

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

LUNDOI TOBIAS LEE

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FUNGICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-
LIMÃO (*Cymbopogon flexuosus*) NO CONTROLE DOS FUNGOS *Aspergillus*
brasiliensis E *Aspergillus flavus* NA CONSERVAÇÃO DE GRÃOS DE TRIGO
(*Triticum aestivum*).

VOLTA REDONDA
2017

LUNDOI TOBIAS LEE

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FUNGICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
CAPIM-LIMÃO (*Cymbopogon flexuosus*) NO CONTROLE DOS FUNGOS
Aspergillus brasiliensis E *Aspergillus flavus* NA CONSERVAÇÃO DE GRÃOS DE
TRIGO (*Triticum aestivum*).**

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

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

Volta Redonda, RJ
2017

L477 Lee, Lundoι Tobias.

Avaliação do potencial fungicida do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) no controle dos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus flavus* na conservação de grãos de trigo (*Triticum aestivum*) / Lundoι Tobias Lee – Volta Redonda, 2017.

76 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) –
Universidade Federal Fluminense

Orientador: Ana Paula Martinazzo

Coorientador: Carlos Eduardo de Souza Teodoro

1. CIM. 2. Citral. 3. Cromatografia. 4. Micotoxinas. 5. Microdiluição. I. Martinazzo, Ana Paula. II. Teodoro, Carlos Eduardo de Souza. III. Título.

CDD 628

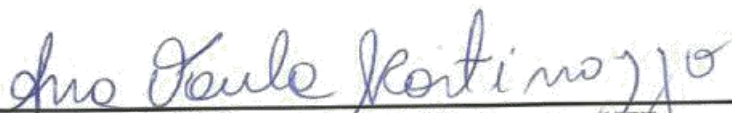
LUNDOI TOBIAS LEE

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FUNGICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO (*Cymbopogon flexuosus*) NO CONTROLE DOS FUNGOS *Aspergillus brasiliensis* E *Aspergillus flavus* NA CONSERVAÇÃO DE GRÃOS DE TRIGO (*Triticum aestivum*).

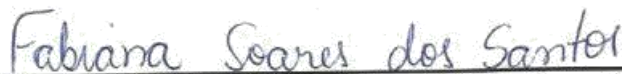
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Aprovada em 05 de maio de 2017.

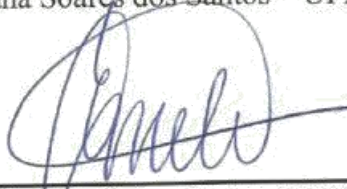
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dra. Ana Paula Martinazzo – UFF
Orientadora



Prof.^a. Dra. Fabiana Soares dos Santos – UFF



Prof. Dr. Evandro de Castro Melo – UFV

Dedico esse trabalho a todos, que mesmo com todas as adversidades e dificuldades, são movidos pela paixão, a paixão pela busca de conhecimento e insistem em fazer ciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Criador por toda sua bondade, por todas as oportunidades e acima de tudo por sempre me fazer sentir amparada, agradeço pela fé, agradeço a todos os meus amigos espirituais que sempre estiveram ao meu lado nessa jornada.

Agradeço a minha orientadora professora Ana Paula Martinazzo, por todo o apoio, principalmente nos momentos difíceis, pela paciência, pela orientação e acima de tudo por acreditar, muito obrigada.

Agradeço ao meu co-orientador professor Carlos Eduardo de Souza Teodoro, por toda a generosidade, pela co-orientação e por todos os ensinamentos no laboratório, muito obrigada.

Agradeço a todos os professores do programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental, agradeço especialmente ao professor Wellington Kiffer, agradeço especialmente aos professores Adriano Portz e Gilmar Clemente pelo auxílio no desenvolvimento do meu trabalho, muito obrigada.

Agradeço aos meus companheiros de turma PGTA-2015, pela companhia e amizade nessa caminhada.

Agradeço aos meus companheiros do Laboratório de Biotecnologia e Processamentos Agrícolas e Pós Colheita, que me tanto me auxiliaram, Filipe Oliveira, Gabriel Souza, Milena dos Santos, Renie Delgado, Rodrigo Costa, Patrícia Pires, Marina Ramalhet, muito obrigada. Agradeço especialmente ao Leonardo dos Santos que foi meu parceiro de mestrado, meu parceiro de laboratório e que tanto me ajudou, muito obrigada. Meu agradecimento mais que especial vai para a pessoa mais incrível que pude conhecer, minha querida Sabrinna Aires, que foi minha amiga, companheira, meu braço direito, meus olhos, eu não sei o que teria sido de mim sem você, desejo que todos os mestrandos tenham alguém como você, muito obrigada por tudo.

Agradeço a todos os meus amigos e a minha família, por entenderem minhas dificuldades e em muitos momentos minha ausência, agradeço especialmente a tia Lina por todo o auxílio em todos os momentos, agradeço aos meus gatos Pitty e Espanador pela companhia constante nas horas de estudo.

Agradeço a EMBRAPA Trigo/RS, pelo fornecimento do trigo utilizado na pesquisa e especialmente a Casiane Tibola, Marialba Santos e Luciano Consoli.

Agradeço a Coleção de Cultura e Fungos Filamentosos da Fundação Oswaldo Cruz, pelo fornecimento dos fungos utilizados no estudo.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro e a concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização desse trabalho. **MUITO OBRIGADA!!!**

“A educação tem raízes amargas, mas os seus frutos
são doces.” Aristóteles

RESUMO

Os fungos estão entre os principais responsáveis por danos e perdas em grãos armazenados. Possuem a capacidade de produzir metabólitos secundários quando submetidos a condições ideais, conhecidos como micotoxinas, substâncias altamente tóxicas que podem contaminar os produtos destinados à alimentação tanto humana como animal causando danos para a saúde. O controle destes fungos tem sido feito por meio de substâncias sintéticas, que são prejudiciais ao homem e ao meio ambiente. Desta forma faz-se necessária a busca por métodos alternativos do controle desses fungos. Neste contexto, os óleos essenciais extraídos de plantas mostram-se como possível opção. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia dos óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) para controle dos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus flavus*, os quais infestam grãos armazenados. Inicialmente verificou-se o efeito do óleo essencial sobre o crescimento micelial dos fungos em testes *in vitro* nas doses de: 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4 e 12,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Em seguida, realizou-se microdiluição seriada para determinação da concentração mínima inibitória, em doses entre 0,12 a 1,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Sequencialmente foi realizada avaliação do efeito fungicida do componente majoritário do óleo essencial, o citral, o qual corresponde a 72% da composição total do óleo, nas doses de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Por último foi analisado o efeito do óleo de capim-limão na inibição do desenvolvimento dos fungos em grãos de trigo (*Triticum aestivum*) contaminados, nas doses de: 0,6; 0,8 e 1,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$, com período de armazenamento de 10, 20 e 30 dias. Os resultados demonstraram que o óleo essencial apresentou, nos testes *in vitro*, potencial fungicida sobre os fungos *A. flavus* e *A. brasiliensis*, com doses a partir de 0,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$, sendo, porém, juntamente com a análise da microdiluição, considerada como a dose mínima inibitória 1,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de óleo essencial de *C. flexuosus* para total controle dos micro-organismos. Nos testes *in vitro* com o citral, obteve-se controle total dos fungos a partir da dose de 0,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de citral. Na análise em grãos, para melhor controle das duas espécies fúngicas, a dose de 1,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ mostrou ser a mais indicada.

Palavras-chave: micro-organismo, armazenagem, qualidade, citral.

ABSTRACT

Fungi are among the main responsible for damages and losses in stored grains. They have the ability to produce secondary metabolites when subjected to ideal conditions, known as mycotoxins, highly toxic substances that can contaminate products intended for human and animal nutrition causing health damage. The control of these fungi has been made by synthetic substances, which are harmful to man and the environment. In this way it is necessary to search for alternative methods of controlling these fungi. In this context, essential oils extracted from plants are shown as a possible option. The objective of this study was to evaluate the efficacy of essential oils of lemon grass (*Cymbopogon flexuosus*) for control of fungi that attack stored grains, the species tested were *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus flavus*. The effect of the essential oil on fungal mycelial growth was initially verified in in vitro tests, the doses tested were: 0.05; 0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1.6; 3.2; 6.4 and 12.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Subsequently, serial microdilution was performed to determine the minimum inhibitory concentration at doses between 0.12 and 1.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Sequentially, the fungicidal effect of the major component of the essential oil, citral, was evaluated, which corresponds to 72% of the total oil composition, in the doses of 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Finally, the effect of lemon grass oil on the inhibition of the development of fungi on contaminated wheat grains (*Triticum aestivum*), at the doses of: 0.6; 0.8 and 1.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$, with observation period of 10, 20 and 30 days. The results showed that in the in vitro tests, the fungicidal potential of the fungi *A. flavus* and *A. brasiliensis*, with doses from 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$, was evaluated in in vitro tests, but, together with the microdilution analysis, considered as the minimum inhibitory dose 1.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of essential oil of *C. flexuosus* for total control of the microorganisms. In the in vitro tests with citral, total control of the fungi was obtained from the dose of 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ citral. In the grain analysis, for a better control of the two fungal species, the dose of 1.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ was shown to be the most indicated.

Keywords: Microorganism, storage, quality, citral.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i>	22
Figura 2: Fungo <i>Aspergillus flavus</i>	23
Figura 3: Estrutura química da aflatoxina B1	26
Figura 4: Capim-limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>)	27
Figura 5: Fórmula estrutural do citral	31
Figura 6: Trigo	40
Figura 7: Cromatograma do óleo essencial de capim-limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>) utilizado no experimento	40
Figura 8: Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de capim-limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>) no crescimento do fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i>	43
Figura 9: Efeito de diferentes doses do óleo essencial de capim-limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>) na inibição do desenvolvimento micelial do fungo <i>A. brasiliensis</i> no nono dia de incubação	46
Figura 10: Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de capim-limão (<i>C. flexuosus</i>) no crescimento do fungo <i>Aspergillus flavus</i>	47
Figura 11: Porcentagem de inibição do efeito do óleo essencial de capim-limão (<i>C. flexuosus</i>) no desenvolvimento do fungo <i>A. flavus</i>	50
Figura 12: Efeito de diferentes doses de citral no crescimento do fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i>	52
Figura 13: Efeito de diferentes doses de citral no crescimento do fungo <i>Aspergillus flavus</i>	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Principais componentes do óleo essencial capim-limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>) determinados por CG-EM	41
Tabela 02. Comparação dos principais componentes do óleo essencial de capim limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>), identificados no presente trabalho, em relação a artigos publicados.....	42
Tabela 03: Porcentagem média de inibição, <i>in vitro</i> , do crescimento micelial do fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> para diferentes dosagens ($\mu\text{L}/\text{mL}$) do óleo essencial de capim-limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>) durante o período de incubação	45
Tabela 04. Porcentagem média de inibição, <i>in vitro</i> , do crescimento micelial do fungo <i>Aspergillus flavus</i> para diferentes dosagens ($\mu\text{L}/\text{mL}$) do óleo essencial de capim-limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>) durante o período de incubação	49
Tabela 05: Indicação de crescimento fúngico* em microdiluição seriada de <i>Aspergillus brasiliensis</i> e <i>Aspergillus flavus</i> para diferentes dosagens ($\mu\text{L}/\text{mL}$) do óleo essencial de capim limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>)	51
Tabela 06. Porcentagem média de inibição, <i>in vitro</i> , do crescimento micelial do fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> para diferentes dosagens ($\mu\text{L}/\text{mL}$) de citral durante o período de incubação	54
Tabela 07. Porcentagem média de inibição, <i>in vitro</i> , do crescimento micelial do fungo <i>Aspergillus flavus</i> para diferentes dosagens ($\mu\text{L}/\text{mL}$) de citral durante o período de incubação	56
Tabela 08. Porcentagem média de inibição do crescimento do fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i> em grãos de trigo (<i>T. aestivum</i>) para diferentes doses do óleo essencial de capim-limão (<i>C. flexuosus</i>) e períodos de armazenamento	59
Tabela 09. Porcentagem média de inibição do crescimento do fungo <i>Aspergillus flavus</i> em grãos de trigo (<i>T. aestivum</i>) para diferentes doses do óleo essencial de capim-limão (<i>C. flexuosus</i>) e períodos de armazenamento	59

LISTA DE QUADROS

- Quadro 01.** Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do óleo essencial de capim limão (*C. flexuosus*), durante o período de incubação (dias) sobre o crescimento micelial do fungo *A. brasiliensis*..... 44
- Quadro 02.** Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do óleo essencial de capim limão (*C. flexuosus*), durante o período de incubação (dias) sobre o crescimento micelial do fungo *A. flavus*..... 48
- Quadro 03.** Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do citral, durante o período de incubação (dias) sobre o crescimento micelial do fungo *A. brasiliensis*..... 53
- Quadro 04.** Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do citral, durante o período de incubação (dias) sobre o crescimento micelial do fungo *A. flavus*..... 56
- Quadro 05** – Resumo da análise de variância do efeito de diferentes doses óleo essencial de *C. flexuosus* (0,6; 0,8; 1,6, $\mu\text{L}/\text{mL}$), durante o período de 10 dias, no crescimento do fungo *A. brasiliensis* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados.....73
- Quadro 06** – Resumo da análise de variância do efeito de diferentes doses óleo essencial de *C. flexuosus* (0,6; 0,8; 1,6, $\mu\text{L}/\text{mL}$), durante o período de 20 dias, no crescimento do fungo *A. brasiliensis* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados 73
- Quadro 07** – Resumo da análise de variância do efeito de diferentes doses óleo essencial de *C. flexuosus* (0,6; 0,8; 1,6, $\mu\text{L}/\text{mL}$), durante o período de 20 dias, no crescimento do fungo *A. brasiliensis* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados 73
- Quadro 08** – Resumo da análise de variância do efeito da dose de 0,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ do óleo essencial de *C. flexuosus*, em diferentes períodos de incubação (10, 20, 30 dias), no crescimento do fungo *A. brasiliensis* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados 74
- Quadro 09** – Resumo da análise de variância do efeito da dose de 0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ do óleo essencial de *C. flexuosus*, em diferentes períodos de incubação (10, 20, 30 dias), no crescimento do fungo *A. brasiliensis* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados 74
- Quadro 10** – Resumo da análise de variância do efeito da dose de 1,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ do óleo essencial de *C. flexuosus*, em diferentes períodos de incubação (10, 20, 30 dias), no crescimento do fungo *A. brasiliensis* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados 74
- Quadro 11** – Resumo da análise de variância do efeito de diferentes doses óleo essencial de *C. flexuosus* (0,6; 0,8; 1,6, $\mu\text{L}/\text{mL}$), durante o período de 10 dias, no

crescimento do fungo *A. flavus* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados 75

Quadro 12 – Resumo da análise de variância do efeito de diferentes doses óleo essencial de *C. flexuosus* (0,6; 0,8; 1,6, $\mu\text{L}/\text{mL}$), durante o período de 20 dias, no crescimento do fungo *A. flavus* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados 75

Quadro 13 – Resumo da análise de variância do efeito de diferentes doses óleo essencial de *C. flexuosus* (0,6; 0,8; 1,6, $\mu\text{L}/\text{mL}$), durante o período de 20 dias, no crescimento do fungo *A. flavus* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados 75

Quadro 14 – Resumo da análise de variância do efeito da dose de 0,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ do óleo essencial de *C. flexuosus*, em diferentes períodos de incubação (10, 20, 30 dias), no crescimento do fungo *A. flavus* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados 76

Quadro 15 – Resumo da análise de variância do efeito da dose de 0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ do óleo essencial de *C. flexuosus*, em diferentes períodos de incubação (10, 20, 30 dias), no crescimento do fungo *A. flavus* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados 76

Quadro 16 – Resumo da análise de variância do efeito da dose de 1,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ do óleo essencial de *C. flexuosus*, em diferentes períodos de incubação (10, 20, 30 dias), no crescimento do fungo *A. flavus* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados 76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

B.O.D - Biochemical Oxygen Demand

BD - Batata, dextrose

BDA - Batata, dextrose e ágar

CG-EM - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa

CIM - Concentração inibitória mínima

CV - Coeficiente de Variação

DMSO - Dimetilsufóxido

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

IK - Índice de Retenção de Kovats

PI - Porcentagem de inibição

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

UFC - Unidade Formadora de Colônias

UFF- Universidade Federal Fluminense

WASDE - World Agricultural Supply and Demand Estimates.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
2. Objetivo geral	19
2.1 Objetivos específicos.....	19
3. Revisão de literatura	20
3.1. Fungos	20
3.1.1 Gênero <i>Aspergillus</i>	21
3.1.1.1 <i>Aspergillus brasiliensis</i>	22
3.1.1.2 <i>Aspergillus flavus</i>	23
3.1.2 Micotoxinas	24
3.2 Trigo	26
3.3 Óleos essenciais.....	28
3.4 Capim-limão [<i>Cymbopogon flexuosus</i> (Nees ex Steudel) Watson].....	30
3.5 Controle de fungos por meio de óleos essenciais	32
4. Metodologia.....	35
4.1 Análises dos constituintes do óleo essencial	35
4.2 Crescimento fúngico.....	35
4.3 Ensaio antifúngico <i>in vitro</i>	36
4.4 Microdiluição em microplaca de 96 poços.....	37
4.5 Análise do controle de fungos por óleo essencial em grãos infestados.....	38
4.6 Análise estatística	39
5. Resultados e discussão	40
5.1.1. Identificação dos componentes químicos do óleo essencial de capim limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>)	40
5.1.2 Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> do óleo essencial de capim-limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>) sobre o <i>Aspergillus brasiliensis</i>	43
5.1.3 Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> do óleo essencial de capim-limão (<i>C. flexuosus</i>) sobre o fungo <i>Aspergillus flavus</i>	46
5.1.4 Análise da atividade antifúngica por microdiluição do óleo essencial de capim-limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>) sobre fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	51

5.1.5 Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> do citral sobre o fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i>	52
5.1.6 Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> do citral sobre o <i>Aspergillus flavus</i> ...	54
5.1.7 Avaliação da eficácia do óleo essencial de capim-limão (<i>C. flexuosus</i>) no controle dos fungos <i>Aspergillus brasiliensis</i> e <i>A. flavus</i> em grãos de trigo (<i>T. aestivum</i>) contaminados.....	58
6. Conclusões.....	62
7. Referências bibliográficas	63
I. ANEXO.....	73

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são considerados uma das maiores causas de deterioração de sementes e grãos durante o armazenamento. A estimativa é que, da produção mundial agrícola, um milhão de toneladas de alimentos é comprometido, em consequência da contaminação com alguma micotoxina, com reconhecidos efeitos prejudiciais na saúde humana e animal. O Brasil considerado um dos países líderes na agricultura, possui condições ambientais ótimas para o desenvolvimento de fungos micotoxigênicos (FREIRE et al., 2007; PRAKASH et al., 2015).

Os fungos que ocorrem nos grãos podem ser divididos em dois grupos: de campo e de armazenamento. Os primeiros causam doenças nas plantas durante seu cultivo. O segundo grupo, dos fungos de armazenamento compreende principalmente o gênero *Aspergillus*. Entre os maiores danos ocasionados pelo desenvolvimento fúngico em grãos e sementes armazenados estão a perda do poder germinativo e matéria seca, alteração do valor nutricional e produção de micotoxinas (LAZZARI, 1997; BIRCK, 2005; TIBOLA et al., 2013).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de fungos, quando submetidos a condições ideais para seu desenvolvimento. A ingestão de alimentos contaminados e a intoxicação com essas toxinas são chamadas de micotoxicoses. Devido à sua resistência, estes agentes podem ser encontrados tanto em grãos e sementes armazenadas quanto em alimentos processados e rações (TIBOLA et al., 2013; LINS et al., 2014). A contaminação de grãos e sementes com micotoxinas ocorre de maneira ampla e afeta cereais de importância econômica e alimentar, entre eles o trigo.

O trigo é fonte de matéria prima para produção de muitos alimentos, sendo considerado fundamental na alimentação humana, seu cultivo representa 30% de toda produção mundial de grãos (TIBOLA et al., 2013). De acordo com *World Agricultural Supply and Demand Estimates*, no mês de agosto de 2016 no mundo foram produzidos 819,5 milhões de toneladas de trigo, desses 5,3 milhões de toneladas produzidas no Brasil (WASDE, 2016).

Devido à problemática em relação a intoxicações causadas por fungos em produtos alimentícios, há legislações vigentes por todo o mundo em relação aos teores

máximos permitidos destas substâncias para diversos tipos de alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias primas. Internacionalmente estes teores são recomendados pelo *Codex Alimentarius* e a nível nacional são regidos pela Resolução RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a qual se aplica às empresas que importem, produzam, distribuam e comercializem bebidas, alimentos e matérias primas como o trigo e seus produtos (BRASIL, 2011).

Para o controle da contaminação fúngica em diversos tipos de alimentos, tem-se buscado medidas alternativas, utilizando-se agentes naturais como os óleos essenciais, que não provoquem efeitos colaterais e poluição ambiental.

As propriedades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais obtidos de plantas tem sido reconhecidas empiricamente durante séculos, mas foram confirmadas cientificamente apenas há alguns anos. Vários pesquisadores têm estudado a atividade biológica de plantas medicinais originárias de diversas regiões do mundo, orientados pelo uso popular de espécies nativas, mostrando que seus compostos secundários são eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de micro-organismos como fungos filamentosos, leveduras e bactérias (JANSSEN et al., 1987). Segundo Bhavnani e Ballow (2000) cerca de 60% dos óleos essenciais possuem atividades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas.

Dentre as espécies produtoras de óleos essenciais que se desenvolvem em diversas regiões do Brasil, sendo amplamente conhecida e utilizada, está o capim-limão [*Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steudel) Watson].

O capim-limão nativo da Índia é uma erva aromática perene cultivada para obtenção do seu óleo essencial, o qual é rico em citral, substância utilizada na indústria de perfumaria, cosmética e farmacêutica (MAY et al., 2008; ADINARAYANA et al., 2012). Estudos como de Pandey et al. (2003); Koshima et al. (2006); Valeriano et al. (2012) e Aquino et al. (2014), comprovaram intensa atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral e inseticida deste óleo essencial.

Diante do exposto, o presente trabalho buscou alternativas para o controle de fungos, avaliando o potencial fungicida do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre o desenvolvimento dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus brasiliensis*.

2. OBJETIVO GERAL

Analisar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de capim-limão [*Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steudel) Watson] para o controle dos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus flavus*, em grãos de trigo (*Triticum aestivum* L.) contaminados.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os principais componentes químicos do óleo essencial utilizado;
- Avaliar a atividade fungitóxica *in vitro* do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon flexuosus*) sobre o desenvolvimento dos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus flavus*;
- Identificar a concentração mínima inibitória do óleo essencial no desenvolvimento dos fungos em estudo;
- Avaliar a atividade fungitóxica *in vitro* do componente citral sobre o desenvolvimento dos fungos em estudo;
- Analisar a eficácia do óleo essencial na inibição do desenvolvimento dos fungos em grãos de trigo (*Triticum aestivum*) contaminados durante diferentes períodos de armazenagem.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. FUNGOS

A micologia (do grego, *Mykes* = cogumelo + *logos* = estudo) é a ciência que estuda os fungos. Teve início no século XVII, quando se passou a observar as células e suas estruturas através de microscópios. Durante muitos anos os fungos foram tratados como plantas, e eram estudados dentro da Botânica. Devido sua morfologia externa que se assemelham com de algumas plantas, no início acreditavam-se que os fungos e as algas tivessem uma origem comum (GOMPERTZ et al., 2008; HENRIQUE et al., 2010). Porém, foi evidenciado que os fungos são originados de um ancestral eucarionte unicelular flagelado (Protista), não-clorofilado e que depois originou as formas filamentosas. Por esses fatos os fungos teriam seguido uma linha evolutiva independente, não sendo classificados como animais ou plantas. Whittaker, em 1969, propôs o Sistema de Classificação dos organismos em cinco reinos, assim os fungos passaram a ocupar um reino exclusivo, o *Reino Fungi* ou *Mycetae*, e uma de suas principais características é ter a absorção como forma de obter nutrientes (HENRIQUE et al., 2010).

Os fungos compreendem os bolores, leveduras e cogumelos, esses termos não estão relacionados com a classificação dos fungos e sim com sua morfologia. As leveduras são fungos unicelulares, os bolores são fungos filamentosos e os cogumelos são as estruturas reprodutivas de alguns fungos, e em sua grande maioria são comestíveis. São organismos eucariontes, aclorofilados, heterotróficos. Como mecanismo de obtenção de alimento, os fungos secretam enzimas no ambiente para realizar a quebra de moléculas grandes em moléculas menores para conseguirem realizar a absorção (GOMPERTZ et al., 2008; HENRIQUE et al., 2010; NESTER et al., 2011).

Há muitos anos, independentemente de suas origens e afinidades os fungos fazem parte do nosso cotidiano. Eles atuam nos processos industriais como a fermentação, produção de ácidos orgânicos e vitaminas. Dos fungos também são extraídas substâncias que são utilizadas na produção de medicamentos, assim estes organismos se mostram relevantes e influentes na vida humana (HENRIQUE et al., 2010). Essas características de serem decompositores podem ser prejudiciais para o nosso dia a dia, já que os fungos

podem causar o apodrecimento de roupas, objetos de couro, madeira e principalmente de alimentos (AMABIS e MARTHO, 2010).

A contaminação por fungos pode desencadear inúmeras perdas econômicas para a indústria de alimentos, associadas à redução do valor nutricional, alteração do paladar, e quando em condições favoráveis, algumas espécies tem a capacidade de produzirem micotoxinas, podendo afetar tanto a saúde humana como a animal (LAZZARI, 1993).

Em relação a grãos e sementes armazenados, os fungos são os maiores causadores da deterioração provocando a perda de grande parte da produção mundial, além de provocarem doenças na planta viva e degradação de suas partes. A contaminação por fungos em grãos e sementes pode ocorrer em qualquer estágio da cadeia produtiva. A presença de fungos altera as propriedades físicas do grão, poder germinativo das sementes, além de alterarem as propriedades nutricionais, e a produção de micotoxinas, que tem graves consequências para a saúde. Os fungos são encontrados espalhados no ar e solo e podem se desenvolver em qualquer substrato que encontrem as condições ideais para seu desenvolvimento (SCUSSEL, 2002).

3.1.1 GÊNERO *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* tem mais de 260 espécies já estudadas. Em 1729 o botânico Pier Antonio Michelli descreveu o gênero pela primeira vez, e no ano de 1809 foi descrito de maneira mais clara por Johann Heinrich Friedrich Link. Posteriormente com a microscopia óptica, Rudolf Virchow, no ano de 1856, apresentou as características morfológicas do *Aspergillus spp.* e associou com lesões pulmonares de papagaios, falcões e no homem (CASTRO, 2011).

Os fungos do gênero *Aspergillus* representam os encontrados com maior frequência no meio ambiente, no solo e em alimentos (ALVES et al., 2014). Muitas espécies de *Aspergillus* são benéficas para os humanos, como também podem ser sérios patógenos para animais e plantas. Através do metabolismo secundário todas as espécies de *Aspergillus* podem produzir uma ou mais toxinas. Todos os *Aspergillus* produzem esporos assexuadamente o que é sua principal maneira de dispersão, a esporulação

assexuada está estreitamente correlacionada com a produção de determinadas micotoxinas (NI et al., 2011).

As espécies deste gênero de fungos podem afetar negativamente a economia, devido à produção de micotoxinas potentes quanto pela deterioração de alimentos. A presença de fungos no substrato não indica necessariamente a presença de toxinas, porém contagens elevadas de fungos podem indicar a presença de micotoxina no alimento. A presença de fungos do gênero *Aspergillus*, representa um perigo em potencial, pois pode desencadear patologias nos trabalhadores que diretamente entram em contato com o fungo, como a aspergilose, alergias e problemas respiratórios devido ao contato e inalação de conídios (ALVES et al., 2014).

3.1.1.1 *Aspergillus brasiliensis*

No estudo realizado por Parenicová et al. (2001), que tinha como objetivo desenvolver técnicas para identificação e caracterização do gênero *Aspergillus*, o *Aspergillus brasiliensis* (Figura 01) apresentou características distintas do *A. niger* e *A. tubingensis*, sugerindo a classificação de uma nova espécie. Não há estudos sobre a evidência da produção de micotoxinas.



Figura 01: Fungo *Aspergillus brasiliensis*.
Fonte: VARGA et al., 2007.

A espécie *Aspergillus brasiliensis* foi descrita por Varga et al. (2007), da seção *Aspergillus nigri*, foi isolada dos solos do Brasil, na região de São Paulo mais especificamente, o que deu origem ao seu nome, posteriormente também foi encontrada nos solos da Austrália, Estados Unidos e Holanda. Apresenta pouco crescimento e forte produção de ácido, suas colônias apresentam coloração em branco, marrom escuro, e posteriormente mudam para preto, temperatura ótima para crescimento e esporulação 37°C, essa espécie se difere das demais nas suas características fenotípicas e genotípicas.

3.1.1.2 *Aspergillus flavus*

Os fungos da espécie *Aspergillus flavus* (Figura 02) são os principais produtores da micotoxina aflatoxina, e conseqüentemente podem acarretar na contaminação direta de uma variedade extensa de alimentos (ALVES et al., 2014). Suas colônias apresentam as características de serem entre tons de verde à amarelo-oliva, podendo apresentar-se na coloração amarelo puro, e conforme vão envelhecendo se tornam acinzentadas (CASTRO, 2011).

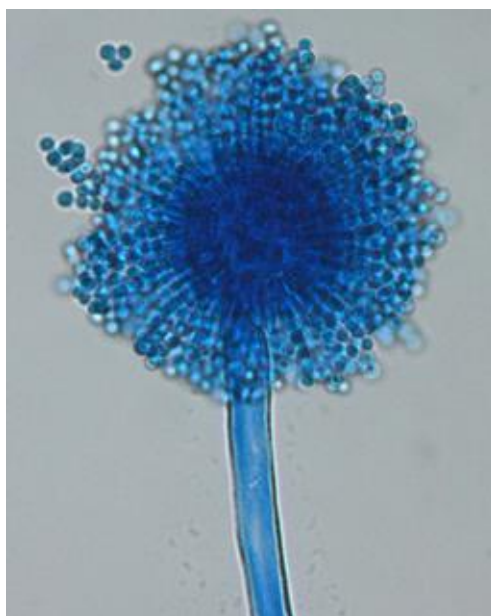


Figura 02: Fungo *Aspergillus flavus*.
Fonte: The University of Adelaide, 2017.

São fungos considerados de armazenamento, encontrado frequentemente em armazéns, silos, moinhos, moegas, elevadores, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados produtos agrícolas. Provocam danos aos produtos somente se as condições de armazenamento não forem adequadas para manter a qualidade dos mesmos (LAZZARI, 1993; TIBOLA et al., 2013; LINS et al., 2014).

Desenvolvem-se bem em condições de umidade relativa do ar entre 80% e 95%, temperatura entre 27 a 30°C e em substratos oleaginosos, o que proporciona o aumento do nível de produção de aflatoxinas; raramente são encontrados em substratos com maior teor de amido, como o milho e ainda assim podem produzir aflatoxinas (MERONUCK, 1987; BARKAI-GOLAN e PASTER, 2008; IAMANAKA et al., 2010).

Durante o armazenamento, além da possível produção de micotoxinas, os efeitos provocados em grãos e sementes pela espécie *Aspergillus flavus*, são morte, descoloração, aquecimento e formação de torrões do produto. Mesmo quando o desenvolvimento dos fungos não é acentuado, pode haver a produção de toxinas, além da degradação causada nos grãos, o que provoca a perda de lotes inteiros, entre outros danos que acabam por interferir na saúde de animais e seres humanos (SCUSSEL, 2002).

3.1.2 Micotoxinas

Os metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos toxigênicos são chamados de micotoxinas e podem ser liberadas no substrato no qual se desenvolveram. A ingestão desses metabólitos fúngicos através de alimentos contaminados podem causar doenças denominadas micotoxicoses (CAST, 2003; TIBOLA et al., 2011).

Estima-se que haja de 300 a 400 tipos distintos de micotoxinas, sendo as mais conhecidas as denominadas aflatoxinas. O termo micotoxina é originário da palavra grega *mykes* - fungo e de uma palavra do latim *toxicum* - toxina. A expressão greco-latina *mykes toxicum* significa toxina fúngica ou micotoxina (JAY, 2005; FREIRE et al., 2007; MALLMAN et al., 2015).

As micotoxinas ficaram conhecidas a partir do ano de 1960, quando ocorreu um surto de morte sem justificativas em aves no Reino Unido, em especial, perus. Esse evento ficou mundialmente conhecido como *Turkey x diases*, após investigações concluiu-se que a causa da morte das aves foi a ração produzida com amendoim importado do Brasil e da

África, o qual estava contaminado com substâncias fluorescentes produzidas por fungos, da espécie *Aspergillus flavus* (SARGEANT et al., 1961).

Existem vários relatos na história da humanidade sobre os efeitos das micotoxinas, eventos documentados onde se associam a ação dessas, como durante a Segunda Guerra Mundial na Sibéria onde ocorreu a produção de micotoxinas nos cereais armazenados durante o inverno, o que provocou a morte de milhares de pessoas que ingeriram esses cereais (TIBOLA et al., 2013).

As micotoxinas aparentemente não demonstram participação no metabolismo normal dos fungos, são produzidas mesmo que de modo não exclusivo, à medida que o fungo se desenvolve e atinge sua maturidade. São moléculas diversificadas com estruturas que variam e não apresentam imunogenicidade (JAY, 2005; FREIRE et al., 2007; MALLMAN et al., 2015).

Ocorrem naturalmente, se proliferam em produtos agrícolas, tanto no seu desenvolvimento no campo, quanto durante o armazenamento, acometendo alimentos processados ou rações para animais. Possuem as seguintes características: inodoras, insípidas e incolores. Quimicamente estáveis e resistentes, nos alimentos mesmo após o cozimento sofrem pouca degradação com difícil eliminação (CAST, 2003; NOVOA e DIÁZ, 2006; TIBOLA et al., 2013; LINS et al., 2014).

A ingestão de alimentos contaminados pode provocar manifestações hepatotóxicas, nefrotóxicas, mutagênicas, estrogênicas, neurotóxicas, imunossupressoras e carcinogênicas, tanto em humanos como em animais (BIRCK 2005; JAY, 2005; MALLMAN et al., 2015).

A micotoxina de maior relevância é a aflatoxina (Figura 03), a expressão aflatoxina é derivada do seu principal agente produtor o *Aspergillus flavus* (SILVA, R. et al., 2013; LINS et al., 2014).

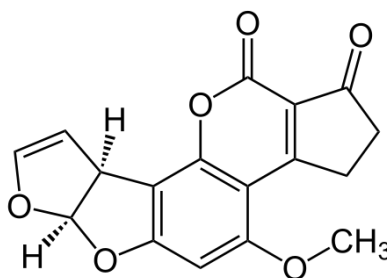


Figura 03: Estrutura química da Aflatoxina B1

Fonte: PubChem, 2017.

A legislação Brasileira que diz respeito ao limite máximo de micotoxinas tolerado em alimentos é a Resolução RDC nº 7, de 18 de Fevereiro de 2011. Tem como objetivo estabelecer os limites máximos para aflatoxinas, ocratoxina A, desoxinivalenol, fumonisinas, patulina e zearalenona admissíveis em alimentos prontos para o consumo e em matérias-primas. Essa resolução foi baseada nos parâmetros estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*. Os níveis de micotoxinas têm que ser o mais baixo possível, devendo ser aplicada as melhores práticas e tecnologias de produção, manipulação, armazenamento, processamento e embalagem, com o intuito de evitar que alimentos contaminados sejam comercializados ou consumidos (BRASIL, 2011).

No que diz respeito a cereais e em específico ao trigo, referente ao limite máximo tolerado (LMT - $\mu\text{g}/\text{kg}$) de micotoxinas, de acordo com a RDC nº 7/2011, com atualização em janeiro de 2016, os limites permitidos de aflatoxinas do tipo B1, B2, G1 e G2 em cereais e produtos cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada é de $5\mu\text{g}/\text{kg}$.

3.2 TRIGO

O trigo é uma gramínea do gênero *Triticum* pertencente ao grupo de plantas mais cultivadas do mundo. Não se sabe ao certo quando exatamente o trigo começou a fazer parte da alimentação humana, mas há relatos que esta planta está a centenas de anos na história da humanidade. Já foi de grande importância na sobrevivência de inúmeras civilizações, sendo fonte de matéria prima de muitos alimentos (TOMASINI e AMBROSI, 1998).

No Brasil desde a época que os portugueses colonizaram o país se tem interesse em plantar o trigo. Inicialmente, para suprir os hábitos dos imigrantes europeus, na época foram realizadas inúmeras tentativas de semear o trigo em diferentes locais do país, como no centro e no norte, até o cultivo migrar para o sul, onde encontrou um ambiente mais propício às suas necessidades e o seu desenvolvimento (CUNHA, 2000).



Figura 04: Trigo

Fonte: OR Sementes, 2017.

Segundo Bernardi et al. (2011) três espécies representam 90% do todo cultivo de trigo no mundo, sendo cada uma delas mais adequada a produção de determinado tipo de alimento, são essas:

- *Triticum aestivum* - é o mais plantado no planeta e é conhecido como trigo comum, representando quatro quintos de toda produção mundial de grão. É o tipo de trigo mais utilizado na fabricação de pão. No âmbito nutricional a quantidade de substâncias contidas no grão alterna-se de acordo com a variedade. No Brasil esta espécie é a mais consumida com um teor de proteína em torno de 15%.
- *Triticum compactum* - possui um teor de proteína médio de 8%, é conhecido como tipo clube. Possui menor teor de glúten, que é responsável pelo crescimento e textura dos produtos feitos com a farinha. É o mais utilizado na fabricação de bolos e biscoitos mais macios e menos crocantes.
- *Triticum durum* – possui um glúten mais resistente, indicado para a produção de massas, inclusive macarrão, pois permite uma textura firme após o cozimento. Este tipo de grão não é cultivado no Brasil.

Para a cadeia agroindustrial, o trigo significa a venda de insumos, para o produtor, a venda do grão, e para o consumidor, a compra de pão e derivados da sua farinha. Essa teia de interesses é de extrema importância para economia, auxilia na manutenção de

milhares de empregos e na geração de receita (TOMASINI e AMBROSI, 1998; MORI e IGNACZAK, 2011).

Um dos problemas da infestação de fungos em grãos de trigo armazenados é a perda na criação de animais em decorrência do consumo de rações contaminadas com micotoxinas, devido ao fato de se utilizar farelo na produção da ração, o qual concentra os maiores teores de toxinas. Além dos danos na saúde dos animais, provocam impactos negativos na cadeia produtiva devido ao menor desempenho e a mortalidade (TIBOLA et al., 2011).

As consequências da presença de fungos nos alimentos para a saúde humana são as infecções ou micoses causadas pelos fungos, alterações gastrointestinais, perda do valor nutricional dos alimentos, como alteração do sabor (SCUSSEL, 2002). Nos casos de ingestão de micotoxinas, elas podem provocar lesões neurológicas, hepáticas, nefréticas, como também apresentar características teratogênicas, mutagênicas, carcinogênicas e alergênicas (FREIRE et al., 2007).

3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais são compostos naturais, voláteis, de estruturas complexas. Apresentam como característica odor forte e são extraídos de plantas aromáticas, produzidos por meio do metabolismo secundário. São substâncias repelentes ou atraentes para insetos das plantas, podendo se acumular em todos os órgãos vegetais (KNAAK e FIUZA, 2010; MACHADO et al., 2013).

Alguns óleos essenciais têm alta toxicidade, apresentam ação repelente, além de influenciarem no desenvolvimento de organismos vivos, como os insetos. Nos vegetais desenvolvem ações em relação a sua volatilidade, atraem insetos polinizadores, atuam contra predadores e patógenos, aumento de temperatura, perda de água, desempenham também papel ecológico, especialmente como inibidores da germinação. A função específica dos óleos essenciais na planta ainda é desconhecida (KNAAK e FIUZA, 2010; GUIMARÃES et al., 2011).

A constituição dos óleos essenciais ocorre através da mistura de compostos, dentre eles, recebem destaque os monoterpenos, sesquiterpenos, e derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, éster, éteres e óxidos). Outros compostos voláteis

incluem fenilpropanoides e substâncias contendo enxofre ou nitrogênio (VALERIANO et al., 2012; MACHADO et al., 2013)

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento, mas as condições ambientais são capazes de causar variações significativas, como a influência do ciclo vegetativo, em que a concentração de cada um dos constituintes do óleo pode variar durante o desenvolvimento do vegetal. O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo também influem sobre a composição química dos óleos essenciais, entretanto, fatores ambientais, tais como temperatura, umidade relativa, duração total de exposição ao sol, regimes de ventos, grau de hidratação do terreno e presença de micronutrientes neste terreno, influenciam na composição do óleo essencial (PEREIRA et al., 2006; GONÇALVES, 2012).

A solubilidade dos componentes do óleo essencial em água está diretamente correlacionada com a capacidade de penetrar na parede celular de bactérias e fungos. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais ocorre devido à solubilidade na bicamada lipídica da membrana celular dos micro-organismos. As diferenças na constituição e concentração dos óleos essenciais influenciam diretamente na atividade antimicrobiana do óleo essencial, a ação dos monoterpenos tem sido explicada pelo efeito tóxico na função e estrutura da membrana celular, devido às características lipofílicas, os monoterpenos preferencialmente, tendem a se deslocar da fase aquosa em direção as estruturas da membrana, o que resulta na sua expansão, aumento da fluidez e permeabilidade, desordenando as proteínas embebidas da membrana, alterando o processo de transporte de íons e inibindo a respiração celular, assim danos causados na estrutura da membrana citoplasmática acarretam o comprometimento das funções, como local de ação enzimática, barreira seletiva e geração de energia (VALERIANO et al., 2012, ROCHA et al., 2014).

Os óleos essenciais proporcionam a inibição do crescimento micelial, e interferem na produção e germinação de conídios, variando de acordo com a composição e dosagem do óleo utilizado, a inibição da germinação conidial é fundamental no controle das doenças, pois normalmente é o ponto inicial da infecção propriamente dita, para a ação efetiva dos óleos essenciais ser bem sucedida além de inibir o crescimento micelial do

patógeno, também se faz necessário inibir a germinação de seus conídios (MACHADO et al., 2013; AQUINO et al., 2014).

Além do potencial da ação fungitóxica direta, com a inibição o crescimento micelial e a germinação de esporos, os óleos essenciais tem demonstrado potencial no controle de fungos pela indução de fitoalexinas. As fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, de baixo peso molecular, produzidos pelas plantas em resposta a situações de estresse, com o intuito de impedir a atividade de patógenos, o modo de ação dessas substâncias em relação aos fungos ocorre com a granulação do citoplasma, desorganização dos conteúdos celulares, rompimento da membrana plasmática e inibição das enzimas fúngicas (PEREIRA et al., 2006; HILLEN et al., 2012; SARMENTO-BRUM et al., 2013).

3.4 CAPIM-LIMÃO [*Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steudel) Watson]

O *Cymbopogon flexuosus* (Figura 04), da família *Poaceae*, conhecido popularmente como capim-limão ou capim-limão da Índia Oriental, é uma espécie produtora de óleo essencial, originária da Índia, sua essência é o *lemongrass*, amplamente utilizada nas indústrias farmacêuticas, aromáticas e de perfumaria. O *lemongrass* apresenta atividade analgésica, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, sedativas, digestiva, antirreumáticas, calmantes, antifebris, antiespasmódica, antimicrobiana e repelente de insetos (PANDEY et al., 2003; MAY et al., 2008; ADINARAYANA et al., 2012).

A espécie *Cymbopogon flexuosus* nos meses de inverno, com as condições climáticas do Brasil apresentam florescimento intenso (MAY et al.; 2008). Segundo Lorenzi (2008), no óleo essencial do *Cymbopogon flexuosus* encontram-se os mesmos componentes do extraído do *Cymbopogon citratus*, porém apresenta um porte maior, capaz de produzir três vezes mais volume de massa numa mesma área, característica essa importante preferência dos produtores.



Figura 05: Capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*)
Fonte: ICAR, 2017.

O óleo essencial do *C. flexuosus* é empregado como aromatizante de ambiente e, principalmente, como material de partida para síntese da Vitamina A, Beta-ionona e Betacaroteno. Tem se mostrando promissor no tratamento de células cancerígenas, provocando a inviabilidade tumoral da célula, também se mostra um fungicida superior se comparado com os sintéticos e não são fitotóxicos na natureza (DESAI e PARIKH, 2012).

Cerca de 22 espécies microbianas e fúngicas já apresentaram comprovada sensibilidade ao óleo de capim-limão, tendo o desenvolvimento comprometido quando submetidos à aplicação do óleo, situação já observada também com insetos. A atividade antimicrobiana do óleo de capim-limão reside, conforme sugerem os estudos já realizados, principalmente nas estruturas neral e geranial (CARVALHO et al., 2005).

O principal componente do óleo essencial é o citral (Figura 05), uma mistura dos isômeros β -citral (neral) e α -citral (geranial), ácidos monoterpênóides acíclicos os quais totalizam cerca de 70 a 85% da composição do óleo (SCHUCK et al., 2001; PANDEY et al., 2003).

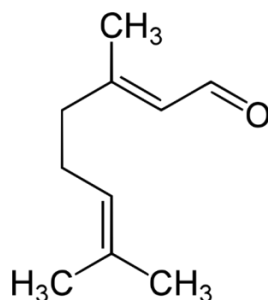


Figura 6: Fórmula estrutural do citral.

Fonte: KFDA, 2017.

Devido ao seu aroma característico de limão, o citral é bastante utilizado na alimentação, indústria, na fabricação de produtos de perfumaria, cosméticos e farmacêuticos, sua formulação sintética derivada da terebintina de coníferas é normalmente utilizado para esses fins. O citral apresenta atividade antifúngica contra patógenos que acometem humanos e vegetais, inibe a germinação de sementes, apresenta ação bactericida e propriedades inseticidas (LEWINSOHN et al., 1998; KOSHIMA et al., 2006; SADDIQ e KHAYYAT, 2010).

3.5 CONTROLE DE FUNGOS POR MEIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Existem em torno de 3.000 tipos de óleos essenciais conhecidos, desses, 300 apresentam importância comercial (BAKKALI et al. 2008). No ponto de vista biológico, os óleos essenciais, devido à sua característica volátil, para os vegetais atuam como sinais de comunicação química e funciona como arma de defesa contra os animais. Tais características tornam as plantas produtoras de óleos essenciais, poderosas fontes de agentes biocidas, sendo amplamente estudadas na agricultura por apresentarem atividades fungicidas, bactericidas e inseticidas (PEREIRA, 2006).

Muitos estudos como de Baratta et al. (1998), Shin (2003), Pandey et al. (2003), Pereira et al. (2006), Rasooli et al. (2008), Ozöcan e Chalchat (2008), Moghtader et al. (2011), Valeriano et al. (2012), vêm sendo desenvolvidos para avaliar a ação antimicrobiana de óleos essenciais, e os resultados alcançados nessa linha de pesquisa têm-se mostrado promissores, porém a atividade dos óleos depende do tipo de micro-organismo, do tipo do óleo e de sua concentração. Existem relatos da atividade direta de

extratos de plantas e óleos essenciais sobre insetos, fungos, bactérias, e efeito alelopáticos (GONÇALVES, 2012; OOTANI et al. 2013). Segundo OOTANI et al. (2013) a interação química entre as plantas, o que pode causar aumento ou inibição do crescimento, tem sido chamado de alelopatia.

Em relação à ação antifúngica de óleos essenciais, trabalho como de Shahi et al. (2003), Sarma et al. (2004), atestaram os efeitos fungicidas de óleos essenciais, assim como Romero et al. (2009) atribuíram a ação antifúngica do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) sobre fungos devido a capacidade de causarem danos a membrana citoplasmática. Nos estudos realizados por Juven et al. (1994) e Rao et al. (2010), foi atribuída a ação antifúngica de óleos essenciais com a capacidade de troca entre os íons intra e extracelulares dos fungos, assim afetando a permeabilidade da membrana e provocando o extravasamento celular.

A utilização de óleos essenciais na agricultura foi estudada por Ootani et al. (2013), onde os óleos essenciais se apresentam como alternativas para o controle de agentes fitopatogênicos e pragas agrícolas, substituindo produtos químicos, são substâncias com propriedades antifúngicas, com baixo ou quase nenhum poder residual, diminuindo os impactos ambientais. Salgado et al. (2003), avaliaram a atividade fungitóxica de óleos essenciais de eucaliptos (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *E. citriodora* Hook. e *E. urophylla* Blake) sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*, foi observado inibições significativas no crescimento micelial das espécies fúngicas.

O estudo desenvolvido por Sousa et al. (2012), que avaliaram o efeito de óleos essenciais de eucalipto (*Eucalyptus spp*), copaíba (*Copaifera sp.*), andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), babaçu (*Orbignya phalerata*, Mart.), coco (*Cocos nucifera*), nem (*Azadirachta indica*), semente de uva (*Vitis vinifera* L.), amêndoa (*Prunus amygdalus* Batsch), hortelã (*Mentha sp*) e pau rosa (*Aniba rosaeodora*), em diferentes concentrações sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro* e em frutos de pimenta em pós colheita, no experimento *in vitro* todos os óleos, com exceção dos óleos de babaçu, semente de uva e amêndoa, inibiram o crescimento do fungo, no resultado obtido em pós-colheita apenas o óleo de babaçu não foi eficiente em reduzir o desenvolvimento da lesão de antracnose.

O trabalho realizado por Geromini et al. (2012), que avaliaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira-brasileira (*Lippia alba*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) sobre *Candida albicans*, como resultados obtiveram que os óleos essenciais, principalmente de *L. alba* e *O. gratissimum*, demonstraram alto potencial inibitório sobre o crescimento do micro-organismo avaliado. Assim como o estudo de Deus et al. (2009), que avaliaram a atividade fungitóxica *in vitro* do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne), sobre cinco espécies do gênero *Aspergillus* e três espécies de *Candida*, os resultados mostraram que o óleo essencial foi altamente efetivo contra a *Candida parapsolosis*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus tamaritii*, demonstrando o potencial fungicida dos óleos essenciais.

Ação fungitóxica do óleo essencial de cipó vick ou cipó-carimbó (*Tanaecium nocturnum*) sobre o *Aspergillus flavus* foi avaliada por Pimentel et al. (2010), como resultados obtiveram que em determinadas dosagens ocorre a inibição total do crescimento micelial do fungo e inibição da esporulação. A avaliação do potencial fungitóxico do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), foi realizada por Santos et al. (2007), sobre os fungos *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* e concluíram que o óleo essencial provoca alteração do crescimento micelial dos fungos e em determinadas doses provoca inibição total dos fungos. No estudo de Guimarães et al. (2011), que avaliaram os efeitos fungitóxicos do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e do seu constituinte majoritário citral sobre a inibição micelial do *Fusarium oxysporum cubense*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Bipolaris sp.* e *Alternaria alternata*, todos os micro-organismos testados tiveram seu crescimento micelial inibido pelo óleo essencial de capim-limão e pelo citral, e o citral provocou maior inibição do crescimento fúngico, demonstrando maior eficiência no controle fúngico.

4. METODOLOGIA

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Biotecnologia e de Pós-colheita e Pré-Processamento de Produtos Agrícolas, na Escola de Engenharia Industrial Metalúrgica de Volta Redonda, *campus* da Universidade Federal Fluminense.

4.1 ANÁLISES DOS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) foi adquirido da empresa Ferquima[®] (Ind. e Com. Ltda).

A análise dos constituintes do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/EM). A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo capilar de sílica fundida com fase estacionária DB-5 (0,25 µm de espessura, 30 m comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno). Foi utilizado hélio como gás carreador a um fluxo de 1,0 mL/minuto. A temperatura no injetor foi de 220°C e 240°C no detector. A temperatura inicial do forno foi mantida a 60°C por dois minutos, sendo programada para ter acréscimos de 3°C a cada minuto até atingir a temperatura máxima de 240°C, na qual foi mantida por mais 30 minutos fornecendo um tempo total de análise de 91 minutos. A razão de split utilizada foi de 1:20 e o tempo de corte do solvente de 5 minutos. O volume da amostra injetado foi 1 µL, na concentração de 10.000 ppm, utilizando como solvente o hexano.

A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massas obtidos com os do banco de dados do aparelho e pelo Índice de Retenção de Kovats (IK) de cada componente (LANÇAS, 1993). A análise quantitativa dos principais componentes do óleo essencial, expressa em porcentagem, foi realizada pelo método de normalização de integração de área dos picos, conforme descrito por Zhang et al. (2006).

4.2 CRESCIMENTO FÚNGICO

Os fungos utilizados neste trabalho foram, *Aspergillus brasiliensis* (Nº CCCD AA002) foi obtido na empresa Didática sp.[®] (Ind. e Com. Ltda), *Aspergillus flavus* (Nº

de acesso da linhagem IOC 4102) foi obtida por meio de doação da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ).

O crescimento dos fungos foi realizado em meio BDA (batata, dextrose e ágar) em placas de Petri a 30°C durante sete dias. Para o preparo de 1L do meio foi utilizado 225 g de batatas, 20 g de dextrose e 17 g Agar. As batatas foram cozidas em 1000 mL de água, do caldo obtido foram utilizados 600 mL para misturar com a dextrose e o Agar, completado com 400 mL de água, após homogeneização, o meio foi fervido por 1 minutos, e autoclavado por 15 minutos à 121°C. Após crescimento micelial, retirou-se um disco de BDA com aproximadamente 7 mm de diâmetro contendo os micélios de cada fungo. O mesmo foi transferido para outra placa de Petri contendo BDA, sendo incubado novamente nas mesmas condições descritas anteriormente.

Para realizar a coleta dos esporos foram adicionados 15 mL de água destilada estéril sobre placa de Petri que continha meio BDA e a colônia do fungo crescido. Os conídios foram coletados com auxílio de pipeta. A suspensão de esporos foi ajustada com água destilada estéril, para se obter a concentração final de $4,5 \times 10^6$ esporos. mL⁻¹ com o uso da câmara de Neubauer. A suspensão foi armazenada a 4 °C até ser utilizada.

4.3 ENSAIO ANTIFÚNGICO *IN VITRO*

No ensaio antifúngico *in vitro* foram testadas as seguintes doses do óleo essencial de capim-limão: 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4 e 12,8 µL/mL; s escolhidas a partir de trabalhos realizados anteriormente no Laboratório de Pós colheita.

Para facilitar a dispersão do óleo essencial através do meio de cultura, utilizou-se o surfactante DMSO (dimetilsulfóxido) a 1%.

Nas testemunhas, doses zero, sem óleo essencial, foram realizados dois controles: o primeiro com o crescimento do fungo somente no meio BDA e o segundo controle com o desenvolvimento do fungo em meio BDA acrescido pelo DMSO com o objetivo de avaliar a influência do surfactante sobre o crescimento dos fungos.

Foram adicionados ao meio BDA fundido (45°C), uma solução de óleo essencial, DMSO 1% a fim de se obter a concentração desejada. Após homogeneização, o meio foi vertido para placas de Petri e estas incubadas com um disco micelial de 7 mm foi retirado de uma colônia crescida em BDA de cada fungo em estudo. As placas de

controle, sem óleo essencial, foram inoculadas seguindo o mesmo procedimento. Em seguida todas as placas foram incubadas a 30°C até a data em que o fungo tomasse toda a placa do controle, ou seja, entre 7 e 10 dias, sendo então finalizado o período de incubação. O diâmetro das colônias foi registrado diariamente por meio de um paquímetro digital. O tamanho da colônia de cada amostra teste foi comparado com a dimensão dos controles. Os resultados foram expressos em termos de tamanho do diâmetro do halo do crescimento microbiano. A porcentagem de inibição do número de colônias (PI) foi calculada conforme Billerbeck et al. (2001):

$$PI = \frac{\varnothing_0 - \varnothing_T}{\varnothing_0} 100 \quad (\text{Equação 01})$$

Sendo:

\varnothing_0 = diâmetro médio do micélio no controle;

\varnothing_T = diâmetro médio do micélio no tratamento.

Por meio dos resultados obtidos do teste com o óleo essencial, foi realizado teste *in vitro* com seu componente majoritário, o Citral, adquirido da empresa Sigma-Aldrich®. As doses testadas foram: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,6 µL/mL. A porcentagem de inibição foi determinada pela Equação 01.

4.4 MICRODILUIÇÃO EM MICROPLACA DE 96 POÇOS

A concentração mínima inibitória (CIM), do óleo essencial sobre os fungos em estudo, foi realizada através da microdiluição seriada em microplaca de 96 poços, as doses testadas foram definidas a partir dos resultados do teste *in vitro*, sendo avaliadas as doses de: 1,0; 1,2; 1,4; 1,6 e 1,8 µL/mL.

Para cada dose testada foram realizadas quatro repetições em meio BD (batata e dextrose) 2x concentrado, solução com o óleo essencial, DMSO e suspensão de esporos (10⁷) e como controle o tratamento sem o óleo essencial. A microdiluição seriada em microplaca, foi realizada adicionando 75 µL de meio BD em cada poço, e na primeira

linha foi adicionado solução que continha a dosagem de óleo essencial a ser testada, DMSO e o volume de água destilada para completar 75 μL , foram realizadas diluições seriadas 4x com 75 μL da solução, desprezando 75 μL da última diluição, com o intuito que todos os poços contivessem o mesmo volume (75 μL), após a diluição seriada foram adicionado 75 μL da suspensão de esporos dos fungos analisados, e colocado em câmara B.O.D. à temperatura de 35°C por 72h.

Após o período de incubação a interpretação dos resultados foi realizada por análise visual. A concentração mínima inibitória (CIM) foi definida como a menor concentração de óleo essencial em que não ocorreu crescimento fúngico (PANDEY et al., 2003; DELLAVALLE et al., 2011).

4.5 ANÁLISE DO CONTROLE DE FUNGOS POR ÓLEO ESSENCIAL EM GRÃOS INFESTADOS

Os grãos de trigo utilizados foram fornecidos pela EMBRAPA Trigo/RS. A análise da eficácia do óleo essencial de capim-limão sobre o desenvolvimento dos fungos foi realizada baseada em três doses do óleo essencial as quais foram definidas de acordo com as que apresentaram maior porcentagem de inibição do crescimento micelial (PI) no teste *in vitro*, sendo: 0,6; 0,8 e 1,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ além do controle, o qual não continha tratamento com óleo essencial. Estas doses foram testadas em diferentes períodos de armazenamento (10, 20 e 30 dias) em ambiente controlado (30°C).

Em recipientes de vidro com volume de 1,4 L foram acondicionados 200 g de grãos de trigo os quais foram previamente esterilizados em autoclave a 120°C por 15 min. Posteriormente, para cada recipiente, foi inoculada 2 mL da suspensão de 10^7 esporos/mL da espécie de fungo correspondente. Os frascos foram mantidos a temperatura controlada (30°C) em câmara B.O.D. por 2 dias para promover o crescimento do fungo.

Após 48 h saches de papel filtro foram embebidos com as diferentes doses de óleo essencial. Os saches foram introduzidos nos recipientes contendo os grãos inoculados com os fungos, sendo cada espécie avaliada separadamente em diferentes recipientes. O tratamento controle não recebeu nenhuma dosagem de óleo essencial e foi analisado nos diferentes períodos conforme ocorreu com os tratamentos. Para cada dose

testada foram realizadas três repetições. Esses procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar.

Para cada dose testada foi adicionado o volume de óleo essencial equivalente no sachê:

- 0,6 µL/mL: 840 µL

- 0,8 µL/mL: 1120 µL

- 1,6 µL/mL: 2240 µL

A eficiência do óleo essencial foi analisada, realizando-se amostragens periódicas a cada 10 dias de cada tratamento. Foram quantificadas as UFCs (Unidades Formadoras de Colônia) sob efeitos de cada tratamento.

No final de cada período, 10 g de grãos, foram retiradas e diluídas em 90 mL de solução salina (NaCl 0,9%). Diluições seriadas de dez vezes (10^{-1} a 10^{-3}) foram preparadas desta solução. Meio mililitro de cada diluição foi inoculado em placas de Petri com 20 mL de meio Ágar Sabouraud. As placas foram incubadas por 48 h a 30°C em câmara B.O.D. Placas contendo de 05 a 250 UFC foram contadas e a porcentagem de inibição do crescimento (PI) foi calculada conforme Tatsadjieu et al. (2010):

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

Sendo:

C_0 = número de colônias que não receberam tratamento;

C_T = número de colônias que receberam tratamento com óleo essencial.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis obtidas nos testes foram analisadas por meio do programa estatístico SISVAR[®], com análise de variância e comparação de médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância, em delineamento experimental inteiramente casualizado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO REALIZADO COM CAPIM LIMÃO

5.1.1. Identificação dos componentes químicos do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon flexuosus*)

A Figura 07 apresenta o cromatograma obtido na identificação dos principais componentes do óleo essencial de capim limão (*C. flexuosus*):

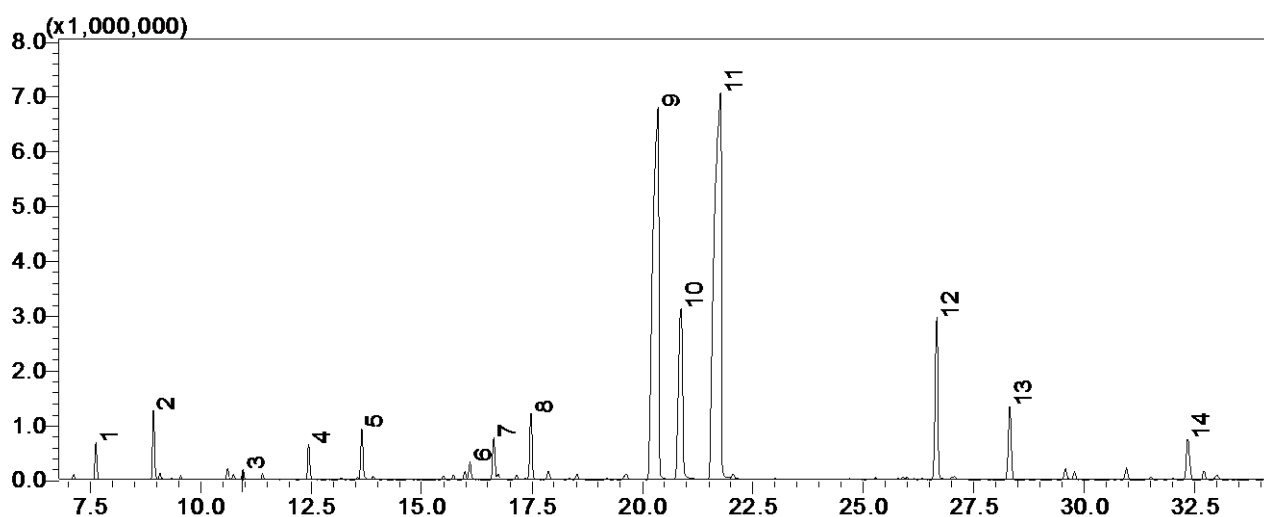


Figura 07: Cromatograma do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) utilizado no experimento.

A Tabela 01 apresenta o tempo médio de retenção e o índice de Kovats dos componentes identificados pelo cromatograma apresentado na Figura 01.

Tabela 01: Principais componentes do óleo essencial capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) determinados por CG-EM.

Pico	Componente	Tempo de Retenção* (min)	Presente trabalho	Índice de Kovats	
				Adams (1995)	Outros autores
02	6-metil-5-hepten-2-ona	8,927	994	992	
05	Linalol	13,647	1093	1098	
06	Citronelal	16,097	1150	1153	
09	Neral	20,353	1245	1244	
10	Geraniol	20,873	1257	1257	
11	Geranial	21,768	1272	1270	
12	Acetato de Geranila	26,664	1388	1383	
13	Cariofileno	28,315	1430	-	1428 ⁽¹⁾

*Coluna DB-5. ⁽¹⁾ CHOI, 2003.

Observa-se pela Figura 07 em conjunto com a Tabela 01, que o principal componente do óleo essencial de capim limão utilizado neste trabalho é o citral, mistura do neral e geranial. A concentração de citral foi quantificada em 72% da composição do óleo, sendo 40% geranial e 32% neral. O citral tem sido identificado como principal componente de algumas plantas como a *Lippia alba* (BARBOSA et. al., 2006), a *Pectis brevipedunculata* (OLIVEIRA et al., 2011) e o *Cymbopogon citratus* (MARTINAZZO et al., 2013).

A Tabela 02 apresenta a identificação dos principais componentes do óleo essencial de capim-limão utilizado neste trabalho em comparação com outros publicados, verificando-se similaridades e certas diferenças entre os principais componentes identificados. Autores como Lorenzi (2008), Simões e Spitzer (2003) afirmam que a composição dos óleos essenciais de uma mesma espécie pode variar segundo as influências externas, condições climáticas e sazonalidades durante seu cultivo.

Tabela 02. Comparação dos principais componentes do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon flexuosus*), identificados no presente trabalho, em relação a artigos publicados.

Componente	Presente Trabalho	Kumar et al. (2009)	Adinarayana et al. (2012)	Silva et al. (2015)	Azevedo et al. (2016)
6-metil-5-hepten-2-ona	x	x	x		x
Linalol	x	x		x	x
Citronelal	x			x	
Neral	x	x		x	x
Geraniol	x	x	x	x	x
Geranial	x			x	x
Acetato de Geranila	x			x	
Cariofileno	x				x

5.1.2 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) sobre o *Aspergillus brasiliensis*

Para todos os testes *in vitro* realizados o controle utilizado foi o zero sem DMSO, devido ao fato que nos testes preliminares o DMSO demonstrou não influenciar no crescimento fúngico.

A Figura 08 apresenta o efeito inibitório obtido com o óleo essencial de capim-limão no crescimento micelial do fungo *A. brasiliensis*, nas diferentes doses testadas durante o período de incubação.

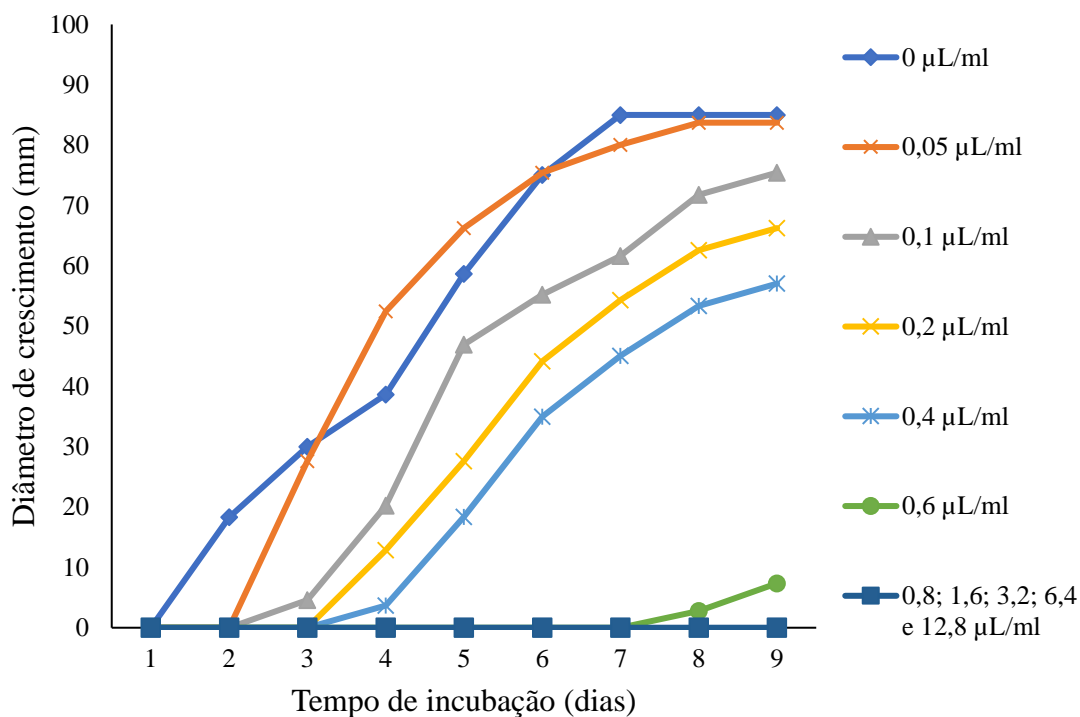


Figura 8: Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) no crescimento do fungo *Aspergillus brasiliensis*.

Observa-se pela Figura 08 que para as doses de óleo essencial de 0,05 e 0,4 µL/mL o diâmetro do crescimento fúngico variou entre 84 e 57 mm durante o período de incubação. Na dose de 0,6 µL/mL houve crescimento de 7 mm de diâmetro do fungo a partir do sétimo dia. Para as demais doses o crescimento radial do fungo foi totalmente

inibido. É válido ressaltar que o final do período de incubação foi determinado no momento em que o crescimento micelial nos tratamentos testemunhas (dose zero) atingiu toda a placa de Petri, a qual possuía diâmetro de 92 mm.

Para avaliar o efeito das doses testadas, calculou-se a Porcentagem de Inibição (Equação 01) de cada dose sobre o fungo em estudo e procedeu-se a análise estatística conforme descrito a seguir:

O Quadro 01 apresenta o resumo da análise de variância do efeito do óleo essencial de capim-limão e do tempo de incubação no crescimento micelial do fungo *A. brasiliensis*.

Quadro 01. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do óleo essencial de capim limão (*C. flexuosus*), durante o período de incubação (dias) sobre o crescimento micelial do fungo *A. brasiliensis*.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Dose de óleo essencial (D)	9	2,13	*
Tempo de Incubação (t)	8	0,052	*
D x t	72	0,013	*
Erro	356	0,0051	
Total	449		
CV = 8,44%			

* Significativo a 5% de significância pelo teste F.

O Quadro 01 mostra que houve efeito significativo das diferentes doses de óleo essencial de capim-limão, para o tempo de incubação, assim como para a interação (D x t), indicando que a inibição do crescimento do fungo *A. brasiliensis*, com o óleo essencial de capim-limão, depende da interação entre a dose do óleo aplicada e o tempo de incubação do fungo. Desta forma, procedeu-se o desdobramento da interação para estudar o comportamento do controle micro-organismo dentro de cada fator estudado, conforme descrito na Tabela 03.

Ainda pelo Quadro 01, observa-se o baixo valor do coeficiente de variação (CV), de 8,44% o qual fornece uma informação sobre a precisão do experimento, de acordo com

Pimentel-Gomes (1987), quanto menor o coeficiente de variação maior é a precisão experimental dos resultados. Poderá ser observado ao longo da apresentação dos resultados que, em todas as análises de variância obtidas, o valor CV foi baixo.

Tabela 03: Porcentagem média de inibição, *in vitro*, do crescimento micelial do fungo *Aspergillus brasiliensis* para diferentes dosagens ($\mu\text{L}/\text{mL}$) do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) durante o período de incubação

Dose de óleo essencial l ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Porcentagem de inibição do crescimento micelial*								
	Período de incubação (dias)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,05	100aA	100aA	70bB	43cC	28dD	18dE	13dE	9dE	9cE
0,1	100aA	100aA	95aA	78bB	49cC	40cD	33cD	22dE	18cE
0,2	100aA	100aA	100aA	96aA	80bB	62bC	51bD	42bE	38bE
0,4	100aA	100aA	100aA	96aA	80bB	62bC	51bD	42bE	38bE
0,6	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	97aA	92aA
0,8	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA
1,6	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA
3,2	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA
6,4	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA
12,8	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA

*Letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott com nível de significância de 5%.

Pela Tabela 03 observa-se que nas primeiras 48 horas todas as doses tiveram controle no crescimento, a partir de 72 h a dose de 0,05 $\mu\text{L}/\text{mL}$ difere estatisticamente das demais, ocorrendo sucessivamente ao longo dos dias com as doses de 0,1; 0,2 e 0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Somente as doses de 0,6 a 12,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ mantiveram, sem diferença estatística significativa, o controle do crescimento micelial do fungo, ao longo dos nove dias de observação.

A Figura 09 ressalta a porcentagem de inibição obtida ao final do período de incubação do fungo *A. brasiliensis* com a aplicação de diferentes doses de óleo essencial de capim limão. Observa-se que a partir da dose de 0,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ não houve diferença estatística entre as concentrações testadas na porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo, conforme apresentando na Tabela 03.

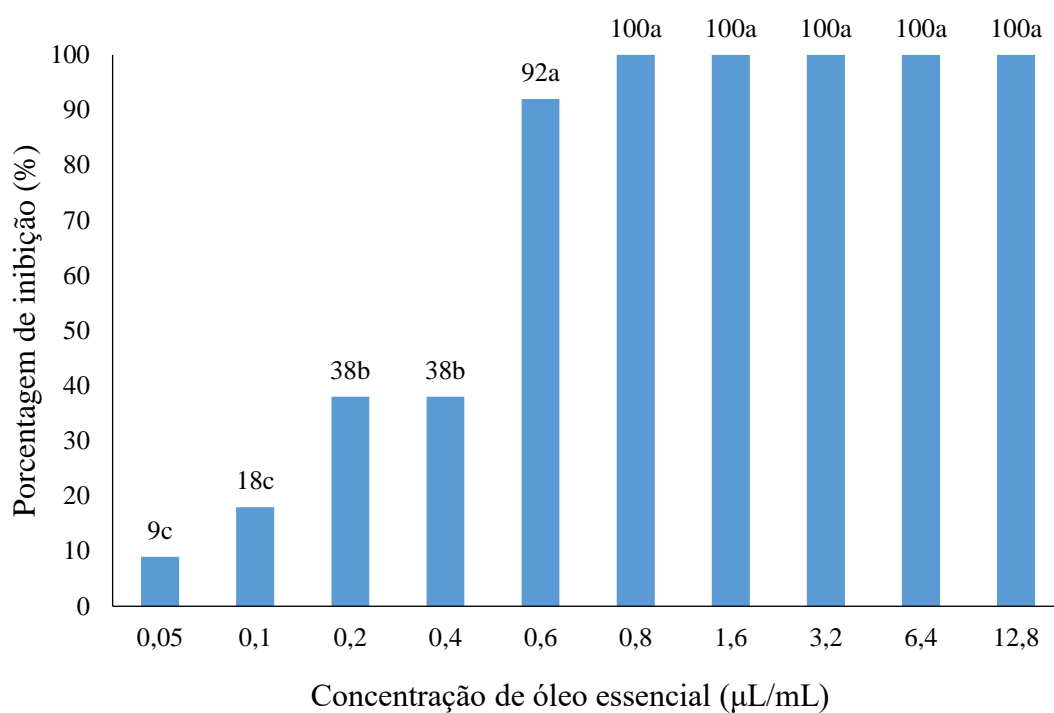


Figura 09: Efeito de diferentes doses do óleo essencial de capim-limão (*C. flexuosus*) na inibição do desenvolvimento micelial do fungo *A. brasiliensis* no nono dia de incubação. *As médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

5.1.3 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de capim-limão (*C. flexuosus*) sobre o fungo *Aspergillus flavus*

A Figura 10 apresenta o efeito inibitório obtido com o óleo essencial de capim-limão no crescimento micelial do fungo *A. flavus*, nas doses testadas durante o período de incubação.

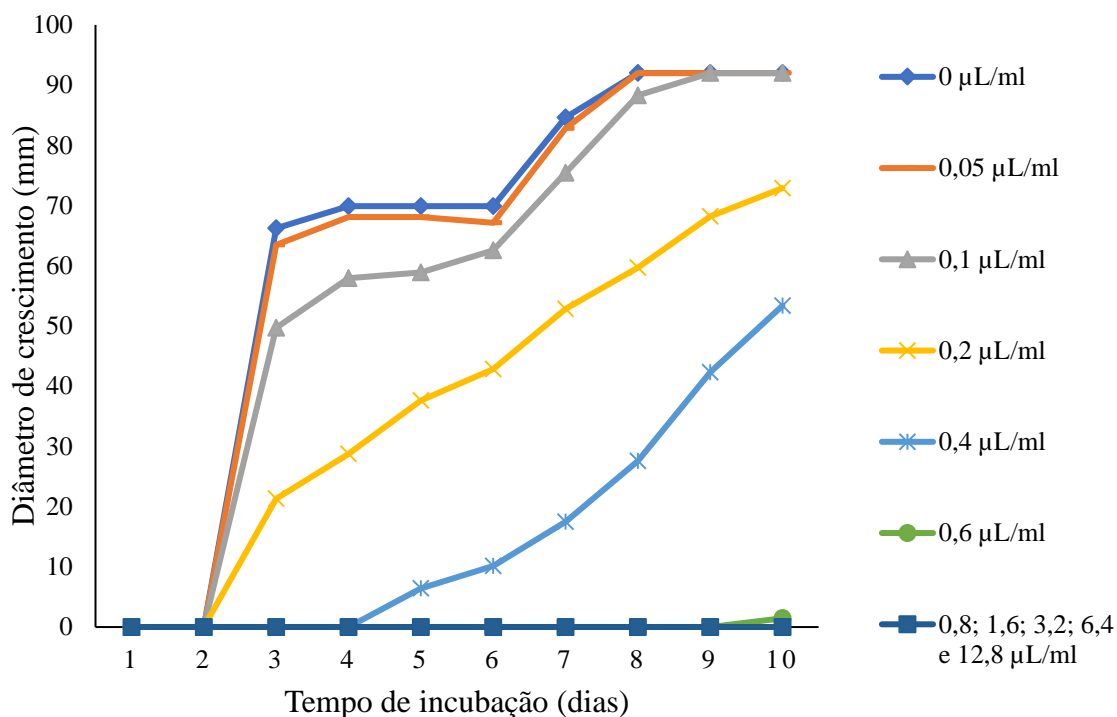


Figura 10: Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de capim-limão (*C. flexuosus*) no crescimento do fungo *Aspergillus flavus*.

Observa-se pela Figura 10 que o período de incubação do *A. flavus* foi de 10 dias, diferente do *A. brasiliensis* o qual foi de nove dias, o que ocorre devido a diferença das características de cada espécie.

Verificou-se que o *A. flavus* se desenvolveu entre as doses de 0,05 e 0,6 µL/mL. Para as doses de 0,4 µL/mL abaixo, diâmetro de crescimento do halo fúngico variou entre 53 e 92 mm, a dose de 0,6 µL/mL apresentou crescimento de 2 mm, observado a partir do penúltimo dia de incubação. Somente as doses acima de 0,8 µL/mL não apresentaram crescimento micelial do fungo, com resultados próximos aos obtidos para o *A. brasiliensis*.

Tais resultados diferiram do encontrado por Sarma et al. (2004) que testaram a atividade fungicida do óleo essencial de *C. flexuosus* sobre espécie *Aspergillus niger*, nas doses de 10, 20 e 30 µL/mL, para as quais houve crescimento fúngico com 72 h de incubação, acredita-se que a diferença entre os valores obtidos e a dos referidos autores além da diferença da espécie fungica, seja devido a quantidade de citral presente nos óleos essenciais utilizados, sendo de 25,9% para os autores e de 72% para este trabalho, sendo

o componente o possível responsável pelo controle de fungo com menores doses de óleo essencial.

Assim como realizado anteriormente, para avaliar o efeito das doses testadas, calculou-se a Porcentagem de Inibição de cada dose sobre o fungo em estudo e procedeu-se a análise estatística conforme descrito a seguir.

Quadro 02. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do óleo essencial de capim limão (*C. flexuosus*), durante o período de incubação (dias) sobre o crescimento micelial do fungo *A. flavus*.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Dose de óleo essencial (D)	9	5,26	*
Tempo de Incubação (t)	9	0,083	*
D x t	81	0,018	*
Erro	396	0,0025	
Total	404		
CV = 6,55%			

* Significativo a 5% de significância pelo teste F.

O Quadro 02 mostra que houve efeito significativo das diferentes doses de óleo essencial de capim-limão, para o tempo de incubação, assim como para a interação entre (D x t), indicando que a inibição do crescimento do fungo *A. flavus*, com o óleo essencial de capim-limão, depende da interação entre a dose do óleo e o tempo de incubação, assim como ocorreu para o controle do *A. brasiliensis*. Desta forma, procedeu-se o desdobramento da interação para estudar o comportamento do controle do fungo dentro de cada fator, conforme descrito a seguir.

A porcentagem de inibição do óleo essencial de capim limão, sobre o crescimento micelial do *A. flavus* está apresentado na Tabela 04.

Tabela 04. Porcentagem média de inibição, *in vitro*, do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* para diferentes dosagens ($\mu\text{L}/\text{mL}$) do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) durante o período de incubação.

Dose de óleo essencial ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Porcentagem de Inibição do crescimento micelial*									
	Período de incubação (dias)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,05	100aA	100aA	28cB	24cB	24cB	24dB	8dC	0cD	0cD	0cD
0,1	100aA	100aA	31cB	26cB	26cB	27dB	10dC	0cD	0cD	0cD
0,2	100aA	100aA	46bB	37bC	36bC	32cC	18cD	4cE	0cE	0cE
0,4	100aA	100aA	100aA	100aA	93aB	89bB	81bC	70bD	54bE	42bF
0,6	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	98aA
0,8	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA
1,6	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA
3,2	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA
6,4	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA
12,8	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA

*Letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não se diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott com nível de significância de 5%.

Pela Tabela 04 observa-se que nas primeiras 48 horas todas as doses tiveram controle no crescimento do *A. flavus*, a partir do terceiro dia, as doses de 0,05 a 0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ apresentaram redução do percentual de inibição, assim como a dose 0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ a partir do sexto dia, o que demonstra que para o controle eficiente do fungo, doses acima desta devem ser aplicadas. Estatisticamente as doses de 0,6 a 12,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ controlaram o desenvolvimento fúngico, não apresentando diferença estatística significativa na porcentagem de inibição.

A Figura 11 ressalta a porcentagem de inibição obtida ao final do período de incubação.

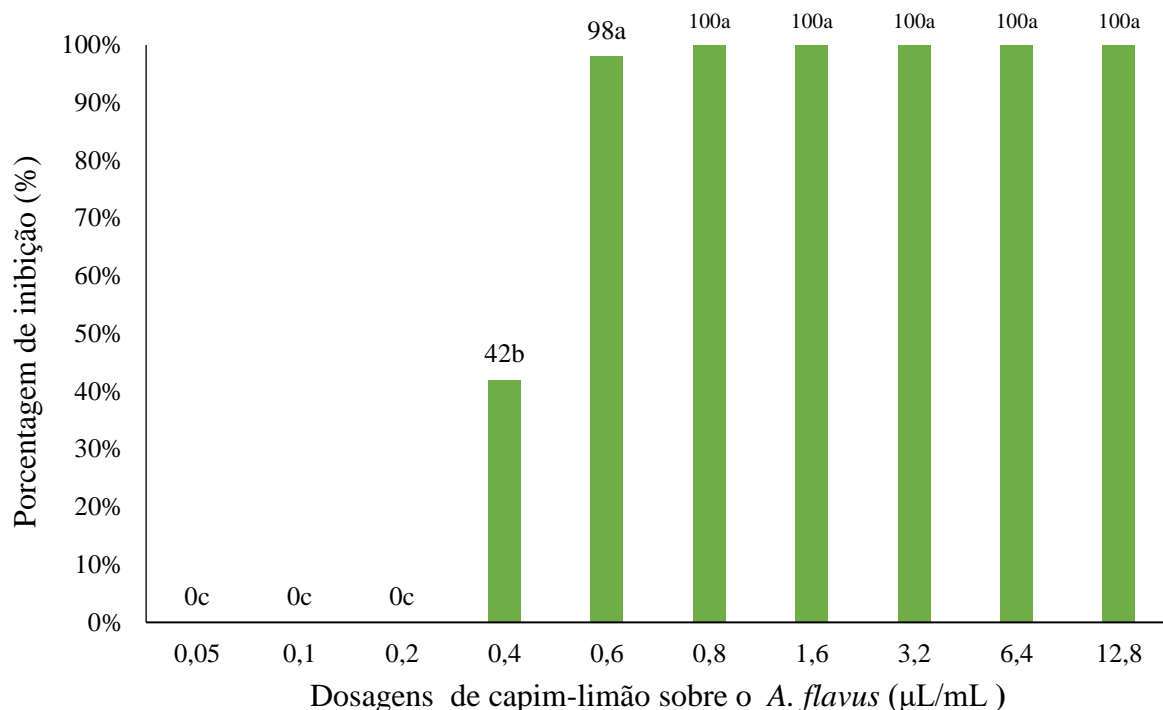


Figura 11. Porcentagem de inibição do efeito do óleo essencial de capim-limão (*C. flexuosus*) no desenvolvimento do fungo *A. flavus*.

*Letras iguais, minúsculas nas colunas, não se diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott com nível de significância de 5%.

A dose de 0,6 µL/mL a qual apresentou controle sobre os fungos em estudo, está próxima aos resultados obtidos por Shahi et al. (2003), os quais avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de capim-limão nas doses de 0,1 a 0,8 µL/mL sobre quatro espécies do gênero *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. parasiticus*) e observaram 100% de inibição no crescimento fúngico com sete dias de incubação a partir da dose de 0,4 µL/mL. Segundo os autores, o citral foi o principal componente identificado, com quantidade variando de 68 a 80% da composição do óleo essencial.

Estudos anteriores como de Misra e Dubey (1994), Baratta et al. (1998) e Chao et al. (2000) constataram a atividade fungitóxica do óleo essencial de *C. flexuosus* sobre alguns micro-organismos, entre eles, os fungos do gênero *Aspergillus*, conforme obtido no presente trabalho.

5.1.4 Análise da atividade antifúngica por microdiluição do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) sobre fungos do gênero *Aspergillus*

A microdiluição seriada em microplaca foi realizada com o intuito de identificar a concentração mínima inibitória (CIM) do crescimento fúngico. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 05. As doses testadas foram estipuladas a partir dos resultados alcançados nos testes *in vitro*.

Tabela 05: Indicação de crescimento fúngico* em microdiluição seriada de *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus flavus* para diferentes dosagens ($\mu\text{L}/\text{mL}$) do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon flexuosus*).

Dose de óleo essencial ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	Dose de óleo essencial ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	<i>Aspergillus flavus</i> .
1,8	-	-	0,45	+	+
1,6	-	-	0,4	+	+
1,4	-	-	0,35	+	+
1,2	-	-	0,3	+	+
1,0	-	-	0,25	+	+
0,9	-	+	0,22	+	+
0,8	-	+	0,2	+	+
0,7	+	+	0,17	+	+
0,6	+	+	0,15	+	+
0,5	+	+	0,12	+	+

*Sinal + indica crescimento fúngico e - não crescimento.

Os resultados demonstraram inibição do crescimento para os dois fungos avaliados, observou-se o *A. brasiliensis* mais suscetível ao controle pelo óleo essencial, por esta metodologia, com inibição a partir da dose de 0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ como ocorrido no teste *in vitro*. A dose de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ foi a que inibiu totalmente as duas espécies, sendo considerada a CIM para controle das mesmas, valor este próximo ao obtido no teste *in vitro*, considerando-se que as diferenças entre doses são mínimas.

Resultados superiores da CIM para fungos do gênero *Aspergillus* foram encontrados por Kumar et al. (2009) na avaliação do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* e seus componentes como antifúngico e inibidor da produção de aflatoxinas, os quais encontraram as concentrações mínimas inibitórias de 1,2; 1,3 e 1,9 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para as

espécies *A. fumigatu*, *A. terreus* e *A. niger*, respectivamente. O citral foi quantificado em 63,17%, estando abaixo do valor deste trabalho, o que pode ter sido uma das causas da necessidade de doses maiores de óleo essencial para inibição dos fungos, além da especificidade de cada espécie.

Tendo em vista o óleo essencial de *C. flexuosus* ter mostrado atividade antifúngica em relação ao *A. brasiliensis* e o *A. flavus* e seu componente majoritário ser o citral, o qual corresponde a 72% da sua composição, realizou-se o estudo *in vitro* com citral para verificar se o controle do fungo se dá por meio deste componente, conforme descrito a seguir.

5.1.5 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do citral sobre o fungo *Aspergillus brasiliensis*

A Figura 12 apresenta o efeito inibitório obtido com o citral no crescimento micelial do fungo *A. brasiliensis*, nas diferentes doses testadas durante o período de incubação, o qual foi de sete dias.

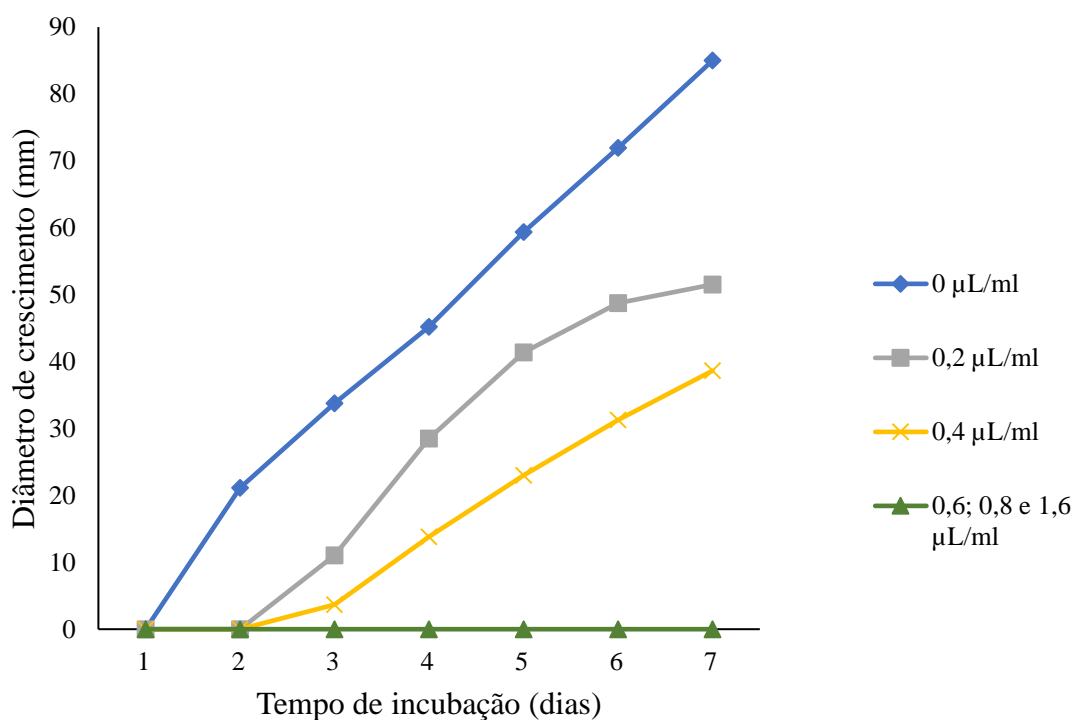


Figura 12: Efeito de diferentes doses de citral no crescimento do fungo *Aspergillus brasiliensis*.

A Figura 12 mostra que para as dosagens testadas a partir de 0,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ não houve crescimento do fungo, assim como ocorreu no teste *in vitro*, o que evidencia a eficácia do citral como componente antifúngico sobre o *A. brasiliensis*. Observou-se desenvolvimento do micro-organismo nas doses inferiores, 0,2 e 0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para as quais a média do diâmetro de crescimento foi de 52 e 39 mm, respectivamente.

O Quadro 03 apresenta o resumo da análise de variância do efeito do citral e do tempo de incubação no crescimento micelial do fungo *A. brasiliensis*.

Quadro 03. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do citral, durante o período de incubação (dias) sobre o crescimento micelial do fungo *A. brasiliensis*.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Dose de citral (D)	4	0,58	*
Tempo de Incubação (t)	6	0,166	*
D x t	24	0,066	*
Erro	136	0,007	
Total	209		
CV = 9,27%			

* Significativo a 5% de significância teste F.

O Quadro 03 mostra que houve efeito significativo das diferentes doses de citral, para o tempo de incubação, assim como para a interação (D x t), indicando que a inibição do crescimento do fungo *A. brasiliensis* com o citral, depende da interação entre a dose do óleo e o tempo de incubação, assim como ocorreu para o controle do *A. brasiliensis* no teste *in vitro*. O estudo do comportamento do controle do fungo dentro de cada fator está apresentado na Tabela 06.

Tabela 06. Porcentagem média de inibição, *in vitro*, do crescimento micelial do fungo *Aspergillus brasiliensis* para diferentes dosagens ($\mu\text{L}/\text{mL}$) de citral durante o período de incubação.

Dose de citral ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Inibição do crescimento micelial* em dias (%)						
	1	2	3	4	5	6	7
0,2	100aA	100aA	88bB	69cC	55cD	47cD	44cD
0,4	100aA	100aA	96aA	85bB	75bC	66bD	58bD
0,6	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA
0,8	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA
1,6	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA

*Letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não se diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott com nível de significância de 5%.

Os resultados apresentados na Tabela 06 demonstram a total inibição do crescimento fúngico com a aplicação do citral a partir da dose 0,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ em todo período de incubação, o que está de acordo com o observado no teste *in vitro* para o óleo essencial de capim limão.

Observa-se que a dose de 0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ apresentou diferença estatística das doses superiores somente a partir do quarto dia de incubação, quando então sua ação sobre o fungo começa a reduzir. A dose 0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ demonstrou controle apenas nas primeiras 24 horas.

5.1.6 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do citral sobre o *Aspergillus flavus*

Assim como realizado com o *A. brasiliensis*, realizou-se o teste *in vitro* com citral para verificar se o controle do fungo *A. flavus* se dá por meio deste componente. A Figura 13 apresenta o efeito inibitório obtido com o citral no crescimento micelial do fungo *A. flavus*, nas diferentes doses testadas no final do período de incubação, o qual foi de dez dias.

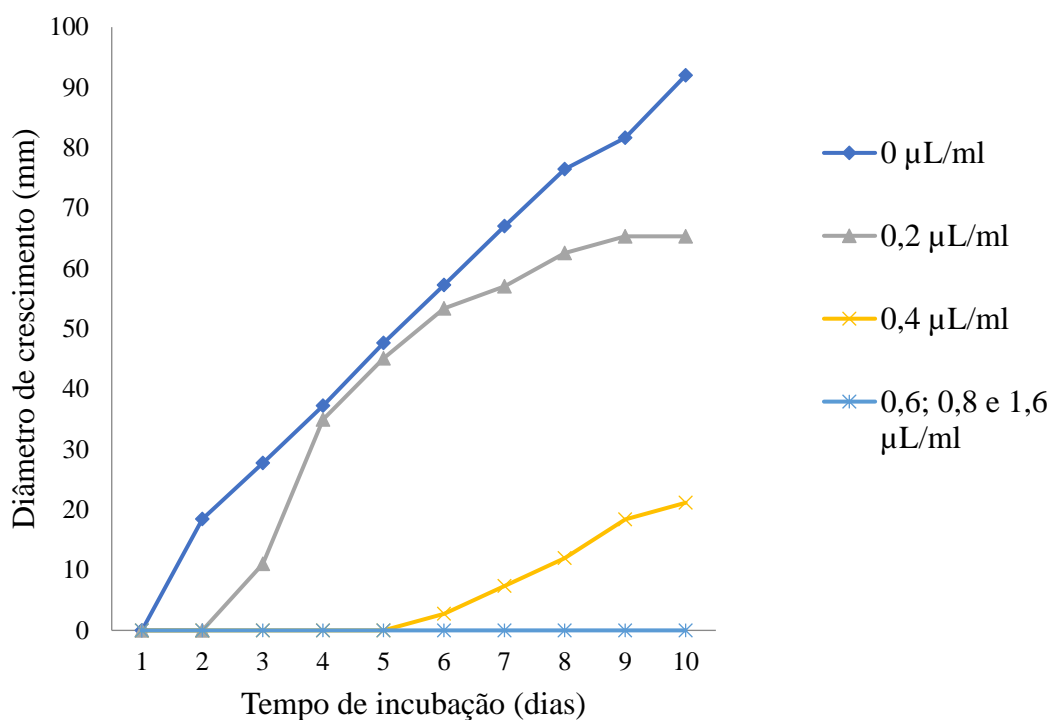


Figura 13: Efeito de diferentes doses de citral no crescimento do fungo *Aspergillus flavus*.

De acordo com a Figura 13 as doses a partir de 0,6 µL/mL não apresentaram crescimento fúngico por todo período de incubação, conforme resultados obtidos com o *A. brasiliensis*. A dose de 0,2 µL/mL não controlou o desenvolvimento do fungo apresentando no décimo dia de incubação, diâmetro de crescimento de 65 mm. Na dose 0,4 µL/mL o fungo começou a se desenvolver a partir do quinto dia de incubação e ao final apresentou 21 mm de crescimento.

O Quadro 04 apresenta o resumo da análise de variância do efeito do citral e do tempo de incubação no crescimento micelial do fungo *A. flavus*.

Quadro 04. Resumo da análise de variância dos dados obtidos do efeito do citral, durante o período de incubação (dias) sobre o crescimento micelial do fungo *A. flavus*.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Dose de citral (D)	4	1,69	*
Tempo de Incubação (t)	9	1,28	*
D x t	36	0,078	*
Erro	196	0,004	
Total	249		

CV = 7,12%

* Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Da mesma forma como ocorreu no controle do *A. brasiliensis*, o Quadro 04 mostra que houve efeito significativo das diferentes doses de citral, para o tempo de incubação, assim como para a interação (D x t), indicando que a inibição do crescimento do fungo *A. flavus*, com citral, depende da interação entre a dose do óleo e o tempo de incubação. A Tabela 07 apresenta a análise estatística relacionada à porcentagem de inibição do citral sobre o desenvolvimento do fungo.

Tabela 07. Porcentagem média de inibição, *in vitro*, do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* para diferentes dosagens ($\mu\text{L}/\text{mL}$) de citral durante o período de incubação.

Dose de citral ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Porcentagem de inibição do crescimento micelial*									
	Período de incubação (dias)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,2	100aA	100aA	88bB	62bC	51bD	42bE	38cE	32cF	29cF	29cF
0,4	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	97aA	92bA	87bB	80bC	77bC
0,6	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA
0,8	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA
1,6	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA	100aA

*Letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não se diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott com nível de significância de 5%.

Conforme a Tabela 07 as doses a partir de 0,6 µL/mL apresentaram controle total dos fungos nos dez dias de incubação. Resultados semelhantes foram obtidos por Luo et al. (2004) na análise do efeito do citral sobre o fungo *A. flavus*, os quais obtiveram como concentração mínima inibitória a dose de 0,5 µL/mL.

Ainda pela Tabela 07 observa-se que a dose de 0,4 µL/mL, apresentou diferença estatística das doses superiores somente a partir do oitavo dia de incubação, quando sua ação antifúngica se reduz. A dose 0,2 µL/mL demonstrou controle total apenas nos dois primeiros dias. Em seu trabalho, López-Malo et al. (2002), concluíram que a concentração inibitória mínima do citral para inibição do fungo *A. flavus* por sessenta dias seria de 1800 µL/mL, mesmo com a particularidade da espécie e da metodologia aplicada, tal resultado está bem acima dos encontrados neste trabalho considerando-se que a dose 0,6 µL/mL obteve 100% de inibição ao final de 10 dias.

Nos testes realizados com o citral tanto para *A. brasilienses* quanto para o *A. flavus* observou-se que nas primeiras 48 horas, todas as doses apresentaram 100% de inibição, resultados estes que estão próximos aos obtidos por Moleyar e Narasimham (1987) que avaliaram o potencial fungicida do citral sobre o fungo *A. niger* nas doses de 0,06; 0,12 e 0,24 µL/mL e obtiveram porcentagem de inibição de 83% para a dose 0,06 µL/mL e de 100% nas doses 0,12 e 0,24 µL/mL no mesmo período de observação.

Trabalhos como o de Stevens et al. (1971), Batt et al. (1983) e Moleyar e Narasimham (1987), Kakarla e Ganjewala (2009) comprovaram a ação antimicrobiana do citral, e relataram o potencial fungitóxico deste para o gênero *Aspergillus*, porém com dosagens mais elevadas em relação ao presente estudo.

Stevens et al. (1971) testaram a atividade microbiana do citral sobre alguns microorganismos, dentre eles os *A. oryzae* e *A. niger*, nas concentrações 125 e 500 µL/mL, no período de incubação de 96 h e observaram que a dose de 125 µL/mL apresentou ligeiro crescimento fúngico e a de 500 µL/mL inibição total.

Batt et al. (1983) verificaram o efeito do citral na dose de 3,7 µL/mL sobre o crescimento micelial do *A. parasiticus* e observaram que após cinco dias de incubação não houve crescimento micelial do fungo.

Kakarla e Ganjewala (2009) testaram a atividade fungitóxica do citral na concentração de 10 µL, sobre duas espécies do gênero *Aspergillus* e após 48 h de

incubação observaram que o componente apresentou porcentagem de inibição de 42% sobre o *A. fumigatus* e de 92% para o *A. flavus*.

Em seu estudo, Luo et al. (2004) verificaram que o citral lesionou a parede e a membrana dos esporos de *A. flavus*, alterando sua elasticidade. Após a penetração intracelular, o citral alterou a expressão gênica, reduplicação e morfologia mitocondrial, e também alterou a agregação de proteínas e macromoléculas. Assim constataram que células, organelas e macromoléculas tiveram suas estruturas e funções normais alteradas, desencadeando na perda da capacidade de germinação de esporos do fungo *A. flavus*, mostrando que o componente tem poder fungitóxico para o gênero *Aspergillus*.

5.1.7 Avaliação da eficácia do óleo essencial de capim-limão (*C. flexuosus*) no controle dos fungos *Aspergillus brasilienses* e *A. flavus* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados

Baseando-se nos melhores resultados encontrados anteriormente, foram realizados testes com o óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*, para verificar a eficácia do óleo no controle dos referidos fungos em grãos de trigo contaminados com os mesmos.

Ao final de cada período de armazenamento (10, 20 e 30 dias) foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia e determinada a porcentagem de inibição do crescimento fúngico nos grãos contaminados por meio da aplicação das melhores doses de controle obtidas (0,6, 0,8 e 1,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$)

As análises de variâncias obtidas para cada tempo de incubação nas diferentes doses avaliadas estão descritas em Anexo (Quadros 08 a 16). Em cada período avaliado, observou-se diferença significativa das doses, procedendo-se assim a comparação do percentual de inibição por meio do teste de médias, conforme apresentado nas Tabelas 08 e 09.

Tabela 08. Porcentagem média de inibição do crescimento do fungo *Aspergillus brasiliensis* em grãos de trigo (*T. aestivum*) para diferentes doses do óleo essencial de capim-limão (*C. flexuosus*) e períodos de armazenamento.

Dose de óleo essencial de <i>C. flexuosus</i> (µL/mL)	Porcentagem de inibição do crescimento fúngico durante o período de armazenamento (dias)		
	10	20	30
0,6	88,69 aA	83,51 aB	88,44 aA
0,8	88,11 aA	86,41 aA	96,82 bB
1,6	92,00 bA	92,28 bA	96,04 bB

*Letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não se diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott com nível de significância de 5%.

Tabela 09. Porcentagem média de inibição do crescimento do fungo *Aspergillus flavus* em grãos de trigo (*T. aestivum*) para diferentes doses do óleo essencial de capim-limão (*C. flexuosus*) e períodos de armazenamento.

Dose de óleo essencial de <i>C. flexuosus</i> (µL/mL)	Porcentagem de inibição do crescimento fúngico durante o período de armazenamento (dias)		
	10	20	30
0,6	91,78 aA	99,37 aB	99,25 aB
0,8	92,47 aA	98,90 aB	99,34 aB
1,6	87,98 bA	99,05 aB	99,34 aB

*Letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não se diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott com nível de significância de 5%.

Os resultados demonstraram porcentagem de inibição acima de 80% para os dois fungos em todos os tratamentos, sendo a maior inibição observada no *A. flavus*. Algumas variações foram encontradas com aumento ou diminuição do controle, porém os resultados evidenciaram o efeito antifúngico do óleo essencial nos grãos contaminados.

Por meio da Tabela 08 pode-se observar que aos 10 e 20 dias de armazenamento a porcentagem de inibição foi superior e na dose de 1,6 µL/mL a qual apresentou aumento no controle do *A. brasiliensis* ao longo do período, ao contrário das outras doses testadas que apresentaram variação na inibição.

Em relação ao *A. flavus* (Tabela 09) observou-se que em todas as doses testadas, ao final dos períodos 20 e 30 dias de armazenamento não houve diferença no percentual de inibição entre as doses de 0,8 e 1,6 µL/mL. A cada período avaliado, somente a dose de 1,6 µL/mL nos 10 dias de armazenagem apresentou diferença estatística das demais,

nos períodos de 20 e 30 dias não foi houve diferença estatística, indicando o mesmo percentual de inibição, em torno de 99%, em todas as doses, o que demonstra elevada atividade antifúngica do óleo no controle do fungo no grão.

O período de armazenamento de grãos em geral varia com a demanda de mercado, os resultados demonstraram, inicialmente, que a maior dose testada foi a que apresentou resultados mais consistentes no controle do crescimento fúngico em função do tempo de armazenagem para o fungo *A. brasiliensis*, no caso do fungo *A. flavus* se mostra eficiente na dose de 0,6 µL/mL. Segundo Isman (2006) pesquisas sobre a persistência destes compostos na proteção de sementes e grãos contra o ataque de pragas são de um modo geral, escassos, mas indicam que estes se degradam rapidamente.

Tatsadjieu et al. (2010) avaliaram a porcentagem de inibição do crescimento do *A. flavus* em grãos de milho com o uso de óleos essenciais (*O. Gratissimum*, *L. Rugosa* e *X. aethiopica*) e observaram que após duas semanas, a porcentagem de inibição foi de 93,1%, posteriormente, com seis semanas este percentual caiu para 34,6%, segundo os autores isto pode ser pelo fato de que, durante um período relativamente longo, o período de incubação alguns componentes voláteis dos óleos possam evaporar, diminuindo a sua concentração e controle sobre o micro-organismo.

No presente trabalho observa-se que a porcentagem de inibição manteve-se alta para todas as doses ao final de 30 dias, indicando que os componentes que constituem o óleo de *Cymbopogon flexuosus*, em sua maioria o citral (72%), tem maior efeito antifúngico por longos períodos em relação às espécies estudadas por Tatsadjieu et al. (2010).

O uso de óleos essenciais como controle do crescimento de fungos patogênicos em produtos agrícolas, como grãos e sementes, tem apresentado grande potencial a ser explorado no controle de pragas agrícolas, como uma alternativa barata e ecológica aos produtos sintéticos.

Morais et al. (2008) em seu estudo, indicaram a possibilidade dos óleos essenciais serem utilizados no tratamento de sementes de feijão cv. Carioquinha, após avaliarem o efeito do *Cymbopogon flexuosus* e *C. citratus*, na germinação e sanidade das sementes. Os autores observaram que o óleo essencial de *C. flexuosus* inibiu a incidência do fungo *Cladosporium* sp. e que o óleo de *C. citratus* mostrou-se eficaz na redução dos fungos

Aspergillus spp. e *Penicillium* spp, porém reduziu o percentual de germinação das sementes.

Gonçalves et al. (2009) concluíram que o óleo essencial de gengibre apresentou atividade positiva no controle de patógenos em grãos de soja, com redução da incidência de 75% de *Cladosporium* sp; *Rhizopus* sp. e *Fusarium* spp. quando comparados à testemunha

Ticiane (2013) avaliou os efeitos de óleos essenciais, dentre eles do *C. flexuosus*, no tratamento de sementes de trigo e observou que o óleo de capim-limão foi um dos mais eficientes na redução dos patógenos *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium* e *Dreschelera tritici* sem interferir no rendimento das sementes (kg/ha), causando, entretanto, redução no seu poder germinativo. Segundo o autor é possível levantar a hipótese de que a utilização de óleos essenciais torna-se uma alternativa viável para a agricultura futuramente, mas ainda é preciso estudos sobre os mesmos, pois existem poucos experimentos a campo e resultados na literatura.

6. CONCLUSÕES

O óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* apresentou efeito fungicida sobre os fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus flavus* nos testes *in vitro*, apresentando controle a partir da dose de 0,8 µL/mL.

O óleo essencial apresentou concentração inibitória mínima de 1,0 µL/mL para o *A. flavus* e 0,8 µL/mL para o *A. brasiliensis* de óleo essencial de *C. flexuosus*

O componente majoritário identificado no óleo essencial utilizado foi o citral, correspondendo a 72% da composição.

Os testes *in vitro* com o citral apresentaram efeito fungicida do componente sobre os fungos a partir da dose de 0,6 µL/mL.

O óleo essencial de *C. flexuosus* se mostrou eficiente no teste em grãos de trigos contaminados armazenados, mantendo a capacidade fungicida mesmo após 30 dias de incubação para ambos os fungos, variando a porcentagem de inibição de acordo com a espécie. Para melhor controle das espécies fúngicas em estudo, a dose de 1,6 µL/mL mostrou ser a mais indicada, quando a concentração de citral for igual a 72%.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADINARAYANA G.; RAHUL G.; RAVI KIRAN S.; SYAMSUNDAR K.V.; RAJESWARA RAO B.R. Evaluation of antimicrobial potential of field distilled and water-soluble Essential oils of *Cymbopogon flexuosus*. **Journal of Pharmacognosy**, v. 3, n. 2, p. 142-146, 2012.

ALVES, V.C.; CARDOSO FILHO, F.C.; PEREIRA, M.M.G.; COSTA, A.P.R.; MURATORI, M.C.S. Identificação de espécies de *Aspergillus* e potencial toxigeno de *Aspergillus flavus* isolados de rações comerciais. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 16, n. 2, p. 131-136, 2014.

AMABIS, J.M.; MARTHO, G.R. Fungos. In: _____. **Biologia**. 3. ed. São Paulo: Moderna, 2010. v. 2. 496 p.

AQUINO, C.F.; SALES, N.L.P.; SOARES, E.P.S.; MARTINS, E.R.; COSTA, C.A. Composição química e atividade in vitro de três óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* do maracujazeiro. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 16, n. 2, p. 329-336, 2014.

ARAÚJO, S. G.; PINTO, M.E.A.; SILVA, N.L.; SANTOS, F.J.L.; CASTRO, A.H.F.; LIMA, L.A.R.S. Antioxidant and allelopathic activities of extract and fractions from *Rosmarinus officinalis*. **BBR – Biochemistry And Biotechnology Reports**, v. 2, n. 1, p. 35-43. 2013.

AZEVEDO, I.L.; ALMEIDA, A.C.; MARTINS, E.R.; NOGUEIRA, C.L.; FARIA FILHO, D.E.; OLIVEIRA, S.P.; PRATES, J.P.B.; SOUZA, C.N. Eficácia *in vitro* do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* STEUD. WATS.) rente a bactérias entéricas de origem avícola. **Acta Veterinaria Brasilica**. v.10, n.1, p.25-31, 2016.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARATTA, M.T.; DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**. v.13, p. 235-244, 1998.

BARBOSA, F.F.; BARBOSA, L.C.A.; MELO, E.C.; BOTELHO, F.M.; SANTOS, R.H. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown. **Quím. Nova**, v. 29, n.6, p. 1221-1225, 2006.

BARKAI-GOLAN, R.; PASTER, N. **Mycotoxins in Fruits and Vegetables**. Academic Press, San Diego, 2008. 396p.

BATT, C.; SOLBERG, M.; CEPONIS, M. Effect of volatile components of carrot seed oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Food Science**, v. 48, p.762-764, 1983.

BERNARDI, C.; STEMMER JUNIOR, E.; NOGARA, G.; PEDROLLO, I.J.; FERREIRA, J.S.; CAETANO, L.C.; VONISKA, M.; SANTOS, S.G.; ORIGUELA, V.V. **O triticultor e o mercado**. ABITRIGO Associação Brasileira de Industria do Trigo, São Paulo. 2011. 44p.

BHAVNANI, S. M; BALLOW, C. H. New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion In Microbiology**, v. 3, n. 5, p.528-534, 2000.

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

BIRCK, N. M. M. **Contaminação fúngica, micotoxinas e sua relação com a infestação de insetos em trigo armazenado**. 2005. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, n. 46, p. 66-67, 09 mar. 2011. Seção 1.

CARVALHO, C.M.; COSTA, C.P.M.; SOUSA, J.S.; SILVA, H.D.; OLIVEIRA, C.L.; PAIXÃO, F.J. Rendimento da produção de óleo essencial de capim-santo submetido a diferentes tipos de adubação. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 2, p. 59-65, 2005.

CAST. Council for Agricultural Science and Technology. **Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems**. Task Force Report, n.139, Ames, Iowa, USA, 2003. 217p.

CASTRO, F. L. F. **Interação entre fungos toxigênicos (*Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*) e carunchos (*Sitophilus zeamais*) em amostras de grãos de milho**. 2011. 43f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHAO. S.C.; YOUNG, D.G.; OBERG, C.J. Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n. 5, p. 639-649, 2000.

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

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; MADRID, I.; FONSECA, A.O.; ALVES, G.H.; MEIRELES, M.C.A.; RODRIGUES, M.R.A. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 43-49, 2012.

CUNHA, Gilberto. Rumo ao século XXI. In: ____ **Trigo no Brasil: Rumo ao século XXI**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000, 194 p. C.1, p. 13-17.

DELLAVALE, P.D.; CABRERA, A.; ALEM, D.; LARRAÑAGA, P.; FERREIRA, F.; RIZZA, M.D. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungos *Alternaria SPP*. **Chilean Journal of Agricultural Research**. v.71, n. 2. 2011.

DESAI, M.A.; PARIKH, J. Microwave Assisted Extraction of Essential Oil From *Cymbopogon Flexuosus* (Steud.) Wats.: A Parametric and Comparative Study. **Separation Science and Technology**, v. 47, n. 13, p. 963-1970, 2012.

DEUS, R.J.A.; CARVALHO, A.S.C.; BANNA, D.A.D.S.; ARRUDA, M.S.P.; ALVES, C.N.; SANTOS, A.S. Efeito fungitóxico in vitro do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.3, p.347-353, 2009.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In...45a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, S, p. 255-258, 2000.

FREIRE, F.; VIEIRA, I.G.P.; GUEDES, M.I.F.; MENDES, F.N.P. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 1. ed. 2007. 48 p.

GEROMINI, K. V. N.; RORATTO, F. B.; FERREIRA, F. G.; POLIDO, P. P.; SOUZA, S. G. H.; VALLE, J. S.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 15, n. 2, p. 127-131, 2012.

GOMPERTZ, O.F.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; CORRÊA, B. Características gerais dos fungos. In ____ TRABULSI, Luiz Rachid; TOLEDO, Maria Regina Fernandes de. **Microbiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008 780 p. Cap. , p. 479-491.

GONÇALVES G.G.; MATTOS L.P.V.; MORAIS L.A.S. Óleos essenciais e extratos vegetais no controle de fitopatógenos de grãos de Óleos essenciais e extratos vegetais no controle de fitopatógenos de grãos de soja. **Horticultura Brasileira**. v.27, n. 2, 2009.

GONÇALVES, A.H. Atividade fungitóxica dos óleos essenciais de *Lippias idoidescham*. E de *Cymbopogon citratus* (d.c.)Stapf. no controle de fitopatógenos do feijoeiro comum. 2012. 90p. **Dissertação**. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi.

GUIMARÃES, L.G.L.; CARDOSO, M.G.; SOUSA, P.E.; ANDRADE, J.; VIEIRA, S.S. Atividade antioxidante e fungitóxica do óleo essencial do capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 464-472, 2011.

HENRIQUE, A.B.; CALLADO, C.H.; RIZZINI, C.M.; REINERT, F.; CUNHA, M.; VALENTIN, Y.Y. **Botânica** 1. 3. ed. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, 2010. 244p.

HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; MESQUINI, R.M.; CRUZ, M.E.S.; STANGARLIN, J.R.; NOZAKI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos in vitro e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 439-445, 2012.

IAMANAKA, B.T.; OLIVEIRA, I.S.; TANIWAKI, M.H. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 7, p. 138-161, 2010.

ICAR, Directorate of Medicinal & Aromatic Plants Research, Anand, Gujarat. Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*). Disponível em: <<http://www.dmapr.org.in/MandCrop/Lemongrass.html>>

International Association for Food Protection. Aflatoxin B1 Structural Formula. Disponível em: <<https://www.foodprotection.org/upl/downloads/library/slides-11-29-16-webinar.pdf>> Acesso em: 31 mar 2017. il

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v.51, n.1, p.45-66, 2006.

JANSSEN A.M.; SCHEFFER, J.J.C.; BAERHEIM SVENDSEN, A. Antimicrobial activity of essential oils from Greek Sideritis species. **Pharmazie**, v.12, n.8. 1987.

JAY, James. Micotoxinas. In:____ **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. [trad.] Eduardo Cesar Tondo et al. Porto Alegre: Artmed. c. 30, p. 633-649, 2005.

JUVEN, B.J.; KANNER, J.; SCHUED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Microbiology Bacteriology**, v. 76, p. 626-631, 1994.

KAKARLA, S.; GANJEWALA, D. Antimicrobial activity of essential oils for four Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Steude) varieties. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**. v.3, n.1, p.107-109. 2009.

KNAAK, N.; FIUZA, L.M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2 p. 120-132, 2010.

Korea Food Additives Code. Fórmula estrutural do citral. Disponível em: <<https://encryptedtbn3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSbZNix847mVykGLKlwfMviuRvQcc7uv6OxVsPPVgPJq8hdMznT>> Acesso em: 31 mar 2017. il

KOSHIMA, F.A.T.; MING, L.C.; MARQUES, M.O.M. Produção de biomassa, rendimento de óleo essencial e de citral em capim-limão, *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, com cobertura morta nas estações do ano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 112-116, 2006.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; DUBEY, N.K. Biodeterioration of some herbal raw materials by storage fungi and aflatoxin and assessment of *Cymbopogon flexuosus* essential oil and its components as antifungal. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 63, p.712-716, 2009.

LADEIRAS, D.F.B. Estudo de compostos bioativos e atividades biológicas do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). 2014. **Dissertação** apresentada ao Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias/ Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde. Lisboa.

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

LAZZARI, F. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2.ed. Curitiba: Editora do Autor, 1997. 134p.

LAZZARI, Flávio. Contaminação fúngica de sementes, grãos e rações. In: SIMPÓSIO DE PROTEÇÃO DE GRÃOS ARMAZENADOS, 1993, Passo Fundo, RS. **Anais**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1993. p. 59-69.

LEWINSOHN, E.; DUDAI, N.; TADMORÉ, Y.; KATZIR, I.; RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; JOEL, D.M. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Staff. *Poaceae*). **Annals of Botany**, v. 81, p. 35-9, 1998.

LINS, J.L.F.; SILVA, J.M.; SILVA, L.P.; SANTOS, T.M.C.; SANTOS, E.L. Ocorrência de fungos de campo e armazenamento em ingredientes e rações para suínos. **Revista Verde**, v. 9, n. 2, p. 14 - 20, 2014.

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

LOPEZ-MALO, A.; ALZAMORA, S.M.; PALOU, E. *Aspergillus flavus* dose-response curves to selected natural and synthetic antimicrobials. **International Journal of Food Microbiology**, v.73, p.213-218, 2002.

LORENZI, H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 576 p.

LUO, M.; JIANG, L.K.; HUANG, Y.X.; XIAO, M.; LI, B. ZOU, G.L. Effects of Citral on *Aspergillus flavus* Spores by Quasi-elastic Light Scattering and Multiplex Microanalysis Techniques. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.36, n.4, p.277-283, 2004.

MACHADO, R. M. A.; MUSSI-DIAS, V.; SOUZA, C.L.M.S.; SILVA, L.B.; FREIRE, M.G.M. Avaliação de óleos essenciais sobre o crescimento in vitro do fungo *colletotrichum gloeosporioides*. **Perspectiva Online Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 8, n. 3, p.64-75, 2013.

MALLMANN, C.A.; VASCONCELOS, T.G.; TYSKA, D.; MARTINS, A.C. **Comparação de metodologias analíticas e de amostragem para micotoxinas. Laboratório de Análises Micotoxicológicas.** Universidade Federal de Santa Maria. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/papers/AMENA.pdf>>. Acesso em: 19 ago. 2016.

MARTINAZZO, A.P.; MELO, E.C.; DEMUNER, A.J.; BERBET, P.A. Avaliação do óleo essencial folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf após o processo de secagem. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 12, n. 5, p. 523 – 536, 2013

MAY, A.; BOVI, O.A.; MAIA, N.B.; MORAES, A.R.A.; PINHEIRO, M.Q.; MARIO, M. Influência do intervalo entre cortes sobre a produção de biomassa de duas espécies de capim limão. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 3, 2008.

MERONUCK, R.A. The significance of fungi in cereal grains. **Plantas Disease**. v. 71, n. 3. p. 287-292, 1987.

MISHRA, K.A.K.; DUBEY, N.K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1101-1105, 1994.

MOGHTADER, M. SALARI, H., FARAHMAND, A. Evaluation of the antifungal effects of rosemary oil and comparison with synthetic borneol and fungicide on the growth of *Aspergillus flavus*. **Journal of Ecology and the Natural Environment**.v. 3, n. 6, p. 210-214. 2011.

MOLEYAR, V.; NARASIMHAM, P. Detoxification of essential oil components (citral and menthol) by *Aspergillus niger* and *Rhizopus stolonifer*. **Journal of th Science of Food and Agriculture**, v.39, p.239-246, 1987.

MORAIS L.A.S; RAMOS N.P.; GONÇALVES G.G.; BETIOL W.; CHAVES F.C.M. Atividade antifúngica de óleos essenciais em sementes de feijão cv. carioquinha. **Horticultura Brasileira**. v.26, n. 2, 2008.

MORI, Claudia. IGNACZAK, João Carlos. Aspectos econômicos do complexo agroindustrial do trigo. In:____ PIRES, João Leonardo Fernandes; VARGAS, Leandro; CUNHA, Gilberto Rocca. **Trigo no Brasil Bases para a produção competitiva e sustentável**. Passo Fundo, 2011. 488p. c. 3, p. 41-76.

NESTER, E. W.; ANDERSON, D.; ROBERTS JR, C.E. **Microbiology: a human perspective**. 7 ed. Nova York: McGraw-Hill, 2011. 864p.

NI, M., GAO, N., KWON, N.J., SHIN, K.S., YU, J.H. Regulation of *Aspergillus* Conidiation In:_____ Katherine Borkovich, Daniel J. Ebbole. **Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi**. Washington DC: American Society for Microbiology Press. 2010. 802 p.

NOVOA, José; DIÁZ, Gonzalo. Aflatoxinas: mecanismos de toxicidade Enlaetiología de câncer hepático celular. **Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia**, v. 54, n. 2, p. 108-116, 2006.

OLIVEIRA, M.T.R.; BERBERT, P.A.; MATOS, C.R.R.; MATHIAS, L.; MOREIRA, R.O. Efeito da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Pectis brevipedunculata*. **Química. Nova**, v. 34, n. 7, p. 1200-1204, 2011.

OOTANI, M.A.; AGUIAR, R.W.; RAMOS, A.C.C.; BRITO, D.R.; SILVA, J.B.; CAJAZEIRA, J.P. Use of essential oils in agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-174, 2013.

OR SEMENTES. Baixo crescimento do consumo de trigo preocupa as indústrias. Disponível em: < <http://www.orsementes.com.br/noticias-geral/noticias/629-baixo-crescimento-do-consumo-de-trigo-preocupa-as-industrias>> Acesso em: 08 dez 2016.

ÖZACAN, M.M.; CHALCHAT, J.C. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 59, n. 7-8, p. 691-698, 2008.

PANDEY, A. K.; RAI, M.K.; ACHARYA, D. Chemical Composition and Antimycotic Activity of the Essential Oils of Corn Mint (*Mentha arvensis*) and Lemon Grass (*Cymbopogon flexuosus*) Against Human Pathogenic Fungi. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 6, p. 421-425, 2003.

PARENICOVÁ, L.; SKOUBOE, P.; FRISVAD, J.; SAMSON, R.A.; ROSSEN, L.; HOOR-SUYKERBUYK, M.; VISSER, J. Combined Molecular and Biochemical Approach Identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as Two Species. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 2, p. 521-527. 2001.

PEREIRA, A.B. Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos. 2006. 72 f. **Dissertação**, Programa de Pós-graduação “Stricto Sensu” em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PEREIRA, M.C.; VILELA, G.R.; COSTA, L.M.A.S.; SILVA, R.F.; FERNANDES, A.F.; FONSECA, E.W.N.; PICCOLI, R.H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. das G.; BATISTA, L. R.; GUIMARÃES, L. G. de L.; SILVA, D. M. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb.

Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa). **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 213-220, 2010.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 193-210, 2001.

PRAKASH, B.; KEDIA, A.; MISHRA, P.K., DUBEY, N.K. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities e Potentials and challenges. **Food Control**. v.47, p.381-391. 2015.

RAO, A.; ZHANG, Y.; MUEND, S.; RAO, R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 5062–5069, 2010.

RASOOLI, I.; FAKOOR, M.H.; YADEGARINIA, D.; GACHKAR, L.; ALLAMEH, A.; REZAEI, M.B. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 135–139, 2008.

RIBEIRO, D.S.; MELO, D.B.; GUIMARÃES, A.G.; VELOZO, E.S. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 687-696, 2012.

ROCHA, C. R.; CARELI, R.T.; SILVA, R.P.; ALMEIDA, A.C.; MARTINS, E.R.; OLIVEIRA, E.M.B.; DUARTE, E.R. Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. como sanitizante natural para controle de bactérias sésseis em superfície utilizada para corte de alimentos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 4, p. 338-344, 2014.

ROMERO, A.L.; SPECIAN, V.; OLIVEIRA, R.C.; DINIZ, S.S.S. Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 11, p. 15-18, 2009.

SADDIQ, A.A.; KHAYYAT, S.A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, p. 89-93, 2010.

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

SANTOS, L.G.M.; CARDOSO, M. G.; LIMA, R. K.; SOUZA, P. E.; GUIMARÃES, L. G.L.; ANDRADE, M. A. Avaliação do potencial fungitóxico do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry (cravo-da-índia). **Tecno-lógica**, v. 11, n. 1, p. 11-14, 2007.

SARGEANT K, O'KELLY, CARNAGHAN, ALLCROFT. The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. **Veterinary Record**, v. 73, p. 1219-1223, 1961.

SARMA, A.; SAIKIA, R.; SARMA, T.C.; BORUAH, P. Lemongrass [*Cymbopogon Flexuosus* (Steud) Wats] inflorescence oil: A potent anti fungal agent. **Journal of Essential Oil earing Plants**, v.7, n.1, p.87-90, 2004.

SARMENTO-BRUM, R.B.C.; SANTOS, G.R.; CASTRO, H.G.; GONÇALVES, C.G.; JÚNIOR CHAGAS, A.F.; NASCIMENTO, I.R. Efeito de óleos essenciais de plantas medicinais sobre a Antracnose do sorgo. **Bioscience Journal**, v. 29, Supplement 1, p. 1549-1557, 2013.

SCHUCK, V. J.A.; FRATINI, M.; RAUBER, C.S.; HNERIQUES, A.; SCHAPOVAL, E.E.S. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 1, p. 45-49, 2001.

SCUSSEL, V.M. Fungos em grãos armazenados. In: **Armazenagem de grãos**. Lorini, I. (ed.) et al. Campinas: IBG, 2002. p. 675-691

SHAHI, S. K.; PATRA, M.; SHUKLA, A.C.; DIKSHIT, A. Use of essential oil as botanical-pesticide against post harvests spoilage in *Malus pumilo* fruits. **BioControl**. v. 48, p. 223-232, 2003.

SHIN, S. Anti-Aspergillus Activities of Plant Essential Oils and Their Combination Effects with Ketoconazole or Amphotericin B. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 5, p. 389-393, 2003.

SILVA, J.L. Óleo Essencial de *Cymbopogon flexuosus* (STEUD.) WATS., *Vernonia polyanthes* Less. E fosfito de potássio no controle de antracnose do feijoeiro. 2013. **Dissertação** apresentada ao programa de Pós-Graduação Agronomia/Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Lavras.

SILVA, J.L.; SOUZA, P.E.; ALVES, E.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FREITAS, M.L.O.; ANDRADE, C.L.; RESENDE, M.L.V. Essential oil of *Cymbopogon flexuosus*, *Vernonia polyanthes* and potassium phosphite in control of be ananthracnose. **Journal of Medicinal Plants Research**. v.9. n. 8, p.243-253, 2015.

SIMÕES, C.M.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia da planta ao medicamento**. SIMÕES, C.M. (Org). 5 ed. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003, cap.18, 467 – 495p.

SOUSA, R.M.S; SERRA, I.M.R.S; MELO, T.A. Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, em pimenta. **Summa Phytopathologica**, v.38, n.1, p.42-47, 2012.

STEVENS, K.L.; JURD, L.; KING JR, A.D.; MIHARA, K. The Antimicrobial Activity of Citral. **Experientia**, v.27, n.5, p.600-602. 1971.

TATSADIJIEU, N.I.; YAUBA, A.; NUKENINE, E.N.; NGASSOUM, M.B.; MBOFUNG, C.M.F. Comparative study of the simultaneous action of three essential oils on *Aspergillus flavus* and *Sitophilus zeamais* Motsh. **Food Control**, v.21, p.186-190, 2010.

THE UNIVERSITY OF ADELAIDE. Mycology Online. Disponível em: <[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Aspergillus/flavus.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Aspergillus/flavus.html)> Acesso em: 08 dez 2016. il.color

TIBOLA, C. S.; FERNANDES, J.M.C.; DEL PONTE, E.M.; MALLMANN, C.A.; DILKIN, P.; LIMA, M.I.P.M.; PAVAN, W. **Indicações técnicas para minimizar a contaminação de trigo por micotoxinas**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2013. 40 p.

TIBOLA, C.S.; MORI, C.; GUARIENTI, E.M.; LORINI, I.; LIMA, M.I.P.M.; MIRANDA, M.Z. *Gestão da qualidade do trigo na pós-colheita*. In: PIRES, João Leonardo Fernandes; VARGAS, Leandro; CUNHA, Gilberto Rocca. **Trigo no Brasil Bases para a produção competitiva e sustentável**. Passo Fundo, 2011. 488p. cap 16, p.391-426.

TICIANI, F. TRATAMENTO DE SEMENTES DE TRIGO (*Triticum aestivum L.*) COM ÓLEOS ESSENCIAIS. 2013. 44p. **Trabalho de Conclusão de Curso** apresentado ao Curso de Agronomia. Departamento de Estudos Agrários (DEAg) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI), Ijuí.

TOMASINI, Roque; AMBROSI Ivo. Aspectos econômicos da cultura de trigo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 15, n. 2, p. 59-84, 1998.

VALERIANO, C.; PICCOLI, R.H.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2012.

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

WASDE **World Agricultural Supply and Demand Estimates** WASDE-539, 2016. Online. Disponível em: <<http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1194>> Acesso em: 17 abri 2017.

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

ANEXO

Quadro 05 – Resumo da análise de variância do efeito de diferentes doses óleo essencial de *C. flexuosus* (0,6; 0,8; 1,6, $\mu\text{L/mL}$), durante o período de 10 dias, no crescimento do fungo *A. brasiliensis* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Dose de óleo essencial (D)	2	13,1941	*
Erro	6	1,67	
Total	8		
CV = 1,44%			

* Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Quadro 06 – Resumo da análise de variância do efeito de diferentes doses óleo essencial de *C. flexuosus* (0,6; 0,8; 1,6, $\mu\text{L/mL}$), durante o período de 20 dias, no crescimento do fungo *A. brasiliensis* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Dose de óleo essencial (D)	2	59,85	*
Erro	6	1,36	
Total	8		
CV = 1,33%			

* Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Quadro 07 – Resumo da análise de variância do efeito de diferentes doses óleo essencial de *C. flexuosus* (0,6; 0,8; 1,6, $\mu\text{L/mL}$), durante o período de 20 dias, no crescimento do fungo *A. brasiliensis* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Dose de óleo essencial (D)	2	64,40	*
Erro	6	0,82	
Total	8		
CV = 0,96%			

* Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Quadro 08 – Resumo da análise de variância do efeito da dose de 0,6 µL/mL do óleo essencial de *C. flexuosus*, em diferentes períodos de incubação (10, 20, 30 dias), no crescimento do fungo *A. brasiliensis* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Tempo de incubação (t)	2	25,57	*
Erro	6	1,58	
Total	8		
CV = 1,45%			

* Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Quadro 09 – Resumo da análise de variância do efeito da dose de 0,8 µL/mL do óleo essencial de *C. flexuosus*, em diferentes períodos de incubação (10, 20, 30 dias), no crescimento do fungo *A. brasiliensis* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Tempo de incubação (t)	2	93,64	*
Erro	6	1,79	
Total	8		
CV = 1,48%			

* Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Quadro 10 – Resumo da análise de variância do efeito da dose de 1,6 µL/mL do óleo essencial de *C. flexuosus*, em diferentes períodos de incubação (10, 20, 30 dias), no crescimento do fungo *A. brasiliensis* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Tempo de incubação (t)	2	15,31	*
Erro	6	0,46	
Total	8		
CV = 0,73%			

* Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Quadro 11 – Resumo da análise de variância do efeito de diferentes doses óleo essencial de *C. flexuosus* (0,6; 0,8; 1,6, $\mu\text{L}/\text{mL}$), durante o período de 10 dias, no crescimento do fungo *A. flavus* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Dose de óleo essencial (D)	2	17,35	*
Erro	6	0,93	
Total	8		
CV = 1,06%			

* Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Quadro 12 – Resumo da análise de variância do efeito de diferentes doses óleo essencial de *C. flexuosus* (0,6; 0,8; 1,6, $\mu\text{L}/\text{mL}$), durante o período de 20 dias, no crescimento do fungo *A. flavus* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Dose de óleo essencial (D)	2	0,17	n.s.
Erro	6	0,05	
Total	8		
CV = 0,22%			

n.s. Não significativo a 5% de significância pelo teste F.

Quadro 13 – Resumo da análise de variância do efeito de diferentes doses óleo essencial de *C. flexuosus* (0,6; 0,8; 1,6, $\mu\text{L}/\text{mL}$), durante o período de 20 dias, no crescimento do fungo *A. flavus* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Dose de óleo essencial (D)	2	0,08	n.s.
Erro	6	0,07	
Total	8		
CV = 0,26%			

n.s. Não significativo a 5% de significância pelo teste F.

Quadro 14 – Resumo da análise de variância do efeito da dose de 0,6 µL/mL do óleo essencial de *C. flexuosus*, em diferentes períodos de incubação (10, 20, 30 dias), no crescimento do fungo *A. flavus* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Tempo de incubação (t)	2	56,68	*
Erro	6	0,14	
Total	8		
CV = 0,39%			

* Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Quadro 15 – Resumo da análise de variância do efeito da dose de 0,8 µL/mL do óleo essencial de *C. flexuosus*, em diferentes períodos de incubação (10, 20, 30 dias), no crescimento do fungo *A. flavus* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Tempo de incubação (t)	2	44,83	*
Erro	6	0,11	
Total	8		
CV = 0,34%			

* Significativo a 5% de significância pelo teste F.

Quadro 16 – Resumo da análise de variância do efeito da dose de 1,6 µL/mL do óleo essencial de *C. flexuosus*, em diferentes períodos de incubação (10, 20, 30 dias), no crescimento do fungo *A. flavus* em grãos de trigo (*T. aestivum*) contaminados.

Fonte de Variação	GL	QM	P>0,05
Tempo de incubação (t)	2	125,80	*
Erro	6	0,79	
Total	8		
CV = 0,93%			

* Significativo a 5% de significância pelo teste F.