

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

MELLIDE ZANCHETTIN

**EFEITO ANTIFÚNGICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS ISOLADOS E COMBINADOS
FRENTE A FUNGOS FILAMENTOSOS**

MEDIANEIRA

2021

MELLIDE ZANCHETTIN

**EFEITO ANTIFÚNGICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS ISOLADOS E COMBINADOS
FRENTE A FUNGOS FILAMENTOSOS**

**Antifungal effect of isolated and combined essential oils against filamentous
fungi**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Alimentos da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Flávio Dias Ferreira

MEDIANEIRA

2021



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Diretoria de Graduação e Educação Profissional
Coordenação Engenharia de Alimentos

Mellide Zanchettin

**Efeito Antifúngico de Óleos Essenciais Isolados e Combinados
Frente a Fungos Filamentosos**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado às 09:00 horas do dia 09 de agosto de 2021 como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro(a) de Alimentos, do Curso de Bacharelado em Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Medianeira. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Dias Ferreira

Membro da Banca: Prof. Dr. Valdemar Padilha Feltrin

Membro da Banca: Prof. Dr. Ilton José Baraldi

Aluna: Mellide Zanchettin

Medianeira, 09 de agosto de 2021.
“O termo de aprovação assinado encontra-se na coordenação do curso”

"Dedico este trabalho aos meus pais Marcos e Silvana, que sempre acreditaram no meu potencial e contribuíram com essa conquista.

Amo vocês mais que tudo!"

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sabedoria, força de vontade e coragem para superar as adversidades.

Aos meus pais que sempre foram meu alicerce e inspiração, por todo incentivo e conforto para que eu concluísse com êxito essa e todas as demais etapas de minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Dias Ferreira, por estar sempre disposto a compartilhar comigo seu conhecimento, me apoiar e incentivar nos momentos de desânimo.

A todos os professores que fizeram parte de minha jornada, desde a alfabetização até a graduação.

Em especial a Rafaela, amiga que este trabalho me proporcionou, não tenho palavras para descrever o quanto sua presença tornou tudo mais fácil.

Por fim, a Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Medianeira e a todos os servidores.

RESUMO

Os óleos essenciais constituem uma mistura complexa de compostos provenientes do metabolismo secundário de plantas aromáticas, aos quais são atribuídos atividade biológica. Assim sendo, representam uma promissora alternativa ao controle de fungos filamentosos no campo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antifúngico dos óleos essenciais de *Citrus aurantium bergamia* (bergamota), *Melaleuca alternifolia* (árvore do chá), *Pogostemon cablin* (patchouli) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) sob o crescimento de *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*. E ainda, o efeito interativo de *S. aromaticum* e *M. alternifolia* frente a *F. verticillioides*. A composição dos óleos essenciais foi determinada por cromatografia gasosa, cujos compostos majoritários identificados foram Limoneno (48,04 %) e Acetato de linalila (36,97%), Terpinen-4-ol (65,61%), Patchoulol (57,17 %) e Eugenol (91,30%) para bergamota, árvore do chá, patchouli e cravo-da-índia, respectivamente. A avaliação do efeito antifúngico foi realizada através do método por microdiluição em caldo por meio da concentração inibitória mínima (MIC) e fungicida mínima (CFM) para os óleos essenciais isolados, onde o óleo essencial de cravo apresentou-se eficaz frente a *A. flavus* e *F. verticillioides* com CIM e CFM de 1000 µg/mL, já árvore do chá exibiu CIM de 4000 µg/mL e CFM 8000 µg/mL para *F. verticillioides*. A avaliação interativa foi realizada pelo método de Checkerboard através da concentração inibitória fracional (CIF) entre os óleos essenciais de árvore do chá e cravo-da-índia possibilitando a observação de um efeito sinérgico em ambas combinações, sendo assim, possível aumentar a eficácia dos óleos em concentrações inferiores.

Palavras-chave: *Aspergillus*. *Fusarium*. Essências. Óleos essenciais.

ABSTRACT

Essential oils are a complex mixture of compounds from the secondary metabolism of aromatic plants, which are attributed to biological activity. Therefore, they represent a promising alternative to the control of filamentous fungi in the field. The objective of this work was to evaluate the antifungal effect of essential oils of *Citrus aurantium bergamia* (bergamot), *Melaleuca alternifolia* (tea tree), *Pogostemon cablin* (patchouli) and *Syzygium aromaticum* (clove) on the growth of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. And yet, the interactive effect of *S. aromaticum* and *M. alternifolia* against *F. verticillioides*. The composition of the essential oils was determined by gas chromatography, whose major compounds identified were Limonene (48.04%) and Linalyl acetate (36.97%), Terpinen-4-ol (65.61%), Patchoulol (57, 17%) and Eugenol (91.30%) for bergamot, tea tree, patchouli and clove, respectively. The evaluation of the antifungal effect was carried out using the method by microdilution in broth through the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicide (MFC) for isolated essential oils, where the essential oil of clove was effective against *A. flavus* and *F. verticillioides* with MIC and CFM of 1000 µg/mL, while tea tree exhibited MIC of 4000 µg/mL and CFM 8000 µg/mL for *F. verticillioides*. The interactive evaluation was performed by the Checkerboard method through the fractional inhibitory concentration (FIC) between the essential oils of tea tree and clove, allowing the observation of a synergistic effect in both combinations, thus, it is possible to increase the effectiveness of the oils in lower concentrations

Keywords: *Aspergillus*. *Fusarium*. Essences. Essential oils.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química dos OEs.....	27
Tabela 2 – CIM e CFM dos óleos essenciais isolados.....	29
Tabela 3 – FIC e efeitos de interações duplas de OEs frente a <i>F. verticillioides</i>	32

LISTA DE SIGLAS

BDA	Batata Dextrose Ágar
CFM	Concentração fungicida mínima
CG-MS	Cromatografia gasosa – espectrometria de massas
CIF	Concentração inibitória fracional
CIM	Concentração inibitória mínima
OE	Óleo essencial
OEB	Óleo essencial de bergamota
OEC	Óleo essencial de cravo-da-índia
OEM	Óleo essencial de melaleuca
OEP	Óleo essencial de patchouli
TR	Tempo de retenção
UEM	Universidade Estadual de Maringá
USP	Universidade Estadual de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	FUNGOS	14
3.1.1	<i>Aspergillus flavus</i>	15
3.1.2	<i>Fusarium verticillioides</i>	16
3.2	PRODUTOS NATURAIS	17
3.2.1	<i>Citrus aurantium bergamia</i>	18
3.2.2	<i>Syzygium aromaticum</i>	19
3.2.3	<i>Melaleuca alternifolia</i>	19
3.2.4	<i>Pogostemon cablin</i>	20
3.3	ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1.1	Obtenção dos Óleos Essenciais.....	23
4.1.2	Análise dos Óleos e Identificação Química	23
4.1.3	Preparação do Óleo Essencial	23
4.2	PREPARAÇÃO DO INÓCULO	24
4.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO	24
4.4	INTERAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
5.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	26
5.2	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E FUNGICIDA MÍNIMA PARA ÓLEOS ESSENCIAIS ISOLADOS.....	28
5.3	FIC DAS COMBINAÇÕES ENTRE ÓLEOS ESSENCIAIS PELO MÉTODO DE CHECKBOARD	31
6	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos em geral constituem um excelente substrato para crescimento microbiano pela disponibilidade de nutrientes e água, possibilitando ocorrência de reações químicas e metabólicas. Apesar de algumas espécies serem benéficas e intencionalmente adicionadas aos alimentos, por conferirem características sensoriais desejáveis, a grande maioria deles são provenientes do ambiente produtivo e causam deterioração e contaminações que acarretam em um alimento impróprio para consumo. Além disso, microrganismos como fungos, acometem diversas culturas ainda na lavoura ocasionando perdas econômicas e impactos à saúde de humanos e animais (BAPTISTA; VENÂNCIO, 2003).

Comumente, esses microrganismos podem ser divididos em fungos de campo, quando o processo infeccioso ocorre ainda nas fases de cultivo, ou fungos de armazenamento, quando manifestam-se durante a estocagem. Os principais gêneros envolvidos são: *Aspergillus* e *Fusarium* (LINS, 2014).

Aspergillus flavus é um fungo filamentosso, saprófito, que apresenta como forma de resistência a esporulação, ocorre comumente em milho, amendoim, soja e outros grãos causando deterioração e risco à saúde do consumidor pela produção de micotoxinas, metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos altamente toxigênicos, termoestáveis e resistentes aos processos industriais (EINLOFT, 2016). O gênero *Aspergillus* produz aflatoxinas que desencadeiam neoplasias hepáticas tanto em humanos quanto em animais (BRASIL, 2019).

Fusarium verticillioides é um fungo cosmopolita e fitopatogênico, amplamente difundido geograficamente que pode atingir diversas culturas distintas, como milho, beterraba, aveia e algodão. Além disso, este gênero é produtor de diversas micotoxinas, as fumonisinas, que geram severos danos à saúde de humanos e animais, agindo como clastogênicos, imunossupressores e neurotóxicos. (BARROS, 2013).

Atualmente, as medidas de controle utilizadas para esses microrganismos são fungicidas sintéticos, os quais podem causar fitotoxicidade, resistência microbiana, além de possíveis danos à saúde (OLIVEIRA; VIANA e MARTINS, 2016). Uma

alternativa ao seu uso são os produtos naturais a base de plantas, como óleos essenciais (OE), metabólitos secundários de plantas aromáticas, que indicam uma solução promissora para evitar possíveis efeitos colaterais, formas de resistência e aumentar a eficácia dos produtos antimicrobianos conforme relatado por CORTEZ et al., 2015 e LIMA et al. 2006.

A bergamota (*Citrus aurantium bergamia*) é um fruto esférico cuja casca é rica em flavonoides com pigmentação laranja (GERHARDT et al., 2012). O óleo essencial de bergamota (OEB) é obtido da casca e além do odor característico, adocicado, cítrico e refrescante, apresenta propriedades antibacterianas e antissépticas (KOSHIMA, 2011).

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) é uma árvore nativa da Indonésia, pertencente à família Myrtaceae, cuja altura atinge entre 15 e 20 metros (LEE; SHIBAMOTO, 2001). O principal composto aromático presente no óleo essencial de cravo (OEC) é o Eugenol, cujos relatos literários apontam propriedades antissépticas, antibacterianas, além de ação antifúngica contra leveduras e fungos filamentosos (PINTO et al., 2009).

Melaleuca alternifolia popularmente conhecida como árvore do chá, é uma planta nativa da Austrália, pertencente à família Myrtaceae, seu uso é muito difundido devido suas propriedades aromáticas e medicinais, que são relativamente pronunciadas em seu óleo essencial (OEM), do qual há relatos de atividade antifúngica, antibacteriana e anti-inflamatória (MONTEIRO et al., 2013).

O patchouli (*Pogostemon cablin*) é uma planta pertencente à família Lamiaceae, nativa da região sudeste da Ásia. Há muitos anos, vem sendo utilizada na medicina popular chinesa devido suas propriedades farmacológicas, atuando como analgésico, anti-inflamatório e antimicrobiano (CHEN et al., 2020). A composição de seu óleo essencial (OEP) é extremamente complexa, consistindo em um grande número de sesquiterpenos (CHEN et al., 2014).

Tendo em vista, as propriedades antimicrobianas supracitadas e sua importância na redução do uso de fungicidas sintéticos, o presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito antifúngico dos OEs de *C. aurantium bergamia*, *S. aromaticum*,

M. alternifolia e *P. cablin* isolados sob esporos de *A. flavus* e *F. verticillioides* e o efeito interativo entre *M. alternifolia* e *S. aromaticum* frente a *F. verticillioides*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antifúngico dos OEs de *C. aurantium bergamia* (bergamota), *S. aromaticum* (cravo-da-índia), *M. alternifolia* (árvore do chá) e *P. cablin* (Patchouli) sobre o crescimento de *A. flavus* e *F. verticillioides* e o efeito interativo de *S. aromaticum* e *M. alternifolia* frente a *F. verticillioides*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a composição química dos OEs de *C. aurantium bergamia*, *S. aromaticum*, *M. alternifolia* e *P. cablin*;
- Investigar o efeito antifúngico de tais espécies sob esporos de *A. flavus* e *F. verticillioides*;
- Identificar a concentração mínima inibitória (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais isolados;
- Avaliar a interação dos OEs de *S. aromaticum* e *M. alternifolia* quanto ao efeito sinérgico, aditivo ou antagonista e sem efeito interativo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FUNGOS

Os fungos são microrganismos naturalmente presentes no ambiente, habitando principalmente o solo e o ar, onde estruturas reprodutivas, na forma de conídios ou esporos, estão prontas para, ao cair em substrato adequado, desenvolverem novas estruturas vegetativas. São eucariontes, podendo ser uni ou multicelulares, sem presença de clorofila, reproduzindo-se de forma sexuada ou assexuada, com estruturas somáticas vegetativas, filamentosas e ramificadas, e com parede celular contendo quitina e α -glucano. Possuem extrema relevância pois degradam matéria orgânica e tornam-na assimilável pelas plantas, porém, muitas vezes, não atuam benéficamente, ou seja, são responsáveis por causar putrefação e degradação, especialmente em alimentos (MORAES et al., 2009).

Por muitos anos os fungos foram considerados na divisão de reinos como vegetais, apenas no ano de 1969 foram classificados e reorganizados no reino Fungi, que reúne além dos fungos, líquens e algas do gênero *Prototheca*. Este reino é subdividido em seis filos, dentre os quais quatro possuem maior relevância, Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota (IDCB-UFMG, 2019).

O filo Chytridiomycota é representado por organismos uni ou multicelulares, que vivem em ambientes aquáticos, principalmente de água doce, são formadores de zoósporos flagelados, que auxiliam os mesmos na locomoção. O Zygomycota, possui representantes multicelulares que não contém corpo de frutificação, e a reprodução assexuada, por meio de zigósporos, é a mais frequente. No filo Basidiomycota, encontram-se os cogumelos, seu basídio é formado por um basidiocarpo, que é constituído por píleo, lamela e estirpe. Quando a reprodução ocorre de forma assexuada, dá-se origem aos conídios e sexuada aos esporos, estes podem ser comparados a sementes, que necessitam de umidade e calor para germinar, dando origem aos tubos germinativos, que após ramificarem-se, formarão uma massa filamentosa, denominada micélio, os filamentos são as hifas. Já o filo Ascomycota que

compreende a maior parte dos organismos, caracteriza-se por fungos cosmopolitas, saprófitos, filamentosos, parasitas ou que compõem associações mutualísticas, contém ascósporos, sendo este seu mecanismo de propagação, uma vez que a reprodução ocorre na maioria das vezes de forma sexuada (MORAES et al., 2009).

Fungos filamentosos são muito conhecidos por produzirem toxinas como metabólitos secundários em condições de estresse, as denominadas micotoxinas, cuja produção é favorecida por mudanças de temperatura, umidade, aeração e na presença de agentes agressivos (CASTRO et al., 2015). Relatos da literatura apontam que existem quatrocentos tipos distintos de micotoxinas, sintetizadas por cepas fúngicas, sendo as mais importantes e comuns em grãos e derivados, as aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona e fumonisinas (MAGNOLI, 2018).

3.1.1 *Aspergillus flavus*

O gênero *Aspergillus* compreende mais de 200 espécies, dos quais 34 foram descritas como patógenos a humanos. Sua descoberta ocorreu em 1729 pelo padre Micheli, que assim o nomeou, devido sua aparência ao aspersor de água benta. É amplamente difundido nos mais variados ambientes, como por exemplo, no solo, água e biomassa em decomposição (GUAZZELLI, 2011).

A espécie pertence ao filo Ascomycota, e é um fungo saprófito e filamentoso, que caracteriza-se pela formação de colônias verdes, que são decorrentes de seus conídios fortemente pigmentados. Quanto a sua morfologia, a ornamentação conidial é lisa e com paredes finas. *A. flavus* apresenta a capacidade de obter nutrientes, de diversos substratos, o que contribui a sua ubiquidade, é extremamente resistente, sendo capaz de sobreviver no solo na forma micelial durante o período de entressafras (EINLOFT, 2016).

O fungo é mesófilo com temperatura ideal de crescimento entre 35 e 38 °C, requer uma atividade de água mínima entre 0,78 e 0,80 para crescimento e para produção de micotoxina entre 0,83 e 0,87. Altas temperaturas e estresse hídrico contribuem para a colonização de grãos no período de pré-colheita, uma vez que o crescimento deste microrganismo depende basicamente do teor de água presente no

substrato (TRAVAGLIA, 2011). Apesar do pH ótimo ser muito variável com a espécie de fungo, o *A. flavus* não é sensível a mudanças, podendo crescer em uma ampla faixa de pH que varia entre 2,1 e 11,2. (GASPERINI, 2014).

A. flavus afeta principalmente o desenvolvimento de grãos, como amendoim e milho, sendo considerado um indicador de deterioração nas sementes, pois causa danos ao germe, como descoloração ou alterações nutricionais, além de perda de matéria seca (PEZZINI et al., 2005). Seu desenvolvimento é favorecido em substratos oleaginosos, onde a produção de micotoxinas acresce consideravelmente, culturas de solos ricos em zinco também colaboram para o melhor desenvolvimento do fungo e produção de aflatoxinas (REIS, 2009).

O termo aflatoxina compreende o grupo de micotoxinas produzidas pelos fungos *A. flavus* e *Aspergillus parasiticus* e as principais são identificadas como B₁, B₂, G₁ e G₂. Essa diferenciação dá-se ao fato das distintas colorações apresentadas na fluorescência, B (blue) e G (green) quando observadas na luz ultravioleta. As aflatoxinas B₁ e B₂, quando metabolizadas por mamíferos são hidroxiladas e dão origem a outras duas toxinas, M₁ e M₂, que podem estar presentes no leite e na urina de gado leiteiro (CVE, 2003).

A intoxicação por aflatoxinas, pode desencadear hepatotoxicidade, devido a destruição de células parenquimatosas, além de neoplasias, hemorragias e alterações nervosas. Na grande maioria das vezes a intoxicação ocorre de forma gradual e os efeitos levam anos para manifestar-se, porém um dos efeitos mais significativos em humanos é o comprometimento do sistema imunológico, deixando o indivíduo mais propenso a demais doenças oportunistas (MAGNOLI, 2018).

3.1.2 *Fusarium verticillioides*

O gênero *Fusarium* é composto por aproximadamente 1500 táxons, dentre as categorias de espécies e subespécies, pertence ao filo Ascomycota e comumente habita o solo, onde sobrevive por longos períodos (TINOCO, 2010).

A espécie caracteriza-se morfológicamente pela presença de microconídios em grandes cadeias produzidas a partir de monofiálides. é a representação do estágio

anamorfo da espécie *Gibberella moniliformis*, pertencendo ao complexo *Gibberella fujikuroi*, da antiga seção *Liseola*, este grupo é subdividido em aproximadamente vinte espécies e oito populações biológicas, que diferenciam-se geneticamente, e são caracterizadas pelas letras de A à H. Sendo a A, à qual pertence o *F. verticillioides*, e a D as que produzem um maior nível de micotoxinas (CHANG, 2014).

F. verticillioides é um fungo micotoxigênico e fitopatogênico amplamente disseminado em diversas culturas, entretanto, sua patogenicidade em milho, é de extrema relevância pelas inúmeras perdas econômicas. É o agente etiológico da podridão de colmo, que pode ser identificada pelo surgimento de lesões necróticas de coloração salmão, e dos grãos ardidos, reflexo das podridões de espiga (SABATO e FERNANDES, 2014).

O patógeno acumula micotoxinas nos tecidos infectados, ocasionando sérias consequências a saúde humana e animal, as fumonisinas são as micotoxinas de maior relevância devido sua toxicidade, podendo causar, imunossupressão, neurotoxicidade, além de ação clastogênica. A infecção tem origem ainda no campo, durante a fase de maturação fisiológica, prosseguindo nas etapas de colheita, secagem e armazenagem (QUEIROZ et al., 2013).

São evidenciadas na literatura diversas séries de fumonisinas, agrupadas por sua estrutura, A (A₁ – A₄), B (B₁-B₄), C (C₁-C₄) e P. No entanto as comumente encontradas são as Fumonisinas B₁ e B₂ (LINO et al.1999). As fumonisinas B₁ e B₂ são diésteres do ácido tricarbálico e álcoois polihídricos, diferenciando-se pela variação do grupo hidroxil. Como estas micotoxinas não absorvem a luz ultravioleta, requerem a derivação para serem analisadas e quantificadas (BECKER; BADIALE-FURLONG, 2019).

3.2 PRODUTOS NATURAIS

As plantas produzem diversos compostos orgânicos que não possuem função direta em seu crescimento e desenvolvimento, esses compostos são denominados metabólitos secundários, e em sua grande maioria, pertencem quimicamente a três

grandes grupos, terpenos, fenólicos e alcaloides. A atividade biológica de tais compostos, está relacionada a sua característica lipofílica e a capacidade de formar complexos com enzimas ou inibi-las, e aos efeitos toxicológicos gerados, comprometendo a integridade da membrana celular de microrganismos e a extinção de radicais livres (MANGALAGIRI et al., 2021).

Os OEs são uma mistura de metabólitos secundários de baixo peso molecular, que podem ser extraídos de diversas partes da planta como folhas, flores, sementes, frutos ou caule. Sua composição química sofre variação em decorrência da parte da planta extraída ou da espécie vegetal, pois fatores como clima, local de cultivo, estocagem e coleta podem influenciar nos compostos formados (MIRANDA et al., 2016).

Caracterizam-se como líquidos límpidos, hidrofóbicos e voláteis, que devem ser armazenados em recipientes fechados e com ausência de luz, pois facilmente podem sofrer oxidação, fotoisomerização, peroxidação, fotociclização, decomposição de álcoois e hidrólise de cetonas (MISHRA et al., 2020).

3.2.1 *Citrus aurantium bergamia*

As frutas cítricas são membros da família Rutaceae e fazem parte de uma das culturas mais difundidas no mundo, sendo comumente encontradas em regiões tropicais, onde o clima quente e úmido, além do regime pluvial, favorecem seu crescimento (ARAÚJO, 2019).

A bergamota (*C. aurantium bergamia*) é uma fruta típica do sul da Itália, e seu nome deve-se a cidade de Bérgamo, na Lombardia (KOSHIMA, 2015). Possui importantes compostos bioativos como compostos fenólicos, flavonoides e vitaminas (RAHNAMA et al., 2014). A planta caracteriza-se por apresentar folhas grandes, que se assemelham as do limão, flores brancas e frutos com casca amarela e esférica. Os principais países produtores são a Itália, Costa do Marfim, Argentina e Brasil (KOSHIMA, 2015).

A casca das frutas cítricas compreende entre 40 a 50% do peso da fruta, e é o principal resíduo gerado no processamento de sucos e enlatados. Além disso, a

casca é a matéria-prima do OEB, e possui um alto rendimento quando comparado a outros óleos, chegando a 3,0 kg de óleo por tonelada de casca (SINGH et al., 2021).

O OEB pode ser obtido por meio de prensagem a frio ou raspagem da casca e apresenta em sua composição maior quantidade de compostos oxigenados em relação a outras frutas cítricas. Os constituintes de maior destaque são o Limoneno (25 - 53%), o Linalol (2 - 20%), Acetado de linalila (15 – 40%) γ -Terpineno e β -Pinenol (ARAÚJO; FARIAS, 2003).

3.2.2 *Syzygium aromaticum*

O cravo-da-índia (*S. aromaticum*) é uma planta pertencente à família Myrtaceae, cujo nome sofre variações em decorrência da classificação adotada. É uma espécie nativa da Indonésia que apresenta-se como uma árvore de copa alongada, e mede entre 10 e 20 metros de altura (COSTA et al., 2011). Suas folhas são ovaladas e lisas e as flores formam cachos avermelhados agrupados, seus frutos são alongados e possuem um odor forte e característico (FROHLICH et al., 2019). A parte comumente comercializada desta especiaria são os botões florais, que começam a ser produzidos apenas quatro anos após o plantio da árvore, esses devem ser colhidos no período de maturação, antecedendo sempre a floração (RADUNZ et al., 2019).

O principal composto presente no OEC é o eugenol (4-Allyl-2-methoxyphenol), que pode representar até 95% da composição química (HABTEMARIAM, 2019). Diversos estudos relatam propriedades anti-inflamatórias, anestésicas, inseticida, acaricida e fungicida deste composto (SHANG et al., 2020).

A escolha do método de extração é um fator determinante na manutenção da composição química e da atividade biológica dos compostos presentes no OEC, uma vez que, por tratarem-se de compostos fenólicos, estes são sensíveis a temperatura. O método mais eficaz para extração é a prensagem a frio (HABTEMARIAM, 2019).

3.2.3 *Melaleuca alternifolia*

O gênero *Melaleuca* pertence à família Myrtaceae, que inclui aproximadamente 100 gêneros e mais de 3000 espécies, nativas da Austrália. A espécie *alternifolia* é conhecida popularmente como árvore do chá, e sua floração ocorre comumente em áreas de pântano e próxima a rios. É uma árvore pequena que atinge no máximo sete metros de altura, sua casca é fina e suas folhas afiladas com aproximadamente 0,02 m de comprimento (LEMOS, 2008).

O nome popular, árvore do chá, foi dado pois suas folhas eram utilizadas pelos aborígenes do sul da Austrália na preparação de um chá aromático, cuja as folhas eram maceradas e ficavam emergidas em água durante horas ou dias, e após isso a imersão era utilizada no tratamento de enfermidades (OLIVEIRA et al., 2015).

O OEM consiste em uma mistura complexa de monoterpenos e terpenóides, dentre os quais destacam-se o Terpinen-4-ol, seu componente majoritário. (HENDGES et al., 2021). Essa classe de compostos fornece atividade biológica as plantas deste gênero, relatadas em diversos estudos como antioxidantes, antivirais, antibacterianos e antifúngicos (CHIDI; BOUHOUDAN; KHADDOR, 2020).

O método de extração utilizado para obtenção do OEM é a hidrodestilação, e assim como nos demais casos, a composição química varia de acordo com a região de cultivo e o método de extração (FELIPE et al., 2017).

3.2.4 *Pogostemon cablin*

O patchouli (*P. cablin*) é uma planta nativa do sudoeste asiático, proveniente de países com clima predominantemente tropical. É membro da família Lamiaceae, e caracteriza-se como uma planta aromática, perene e ereta, cujo a altura pode variar entre 1 a 1,5 metros (HU et al., 2006).

O OEP é composto por uma mistura de sesquiterpenoides, triterpenoides, esteroides, flavonoides, alcaloides e glicosídeos fenilpropanoides (DAI et al., 2018). O principal componente do OEP, responsável pelo aroma lenhoso típico de patchouli, é um álcool sesquiterpeno, o Patchoulol, podendo também ser observado o D-, E- e J-Patchouleno (CHEN et al., 2014).

O OEP destaca-se entre os dezoito principais OEs de maior importância

econômica a nível mundial, sendo extremamente utilizado na indústria de perfumaria, por conferir estabilidade às fragrâncias. Quanto as propriedades medicinais, diversos estudos relatam que o patchouli possui efeitos anti-inflamatório, antidepressivo, sedativo, tripanocida e antibacteriano (SANTOS et al., 2010).

3.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os OEs são utilizados como fonte de compostos naturais que possuem atividade biológica, atuando como antimicrobianos, antioxidantes, antissépticos e anti-inflamatórios (GOUDJIL et al., 2020).

Abduhallahi et al. (2020), relataram a atividade antimicrobiana do OE de gengibre contra fitopatógenos (*Fusarium oxysporum*, *Pyricularia oryzae*, *Colletotrichum falcatum*, *Ganoderma boninense*, *Rigidoporus microporus*, *Xanthomonas oryzae*, *Ralstonia solanacearum*, *Bacillus* sp., *Klesbiella* sp.), os resultados indicaram que o gengibre possui efeito antifúngico, inibindo o crescimento micelial de *F. oxysporum* em 50,38% na menor concentração testada (1 µL/mL), além de *C. falcatum* (45,62%), *P. oryzae* (42,62%), *R. microporus* (33,46%) e *G. boninense* (27,46%). Como antibacteriano o OE de gengibre também denotou resultados significativos, apresentando CIM de 100 µL/mL contra as cepas testadas.

Mou et al. (2021), realizaram avaliação da atividade antifúngica de *Artemisia argyi*, *Alpinia officinarum* e *Cortex dictamni* contra fungos fitopatogênicos (*A. flavus*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria alternata* e *Molinilia fructicola*) por meio dos diâmetros das zonas de inibição. Os resultados obtidos, denotaram que todos os OEs apresentaram atividade antifúngica, *A. argyi* obteve melhores resultados para *A. flavus* reduzindo o crescimento micelial em 45,1%, já *A. officinarum* exibiu atividade proeminente para *R. stolonifer* (58,2%). O OE de *C. dictamni* destacou-se frente a *P. expansum* (46,4%), *B. cinerea* (45,6%), *A. alternata* (51,7%) e *M. fructicola* (49,7%).

Hu et al. (2019), realizaram a avaliação da atividade antifúngica sete OEs (canela, anis, cravo, citronela, hortelã-pimenta, pimenta e cânfora) contra *A. niger*,

Aspergillus oryzae e *Aspergillus ochraceus*, utilizando o método de macrodiluição para determinar o MIC. As concentrações testadas variaram entre 16 e 0,0,313 mg/mL de OE. Os melhores resultados foram obtidos pelos OEs de cravo com CIM de 0,25 mg/mL para todas as cepas testadas, e canela 0,0625 mg/mL (*A. niger*) e 0,125 mg/mL (*A. oryzae* e *A. ochraceus*). Anis demonstrou boa atividade antifúngica para *A. ochraceus* (0,5 mg/mL), enquanto os demais OEs testados inibiram o crescimento fúngico em concentrações entre 1 – 2 mg/mL.

Mehrparvar et al. (2016), avaliaram a atividade antifúngica de onze OEs (*Citrus limonum*, *Citrus aurantium*, *Zataria multiflora*, *Satureja hortensis*, *Mentha pulegium*, *Mentha piperita*, *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare*, *Artemisia dracuncululus*, *Artemisia sieberi*, *Pelargonium roseum*) frente a *Agaricus bisporus* e seu patógeno *Lecanicillium fungicola*, pelo método da macrodiluição, avaliando a dose necessária para inibir 50% do crescimento micelial. Os OEs de *A. dracuncululus*, *C. aurantium* e *C. limonum*, não apresentaram diferenças significativas entre si, com concentrações de inibição de 2894, 2646 e 2379 $\mu\text{L/mL}$. Já *Z. multiflora* e *S. hortensis*, também não possuíram diferenças significativas, resultando em inibição com 85,61 e 118,14 $\mu\text{L/mL}$. *Z. multiflora* apresentou a melhor capacidade de inibição em comparação aos demais OEs. O OE de *P. roseum* mostrou-se o mais eficaz após *Z. multiflora* e *S. hortensis* (196,81 $\mu\text{L/mL}$). Para *A. graveolens*, *M. pulegium*, e *M. piperita* os resultados foram 408,40, 407,98 e 402,23 $\mu\text{L/mL}$, e não houveram diferenças significativas entre eles. *A. sieberi* apresentou concentração de 728,04 $\mu\text{L/mL}$ e *F. vulgare* de 933,28 $\mu\text{L/mL}$, diferindo-se dos demais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ÓLEOS ESSENCIAIS

4.1.1 Obtenção dos Óleos Essenciais

Os OEs de *C. aurantium bergamia*, *S. aromaticum*, *M.alternifolia* e *P. cablin* foram adquiridos da linha de óleos essenciais orgânicos BioEssência®. Os OEs de *M. alternifolia*, *S. aromaticum* e *P. cablin* foram extraídos por meio de destilação à vapor das folhas, já o de *C. aurantium bergamia* por meio de prensagem a frio da casca.

4.1.2 Análise dos Óleos Essenciais e Identificação Química

A caracterização da composição química dos OEs foi realizada na Central Analítica da Universidade de São Paulo (USP) através da técnica de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (CG-EM). A quantificação de cada um dos constituintes foi estimada pela normalização da área (%) calculada pela da área dos picos no cromatograma organizados em ordem de eluição. A identificação dos picos foi realizada pela comparação dos espectros de massas com os espectros existentes na literatura (ADAMS, 2007), com espectros do banco de dados do cromatógrafo e, também, pela comparação dos índices de retenção com aqueles da literatura. Os índices de retenção foram determinados utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras, utilizando a equação de Van Den Dool e Kratz (1963).

4.1.3 Preparação dos Óleos Essenciais

As concentrações de uso dos óleos essenciais foram ajustadas através da diluição em solução estéril de Tween 80 a 0,01% conforme preconizado por Nguiefack et al., (2009), afim de obter 32000 a 62,5 µg/mL para os óleos essenciais de *C.*

aurantium bergamia, *M. alternifolia* e *P. cablin* e 8000 a 15,62 µg/mL para *S. aromaticum*.

4.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Os isolados de *A. flavus* e *F. verticillioides* foram obtidos do laboratório de toxicologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), e armazenados em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), sob refrigeração a temperatura de 8 °C. A esporulação foi realizada através do cultivo do isolado em meio BDA para *A. flavus* e Ágar Sabouraud para *F. verticillioides*. A suspensão conidial foi preparada a partir de uma cultura de 7 dias, adicionando solução salina (0.9%) estéril e realizando a raspagem da superfície para liberar os conídios do micélio fúngico. A contagem do inóculo foi realizada em câmara de Neubauer e ajustada para 10⁵ conídios/mL.

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Para determinação da CIM e CFM utilizou-se o método de referência CLSI M38-A2 (2008). Os óleos essenciais de *C. aurantium bergamia*, *S. aromaticum*, *M. alternifolia* e *P. cablin* foram diluídos em meio de cultura RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute – 1640) com L-glutamina sem bicarbonato, tamponado com 0.165 M de ácido 3-[N-morfolino]-Propanosulfônico (MOPS). Diluições seriadas foram realizadas utilizando uma microplaca de 96 poços contendo o meio de cultura e a suspensão de 10⁵ de conídios/mL e incubadas a 28 °C por 72 horas. Além disso, incluiu-se o controle de crescimento composto pelo meio de cultura com a suspensão de conídios sem a presença do OE e o controle negativo apenas o meio de cultura.

Os ensaios para determinação da CFM foram realizados em uma placa contendo meio BDA para *A. flavus* e Ágar Sabouraud para *F. verticillioides*. Adicionaram-se 10 µL da CIM, e todas as concentrações acima, mais o controle

positivo e negativo. As placas foram incubadas por 72 horas a 28 °C. Tanto a CIM quanto a CFM foram definidas como a menor concentração em que não houve crescimento fúngico visual. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4 INTERAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Para avaliação da ação combinada dos OEs de cravo-da-índia e árvore do chá utilizou-se o método de Checkboard através da concentração inibitória fracional (CIF) descrito por NIKKAH et al. (2017).

Realizou-se o método bidimensional em placa de 96 poços, gerando um tratamento: cravo-da-índia/melaleuca, além do controle negativo (apenas o meio de cultura) e controle de crescimento (meio de cultura e inóculo sem a presença de OEs). A microplaca foi incubada a 28 °C por 72 horas. A CIM foi definida como a menor concentração de tratamento que inibiu o crescimento visual do fungo. Cada teste foi realizado em triplicata.

O CIF foi calculado da seguinte forma: CIF do composto A (CIF A) = CIM (A) em combinação / CIM (A) sozinho; Onde A e B são os OEs de *M. alternifolia* e *S. aromaticum*, respectivamente. Os resultados obtidos foram interpretados da seguinte forma: efeito sinérgico ($CIF I \leq 0.5$); efeito aditivo ($0.5 < CIF I \leq 1$); sem efeito interativo ($1 < CIF I \leq 4$) e efeito antagônico ($CIF I > 4$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os OEs são misturas complexas de compostos orgânicos voláteis de baixo peso molecular, sintetizados por plantas, que incluem principalmente terpenos, terpenóides, fenilpropanóides, aldeídos, ésteres, álcoois e cetonas, cuja atividade biológica sofre variações em decorrência da configuração estrutural das moléculas (SILVA et al., 2021). Sua composição química e o percentual dos compostos podem ser influenciadas por fatores climáticos, geográficos, entre as espécies e partes da mesma planta (MATOS et al., 2020; BLANK et al., 2011; GASPARETTO et al., 2017; PANDEY et al., 2014).

Os compostos identificados pela cromatografia gasosa para os OEs de *C. aurantium bergamia*, *M. alternifolia*, *P. cablin* e *S. aromaticum* encontram-se dispostos na Tabela 1.

OEB apresentou 15 compostos, cujos majoritários foram Limoneno (48,04 %), Acetato de linalil (36,7%) e Linalol (7,30%), corroborando com estes resultados Franceschi et al. (2004) relataram Limoneno (38,36%), Acetato de linalil (34,71%) e Linalol (15,30%) e, Garbin et al. (2021) obtiveram 50,46% de Limoneno, 20,98% de Acetato de linalil e 6,9% de Linalol. Além disso, outros compostos encontrados em nosso estudo destacaram-se, como o β -Pineno (6,65%) e γ -Terpineno (6,38%), percentuais próximos ao encontrados por Han, Beaumont e Stevens (2017), onde observaram 9,0% para γ -Terpineno e 7,0% para β -Pineno.

Tabela 1 – Composição química dos OEs

Compostos	<i>C. aurantium bergamia</i>		<i>M. alternifolia</i>		<i>P. cablin</i>		<i>S. aromaticum</i>	
	*TR (min)	Área (%)	*TR (min)	Área (%)	*TR (min)	Área (%)	*TR (min)	Área (%)
Limoneno	10,579	48,04	-	-	-	-	-	-
Acetato de Linalila	20,635	36,97	-	-	-	-	-	-
Linalol	13,587	7,30	-	-	-	-	-	-
γ-Terpineno	11,744	3,34	11,758	12,09	-	-	-	-
β-Pineno	8,442	2,51	8,429	0,19	-	-	-	-
Terpinen-4-ol	-	-	17,058	65,61	-	-	-	-
p-Cimeno	-	-	10,323	9,83	-	-	-	-
Terpineol	-	-	17,549	3,08	-	-	-	-
α-Terpineno	-	-	9,994	3,51	-	-	-	-
α-Pineno	6,952	0,25	6,921	1,48	-	-	-	-
Patchoulol	-	-	-	-	36,888	57,17	-	-
α-Guaieno	-	-	-	-	28,364	17,73	-	-
α-Bulneseno	-	-	-	-	31,104	17,00	-	-
Aromandendreno	-	-	-	-	28,947	1,20	-	-
α-Patchouleno	-	-	28,248	1,41	33,951	2,48	-	-
Eugenol	-	-	-	-	-	-	24,889	91,30
Farneceno	-	-	-	-	-	-	27,447	7,52
Outros	-	1,59	-	2,80	-	4,42	-	1,18
Total	-	100	-	100	-	100	-	100

Legenda: (*) Tempo de retenção expresso em minutos, (-) Composto não identificado na análise

Fonte: Autoria própria (2021)

Baldissera et al. (2014), descreveram a composição química do OEM, cujos compostos majoritários identificados foram Terpinen-4-ol (41,98 %) e γ -Terpineno (20,15 %), em nosso estudo, também observamos predominância de terpinen-4-ol (65,61%) e γ -Terpineno (12,09%). Além disso, foram descritos em menor quantidade componentes encontrados em nosso estudo, como α -Pineno, p-Cimeno e Terpineol. Outro estudo que obtiveram compostos semelhantes foi de Silva et al. (2019), onde, apresentou com 43,1 % de Terpinen-4-ol, 22,8% γ -Terpineno, 9,3% α -Terpineno, 5,2% α -Terpineol, 3,5 % Terpinoleno e 3 % α -Pineno.

No presente estudo, o OEP apresentou 16 compostos, dos quais três destacaram-se como majoritários, Patchoulol (57,17%), α -Guaieno (17,73%) e α -Bulneseno (17 %), além de outros compostos em menores quantidades, α -Patchouleno (2,48%) e Aromandendreno (1,20 %). Blank et al. (2011), avaliaram seis amostras de OEP e foram identificados dezessete compostos nas análises, dos quais os majoritários foram Patchoulol (47,26 - 62,97%), α -Bulneseno (6,12 – 9,83 %) e α -Guaieno (4,44 – 7,54%). Silva-Filho et al. (2016), obtiveram 22 compostos, com predominância de Patchoulol (38,5%), α -Bulneseno (20,37%) e α -Guaieno (12,31%), além de outros compostos também identificados em nosso estudo, como Norpatchoulol (8,33 %) e α -Patchouleno (4,91%).

O OEC apresentou como composto majoritário Eugenol, resultados semelhantes foram encontrados por Zhang et al. (2017), Achimón et al. (2021), Sharma et al. (2017) e Matos et al. (2020). Alguns compostos com percentuais menores variaram nos referidos estudos, entretanto, Pandey et al. (2014) justifica que alguns compostos estão presentes exclusivamente em determinadas partes da planta.

5.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E FUNGICIDA MÍNIMA PARA ÓLEOS ESSENCIAIS ISOLADOS

Os resultados obtidos no presente estudo (Tabela 2) demonstram que a CIM e CFM do OEC foram de 1000 $\mu\text{g/mL}$ para *A. flavus* e *F. verticilloides* e, o OEM apresentou CIM e CFM de 4000 e 8000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, para *F. verticillioides*.

Tabela 2 – CIM e CFM dos óleos essenciais isolados

Óleos essenciais	<i>A. flavus</i>		<i>F. verticillioides</i>	
	*CIM	*CFM	*CIM	*CFM
<i>C. aurantium bergamia</i>	32000	-	-	-
<i>S. aromaticum</i>	1000	1000	1000	1000
<i>M. alternifolia</i>	-	-	4000	8000
<i>P. cablin</i>	-	-	-	-

Legenda: (*) Resultados expressos em µg/mL, (-) não foram observados resultados nas concentrações testadas

Fonte: A autoria própria (2021)

S. aromaticum apresentou CIM e CFM de 1000 µg/ml para as duas cepas testadas, sobressaindo-se como o melhor agente antifúngico dentre os OEs investigados. Achimón et al. (2021), em seu estudo sobre composição química e propriedades antifúngicas de quatro OEs contra *F. verticillioides*, relataram que a partir da concentração de 500 µg/mL o OEC inibiu completamente o crescimento fúngico, além disso, evidenciou-se que este OE apresentou a maior inibição em concentrações mais baixas (70,4 %) em comparação aos demais OEs testados. Esses resultados são condizentes aos observados no presente estudo.

Santamarina et al. (2016), analisaram a atividade antifúngica dos OEs de *Laurus nobilis* e *S. aromaticum* contra fungos fitopatogênicos pós-colheita de arroz. O OEC apresentou melhor potencial como inibidor do crescimento de micélios na concentração de 300 µg/mL contra todas as cepas testadas (*A. alternata*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium equiseti* e *F. verticillioides*). Ma et al. (2019) ao avaliar a eficácia do OEC obteve como resultado a inibição de *F. oxysporum* em uma concentração de 340 µg/mL e de *Fusarium solani* de 560 µg/mL, além disso, essa atividade biológica foi atribuída ao Eugenol, composto encontrado em nosso estudo como majoritário (91,30%). Makhuvele et al. (2020) relata que o mecanismo de atuação do Eugenol contra fungos toxigênicos está relacionado a indução de apoptose precoce, por meio de condensação nuclear, ou tardia, por danos causados a membrana plasmática em hifas. Além disso, o composto pode ocasionar uma regulação negativa de genes do metabolismo secundário, como o regulador global,

lipase, metaloprotease, que são responsáveis pelo metabolismo de lipídeos e proteínas fúngicas.

M. alternofilia não apresentou atividade antifúngica frente a *A. flavus*, entretanto, o mesmo mostrou-se eficaz para *F. verticillioides*, com CIM de 4000 µg/mL e CFM de 8000 µg/mL. Resultados semelhantes foram encontrados por Mongiano et al. (2021) ao avaliar a atividade antifúngica contra cepas de *Fusarium fujikuroi* in vitro de compostos isolados de OEs, onde, observou que 0,1% de Terpinen-4-ol, composto que corresponde a 68,69% do nosso OE, foi capaz de inibir completamente o crescimento das cepas testadas. Além disso, no referido estudo não foi observado fitotoxicidade em ensaios in vivo nas concentrações testadas, demonstrando uma possível utilização deste composto em campo. Os possíveis mecanismos de inibição fúngica do α -Terpineol relacionam-se ao vazamento de material celular, como ácidos nucleicos e proteínas, devido ao dano causado a membrana plasmática, promovendo morte celular. Sendo o grupo hidroxila o principal responsável por este aumento de permeabilidade (CHAUDHARI et al., 2020). Corroborando com isto Li et al. (2017) ao avaliar o mecanismo de ação antifúngica do OEM frente a *B. cinerea* observou danos as mitocôndrias, exibindo superfícies colapsadas, desordenadas e ásperas. Observaram ainda danos a membrana celular, que sofreu ruptura e vacuolização.

O OEP não denotou atividade biológica frente as cepas nas concentrações testadas. Embora o patchouli não tenha apresentado bons resultados como antifúngico no presente estudo, o mesmo tem sido relatado como agente antibacteriano, Lin, Lee e Chang (2016), realizaram um estudo com sete OEs frente ao crescimento de *Escherichia coli*, no qual patchouli destacou-se por apresentar CIM entre 0,01% e 0,05%. Reforçando estes dados, Hussein et al. (2011), observou uma CIM de 520 µg/mL para *Staphylococcus aureus*, 100,7 µg/mL para *Bacillus cereus*, 80,0 µg/mL para *Bacillus subtilis*, 310,3 µg/mL para *Bacillus pumilis*, 1200,00 µg/mL para *Pseudomonas aeruginosa*, 950,4 µg/mL para *Salmonella Poona* e 410,0 µg/mL para *E. coli*.

Já o OEB não denotou atividade frente a *F. verticillioides* e apresentou CIM de 32000 µg/mL para *A. flavus*, entretanto não foram testadas concentrações superiores para avaliação do efeito fungicida. Resultados análogos foram encontrados

por Zabka, Pavela e Prokinova (2014) que avaliou a atividade antifúngica de 20 OEs, utilizando o método de diluição em ágar, onde cada OE foi dissolvido em meio BDA na concentração de 1 µl/mL. O OEB não atingiu 50% do efeito inibidor contra nenhuma cepa testada (*A. niger*, *A. alternata*, *Stachybotrys chartarum* e *Cladosporium cladosporioides*). Entretanto, Simas et al. (2017) relataram a inibição do crescimento micelial de *B. cinerea* em tratamentos com Limoneno, obtendo 40% de redução com 1,25 µL/placa e 60% com 5,0 µL/placa. Em nosso estudo, a ausência de atividade antifúngica do OEB frente as cepas testadas, pode ser decorrência de outros compostos presentes no óleo, conforme exposto por Liang et al. (2018), os principais constituintes dos OEs podem apresentar atividade antagônica quando coexistem, além de contribuir para atividade antagônica geral do OE.

5.3 FIC DAS COMBINAÇÕES ENTRE ÓLEOS ESSENCIAIS PELO MÉTODO DE CHECKBOARD

Após observarmos uma atividade antifúngica efetiva do OEM e OEC frente a *F. verticillioides* de forma isolada, visamos avaliar os resultados destes OEs de forma interativa. Os resultados do Chekboard indicaram que os OEs combinados possuem efeito sinérgico em ambos os casos conforme demonstrado na Tabela 3. A combinação entre dois ou mais agentes podem interagirem de maneira distinta, resultando em um dos quatro possíveis efeitos, sendo estes sinérgico, aditivo, sem efeito interativo ou antagônico. Dentre eles, o mais importante é o efeito sinérgico, pois sua interação potencializa o efeito antimicrobiano, valendo-se da eficiência dos compostos combinados, possibilitando a redução na concentração utilizada. O mecanismo promovido pela sinergia, é decorrente da complexidade das estruturas dos compostos que atuam paralelamente afetando múltiplos processos bioquímicos nos microrganismos. Além disso, a complexa combinação que decorre da variedade dos compostos químicos presentes no OEs reduz ainda mais os mecanismos de resistência microbiana (SHARMA et al., 2020).

Tabela 3 – FIC e efeitos de interações duplas de OEs frente a *F. verticillioides*

Combinação dos óleos essenciais (A/B)	*CIM A (sozinho)	*CIM A (na presença de B)	FIC (Checkboard)
OEM/OEC	4000	1000	0,250
OEC/OEM	1000	250	0,250

Legenda: (*) Resultados expressos em µg/mL
 Fonte: Autoria própria (2021)

Nikkhah et al. (2017), também encontraram resultados satisfatórios na combinação dos OEs de tomilho, canela, alecrim e manjerona. Para tal, realizaram-se combinações duplas usando teste de microdiluição em Checkboard. Foram gerados seis tratamentos (tomilho/alecrim, tomilho/manjerona, canela/alecrim, canela/manjerona, alecrim/manjerona e tomilho/canela) que foram testados frente aos fungos *B. cinerea* e *P. expansum*. As combinações mais eficazes apresentaram efeito sinérgico CIF = 0,5 contra *B. cinerea* e compreenderam os tratamentos tomilho/alecrim e tomilho canela, já as combinações tomilho/manjerona e canela/manjerona exibiram efeito aditivo. Para *P. expansum* canela/tomilho (CIF = 0,25) e canela/alecrim (CIF = 0,5) resultaram em efeitos sinérgicos, enquanto manjerona/ canela e manjerona/tomilho, apresentaram efeitos aditivos.

Clemente, Aznar e Nerín (2019), avaliaram as propriedades sinérgicas dos OEs de mostarda e canela por meio do teste de microdiluição em Chekboard, frente a *Penicillium roqueforti*, *Penicillium verrucosum*, *F. oxysporum*, *P. expansum*, *Botryotinia fuckeliana*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *Geotrichum* spp. e *Rhizopus stolonifer*. A combinação não demonstrou efeito antagônico frente a nenhuma das cepas testadas, para *P. roqueforti* a combinação não apresentou efeito interativo, já para *A. flavus*, *B. fluckeliana*, *R. stolonifer*, *A. niger*, *P. expansum*, *Geotrichum* spp., *F. oxysporum*, a combinação demonstrou efeito aditivo. Entretanto, apenas frente a *A. ochraceus* o resultado foi sinérgico.

Poucos estudos relatam os mecanismos de inibição da combinação de OEs, portanto os mecanismos comumente aceitos referidos a sinergia dos compostos, indicam a inibição sequencial de uma via bioquímica, inibição enzimática, e aumento

da permeabilidade da membrana celular, que permite maior permeação de compostos antimicrobianos. Portanto a combinação dos compostos agindo de maneira sinérgica, reduzirá a concentração necessária para produzir o mesmo efeito de forma isolada (BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

6 CONCLUSÃO

Os compostos majoritários citados na literatura foram encontrados em todos os OEs estudados, entretanto, alguns compostos apresentaram variações qualitativas e quantitativas.

O OEC denotou boa atividade antifúngica nas cepas testadas, corroborando com resultados descritos por outros autores. O OEM demonstrou atividade frente *F. verticillioides*, entretanto bergamota e patchouli não apresentaram atividade antifúngica nas concentrações testadas.

Quanto a interação dos OEs de cravo-da-índia e árvore do chá, resultados promissores foram observados, sendo que ambos demonstram atuar de forma sinérgica frente a *F. verticillioides*, possibilitando redução na concentração.

Deste modo, o presente estudo evidencia a necessidade de pesquisas futuras no intuito de avaliar o efeito in natura desses OEs, compreender os mecanismos de ação promovidos pela sinergia e averiguar se o efeito sinérgico apresentado é proveniente dos compostos majoritários ou da mistura dos compostos.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, A. et al. **Phytochemical profiling and antimicrobial activity of ginger (*Zingiber officinale*) essential oils against important phytopathogens**. 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535220303658>>. Acesso em: 26 jul. 2021.
- ACHIMÓN, F. et al. **Chemical composition and antifungal properties of commercial essential oils against the maize phytoathogenic fungus *Fusarium verticillioides***. 2021. Disponível em: <<https://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina-microbiologia-372-avance-resumen-chemical-composition-antifungal-properties-commercial-S0325754121000018>>. Acessado em: 28 jul. 2021.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th Edition. Illinois: Allured Publishing, Carol Stream, 2007. 804 p.
- ARAÚJO, J. S. F. **Micropartículas de óleo essencial de laranja doce (*Citrus aurantium var. dulcis*) em matriz de gelatina e maltodextrina**. 2019. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Campina Grande. Pombal: PB. Disponível em: <<http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/xmlui/handle/riufcg/6336>>. Acesso em: 03 nov. 2019.
- ARAÚJO, J. M.A.; FARIAS, A.P. S. F. **Redução do teor de limoneno e bergapteno do óleo essencial de bergamota adsorvido em sílica gel pelo CO₂ – supercítico**. 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v23n2/v23n2a02.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2019.
- BALDISSERA, M. D. et al. **Effect of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on the longevity and immune response of rats infected by *Trypanosoma evansi***. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528814000885>>. Acesso em: 24 jul. 2021.
- BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H, R. **Essential oils in combination and their antimicrobial properties**. 2012. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/17/4/3989>>. Acessado em: 26 jul. 2021.
- BAPTISTA, P.; VENÂNCIO, A. **Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos**. Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, Lda., 1ed. 2003. Disponível em: <<https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/33398/1/document27481pdf>>. Acesso em: 18 set. 2019.
- BARROS, N. de L. **Caracterização morfológica e molecular de isolamentos de *Fusarium* associados a grão de milho**. 2013. Dissertação (Mestrado).

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns: PE. Disponível em: <<http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede/bitstream/tede2/6164/2/Nielson%20de%20Lima%20Barros.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2019.

BECKER, T. A.; BADIALE-FURLONG, E. **Fumonisina B1 e B2 em arroz: um estudo de metodologia e ocorrência**. 2019. Disponível em: <<https://propesp.furg.br/anaismpu/cd2010/pos/1357.pdf>>. Acesso em: 02 nov. 2019.

BLANK, A. F. et al. **Chemical characterization of the essential oil from patchouli accessions harvested over four seasons**. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669011000409>>. Acesso em: 25 jul. 2021.

BRASIL, Food ingredients. **As micotoxinas**. Disponível em: <www.revista-fi.com>. Acesso em: 08 out. de 2019.

CASTRO, I. C. D. et al. **Micotoxinas na produção de suínos**. 2015. Disponível em: <http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/PDF/pdf6_2015/6-13.pdf>. Acesso em: 26 out. 2019.

CHAUDHARI, A. et al. **Assessment of chitosan biopolymer encapsulated α -Terpineol against fungal, aflatoxin B₁ (AFB₁) and free radicals mediated deterioration of store maize and possible mode of action**. 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814619321533>>. Acesso em: 19 jul. 2021.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Aflatoxinas e outras Micotoxinas**. São Paulo, 2003. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-transmitidas-por-agua-e-alimentos/doc/toxinas/aflatoxinas.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2019.

CHANG, S. C. **Identificação de Isolados de *Fusarium verticillioides* Micotoxigênicos em Grãos de Milho no Estado de Pernambuco**. 2014. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife: PE. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/27647/1/TESE%20Susane%20Cavalcanti%20Chang.pdf>>. Acesso em: 16 nov. de 2019.

CHEN, X. et al. **PatSWC4, a methyl jasmonate-responsive MYB (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog) – related transcription factor, positively regulates patchoulol biosynthesis in *Pogostemon cablin***. 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669020305884>>. Acesso em: 06 jul. 2021.

CHEN, Y. et al. **Dynamic accumulation of sesquiterpenes in essential oil of *Pogostemon cablin***. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102695X15000034>>. Acesso em:

10 jul. 2021.

CHIDI, F.; BOUHOUDAN, A.; KHADDOR, M. **Antifungal effect of the tea tree essential oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Penicillium griseofulvum* and *Penicillium verrucosum***. 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364720300616>>. Acesso em: 11 jul. 2021.

CLEMENTE, I; AZNAR, M.; NERÍN, C. **Synergistic properties of mustard and cinnamon essential oils for the inactivation of foodborne moulds in vitro and on Spanish bread**. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160518304586>>. Acesso em: 26 jul. 2021.

CORTEZ, L. E. R. et al. **Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (*Verbenaceae*) e *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (*Poaceae*)**. O Mundo da Saúde, São Paulo - 2015;39(4):433-440. Disponível em: <http://www.saocamilo-sp.br/pdf/mundo_saude/155572/A04.pdf>. Acesso em: 18 set. de 2019.

COSTA, A. R. T. et al. **Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos**. 2011. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbpm/a/qnJd5sDFvnHS6yv5nGWRF4g/?lang=pt>>. Acesso em: 08 jul. 2021.

DAI, O. et al. **Sesquiterpenoids from the aerial parts of *Pogostemon cablin***. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1874390017306766>>. Acesso em: 10 jul. 2021.

EINLOFT, T. C. **Biocontrole de *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* por *Bacillus spp.* isolados de plantas de milho**. Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2016. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/153322>>. Acesso em: 18 set. 2019.

FELIPE, L. O. et al. **Lactoferrin, chitosan and *Melaleuca alternifolia* – natural products that show promise in candidiasis treatment**. 2017. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v49n2/1517-8382-bjm-49-02-0212.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2019.

FRANCESCHI, E. et al. **Phase behavior of lemon and bergamot peel oils in supercritical CO₂**. 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381204002742>>. Acesso em: 21 jul. 2021.

FROHLICH, P. C. et al. **Evaluation of the effects of temperature and pressure on the extraction of eugenol from clove (*Syzygium aromaticum*) leaves using supercritical CO₂**. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0896844618304674> >. Acesso em: 08 jul. 2021.

GARBIN, V. P. et al. **Chemical characterization and *in vitro* anthelmintic activity of *Citrus bergamia* Risso and *Citrus X paradisi* Macfad essential oil against *Haemonchus contortus* Kirby isolate**. 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X21000486>>. Acesso em: 21 jul. 2021.

GASPARETTO, A. et al. **Seasonal variation in the chemical composition, antimicrobial and mutagenic potential of essential oils from *Piper cernuum***. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016307154>>. Acesso em: 25 jul. 2021.

GASPERINI, A. M. **Efeito de óleos essenciais sobre o crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus***. 2014. Dissertação (Mestrado) – UNICAMP, Campinas, SP. Disponível em: <http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/CAMP_e8079dd87cf75dde6c86a9202a0ed376 >. Acesso em: 03 nov. 2019.

GERHARDT, C. et al. **Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana**. Braz. J. Food Technol., IV SSA, maio 2012, p. 11-17. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/bjft/a/dWZYLJpXJWXwN9HKTfhWTrD/?lang=pt>>. Acesso em: 08 out. de 2019.

GOUDJIL, M. B. et al. **Biological activities of essential oils extracted from *Thymus capitatus* (Lamaceae)**. 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0254629919314073>>. Acesso em: 26 jul. 2021.

GUAZZELLI, L. S. **Estudo etiológico, clínico, laboratorial e epidemiológico da bola fúngica pulmonar por *Aspergillus* spp**. 2011. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre: RS. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/30929>>. Acesso em: 16 nov. 2019.

HABTEMARIAM, Solomon. **Medicinal Foods as Potential Therapies for Type – 2 Diabetes and Associated Diseases: The Chemical and Pharmacological Basis of their Action**. Cambridge: Academic Press, 2019.

HAN, X.; BEAUMONT, C.; STEVENS, N. **Chemical composition analysis and *in vitro* biological activities of ten essential oils in human skin cells**. 2017. Disponível em: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214008517300123>>. Acesso em: 21 jul. 2021.

HENDGES, C. et al. **Antifungal activity and control of the early blight in tomato tea tree essential oil**. 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219421001988>>. Acesso em: 11 jul. 2021.

HU, L. F. et al. **GC-MS fingerprint of *Pogostemon cablin* in China**. 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708505006278>>. Acesso em: 10 jul. 2021.

HU, F. et al. **Comparison of antifungal activity of essential oils from diferente plants against three fungi**. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691519306118>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

HUSSEIN, A. I. et al. **Antibacterial activity of some Laminaceae essential oils using resazurin as indicator of cell growth**. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381000349X>>. Acesso em: 14 jul. 2021.

IDCB.INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS. UFMG. **Morfologia, fisiologia e classificação dos fungos**. 2019. Disponível em: <<http://microbiologia.yolasite.com/resources/morfologia%20e%20fisiologia%20fungos.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2019.

KOSHIMA, C. C. **Determinação de dados de equilíbrio líquido-líquido e modelagem termodinâmica de sistemas modelo, a 25°C**. 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Pirassununga: SP. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74132/tde-11082011-092748/publico/ME5111497.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2019.

LEE, K. G; SHIBAMOTO, T. **Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]**. 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814601001613#:~:text=The%20antioxidant%20property%20of%20the,the%20160%20%CE%BCg%2Fml%20level.>>. Acesso em: 06 jul. 2021.

LEMOS, D. R. H. **Influência da temperatura do ar de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa: MG. Disponível em: <<https://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/3514/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 03 nov. 2019.

LI, Y. et al. **Tea tree oil exhibits antifungal activity against *Botrytis cinerea* by affecting mitochondria**. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617307513>>. Acesso em: 21 jul. 2021.

LIANG, J. Y. et al. **Antagonistic activity of essential oils and their main constituents extracted from *Ajania fruticulosa* and *A. potaninii* against *Ditylenchus destructor***. 2018. Disponível em: <https://brill.com/view/journals/nemy/20/10/article-p911_1.xml>. Acesso em: 22 jul. 2021.

LIMA, I. de O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Brazilian Journal of Pharmacognosy 16(2): 197-201, Abr./Jun. 2006.

LIN, P.C.; LEE, J. J.; CHANG, I. J. **Essential oils from Taiwan: Chemical composition and antibacterial activity against *Escherichia coli***. 2016. Disponível em: <<https://pdf.sciencedirectassets.com/287519/1-s2.0-S1021949816X00038/1-s2.0-S1021949816300370>>. Acesso em: 14 jul. 2021.

LINO, C. M. et al. **Fumonisin**: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. 1999. Disponível em: <http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/PDF/pdf12_2004/552_181_192.pdf>. Acesso em: 03 nov.2019.

LINS, J. L. F. et al. Ocorrência de fungos de campo e armazenamento em ingredientes e rações para suínos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. Mossoró. v. 9, n.2, p. 14 - 20, abr-jun, 2014.

MA, Y. N. et al. **The beneficial use of essential oils from buds and fruit of *Syzygium aromaticum* to combat pathogenic fungi of *Panax notoginseng***. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669019301864>>. Acesso em: 11 jul. 2021.

MAGNOLI, A. P. et al. **Validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the detection of aflatoxin B₁ residues in broiler liver**. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754117300986>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

MAKHUVELE, R. et al. **The use of plant extracts and their phytochemicals for control of toxigenic fungi and mycotoxins**. 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844020321344>>. Acesso em: 19 jul. 2021.

MANGALAGIRI, N. et al. **Antimicrobial activity of essential plant oils and their major componentes**. 2021. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844021009385>>. Acesso em: 18 jul. 2021.

MATOS, L. F. et al. **Chemical composition and insecticidal effect of essential oils from *Illium verum* and *Eugenia caryophyllus* on *Callosobruchus maculatus* in cowpera**. 2020. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669020300042>>. Acesso em: 21 jul. 2021.

MEHRPARVAR, M. et al. **Antifungal activity of essential oils against mycelial growth of *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola* and *Agaricus bisporus***. 2016.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669016300796>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. **Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas**. 2016. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rca/v47n1/0045-6888-rca-47-01-0213.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2019.

MISHRA, A. et al. **Combination of essential oils in dairy products: A review of their functions and potential benefits**. 2020. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820311051>>. Acesso em: 18 jul. 2021.

MOGIANO, G. et al. **Application of plant-derived bioactive compounds as seed treatments to manage the rice pathogen *Fusarium fujikuroi***. 2021. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S026121942100209X>>. Acesso em: 14 jul. 2021.

MONTEIRO, M. H. D. A. et al. Óleos essenciais terapêuticos obtidos de espécies de Melaleuca L. (*Myrtaceae* Juss.). **Revista Fitos**. Rio de Janeiro, vol. 8(1):1-72, Jan-Mar, 2013.

MORAES, A. M.L. de. et al. Micologia. In: MOLINARO, E. M. et al. **Conceitos e Métodos para Formação de Profissionais em Laboratório de Saúde**. 2009.

Disponível em: <<http://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/cap4.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2019.

MOU, L. et al. **Component analysis and antifungal activity of three Chinese herbal essential oils and their application of postharvest preservation of peach fruit**. 2021. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643821012421>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi.** Approved Standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2002.

NIKKHAH, M. et al. **Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit.** 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160517302891>>. Acesso em: 26 jul. 2021.

OLIVEIRA, E. S.; VIANA, F. M. P.; MARTINS, M. V. V. **Alternativas a fungicidas sintéticos no controle da antracnose da banana.** *Summa Phytopathologica*, v.42, n.4, p.340-350, 2016.

OLIVEIRA, M. I. et al. **Extração e caracterização do óleo essencial de *Melaleuca* e desenvolvimento de uma formulação semi-sólida de uso tópico.** 2015. Disponível em: <<https://online.unisc.br/seer/index.php/jovenspesquisadores/article/viewFile/5806/4048>>. Acesso em: 03 nov. 2019.

PANDEY, V. et al. **Compositional variation in the leaf, flower and stem essential oils of *Hyssop* (*Hyssopus officinalis* L.) from Western-Himalaya.** 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210803313000882>>. Acesso em: 25 jul. 2021.

PEZZINI, V. et al. **Incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho armazenados sob diferentes condições.** 2005. Disponível em: <<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v64n1/v64n1a14.pdf>>. Acesso em: 26 out. 2019.

PINTO, E. et al. **Antifungal activity of the essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species.** 2009. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmm/58/11/1454.pdf?expires=1625576946&id=id&accname=guest&checksum=1E76ECDE88FA0D025EE58946981D7764>>. Acesso em: 06 jul. 2021.

QUEIROZ, V. A. V. et al. **Ocorrência de Fumonisinias em Milho Armazenado em Propriedades Familiares da Região Central de Minas Gerais.** 2013. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/975580/1/circ198.pdf>>. Acesso em: 03 nov.2019.

RADUNZ, M. et al. **Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil.** 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618317588>>. Acesso em: 08 jul. 2021.

RAHNAMA, S. et al. **Anti-amnesic activity of *Citrus aurantium* flowers extract against scopolamine-induced memory impairments in rats**. 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10072-014-1991-2.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2019.

REIS, G. M. **Variabilidade Genética de Cepas de *Aspergillus flavus* em Amendoim**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. São Paulo: SP. Disponível:< https://teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tdc-29012010-092918/publico/GabrielaMartinsReis_Mestrado.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2019.

SABATO, E. DE O.; FERNANDES, F. T. **Doenças do Milho**. 2014. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/107246/1/Doencas-do-milho.pdf>>. Acesso em: nov. 2019.

SILVA, L. C. Micotoxinas em Grãos e Derivados. 2016. Disponível em:< http://www.agais.com/manuscript/ag0110_micotoxinas_em_unidades_armazenadoras.pdf>. Acesso em: nov. 2019.

SANTAMARINA, M. P. et al. **Commercial *Laurus nobilis* L. and *Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry essential oils against post-harvest phytopathogenic fungi on rice**. 2016. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815301341>>. Acesso em: 15 jul. 2021.

SANTOS, A. V. et al. **Mass multiplication of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth genotypes and increase of essential oil and patchoulol yield**. 2010. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669010001652>>. Acesso em: 11 jul. 2021.

SHANG, X. F. et al. **A value-added application of eugenol as acaricidal agent: The mechanism of action and safety evaluation**. 2020. Disponível em:< <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123220302605>>. Acesso em: 10 jul. 2021.

SHARMA, A. et al. **Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil**. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172316303097>>. Acesso em: 25 jul. 2021.

SHARMA, K. et al. **Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds**. 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669020304854>>. Acesso em: 26 jul. 2021.

SIMAS, D. L. R. et al. **Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit**. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669017300262>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

SINGH, B. et al. **Insights into the chemical composition and bioactivities of citrus peel essential oils**. 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996921001307>>. Acesso em: 11 jul. 2021.

SILVA-FILHO, S. E. et al. **Effect of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil on *in vitro* and *in vivo* leukocytes behavior in acute inflammatory response**. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332216310605>>. Acesso em: 25 jul. 2021.

SILVA, B. D. et al. **Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products**. 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174021000395>>. Acesso em: 21 jul. 2021.

SILVA, C. S. et al. **Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil in ground beef**. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816051830655X>>. Acesso em: 13 jul. 2021.

TRAVAGLIA, D. P. **Crescimento de *Aspergillus Flavus* e Produção de Aflatoxina em grãos de milho armazenados sob diferentes temperaturas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, 2011. Disponível em: <<https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/3584>>. Acesso em: 27 out. 2019.

TINOCO, M. L. P. **Silenciamento Trans - Específico *in vivo* entre fumo e o fungo fitopatogênico *Fusarium Verticillioides***. 2010. Tese (Doutorado) Brasília, DF. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/8468/1/2010_MariaLainePenhaTinoco.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2019.

ZABKA, M.; PAVELA, R.; PROKINOVA, E. **Antifungal activity and chemical composition of twenty essential oils against significant indoor and outdoor toxigenic and aeroallergenic fungi**. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653514006262>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

ZHANG, Y. et al. **Antibacterial and antibiofilm activities of eugenol from essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry (clove) leaf**

against periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401017311956>>. Acesso em: 25 jul. 2021.