



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

**EFICÁCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO (*THYMUS VULGARIS* L.) NO
CONTROLE *IN VITRO* DE *ASPERGILLUS FLAVUS***

MANUELLA OLIVEIRA NASCIMENTO

BRASÍLIA - DF

2020

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

MANUELLA OLIVEIRA NASCIMENTO

**EFICÁCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO (*THYMUS VULGARIS* L.) NO
CONTROLE *IN VITRO* DE *ASPERGILLUS FLAVUS***

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para obtenção do título
de Nutricionista pela Faculdade de Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Ernandes Rodrigues de Alencar

Brasília
2020

Dedico esse trabalho a minha família que esteve comigo me apoiando e me incentivando durante todo esse tempo e sem a qual eu não estaria aqui.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que souberam ser ótimos pais, amigos e conselheiros.

À minha irmã, que foi minha companheira durante as muitas horas em frente ao computador.

Às minhas adoráveis cadelas que me mantiveram de coração e mente aquecida.

Ao meu amado, que nas horas de aperto soube ser um bom ouvinte e um bom humorista.

Aos meus amigos e amigas que também me deram suporte substancial.

E ao meu professor orientador, que soube ser mais que um mestre, um amigo.

EPÍGRAFE

“O sucesso não é a chegada, mas o caminho percorrido” - Autor desconhecido.

RESUMO

Óleos essenciais (OE) são o resultado da extração de compostos voláteis de plantas aromáticas por diferentes técnicas, tendo eles diversas funções, como a de antifúngicos. Entre os OE que se mostram importante alternativa no controle de fungos está o OE de tomilho. Além disso, o fungo do gênero *Aspergillus flavus* é de grande interesse de se controlar, devido a seu potencial de sintetizar as aflatoxinas, que são compostos hepatocarcinogênicos e contaminantes de alimentos. Por isso, esse trabalho analisou a eficácia do OE de tomilho em diferentes concentrações (0 (controle), 250, 500, 1.000, 1.500 e 2.000 $\mu\text{L/L}$) no controle *in vitro* de *Aspergillus flavus* e o percentual de inibição do crescimento micelial (ICM) durante 22 dias. Como resultado, observou-se que apenas na concentração de 250 $\mu\text{L/L}$ houve crescimento do fungo, com uma ICM de 52,78%, enquanto nas outras concentrações (500, 1.000, 1.500 e 2.000 $\mu\text{L/L}$) não houve crescimento do fungo, com ICM de 100%. Concluiu-se que o OE de tomilho é parcialmente eficaz no controle de *Aspergillus flavus* na concentração de 250 $\mu\text{L/L}$ e totalmente eficaz em concentrações iguais ou superiores a 500 $\mu\text{L/L}$.

PALAVRAS-CHAVE: Óleos essenciais, óleo essencial de tomilho, *Aspergillus flavus*, fungos contaminantes de alimentos.

ABSTRACT

Essential oils (EO) are the result of the extraction of volatile compounds from aromatic plants by different techniques, having several functions, such as antifungals. Among the EOs that are shown to be a great strategy in the control of fungi is thyme EO. In addition, the fungus of the genus *Aspergillus flavus* is of great interest to control itself due to being highly hepatocarcinogenic and food contaminant. Therefore, this study analyzed the efficacy of thyme OE at different concentrations (0 (control), 250, 500, 1,000, 1,500 and 2,000 $\mu\text{L/L}$) in the in vitro control of *Aspergillus flavus* and the percentage of mycelial growth inhibition (MGI) for 22 days. As a result, it was observed that only at the concentration of 250 $\mu\text{L/L}$ there was fungus growth with an inhibition of mycelial growth (MGI) of 52.78%, while in the other concentrations (500, 1,000, 1,500 and 2,000 $\mu\text{L/L}$) there was no fungus growth, 100% MGI. It was concluded that thyme EO is partially effective in controlling *Aspergillus flavus* at a concentration of 250 $\mu\text{L/L}$ and fully effective at concentrations above 500 $\mu\text{L/L}$.

KEYWORDS: Essential oils, thyme essential oil, *Aspergillus flavus*, food contaminating fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curvas de regressão referentes ao efeito in vitro do óleo essencial de tomilho, em diferentes concentrações, no diâmetro das colônias de *A. flavus*, durante 22 dias, a 25 °C.---17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Equações de regressão e respectivos coeficientes de determinação referentes ao efeito in vitro do óleo essencial de tomilho, em diferentes concentrações, no diâmetro das colônias de *A. flavus* ("y") em função do tempo (x), a 25 °C e inibição do crescimento micelial (%) depois de 22 dias. ----- 17

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivo geral.....	10
2.2. Objetivos específicos.....	10
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1. Plantas medicinais, aromáticas e condimentares.....	11
3.2. Óleos essenciais	11
3.2.1. Óleo essencial de tomilho.....	12
3.3. Contaminantes de alimentos.....	13
3.3.1. <i>Aspergillus flavus</i>	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1. Óleo essencial	15
4.2. Isolado de <i>Aspergillus flavus</i>	15
4.3. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho no controle de <i>A. flavus</i>.....	15
4.4. Análise estatística.....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	18
REFERÊNCIAS.....	19

1. INTRODUÇÃO

Óleos essenciais (OE) são definidos como compostos voláteis de plantas aromáticas, podendo ser extraídos de qualquer parte da planta, por processo físico, destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou dentre outros métodos adequados (Brasil, 2007). Esses compostos apresentam a função de proteção ou comunicação das plantas (Saito e Scramin, 2000). Adicionalmente, os óleos essenciais têm sido utilizados ao longo da história pelo homem para fins medicinais e para antissepsia, por exemplo, como antifúngicos (Bakkali et al, 2008).

Uma das vantagens de se utilizar os OE seria que esses são menos tóxicos que os fungicidas sintéticos, por exemplo, por serem produzidos naturalmente (Tariq et al, 2019), sendo considerados sustentáveis e de grande interesse comercial (Bizzo et al, 2009). Outra vantagem é que o Brasil possui lugar de destaque na produção de OE no mundo, além de ter uma flora diversa, que favorece a extração desses óleos, destacando-se por um mercado em ascensão (Bizzo, 2013).

Um dos OE mais utilizado é aquele extraído de *Thymus vulgaris* L., popularmente conhecido como tomilho, devido a seu potencial antibactericida, antifúngico, antioxidante e anti-inflamatório (Bremnes, 2002). Destaca-se que o OE de tomilho é um dos fungicidas mais potentes e a sua eficácia é justificada pela sua composição, destacando-se o timol e o carvacrol (Bremnes, 2002; Soković, 2009). Dentre as alterações ocasionadas nos fungos e associadas a ação dos constituintes do OE de tomilho, destacam-se redução da germinação de esporos, alteração da permeabilidade da membrana celular e lise celular (López-Meneses et al. 2015; Jafri et al., 2019; Pina-vaz et al, 2004).

Um dos fungos de importância em alimentos e que devem ser inibidos devido a seu potencial de sintetizar micotoxinas, que causam doenças em humanos e animais, destaca-se *Aspergillus flavus*. Essa espécie é capaz de desenvolver em alimentos, tais como amendoim, nozes, sorgo e outras oleaginosas, e em determinadas condições é capaz de produzir micotoxinas (Klich, 2002). Dentre as micotoxinas que podem ser sintetizadas por *A. flavus*, tem-se as aflatoxinas B1 e B2, sendo que a aflatoxinas B1 é classificada como causadora de câncer em humanos e um dos mais potentes hepatocarcinógenos naturais, que podem ser encontrados em alimentos (Oliveira e Germano, 1997; IARC, 1993).

Como mencionado anteriormente, em geral, a utilização de OE como fungicida é interessante por apresentar menor toxicidade quando comparado aos fungicidas sintéticos,

podendo, inclusive, ser utilizado em alimentos (Oussalah et al, 2006). Dessa forma, os OE podem contribuir para garantir a qualidade microbiológica dos alimentos, contribuindo assim para o cumprimento do direito humano a Segurança Alimentar e Nutricional (Brasil, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* por contato direto do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) no controle de *Aspergillus flavus*.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de tomilho no crescimento micelial de *Aspergillus flavus*;
- Determinar o percentual de inibição do crescimento micelial de *Aspergillus flavus* em decorrência da exposição a diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Plantas medicinais, aromáticas e condimentares

Em todo o mundo, a busca por substâncias naturais que promovam sustentabilidade vem crescendo ao longo dos anos, tanto por parte dos consumidores, como pela indústria. Nesse cenário, destacam-se as plantas medicinais, aromáticas e condimentares por terem diversas utilidades, como para produção de cosméticos, alimentos, medicamentos e outros (Corrêa Jr e Scheffer, 2013).

Segundo Neto e Simões (2016), plantas medicinais podem ser definidas como qualquer planta que tenha substâncias que possam ser utilizadas com finalidade terapêutica ou farmacêutica. Por outro lado, as aromáticas são caracterizadas por possuírem óleos essenciais, sendo exemplos alecrim, eucalipto, hortelã, tomilho, dentre outras. Já as plantas condimentares são aquelas utilizadas na elaboração ou preparo de alimentos

As plantas medicinais, aromáticas e condimentares também se diferenciam por sua função e finalidade principal, sendo que as medicinais são utilizadas para prevenção, alívio ou cura de doenças; as aromáticas principalmente para extração de óleos essenciais; e as condimentares para dar sabor, aroma e cor aos alimentos, podendo inclusive uma única planta, como o capim-limão, ser utilizada para as três finalidades (SENAR, 2017).

3.2. Óleos essenciais

Não se sabe exatamente quando os óleos essenciais (OE) começaram a ser utilizados pelo homem, mas acredita-se que as primeiras utilizações foram para preservar cadáveres há milhares de anos. Os primeiros registros oficiais do uso de óleos essenciais datam de 2000 a.C. pelos hindus e outros povos para fins terapêuticos e cerimônias religiosas. A realização de estudos e a maior propagação do uso dos OE apenas ocorreu por volta do século XVI e XVII, tornando-se junto com outras especiarias, produtos de alto valor comercial na Europa (Trancoso, 2013).

Já no Brasil, de acordo com a Revista Casa da Agricultura (CECOR/CATI, 2013), os estudos com OE extraídos das plantas medicinais e aromáticas se iniciaram em 1847, com a chegada de Theodor Peckolt, farmacêutico da Silésia alemã (atual Polônia). Depois desse estudo, fundou-se em 1918 o Instituto de Química, no Rio de Janeiro, que posteriormente foi denominado Instituto de Química Agrícola. Nesse instituto a pesquisa sobre fitoquímica foi expandida e diversificada no país.

Atualmente os OE são obtidos por destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outros métodos, podendo ser isolados ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados (BRASIL, 2007). Além disso, estima-se que existem aproximadamente 3000 tipos de óleos essenciais (OE) sendo eles importantes para culinária, higiene, cosméticos, indústria farmacêutica, agronegócio e outros (Tariq et al., 2019).

Quanto as características dos OE, Bakkali et al (2008) descreveram que esses são geralmente líquidos, lipossolúveis, voláteis, translúcidos e raramente coloridos, tendo uma densidade geralmente menor do que a da água. Ainda de acordo com esses autores, um OE pode ter em sua composição de 20 a 60 compostos em concentrações diferentes, sendo que as substâncias mais comumente encontradas são das classes dos terpenos, compostos aromáticos e alifáticos.

Como já mencionado anteriormente, os OE possuem diversas funções, uma delas é a de substância antifúngica, sendo possível, inclusive, uso no controle de fungos deterioradores de alimentos. Destaca-se que esses fungos causam prejuízos na produção de alimentos e que podem causar doenças aos seres humanos. Exemplos de tais fungos são os dos gêneros *Fusarium* e *Aspergillus*, que possuem espécies produtoras de toxinas em alimentos, as micotoxinas (Maia et al, 2015).

Tariq et al (2019) realizaram revisão de literatura sobre a aplicação de OE no controle de fungos e esses os autores concluíram que esses compostos apresentam um amplo espectro de inibição contra diversos tipos de fungos patogênicos, tendo diferentes mecanismos de ação, como quebra ou inibição da formação da membrana celular dos fungos, disfunção de mitocôndrias, inibição de bombas de efluxo, dentre outros.

Medeiros et al. (2011) observaram que o OE de *Pittosporum undulatum* L. foi eficiente e exibiu atividade inibitória tanto sobre *Aspergillus flavus* como na produção de sua aflatoxina. Vale ressaltar que *Aspergillus flavus* é uma espécie de fungo extremamente importante, pois pode se desenvolver durante armazenamento incorreto de alimentos como grãos e é produtor da aflatoxina B₁, substância natural mais carcinogênica, mutagênica e teratogênica encontrada em alimentos (IARC, 1993).

3.2.1. Óleo essencial de tomilho

A EMBRAPA (2013) afirma que o tomilho (*Thymus vulgaris* L.) é uma espécie da família Lamiaceae. Essa família contempla ervas, arbustos ou árvores, nativa do

Mediterrâneo, com várias espécies de plantas condimentares produtoras de OE, tais como menta, lavanda, orégano e sálvia. Ademais, define o tomilho como um arbusto sempre verde rasteiro, com pequenas folhas em forma de lança que variam do verde intenso ao amarelo-esverdeado. Seu aroma é picante que lembra a pimenta e seu sabor delicado que puxa ao cravo e à hortelã, tendo utilidade como antisséptico, como estimulante e como tempero.

O OE de tomilho é conhecido por seus efeitos antibacterianos, antifúngicos (Pereira, 2006), anti-inflamatórios (Fachini-Queiroz et al, 2012), dentre outros. Ao longo da história foi utilizado para medicina tradicional, além de ser aproveitado também na indústria alimentícia e indústria cosmética, como conservante e antioxidante (Zarzuelo e Crespo, 2002).

Quanto a sua composição, geralmente o OE de tomilho é composto principalmente por timol, carvacrol e compostos fenólicos (Amiri, 2012). E a alta capacidade do OE de tomilho de inativar fungos está associada principalmente ao timol e ao carvacrol (Soković, 2009).

3.3. Contaminantes de alimentos

Conforme a Lei Orgânica de Segurança Alimentar Nutricional, LOSAN (Brasil, 2006), é um direito de todos o consumo de um alimento seguro, desde seu aspecto nutricional, contemplando o acesso até o quesito de qualidade do alimento. Ou seja, dentro da perspectiva da LOSAN, é um direito de todos um alimento justo e digno de ser consumido, envolvendo inclusive o quesito microbiológico e riscos à saúde, que algumas substâncias sintéticas podem trazer.

Tendo em vista que alguns microrganismos, tais como bactérias e fungos, podem contaminar os alimentos antes, durante ou após o processamento, o que é indesejado por causar diminuição da qualidade e segurança dos alimentos (Madigan et al, 2016), o uso dos óleos essenciais (OE) se destaca por ser uma importante alternativa. Isso se justifica porque os OE são compostos naturais que podem inibir o crescimento desses microrganismos, evitando assim a contaminação microbiológica dos alimentos (Pereira, 2006) e problemas maiores posteriormente.

Sobre os fungos contaminantes de alimentos, alguns deles são produtores das chamadas micotoxinas - derivado da palavra grega *mykes*, que significa fungo, e do latim *toxican*, que significa toxinas. Esses compostos que podem causar doenças ou até morte de animais e seres humanos (Iamanaka et al, 2010). Ainda de acordo com esses autores, os gêneros de fungos mais comumente associados a essas toxinas são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Um dos tipos de micotoxinas que causam maiores problemas de saúde é a produzida por fungos do gênero *Aspergillus*, as chamadas aflatoxinas, por serem altamente tóxicas e carcinogênicas (Madigan et al, 2016). Além disso, são uma das micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação brasileira (BRASIL, 2011). Normalmente os alimentos mais associados à sua contaminação são cereais, grãos, nozes, tubérculos, frutas (CVE, 2003).

3.3.1. *Aspergillus flavus*

O gênero *Aspergillus* foi pioneiramente descrito em 1729, por Pier Antônio Michelli, sendo posteriormente melhor estudado por Johan Heirich Friedrich, em 1809, e Rudolf Virchow, em 1856 (Bossche et al, 1988). Esse gênero é composto por 180 espécies descritas em nove subgêneros diferentes (Pitt e Samson, 2000), em que macroscopicamente suas colônias se caracterizam por serem coloridas, variando de verde e amarelo-oliva, tornando-se acinzentadas e brilhantes com o tempo (Geisen, 2000).

Dentre as espécies de *Arpegillus*, têm-se *Aspergillus flavus*, um fungo contaminante de alimentos, que cresce em temperaturas entre 25 °C e 30 °C e atividade de água em torno de 0,85, podendo ser caracterizado como de campo e de armazenamento e produtor de aflatoxinas (Ferreira-Castro, 2011). Além disso, *A. flavus* é capaz de produzir as aflatoxinas B₁ e B₂. Vale mencionar que dentre as aflatoxinas, a aflatoxina B₁ é a substância mais perigosa, destacando-se por ser carcinogênica, mutagênica e teratogênica, sendo assim o controle do fungo muito importante para a saúde pública (Medeiros et al, 2011). Ressalta-se que a aflatoxina B₁ é comprovadamente causadora de câncer de fígado em humanos e animais, a partir da ingestão de alimentos contaminados (Madigan et al, 2016).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Óleo essencial

O óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris L.*) foi obtido comercialmente por meio da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda., e sua caracterização foi feita previamente em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (dados não apresentados).

4.2. Isolado de *Aspergillus flavus*

O isolado de *Aspergillus flavus* (CCUB 1405) que foi utilizado no experimento é proveniente e amendoim comercial sintomático, isolado utilizando-se em meio de cultura seletivo *Aspergillus flavus* e *parasiticus* ágar (AFPA). Esse isolado foi caracterizado molecularmente e a sua sequência foi depositada no banco de dados Genbank, sob o número de acesso CCUB1405. Testes preliminares indicaram que esse isolado é aflatoxigênico.

4.3. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho no controle de *A. flavus*

Para a avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial do óleo essencial de tomilho no controle de *A. flavus*, por contato direto, adotaram-se as concentrações de 0 (controle), 250, 500, 1.000, 1.500 e 2.000 $\mu\text{L/L}$. O óleo essencial de tomilho, nas diferentes concentrações, foi incorporado, sob agitação, ao meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) acidificado com ácido tartárico. Em seguida, foi efetuada a inoculação de *A. flavus* em placas de Petri contendo o meio de cultura, na presença ou não do óleo essencial, utilizando-se alfinete entomológico esterilizado, de tal forma que crescesse somente uma colônia por placa. As placas foram incubadas a 25 °C durante o período de 22 dias.

O diâmetro das colônias foi medido com régua graduada em duas direções perpendiculares, a cada 24 h, até 14 dias, e depois a cada 48 h, até 22 dias (Hua et al., 2014). Para cada concentração do óleo essencial, utilizou-se vinte repetições. A partir dos resultados obtidos, obtiveram-se equações de regressão, relacionando-se diâmetro das colônias e tempo de exposição, para cada concentração do óleo essencial de tomilho.

Determinou-se também o percentual de inibição do crescimento micelial (ICM, %), utilizando-se os dados obtidos depois de 22 dias de incubação, de acordo com a Equação 1 (Pandey et al., 1982).

$$ICM = \frac{(DC - DT)}{DC} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

DC – Diâmetro médio no tratamento controle.

DT – Diâmetro médio no tratamento com óleo essencial de tomilho.

4.4. Análise estatística

Adotou-se Delineamento Inteiramente Casualizado, com medidas repetidas no tempo, com vinte repetições, sendo seis tratamentos referentes às concentrações do óleo essencial de tomilho (0 (controle), 250, 500, 1.000, 1.500 e 2.000 µL/L). Para a plotagem dos gráficos e obtenção das equações de regressão, utilizou-se o software SigmaPlot v.10 (Systat Software Inc., Germany).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 e na Tabela 1, são apresentadas as curvas de regressão e as equações de regressão, respectivamente, referentes ao diâmetro das colônias de *A. flavus*, depois da exposição a diferentes concentrações de óleo essencial (OE) de tomilho (0, 250, 500, 1.000, 1.500 e 2.000 µL/L), durante 22 dias.

Observou-se crescimento micelial somente no tratamento controle (sem aplicação de óleo essencial de tomilho) e quando adotada a concentração de óleo essencial de tomilho de 250 µL/L. Os diâmetros estimados das colônias de *A. flavus*, depois de 10 dias de exposição foram equivalentes a 51,7 e 1,0 mm, para os tratamentos controle e 250 µL/L de óleo essencial de tomilho, respectivamente. Depois de 22 dias de exposição, os diâmetros estimados das colônias para os tratamentos controle e 250 µL/L de óleo essencial de tomilho foram equivalentes a 54,0 e 24,5 mm, respectivamente.

Obteve-se 54,7% de inibição de crescimento micelial (ICM), depois de 22 dias de exposição, considerando-se 24,5 mm de diâmetro das colônias de *A. flavus*, para a concentração de 250 µL/L, e 54,0 mm para o tratamento controle (Tabela 1). Ressalta-se que não houve crescimento micelial quanto se adotaram as concentrações 500, 1.000, 1.500 e 2.000 µL/L, com ICM de 100,0%. Esses resultados podem ser justificados pela composição do óleo essencial de tomilho, uma vez que são presentes timol e carvacrol, compostos que possuem comprovada capacidade de inativar fungos (Adam et al., 1998).

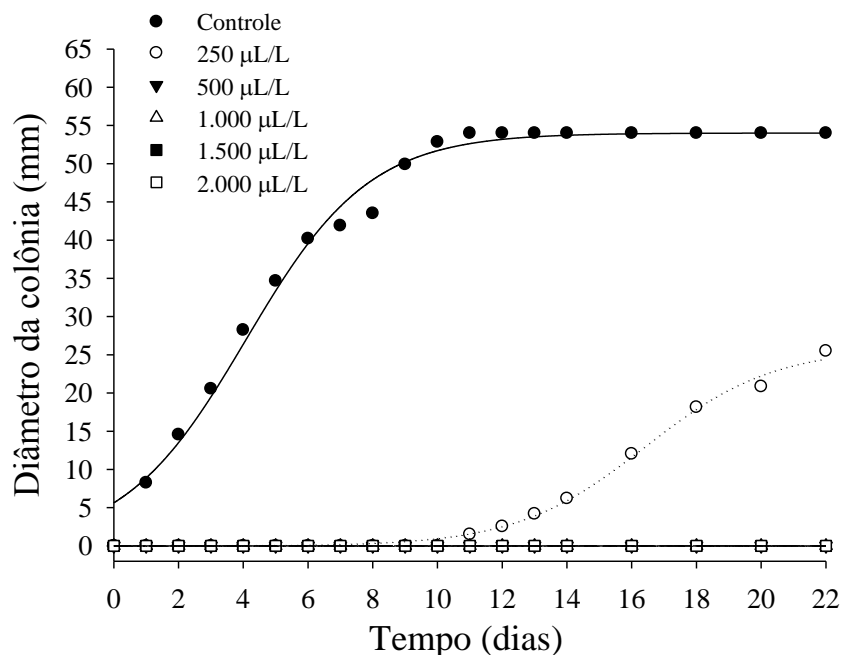


Figura 1. Curvas de regressão referentes ao efeito *in vitro* do óleo essencial de tomilho, em diferentes concentrações, no diâmetro das colônias de *A. flavus*, durante 22 dias, a 25 °C.

Tabela 1. Equações de regressão e respectivos coeficientes de determinação referentes ao efeito *in vitro* do óleo essencial de tomilho, em diferentes concentrações, no diâmetro das colônias de *A. flavus* (\hat{y}) em função do tempo (x), a 25 °C e inibição do crescimento micelial (%) depois de 22 dias

Tratamentos	Equações de regressão	R ²	EPE	ICM (%)
Controle	$\hat{y} = \frac{54,01}{\left(1 + e^{\left(\frac{-(x-4,09)}{1,90}\right)}\right)}$	0,99	2,09	-
250 µL/L	$\hat{y} = \frac{25,96}{\left(1 + e^{\left(\frac{-(x-16,40)}{1,99}\right)}\right)}$	0,99	0,56	54,7
500 µL/L	Sem crescimento	-	-	100,00
1.000 µL/L	Sem crescimento	-	-	100,00
1.500 µL/L	Sem crescimento	-	-	100,00
2.000 µL/L	Sem crescimento	-	-	100,00

ICM – Percentual de Inibição do Crescimento Micelial.

Resultados semelhantes aos do presente estudo foram obtidos por Zampieri et al (2016), em que o óleo essencial de tomilho inibiu parcialmente *A. flavus*, nas concentrações de 50, 100, 150 mg/L e inibiu totalmente esse microrganismo, nas concentrações de 250 e 500 mg/L. No mesmo sentido, Soliman e Badeaa (2002) observaram que observou que o óleo essencial de tomilho foi eficaz no controle de *A. flavus*, com efeito fungistático, na concentração de 250 ppm, e fungicida, na concentração de 500 ppm.

Outros autores também verificaram a eficácia do óleo essencial de tomilho no controle de outras espécies de fungos. Puškárová et al (2017) observaram que o óleo essencial de tomilho foi eficiente no controle de *Cladosporium cladosporoides*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Chaetomium globosum* e *Penicillium chrysogenum*, nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10, 25, 50 e 75% (v/v). Mandras et al. (2016) observaram que o óleo essencial de tomilho, em concentrações de 2 a 0,0038% (v/v), foi eficiente no controle de *Candida ssp.*, espécie causadora de candidíase.

O presente estudo demonstrou que as concentrações de óleo essencial de tomilho que sejam iguais ou superiores a 500 µL/L são efetivas no controle de *Aspergillus flavus*, enquanto que a concentração de 250 µL/L possibilita inibição parcial do desenvolvimento do microrganismo. Esses resultados são extremamente relevantes, tendo em vista que mais de 300 milhões de pessoas no mundo sofrem de algum tipo de infecção fúngica e que fungos dos gêneros *Cryptococcus*, *Candida* e *Aspergillus* são responsáveis por mais de 90% das mortes relacionadas a esse grupo de microrganismos (Cowen et al., 2015). Então, os resultados obtidos são extremamente relevantes, tendo em vista a importância de se prevenir e tratar doenças fúngicas, utilizando-se óleos essenciais (Nazzaro et al., 2017).

6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

A partir dos resultados obtidos, é possível concluir que óleo essencial de tomilho é parcialmente eficaz no controle de *A. flavus* na concentração de 250 µL/L e totalmente eficaz em concentrações iguais ou superiores a 500 µL/L.

Para estudos futuros, sugere-se que sejam testadas concentrações do óleo essencial de tomilho entre 250 e 500 µL/L, para assim que seja obtida a menor concentração para controlar *A. flavus*.

REFERÊNCIAS

ADAM, K. *et al.* Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. **J. Agric. Food Chem**, v. 45, ed. 5, p. 1739–1745, 1998.

AMIRI, H. Essential oils composition and antioxidant properties of three thymus species. **Evid Based Complement Alternat Med**., v. 2012, p. 1-8, 2012.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BIZZO, H. R. *et al.* Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BIZZO, H. R. Óleos essenciais: uma fonte de divisas a ser mais explorada no Brasil. **A lavoura**, Plantas bioativas, ano 116, n. 699/2013, p. 48-53, 2013.

BOSSCHE, V. D. *et al.* **Aspergillus and Aspergillosis**. Plenum Press, 1988. 332 p. ISBN 978-1-4899-3505-2.

BRASIL. Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional-SISAN com vistas em assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. **Lei Orgânica de Segurança Alimentar Nutricional (LOSAN)**. Diário Oficial da União, 2006.

BRASIL. Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011**, Diário Oficial da União, 2011.

BRASIL. Resolução RDC Nº. 2, DE 15 DE JANEIRO DE 2007, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes", que consta como Anexo da presente Resolução. **RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007**, Diário Oficial da União, 2007.

BREMNES, L. **Herbs**. Smithsonian Handbooks, 2002. 304 p. ISBN 0-7894-9391-8

CECOR/CATI. **Plantas medicinais e aromáticas**. Casa da Agricultura: São Paulo, ano 16, n. 3, p. 6-50, 2013. Disponível em: <http://www.cati.sp.gov.br/revistacasadaagricultura/15/RevistaCA_Medicinais_Ano16_n3.pdf>. Acesso em: 20 de jan. de 2020.

Centro de Vigilância Epidemiológica - CVE. **Manual das doenças transmitidas por alimentos - Aflatoxinas e outras micotoxinas**. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2003.

CORRÊA JR, C.; SCHEFFER, M.C. Boas Práticas Agrícolas (BPA) de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares. **Instituto Emater**. Curitiba, 2013. 52 p.

COWEN, L. E. *et al.* Mechanisms of antifungal drug resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 7, p. 1–22, 2015.

EMBRAPA. **Plantas condimentares: cultivo e utilização**. 1. ed. Embrapa Agroindústria Tropical: Fortaleza, 2013. 55 p.

FACHINI-QUEIROZ, F. C. et al. Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Volume 2012, 2012. 10 p.

FERREIRA-CASTRO, F. L. **Interação entre fungos toxigênicos (*Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*) e carunchos (*Sitophilus zeamais*)**. Orientador: Benedito Corrêa. 2011. 111 f. Tese de doutorado (Doutor em ciências) - USP, São Paulo, 2011.

GEISEN, R. PCR Methods for detection of Mycotoxin – producing Fungi. Applications of PCR in mycology, ed. 2, **Cambridge**: University Press, p. 242-263, 2000.

HUA, H. et al. Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production. **Plos One**, v. 9, n. 9, p. 1–10, 2014.

IAMANAKA, B. T et al. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 7, p.138-161, 2010.

International Agency for Research on Cancer - IARC. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**, 1993.

JAFRI, H.; ANSARI, F. A.; AHMAD, I. Prospects of Essential Oils in Controlling Pathogenic Biofilm. **New Look to Phytomedicine**, p. 203-236, 2019.

KLICH, M. A. Identification of Common *Aspergillus* Species. **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, Netherlands, v. 17, n° 3, 2002, 116 p.

LÓPEZ-MENESES, A. K. et al. Antifungal and antimycotoxigenic activity of essential oils from *Eucalyptus globulus*, *Thymus capitatus* and *Schinus molle*. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 664–671, 2015.

MADIGAN, M. T. **Microbiologia de Brock**. Artmed. 14. ed. Porto Alegre, 2016.

MAIA, T. F. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.17, n.1, p.105-116, 2015.

MANDRAS, N. et al. Liquid and vapour-phase antifungal activities of essential oils against *candida albicans* and non-*albicans candida*. **Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-7, 2016.

MEDEIROS, R. T. S. et al. Evaluation of antifungal activity of *Pittosporum undulatum* L. essential oil against *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 71-76, 2011.

NAZZARO, F. et al. Essential oils and antifungal activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 1–20, 2017.

NETO, F. C.; SIMÕES, M. T. F. **Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares - Terra Fria Transmontana**. Plantas Aromáticas do Concelho de Bragança. 2016, 30 p.

OLIVEIRA, C. A. F. DE; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 417–424, 1997.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Spaphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, 2006.

PANDEY, D. K. et al. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 89, n. 6, p. 344–349, 1982.

PEREIRA, A. A. **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos**. Orientador: Maria das Graças Cardoso. 2006. 58 f. Tese de mestrado (Mestrado em ciência dos alimentos) - Universidade Federal de Lavras, 2006.

PINA-VAZ, C. et al. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. **European Academy of Dermatology and Venereology**, p. 256-265, 2004.

PITT, J. I.; SAMSOM, R. A. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. **Hardwood**: Academic Publishers Reading, 2000. p. 51-72.

PUŠKÁROVÁ, A. et al. The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. **Scientific Reports**, 2017. p. 1-11.

SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. Plantas aromáticas e seu uso na agricultura. **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, 2000. 48p.

Serviço Nacional de Aprendizagem Rural - SENAR. Plantas medicinais aromáticas e condimentares: produção e beneficiamento. **Serviço Nacional de Aprendizagem Rural**. Brasília: SENAR, 2017. 124p.

SOKOVIĆ, M. C et al. Chemical Composition of Essential Oils of *Thymus* and *Mentha* Species and Their Antifungal Activities. **Molecules**, p. 238–249, 2009.

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

TARIQ, S. et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug- resistant microbial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, p. 1-20, 2019.

TRANCOSO, D. T. Projeto Óleos Essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano. **Revista Práxis**, ano V, nº 9, 2013.

ZAMPIERI, N. S. et al. Efeito do óleo essencial de tomilho sobre o fungo *Aspergillus flavus*. **VEAIC Jr**. 2016.

ZARZUELO, A.; CRESPO, E. The medicinal and non-medicinal uses of thyme. **Medicinal and Aromatic Plants**, p. 263–292, 2002.