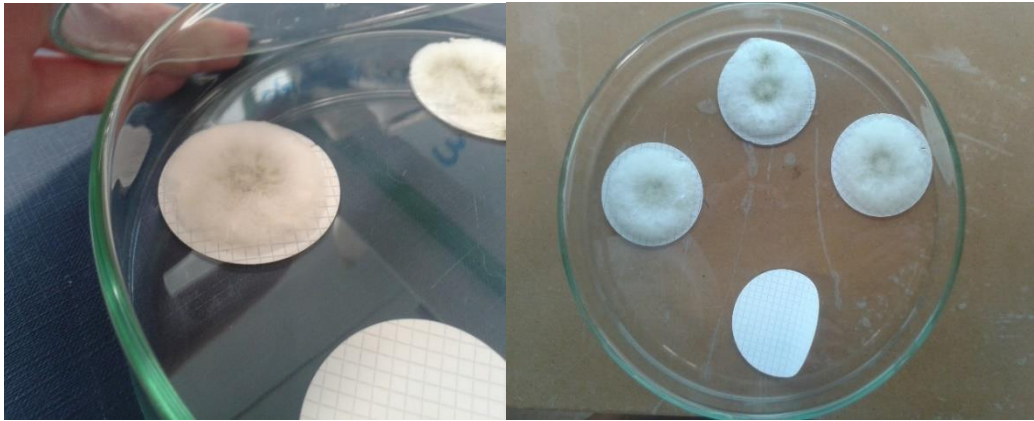


Figura 3.6: Filtros com colónias de *A.parasiticus*.

Após a pesagem e quantificação do diâmetro das colónias, os filtros com as colónias foram colocados numa estufa a 105°C. Assim, após as 2, 4 e 6 horas de secagem, os filtros foram retirados da estufa e transferidos para um exsicador para permitir um arrefecimento e manutenção do teor de secagem das amostras, sem adição de humidade. Após 30 minutos no exsicador os filtros contendo as colónias secas foram pesados. O tempo necessário para atingir peso constante foi com 6 horas de secagem.

Posteriormente os filtros com as colónias secas (Figura 3.7) foram submetidos à metodologia de extração do ergosterol, descrita previamente na secção 3.4.

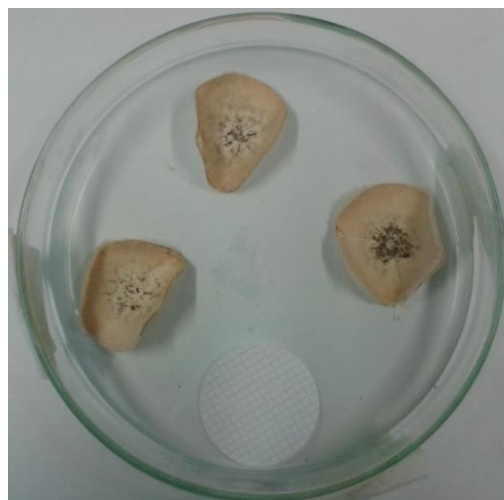


Figura 3.7: Filtros contendo as colónias de *A.parasiticus* após secagem.

3.4.2 Avaliação em matriz sólida

De forma a estudar o comportamento fúngico numa matriz alimentar sólida, estudou-se a possibilidade de avaliar a proliferação fúngica de *A. parasiticus* sobre milho, através do doseamento do teor de ergosterol. Este estudo deveu-se ao facto de quando inoculado no milho, o fungo crescer de forma não axial, o que compromete a avaliação do seu crescimento por meio da medição do diâmetro, necessitando-se assim de novas formas de avaliação da proliferação fúngica.

Para a realização destes ensaios procedeu-se inicialmente a uma descontaminação do milho, fornecido pela Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, com radiações UV. Assim, o milho foi submetido 1 hora a radiações UV e os grãos foram revolvidos de 15 em 15 minutos para que a radiação atingisse todas as partes.

Após a descontaminação, o milho foi colocado em caixas de Petri sem meio de cultura (Figura 3.8) e incubado a 25°C durante 8 dias, de forma a verificar se ocorreria algum tipo de crescimento fúngico visível. Paralelamente foram efetuados controlos, correspondentes ao milho que não foi submetido a descontaminação.



Figura 3.8: Colocação do milho nas placas de Petri.

De forma a estudar a possibilidade de ocorrência de uma proliferação fúngica não visível, doseou-se o teor de ergosterol, segundo a metodologia de extração descrita no capítulo 3.4.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química dos óleos essenciais

A identificação e a quantificação dos componentes maioritários e minoritários presentes nas diferentes frações dos OEs foram realizadas através da análise de cromatografia gasosa acoplada a um espectrómetro de massas (GC-MS). Os componentes foram identificados com base no espectro de massas e no índice de retenção. Os resultados da análise química efetuada aos vários OEs estudados estão descritos na tabela 4.1. Nesta tabela apresentam-se os compostos quantificados num teor superior a 1%.

Tabela 4.1: Componentes principais ($\geq 1\%$) dos OEs de *C. zeylanicum*, *C. bergamia*, *C. sinensis*, *C. nardus*, *L. officinalis*, *M. alternifolia*, *M. viridiflora* e *P. cablin*

Óleos Essenciais	Componentes	Tempo de retenção (min)	Área	%
<i>C. zeylanicum</i>	Linalol	17,71	9,67E+05	1,42
	E-cariofileno ¹	19,03	1,62E+06	2,38
	Eugenol	38,54	3,60E+07	52,85
	Acetato de eugenilo	41,27	1,48E+07	21,70
	Benzoato de benzilo ¹	51,05	1,34E+07	19,65
<i>C. bergamia</i>	α -pineno	3,31	445475	1,81
	β -pineno	4,41	1,70E+06	6,92
	Mirceno	5,41	942539	3,84
	Limoneno	6,22	8,73E+06	35,53
	γ -terpineno	7,34	1,82E+06	7,41
	<i>Trans</i> -ocimeno	7,53	4,56E+05	1,86
	Linalol	17,71	3,15E+06	12,84
	Acetato de linalilo	18,00	6,90E+06	28,08
	Acetato de geraniol	25,23	420194	1,71
<i>C. sinensis</i>	α -pineno	3,31	325535	1,02
	Mirceno	5,40	613419	1,92
	Limoneno	6,26	3,10E+07	97,06
<i>C. nardus</i>	α -pineno	3,31	997592	2,07
	NI ²	3,71	691302	1,43
	Canfeno	3,82	3,82E+06	7,92
	Limoneno	6,19	3,72E+06	7,72
	p -cimeno	8,02	734712	1,52
	Citronelal	15,15	6542590	13,56
	Citronelol	25,66	2,69E+07	55,80
	Geraniol	28,47	2606864	5,40

Tabela 4.1: Componentes principais ($\geq 1\%$) dos OEs de *C. zeylanicum*, *C. bergamia*, *C. sinensis*, *C. nardus*, *L. officinalis*, *M. alternifolia*, *M. viridiflora* e *P. cablin* - continuação

Óleos Essenciais	Componentes	Tempo de retenção (min)	Área	%
<i>L. officinalis</i>	Óxido furânico de linalol, trans	13,66	82634	12,87
	Ácido acético	14,09	114400	17,82
	Óxido furânico de linalol, <i>cis</i>	14,70	70622	11,00
	Linalol	17,68	129049	20,10
	Hidrato de linalol ¹	32,98	245416	38,22
<i>M. alternifolia</i>	α -pineno	3,30	2,03E+06	7,72
	β -pineno	4,40	832789	3,17
	α -terpineno	5,74	527304	2,01
	Limoneno	6,18	509531	1,94
	1,8-cineol	6,41	1,09E+06	4,14
	γ -terpineno	7,33	1,81E+00	6,90
	p -cimeno	8,03	7,25E+00	27,62
	Terpinoleno	8,35	4,68E+05	1,78
	Terpineno-4-ol	19,56	1,08E+07	41,03
	α -terpineol	23,02	9,64E+05	3,67
<i>M. viridiflora</i>	<i>A</i> -pineno	3,31	923245	3,13
	1,4-cineol	5,74	750682	2,54
	Limoneno	6,18	1,78E+06	6,03
	1,8-cineol	6,48	2,07E+07	70,17
	p -cimeno	8,02	1,57E+06	5,32
	Linalol	17,70	2,04E+06	6,91
	1-terpineol ¹	18,60	4,83E+05	1,64
	α -terpineol	23,01	1,26E+06	4,28
<i>P. cablin</i>	β -patchouleno ¹	14,89	1,70E+06	6,16
	β -guaiano ¹	17,65	329586	1,19
	α -guaiano ¹	18,96	8,68E+06	31,35
	(<i>E</i>)-cariofileno ¹	19,03	1,15E+06	4,16
	α -patchouleno ¹	20,30	1,16E+06	4,19
	γ -gurjuneno ¹	20,42	3,44E+06	12,41
	Acifileno ¹	20,94	4,87E+05	1,76
	γ -gualeno ¹	22,88	1,23E+06	4,46
	Patchoulol ¹	23,42	9,50E+06	34,32

¹ Tentativamente identificado com base no índice de retenção e do espectro de massas

² Não identificado

A análise efetuada aos oito óleos permitiu identificar inequivocamente ou tentativamente (com base no índice de retenção e no espectro de massa) quase todos os componentes principais dos óleos (aqueles presentes em teores superiores a 1%). Apenas num óleo - de *C. nardus* - não se conseguiu a identificação de um dos componentes principais.

O OE de *C. zeylanicum* apresentou como componente maioritário o eugenol (52,8%), seguindo-se o acetato de eugenol (21,7%) e o benzoato de benzilo (19,6%). A análise química ao OE de *C.*

zeylanicum realizada por Lima *et al.* [83] revelaram resultados semelhantes ao verificado neste estudo (cerca de 60% de eugenol).

As análises químicas realizadas aos OEs de *C. bergamia* e *C. sinensis* permitiram identificar inequivocamente e quantificar a totalidade dos seus componentes principais. O componente com maior destaque foi o monoterpene limoneno, representando, respetivamente, cerca de 35,5% e 97% dos OEs. Outros componentes maioritários foram identificados e quantificados no óleo de *C. bergamia*: o acetato de linalilo (28%), o linalol (12,8%) e o β -pineno (6,9) (Tabela 4.1). Sawamura *et al.* [84] também verificaram que os componentes principais do óleo de *C. bergamia* foram o limoneno (37,2%), o linalol (8,8%) e o β -pineno (6,2%).

No que se refere ao OE de *C. sinensis*, Moufida *et al.* [88] verificaram que o limoneno se apresentou como o componente maioritário, com cerca de 88%.

Da análise química ao OE de *C. nardus* resultou uma fração dominante de monoterpenos, destacando-se o citronelol (55,8%), o citronelal (13,6%), o canfeno (7,9%) e o limoneno (7,7%), (Tabela 4.1). Os resultados obtidos vão de encontro ao verificado em outros estudos. Mahalwal *et al.* [92] verificaram também a presença de compostos como o citronelal (29,7%), o geraniol (24,2%) e o limoneno (0,2%), na análise química que efetuaram.

No OE de *L. officinalis* observou-se como componentes maioritários o hidrato de linalol (38,2%) e o linalol (20,1%). Num estudo publicado em 2014, onde foi efetuada uma análise química do extrato de *L. officinalis*, os autores verificaram também a presença de altas quantidades do componente linalol (26-49%). Os autores conseguiram identificar e quantificar outros componentes maioritários como o acetato de linalol (12-28%) e o lavandulol (4-9%). Estes últimos compostos identificados não foram de encontro aos identificados no presente estudo, podendo este facto dever-se à utilização de diferentes metodologias de extração do OE [96].

Da análise química ao OE de *M. alternifolia*, verificou-se que cerca de 41% do OE era composto por terpineno-4-ol, 28% por *p*-cimento, 7,7% por α -pimeno e 6,9% por γ -terpineno (Tabela 4.1).

Os resultados obtidos vão de encontro ao verificado em vários estudos. Num estudo publicado em 2011, os autores verificaram que o OE de *M. alternifolia* extraído era composto maioritariamente por terpineno-4-ol (40,4%), 1,8-cineol (5,2%), γ -terpineno (19,5%), α -terpineno (7,7%), *p*-cimento (4,7%), α -terpineol (3,3%), α -terpinoleno (3,1%) e α -pineno (2,7%), sendo que alguns destes compostos também foram identificados e quantificados no presente estudo [100].

No OE de *M. viridiflora* foram quantificados os compostos que compunham cerca de 100% do óleo. O componente 1,8-cineol apresentou-se como componente principal, com cerca de 70% da

totalidade do óleo. Com cerca de 7% apresentou-se o linalol e com 6% o limoneno (Tabela 4.1). Num estudo publicado em 2006, também foi verificado que este se apresentou maioritariamente constituído por 1,8-cineol (0,1-76%), *p*-cimeno (0-40%), α -pineno (0-30%), limoneno (0,1-16%) e β -pineno (0,1-5,5%) [101].

Na análise química do OE de *P. cablin* foi possível observar que 34% do óleo correspondeu ao componente patchoulol e 31% correspondeu ao componente α -guaieno. O componente γ -gurjuneno representou também uma considerável percentagem no OE, de cerca de 12%, seguindo-se o β -patchouleno com 6,2% (Tabela 4.1). Em 2013, Albuquerque *et al.* [108] verificaram que o componente patchoulol representava a maior fração do óleo, com cerca de 36,6% e que o componente β -patchouleno também era um dos componentes maioritários, tal como verificado no presente estudo.

4.2 Atividade antifúngica dos óleos essenciais

4.2.1 Efeito dos óleos essenciais no crescimento de *A. parasiticus*

Para determinar a atividade antifúngica dos OEs, o fungo *A. parasiticus* foi inoculado em meio PDA, na presença de diferentes quantidades dos óleos (5, 10, 25 e 50 μL), sendo avaliado o crescimento fúngico, através da verificação dos diâmetros das colônias fúngicas, ao longo dos 10 dias de incubação e crescimento.

Na tabela 4.2 encontram-se os registos fotográficos do crescimento fúngico visível nas placas, inoculadas com os vários OEs, nas concentrações limites estudadas (5 e 50 μL) e também o crescimento fúngico obtido sem a presença dos OEs (controlo), após 10 dias de incubação.

Tabela 4.2: Crescimento fúngico visível nas placas que foram inoculadas com 5 e 50 μL dos OEs de *C. zeylanicum*, *C. bergamia*, *C. sinensis*, *C. nardus*, *L. officinalis*, *M. alternifolia*, *M. viridiflora* e *P. cablin*




	5 μL	50 μL
Controlo		
<i>C. zeylanicum</i>		

Tabela 4.2: Crescimento fúngico visível nas placas que foram inoculadas com 5 e 50 µL dos OEs de *C. zeylanicum*, *C. bergamia*, *C. sinensis*, *C. nardus*, *L. officinalis*, *M. alternifolia*, *M. viridiflora* e *P. cablin*-
continuação










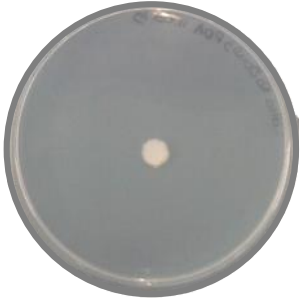




	5 µL	50 µL
<i>C. bergamia</i>		
<i>C. sinensis</i>		
<i>C. nardus</i>		
<i>L. officinalis</i>		

Tabela 4.2: Crescimento fúngico visível nas placas que foram inoculadas com 5 e 50 µL dos OEs de *C. zeylanicum*, *C. bergamia*, *C. sinensis*, *C. nardus*, *L. officinalis*, *M. alternifolia*, *M. viridiflora* e *P. cablin*-continuação

	5 µL	50 µL
<i>M. alternifolia</i>		
<i>M. viridiflora</i>		
<i>P. cablin</i>		

As imagens de crescimento fúngico apresentadas na tabela 4.2 permitem inferir acerca do comportamento do crescimento fúngico visualizado com o aumento da quantidade inoculada dos vários OEs, uma vez que exibem as diferenças de crescimento observado nas placas sujeitas às quantidades mínima (5 µL) e máxima (50 µL), de cada um dos óleos testados.

Como está patente nas imagens presentes na tabela 4.2, é possível verificar que ocorreu um efeito inibitório acentuado do crescimento fúngico com a aplicação dos OEs de *C. zeylanicum*, *C. nardus*,

M. alternifolia e *M. viridiflora*. Com estes óleos observa-se uma elevada diferença no tamanho das colónias fúngicas sujeitas às quantidades apresentadas (0, 5 e 50 μL).

Pelo contrário, não foi notória a ocorrência de um efeito inibitório do crescimento fúngico com o aumento da quantidade inoculada dos OEs de *C. bergamia*, *C. sinensis*, *L. officinalis* e *P. cablin*, dado que as colónias apresentaram tamanhos similares com as quantidades de 0, 5 e 50 μL (Tabela 4.2).

De forma a averiguar com maior precisão o comportamento do fungo *A. parasiticus*, quando inoculado com os diversos OEs, nas várias quantidades estudadas, procedeu-se à construção das respetivas curvas de crescimento, ao longo dos 10 dias de incubação (Figuras 4.1 a 4.8). O efeito antifúngico de cada OE, nas várias quantidades, foi determinado por comparação do diâmetro da colónia na presença do OE, com o diâmetro visualizado quando o fungo foi inoculado sem a presença do OE (controlo).

A inibição fúngica induzida por cada OE, nas diversas quantidades, foi estimada a partir da análise dos diâmetros das colónias após 8 dias de incubação. Procedeu-se a uma análise estatística dos valores obtidos, de modo a verificar-se o quão significativas foram as diferenças de inibição fúngica observadas (Figura 4.9) (Tabela A2.1, Anexo II).

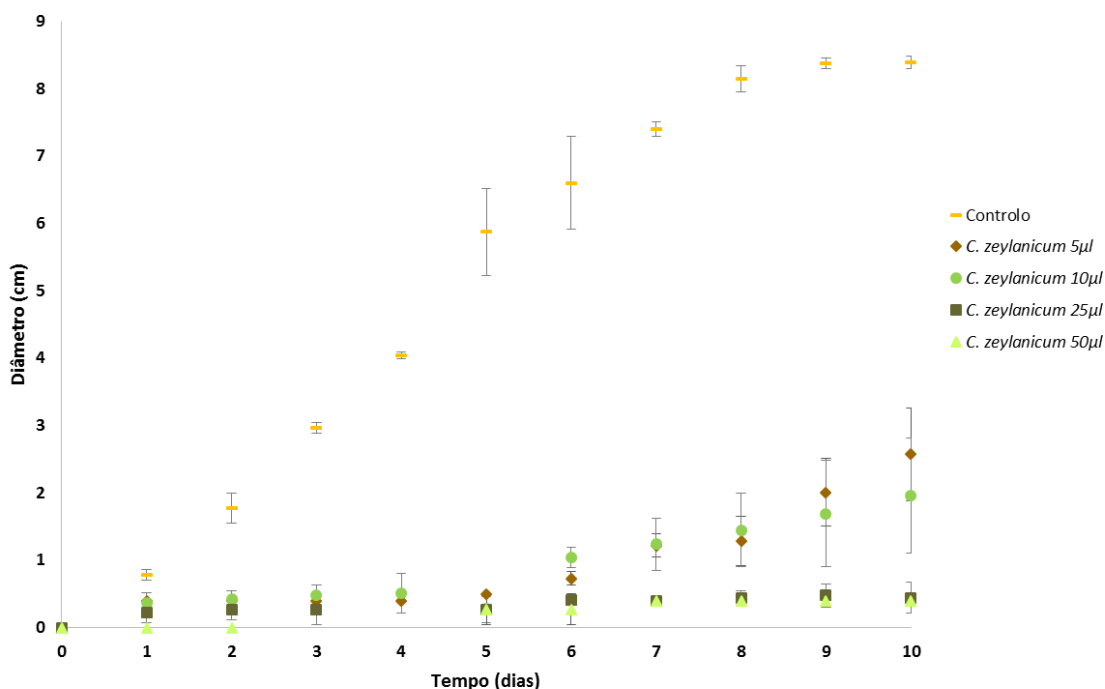


Figura 4.1: Crescimento fúngico de *A. parasiticus* durante 10 dias, sob o efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 μL do OE de *C. zeylanicum*.

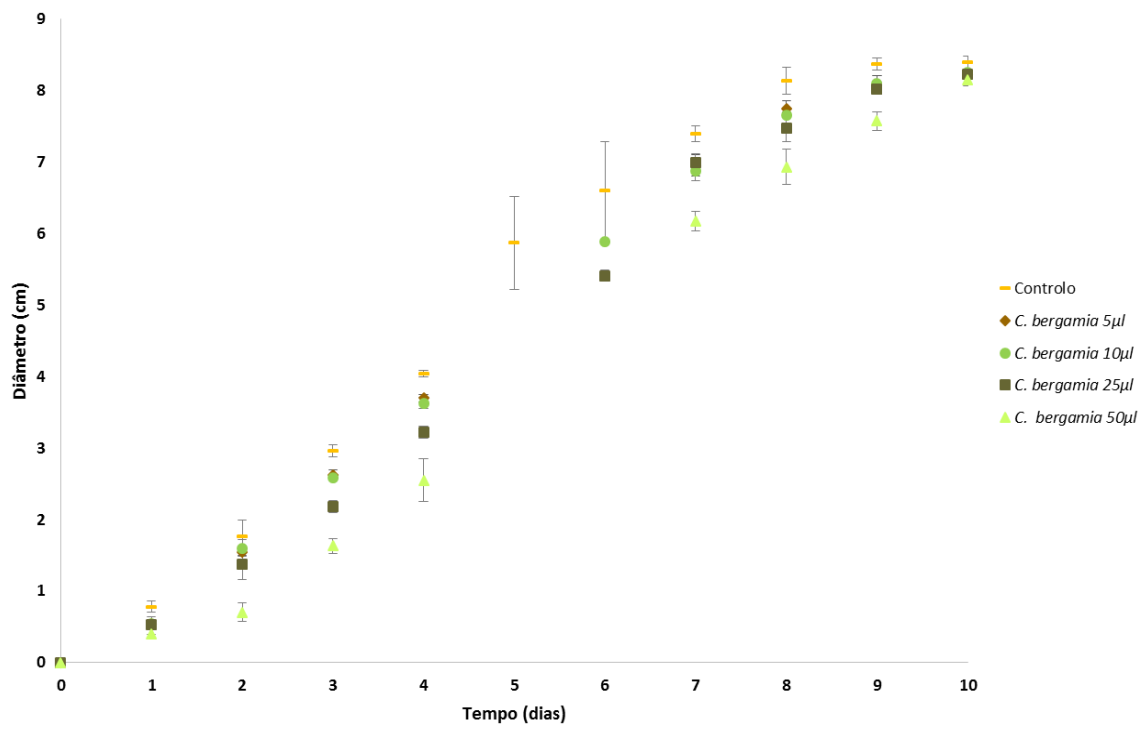


Figura 4.2: Crescimento fúngico de *A. parasiticus* durante 10 dias, sob o efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de *C. bergamia*.

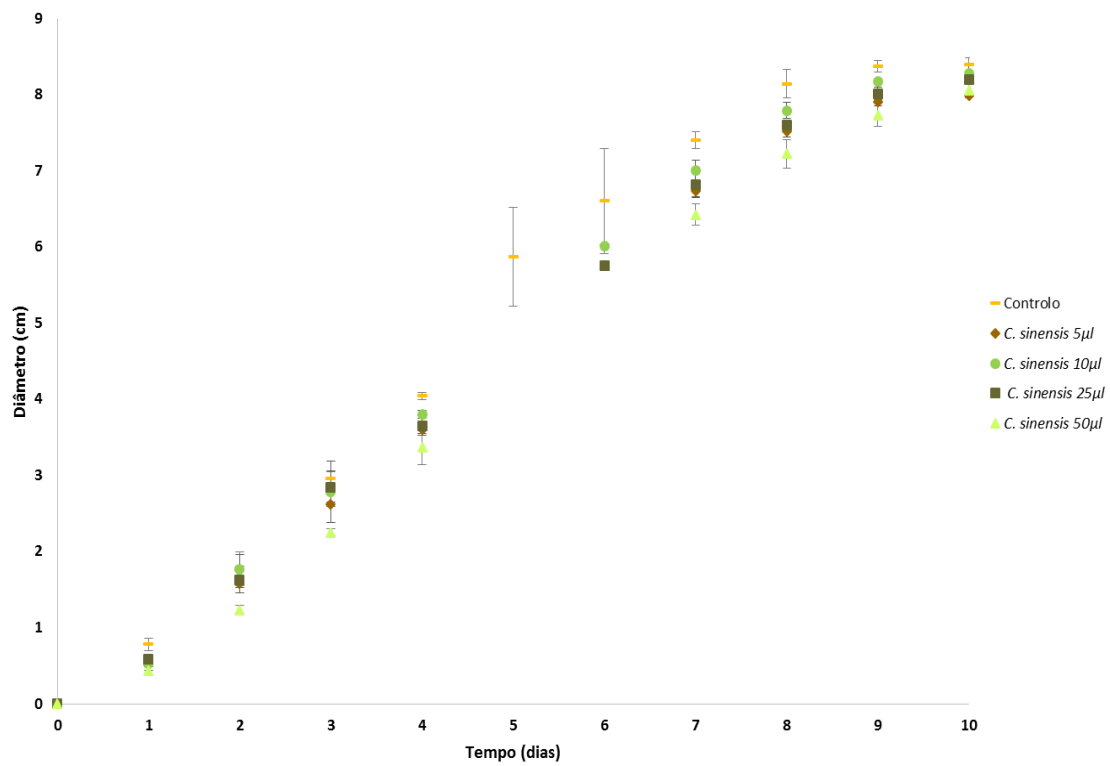


Figura 4.3: Crescimento fúngico de *A. parasiticus* durante 10 dias, sob o efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de *C. sinensis*.

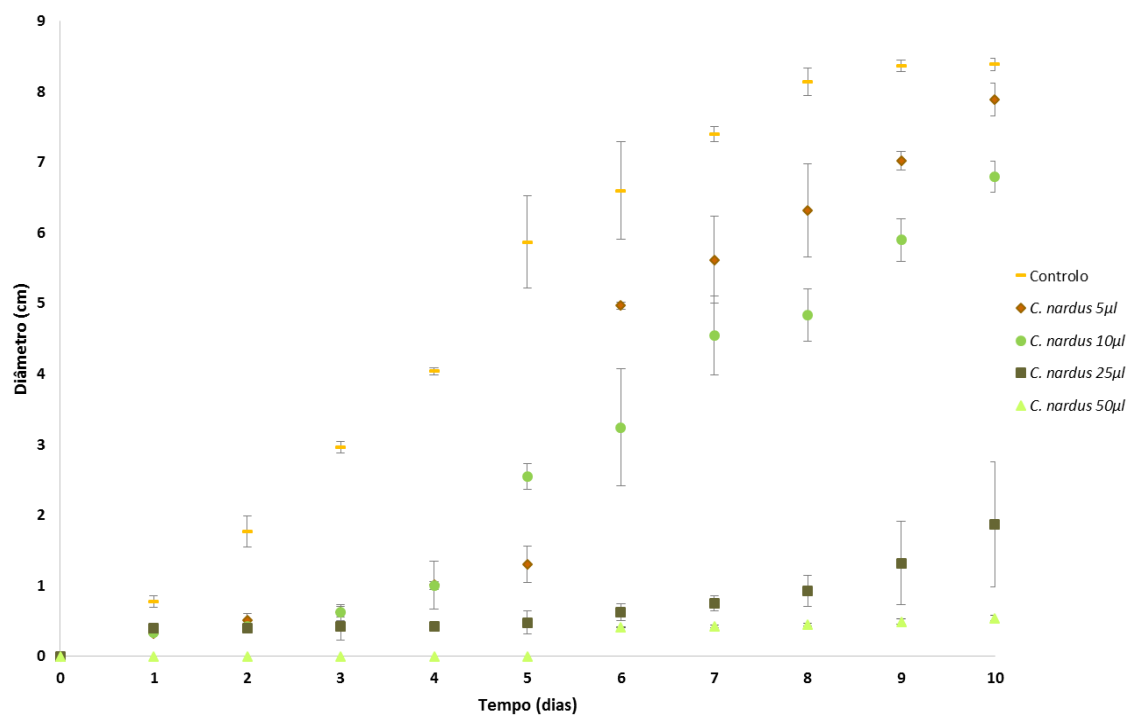


Figura 4.4: Crescimento fúngico de *A. parasiticus* durante 10 dias, sob o efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de *C. nardus*.

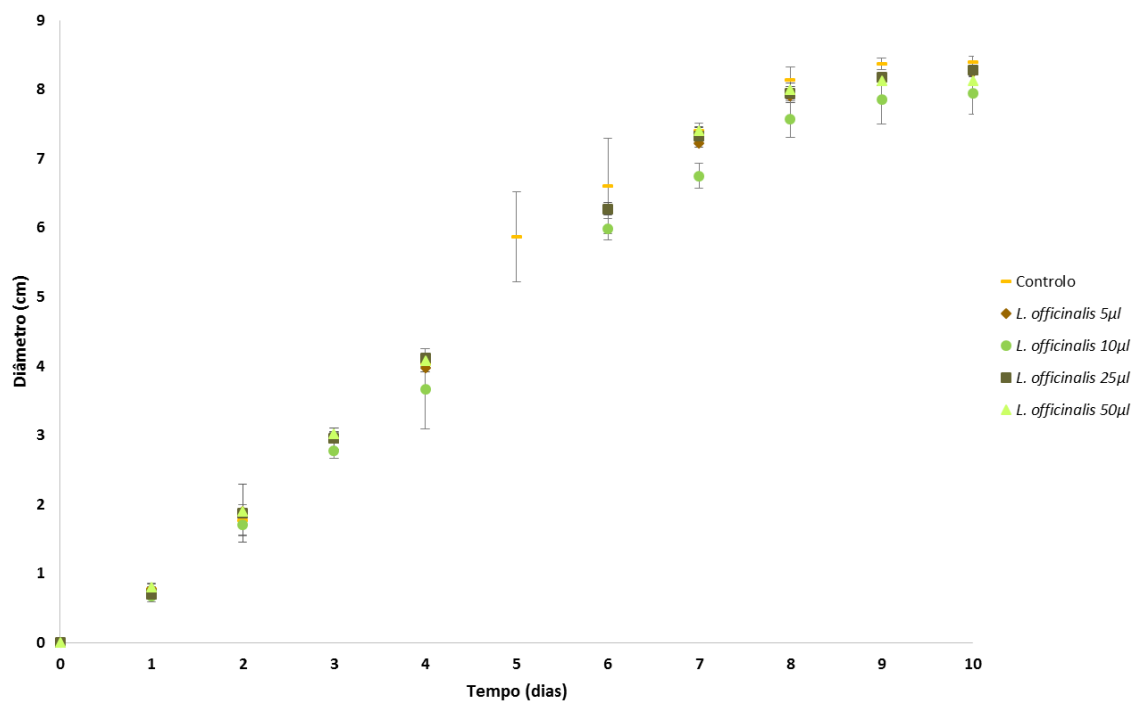


Figura 4.5: Crescimento fúngico de *A. parasiticus* durante 10 dias, sob o efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de *L. officinalis*.

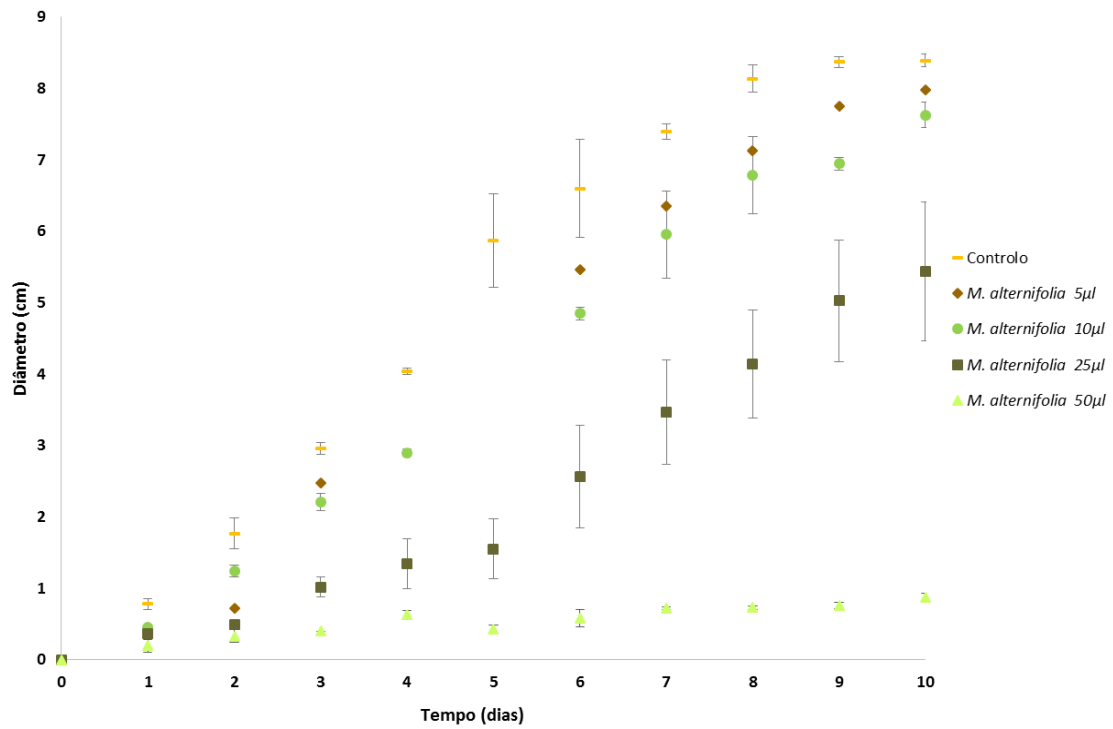


Figura 4.6: Crescimento fúngico de *A. parasiticus* durante 10 dias, sob o efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de *M. alternifolia*.

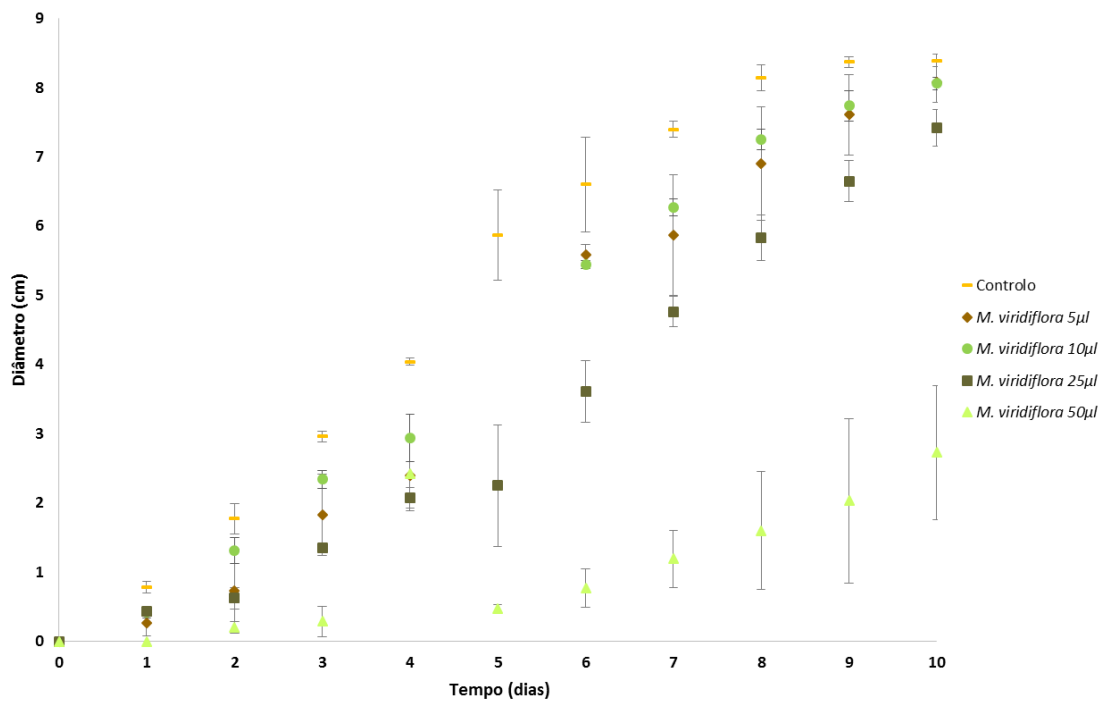


Figura 4.7: Crescimento fúngico de *A. parasiticus* durante 10 dias, sob o efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de *M. viridiflora*.

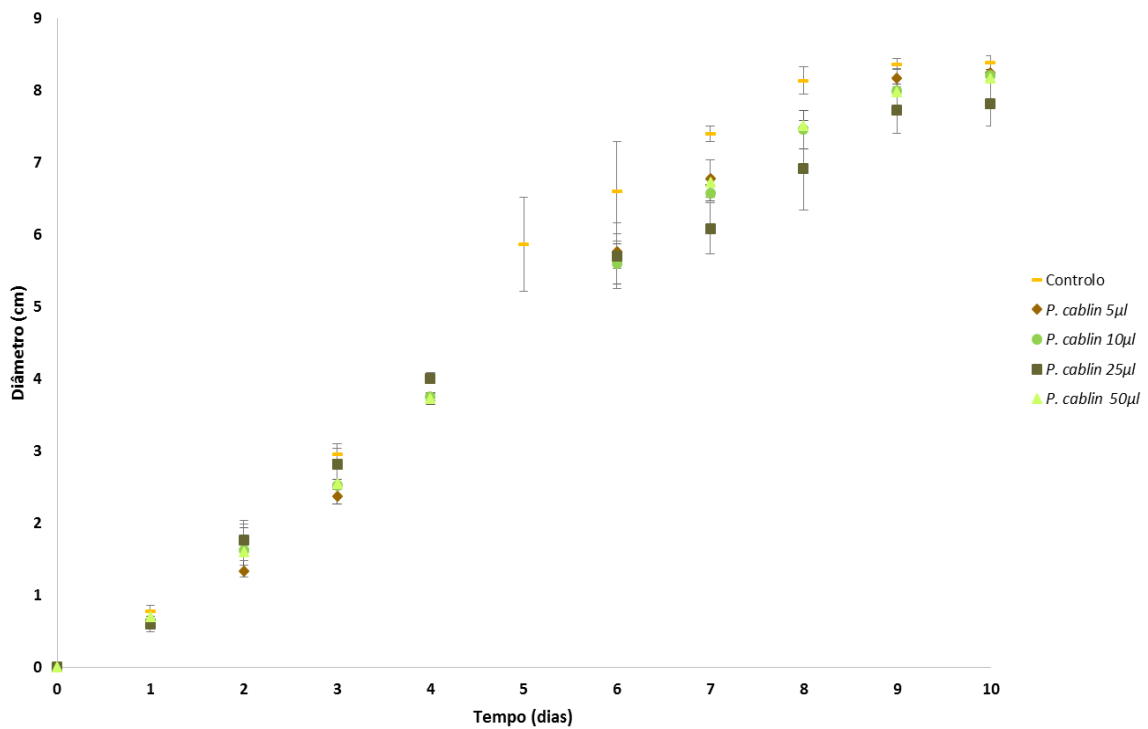


Figura 4.8: Crescimento fúngico de *A. parasiticus* durante 10 dias, sob o efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de *P. cablin*.

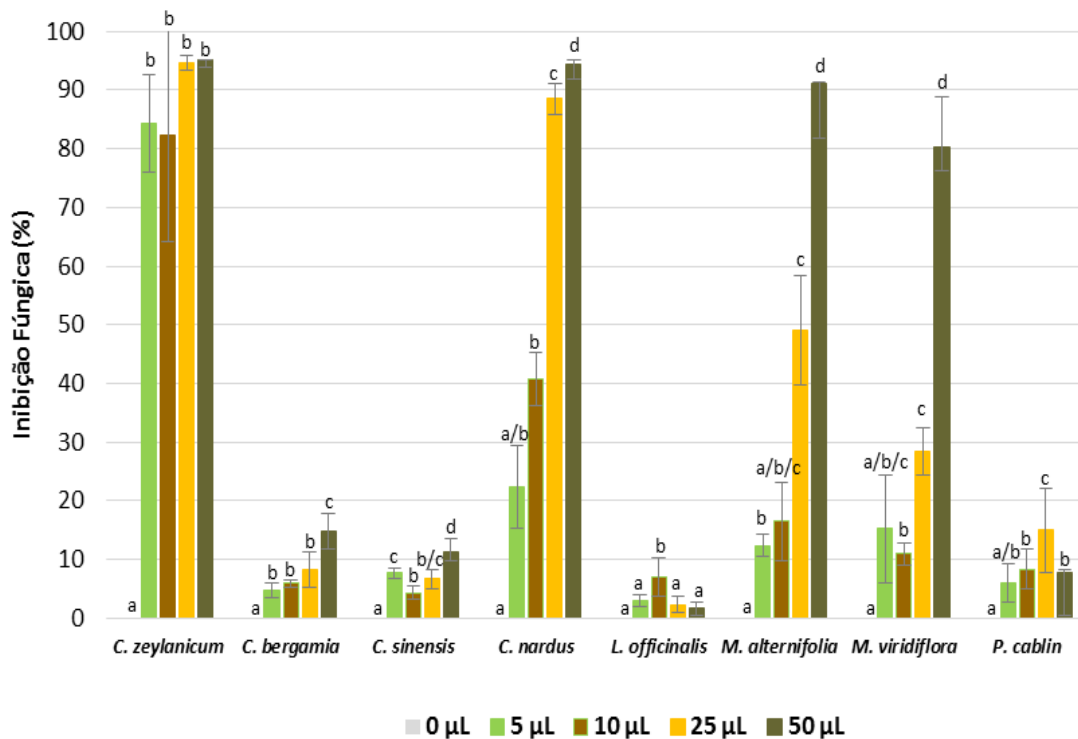


Figura 4.9: Inibição do crescimento de *A. parasiticus*, por diferentes quantidades dos vários OEs estudados. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05).

Na curva de crescimento fúngico obtida com o OE de *C. zeylanicum* observa-se um elevado efeito antifúngico nas várias quantidades estudadas. Além disso, foi visível que um aumento da quantidade do óleo diminuiu o crescimento fúngico, sendo que com a concentração de 5 μL o diâmetro obtido ao décimo dia de crescimento foi de apenas 2,57 cm, com a concentração de 10 μL foi de 1,96 cm, com a concentração de 25 μL foi de 0,44 cm e com a concentração de 50 μL , o crescimento fúngico foi ainda mais baixo, não ultrapassando os 0,4 cm (Figura 4.1) Estes resultados são indicativos do forte potencial do OE de *C. zeylanicum*. É ainda de referir que nas várias quantidades usadas, o crescimento fúngico começa a ser mais visível após os 5 dias de incubação (Figura 4.1). Com a utilização do óleo de *C. zeylanicum*, verifica-se que ocorreu um aumento da inibição fúngica com o aumento da quantidade do OE: com 5 μL deste OE obteve-se uma inibição de cerca de 80%, atingindo-se a inibição máxima de cerca de 95%, com 50 μL do OE. Estatisticamente, embora tenha ocorrido um ligeiro aumento da inibição com o aumento da quantidade do óleo, esse aumento não foi considerado significativo, indicando que as inibições obtidas com 5, 10, 25 e 50 μL do óleo foram estatisticamente diferentes do controlo mas idênticas entre si (Figura 4.9). Estes resultados mostram-se muito interessantes na medida em que, mesmo em baixas quantidades o OE de *C. zeylanicum* permite uma redução acentuada do crescimento fúngico podendo vir a ser um óleo com utilização económica.

Os resultados obtidos vão de encontro ao verificado por outros autores. Num estudo publicado em 2008, onde se estudou o efeito do OE de *C. zeylanicum* (5, 10, 20, 40, 80, 160 e 320 $\mu\text{L mL}^{-1}$) no crescimento de várias espécies de *Aspergillus*, incluindo *A. parasiticus*, os autores verificaram também que um aumento da concentração do óleo inibia o crescimento fúngico. A técnica de envenenamento do substrato mostrou um forte efeito fungicida do OE a 80 e 40 $\mu\text{L mL}^{-1}$, com uma inibição de 100%. Foi verificada ainda uma inibição de 80 e 90% da germinação de *A. flavus* e *A. fumigatus*, com 20 $\mu\text{L mL}^{-1}$ do OE. Ocorreu ainda 20% de inibição da germinação de *A. niger*, com 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do óleo essência I [136].

O efeito inibitório deste OE poderá dever-se ao facto de ser constituído por uma elevada quantidade de eugenol, conhecido por apresentar um efeito tóxico nos fungos filamentosos, nomeadamente em algumas espécies de *Aspergillus* [137]. Relata-se que o efeito antimicrobiano deste composto está associado ao seu carácter lipofílico, que faz com que ocorra um aumento da fluidez e permeabilidade da membrana celular dos microrganismos. Além disso, este composto pode interferir com o transporte de iões, desequilibrando condições osmóticas na membrana e tornando

as proteínas associadas ineficazes. Em qualquer caso, pode-se gerar inibição do crescimento microbiano e morte ou lise celular [138].

Com o OE de *C. bergamia*, verificou-se um baixo efeito antimicrobiano, durante os 10 dias de incubação, com o aumento da quantidade do óleo até 25 μL , dado que os diâmetros fúngicos visualizados nas placas que foram submetidas a essas quantidades foram significativamente idênticos entre si, embora menores que os visualizados no controle (figura 4.2 e 4.9).

No entanto, com a utilização de 50 μL do OE, esse efeito mostrou-se significativamente diferente, pois verificou-se uma diminuição mais visível do diâmetro fúngico e conseqüentemente uma maior inibição fúngica (cerca de 15%) (Figura 4.2 e 4.9). Estes resultados podem indicar a necessidade de concentrações superiores a 50 μL , para se visualizar um maior efeito antifúngico.

Com a utilização do OE de *C. sinensis* verificou-se também um baixo efeito antifúngico com todas as quantidades aplicadas. Com as curvas de crescimento fúngico não foi possível verificar diferenças ao nível da inibição fúngica, com as quantidades de 5, 10 e 25 μL , pois apresentaram diâmetros bastante próximos entre si e bastante próximos aos diâmetros obtidos com o controle (Figura 4.3). Com 50 μL do OE verificou-se uma maior redução do crescimento e um significativo aumento da inibição fúngica, comparativamente às inibições obtidas com as restantes quantidades (Figura 4.3 e 4.9). Estes resultados podem indicar a possibilidade de o OE apresentar uma superior atividade antifúngica em quantidades superiores a 50 μL , como é verificado noutros estudos.

Em 2008, Sharma *et al.* [139] investigaram o efeito do OE de *C. sinensis* no crescimento e a na morfologia de *A. niger*. Estes autores verificaram que com 3 mg L^{-1} do OE, o crescimento fúngico foi completamente inibido após 7 dias de incubação, sugerindo que a atividade antifúngica do óleo poderá ser devida ao ataque da parede celular, retração do citoplasma e finalmente a morte do micélio. Estes investigadores sugeriram que tais modificações podem ainda estar relacionadas com a interferência de componentes do OE com reações enzimáticas da síntese da parede, afetando a morfogénese e o crescimento fúngico [139].

Viuda-Martó *et al.* [140] verificaram que o OE de *C. sinensis* apresentou capacidade de redução ou inibição do crescimento de *A. niger* e *A. flavus*, nas várias concentrações estudadas (cerca de 2,7 a 9,4 g L^{-1}). Os autores verificaram que com o aumento da concentração do óleo ocorria uma diminuição do crescimento fúngico, sendo que com 9 g L^{-1} do óleo ocorreu um crescimento que não ultrapassou os 0,9 cm nos 9 dias de incubação, com ambos os fungos.

Vários autores indicam que a atividade antifúngica dos OEs de *Citrus* é devida à presença de compostos como o limoneno e o linalol [141, 142]. Outros autores atribuem a função

antimicrobiana do óleo a compostos fenólicos, dado que a anfipaticidade destes compostos podem explicar as suas interações com a membrana, inculindo em efeito antimicrobiano [143].

Na curva de crescimento fúngico obtida com o OE de *C. nardus*, observa-se que o óleo exibiu um efeito inibitório no crescimento fúngico, nas diferentes quantidades aplicadas (5, 10, 25 e 50 μL). Com o aumento da quantidade do OE, verificou-se um aumento do efeito antifúngico, com diminuição do diâmetro das colónias, comparativamente ao verificado no controlo (Figura 4.4). Este aumento do efeito antifúngico com o aumento da quantidade deste OE foi comprovado pelo cálculo da inibição fúngica. No entanto, a análise estatística revelou que o aumento da inibição fúngica foi apenas significativamente diferente com 25 e 50 μL (Figura 4.9).

A inibição do crescimento fúngico visualizada com este OE vai de encontro ao verificado em estudos anteriores. Em 2001, foi estudado o efeito de *C. nardus* no crescimento de *A. niger*. Neste estudo foram usadas 100, 200, 400 e 800 mg L^{-1} do OE e o fungo foi incubado por 14 dias. Os autores verificaram que, um aumento da quantidade do óleo inibia o crescimento fúngico, sendo que com as quantidades mais baixas (100, 200 e 400 mg L^{-1}) ocorreu desenvolvimento fúngico, nas condições do ensaio. Com 800 mg L^{-1} do OE, o desenvolvimento do fungo foi completamente inibido (100 % de inibição fúngica) ao longo dos 14 dias de incubação [144]. Os componentes presentes no óleo de *C. nardus* são relatados como os principais responsáveis pela atividade antifúngica deste OE. Num estudo publicado em 2003, verificou-se que componentes citronelal e linalol inibiram completamente o crescimento de todas as estirpes de fungos testadas, numa dose de 112 mg L^{-1} . Os resultados sugeriam que o citronelal, e o linalol contribuíram significativamente para a atividade antifúngica visualizada [93]. Num outro estudo foi verificado o crescimento de várias espécies de *Aspergillus* foi inibido pelo componente citronelol [145]. Dessa forma, o efeito antifúngico visualizado no presente estudo também poderá ter ocorrido devido à presença do composto citronelal e citronelol, que se apresentaram como os componentes maioritários do OE, na análise química efetuada.

O facto de estes componentes exibirem propriedades antifúngicas pode dever-se à perturbação do sistema da membrana mitocondrial. A disrupção da membrana pode ainda estar associada a reações enzimáticas da membrana, como o transporte de eletrões e protões e as etapas de fosforilação acopladas [144].

Como se pode visualizar na curva de crescimento fúngico obtida com o OE de *L. officinalis* presente na figura 4.5, verificou-se uma baixa inibição, dado que o comportamento fúngico obtido com as diversas quantidades do OE (0, 5, 10, 25 e 50 μL), manteve-se bastante semelhante.

As inibições calculadas e a análise estatística efetuada comprovam esta observação, mostrando que as inibições obtidas com as quantidades de 5, 25 e 50 μL foram estatisticamente idênticas (Figura 4.9). No entanto verifica-se que a quantidade de 10 μL originou uma diminuição do crescimento fúngico, após o quarto dia de incubação (Figura 4.5) e conseqüentemente um significativo aumento da percentagem de inibição fúngica, comprovado pela análise estatística (Figura 4.9). Este resultado pode dever-se a um erro experimental.

Os resultados obtidos para o óleo de *L. officinalis* sugerem que as quantidades utilizadas poderão não ter sido suficientes para se verificarem maiores diferenças ao nível da inibição fúngica, sendo necessário concentrações superiores para se verificar o seu efeito.

Rashidi *et al.* [146] estudaram o efeito antifúngico de *L. officinalis* e de outros OEs. Verificaram que o OE de *L. officinalis* apresentou um efeito antifúngico, com concentrações mínimas inibitórias de 16 670; 66 670 e 41 700 mg L^{-1} para *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. niger*, respetivamente. Assim, as diferenças nos resultados obtidos no presente estudo comparativamente ao estudo efetuado por Rashidi *et al.* [146] podem ser atribuídas a vários fatores incluindo a composição, a quantidade do OE e a metodologia utilizada.

O OE de *M. alternifolia* apresentou um efeito antifúngico nas várias quantidades estudadas. Além disso, o aumento da concentração do óleo induziu uma diminuição do crescimento fúngico, comparativamente com o controlo, tal como pode ser verificado nas curvas de crescimento apresentadas na figura 4.6.

No entanto, essa correlação foi mais visível com as concentrações de 25 e 50 μL , uma vez que se obtiveram inibições fúngicas superiores. A análise estatística revelou que a inibição fúngica obtida com 50 μL foi significativamente diferente das restantes, mas a inibição fúngica obtida com 25 μL apenas foi significativamente diferente da inibição obtida com 0, 5 e 50 μL (Figura 4.9). A inibição fúngica obtida com 10 μL do OE não apresentou diferenças estatísticas com as inibições obtidas 0, 5 e 25 μL , o que pode indicar que o OE de *M. alternifolia* apresenta uma forte capacidade inibitória quando utilizado em concentrações superiores (Figura 4.9). Os resultados visualizados vão de encontro ao verificado noutros estudos. Num estudo realizado por Lima *et al.* [147], onde se estudou o efeito antifúngico do OE de *M. alternifolia*, com espalhamento de alíquotas de 0.5, 5, 10 e 15 μL na superfície do meio, os autores verificaram que o óleo inibiu o crescimento de *A. flavus* em todas as concentrações. Porém, o óleo apresentou baixa eficiência no controlo do crescimento de *A. niger*. Diferentes autores sugerem que o efeito antifúngico de *M. alternifolia* pode ser devido a alterações ou danos no funcionamento das membranas fúngicas,

provocadas pelos componentes constituintes do OE [98]. O componente terpineno-4-ol, que se apresentou em maior quantidade neste OE é realçado num outro estudo, uma vez que se mostrou ativo contra todos os microrganismos do ensaio. Já o componente p-cimeno, também presente em elevadas quantidades, não demonstrou nenhuma atividade antimicrobiana nesse mesmo estudo [148].

Nos ensaios realizados com o OE de *M. viridiflora* verificou-se uma tendência para uma diminuição do crescimento fúngico com o aumento da quantidade do OE, comparativamente com o controlo. No entanto, nas placas submetidas a 5 e 10 μL do OE, o crescimento fúngico mostrou-se similar e a análise estatística efetuada revelou não existir diferenças entre as inibições fúngicas obtidas com ambas as quantidades (Figura 4.7 e 4.9). A análise estatística também revelou não existir diferenças significativas entre as inibições obtidas com 0 e 5 μL e com 5 e 25 μL . Com a concentração mais elevada do óleo (50 μL), verificou-se um aumento significativo do efeito antifúngico, com uma diminuição do crescimento da estirpe de fungo testada (Figura 4.7 e 4.9). Os resultados apontam para um maior potencial antifúngico deste óleo, para concentrações mais elevadas.

A capacidade antifúngica do óleo de *M. viridiflora* pode dever-se ao facto de ser constituído maioritariamente por 1,8-cineol. Este componente é referido em alguns estudos, pois inibe a proliferação fúngica quando está presente em quantidades elevadas [149, 150]. O efeito inibitório deste OE também poderá estar relacionado com os componentes presentes em menores quantidades, que têm um efeito sinérgico com os componentes principais, nomeadamente com o 1,8-cineol [151].

Na figura 4.8, que representa a curva de crescimento fúngico ao longo dos 10 dias de incubação com a utilização do OE de *P. cablin*, verifica-se que ocorreu um baixo efeito antifúngico, pois as curvas de crescimento obtidas com cada quantidade do óleo estudadas apresentaram comportamento idêntico entre si e também comparativamente ao controlo. No entanto, é possível verificar que nas placas submetidas a 25 μL , a partir dos 6 dias de crescimento, ocorreu uma menor crescimento fúngico e conseqüentemente uma maior inibição fúngica, comparativamente às placas submetidas a 5, 10 e 50 μL do óleo, que, para além de apresentarem crescimentos similares, apresentaram inibições mais aproximadas e estatisticamente idênticas (Figura 4.8 e 4.9). Estes resultados podem indicar a ocorrência de algum erro experimental que fez com que se obtivesse melhores resultados com a concentração de 25 μL . Também podem indicar que as quantidades usadas do óleo poderão não ser as suficientes para a visualização de uma inibição

fúngica correlacionável. A utilização de concentrações superiores a 50 μL poderia mostrar a possibilidade de uma superior atividade antifúngica.

Num estudo publicado em 2013, Kocevski *et al.* [152] verificaram que o OE de *P. cablin* inibiu o crescimento fúngico de *A. flavus* e *A. oryzae* com uma concentração superior a 1500 mg L^{-1} . A atividade antifúngica do óleo poderá ser devida a danos em enzimas responsáveis pela produção de energia, inibição de compostos essenciais ou até mesmo a desnaturação de enzimas responsáveis pela germinação dos esporos fúngicos [152].

4.2.1.1 Modelação do crescimento fúngico

Além da avaliação do diâmetro das colónias ao longo dos 10 dias de crescimento e da avaliação da inibição fúngica ocorrida com a aplicação dos vários óleos nas diversas quantidades, procedeu-se também a uma avaliação da velocidade de crescimento fúngico (μ) e do tempo de crescimento fúngico necessário para a velocidade de crescimento se tornar constante (λ), ajustando para o efeito o modelo de Baranyi e Roberts [133] modificado. Os resultados obtidos estão expostos na figura 4.10 e 4.11 (Tabela A2.2, Anexo II).

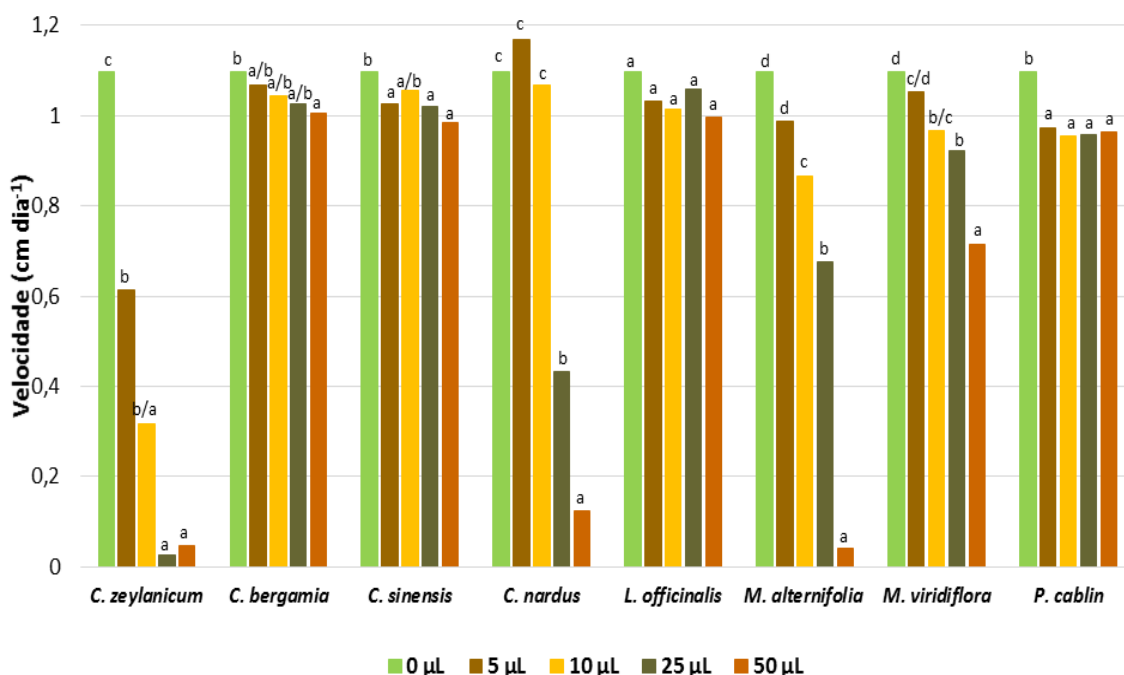


Figura 4.10: Valores médios da velocidade de crescimento de *A. parasiticus*, sob efeito de diferentes quantidades dos OEs estudados. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c, d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C ($P=0,05$).

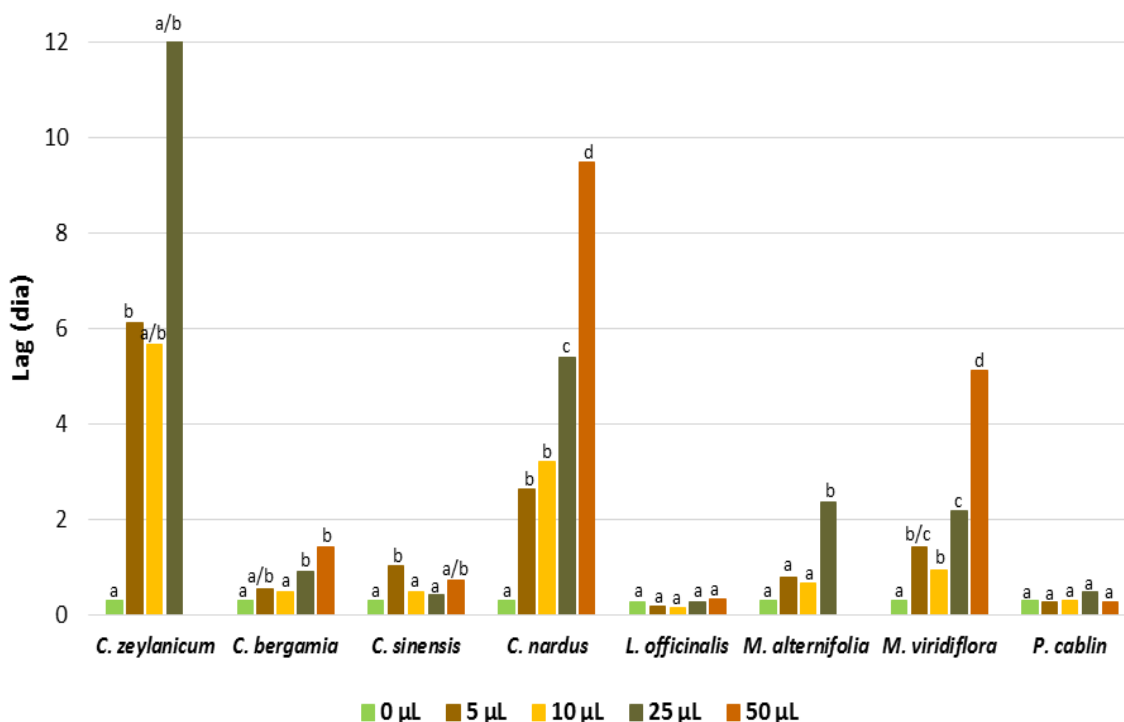


Figura 4.11: Valores médios do tempo de crescimento Lag de *A. parasiticus*, sob efeito de diferentes quantidades dos OEs estudados. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05).

Segundo o gráfico apresentado na figura 4.10, é possível verificar que as velocidades de crescimento fúngico com a aplicação dos vários OEs foram significativamente diferentes.

Com o OE de *C. zeylanicum* verificou-se a diminuição mais significativa da velocidade de crescimento fúngico com o aumento da quantidade do óleo, comparativamente aos restantes óleos. Foi ainda possível verificar que o óleo apresentou velocidades de crescimento bastante baixas em todas as quantidades usadas (5, 10, 25 e 50 µL). No entanto, as velocidades de crescimento obtidas com 5 e 10 µL foram estatisticamente idênticas, bem como as velocidades obtidas com 10, 25 e 50 µL (Figura 4.10).

Relativamente ao parâmetro de crescimento Lag (λ), verificou-se um aumento do tempo para o crescimento fúngico atingir uma fase constante, com o aumento da quantidade do OE. Com 50 µL do OE de *C. zeylanicum* verificou-se um tempo para crescimento contante negativo (Tabela A2.2, Anexo II), devido ao facto de se ter visualizado um crescimento fúngico bastante baixo com este volume do óleo. Este valor negativo não tem significado físico e decorre do erro do ajuste do modelo à curva de crescimento. No entanto, a análise estatística revelou que não existiram diferenças significativas comparativamente aos restantes tempos para crescimento, obtidos com

as outras quantidades testadas. Apenas apresentaram diferenças significativas, os tempos para crescimento obtidos com 0 e 5 μL (Figura 4.11).

Com o OE de *C. bergamia* visualizou-se uma tendência para a diminuição da velocidade de crescimento com o aumento da quantidade do óleo. No entanto, a diminuição da velocidade de crescimento apenas se mostrou significativa entre o controle e a maior quantidade de óleo testada – 50 μL (Figura 4.10).

Relativamente ao parâmetro de crescimento Lag (λ), também foi observada uma tendência para o seu aumento na presença do óleo, embora este aumento não tenha sido significativamente diferente em algumas quantidades testadas, nomeadamente com 0, 5 e 10 μL e com 5, 25 e 50 μL (Figura 4.11).

Com o OE de *C. sinensis* foi possível verificar uma diminuição geral da velocidade de crescimento com o aumento da quantidade do OE, embora com algumas variações entre quantidades. A análise estatística provou a existência dessas mesmas variações, dado que as velocidades de crescimento obtidas com 5, 10, 25 e 50 μL não apresentaram diferenças significativas, bem como as velocidades de crescimento obtidas com 0 e 10 μL do OE. Estes resultados poderão indicar que apenas concentrações elevadas do óleo poderão exibir um efeito antifúngico significativo (Figura 4.10).

Relativamente ao parâmetro de crescimento Lag (λ) obtido com as várias quantidades do mesmo óleo, verificou-se também algumas variações. Assim, não ocorreu uma correlação entre o aumento da quantidade do óleo e o tempo para crescimento, sendo que a análise estatística indicou que o tempo para crescimento com 0 μL foi estatisticamente idêntico ao de 10, 25 e 50 μL , bem como o tempo para crescimento obtido com 5 e 50 μL . Estes resultados sugerem o que já foi relatado, ou seja, a necessidade de superiores quantidades do óleo, para se visualizarem uma melhor correlação nos resultados (Figura 4.11).

Com o OE de *C. nardus*, as velocidades de crescimento tenderam a diminuir com o aumento da quantidade do óleo, dado que ocorreu uma diminuição nos diâmetros fúngicos com esse mesmo aumento. No entanto, segundo os dados estatísticos, a diminuição da velocidade de crescimento com o mesmo óleo, foi estatisticamente diferente apenas na concentração de 25 e 50 μL . Na concentração de 0, 5 e 10 μL ocorreram diferenças ao nível da velocidade de crescimento, que estatisticamente não apresentaram significado (Figura 4.10).

Relativamente ao parâmetro de crescimento Lag (λ) obtido com o mesmo OE, verificou-se que um aumento da quantidade do óleo originou um aumento do tempo de crescimento necessário para

a velocidade ser constante. A análise estatística indicou que o tempo de crescimento foi realmente diferente entre quantidades, à exceção das quantidades de 5 e 10 μL , que não apresentaram diferenças significativas (Figura 4.11).

No que se refere aos ensaios realizados com o OE de *L. officinalis* foi possível verificar que as velocidades de crescimento apresentaram uma ligeira diminuição com o aumento da quantidade do óleo. A análise estatística indicou que as diminuições observadas nas velocidades de crescimento não foram significativas (Figura 4.10).

Relativamente ao parâmetro de crescimento Lag (λ), verificou-se que não ocorreu correlação entre o aumento da quantidade do OE de *L. officinalis* e o tempo para o crescimento. Da análise estatística foi possível verificar que embora exista variações ao nível do tempo de crescimento fúngico entre quantidades, as mesmas foram consideradas estatisticamente idênticas (Figura 4.11). Estes resultados sugerem a necessidade de utilização de quantidades maiores deste óleo, para a visualização de um efeito antifúngico.

Com o óleo de *M. alternifolia* verificou-se uma diminuição da velocidade de crescimento fúngico com o aumento da quantidade do óleo (Figura 4.10). A análise estatística revelou que as velocidades de crescimento para cada quantidade testada, foram significativamente diferentes entre si, à exceção das velocidades obtidas com 0 e 5 μL (Figura 4.10).

Os tempos para o crescimento atingir uma velocidade constante tenderam a aumentar com o aumento da quantidade do OE de *M. alternifolia* (Figura 4.11). Para a quantidade de 50 μL verificou-se um tempo para o crescimento negativo (Tabela, Anexo), que se deveu ao facto de ter ocorrido um baixo crescimento fúngico com este volume de óleo. Ao nível estatístico verificou-se que os tempos para crescimento obtidos com 0, 5 e 10 μL foram iguais (Figura 4.11).

O mesmo foi observado com o óleo de *M. viridiflora*, onde um aumento da quantidade do óleo levou a uma diminuição da velocidade de crescimento fúngico. No entanto, as velocidades de crescimento das culturas que foram sujeitas a 5 e 10 μL do óleo revelaram ser estatisticamente idênticas, bem como as velocidades obtidas com 10 e 25 μL . A velocidade de crescimento obtida com 50 μL foi significativamente diferente das restantes (Figura 4.10).

Relativamente ao parâmetro de crescimento Lag (λ) obtido com as várias quantidades do mesmo óleo, verificou-se que ocorreu um ligeiro aumento, apenas estatisticamente diferente com o volume de 50 μL . O tempo para crescimento obtido com 5 μL mostrou não apresentar diferenças significativas com os tempos para crescimento obtidos com 10 e 25 μL (Figura 4.11).

Já com o OE de *P. cablin* verificou-se que ocorreu uma diminuição da velocidade de crescimento, comparativamente às culturas que não foram expostas ao OE (0 µL). No entanto, a partir de 5 µL não ocorreu alterações significativas da velocidade de crescimento. (Figura 4.10). Verificou-se ainda com o mesmo OE, que os tempos para crescimento fúngico não foram significativamente diferentes entre as várias quantidades testadas (Figura 4.11).

Estes resultados podem indicar que as quantidades testadas não foram suficientes para a visualização de uma diferença significativa entre as velocidades de crescimento e os tempos para os crescimentos atingirem uma velocidade constante.

4.2.2 Efeito dos óleos essenciais na produção de AFs por *A. parasiticus*

De forma a avaliar a capacidade dos OEs inibirem a produção de AFs (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2), o fungo *A. parasiticus* foi inoculado juntamente com diferentes quantidades dos OEs (5, 10, 25 e 50 µL), sendo avaliada a produção de AFs, após 10 dias de crescimento. Os resultados relativos à produção de AFs com os vários OEs estão representados nas tabelas 4.3 a 4.10 (Tabela A2.3, Anexo II).

Para os OEs que mostraram efeito inibitório na produção de AFB1 e AFG1, procedeu-se ao cálculo das respetivas inibições. Os resultados de inibição da produção das AFB1 e AFG1 estão representados na figura 4.12 e 4.13 (Tabela A2.3, Anexo II).

Tabela 4.3: Produção de AFs por *A. parasiticus*, sob efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de *C. zeylanicum*. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05)

Volume (µL)	AFB1 (µg mL ⁻¹)	AFB2 (µg mL ⁻¹)	AFG1 (µg mL ⁻¹)	AFG2 (µg mL ⁻¹)
0	10,74±2,70 b	0,07±0,04	2,41±0,43 b	0,02±0,02
5	0,00±0,00 a	0,00±0,00	0,00±0,00 a	0,00±0,00
10	0,00±0,00 a	0,00±0,00	0,00±0,00 a	0,00±0,00
25	0,00±0,00 a	0,00±0,00	0,00±0,00 a	0,00±0,00
50	0,00±0,00 a	0,00±0,00	0,00±0,00 a	0,00±0,00

Tabela 4.4: Produção de AFs por *A. parasiticus*, sob efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de *C. bergamia*. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05)

Volume (µL)	AFB1 (µg mL ⁻¹)	AFB2 (µg mL ⁻¹)	AFG1 (µg mL ⁻¹)	AFG2 (µg mL ⁻¹)
0	10,74±2,70 b	0,07±0,04	2,41±0,43 c	0,02±0,02
5	7,60±0,78 b	0,06±0,01	1,80±0,53 b	0,01±0,00
10	2,84±0,56 a	0,00±0,00	1,19±0,34 a	0,00±0,00
25	2,77±0,53 a	0,00±0,00	1,24±0,38 a/b	0,00±0,00
50	7,09±0,54 b	0,06±0,01	1,60±0,44 a/b	0,01±0,00

Tabela 4.5: Produção de AFs por *A. parasiticus*, sob efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de *C. sinensis*. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05)

Volume (µL)	AFB1 (µg mL ⁻¹)	AFB2 (µg mL ⁻¹)	AFG1 (µg mL ⁻¹)	AFG2 (µg mL ⁻¹)
0	10,74±2,70 b	0,07±0,04	2,41±0,43 b	0,02±0,02
5	11,48±0,97 b	0,23±0,02	3,96±0,35 c	0,06±0,01
10	2,75±0,52 a	0,08±0,02	1,38±0,35 a	0,00±0,00
25	4,17±1,02 a	0,05±0,05	2,40±0,73 b	0,00±0,00
50	10,21±0,8 b	0,22±0,04	4,02±0,08 c	0,07±0,01

Tabela 4.6: Produção de AFs por *A. parasiticus*, sob efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de *C. nardus*. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05)

Volume (µL)	AFB1 (µg mL ⁻¹)	AFB2 (µg mL ⁻¹)	AFG1 (µg mL ⁻¹)	AFG2 (µg mL ⁻¹)
0	10,74±2,70 b	0,08±0,06	2,41±0,43 c	0,02±0,02
5	4,27±1,78 a	0,04±0,01	1,35±0,32 b	0,00±0,00
10	1,61±1,02 a	0,00±0,00	0,69±0,08 b	0,00±0,00
25	0,06±0,04 a	0,00±0,00	0,02±0,01 a	0,00±0,00
50	0,00±0,00 a	0,00±0,00	0,00±0,00 a	0,00±0,00

Tabela 4.7: Produção de AFs por *A. parasiticus*, sob efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de *L. officinalis*. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05)

Volume (µL)	AFB1 (µg mL ⁻¹)	AFB2 (µg mL ⁻¹)	AFG1 (µg mL ⁻¹)	AFG2 (µg mL ⁻¹)
0	10,74±2,70 b	0,08±0,06	2,41±0,43 b	0,02±0,02
5	8,97±0,40 b	0,00±0,00	2,06±0,47 a	0,00±0,00
10	3,08±0,97 a	0,00±0,00	0,88±0,71 a	0,00±0,00
25	3,83±0,31 a	0,00±0,00	1,78±0,41 a	0,00±0,00
50	8,26±0,42 b	0,13±0,02	2,25±0,05 a	0,03±0,00

Tabela 4.8: Produção de AFs por *A. parasiticus*, sob efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de *M. alternifolia*. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's (P=0,05)

Volume (µL)	AFB1 (µg mL ⁻¹)	AFB2 (µg mL ⁻¹)	AFG1 (µg mL ⁻¹)	AFG2 (µg mL ⁻¹)
0	10,74±2,70 d	0,07±0,04	2,41±0,43 d	0,02±0,02
5	3,23±0,36 c	0,14±0,00	1,73±0,29 c	0,00±0,00
10	2,42±0,35 c	0,09±0,08	0,81±0,53 b	0,00±0,00
25	0,70±0,24 b	0,03±0,00	0,34±0,14 a/b	0,00±0,00
50	0,00±0,00 a	0,00±0,00	0,00±0,00 a	0,00±0,00

Tabela 4.9: Produção de AFs por *A. parasiticus*, sob efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 µL do OE de *M. viridiflora*. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c, d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's (P=0,05)

Volume (µL)	AFB1 (µg mL ⁻¹)	AFB2 (µg mL ⁻¹)	AFG1 (µg mL ⁻¹)	AFG2 (µg mL ⁻¹)
0	10,74±2,70 b	0,07±0,04	2,41±0,43 c	0,02±0,02
5	5,49±3,18 a/b	0,13±0,06	0,38±0,14 b	0,00±0,00
10	3,24±0,35 a	0,15±0,03	0,33±0,17 b/a	0,00±0,00
25	1,64±0,30 a	0,03±0,01	0,06±0,05 a	0,00±0,00
50	1,51±1,77 a	0,02±0,02	0,05±0,07 a	0,00±0,00

Tabela 4.10: Produção de AFs por *A. parasiticus*, sob efeito de 0, 5, 10, 25 e 50 μL do OE de *P. cablin*. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c, d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's ($P=0,05$)

Volume (μL)	AFB1 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	AFB2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	AFG1 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	AFG2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
0	10,74 \pm 2,70 b	0,07 \pm 0,04	2,41 \pm 0,43 b	0,02 \pm 0,02
5	1,65 \pm 0,30 a	0,06 \pm 0,01	1,38 \pm 0,65 a	0,00 \pm 0,00
10	1,93 \pm 0,95 a	0,07 \pm 0,08	1,13 \pm 0,12 a	0,00 \pm 0,00
25	3,22 \pm 2,37 a	0,06 \pm 0,02	1,14 \pm 0,86 a	0,00 \pm 0,00
50	4,62 \pm 1,18 a	0,07 \pm 0,03	1,3 \pm 0,38 a	0,02 \pm 0,01

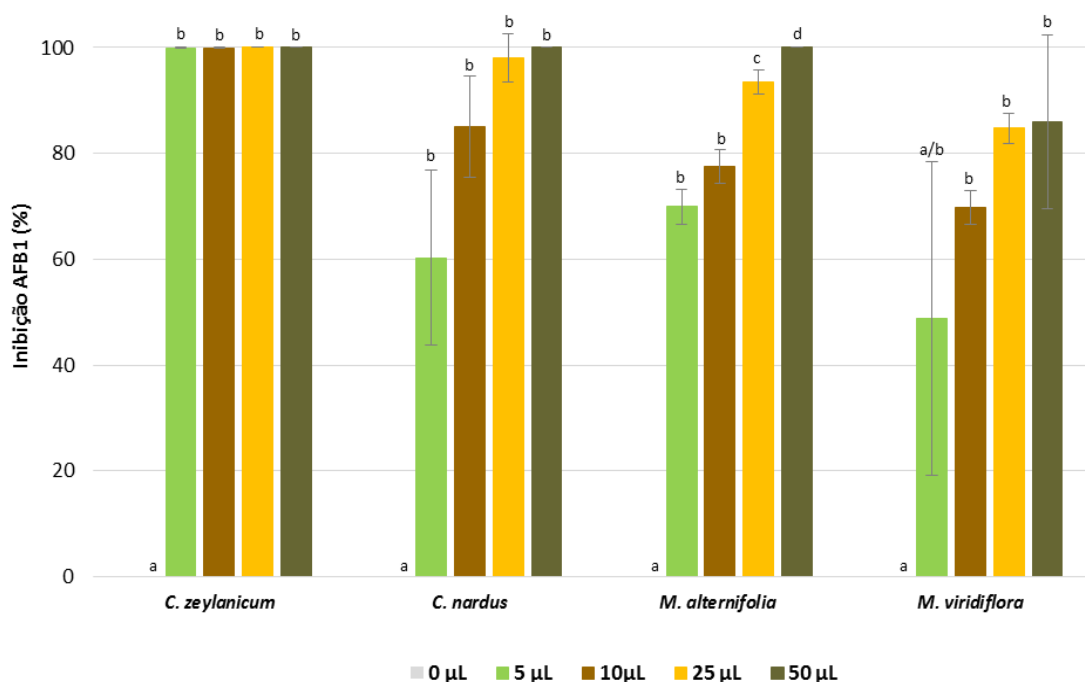


Figura 4.12: Inibição da produção de AFB1 por *A. parasiticus*, por diferentes quantidades dos OEs de *C. nardus*, *M. viridiflora*, *M. alternifolia* e *C. zeylanicum*. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C ($P=0,05$).

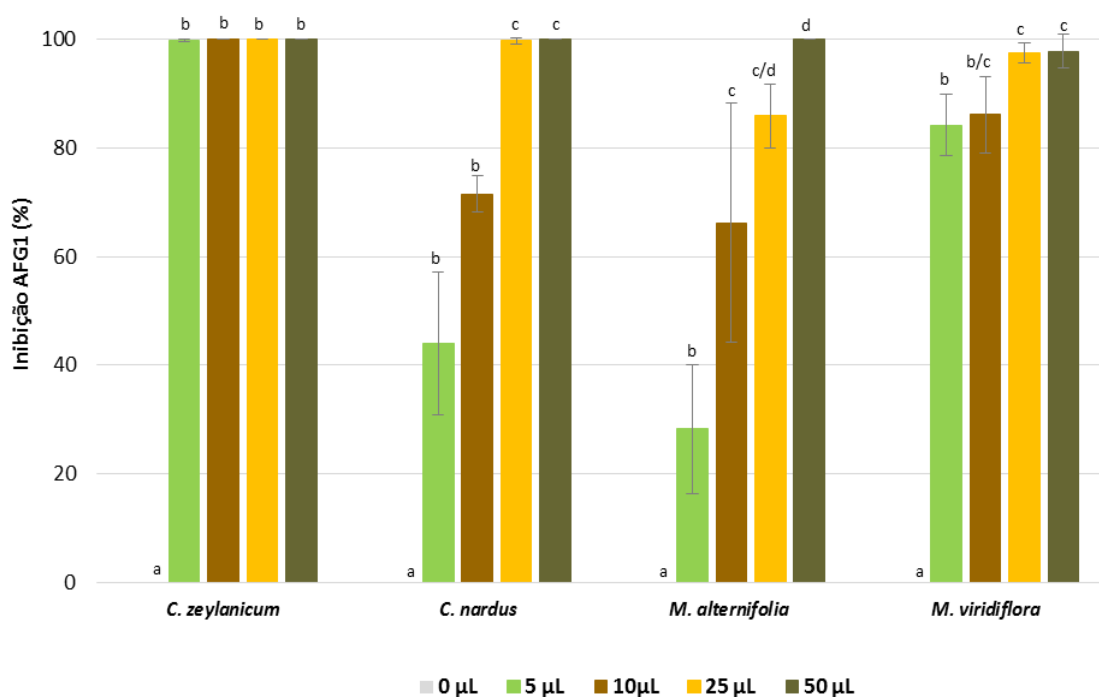


Figura 4.13: Inibição da produção de AFG1 por *A. parasiticus*, por diferentes quantidades dos OEs de *C. nardus*, *M. viridiflora*, *M. alternifolia* e *C. zeylanicum*. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C ($P=0,05$).

Tal como esperado, comprovou-se a produção das quatro AFs (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2) pelo fungo *A. parasiticus* MUM 92.02, assim como se comprovou a maior produção de AFB1 e AFG1. A produção de ambas estas AFs, com as várias quantidades dos óleos, foi de uma forma geral inferior à quantidade das AFs produzidas, quando o fungo não foi inoculado com OEs (0 µL). Estes resultados sugerem que alguns destes óleos exerceram efeito inibitório ao nível da produção de AFs, seja por inibição da sua síntese, seja por inibição do crescimento fúngico.

Verificou-se que com os OEs de *C. zeylanicum* e *C. nardus* ocorreu uma forte diminuição da produção das várias AFs com o aumento da quantidade dos óleos (Tabela 4.3 e 4.6). Foi também com estes óleos que se observou as maiores inibições de crescimento do fungo, repercutindo-se assim numa diminuição da produção de AFs. Dado o facto de se terem visualizado concentrações de AFs muito baixas e bastante próximas, com as várias quantidades destes óleos, levou a que de uma forma geral não ocorressem diferenças significativas entre as várias quantidades estudadas. Num estudo publicado me 2002, verificou-se que 2 mg L⁻¹ do OE de *C. zeylanicum* inibiu por completo a produção de AFs, após 2 semanas de crescimento fúngico [125]. Também num estudo efetuado por Gomori *et al.* [153] onde se verificou o efeito de vários OEs (5, 20 e 40 mg) na

produção de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 por *A. parasiticus*, o OE de *C. zeylanicum* exibiu um efeito redutor nas quantidades de AFB1 e AFG2.

A inibição da produção de AFs com o OE de *C. zeylanicum* poderá estar relacionada com o facto de apresentar na sua constituição um grande fração do componente eugenol. Está relatado que este componente inibe a produção de AFB1, pelo facto de suprimir a expressão dos genes envolvidos na produção da micotoxina [154].

A elevada inibição da produção de AFs verificada com o OE de *C. nardus* também poderá estar relacionada com o facto de ser constituído por compostos que exercem uma ação inibitória sob o crescimento fúngico, nomeadamente o citronelol e o citronelal, como já referido. Num estudo efetuado em 2007, verificou-se que o OE de *C. citratus* inibiu na totalidade a produção de AFB1 por *A. flavus*, com 1 µL de OE por 1 mL de meio de crescimento. Estes resultados sugerem o potencial dos OEs de *Cymbopogon* e a necessidade de uma maior exploração da sua ação ao nível da produção de micotoxinas [114].

Também com o OE de *M. alternifolia* foi possível verificar o mesmo, ou seja, uma diminuição da produção de AFs com o aumento da quantidade do óleo. A análise estatística revelou que as AFB1 obtidas com 5 e 10 µL não apresentaram diferenças significativas. Com as AFG1 produzidas pelo mesmo óleo, verificou-se que as obtidas com os volumes mais elevados também não foram consideradas significativamente diferentes (Tabela 4.8). Estes resultados sugerem que também este OE apresenta uma forte capacidade na inibição destas micotoxinas, como já foi verificado noutros estudos. Em 2012 avaliou-se o efeito do OE de *M. alternifolia* na inibição da produção de AFs por *A. parasiticus*. Foram obtidas inibições máximas de cerca de 67.4, 64.9, 72.6 e 63.3 % das AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, respetivamente, com 1% v/v do OE [155]. A eficácia de inibição de AFs poderá ser atribuída ao componente maioritário presente neste OE (terpineno-4-ol), que é retratado como o agente antifúngico mais ativo de entre os restantes componentes [156].

A mesma situação foi verificada com o OE de *M. viridiflora*, pois um aumento da quantidade deste óleo gerou uma diminuição da produção das AFs, sendo que os valores de AFB1 e AFG1 obtidos nas quantidades superiores do óleo não foram significativamente diferentes. A inibição da produção de AFs com o OE de *M. viridiflora* poderá estar associada aos componentes maioritários presentes no óleo, nomeadamente o 1,8-cineol, dado que num estudo realizado por Shukla *et al*, [151] verificou-se que a produção de AFs foi inibida com 0,918 mg mL⁻¹ de 1,8-cineol.

Verificou-se com os OEs de *C. bergamia*, *C. sinensis* e *L. officinalis* que um aumento da quantidade não induziu um efeito inibitório na produção de AFs. Com estes mesmos óleos foi visível que com

um aumento de 10 μL para 50 μL , ocorreu uma produção significativa de AFB₁. As AFB₁ produzidas com 50 μL foram consideradas idênticas às obtidas com as quantidades mais baixas do óleo, o que pode indicar que os mesmos óleos não apresentam capacidade de inibição da produção de AFs ou possuem uma maior inibição até determinada quantidade, sendo que acima dessa quantidade o óleo induza novamente a produção de AFs e não a sua inibição (Tabela 4.4, 4.5, 4.7).

Com o OE de *P. cablin*, verificou-se um baixo potencial na inibição da produção de AFs, pois não ocorreu uma variação significativa com os vários volumes estudados (Tabela 4.10). Estes resultados sugerem que as quantidades estudadas poderão não ter sido suficientes para a visualização dessa diminuição nas AFs. O OE poderia também não ter inibido a produção de AFs pelo facto de também não ter exercido alterações nos diâmetros das colónias.

Os resultados encontrados sugerem que de uma forma geral os OEs exerceram efeito inibitório ao nível da produção de AFs. No entanto, estes resultados não permitem clarificar se essa inibição ocorreu devido a uma inibição do crescimento fúngico ou se ocorreu devido a uma inibição direta da síntese das AFs. Na tentativa de elucidar o peso relativo de cada um destes efeitos, foi estudada a correlação existente entre o diâmetro das colónias de *A. parasiticus* e a produção das AFB₁, na presença dos vários OEs, nas diversas quantidades estudadas (Figura 4.14) (Tabela A2.4, Anexo II).

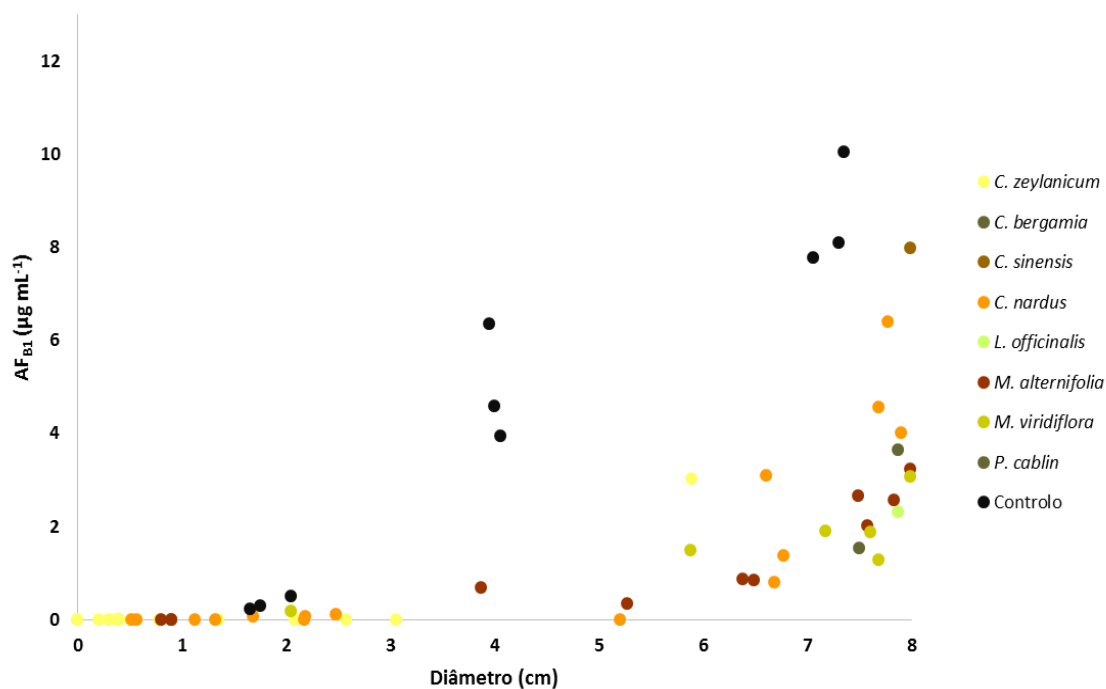


Figura 4.14: Correlação entre o diâmetro de crescimento de *A. parasiticus* e a produção da AFB₁, com os vários OEs estudados.

Os resultados apresentados na figura 4.14 permitem ter uma breve noção acerca da causa da inibição de AFs, pois parece visível que com os OEs de *C. zeylanicum*, *C. nardus*, *M. alternifolia* e *M. viridiflora* ocorreu uma inibição direta na síntese de AFB1, dado que colónias com diâmetros aproximados aos diâmetros do controlo produziram uma menor quantidade de AFB1. Com os restantes OEs verificou-se um crescimento fúngico e uma produção de AFs idênticos ao verificado no controlo, o que não permite clarificar o peso relativo destes dois efeitos fúngicos.

Estes resultados carecem de mais repetições de forma a garantir com uma maior certeza se a inibição da AFB1 foi devida à inibição do crescimento fúngico ou se foi devido a uma inibição direta na produção de AFs.

4.3 O ergosterol como medida da biomassa fúngica

4.3.1 Correlação entre o teor de ergosterol e outras variáveis de medição fúngica

O ergosterol é um constituinte da membrana plasmática dos fungos. É um esterol característico dos fungos uma vez que só estes organismos o conseguem sintetizar. Dessa forma, o ergosterol torna-se um bom indicador do crescimento fúngico, sendo uma alternativa para a avaliação das alterações do crescimento fúngico.

Neste estudo, avaliou-se o diâmetro das colónias, o peso seco fúngico e a concentração de ergosterol, de forma a verificar a ocorrência de uma correlação entre as mesmas variáveis de medição do crescimento fúngico. Tal correlação é necessária, pois nem sempre o desenvolvimento fúngico em géneros alimentares é feito na forma de uma colónia em crescimento, pelo que a quantificação do fungo por medição do diâmetro da colónia não é viável. Os resultados obtidos estão expostos na figura 4.15 e 4.16 (Tabela A2.5, Anexo II).

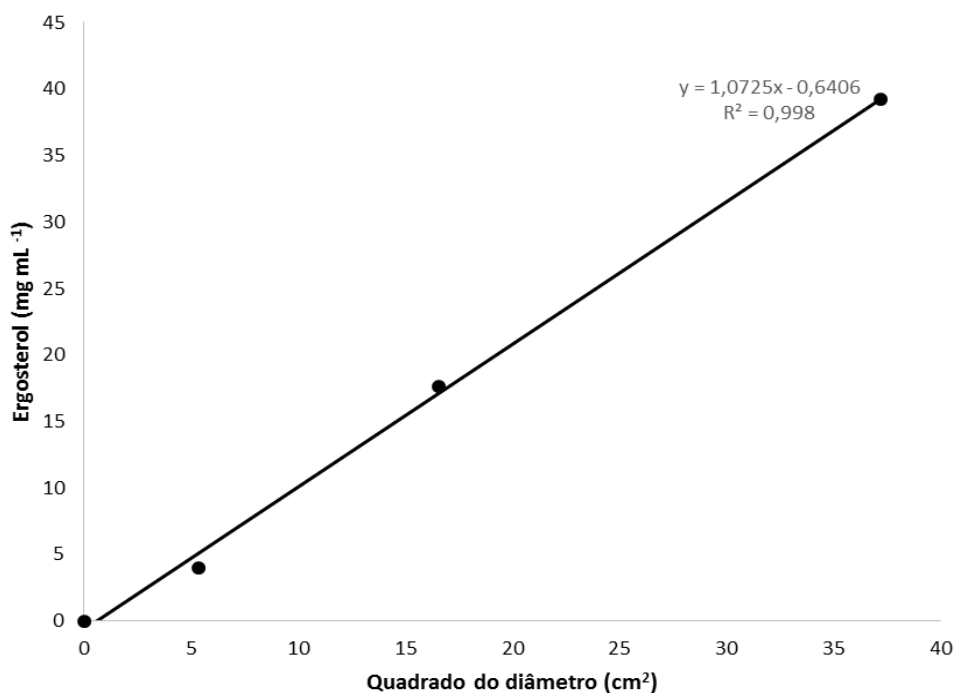


Figura 4.15: Correlação entre o teor de ergosterol fúngico e o quadrado do diâmetro das colónias fúngicas

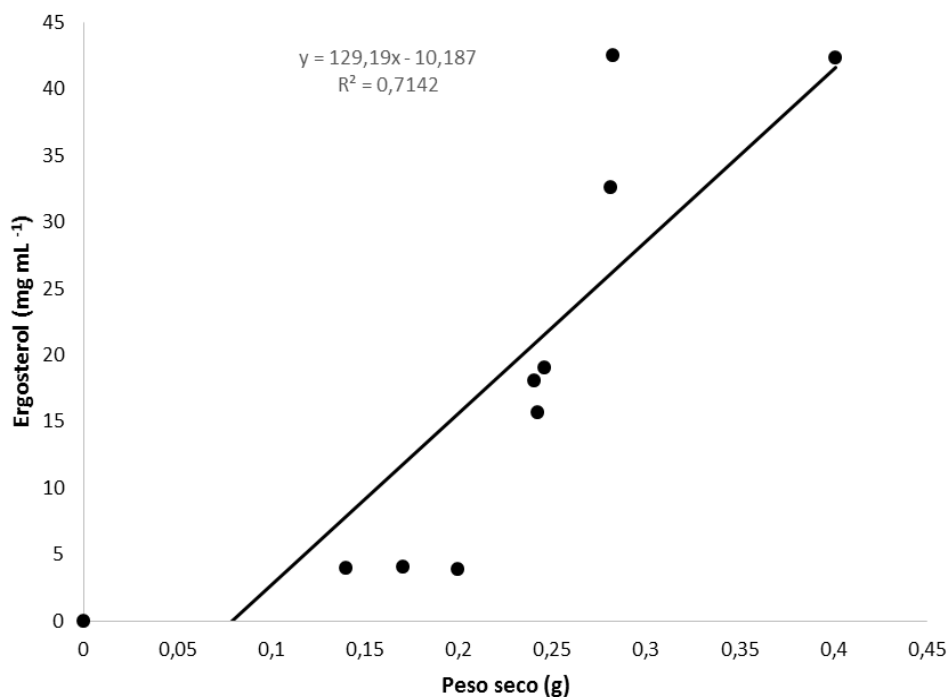


Figura 4.16: Correlação entre o teor de ergosterol fúngico e o peso seco das colônias fúngicas.

Segundo a figura 4.15, é possível verificar que ocorreu uma boa correlação entre o teor de ergosterol e o quadrado do diâmetro das colônias fúngicas com R^2 de cerca de 0,99. Assim, um aumento do diâmetro das colônias levou a um aumento do teor de ergosterol na membrana fúngica, dado que o fungo se encontrava em crescimento.

Já na figura 4.16 é possível verificar que ocorreu pouca correlação entre o teor de ergosterol e o peso seco fúngico. Esta baixa correlação pode estar relacionada a alguns erros de cariz experimental. O facto de a determinação do peso seco passar por um procedimento experimental bastante mais complexo do que a medição do diâmetro fúngico, poderá levar à introdução de erros experimentais.

Estes resultados relativos ao ergosterol e peso seco fúngico não vão de encontro ao verificado num estudo realizado por Abu-Taleb *et al.* [155]. Os autores verificaram que o teor de ergosterol apresentou uma relação linear com o peso seco fúngico, com coeficiente de correlação de cerca de 0,99.

Apesar do correlacionamento com o peso seco não ter sido bom, devido as razões já apresentadas, a análise do teor de ergosterol parece ser um teste útil para a medição do crescimento fúngico, dado que se correlaciona muito bem com as medições de diâmetro das colônias.

4.3.2 Teor de ergosterol em grãos de milho

O milho é extremamente suscetível à deterioração por fungos. O nível de contaminação é um aspeto importante a ser considerado quando se avalia a qualidade do milho para consumo humano e animal. Como o crescimento fúngico em alguns cereais pode não ser visível a olho nú ou detetável com alguns métodos, a quantificação do ergosterol é uma alternativa para estimar o crescimento dos fungos.

Assim, neste trabalho experimental procedeu-se a uma avaliação da contaminação fúngica de grãos de milho pela análise do teor de ergosterol. Dessa forma, avaliou-se o teor de ergosterol de grãos de milho previamente tratados com radiações UV e sem qualquer tratamento, após 6 e 8 dias de incubação. Os resultados do teor de ergosterol obtido estão expostos na tabela 4.11.

Tabela 4.11: Teor de ergosterol de amostras de milho tratadas com radiação UV e sem qualquer tratamento

	Sem tratamento UV	Com tratamento UV
6 dias de incubação	3,72 mg mL ⁻¹	1,28 mg mL ⁻¹
8 dias de incubação	6,18 mg mL ⁻¹	1,73 mg mL ⁻¹
Controlo	2,91 mg mL ⁻¹	

Segundo a tabela 4.11 é possível verificar que o tratamento dos grãos de milho com radiação UV levou à diminuição da contaminação fúngica já presente nos mesmos grãos, dado que o milho rececionado que foi logo submetido a avaliação (controlo) apresentou maior quantidade de ergosterol que o milho que foi sujeito a tratamento com UV.

Também é possível verificar segundo a mesma tabela, que nos vários dias avaliados, o milho que não foi submetido a qualquer tratamento apresentou maior teor de ergosterol, o que poderá indicar uma maior contaminação fúngica, do que o milho que não foi submetido a tratamento. Isto poderá ser devido ao facto de que com o tratamento por UV o milho sofreu um processo de desinfeção/esterilização antes de ser incubado, sendo os resultados de ergosterol visualizados correspondentes ao crescimento fúngico visível após a incubação. O milho que não foi tratado apresentou um maior teor de ergosterol, pois apresentava maior contaminação fúngica antes de ser incubado.

Verifica-se ainda que um aumento dos dias de incubação levou a uma aumento do teor de ergosterol fúngico, quer para o milho que foi submetido a tratamento, quer para o milho que não foi submetido a qualquer tratamento.

Para além de uma superior concentração de ergosterol verificada no milho que não foi submetido a tratamento por UV, visualizou-se também a presença de contaminação visível e a presença de insetos nas placas (Figura 4.17).

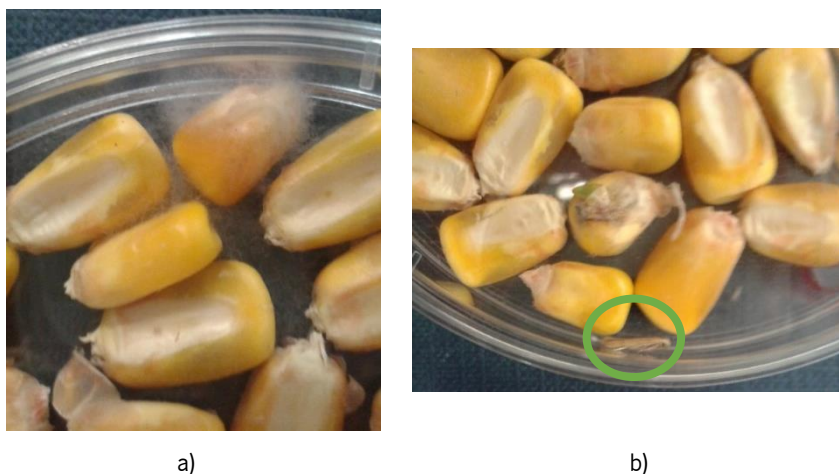


Figura 4.17: Contaminação visível no milho não submetido a tratamento UV: a) proliferação fúngica e b) presença de insetos.

Segundo os resultados obtidos, é possível verificar que a quantificação do teor de ergosterol pode ser utilizada como um bom indicador da contaminação fúngica em sementes e grãos, tal como indicam vários autores. Moraes *et al.* [122] verificaram também que a quantificação do teor de ergosterol de 40 amostras de milho mostrou-se bastante eficaz na avaliação do grau de contaminação fúngica dos grãos, com obtenção de uma média de ergosterol de cerca de 5,5 mg kg⁻¹.

Estes resultados preliminares demonstram o potencial do doseamento de ergosterol como medida da quantificação da contaminação fúngica no milho. Esta metodologia poderia assim ser empregue para a avaliação do efeito de OEs no crescimento fúngico verificado no milho.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com este trabalho experimental pretendia-se avaliar o efeito de vários OEs no crescimento e na produção de AFs por *A. parasiticus*. Após analisados e discutidos os resultados obtidos, verifica-se que o trabalho desenvolvido foi de encontro ao que era proposto inicialmente.

Relativamente à avaliação da proliferação fúngica, nem todos os OEs produziram o efeito inibitório desejado. Apenas os OEs de *C. zeylanicum*, *C. nardus*, *M. alternifolia* e *M. viridiflora* inibiram o crescimento fúngico de *A. parasiticus*, em condições *in vitro*. Essa inibição tendeu a aumentar com o aumento do volume, atingindo 95, 94, 80 e 91% de inibição com a quantidade superior testada (50 µL) dos mesmos óleos, respetivamente. Os OEs de *C. bergamia*, *C. sinensis*, *L. officinalis* e *P. cablin* não exibiram efeitos no crescimento fúngico, nas quantidades estudadas, sendo que as colónias que cresceram em contacto com estes óleos mostraram ser semelhantes às colónias que cresceram sem a presença de OEs.

A modelação do crescimento fúngico permitiu comprovar o efeito dos OEs sobre a velocidade de crescimento e sobre o tempo para crescimento do fungo.

Relativamente à inibição da produção das várias AFs estudadas, verificou-se que ocorreu de uma forma geral uma diminuição da sua produção com a aplicação dos OEs, comparativamente com as AFs produzidas quando o fungo não foi sujeito a qualquer OE. No entanto, essa inibição foi mais visível com os OEs de *C. zeylanicum*, *C. nardus*, *M. alternifolia* e *M. viridiflora*. Além disso, a inibição visualizada tendeu a aumentar com o aumento da quantidade dos mesmos óleos, verificando-se até que as quantidades mais elevadas permitiram uma inibição completa da produção de AFs. Os OEs de *C. bergamia*, *C. sinensis*, *L. officinalis* e *P. cablin* não inibiram a produção de AFs, nas condições testadas. Este trabalho permitiu ainda ter uma breve noção acerca da possível causa da inibição de AFs. Tudo indica que esta inibição ocorreu devido a uma inibição direta da síntese de AFs e não apenas devido ao facto de ter ocorrido uma inibição do crescimento fúngico com alguns dos OEs. No entanto, serão necessárias mais repetições para avaliar com uma maior certeza o peso relativo de cada um destes efeitos.

Através da análise química dos OEs foi possível verificar que os componentes linalol e limoneno foram encontrados na maioria dos óleos, à exceção do OE de *P. cablin*. Estes componentes poderão ter sido os responsáveis pela inibição fúngica e pela inibição da produção de AFs visualizada, dado que são relatados em vários estudos como componentes com uma forte ação antifúngica. Foram também identificados outros componentes inibidores nos OEs que se destacaram, nomeadamente o eugenol, o geraniol, o citronelal, o citronelol, o terpineno-4-ol, o p-cimeno e o 1,8-cineol. Estes componentes em associação com o limoneno e/ou o linalol,

poderão ter desenvolvido uma ação sinérgica, que proporcionou o maior efeito antifúngico visualizado nos OEs de *C. zeylanicum*, *C. bergamia*, *C. sinensis* e *C. nardus*.

Este trabalho elucidou ainda que o método de quantificação de ergosterol poderá ser uma boa alternativa para a medida da biomassa fúngica, dado que a correlação entre a produção de ergosterol e o diâmetro fúngico foi alta ($r=0,99$), indicando uma boa equivalência entre as técnicas. Ainda assim, este método permitiu traçar o perfil de contaminação fúngica de amostras de milho com e sem tratamento UV ao longo de vários dias de incubação, representando uma possibilidade para a avaliação do grau de contaminação fúngica do milho.

Os resultados demonstram a elevada potencialidade dos OEs como inibidores do crescimento e da produção de toxinas fúngicas, sendo essencial aprofundar esta temática em trabalhos futuros. Uma das investigações que poderiam ser realizadas futuramente era a avaliação do efeito isolado dos componentes presentes nos OEs sobre o crescimento fúngico e a produção de AFs, pois neste trabalho não ficou claro se os resultados de inibição do crescimento e da produção de AFs obtidos se deveram apenas a um dos componentes dos OEs, ou se deveram à combinação de vários componentes, através de um efeito sinérgico. Seria interessante investigar também a existência de compostos que podem exercer efeitos indutores em determinados volumes, principalmente nos OEs que não inibiram o crescimento e a produção de AFs, nas condições testadas. Caso isso se verifique, seria necessário estudar as condições para que os componentes inibidores prevaleçam sobre os componentes indutores. Outra das possíveis investigações futuras seria estudar o efeito destes OEs noutros potenciais fungos toxigênicos, de forma a verificar se o comportamento inibitório se manteria.

Os resultados preliminares obtidos com a avaliação do ergosterol permitiram verificar o potencial desta técnica como medida da proliferação fúngica. Dessa forma, seria interessante em trabalhos futuros aprofundar a investigação neste campo, nomeadamente na quantificação do ergosterol para a avaliação de uma possível inibição do crescimento fúngico em milho e noutras matrizes alimentares, com a aplicação de OEs.

Assim, a investigação nos efeitos antimicrobianos dos OEs é de extrema importância, pois pode vir a contribuir para o desenvolvimento de métodos de conservação alimentar ambientalmente sustentáveis e económicos.

CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Serra, R., Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a Ocratoxina A., in Departamento de Engenharia Biológica. 2005, Universidade do Minho. Dissertação de Doutorado.
2. Silva, L., Fungos: um estudo sobre a sua ocorrência nos alimentos., in Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas. 2008, Universidade Federal de Minas Gerais. Curso de Especialização em Microbiologia, p. 32.
3. Afsah-Hejri, L., et al., A review on micotoxins in food and feed: Malaysia case study, in Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety, 2013. 12(6): p.629-651.
4. Bhat, R., Raj, V.R., and Karim, A.A., Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2010. 9(1): p. 57-81.
5. Pitt, J.I., Toxigenic fungi and mycotoxins. British Medical Bulletin, 2000. 56(1): p. 184-92.
6. Agag, B.I., Mycotoxins in foods and feeds 1- Aflatoxins. Assiut University Bulletin for Environmental researches, 2004. 7(1): p. 173-206.
7. Rodrigues, P., Venâncio, A., and Lima, N., Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins. Food Research International, 2012. 48(1): p. 76-90.
8. Ouattara – Sourabie, P.B., et al., Aflatoxigenic potential of *Aspergillus* spp. isolated from groundnut seeds, in Burkina Faso, West Africa. African Journal Microbiology, 2012. 6(11): p. 2603-2609.
9. Pedrosa, K., and Borutova, R., Synergistic effects of mycotoxins discussed. Feedstuffs, 2011. 83(19): p. 3.
10. Lv, F., et al., In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. Food Research International, 2011. 44(9): p. 3057-3064.
11. Seow, Y.X., et al., Plant essential oils as active antimicrobial agents. Critical Review in Food and Scieny Nutrition, 2014. 54(5): p. 625-44.
12. Burt, S., Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology, 2004. 94(3): p. 223-253.
13. Cabral, C.L., Pinto, F.V., and Patriarca, A., Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. International Journal of Food Microbiology, 2013. 166(1): p. 1-14.
14. Lima, N., and Mota, M., BIOTECNOLOGIA: Fundamentos e Aplicações. 2003. Lidel- edições técnicas, lda. p. 505.
15. Hawksworth, D.L., The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited*. Mycological Research, 2001. 105(12): p. 1422-1432.
16. Madigan, T.M., Martinko, J.M., and Clar, D.P., Brock Biology of Microorganisms. 10th edition. 2003. Prentice Hall/Pearson Education. p. 1019.
17. Alexopoulos, G.C., Mims, C.W., and Blackwell, M.M., Introductory Mycology. 4th edition. 1996. Wiley. p. 868.
18. Carris, L.M., Little, R.C., and Stiles, M.C., Introduction to Fungi, in The Plant Health Instructor. 2012.
19. Webster, J., and Weber, R.W.S., Introduction to Fungi. 3th edition. 2007. C.U. Press. p. 867.
20. Marín, S., Ramos, J.A., and Sanchis, V., Comparison of methods for the assessment of growth of food spoilage moulds in solid substrates. International Journal of Food Microbiology, 2005. 99(3): p. 329-341.
21. Magan, N., Fungi in Extreme Environments, in Environmental and Microbial Relationships, C.P. Kubicek and I.S. Druzhinina, Editors. 2007. p. 85-113.

22. Giorni, P., *et al.*, Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 2007. 113(3): p. 330-338.
23. Ellis, D.S., Boehm, M.J., and Mitchell, T.K., *Fungal and Fungal-like Diseases of Plants. Fact Sheet Agricultural and Natural Resources*, 2008. p.1- 4.
24. Hedayati, M.T., *et al.*, *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 2007. 153: p. 1677-92.
25. Silva, C.F., Taxonomia polifásica de *Aspergillus* seção *Flavi* e aplicação de óleos essenciais para controle de fungos aflatoxigênicos, in Universidade Federal de Lavras, 2012. Dissertação de Doutorado, p. 115.
26. Bennett, W.J., An Overview of the genus *Aspergillus*, in *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*, Machida, M., and Yomi, K, Editors. 2010. p. 238.
27. Bennett, J.W., and Klich, M., Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003. 16(3): p. 497-516.
28. Klich, M.A., *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 2007. 8(6): p. 713-22.
29. Krijgheld, P., *et al.*, Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 2013. 74(1): p. 1-29.
30. Abbas, H.K., *et al.*, Dynamics of mycotoxin and *Aspergillus flavus* levels in aging Bt and non-Bt corn residues under Mississippi no-till conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008. 56(16): p. 7578-85.
31. Amaike, S. and Keller, P.N., *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 2011. 49: p. 107-33.
32. Peterson, S.W., *et al.*, Phylogeny and subgeneric taxonomy of *Aspergillus*, in *Aspergillus in the Genomics Era*. 2008, Wageningen Academic Publishers: Wageningen. p. 33-56.
33. Soares, C., *et al.*, Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. *Mycologia*, 2012. 104(3): p. 682-97.
34. Baquião, A.C., *et al.*, Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *Food Chemistry*, 2013. 139(1-4): p. 1127-1132.
35. Abbas, H.K., *et al.*, Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*, 2009. 28(2-3): p. 142-153.
36. Rodrigues, P., *et al.*, A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology*, 2009. 129(2): p. 187-193.
37. Cotty, J.P., Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Postharvest Pathology and Mycotoxins*, 1989. p. 808-814.
38. Vujanovic, V., Smoragiewicz, W., and Krzysztyniak, K., Airborne fungal ecological niche determination as one of the possibilities for indirect mycotoxin risk assessment in indoor air. *Environmental Toxicology*, 2001. 16(1): p. 1-8.
39. Garcia, D., *et al.*, Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Microbiology*, 2011. 28(3): p. 406-417.
40. Silva, L.M., Identificação morfológica e molecular de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* isolados de alimentos destinados a caprinos em lactação, in Instituto Biológico. 2012, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. Dissertação de Mestrado, p. 84.
41. Cast, *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems*. 2003, Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA. p. 192.
42. Abramson, D., Mycotoxin formation and environmental factors, in *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, Shinha, K.K., and Bhatnagar, D, Editors. 1998. p. 520.

43. Lillehoj, B.E., Aflatoxin: Genetic mobilization agent, in Handbook of Applied Micology: Mycotoxins in Ecological Systems, Bhatnagar, D., Lillehoj, B.E., and Arora, K.D, Editors. 1992. p. 22
44. Paterson, R.R.M., and Lima, N., How will climate change affect mycotoxins in food? Food Research International, 2010. 43(7): p. 1902-1914.
45. Reddy, N.R.K., *et al.*, Mycotoxin contamination of commercially important agricultural commodities. Toxins Reviews, 2009. 28 (2-3): p. 154-168.
46. Glenn, A.E., Mycotoxigenic Fusarium species in animal feed. Animal Feed Science and Technology, 2007. 137(3-4): p. 213-240.
47. Iamanaka, T.B., Oliveira, I.S., and Taniwari, M.H., Micotoxinas em alimentos. Anais da Academina Pernambucana de Ciência Agronômica, 2010. 7: p. 138-161.
48. Zöllner, P., and Mayer-Helm, B., Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 2006. 1136(2): p. 123-169.
49. Giorni, P., *et al.*, Effect of aw and CO₂ level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. International Journal of Food Microbiology, 2008. 122(1-2): p. 109-113.
50. Soares, C., Abruñhosa, L., and Venâncio, A., Fungos produtores de micotoxinas. Portuguese Society for Microbiology Magazine, 2013: p. 9.
51. Herrman, T., Mycotoxins in Feed Grains and Ingredients. 2002, Kansas State University. p. 8.
52. Jouany, J.P., Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. Animal Feed Science and Technology, 2007. 137(3-4): p. 342-362.
53. Binder, E.M., *et al.*, Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. Animal Feed Science and Technology, 2007. 137(3-4): p. 265-282.
54. Cotty, P.J., and Jaime-Garcia, R., Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. International Journal of Food Microbiology, 2007. 119(1-2): p. 109-115.
55. Payne, G.A., and Hagler, M.W., Effect of specific amino acids on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in defined media. Applied and Environmental Microbiology, 1983. 46(4): p. 805-812.
56. Williams, J.H., *et al.*, Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. The American Journal of Clinical Nutrition, 2004. 80(5): p. 1106-22.
57. Alpsoy, L., Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activity. African Journal of Biotechnology, 2010. 9(17): p. 2474-2481.
58. Agency, F.F.S., Risk assessment for mycotoxins in human and animal food chain. 2006. p. 76.
59. Wang, J., and Tang, L., Epidemiology of Aflatoxin Exposure and Human Liver Cancer. Toxins Reviews, 2004. 23(2-3): p. 249-271.
60. Drumond, M.M.L.V., Presença de Aflatoxinas em arroz e cereais importados na União Europeia- Revisão Bibliográfica e análise de dados RASFF, in Faculdade de Ciências e Tecnologia. 2012, Universidade Nova de Lisboa. Dissertação de Mestrado, p. 123.
61. Stroka, J., and Anklam, E., New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin-producing moulds in food and feed. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2002. 21(2): p. 90-95.
62. REGULAMENTO (UE) N.º 165/2010: teores máximos de certos contaminantes nos géneros alimentícios, no que diz respeito às aflatoxinas. 2010.

63. Tran-Dinh, N., Pitt, I.J., and Carter, A.D., Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycological Research*, 1999. 103(11): p. 1485-1490.
64. Zorzete, P., *et al.*, Mycobiota, aflatoxins and cyclopiazonic acid in stored peanut cultivars. *Food Research International*, 2013. 52(1): p. 380-386.
65. Vaamonde, G., *et al.*, Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 2003. 88(1): p. 79-84.
66. Schmidt-Heydt, M., *et al.*, The production of aflatoxin B1 or G1 by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. *Mycotoxin Research*, 2010. 26(4): p. 241-6.
67. Hettiarachchi, M.C.H.G., Gooneratne, J., and Hirimburegama, W.K., Effect of initial moisture content and relative humidity on the accumulation of aflatoxin in maize grains (*Zea mays*) during storage. *Journal of the Natural Science Foundation of Sri Lanka*, 2001. 29(1-2) p. 29-34.
68. Pereira, G.M.M., Carvalho, E.P., and Prado, G., Crescimento e produção de Aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. *B. Ceppa*, 2002. 20(1) p. 141-156.
69. Wheeler, M.H., Bhatnagar, D., and Klich, A.M., Effects of chlobenthiazone on aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. flavus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1991. 41(2): p. 190-197.
70. Tubajikat, K.M., and Damann, K.E., Glufosinate-ammonium reduces growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection*, 2002. 65(9): p. 1483-7.
71. Lucera, A., *et al.*, Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, 2012. 3: p. 287.
72. Schafer, H., and Wink, M., Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnology Journal*, 2009. 4(12): p. 1684-703.
73. Hammer, K.A., Carson, F.C and Riley, V.T., Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 1999. 86(6): p. 985-90.
74. Hyldgaard, M., Mygind, T., and Meyer, L.R., Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*, 2012. 3: p. 12.
75. Dorman, H.J., and Deans, G.S., Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 2000. 88(2): p. 308-16.
76. Bakkali, F., *et al.*, Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 2008. 46(2): p. 446-475.
77. Akthar, S.M., Degaga, B., and Azam, T., Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2014. 2(1): p. 001-007.
78. Degenhardt, J., Kollner, G.T., and Gershenzon, J., Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 2009. 70(15-16): p. 1621-37.
79. Cal, K., Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. *Planta Medica*, 2006. 72(4): p. 311-6.
80. Tabassum, N., and Vidyasagar, M.G., Antifungal investigations on plant essential oils. A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2013. 5(2): p. 19-28.
81. Unlu, M., *et al.*, Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food and Chemical Toxicology*, 2010. 48(11): p. 3274-3280.

82. Jayaprakasha, G.K., Rao, J.L., and Sakariah, K.K., Chemical composition of volatile oil from *Cinnamomum zeylanicum* buds. *Verlag der Zeitschrift fur Naturfoschung*, 2002. 57(11-12): p. 990-3.
83. Lima, P.M., *et al.*, Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Acta Amazônica*, 2005. 35(3) p. 363-366.
84. Sawamura, M., *et al.*, Characteristic odour components of bergamot (*Citrus bergamia* Risso) essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 2006. 21(4): p. 609-615.
85. Fisher, K., and Phillips, C., Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science & Technology*, 2008. 19(3): p. 156-164.
86. Nabiha, B., *et al.*, Chemical composition of Bergamot (*Citrus Bergamia* Risso) essential oil obtained by hidrodistillation. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 2010. 4(4): p. 60-62.
87. Assunção, V.G., Caracterização química e avaliação da atividade larvívica frente ao *Aedes aegypti* do óleo essencial da espécie *Citrus sinensis* L. *osbeck*(Laranja Doce), in Centro de Ciências Exatas e Tecnologias. 2013, Universidade Federal do Maranhão. Dissertação de Mestrado, p. 93.
88. Moufida, S.D., and Marzouk, B., Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*, 2003. 62(8): p. 1283-1289.
89. Arias, B.Á., and Ramón-Laca, L., Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005. 97(1): p. 89-95.
90. Mira, B., *et al.*, Supercritical CO₂ extraction of essential oils from orange peel. *The Journal of Supercritical Fluids*, 1996. 9(4): p. 238-243.
91. Rossi, Y.E., and Palacios, M.S., Fumigant toxicity of Citrus sinensis essential oil on *Musca domestica* L. adults in the absence and presence of a P450 inhibitor. *Acta Tropica*, 2013. 127(1): p. 33-7.
92. Mahalwal, S.V., and Ali, M., Volatile constituents of *Cymbopogon nardus* (Linn.) Rendle. *Flavour and Fragrance Journal*, 2003. 18(1): p. 73-76.
93. Nakahara, K., *et al.*, Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (Citronela Grass). *Japan International Research Center for Agricultural Sciences*, 2003. 5(2): p. 147-152.
94. Ihsan, A.S., Essential oil composition of *Lavandula officinalis* L. growth in Jordan. *Journal of Kerbala University*, 2007. 5(1): p. 18-21.
95. Cavanagh, A.M.H., and Wilkinson, J.M., Biological activities of Lavander essential oil. *Phytoterapy Research*, 2002.16(4): p. 301-308.
96. Nadalin, V., *et al.*, Investigation of cultivated lavender (*Lavandula officinalis* L.) extraction and its extracts. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 2014. 20(1): p. 71-86.
97. Network, G.R.I., *Melaleuca alternifolia*. Available from: <http://www.ars-grin.gov.4/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?402629> (22 Junho 2015).
98. Carson, C.F., Hammer, A.K., and Riley, VT., *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006. 19(1): p. 50-62.
99. Hammer, A.K., Carson, C.F., and Riley, T.V., In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) against dermatophytes and other filamentous fungi. *Journal of Antimicrobial Chemoterapy*, 2002. 50(2): p. 195-199.
100. Noumi, E., *et al.*, Chemical composition antioxidant and antifungal potential of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) and *Eucalyptus globulus* essential oils against oral *Candida* species. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011. 5(17): p. 4147-415.

101. Trilles, B.L., *et al.*, Occurrence of various chemotypes in niaouli [*Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake] essential oil from New Caledonia. *Flavour and Fragrance Journal*, 2006. 21(4): p. 677-682.
102. Ramanoelina, R.A.P., *et al.*, Occurrence of various chemotypes in Niaouli (*Melaleuca quinquenervia*) essential oils from Madagascar using multivariate statistical analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994. 42(5): p. 1177-1182.
103. Donelian, A., *et al.*, Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO₂ and by steam distillation. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2009. 48(1): p. 15-20.
104. Hu, L.F., *et al.*, GC-MS fingerprint of *Pogostemon cablin* in China. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006. 42(2): p. 200-6.
105. Srikrishna, A. and Satyanarayana, G., An enantiospecific total synthesis of (-)-patchouli alcohol. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005. 16(24): p. 3992-3997.
106. Deguerry, F., *et al.*, The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2006. 454(2): p. 123-136.
107. H.G., R., Palanimuthu, V., and Singla, R., An introduction to patchouli (*Pogostemon cablin* Benth)- A medicinal and aromatic plant: Its importance. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, 15(2), 2013. p. 243-250.
108. Albuquerque, E.L.D., *et al.*, Insecticidal and repellence activity of the essential oil of *Pogostemon cablin* against urban ants species. *Acta Tropica*, 2013. 127(3): p. 181-186.
109. Celikel, N., and G. Kavas, Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech Journal of Food Science*, 2008. 26(3): p. 174-181.
110. El- Baroty, S.G., *et al.*, Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. *African Journal of Biochemistry Research*, 2010. 4(6): p. 167-174.
111. Lambert, R.J., *et al.*, A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 2001. 91(3): p. 453-62.
112. Conner, D.E., and Beuchat, R.L., Effects of Essential Oils from Plants on Growth of Food Spoilage Yeasts. *Journal of Food Science*, 1984. 49(2): p. 429-434.
113. Ultee, A., *et al.*, Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*, 2000. 174(4): p. 233-8.
114. Helal, G.A., *et al.*, Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* ML2-strain. *Journal of Basic Microbiology*, 2007. 47(1): p. 5-15.
115. Rasooli, I., and Owlia, P., Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*, 2005. 66(24): p. 2851-6.
116. Bluma, R., *et al.*, Control of *Aspergillus* section *Flavi* growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 2008. 105(1): p. 203-14.
117. Bluma, R., Amaiden, R.M., and Etcheverry, M., Screening of Argentine plant extracts: impact on growth parameters and aflatoxin B₁ accumulation by *Aspergillus* section *Flavi*. *International Journal of Food Microbiology*, 2008. 122(1-2): p. 114-25.
118. Bluma, R.V., and Etcheverry, G.M., Application of essential oils in maize grain: impact on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology*, 2008. 25(2): p. 324-34.
119. Ferreira, F.D., *et al.*, Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry*, 2013. 136(2): p. 789-793.

120. Tian, J., *et al.*, The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. PLoS One, 2012. 7(1): p. e30147.
121. Galvão, G.J., *et al.*, Uso do fungo *Fusarium oxysporum* como indicador de ametrina, através da medida da biomassa pela quantificação do ergosterol. Ciência e Agrotecnologia Lavras, 2003. 27(4) p. 840-845.
122. Moraes, Q.J.R., *et al.*, Dosagem de ergosterol como indicador de contaminação fúngica em milho armazenado. Arquivos do Instituto Biológico, 2003. 70(4): p. 483-489.
123. Moreira, P.C.A., *et al.*, Inhibitory effect of the essential oil from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit on the growth and aflatoxins synthesis of *Aspergillus flavus*. Journal of Life Sciences, 2013. 7(3): p. 276-281.
124. Deabes, M., El-Soud, N., and El-Kassem, L., In vitro inhibition of growth and Aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* strain (ATCC 16872) by various medicinal plant essential oils. Macedonian Journal of Medical Sciences, 2011. 4(4): p. 345-350.
125. Soliman, K.M., and Badeaa, I.R., Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food and Chemical Toxicology, 2002. 40(11): p. 1669-1675.
126. Razzaghi-Abyaneh, M., *et al.*, Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. International Journal of Food Microbiology, 2008. 123(3): p. 228-33.
127. Jayashree, T., and Subramanyam, C., Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. Letters in Applied Microbiology, 1999. 28(3): p. 179-83.
128. Lopez-Malo, A., Maris Alzamora, S., and Palou, E., *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. International Journal of Food Microbiology, 2005. 99(2): p. 119-28.
129. Kale, P.S., *et al.*, Characterization of experimentally induced, nonaflatoxigenic variant strains of *Aspergillus parasiticus*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. 62(9): p. 3399-3404.
130. Sánchez-González, L., *et al.*, Use of essential oils in bioactive edible coatings. Food Engineering Reviews, 2010. 3: p. 1-16.
131. Donsì, F., *et al.*, Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. LWT - Food Science and Technology, 2011. 44(9): p. 1908-1914.
132. Guynot, M.E., *et al.*, Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. Journal of Applied Microbiology, 2003. 94(5): p. 893-899.
133. Baranyi, J., and Roberts, A.T., A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiology, 1994. 23(3-4): p. 277-294.
134. Valík, L.r., Baranyi, J., and Görner, F., Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. International Journal of Food Microbiology, 1999. 47(1-2): p. 141-146.
135. Gourama, H., and Bullerman, B.L., Relationship between aflatoxin production and mold growth as measured by ergosterol and plate count. LWT - Food Science and Technology, 1995. 28(2): p. 185-189.
136. Carmo, S.E., *et al.*, Effect of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil on the growth and morphogenesis of some potentially pathogenic *Aspergillus* species. Brazilian Journal of Microbiology, 2008. 39: p. 91-97.
137. Kamatou, G.P., Vermaak, I., and Viljoen, M.A., Eugenol—from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. Molecules, 2012. 17(6): p. 6953-6981.
138. Pereira, O.F., Mendes, M.J., and Lima, O.E., Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. Medical Mycology, 2013. 51(5): p. 507-513.

139. Sharma, N., and Tripathi, A., Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 2008. 163(3): p. 337-344.
140. Viuda-Martos, M., *et al.*, Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 2008. 19(12): p. 1130-1138.
141. Caccioni, D.R.L., *et al.*, Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, 1998. 43(1-2): p. 73-79.
142. Rodov, V., *et al.*, Preformed antifungal compounds of lemon fruit: citral and its relation to disease resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995. 43(4): p. 1057-1061.
143. Veldhuizen, E.J.A., *et al.*, Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006. 54(5): p. 1874-1879.
144. Billerbeck, V.G., *et al.*, Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 2001. 47(1): p. 9-17.
145. Aoudouy, Y., *et al.*, Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen. *Journal of Yeast and Fungal Research*. 2010. 1(1) p. 001-008.
146. Rashidi, A., *et al.*, Evaluation of antifungal effect of *Lavandula officinalis*, *Salvia officinalis*, *Sumac*, *Glycyrrhiza glabra*, and *Althaea officinalis* extracts on *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, and *Aspergillus flavus* species. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011. 6(2): p. 309-313.
147. Lima, A., Ribeiro, A.S., and Bonaldo, S.M., Efeito dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Melaleuca alternifolia* sobre isolados de *Aspergillus* sp. *Scientific Electronics Archives*, 2014. 5: p. 63-67.
148. Carson, C.F., and Riley, V.T., Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995. 78(3): p. 264-269.
149. Morcia, C., Malnati, M., and Terzi, V., In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2011. 29(3): p. 415-422.
150. Vilela, G.R., *et al.*, 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*, 2009. 45(2): p. 108-111.
151. Shukla, R., *et al.*, Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. *Food Control*, 2012. 25(1): p. 27-33.
152. Kocevski, D., *et al.*, Antifungal effect of *Allium tuberosum*, *Cinnamomum cassia*, and *Pogostemon cablin* essential oils and their components against population of *Aspergillus* species. *Journal of Food Science*, 2013. 78(5): p. M731-M737.
153. Gomori, G., *et al.*, Evaluation of five essential oils for the control of food-spoilage and mycotoxins production fungi. *Acta Biologica Szegediensis*, 2013. 94(3): p. 329-334.
154. Komala, V.V., *et al.*, Inhibition of aflatoxin B1 production by an antifungal component, eugenol in stored sorghum grains. *Food Control*, 2012. 26(1): p. 139-146.
155. Abu-Taled, M.A., *Melaleuca alternifolia* essential oil as inhibitory of potentially aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *The Egyptian Society of Experimental Biology*, 2012. 8(2): p. 229-236.
156. Oliva, B., *et al.*, Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. *Letters in Applied Microbiology*, 2003. 37(2): p. 185-187.

ANEXOS

Anexo I - Curvas de Calibração

1. Curva de calibração e limites de detecção e quantificação das AFs

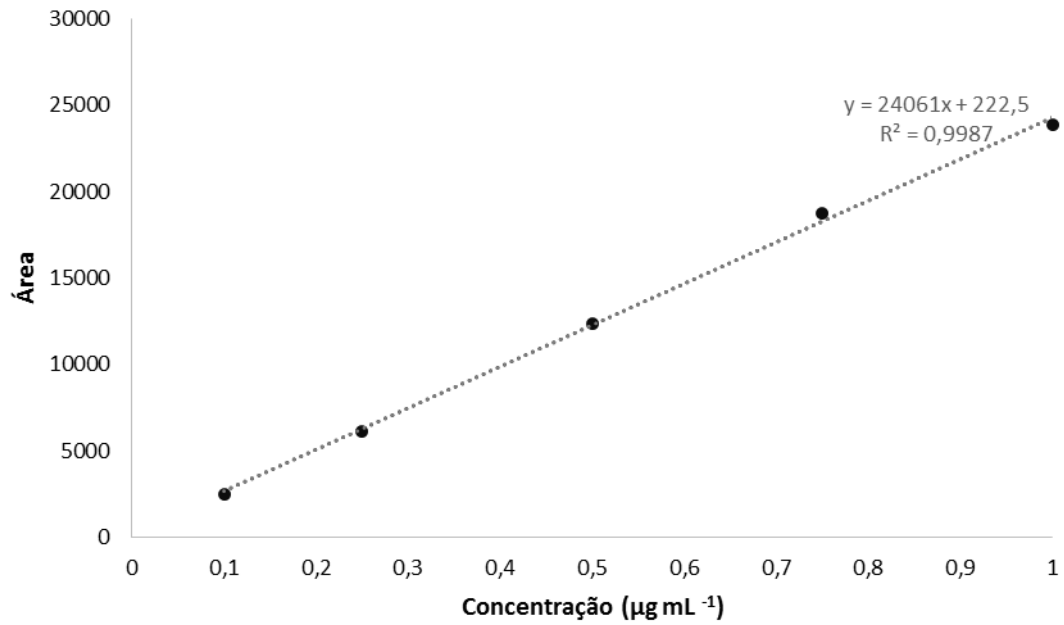


Figura A1.1: Curva de calibração da AFB1 a ganho 10.

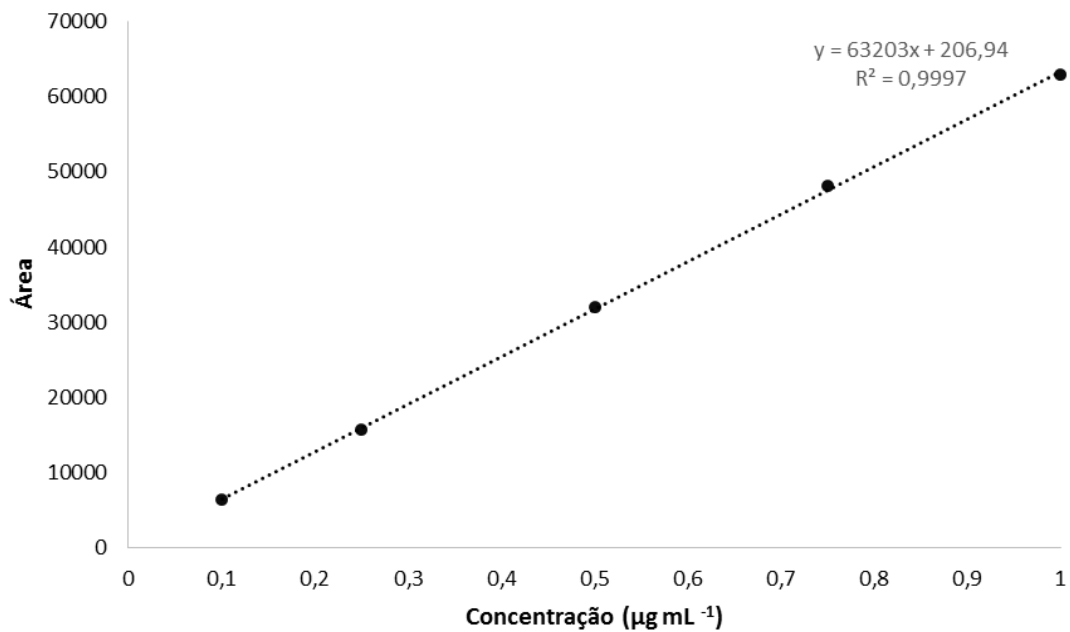


Figura A1.2: Curva de calibração da AFB2 a ganho 10.

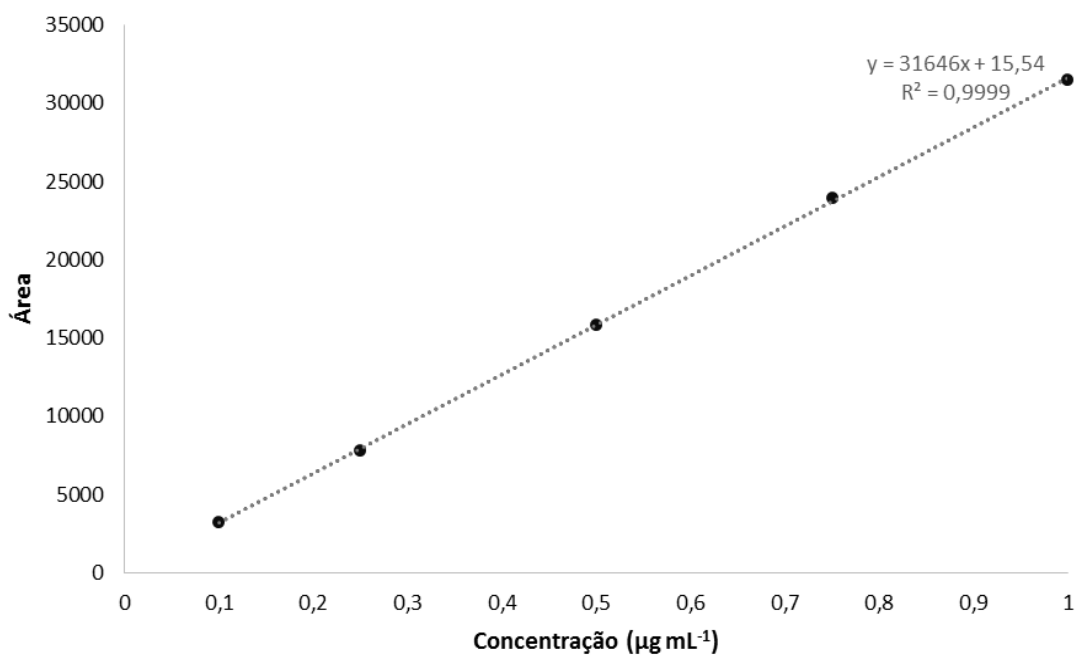


Figura A1.3: Curva de calibração da AFG1 a ganho 10.

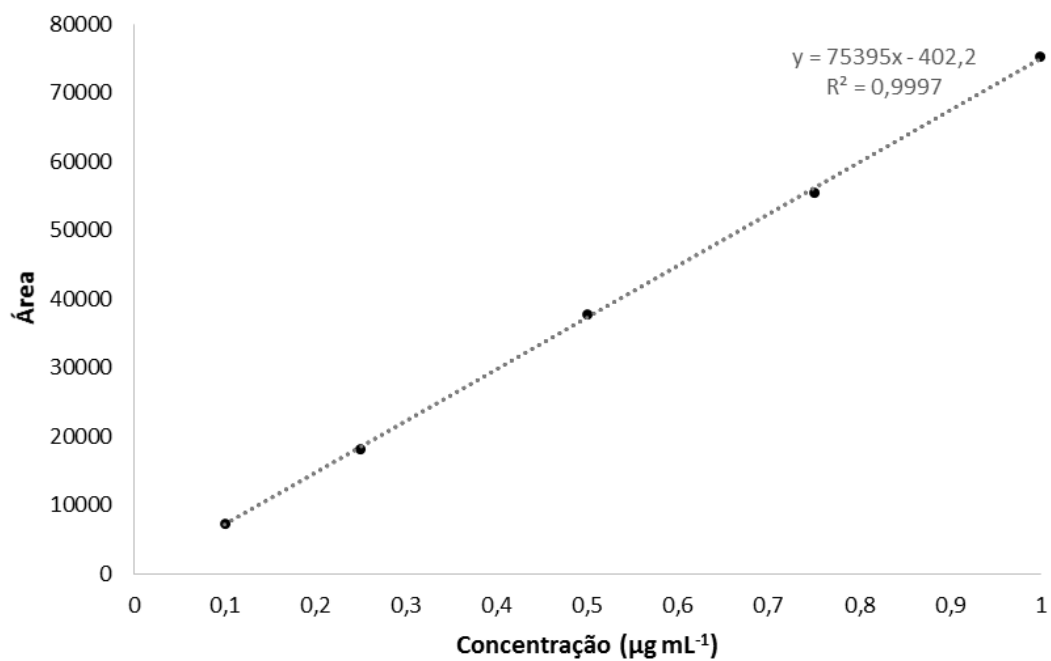


Figura A1.4: Curva de calibração da AFG2 a ganho 10.

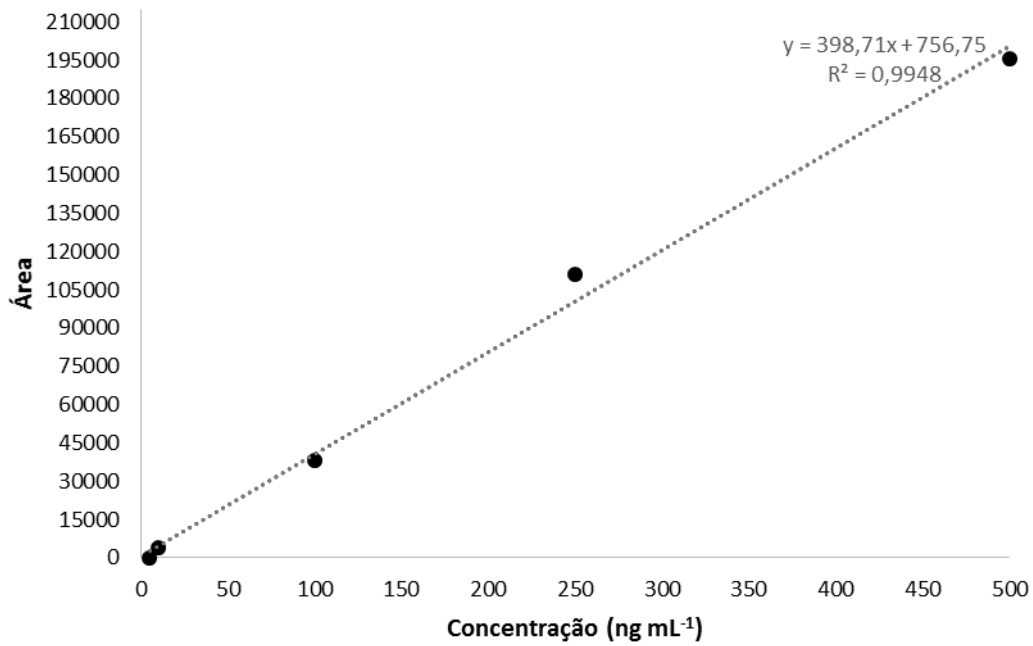


Figura A1.5: Curva de calibração da AFB1 a ganho 100.

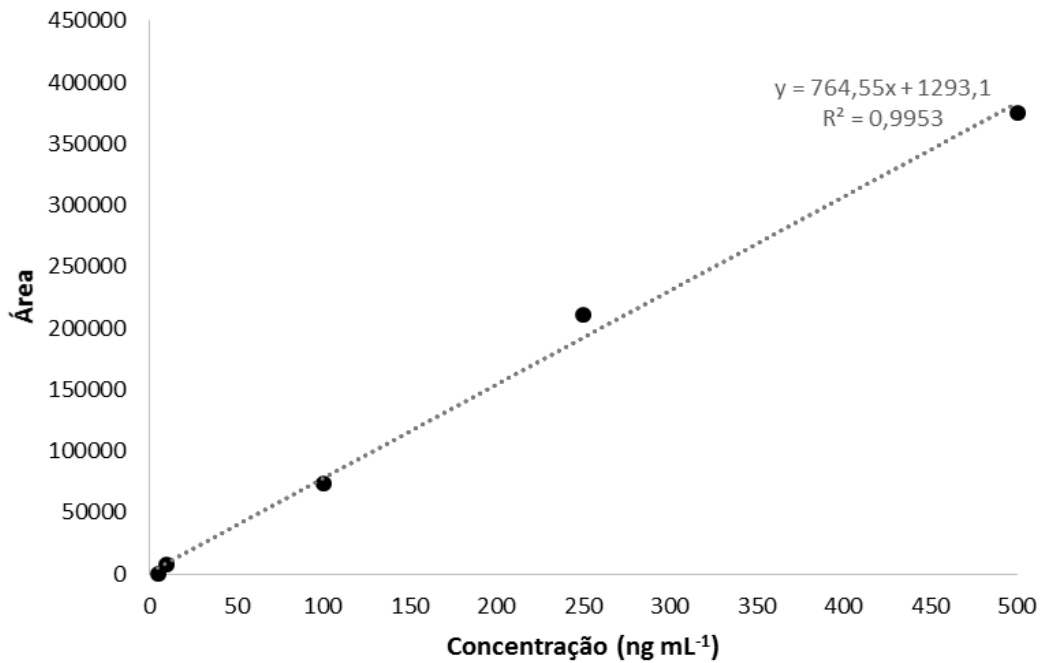


Figura A1.6: Curva de calibração da AFB2 a ganho 100.

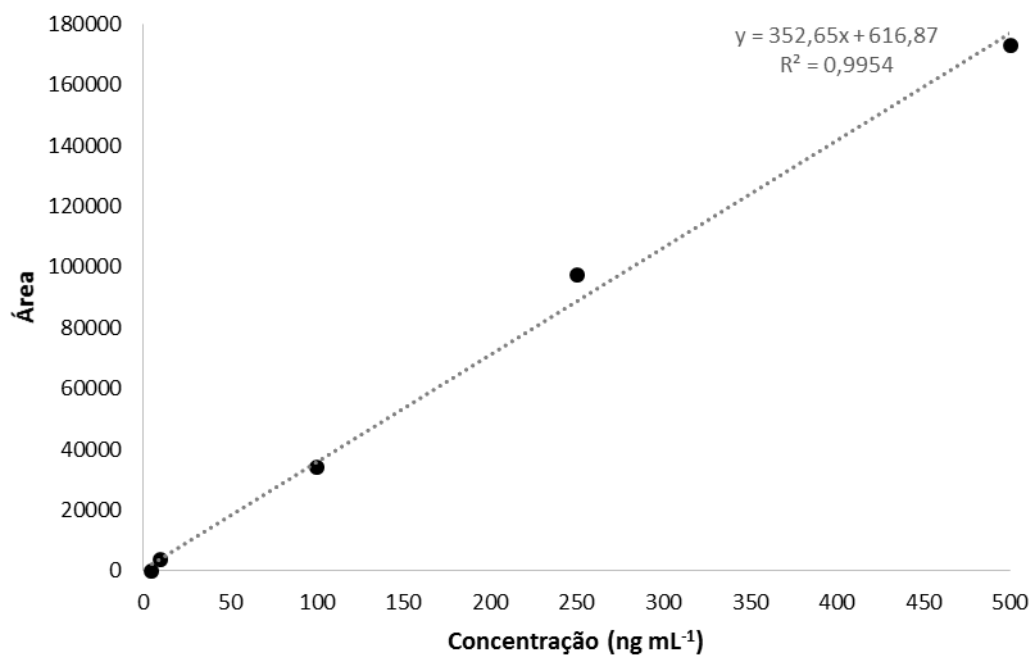


Figura A1.7: Curva de calibração da AFG1 a ganho 100.

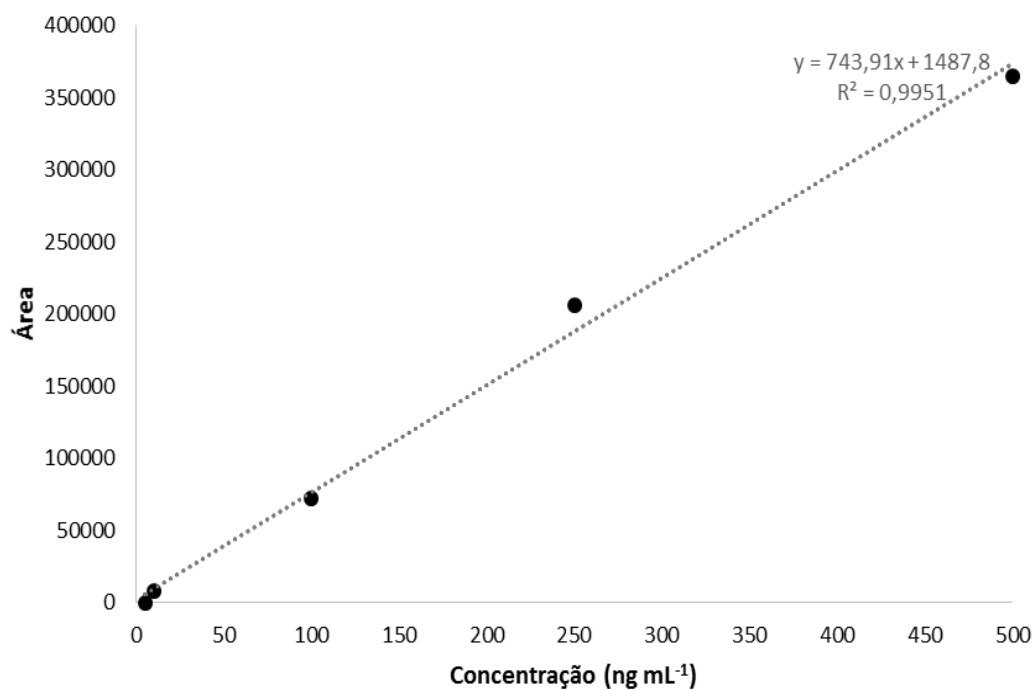


Figura A1.8: Curva de calibração da AFG2 a ganho 100.

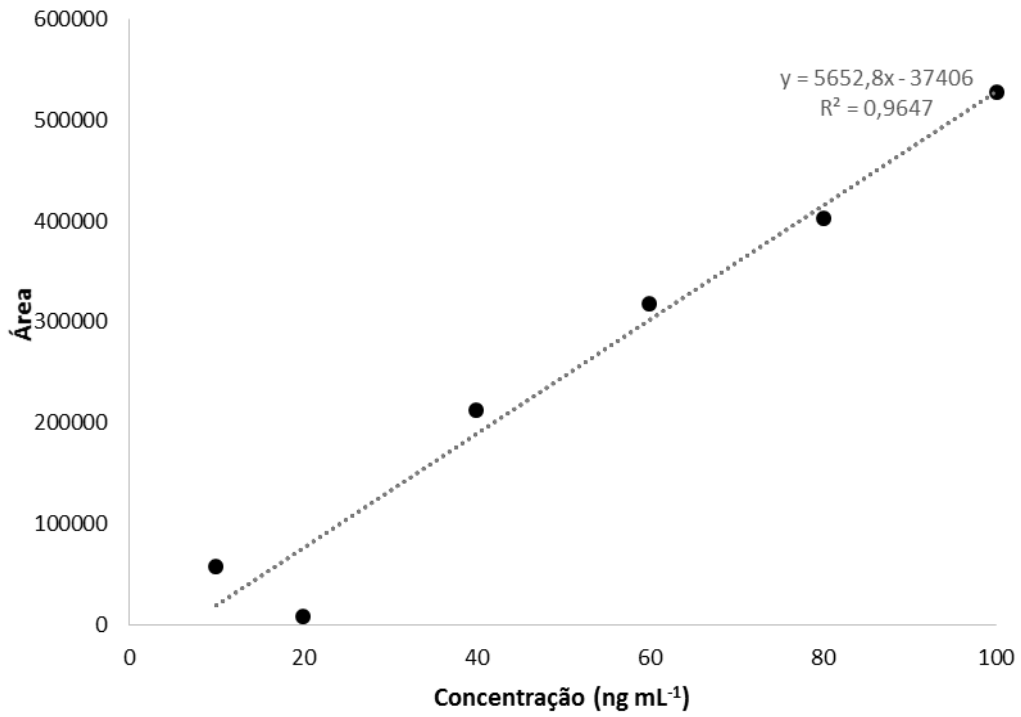


Figura A1.9: Curva de calibração da AFB1 a ganho 1000.

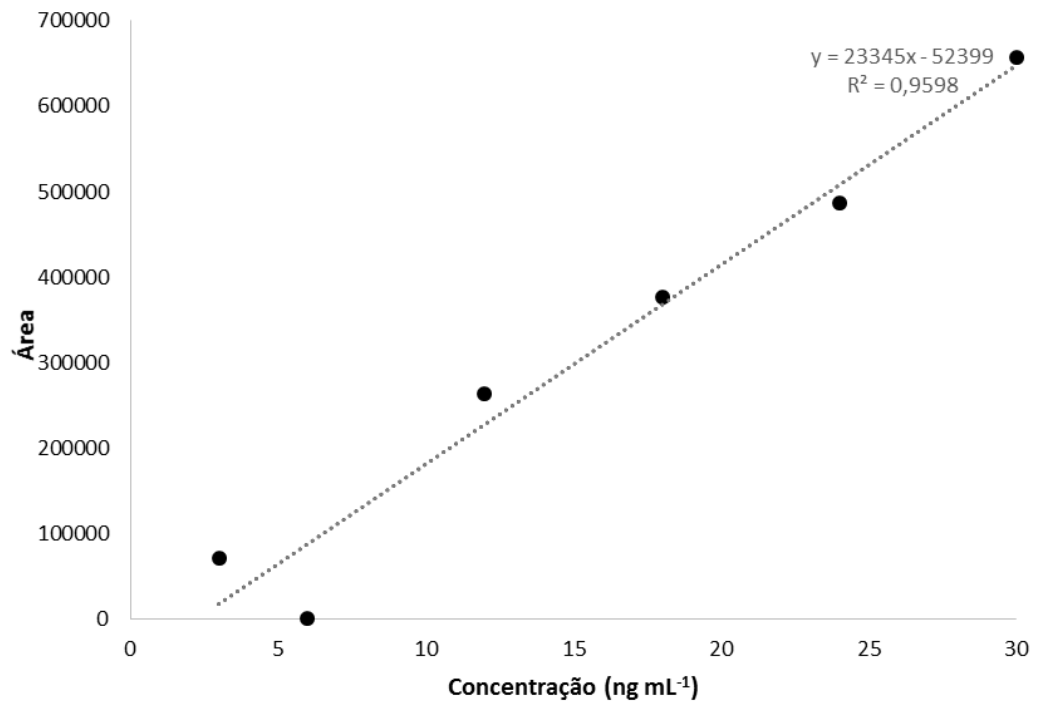


Figura A1.10: Curva de calibração da AFB2 a ganho 1000.

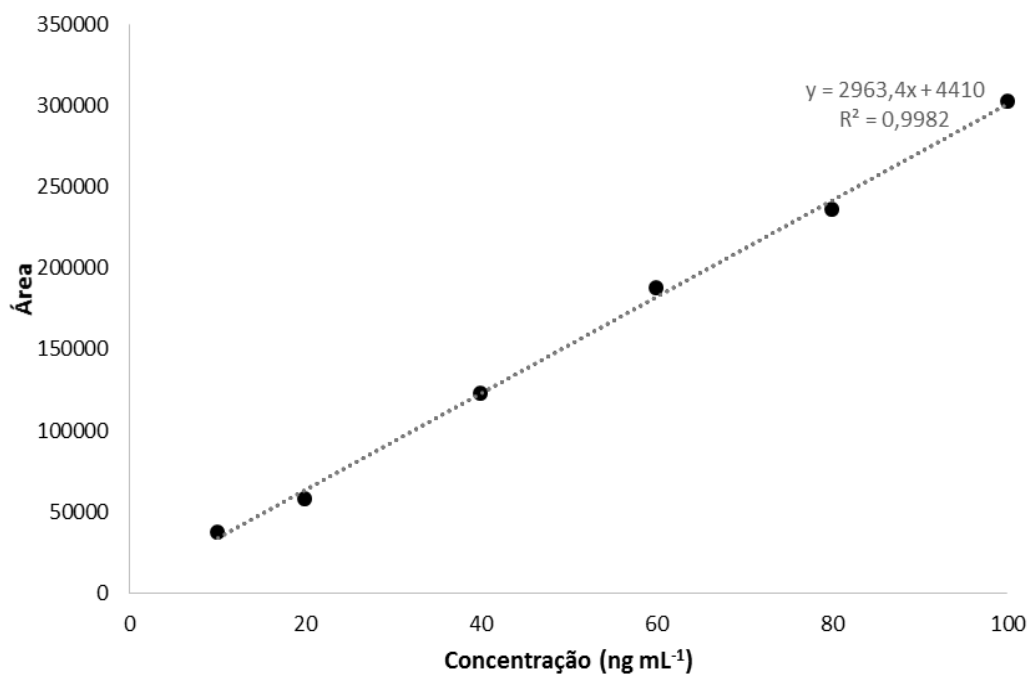


Figura A1.11: Curva de calibração da AFG1 a ganho 1000.

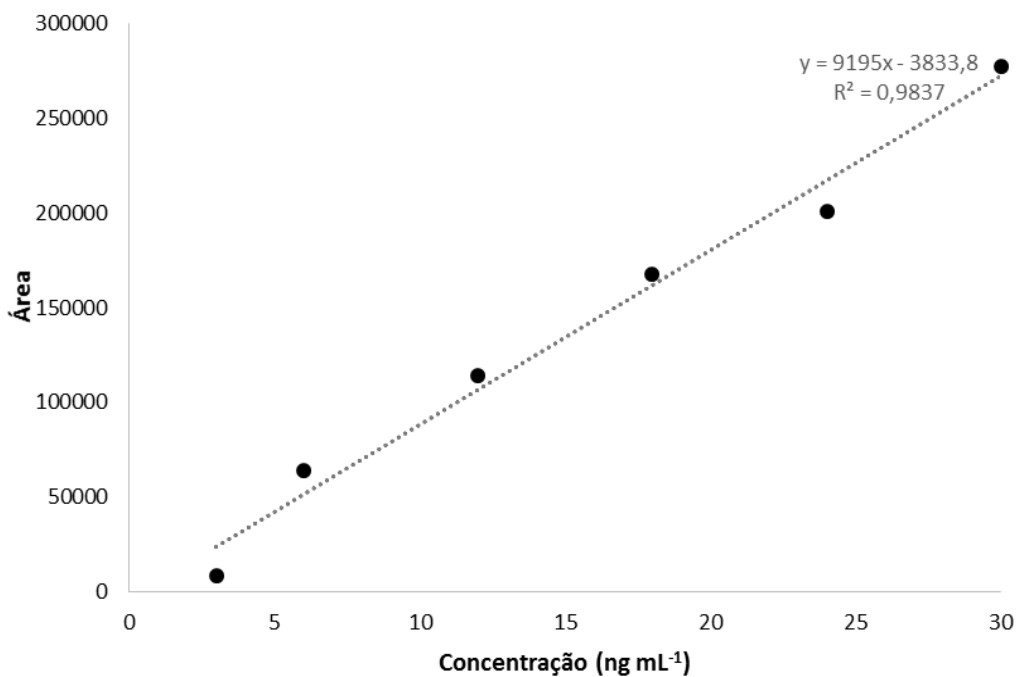


Figura A1.12: Curva de calibração da AFG2 a ganho 1000

Tabela A1.1: Limites de quantificação das AFs

	Limites de quantificação das AFs ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
Ganho 10	0,16	0,08	0,05	0,06
Ganho 100	0,17	0,16	0,16	0,17
Ganho 1000	0,06	0,02	0,02	0,01

Tabela A1.2: Limites de detecção das AFs

	Limites de detecção das AFs ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
Ganho 10	0,05	0,02	0,02	0,02
Ganho 100	0,05	0,05	0,05	0,05
Ganho 1000	0,01	0,00	0,01	0,00

2. Curva de calibração do ergosterol

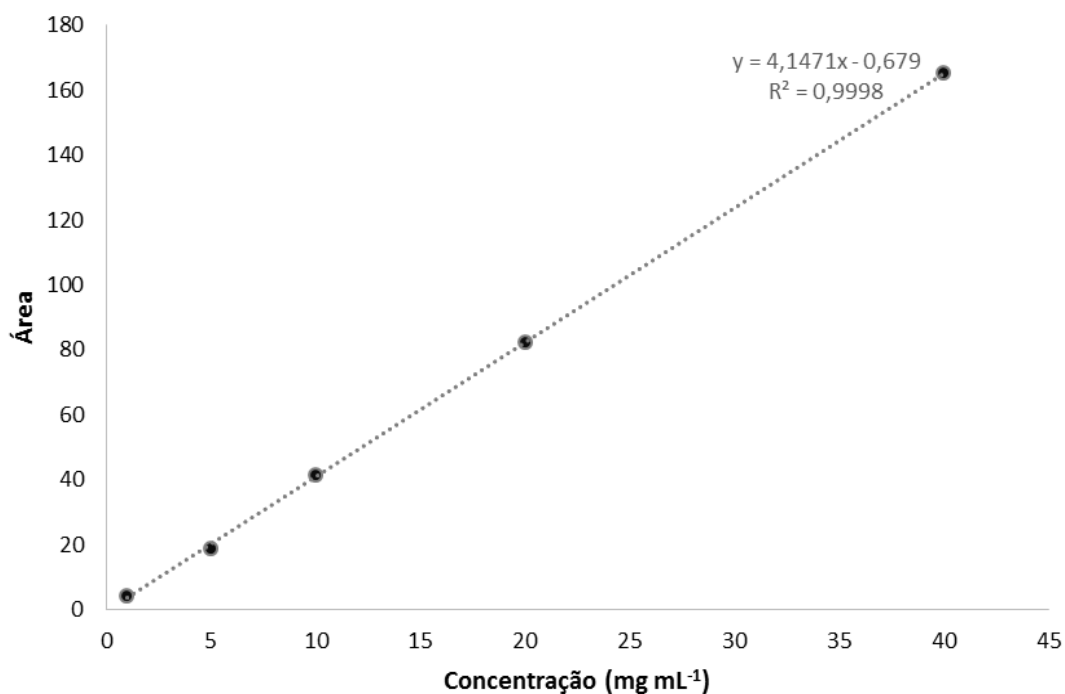


Figura A1.13: Curva de calibração do ergosterol.

Anexo II – Dados experimentais

1. Crescimento fúngico

Tabela A2.1: Inibição do crescimento de *A. parasiticus*, por diferentes quantidades dos OEs estudados. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c, e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05)

Óleos essenciais	Volume (µL)	Inibição Fúngica (%)± DP
<i>C. zeylanicum</i>	0	0,00±2,59 a
	5	84,34 ±8,40 b
	10	82,19 ± 18,09 b
	25	94,59 ± 1,32 b
	50	95,09 ± 0,00 b
<i>C. bergamia</i>	0	0,00±2,59 a
	5	4,79 ± 1,23 b
	10	5,90 ± 0,60 b
	25	8,27 ± 3,07 b
	50	14,86 ± 3,09 c
<i>C. sinensis</i>	0	0,00±2,59 a
	5	7,66 ± 0,94 c
	10	4,30 ± 1,13 b
	25	6,63 ± 1,55 b/c
	50	11,34 ± 2,32 d
<i>C. nardus</i>	0	0,00±2,59 a
	5	22,39 ±7,13 a/b
	10	40,66 ±4,49 b
	25	88,57 ±2,65 c
	50	94,47 ± 0,55 d
<i>L. officinalis</i>	0	0,00±2,59 a
	5	2,95 ± 1,07 a
	10	7,00 ± 3,37 b
	25	2,33 ± 1,35 a
	50	1,72 ± 1,06 a
<i>M. alternifolia</i>	0	0,00±2,59 a
	5	12,40 ± 1,87 b
	10	16,5 ± 06,65 a/b/c
	25	49,14 ± 9,32 c
	50	91,06 ± 0,31 d
<i>M. viridiflora</i>	0	0,00±2,59 a
	5	15,23 ± 9,17 a/b/c
	10	10,93 ± 1,82 b
	25	28,44 ± 4,09 c
	50	80,34 ± 8,44 d

Tabela A2.2: Inibição do crescimento de *A. parasiticus*, por diferentes quantidades dos OEs estudados. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c, e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05)- continuação

	0	0,00±2,59 a
	5	6,02 ± 3,25 a/b
<i>P. cablin</i>	10	8,34 ± 3,32 b
	25	14,96 ± 7,16 c
	50	7,66 ± 0,71 b

Tabela A2.2: Valores médios da fase lag e da taxa de crescimento de *A. parasiticus*, sob efeito de diferentes quantidades dos OEs estudados. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05)

Óleos essenciais	Volume (µL)	Valores médios ± DP	
		Lag (dia)	Vel (cm dia ⁻¹)
<i>C. zeylanicum</i>	0	0,30±0,18 a	1,09±0,09 c
	5	6,11 ±1,33 b	0,61±0,17 b
	10	5,66±4,96 a/b	0,32±0,34 b/a
	25	81,08±96,58 a/b	0,05±0,10 a
	50	-425,26±676,36 a/b	0,03±0,11 a
<i>C. bergamia</i>	0	0,30±0,18 a	1,09±0,09 a
	5	0,55±0,57 a/b	1,07±0,03 a/b
	10	0,48±0,13 a	1,03±0,03 a/b
	25	0,89±0,06 b	1,04±0,02 a/b
	50	1,41±0,13 b	1,00±0,02 b
<i>C. sinensis</i>	0	0,30±0,18 a	1,09±0,09 b
	5	1,03±0,01 b	1,03±0,01 a
	10	0,46±0,08 a	1,06±0,02 a/b
	25	0,42±0,18 a	1,02±0,04 a
	50	0,73±0,26 a/b	0,98±0,02 a
<i>C. nardus</i>	0	0,30±0,18 a	1,09±0,09 c
	5	2,63±0,90 b	1,17±0,11 c
	10	3,18±0,64 b	1,07±0,14 c
	25	3,19 ±0,68 c	0,43± 0,30 b
	50	9,46±2,20 d	0,12± 0,08 a
<i>L. officinalis</i>	0	0,30±0,18 a	1,09±0,09 a
	5	0,18±0,01 a	1,03±0,01 a
	10	0,15±0,41 a	1,00±0,10 a
	25	0,27±0,31 a	1,07±0,04 a
	50	0,33±0,09 a	1,00±0,02 a

Tabela A2.2: Valores médios da fase lag e da taxa de crescimento de *A. parasiticus*, sob efeito de diferentes quantidades dos OEs estudados. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05)- continuação

<i>M. alternifolia</i>	0	0,30±0,18 a	1,09±0,09 e
	5	0,78 ±0,23 a	0,99±0,021 d
	10	0,66±0,38 a	0,87±0,05 c
	25	2,34 ±0,83 b	0,68±0,13 b
	50	-854,11±658,09a/b	0,04±0,07 a
<i>M. viridiflora</i>	0	0,30±0,18 a	1,09±0,09 d
	5	1,48±0,61 b/c	1,05±0,00 c/d
	10	0,92±0,62 b	0,97±0,88 b/c
	25	2,15±0,78 c	0,92±0,05 b
	50	5,10±1,39 d	0,71±0,20 a
<i>P. cablin</i>	0	0,30±0,18 a	1,09±0,09 a
	5	0,25±0,08 a	0,97±0,02 a
	10	0,29±0,17 a	0,96±0,05 a
	25	0,46±0,35 a	0,96±0,07 a
	50	0,26±0,05 a	0,95±0,00 a

2. Produção de AFs

Tabela A2.3: Inibição da produção de AFs por *A. parasiticus* por diferentes quantidades dos OEs estudados. Os valores seguidos por letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferenças significativas, de acordo com os testes de Duncan's e Dunnett C (P=0,05)

Óleos essenciais	Volume (µL)	Inibição de AFs (%) ± DP	
		AFB1	AFG1
<i>C. zeylanicum</i>	0	0,00±25,18 a	0,00±17,82 a
	5	99,97±0,05 b	99,79±0,23 b
	10	99,98±0,05 b	100±0,00 b
	25	100±0,00 b	100±0,00 b
	50	100±0,00 b	100±0,00 b
<i>C. nardus</i>	0	0,00±25,18 a	0,00±17,82 a
	5	60,29±16,59 b	43,98±13,18 b
	10	85,03±9,53 b	71,47±3,34 b
	25	98,04±4,50 b	99,74± 0,58 c
	50	100 ± 0,00 b	100± 0,00 c
<i>M. alternifolia</i>	0	0,00±25,18 a	0,00±17,82 a
	5	69,89 ± 3,22 b	28,01±11,87 b
	10	77,50±3,23 b	66,25±22,05 c
	25	93,51±2,22 c	85,89±5,96 c/d
	50	100±0,00 d	100±0,00 d
<i>M. viridiflora</i>	0	0,00±25,18 a	0,00±17,82 a
	5	48,87±29,64 a/b	84,23±5,60 b
	10	69,80±3,22 b	86,17±7,07 b/c
	25	84,73±2,82 b	97,51±1,95 c
	50	85,96±16,45 c	97,80±3,11 c

Tabela A2.4: Valores médios do diâmetro de crescimento e da produção de AFs por *A. parasiticus* sob efeito de diferentes quantidades dos vários OEs

Óleos essenciais	Volume (µL)	Diâmetro (cm) ± DP	AFB1 ± DP
<i>C. zeylanicum</i>	5	2,57±0,69	0,00±0,00
	10	2,13±2,28	0,00±0,00
	25	0,35±0,29	0,00±0,00
	50	0,20±0,28	0,00±0,00
<i>C. bergamia</i>	5	8,22±0,03	7,60±0,78
	10	8,25±0,00	2,84±0,56
	25	8,23±0,06	2,77±0,53
	50	8,15±0,09	7,09±0,54

Tabela A2.4: Valores médios do diâmetro de crescimento e da produção de AFs por *A. parasiticus* sob efeito de diferentes quantidades dos vários OEs- continuação

<i>C. sinensis</i>	5	7,98±0,03	11,48±0,97
	10	8,27±0,12	2,75±0,52
	25	8,19±0,01	4,17±1,02
	50	8,05±0,09	10,21±0,8
<i>C. nardus</i>	5	7,89±0,24	4,27±1,78
	10	6,68±0,09	1,61±1,02
	25	2,31±1,42	0,06±0,05
	50	0,55±0,04	0,00±0,00
<i>L. officinalis</i>	5	8,25±0,05	8,97±0,40
	10	8,09±0,19	3,08±0,97
	25	8,27±0,06	3,83±0,31
	50	8,08±0,06	8,26±0,42
<i>M.alternifolia</i>	5	7,63±0,18	3,23±0,36
	10	7,59±0,21	2,42±0,35
	25	5,50±1,22	0,70±0,24
	50	0,87±0,06	0,00±0,00
<i>M. viridiflora</i>	5	8,28±0,11	5,49±3,18
	10	8,09±0,11	3,24±0,35
	25	7,08±0,83	1,64±0,30
	50	2,05±0,26	1,51±1,77
<i>P. cablin</i>	5	8,25±0,05	1,65±0,30
	10	8,21±0,08	1,93±0,95
	25	7,93±0,34	3,22±2,37
	50	8,17±0,03	4,62±1,18
Controlo		1,81±0,21	0,34±0,14
		4,00±0,05	4,96±1,25
		7,23±0,16	8,65±1,23
		8,40±0,08	10,73±2,70

3. Relação Ergosterol/ Diâmetro/ Peso Seco

Tabela A2.5: Dados experimentais do teor de ergosterol, diâmetro e peso seco fúngico.

Ergosterol (mg mL⁻¹)	Quadrado do diâmetro (cm²)	Peso seco fúngico (g)
0,00	0,00	0,00
4,02	5,52	0,28
3,91	5,29	0,28
4,13	5,29	0,40
15,73	16,81	0,25
18,12	16,40	0,24
19,04	16,40	0,24
42,41	37,21	0,17
42,57	36,60	0,20
32,59	37,82	0,14