

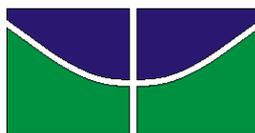
**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**BIOATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO E DO TIMOL**  
**COMO FUMIGANTE NO CONTROLE DE *Aspergillus flavus* CCUB1405**  
***IN VITRO* E EM CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H. B. K.)**  
**DURANTE O ARMAZENAMENTO**

**CAROLINE ROSA DA SILVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA, DF**  
**JANEIRO, 2021**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**BIOATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO E DO TIMOL  
COMO FUMIGANTE NO CONTROLE DE *Aspergillus flavus* CCUB1405  
*IN VITRO* E EM CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H. B. K.)  
DURANTE O ARMAZENAMENTO**

**CAROLINE ROSA DA SILVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA**

**ORIENTADOR: Dr. ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR**

**BRASÍLIA, DF**  
**JANEIRO, 2021**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**BIOATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO E DO TIMOL  
COMO FUMIGANTE NO CONTROLE DE *Aspergillus flavus* CCUB1405  
IN VITRO E EM CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H. B. K.)  
DURANTE O ARMAZENAMENTO**

**CAROLINE ROSA DA SILVA**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Agronomia.

**APROVADO POR:**

---

**ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR, Dr. Professor Associado UFV – DEA**  
**(Orientador)**

---

**MÁRCIO ANTONIO MENDONÇA, Dr. Professor Adjunto UnB – FAV**  
**(Examinador Externo)**

---

**ELIANA DOS SANTOS LEANDRO, Dra. Professora Adjunta UnB – FS**  
**(Examinador Externo)**

**BRASÍLIA, DF**  
**JANEIRO, 2021**

## FICHA CATALOGRÁFICA

SILVA, Caroline Rosa da

BIOATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO E DO TIMOL COMO FUMIGANTE NO CONTROLE DE *Aspergillus flavus* CCUB1405 *IN VITRO* E EM CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) DURANTE O ARMAZENAMENTO / Caroline Rosa da Silva; orientador Ernandes Rodrigues de Alencar. – Brasília, 2021

55 p.

Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Agronomia) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2021.

1. Óleo essencial. 2. Castanha-do-Brasil. 3. Controle de fungos. 4. Agente fungicida. 5. Agente fungistático. 6. Armazenamento.

Orientação: Profº. Dr. Ernandes Rodrigues de Alencar

### REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

SILVA, C. R. **Bioatividade do óleo essencial de tomilho e do timol como fumigante no controle de *Aspergillus flavus* CCUB1405 *in vitro* e em castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) durante o armazenamento.** 2021. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

### Cessão de direitos

Nome do Autor: Caroline Rosa da Silva

Título: Bioatividade do óleo essencial de tomilho e do timol como fumigante no controle de *Aspergillus flavus* CCUB1405 *in vitro* e em castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) durante o armazenamento

Grau: Mestre

Ano: 2021

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desse relatório e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva - se a outros direitos de publicação, e nenhuma parte desse relatório pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais e minha irmã.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pois Ele eu não teria conseguido chegar até aqui e continuar seguindo em frente.

A minha família, que sempre me ajudou e me apoiou durante a vida e meus estudos.

Ao professor Dr. Ernandes Rodrigues de Alencar, pela possibilidade de trabalhar e crescer nessa área.

Ao doutorando Wallas Felipe de Souza Ferreira, pela ajuda que sempre forneceu.

Àqueles que ajudaram na realização deste trabalho, professores e técnicos dos laboratórios, estudantes de graduação e pós-graduação orientados pelo professor Dr. Ernandes Rodrigues de Alencar.

À Universidade de Brasília (UnB), por fornecer a possibilidade de estudo e por todos os seus professores que contribuíram com isso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro com a bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Castanha-do-Brasil.....	3
2.1.1. Botânica.....	3
2.1.2. Importância.....	4
2.1.3. Pós-colheita .....	5
2.2. Gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Aspergillus flavus</i> .....	6
2.2.1. Gênero <i>Aspergillus</i> .....	6
2.2.2. <i>Aspergillus flavus</i> e as aflatoxinas.....	7
2.3. Tomilho.....	8
2.3.1. Botânica.....	8
2.3.2. Importância e tratos culturais .....	9
2.4. Timol.....	10
2.4.1. Obtenção.....	10
2.4.2. Propriedades .....	10
3. METODOLOGIA .....	11
3.1. Óleo essencial de tomilho e timol.....	11
3.2. Caracterização do óleo essencial de tomilho .....	11
3.3. Atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho e timol.....	11
3.3.1. Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> .....	11
3.3.2. Avaliação da atividade antifúngica em castanha-do-Brasil durante o armazenamento	13
3.4. Delineamento experimental .....	14

4.	RESULTADOS .....	15
4.1.	Caracterização do óleo essencial de tomilho .....	15
4.2.	Atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho e timol .....	16
4.2.1.	Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> .....	16
4.2.2.	Avaliação da atividade antifúngica em castanha-do-Brasil durante o armazenamento	24
5.	DISCUSSÃO .....	27
5.1.	Caracterização do óleo essencial de tomilho .....	27
5.2.	Atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho e timol .....	28
5.2.1.	Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> .....	28
5.2.2.	Avaliação da atividade antifúngica em castanha-do-Brasil durante o armazenamento	29
6.	CONCLUSÕES .....	31
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Perfil cromatográfico referente à composição do óleo essencial de tomilho. .... 15
- Figura 2** - Curvas de regressão referentes ao diâmetro das colônias de *Aspergillus flavus* durante exposição ao óleo essencial de tomilho por fumigação, imediatamente depois da inoculação, em diferentes concentrações por até 240 h..... 17
- Figura 3** - Curvas de regressão referentes ao diâmetro das colônias de *Aspergillus flavus* durante exposição a solução etanólica de timol por fumigação, imediatamente depois da inoculação, em diferentes concentrações por até 240 h..... 19
- Figura 4** – Diâmetros médios das colônias de *Aspergillus flavus*, depois de 168 h da interrupção da fumigação por óleo essencial de tomilho em diferentes concentrações, a 30 °C. ....21
- Figura 5** - Diâmetros médios das colônias de *Aspergillus flavus*, depois de 168 h da interrupção da fumigação por solução etanólica de timol em diferentes concentrações, a 30 °C. ....22

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição química do óleo essencial de tomilho.....	16
<b>Tabela 2</b> - Equações de regressão ajustadas com seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), erro padrão da estimativa (EPE), o diâmetro das colônias estimado pela equação de regressão e percentual de inibição do crescimento micelial (ICM) referentes ao diâmetro das colônias de <i>Aspergillus flavus</i> durante exposição ao óleo essencial de tomilho por fumigação, imediatamente depois da inoculação, em diferentes concentrações por até 240 h.....	18
<b>Tabela 3</b> - Equações de regressão ajustadas com seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), erro padrão da estimativa (EPE), o diâmetro das colônias estimado pela equação de regressão e percentual de inibição do crescimento micelial (ICM) referentes ao diâmetro das colônias de <i>Aspergillus flavus</i> durante exposição a solução etanólica de timol por fumigação, imediatamente depois da inoculação, em diferentes concentrações por até 240 h.....	20
<b>Tabela 4</b> - Diâmetros médios das colônias de <i>Aspergillus flavus</i> expostas ao óleo essencial de tomilho e à solução etanólica de timol por fumigação, depois de 72 h da inoculação no meio de cultura, em diferentes concentrações, por 240 e 336 h.....	23
<b>Tabela 5</b> - Percentual de infecção por <i>Aspergillus flavus</i> em castanha-do-Brasil exposta a fumigação por óleo essencial de tomilho em diferentes concentrações, durante o armazenamento em condições ambiente, por 60 dias.....	25
<b>Tabela 6</b> - Percentual de infecção por <i>Aspergillus flavus</i> em castanha-do-Brasil exposta a fumigação por solução etanólica de timol em diferentes concentrações, durante o armazenamento em condições ambiente, por 60 dias.....	25

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C graus Celsius

AFPA *Aspergillus flavus* e *parasiticus* Agar

EC European Commission

EPE Erro Padrão da Estimativa

FAO Food and Agricultural

FDA Food and Drug Administration

g Grama

h Hora

IARC International Agency for Research on Cancer

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICM Inibição do Crescimento Micelial

kg Kilograma

µL Microlitro

µg Micrograma

mg Miligrama

MGI Mycelial Growth Inhibition

min Minuto

mL Mililitro

mm Milímetro

pH Potencial hidrogeniônico

ppb Partes por bilhão

ppm Partes por milhão

R<sup>2</sup> Coeficiente de determinação

WHO World Health Organization

## RESUMO

### **Bioatividade do óleo essencial de tomilho e do timol como fumigante no controle de *Aspergillus flavus* CCUB1405 *in vitro* e em castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) durante o armazenamento**

As amêndoas de castanha-do-Brasil têm grande importância por serem ricas em antioxidantes como o selênio e ácidos graxos insaturados, como o oleico e o linoleico. Entretanto, as amêndoas são susceptíveis de contaminação, especialmente por toxinas de *Aspergillus flavus*. Essa espécie é a principal produtora de aflatoxinas, micotoxina de maior importância no que se refere a alimentos, sendo que sua ingestão está associada a efeitos agudos e crônicos. Dessa forma, o controle desse microrganismo em alimentos é fundamental. Nesse cenário, diferentes óleos essenciais têm sido testados no controle de fungos. Então, o objetivo do presente estudo foi avaliar a bioatividade do óleo essencial de tomilho e do timol como fumigantes no controle de *Aspergillus flavus in vitro* e em castanha-do-Brasil durante o armazenamento. O perfil do óleo essencial de tomilho foi analisado por cromatografia gasosa com espectrometria de massa. As concentrações do óleo essencial de tomilho foram 0 (controle), 50, 100, 250, 500, 750 e 1.000 mg/L. As concentrações da solução etanólica de timol foram definidas a partir do percentual de timol no óleo essencial de tomilho. No ensaio *in vitro*, o diâmetro das colônias foi medido a cada 12 h até 144 horas e depois a cada 24 h até chegar em 240 h. Determinou-se o percentual de inibição do crescimento micelial (ICM), considerando-se 240 h de incubação. Para avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho e do timol em castanha-do-Brasil, inicialmente efetuou-se a inoculação com *A. flavus*. Depois as amostras foram expostas a fumigação com óleo essencial de tomilho e com solução etanólica de timol, adotando-se as concentrações que ocasionaram efeito fungicida na avaliação *in vitro*. As amostras foram mantidas em condições ambiente, sendo analisadas no início do armazenamento e a cada 15 dias, até 60 dias. Verificou-se que os compostos majoritários no óleo essencial de tomilho foram p-cimeno e timol, com percentuais equivalentes a 45,20 e 37,62%, respectivamente. As concentrações testadas da solução etanólica de timol foram de 0; 18,8; 37,6; 94,1; 188,1; 282,2 e 376,2 mg/L. No que se refere aos tratamentos com óleo essencial de tomilho, verificou-se crescimento das colônias de *A. flavus* somente quando se adotaram as concentrações de 50 e 100 mg/L. O óleo essencial de tomilho, nas concentrações

de 500, 750 e 1.000 mg/L, atuou como agente fungicida no controle de *A. flavus*. Com relação à solução etanólica de timol, houve crescimento micelial somente no tratamento controle (0 mg/L) e naqueles correspondentes a 18,8 e 37,6 mg/L. A solução etanólica de timol, nas concentrações de 188,1, 282,2 e 376,2 mg/L, atuou com agente fungicida sobre *A. flavus*. Quanto ao efeito do óleo essencial de tomilho e da solução etanólica de timol no controle de *A. flavus* em castanha-do-Brasil durante a o armazenamento, houve redução significativa do percentual de infecção, sendo essa tendência mais acentuada à medida que se elevou a concentração desses compostos. Concluiu-se que o óleo essencial de tomilho aplicado como fumigante, nas concentrações de 500, 750 e 1.000 mg/L, atua com agente fungicida sobre *A. flavus*; a solução etanólica de timol aplicada como fumigante, nas concentrações de 188,1, 282,2 e 376,2 mg/L, atua com agente fungicida sobre *A. flavus*; nas condições adotadas no presente estudo, em geral, o óleo essencial de tomilho apresentou resultados similares a solução etanólica de timol, quando aplicados como fumigantes no controle de *A. flavus*; o óleo essencial de tomilho e a solução etanólica de timol são capazes de controlar *A. flavus* em castanha-do-Brasil por até 45 dias de armazenamento, sendo mais efetivos quando adotadas as concentrações de 1.000 mg/L e 376,2 mg/L, respectivamente.

Palavras-chave: Óleo essencial; castanha-do-Brasil; controle de fungos, agente fungicida, agente fungistático; armazenamento.

## ABSTRACT

### **Bioactivity of thyme essential oil and of thymol as a fumigant in the control of *Aspergillus flavus* CCUB1405 *in vitro* and in Brazil nuts (*Bertholletia excels* H. B. K.) during storage**

Brazil nuts are of great importance because they are rich in antioxidants such as selenium and unsaturated fatty acids, such as oleic and linoleic. However, almonds are susceptible to contamination, especially by *Aspergillus flavus* toxins. This species is the main producer of aflatoxins, mycotoxin of greatest importance with regard to food, and its ingestion is associated with acute and chronic effects. Thus, the control of this microorganism in food is essential. In this scenario, different essential oils have been tested to control fungi. So, the objective of the present study was to evaluate the bioactivity of thyme essential oil and thymol, as a fumigant in the control of *A. flavus in vitro* and in Brazil nuts during storage. The profile of the essential oil of thyme was analyzed by gas chromatography with mass spectrometry. Thyme essential oil concentrations were 0 (control), 50, 100, 250, 500, 750 and 1,000 mg/L. The concentrations of the ethanol solution of thymol were defined based on the percentage of thymol in thyme essential oil. In the *in vitro* test, the diameter of the colonies was measured every 12 h up to 144 hours and then every 24 h until it reached 240 h. The percentage of mycelial growth inhibition (MGI) was determined, considering 240 h of incubation. To evaluate the antifungal activity of thyme essential oil and thymol in Brazil nuts, inoculation with *A. flavus* was initially carried out. Then the samples were exposed to fumigation with thyme essential oil and with ethanol solution of thymol, adopting the concentrations that had fungicidal effect in the *in vitro* evaluation. The samples were kept in ambient conditions, being analyzed at the beginning of storage and every 15 days, up to 60 days. The major compounds in thyme essential oil were found to be p-cymene and thymol, with percentages equivalent to 45.20 and 37.62%, respectively. The tested concentrations of the ethanol solution of thymol were 0; 18.8; 37.6; 94.1; 188.1; 282.2 and 376.2 mg/L. With regard to treatments with thyme essential oil, *A. flavus* colonies grew only when the concentrations of 50 and 100 mg/L were adopted. The thyme essential oil, when the concentrations of 500, 750 and 1,000 mg/L were used, acted as a fungicidal agent in the control of *A. flavus*. Regarding the ethanol solution of thymol, mycelial growth occurred only

in the control treatment (0 mg/L) and in those corresponding to 18.8 and 37.6 mg/L. The ethanol solution of thymol acted as a fungicidal agent on *A. flavus*, at concentrations of 188.1, 282.2 and 376.2 mg/L. Regarding the effect of thyme essential oil and ethanol solution of thymol in the control of *A. flavus* in Brazil nuts during storage, there was a significant reduction in the percentage of infection, this trend being more accentuated as the concentration increased of these compounds. It was concluded that the essential oil of thyme applied as a fumigant, in concentrations of 500, 750 and 1,000 mg/L, acts as a fungicidal agent on *A. flavus*; the ethanol solution of thymol applied as a fumigant, in concentrations of 188.1, 282.2 and 376.2 mg/L, acts with a fungicidal agent on *A. flavus*; under the conditions adopted in the present study, in general, the essential oil of thyme showed results similar to the ethanol solution of thymol, when applied as fumigants in the control of *A. flavus*; the essential oil of thyme and the ethanol solution of thymol are capable of controlling *A. flavus* in Brazil nuts for up to 45 days of storage, being more effective when adopting concentrations of 1,000 mg/L and 376.2 mg/L, respectively.

Keywords: Essential oil; Brazil nuts; fungi control, fungicidal agent, fungistatic agent; storage.

## 1. INTRODUÇÃO

A castanha-do-Brasil ou castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) é uma planta arbórea da Amazônia da família Lecythidaceae, sendo a única espécie do gênero *Bertholletia* e que produz frutos arredondados que contêm de 10 a 25 amêndoas por fruto (MORI, 1992; CATENACCI, 2016). As amêndoas têm grande importância, por ser rica em antioxidantes como o selênio e ácidos graxos insaturados como o oleico e o linoleico (SHAHIDI; TAN, 2008). Em 2016, a produção permaneceu concentrada na região Norte do Brasil, sendo que o Amazonas deteve 33,2% da produção (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2017). Durante a colheita e pós-colheita, as amêndoas são susceptíveis de contaminação, especialmente por toxinas de *Aspergillus flavus* (MÜLLER; CALZAVARA, 1989).

O gênero *Aspergillus* se destaca por espécies que formam conidióforos eretos com vesícula apical, estipe não septada e célula basal curta. A espécie *A. flavus* forma colônias flocosas de 25 a 70 mm de diâmetro com coloração esverdeada ou amarelada. O crescimento ótimo ocorre com temperatura em torno de 33 °C, associada à atividade de água em torno de 0,80. Essa espécie é a principal produtora de aflatoxinas, a micotoxina de maior importância no que se refere a alimentos (PITT; HOCKING, 2009a), sendo que sua ingestão está associada a efeitos agudos e crônicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2018). Os valores máximos permitidos para aflatoxinas em castanha-do-Brasil é de 10 ppb para o produto sem casca destinado a consumo direto, 15 ppb para o produto sem casca que será submetido a processamento e 20 ppb para o produto com casca destinado a consumo direto (BRASIL, 2011). Então, é fundamental a adoção de técnicas no intuito de se evitar a síntese dessa micotoxina nas diferentes matérias-primas.

Nesse cenário, diferentes óleos essenciais têm sido testados no controle de fungos, inclusive daqueles produtores de micotoxinas. Diferentes partes de plantas podem ser utilizadas para a extração de óleos essenciais, uma mistura complexa que resulta em um líquido aromático e volátil. Os compostos que o constituem podem ser terpenos, terpenóides, fenilpropanos e outros (HYLDGAARD *et al.*, 2012), com destaque para os monoterpenos e sesquiterpenos (CHEE *et al.*, 2009; HYLDGAARD *et al.*, 2012). Dentre as espécies de plantas que têm sido estudadas como fonte de óleos essenciais e cujos seus compostos apresentam propriedades antimicrobianas, destaca-se o tomilho (*Thymus vulgaris* L.) (ŠEGVIĆ KLARIĆ *et al.*, 2007; MOTA *et al.*, 2012).

O tomilho é uma lamiácea de importância que possui tricomas glandulares, nos quais ficam armazenados os óleos essenciais, com destaque para o composto monoterpene timol (STAHL-BISKUP; VENSKUTONIS, 2006). O timol tem várias propriedades benéficas para a saúde nos sistemas respiratório, cardiovascular, nervoso, digestivo, é anti-inflamatório, antimicrobiano, entre outros (SALEHI *et al.*, 2018).

Alguns autores tem relatado efeito fungicida do óleo essencial de tomilho. Kumar *et al.* (2008) analisaram o efeito do óleo essencial de tomilho sobre *A. flavus in vitro*. Esses autores adicionaram óleo essencial de tomilho ao meio de cultura e observaram inibição do crescimento micelial em concentração de 0,7 µL/mL e controle da produção de aflatoxina B1 com concentração de 0,6 µL/mL. López-Meneses *et al.* (2015) verificaram que o óleo essencial de tomilho na concentração de 1.000 µL/L (ensaio de contato) inibiu totalmente o desenvolvimento de *Fusarium moniliforme* e reduz significativamente a germinação de esporos de *Aspergillus parasiticus*.

O timol é um composto tem sido testado no controle de fungos, inclusive *A. flavus* (MISHRA *et al.*, 2013). Em estudos *in vitro* (ensaio de contato), foi verificado que o timol é capaz de gerar espécies reativas do oxigênio e com isso induzir a produção de óxido nítrico, o que afeta a integridade e viabilidade dos esporos (SHEN *et al.*, 2016). O timol também causa apoptose (morte) celular, via o bloqueio no fluxo dos íons de potássio (HU *et al.*, 2018).

Apesar das pesquisas encontradas na literatura, tem-se a necessidade de realização de outros estudos com óleo essencial de tomilho e do seu composto majoritário (timol) no controle de fungos, em especial aqueles aflatoxigênicos. A maioria dos estudos foi realizada *in vitro* e com ensaio de contato. Então, a aplicação como fumigante é uma alternativa para o uso desses compostos e, adicionalmente, testes em alimentos é fundamental. Sendo que, a fumigação é quando um composto químico que a determinada temperatura e pressão fica no estado gasoso em uma concentração letal para determinado organismo (BOND, 1984). Em se tratando de castanha-do-Brasil, o controle de *A. flavus* por óleo essencial de tomilho e timol será de extrema importância, tendo em vista o potencial dessa espécie de sintetizar aflatoxinas.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a bioatividade do óleo essencial de tomilho e do seu composto majoritário (timol) como fumigante no controle de *Aspergillus flavus in vitro* e em castanha-do-Brasil durante o armazenamento.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Castanha-do-Brasil**

#### 2.1.1. Botânica

A castanha-do-Brasil ou castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) é uma planta arbórea da Amazônia, que faz parte da família Lecythidaceae, sendo a única espécie do gênero *Bertholletia* (MORI, 1992; CATENACCI, 2016). Essa espécie é encontrada em regiões de florestas não inundadas, chamada de “terra firme”, sendo que sua distribuição se estende pelos países da Bolívia, Colômbia, Guiana e Guiana Francesa, Peru, Suriname, Venezuela, Trindade e Tobago. No Brasil, tem distribuição nos Estados do Acre, Amazonas, Amapá, Mato Grosso, Pará, Rondônia e Roraima (CATENACCI, 2016).

Essa planta forma agrupamentos chamados de castanhais e está presente em áreas com precipitação anual de 1.400 a 2.800 mm, sendo preciso de dois a cinco meses de seca para o desenvolvimento correto (MAUÉS *et al.*, 2015). As árvores podem atingir de 12 a 50 m, apresentar tronco cilíndrico e casca acinzentada com fissuras longitudinais e casca interna amarela. As folhas apresentam dimensões de 12-36 x 6,5-15,5 cm, glabras, com textura cartácea a coriácea e papilas na face abaxial, as margens são inteiras. A inflorescência é do tipo panícula axilar ou terminal. As flores são zigomorfas com 3-3,5 cm de diâmetro, possuem duas sépalas verdes e seis pétalas creme-amareladas, quatro ou cinco lóculos no ovário e cada lóculo pode ter de seis a oito óvulos. Os frutos são indeiscentes e geralmente arredondados, com 10 a 25 sementes por fruto. As amêndoas são fusiformes e triangulares com testa espessa, destacando-se por permanecer nos frutos devido à pequena abertura que esses apresentam.

As características florais e dos frutos dessa espécie podem variar bastante, inclusive na mesma planta. Alguns exemplos de variação são: o número de estames que podem variar de 80 a 130; podem ocorrer frutos com 3 e 6 lóculos; estilo de tamanho variável; frutos de diferentes formatos e tamanhos com dimensões de 10-12,5 x 10-12,5 cm a 16 x 14 cm; e a variação na quantidade de amêndoas por fruto, sendo comum 17-18 amêndoas (CATENACCI, 2016; MORI; PRANCE, 1990).

A produção de castanha-do-Brasil é predominantemente extrativista. A floração ocorre de acordo com o regime hídrico da região, iniciando no final da estação chuvosa e durando alguns meses (MORI, 1992). O desenvolvimento dos frutos ocorre durante aproximadamente 15 meses, desde o início do desenvolvimento até a maturação. As árvores provenientes do plantio de sementes começam a produzir após oito anos e as enxertadas após 3,5 anos intensificando com seis anos. Os dados de produtividade variam bastante, sendo de 6 a 8 kg

de amêndoas por planta para plantas com 30 anos a 12,5 kg por planta para aquelas com 21 anos. A variação ocorre pelo tipo de cuidado que se tem com os castanhais, se são castanhais nativos ou cultivados, origem da planta, entre outros (MAUÉS *et al.*, 2015).

### 2.1.2. Importância

A castanha-do-pará é a espécie mais importante entre as plantas neotropicais da família Lecythidaceae. A sua exploração já ocorria durante o período do Brasil Colônia, sendo inclusive exportada nessa época para a Europa (MORI; PRANCE, 1990).

Em 2019, o Brasil liderava a produção de castanha-do-Brasil e, considerando-se o produto com casca, a produção foi de 32.905 toneladas, seguido pela Bolívia com 31.146 toneladas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2021). No mesmo ano, a extração vegetal no Brasil totalizou 4,4 bilhões de reais, sendo que o grupo de produtos alimentícios é responsável por 1,2 bilhões desse valor. Os produtos alimentícios são o maior grupo entre produtos não madeireiros de extração vegetal. A castanha-do-Brasil corresponde a 11,1% do valor do grupo alimentício, atrás apenas do açaí e erva-mate. Isso equivalente a uma produção de 32,9 mil toneladas que alcançou R\$ 135,8 milhões. Isso representou uma redução na quantidade da produção quando comparada ao ano de 2018, mesmo assim, o valor da produção aumentou (IBGE, 2020). A produção brasileira de castanha-do-Brasil se concentra na região Norte, sendo o Estado do Mato Grosso o único fora dessa região. Dentre os Estados produtores, em 2016 destacaram-se o Amazonas, que liderava a produção com 33,2%, seguido pelo Acre com 19,7%, Pará com 13,7% e Roraima com 5,4%, correspondendo a 71,8% da produção brasileira (IBGE, 2017).

A castanha-do-Brasil é composta principalmente por lipídeos (60,9-67,3%), seguido de proteínas (14 a 16,5%), carboidratos (10,9 a 15,9%) e fibras (7,5-7,9%). É rica em ácidos graxos insaturados, destacando-se os ácidos oleico e linoleico. O teor de ácidos graxos saturados é considerado baixo. Possui diversos compostos antioxidantes como compostos fenólicos, flavonoides, tocoferol ou vitamina E, fitoesteróis e esqualeno. O principal antioxidante e nutriente de maior interesse nessa castanha é o selênio. Sua quantidade varia com a origem do produto, podendo ir de 5 a 29,9 µg/g, mas é considerada a melhor fonte alimentícia desse nutriente. Possui outros micronutrientes como magnésio, potássio, cálcio, cobre e zinco. Essas características implicam em benefícios para a saúde, tais como redução do colesterol do sangue, do risco de câncer e de doenças cardiovasculares, entre outros (CARDOSO *et al.*, 2017; SHAHIDI; TAN, 2008).

### 2.1.3. Pós-colheita

A colheita ocorre durante alguns meses do período chuvoso. É recomendada a limpeza embaixo das árvores produtoras para evitar a mistura com ouriços de safras anteriores, possivelmente contaminados por microrganismos, especialmente *Aspergillus flavus*. Quando os ouriços contendo as castanhas caem, é feita uma seleção inicial descartando-se os defeituosos ou possivelmente contaminados. Os ouriços são empilhados próximo às árvores, permanecendo no local até sua coleta que, de preferência, deve ser feita o mais rápido possível para diminuir o efeito de fatores bióticos e abióticos. Depois da coleta, os ouriços são quebrados e as castanhas são selecionadas, descartando-se as contaminadas e deterioradas, vazias e danificadas. Se não forem ser processadas imediatamente, as castanhas, ainda com casca, são armazenadas (DE SOUZA *et al.*, 2004).

O beneficiamento engloba nova seleção das castanhas e armazenamento até que sejam processadas. Depois as castanhas são lavadas, quando ainda estão com casca, e tratadas termicamente para reduzir a carga dos microrganismos e facilitar quebra mecânica da casca. As castanhas, depois do descascamento, são novamente selecionadas, deixando-se apenas as que se apresentam bem conservadas, mesmo que quebradas, e seguem para a classificação e separação. As amêndoas são secas para reduzir a umidade (DE SOUZA *et al.*, 2004). O valor do teor de umidade final varia, indo entre valores entre 2 e 15% (DE SOUZA *et al.*, 2004; MÜLLER; CALZAVARA, 1989). Então, são pesadas, embaladas e armazenadas até a venda para a indústria. O armazenamento deve ser feito em local arejado e limpo (DE SOUZA *et al.*, 2004).

Durante o armazenamento, características benéficas da castanha podem ser comprometidas. Isso ocorre pelo alto teor de lipídeos do produto e pela qualidade do beneficiamento e transporte. Castanhas quebradas são mais susceptíveis ao processo de deterioração, sendo mais facilmente contaminadas por microrganismos nas etapas pós-colheita (DE SOUZA *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2010).

A castanha-do-Brasil é colonizada principalmente pelo gênero *Aspergillus*, com destaque para *Aspergillus flavus* (DE SOUZA *et al.*, 2004; BAQUIÃO, 2012; CASTRILLÓN; PURCHIO, 1988). Outros fungos que podem aparecer nas amêndoas são os gêneros *Penicillium* spp. (DE SOUZA *et al.*, 2004; CASTRILLÓN; PURCHIO, 1988) e *Fusarium* spp. (DE SOUZA *et al.*, 2004; BAQUIÃO, 2012). O problema maior está relacionado à colonização por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, por serem capazes de produzir micotoxinas de grande importância, como as aflatoxinas, ocratoxina A

(DE SOUZA *et al.*, 2004). Sendo que as aflatoxinas são compostos extremamente tóxicos produzidos como metabólitos secundários do gênero *Aspergillus*, muito comum cereais, temperos, oleaginosas e castanhas, e a ocratoxina A é produzida principalmente por *A. ochraceus*, *Penicillium verrucosum* e produzida durante o armazenamento de diferentes alimentos (BHAT *et al.*, 2010). Entretanto, na literatura há relatos de contaminação de castanha-do-Brasil somente por aflatoxinas (DE SOUZA *et al.*, 2004). As cepas ou estirpes de *Aspergillus* encontradas nas castanhas tem alta capacidade de serem aflatoxigênicas (BAQUIÃO, 2012). A castanha-do-Brasil tem a maior incidência de aflatoxinas entre as castanhas (CALDAS *et al.*, 2002).

## **2.2. Gênero *Aspergillus* e *Aspergillus flavus***

### **2.2.1. Gênero *Aspergillus***

O gênero *Aspergillus* pertence à classe Hyphomycetes, ordem Moniliales e família Moniliaceae (BAQUIÃO, 2012), foi descrito pela primeira vez em 1729 por Pier Antonio Micheli (KWON-CHUNG, 1988). Esses fungos são caracterizados por possuírem conidióforos eretos compostos por três partes, uma vesícula na parte apical que varia no formato, uma estipe não septada e uma célula basal curta (KWON-CHUNG, 1988; PITT; HOCKING, 2009a). Da vesícula surgem as fiálides, diretamente se for unisseriada, e as métulas, se forem bisseriadas. A cabeça conidial pode ser colunar, globosa ou em formato de cunha, variando de acordo com a disposição das fiálides e formato da vesícula. No ápice das fiálides, são formados os conídios, que permanecem unidos até que estejam maduros. Então, então ocorre a invaginação. À medida que isso acontece e mais conídios se desenvolvem, a cadeia conidial é formada.

Inicialmente, *Aspergillus* descrevia a fase actinomórfica de certos fungos, depois foi descoberto que alguns deles formam a fase teleomórfica (KWON-CHUNG, 1988). Os gêneros teleomórficos foram agrupados na classe Ascomycetes, ordem Eurotiales e família Trichocomaceae (KWON-CHUNG, 1988; REIS, 2009). Os ascocarpos produzidos pelos teleomórficos podem ser bem variáveis nos quesitos coloração e envoltório, que pode ser sem, com parede celular espessa chamada células de Hülle, ou formando esclerócios (KWON-CHUNG, 1988).

### 2.2.2. *Aspergillus flavus* e as aflatoxinas

A espécie *Aspergillus flavus* forma colônias flocosas de 25 a 70 mm de diâmetro, com coloração esverdeada ou amarelada, e esclerócios com cor marrom avermelhada. Essa espécie se desenvolve adequadamente em temperaturas entre 25 a 37 °C, com desenvolvimento ótimo a 33 °C. Atividade de água em torno de 0,80 favorece o desenvolvimento dessa espécie, que é a principal produtora de aflatoxinas, a micotoxina de maior importância em alimentos (PITT; HOCKING, 2009a).

As aflatoxinas mais importantes são AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e AFM1, que formam cristais fosforescentes sob luz ultravioleta. Sob luz ultravioleta, AFB1 e AFB2 emitem coloração azul, AFG1 coloração verde, AFG2 coloração verde azulado e AFM1 coloração azul violácea (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC, 2012). As aflatoxinas B e G são metabólitos secundários produzidos por *Aspergillus* (RUSTOM, 1997), enquanto que AFM1 é um produto do metabolismo da AFB1, quando usada em rações animais ou consumida por humanos. AFM1 pode ser encontrada em leite e seus subprodutos (WHO, 2018). *Aspergillus flavus* produz apenas as aflatoxinas B e, às vezes, o ácido ciclopiazônico (Cyclopiazonic Acid – CPA) (IARC, 2012).

As concentrações permitidas/recomendadas de aflatoxinas nos alimentos apresentam variação, sendo maior em rações de grandes animais e menor para os animais pequenos, domésticos ou silvestres, esses valores variam de 300 a 20 partes por bilhão (ppb). Nozes, castanhas e outros alimentos para consumo humano apresenta concentração máxima permitida de até 20 ppb e no leite o nível máximo é de 0,5 ppb (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2018). As concentrações também variam de acordo com o país, permanecendo entre 4 a 30 ppb para a maioria dos alimentos (WILLIAMS *et al.*, 2004), no Brasil é de até 20 ppb, nos Estados Unidos é de até 4 ppb (BAQUIÃO, 2012) e na Europa é de no máximo 15 ppb se as castanhas ainda forem ser submetidas a outros tratamentos físicos e de 10 ppb para consumo humano direto (EUROPEAN COMMISSION – EC, 2010). Os valores máximos permitidos para a castanha-do-Brasil é de 10 ppb para castanhas sem casca para consumo direto, 15 ppb se for sem casca para processamento posterior e 20 ppb para as castanhas com casca para consumo direto (BRASIL, 2011).

Os riscos relacionados ao consumo de aflatoxinas podem ser classificados como agudos ou crônicos. Os riscos crônicos envolvem exposição por longo prazo, que causam hepatocarcinomas, principalmente no fígado, sendo que isso aumenta quando há interação com o vírus da hepatite B (HBV). Essa substância também é classificada como

imunossupressora e mutagênica (WHO, 2018; IARC, 2012). Já os problemas agudos, associados à ingestão de altas concentrações, estão relacionados com problemas no fígado, que englobam náuseas, letargia, edemas, icterícia, cirrose hepática e necrose hemorrágica levando a morte. Os adultos são mais tolerantes que as crianças a exposição à aflatoxinas (WHO, 2018; WILLIAMS *et al.*, 2004).

## **2.3. Tomilho**

### **2.3.1. Botânica**

O tomilho, *Thymus vulgaris* L., pertence à família Lamiaceae, sendo que o gênero *Thymus* é um dos mais importantes gêneros dessa família (MORALES, 2003). O gênero é amplamente distribuído no Mediterrâneo e Eurásia. A *Thymus vulgaris* L. é nativa do sul da Europa, na região entre Espanha e Itália. Costuma ser cultivado em regiões de clima temperado (STAHL-BISKUP; VENSKUTONIS, 2006), e, por isso, o cultivo no Brasil se concentra nas regiões sul e sudeste (DA ROCHA *et al.*, 2012).

O gênero *Thymus* pode apresentar as plantas de duas formas distintas. A primeira forma é mais herbácea, lenhosa na base e que chegam até 50 cm, com folhas planas e ciliadas na base, inflorescência em capítulo com corola roxa e cálice em forma de campânula. *Thymus serpyllum* L. é um exemplo da forma mais herbácea. Já o *Thymus vulgaris* L., destaca-se por ser um subarbusto perene, de 10 a 30 cm, com o caule quadrangular, característico da família. As folhas são opostas, planas, mais compridas que largas consideradas oblongo-lanceoladas a lineares e as margens são recurvadas. Possui tricomas tectores e glandulares, sendo que o último é de extrema importância para a espécie, por ser o local em que ficam armazenados os óleos essenciais. As flores são lilases e bilabiadas aglomeradas nas axilas ou nas terminações dos ramos (MORALES, 2003; STAHL-BISKUP; VENSKUTONIS, 2006).

Os compostos secundários produzidos pelo tomilho podem ser voláteis, os óleos essenciais, ou não-voláteis, os polifenóis. A concentração de cada tipo de composto varia de acordo com as condições ambientais, época, genética, entre outros (STAHL-BISKUP; VENSKUTONIS, 2006). A produção dos compostos voláteis é maior durante períodos mais secos (MORALES, 2003). Os monoterpenos constituem a maior parte dos voláteis do tomilho, sendo o timol o principal do grupo. Outros monoterpenos que podem ser quantificados são o carvacrol, p-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, linalol,  $\alpha$ -terpineol, eucaliptol e borneol, além de outros compostos em concentrações relativamente baixas (LEE *et al.*, 2005; STAHL-BISKUP; VENSKUTONIS, 2006). Um sesquiterpeno de importância é o  $\beta$ -cariofileno. Os flavonoides

aparecem principalmente como agliconas. Entre os compostos não-voláteis, tem-se os taninos, principalmente o ácido rosmarínico, compostos bifenílicos e outros (STAHL-BISKUP; VENSKUTONIS, 2006).

### 2.3.2. Importância e tratos culturais

O tomilho sempre foi muito utilizado na forma de condimento, em função de suas características aromáticas e na medicina popular (DA ROCHA *et al.*, 2012; SALEHI *et al.*, 2018). O uso medicinal engloba os efeitos no sistema respiratório, nervoso, digestivo, cardiovascular, uso tópico, gargarejos, além de possui propriedades antimicrobianas (BASCH *et al.*, 2004; SALEHI *et al.*, 2018). O óleo essencial de tomilho está entre os dez mais importantes óleos essenciais, devido às diversas propriedades e possibilidades de uso (BADI *et al.*, 2004).

Essa planta é produzida principalmente na Europa, norte da África, Canadá e Estados Unidos. Dentre os países, a Espanha tem posição de destaque, sendo um dos principais fornecedores de folhas secas e óleo essencial, com a produção proveniente de plantas nativas. A propagação pode ser via semente ou propagação assexuada, como a estaquia (STAHL-BISKUP; VENSKUTONIS, 2006). Como as sementes apresentam variabilidade genética, a propagação assexuada é melhor maneira a ser adotada para manter suas características físico-químicas de interesse inalteradas (DONEGA *et al.*, 2014).

Para a obtenção de folhas frescas e secas, produção de óleo e quantidade de timol, um espaçamento menor com coleta no início do florescimento proporciona melhor produtividade (BADI *et al.*, 2004). O tomilho se adapta a diferentes condições climáticas, mas temperaturas médias anuais entre 7 e 20 °C favorecem o desenvolvimento. O solo deve estar sempre úmido durante a emergência e estabelecimento inicial da cultura, devendo permanecer bem drenado após esse período (STAHL-BISKUP; VENSKUTONIS, 2006).

A etapa pós-colheita é de extrema importância para manter a qualidade do produto. Para a venda do tomilho fresco, o armazenamento deve ser feito à temperatura de 0 a 5 °C por no máximo um mês. O processo de secagem garante que o produto possa ser conservado por mais tempo, mas também pode prejudicar a qualidade do tomilho pela modificação dos compostos voláteis, se feita de maneira inadequada. A quantidade de óleo retirado das folhas secas vai de 1 a 2,5% (STAHL-BISKUP; VENSKUTONIS, 2006).

## 2.4. Timol

### 2.4.1. Obtenção

O timol, 2-isopropil-5-metil-fenol, é o isômero mais conhecido do isopropil-5-metil-fenol. Apresenta uma estrutura cristalina, com a estrutura química  $C_{10}H_{14}O$ . Pode ser obtido de forma sintética (THOZET; PERRIN, 1980) ou em diferentes plantas como o tomilho, *Thymus vulgaris* L. variando entre 10 e 64% (SALEHI *et al.*, 2018), *T. fontanesii* Boiss. & Reut. com 67,8% (GHANNADI *et al.*, 2004) e *T. ciliatus* Desf. com 79,1% (KABOUCHE *et al.*, 2009); o alecrim-pimenta, *Lippia sidoides* Cham. variando de 34,2 a 95,1% (LEAL *et al.*, 2003); orégano mexicano, *Lippia graveolens* Kunth com 70,6% (GUEVARA *et al.*, 2018), entre outras. A concentração de timol no óleo extraído de plantas varia com o local, época de coleta do material (ABU-LAFI *et al.*, 2008), estágio da planta (LEAL *et al.*, 2003), manejo do cultivo (CORRÊA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2007), entre outros.

O timol pode ser extraído das plantas por hidrodestilação (CORRÊA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2007; GHANNADI *et al.*, 2004) ou com o uso de solventes como o hexano (GUEVARA *et al.*, 2018). Sinteticamente, pode ser obtido pela condensação de alquilfenóis e cetonas a baixas temperaturas e com um agente condensante como o ácido hidrolórico (HANS, 1930).

### 2.4.2. Propriedades

O timol pode ser usado para diversos fins. Existem estudos sobre o uso de timol na alimentação animal como uma forma de substituir os antibióticos, tanto para frangos (SANTANA *et al.*, 2011) quanto para leitões (SUZUKI *et al.*, 2008). Tem efeito na saúde humana em problemas respiratórios, cardiovasculares e do sistema nervoso, e é anti-inflamatório (SALEHI *et al.*, 2018) e antioxidante (LEE *et al.*, 2005). Também apresenta propriedade antimicrobiana, com efeito comprovado sobre *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella typhimurium*, desintegrando a membrana celular desses microrganismos (HELANDER *et al.*, 1998). Em diferentes espécies fúngicas, como dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, o timol apresenta efeito fungicida (ŠEGVIĆ KLARIĆ *et al.*, 2007). Em *Aspergillus flavus*, já foi estudado que o timol é capaz de gerar espécies reativas do oxigênio e com isso induzir a produção de óxido nítrico levando a inativação desses microrganismos (SHEN *et al.*, 2016). Também causa apoptose via o bloqueio no fluxo dos íons de potássio (HU *et al.*, 2018).

### **3. METODOLOGIA**

O experimento foi realizado no Laboratório de Análise de Alimentos e no Laboratório de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Vegetais da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária na Universidade de Brasília.

#### **3.1. Óleo essencial de tomilho e timol**

O óleo essencial de tomilho utilizado no experimento foi obtido da Ferquima<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil). O timol utilizado possui 98,5% de pureza e foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) na fase sólida.

#### **3.2. Caracterização do óleo essencial de tomilho**

O perfil do óleo essencial de tomilho foi analisado pela técnica de cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM). As análises cromatográficas foram realizadas de acordo com Moura *et al.* (2020), com adaptações. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG-MG) (GC-MS) (GC7820A-5977B, Agilent, United States) para determinar a composição química. A acetonitrila com 99,9% de pureza foi utilizada como solvente. O óleo essencial de tomilho foi diluído em acetonitrila para 50 µL/L e foram feitas amostras de 1,0 µL injetadas no cromatógrafo com um auto injector (Agilent, United States). O cromatógrafo operou no modo Split com razão 20:1, e com temperatura de 220 °C. A temperatura inicial do forno era de 60 °C, com taxa de aquecimento de 5 °C/min até atingir 250 °C. O gás de arraste utilizado era o gás hélio com fluxo de 1,2 mL/min. A caracterização dos compostos foi baseada nos tempos de retenção de cada um dos compostos e as áreas correspondentes.

#### **3.3. Atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho e timol**

Foi avaliada a atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho e do timol por fumigação em *Aspergillus flavus in vitro* e em castanha-do-Brasil. Usou-se o isolado de *A. flavus* CCUB1405, produtor de aflatoxinas, obtido em amendoim comercial assintomático.

##### **3.3.1. Avaliação da atividade antifúngica *in vitro***

Na avaliação *in vitro* do óleo essencial de tomilho e do timol no controle de *A. flavus* foram utilizadas placas de Petri de 54 mm de diâmetro, com 27,5 mL de volume interno. Em cada placa de Petri foi acrescentado 7,5 mL do meio de cultura *Aspergillus flavus* e

*parasiticus* Agar (AFPA) (PITT; HOCKING, 2009b), ficando disponíveis 20,0 mL de volume de ar. Efetuou-se a inoculação de *A. flavus* no centro de cada placa com auxílio de alfinete entomológico, de tal forma que uma colônia se desenvolvia por placa.

Após a inoculação das placas com *A. flavus*, foi aplicado o óleo essencial de tomilho e o timol em diferentes concentrações, considerando 20,0 mL de volume de ar em cada placa de Petri, conforme Hua *et al.* (2014), com modificações. As concentrações do óleo essencial de tomilho foram de 0, 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 mg/L, considerando-se a densidade de 0,920 g/mL à 20 °C, de acordo com as informações do fabricante. A solubilização do timol, adquirido na fase sólida, foi feita com etanol p.a., levando-se em consideração a solubilidade informada pelo fabricante de 50 mg/mL. O tratamento controle teve a quantia máxima de etanol utilizada. As concentrações de timol foram definidas a partir dos resultados obtidos na etapa da caracterização do óleo essencial de tomilho, sendo estabelecidas em função do seu percentual presente no óleo essencial de tomilho. Assim, foi possível avaliar se o efeito do óleo de tomilho decorreu da ação do timol ou da ação conjunta dos compostos presentes no óleo.

As placas de Petri foram invertidas após a inoculação com *A. flavus* para realizar a aplicação das diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho e de timol. Papel de filtro com dimensões de 2,5 x 2,5 cm, e previamente autoclavado, foi utilizado para aplicar as concentrações do óleo essencial e da solução de timol, de tal forma que somente os compostos voláteis entraram em contato com o meio de cultura. As placas de Petri foram seladas com Parafilm® e filme de PVC e acondicionadas em câmaras climáticas a 30 °C. O diâmetro de cada colônia foi medido com uma régua graduada em duas direções perpendiculares, a cada 12 h até atingir 144 horas e depois a cada 24 h até chegar em 240 h (HUA *et al.*, 2014). Para cada combinação de concentração e tempo, foram utilizadas 20 repetições. A partir dos resultados obtidos, foram feitas as equações de regressão que relacionam o diâmetro das colônias e tempo de exposição para cada concentração do óleo essencial de tomilho e do timol. O cálculo do percentual de inibição do crescimento micelial (ICM) foi feito usando os valores estimados a partir das equações de regressão para 240 h 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 estimado do controle; e

DT = diâmetro estimado do tratamento.

Com o intuito de diferenciar os efeitos fungistático e fungicida das distintas condições em que foram aplicados o óleo essencial de tomilho e o timol, foi adotada a metodologia proposta por Smid *et al.* (1995). As placas de Petri referentes aos tratamentos que possibilitaram 100% de inibição do crescimento micelial, por 240 h a 30 °C, foram abertas em ambiente estéril e os papéis de filtro contendo as soluções foram retiradas para interromper a exposição aos compostos voláteis. Depois de 10 min, as placas de Petri foram novamente fechadas, não sendo utilizado o Parafilm<sup>®</sup> ou filme de PVC. O crescimento micelial do *A. flavus* foi monitorado e o diâmetro das colônias medido depois de permanecerem por 168 h (sete dias) a 30 °C. Considerou-se como efeito fungicida quando não houve crescimento micelial, mesmo após a abertura da placa de Petri. Considerou-se como efeito fungistático as placas em que foram verificadas crescimento micelial.

Também foi avaliado o efeito do óleo essencial de tomilho e do timol sobre colônias estabelecidas de *A. flavus*. Para isso, inicialmente foi efetuada a inoculação de *A. flavus* em placas contendo o meio AFPA, mantidas à 30 °C por 72 h. Decorrido esse período, foram medidos os diâmetros das colônias e em seguida aplicados o óleo essencial de tomilho e da solução de timol nas diferentes concentrações. Então, as placas foram mantidas a 30 °C, efetuando-se medição dos diâmetros das colônias depois de 240 h (10 dias) e 336 h (14 dias). Verificou-se visualmente a ocorrência de esporulação depois de 336 h.

### 3.3.2. Avaliação da atividade antifúngica em castanha-do-Brasil durante o armazenamento

Para avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho e do timol em castanha-do-Brasil, foram adquiridas lotes de 10 kg do produto no mercado local. O lote de castanha-do-Brasil foi inoculado com o isolado de *A. flavus* CCUB1405.

Inicialmente o isolado de *A. flavus* foi inoculado em placas de Petri, contendo meio de cultura AFPA, e mantidas a 30 °C por sete dias. Depois desse período, 10 mL de água destilada e esterilizada foi adicionada em cada placa de Petri inoculada para que fosse possível obter a suspensão de conídios. A concentração de conídios foi ajustada para 10<sup>6</sup> esporos por mL. Em seguida, as amostras de castanha-do-Brasil ficaram imersas na suspensão de conídios por 10 min, de acordo com Michel e Radcliffe (1995). Depois de inoculadas, as castanhas permaneceram por sete dias, em condição ambiente.

Depois da inoculação, o lote de castanha-do-Brasil foi fracionado em amostras de 75 g, contidas em sacolas de tule e, posteriormente, acondicionadas em recipientes de vidro com tampa e capacidade de 800 mL. As concentrações de óleo essencial de tomilho e de timol que

foram testadas na castanha-do-Brasil foram aquelas que tiveram efeito fungicida na avaliação *in vitro*, ou seja, apresentaram efeito fungicida. A fumigação das amostras de castanha-do-Brasil com o óleo essencial de tomilho e com timol foi feita conforme Kedia *et al.* (2016), com adaptações. Pedacos de algodão autoclavados foram colocados em placas de Petri de 54 x 12 mm sem a tampa. O óleo essencial de tomilho e a solução de timol foram adicionados ao algodão, e a placa de Petri foi colocada dentro do recipiente que permanecia na horizontal, garantindo assim, que somente os compostos voláteis entrassem em contato com as amostras de castanha-do-Brasil. Os recipientes foram vedados com a tampa e armazenados em condições ambiente por 60 dias.

As amostras foram analisadas no início do armazenamento e a cada 15 dias, sendo que cada combinação de concentração e tempo tinha três repetições. A avaliação do efeito da fumigação com óleo essencial de tomilho e com timol sobre *A. flavus* em castanha-do-Brasil foi feita utilizando-se o método do plaqueamento direto em meio de cultura AFPA, com as placas sendo incubadas a 30 °C por 42 h (PITT; HOCKING, 2009b; TANIWAKI *et al.*, 2012). Os resultados foram expressos em porcentagem de infecção.

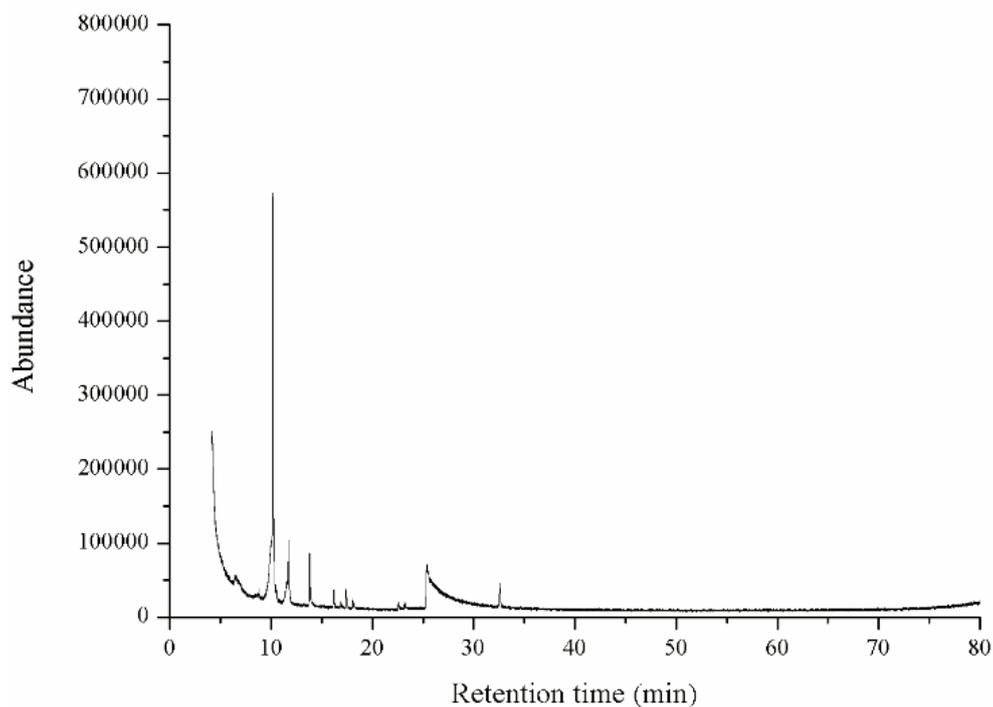
#### **3.4. Delineamento experimental**

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Inicialmente os dados foram submetidos à análise de variância. Para a avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de tomilho e do timol, em função do tempo, utilizou-se análise de regressão. Para as demais variáveis adotou-se teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o software StatPlus versão 5.0. A obtenção das equações de regressão e plotagem dos gráficos foi feita com o software SigmaPlot v. 10.0.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização do óleo essencial de tomilho

Apresentam-se, na Figura 1 e na Tabela 1, o perfil cromatográfico do óleo essencial de tomilho. Verificou-se que os compostos majoritários no óleo essencial de tomilho foram p-cimeno e timol, com percentuais equivalentes a 45,20 e 37,62%, respectivamente. Podem ser destacados ainda os compostos linanol e  $\gamma$ -terpineno, com 4,41 e 3,68%, respectivamente.



**Figura 1** - Perfil cromatográfico referente à composição do óleo essencial de tomilho.

**Tabela 1** - Composição química do óleo essencial de tomilho.

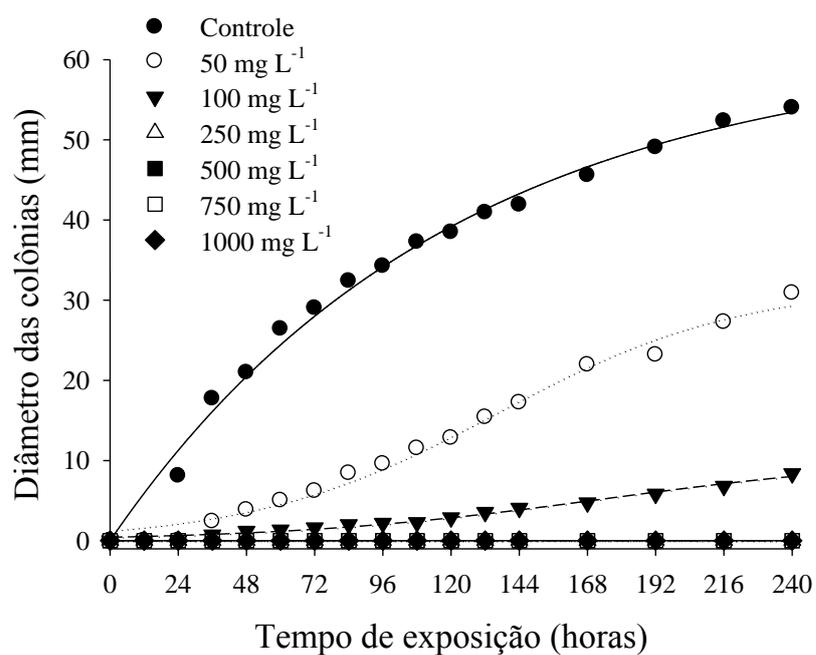
Composto	Tempo de retenção (min)	% Área
$\alpha$ -pineno	6,53	1,55%
p-cimeno	10,176	45,20%
$\gamma$ -terpineno	11,727	3,68%
Linalol	13,826	4,41%
Cânfora	16,212	1,48%
Trans-dihidro- $\beta$ -terpineol	16,895	0,52%
Isoborneol	17,408	1,60%
4-terpineol	18,116	0,80%
Carvacrol metil éter	22,562	0,53%
Geraniol	23,179	0,46%
Timol	25,369	37,62%
(Z)-cariofileno	32,597	2,15%

Levando-se em consideração que o percentual de timol no óleo essencial de tomilho foi equivalente a 37,62%, as concentrações testadas da solução etanólica de timol no controle de *A. flavus* foram de 0; 18,8; 37,6; 94,1; 188,1; 282,2 e 376,2 mg/L, referentes as concentrações do óleo essencial de tomilho de 0; 50; 100; 250; 500; 750 e 1000 mg/L, respectivamente.

## 4.2. Atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho e timol

### 4.2.1. Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

Apresentam-se, na Figura 2 e na Tabela 2, os dados referentes ao diâmetro das colônias de *A. flavus* durante a exposição ao óleo essencial de tomilho por fumigação, imediatamente depois da inoculação, em diferentes concentrações por até 240 h. No que se refere aos tratamentos com óleo essencial de tomilho, verificou-se crescimento das colônias de *A. flavus* somente quando se adotaram as concentrações de 50 e 100 mg/L, embora com menor intensidade que no tratamento controle. Depois de 240 h, o diâmetro estimado das colônias de *A. flavus* para o tratamento controle, obtido a partir da equação de regressão, foi de 53,40 mm. Por outro lado, para os tratamentos equivalentes a 50 e 100 mg/L de óleo essencial de tomilho, os diâmetros estimados das colônias de *A. flavus* foram equivalentes a 29,38 e 8,01 mm, respectivamente.



**Figura 2** - Curvas de regressão referentes ao diâmetro das colônias de *Aspergillus flavus* durante exposição ao óleo essencial de tomilho por fumigação, imediatamente depois da inoculação, em diferentes concentrações por até 240 h.

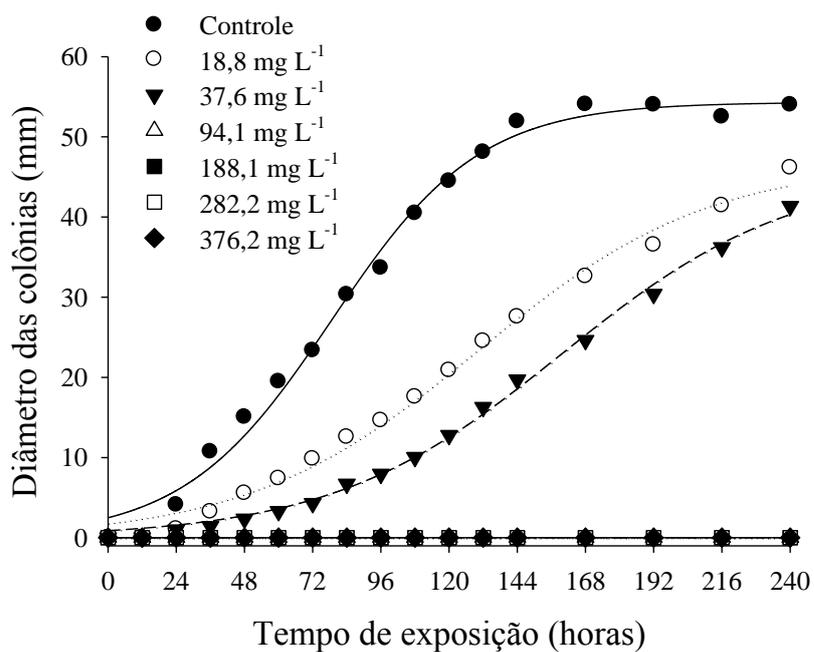
**Tabela 2** - Equações de regressão ajustadas com seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), erro padrão da estimativa (EPE), o diâmetro das colônias estimado pela equação de regressão e percentual de inibição do crescimento micelial (ICM) referentes ao diâmetro das colônias de *Aspergillus flavus* durante exposição ao óleo essencial de tomilho por fumigação, imediatamente depois da inoculação, em diferentes concentrações por até 240 h.

Concentração (mg/L)	Equações ajustadas	$R^2$	EPE	Diâmetro estimado (mm) – 240 h	ICM (%)*
0 (controle)	$\hat{y}=61,6115 \times (1 - e^{(-0,0084 \times x)})$	0,99	1,9865	53,40	-
50	$\hat{y} = \frac{31,9996}{1 + e^{\left(\frac{-(x-136,2044)}{42,9192}\right)}}$	0,99	1,1370	29,38	44,98
100	$\hat{y} = \frac{10,4417}{1 + e^{\left(\frac{-(x-173,8690)}{55,3227}\right)}}$	0,98	0,3365	8,01	84,99
250	Sem crescimento			-	100,00
500	Sem crescimento			-	100,00
750	Sem crescimento			-	100,00
1.000	Sem crescimento			-	100,00

\* Depois de 240 h de exposição.

Quanto ao percentual de inibição do crescimento micelial (ICM) das colônias de *A. flavus* para os tratamentos com óleo essencial de tomilho depois de 240 h (Tabela 2), obtiveram-se valores iguais a 44,98 e 84,99, quando se adotaram as concentrações de 50 e 100 mg/L, respectivamente. É importante destacar que não houve crescimento micelial, para as concentrações de 250, 500, 750 e 1.000 mg/L, correspondendo dessa forma a 100% de inibição do crescimento micelial.

Na Figura 3 e na Tabela 3 são apresentados os dados referentes ao diâmetro das colônias de *A. flavus* durante exposição à solução etanólica de timol por fumigação, imediatamente depois da inoculação, em diferentes concentrações por até 240 h. Verificou-se crescimento micelial somente no tratamento controle (0 mg/L) e naqueles correspondentes a 18,8 e 37,6 mg/L da solução etanólica de timol. Com relação aos diâmetros estimados a partir das equações de regressão depois de 240 h de exposição, obtiveram-se valores iguais a 54,20, 44,02 e 40,30 mm, para o tratamento controle e 18,8 e 37,6 mg/L da solução etanólica de timol, respectivamente.



**Figura 3** - Curvas de regressão referentes ao diâmetro das colônias de *Aspergillus flavus* durante exposição a solução etanólica de timol por fumigação, imediatamente depois da inoculação, em diferentes concentrações por até 240 h.

**Tabela 3** - Equações de regressão ajustadas com seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), erro padrão da estimativa (EPE), o diâmetro das colônias estimado pela equação de regressão e percentual de inibição do crescimento micelial (ICM) referentes ao diâmetro das colônias de *Aspergillus flavus* durante exposição a solução etanólica de timol por fumigação, imediatamente depois da inoculação, em diferentes concentrações por até 240 h.

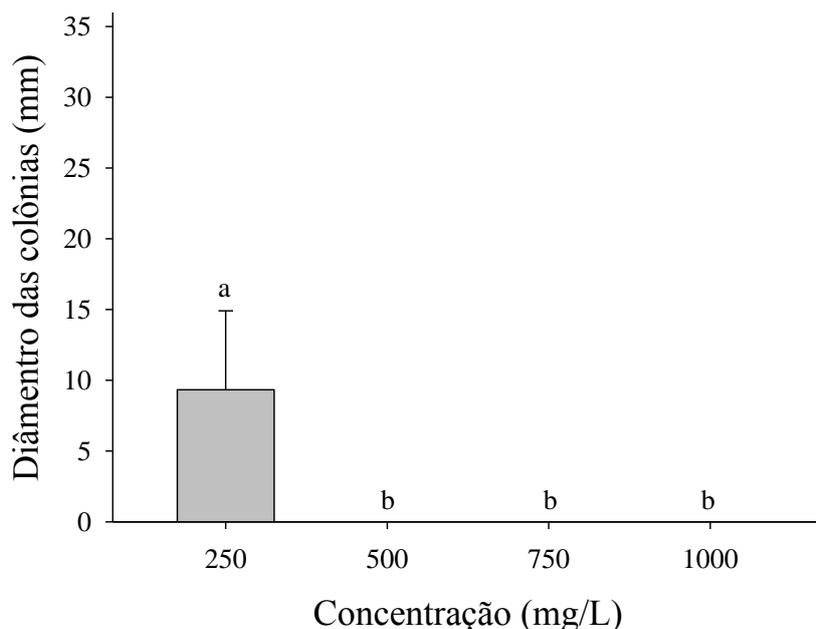
Concentração (mg/L)	Equações ajustadas	$R^2$	EPE	Diâmetro estimado (mm) – 240 h	ICM (%)*
0 (controle)	$\hat{y} = \frac{54,3128}{1 + e^{\left(\frac{-(x-78,7123)}{25,9451}\right)}}$	0,99	1,8844	54,20	-
18,8	$\hat{y} = \frac{46,9282}{1 + e^{\left(\frac{-(x-130,1521)}{40,5112}\right)}}$	0,99	1,3992	44,00	18,79
37,6	$\hat{y} = \frac{45,8978}{1 + e^{\left(\frac{-(x-159,7262)}{40,6478}\right)}}$	0,99	0,8061	40,30	25,64
94,1	Sem crescimento			-	100,00
188,1	Sem crescimento			-	100,00
282,2	Sem crescimento			-	100,00
376,2	Sem crescimento			-	100,00

\* Depois de 240 h de exposição.

No que se refere ao efeito da exposição à solução etanólica de timol por fumigação no percentual de inibição do crescimento micelial (ICM) das colônias de *A. flavus*, depois de 240 h, foram obtidos percentuais iguais a 18,79 e 25,64%, para as concentrações de 18,8 e 37,6 mg/L, respectivamente (Tabela 3). Para as demais concentrações da solução etanólica de timol, o percentual de inibição do crescimento micelial foi de 100%.

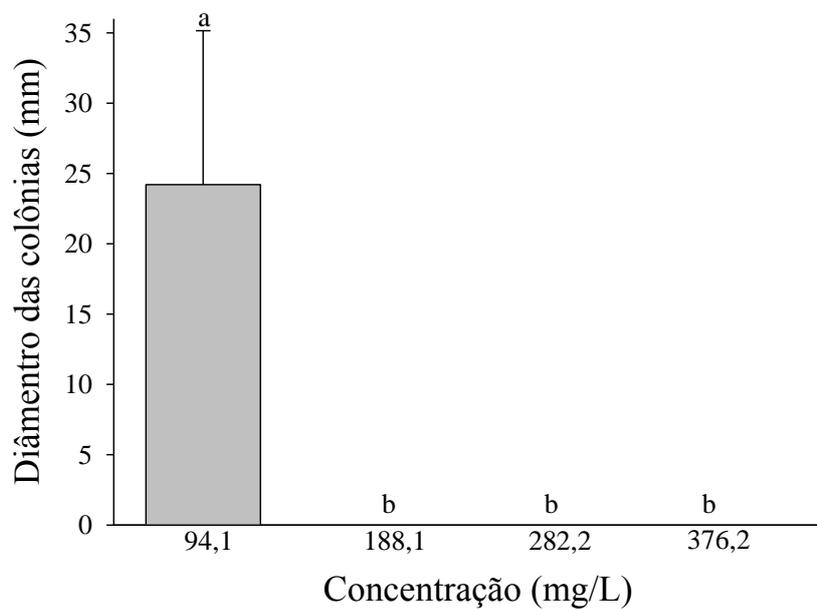
Na Figura 4, são apresentados os diâmetros médios das colônias de *A. flavus* depois da interrupção da fumigação por óleo essencial de tomilho nas concentrações de 250, 500, 750 e 1.000 mg/L, a 30 °C. É importante salientar, que nessa etapa foram consideradas somente as concentrações de óleo essencial de tomilho que ocasionaram 100% de inibição do crescimento micelial (Tabela 2). De acordo com a Figura 4, somente houve crescimento das colônias quando se adotou a concentração de 250 mg/L do óleo essencial de tomilho, com diâmetro médio igual a  $9,33 \pm 5,58$  mm, sendo diferente significativamente ( $p < 0,05$ ) dos demais tratamentos. Dessa forma, nessa concentração, o óleo essencial de tomilho se

comportou como agente fungistático. Por outro, não houve crescimento das colônias quando se adotaram as concentrações de 500, 750 e 1.000 mg/L do óleo essencial de tomilho, mesmo 168 h depois da interrupção da fumigação. Então, o óleo essencial de tomilho, nas concentrações de 500, 750 e 1.000 mg/L, atua como agente fungicida no controle de *A. flavus*, pois mata o fungo nessas condições.



**Figura 4** – Diâmetros médios das colônias de *Aspergillus flavus*, depois de 168 h da interrupção da fumigação por óleo essencial de tomilho em diferentes concentrações, a 30 °C.

Apresentam-se na Figura 5, os diâmetros médios das colônias de *A. flavus*, depois de 168 h da interrupção da fumigação por solução etanólica de timol, nas concentrações de 94,1; 188,1; 282,2 e 376,2 mg/L, a 30 °C. De maneira semelhante ao óleo essencial de tomilho, foram consideradas somente as concentrações em que houve 100% de inibição do crescimento micelial (Tabela 3). Conforme apresentado na Figura 5, houve crescimento das colônias de *A. flavus* somente quando se adotou a concentração de 94,1 mg/L da solução etanólica de timol, com diâmetro médio igual a  $24,21 \pm 10,94$  mm, sendo diferente significativamente ( $p < 0,05$ ) dos demais tratamentos. Então, o timol aplicado nessa concentração se comporta como agente fungistático no controle de *A. flavus*. Em contrapartida, não foi observado crescimento das colônias quando se adotaram as concentrações da solução etanólica de timol iguais a 188,1; 282,2 e 376,2 mg/L. Então, quando aplicado nessas condições, o timol se comporta com agente fungicida sobre *A. flavus*.



**Figura 5** - Diâmetros médios das colônias de *Aspergillus flavus*, depois de 168 h da interrupção da fumigação por solução etanólica de timol em diferentes concentrações, a 30 °C.

Os diâmetros médios das colônias de *A. flavus* expostas ao óleo essencial de tomilho e à solução de timol por fumigação, depois de 72 h da inoculação, em diferentes concentrações, por 240 e 336 h, são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** - Diâmetros médios das colônias de *Aspergillus flavus* expostas ao óleo essencial de tomilho e à solução etanólica de timol por fumigação, depois de 72 h da inoculação no meio de cultura, em diferentes concentrações, por 240 e 336 h.

Tempo (h)	Concentração (mg/L)						
	Óleo essencial de tomilho						
	0	50	100	250	500	750	1.000
0	27,1±0,7Ba	27,4±0,4Ba	27,4±0,7Ba	27,3±0,3Aa	27,1±0,4Aa	27,2±0,4Aa	26,9±0,2Aa
240	54,0±0,0Aa	49,4±8,2Aab	42,7±11,0Ab	27,2±0,3Ac	26,8±0,4Ac	27,1±0,2Ac	26,9±0,2Ac
336	54,0±0,0Aa	50,2±6,9Aab	44,8±11,3Ab	27,3±0,3Ac	27,8±0,4Ac	27,5±0,3Ac	27,1±0,3Ac
Esporulação*	+	+	+	-	-	-	-
	Solução etanólica de timol						
	0	18,8	37,6	94,1	188,1	282,2	376,2
	0	240	336	0	240	336	0
0	26,9±0,2Ba	27,0±0,4Ba	27,3±0,4Ba	27,2±0,6Aa	27,2±0,4Aa	27,6±0,2Aa	27,2±0,6Aa
240	54,0±0,0 Aa	54,0±0,0 Aa	54,0±0,0 Aa	27,2±0,3Ab	26,8±0,4Ab	27,5±0,3Ab	27,4±0,2Ab
336	54,0±0,0 Aa	54,0±0,0 Aa	54,0±0,0 Aa	27,2±0,3Ab	27,2±0,4Ab	27,8±0,4Ab	27,8±0,3Ab
Esporulação*	+	+	+	-	-	-	-

Valores médios seguidos de mesma letra maiúscula nas colunas ou minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

\* Depois de 336 h; + = houve esporulação; - = não houve esporulação.

No que se refere ao efeito do óleo essencial de tomilho sobre colônias de *A. flavus*, aplicado depois de 72 h da inoculação, houve crescimento significativo das colônias ( $p < 0,05$ ) somente no tratamento controle (0 mg/L) e naqueles referentes às concentrações 50 e 100 mg/L, quando se compararam os valores obtidos no tempo zero (0) e depois de 240 e 336 h (Tabela 4). É importante destacar que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ), quando se comparou os valores médios obtidos no tratamento controle e com aqueles equivalentes à concentração de 50 mg/L, para os períodos de 240 e 336 h. Por outro lado, os diâmetros médios das colônias de *A. flavus* para a concentração de óleo essencial de tomilho de 100 mg/L foram inferiores ( $p < 0,05$ ) aos obtidos no tratamento controle, quando se consideraram os tempos de 240 e 336 h.

No que tange aos diâmetros médios das colônias de *A. flavus* expostas a diferentes concentrações da solução etanólica de timol, aplicada depois de 72 h da inoculação (Tabela 4), verificou-se crescimento significativo ( $p < 0,05$ ) no tratamento controle (0 mg/L) e quando se adotaram as concentrações de 18,8 e 37,6 mg/L, quando se compararam os valores obtidos no tempo zero (0) e depois de 240 e 336 h. Salienta-se que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando se comparou os valores médios obtidos no tratamento controle com aqueles referentes a concentração de 18,8 mg/L. Em contrapartida, apesar de ter ocorrido aumento diâmetro das colônias de *A. flavus* quando se adotou a concentração da solução etanólica de timol de 37,6 mg/L, os valores obtidos foram inferiores àqueles referentes ao tratamento controle, quando se consideraram os tempos de 240 e 336 h.

Outro resultado relevante quanto à aplicação do óleo essencial de tomilho e da solução etanólica de timol se refere ao efeito na esporulação de *A. flavus*, verificado visualmente. Além de ter ocorrido crescimento das colônias, observou-se esporulação quando se adotaram as concentrações de óleo essencial de tomilho de 50 e 100 mg/L e de solução etanólica de timol de 18,8 e 37,6 mg/L (Tabela 4).

#### 4.2.2. Avaliação da atividade antifúngica em castanha-do-Brasil durante o armazenamento

Os resultados referentes ao efeito da fumigação com óleo essencial de tomilho e com solução etanólica de timol sobre o percentual de infecção por *A. flavus* em castanha-do-Brasil durante o armazenamento são apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. É importante destacar que nessa etapa foram utilizadas somente as concentrações do óleo essencial de tomilho e da solução etanólica de timol, em que os compostos foram considerados fungicidas, conforme observado nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

**Tabela 5** - Percentual de infecção por *Aspergillus flavus* em castanha-do-Brasil exposta a fumigação por óleo essencial de tomilho em diferentes concentrações, durante o armazenamento em condições ambiente, por 60 dias.

Concentração (mg/L)	Tempo de armazenamento (dias)				
	0	15	30	45	60
Controle	100,0±0,0Aa	100,0±0,0Aa	100,0±0,0Aa	100,0±0,0Aa	100,0±0,0Aa
500	100,0±0,0Aa	68,3±11,7Bb	71,7±13,3Bb	71,7±4,1Bb	98,3±4,1Aa
750	100,0±0,0Aa	53,3±10,3Cc	51,7±11,4Cc	45,0±9,4Cc	80,0±14,1Bb
1.000	100,0±0,0Aa	43,6±10,3Cc	23,3±7,1Dd	10,0±6,3Dd	76,0±13,4Bb

Valores médios seguidos de mesma letra maiúscula nas colunas ou minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

**Tabela 6** - Percentual de infecção por *Aspergillus flavus* em castanha-do-Brasil exposta a fumigação por solução etanólica de timol em diferentes concentrações, durante o armazenamento em condições ambiente, por 60 dias.

Concentração (mg/L)	Tempo de armazenamento (dias)				
	0	15	30	45	60
Controle	100,0±0,0Aa	100,0±0,0Aa	100,0±0,0Aa	100,0±0,0Aa	100,0±0,0Aa
188,1	100,0±0,0Aa	58,3±9,8Bb	60,0±12,5Bb	43,3±7,5Bb	98,3±4,1Aa
282,2	100,0±0,0Aa	66,7±13,6Bb	63,3±10,3Bb	18,3±9,8Cc	96,7±5,2Aa
376,2	100,0±0,0Aa	41,7±11,7Cb	21,7±9,8Cc	8,3±5,5Cc	35,0±8,8Bb

Valores médios seguidos de mesma letra maiúscula nas colunas ou minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

Com relação ao efeito do óleo essencial de tomilho no controle de *A. flavus* em castanha-do-Brasil durante o armazenamento, houve redução significativa do percentual de infecção ( $p<0,05$ ), sendo essa tendência mais acentuada à medida que se elevou a concentração do óleo essencial (Tabela 5). Salienta-se que houve redução significativa até 45 dias de armazenamento, quando se adotou a concentração de 376,2 mg/L, obtendo-se valor médio de 10,0±6,3%. Entretanto, verificou-se aumento significativo do percentual de infecção ( $p<0,05$ ), quando se compararam os valores médios obtidos aos 45 dias de armazenamento com aqueles referentes a 60 dias de armazenamento.

No que tange à solução etanólica de timol (Tabela 6), verificou-se tendência semelhante à observada quando se analisou os resultados obtidos para o óleo essencial de

tomilho (Tabela 5). À medida que se elevou a concentração da solução etanólica de tomilho, houve redução do percentual de infecção por *A. flavus* na castanha-do-Brasil. A redução mais expressiva no percentual de infecção foi verificada quando se adotou a concentração de 376,2 mg/L, com 45 dias de armazenamento, sendo igual a  $8,3 \pm 5,5\%$ . É importante mencionar que de forma semelhante que quando se utilizou óleo essencial de tomilho, houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) quando se efetuou comparação entre os valores médios obtidos aos 45 dias de armazenamento com aqueles referentes a 60 dias de armazenamento. Apesar disso, para a concentração da solução etanólica de 376,2 mg/L, obteve-se percentual de infecção por *A. flavus* na castanha-do-Brasil equivalente a  $35,0 \pm 8,8\%$ .

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização do óleo essencial de tomilho

Com relação à composição química do óleo essencial de tomilho (Tabela 1) obtida no presente estudo, verificou-se que diferiu parcialmente de alguns resultados encontrados na literatura. No presente estudo, os compostos majoritários foram p-cimeno e timol, com percentuais de 45,20 e 37,62%, respectivamente, e com o percentual de  $\gamma$ -terpineno igual a 3,68%.

Porte e Godoy (2008) analisaram óleo essencial de tomilho e obtiveram percentuais iguais a 44,7%, 18,6% e 16,5%, para timol, p-cimeno e  $\gamma$ -terpineno, respectivamente. Miladi *et al.* (2013) também avaliaram a composição de óleo essencial de tomilho e verificaram que timol, p-cimeno e  $\gamma$ -terpineno foram os compostos majoritários, percentuais iguais a 41,33%, 18,08% e 13,12%, respectivamente. Por outro lado, Borugă *et al.* (2014) também relataram os mesmos compostos majoritários, com 47,59% de timol, seguido pelo  $\gamma$ -terpineno com 30,90% e o p-cimeno com 8,41%. Kaloustian *et al.* (2005) analisaram a composição química do óleo essencial de tomilho encontrado no Sul da França, obtendo-se 11% de timol, 21% de carvacrol e 32,4% de p-cimeno. Satyal *et al.* (2016) avaliaram a composição de 85 amostras de óleo essencial de tomilho e afirmaram timol era o mais comum. No que se refere ao percentual de p-cimeno no óleo essencial de tomilho obtido no presente estudo, cabe salientar que está de acordo com Burt (2004), que afirmou que os valores podem variar entre 10 e 56%.

É importante destacar que essa variação na composição química de óleos essenciais é esperada, uma vez que existem fatores que afetam a composição química desses produtos. De acordo com Barra (2009), há fatores exógenos e endógenos que afetam diretamente a composição química dos óleos essenciais. Dentre os fatores exógenos, destacam-se precipitação, local de desenvolvimento (latitude e longitude) e características do solo (pH e constituintes). Ainda de acordo com esse autor, dentre os fatores endógenos, citam-se a idade da planta e características genéticas que regulam o metabolismo secundário.

## 5.2. Atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho e timol

Os resultados obtidos no presente estudo indicaram que tanto o óleo essencial de tomilho quando a solução etanólica de timol, aplicado por fumigação e em determinadas concentrações, são eficientes para controlar *A. flavus in vitro* e em castanha-do-Brasil durante o armazenamento.

### 5.2.1. Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

No que se refere ao óleo essencial de tomilho nos ensaios *in vitro*, destacaram-se as concentrações de 500, 750 e 1.000 mg/L. Nessas concentrações, o óleo essencial de tomilho se comportou como agente fungicida (Figura 4). Por outro lado, quando se adotou a concentração de 250 mg/L, o óleo essencial de tomilho foi classificado como agente fungistático.

Na literatura são encontrados diversos trabalhos que corroboram a ação do óleo essencial de tomilho de *A. flavus*. É importante mencionar que apesar de outros autores já terem relatado que o óleo essencial de tomilho é eficiente no controle de fungos, a maioria das pesquisas apresentaram resultados obtidos em ensaios com contato direto, o que reforça a importância do presente trabalho, no qual se testou esse óleo essencial como fumigante. No ensaio com contato direto, o óleo essencial é incorporado ao meio de cultura.

Resultados semelhantes aos do presente trabalho foram obtidas por Massoud *et al.* (2012), que avaliaram o efeito do óleo essencial de tomilho como fumigante no controle de *A. flavus* e *Fusarium moniliforme*. Kumar *et al.* (2008) avaliaram diferentes tipos de óleos essenciais e afirmaram que o óleo essencial de tomilho é um dos que apresenta maior eficácia como agente fungicida contra *A. flavus* em ensaio com contato direto. Esses autores observaram redução na biomassa micelial do fungo, o que também acarretou em redução na produção de aflatoxina B1. Omidbeygi *et al.* (2007) afirmaram que a concentração de 350 ppm do óleo essencial de tomilho incorporado em meio de cultura foi capaz de inibir completamente o crescimento do fungo por dois meses. Šegvić Klarić *et al.* (2007) analisaram o efeito do óleo essencial de tomilho sobre espécies de fungos de diversos gêneros por contato direto, dentro os quais *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Rhizopus*, e observaram amplo espectro de atividade fungicida. Gasperini (2014) analisou o efeito do óleo essencial de tomilho incorporado em meio de cultura e como fumigante. Esse autor obteve menor taxa média de crescimento do fungo quando incorporado ao meio de cultura.

A eficácia do óleo essencial de tomilho no controle de *A. flavus* pode ser explicada pela sua composição química e em especial a presença do timol, sem desconsiderar possível efeito sinérgico com os outros compostos. Em pesquisas anteriores, foi verificado que o timol é capaz de gerar espécies reativas do oxigênio e com isso induzir a produção de óxido nítrico, ocasionando a inativação de *A. flavus* (SHEN *et al.*, 2016), além de causar apoptose via o bloqueio no fluxo dos íons de potássio (HU *et al.*, 2018). O timol também é capaz de afetar a permeabilidade da membrana celular, além de interagir com proteínas da membrana celular, por interações hidrofílicas e hidrofóbicas (JAFRI *et al.*, 2019; DI PASQUA *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2008). Quanto ao p-cimeno, que foi um composto majoritário do óleo essencial utilizado no presente estudo, tem-se que é precursor do timol e carvacol (NABAVI *et al.*, 2015; STAHL-BISKUP; VENSKUTONIS, 2006). Apesar do p-cimeno ter sido composto majoritário, a eficácia do óleo essencial de tomilho não pode ser atribuída a esse composto exclusivamente. Kordali *et al.* (2008) compararam o efeito *in vitro* de timol e p-cimeno sobre espécies de vários gêneros de fungos. Os autores observaram que enquanto o timol inibiu completamente o crescimento micelial, o p-cimeno não foi eficiente no controle dos microrganismos. Por outro lado, alguns autores indicaram ação sinérgica entre o p-cimeno e o timol. A sinergia desses compostos já foi relatada para *Candida krusei* (PINA-VAZ *et al.*, 2004), *C. albicans* (PINA-VAZ *et al.*, 2004; AHMAD *et al.*, 2014), *C. tropicalis*, *Staphylococcus aureus* e *Morexella cattarhalis* (AHMAD *et al.*, 2014).

Apesar de possível sinergia entre o timol e o p-cimeno, em geral a solução etanólica de timol nos ensaios *in vitro* apresentou eficácia similar a do óleo essencial de tomilho. Ressalta-se que as concentrações da solução etanólica de timol foram definidas a partir da composição química do óleo essencial de tomilho. Outro composto que poderia ter contribuído para a diferenciação do óleo essencial de tomilho em comparação com a solução etanólica de timol é carvacol. Esse composto é efetivo no controle de fungos (KORDALI *et al.*, 2008). Entretanto, o percentual de carvacol no óleo essencial utilizado no presente estudo foi baixo, sendo equivalente a 0,53% (Tabela 1).

#### 5.2.2. Avaliação da atividade antifúngica em castanha-do-Brasil durante o armazenamento

O experimento realizado aqui mostra que a fumigação de castanha-do-Brasil com óleo essencial de tomilho e com solução etanólica de timol são eficiente no controle de *A. flavus* durante o armazenamento. Esses resultados são extremamente relevantes, tendo em vista a importância da inibição e/ou inativação de *A. flavus* em alimentos e em especial em castanha-

do-Brasil. O isolado de *A. flavus* utilizado no presente estudo é aflatoxigênica. Cabe mencionar que dentre as aflatoxinas, tem-se a aflatoxina B1 que é pertencente ao grupo I, de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa de Câncer, possuindo potencial para causar carcinoma hepatocelular primário em humanos (IARC, 2012).

Salienta-se que houve aumento da eficácia do processo de fumigação com óleo essencial de tomilho e com solução etanólica de timol no controle de *A. flavus* em castanha-do-Brasil à medida que se elevou a concentração de ambos os compostos. Deve-se destacar que houve tendência de redução do percentual de infecção por *A. flavus* na castanha-do-Brasil até 45 dias de armazenamento, com elevação depois desse período. Esse aumento no percentual de infecção depois de 45 dias de armazenamento precisa ser elucidado. Para isso, em trabalhos futuros sugere-se que sejam estudados os diferentes mecanismos que porventura podem contribuir para o aumento da resistência de *A. flavus* a fumigação com óleo essencial de tomilho e com solução etanólica de timol. É fundamental ainda a avaliação da qualidade da castanha-do-Brasil durante o armazenamento, quando expostas a fumigação por óleo essencial de tomilho e por solução etanólica de timol.

## 6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que:

- O óleo essencial de tomilho aplicado como fumigante, nas concentrações de 500, 750 e 1.000 mg/L, atua como agente fungicida sobre *A. flavus*.
- A solução etanólica de timol aplicada como fumigante, nas concentrações de 188,1, 282,2 e 376,2 mg/L, atua como agente fungicida sobre *A. flavus*.
- Nas condições adotadas no presente estudo, em geral, o óleo essencial de tomilho apresentou resultados similares a solução etanólica de timol, quando aplicados como fumigantes no controle de *A. flavus*.
- O óleo essencial de tomilho e a solução etanólica de timol são capazes de controlar *A. flavus* em castanha-do-Brasil por até 45 dias de armazenamento, sendo mais efetivos quando adotadas as concentrações de 1.000 mg/L e 376,2 mg/L, respectivamente.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-LAFI, S.; ODEH, I.; DEWIK, H.; QABAJAH, M.; HANUS, L. O.; DEMBITSKY, V. M. Thymol and carvacrol production from leaves of wild Palestinian *Majorana syriaca*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3914-3918, 2008.
- AHMAD, A.; VAN VUUREN, S.; VILJOEN, A. Unravelling the complex antimicrobial interactions of essential oils—the case of *Thymus vulgaris* (Thyme). **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2896-2910, 2014.
- BADI, H. N.; YAZDANI, D.; ALI, S. M.; NAZARI, F. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products**, v. 19, n. 3, p. 231-236, 2004.
- BAQUIÃO, A. C. **Fungos e micotoxinas em castanhas-do-Brasil, da colheita ao armazenamento**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. 2012.
- BARRA, A. Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. **Natural product communications**, v. 4, n. 8, p. 1147-1154, 2009.
- BASCH, E.; ULBRICHT, C.; HAMMERNESS, P.; BEVINS, A.; SOLLARS, D. Thyme (*Thymus vulgaris* L.), thymol. **Journal of Herbal Pharmacotherapy**, v. 4, n. 1, p. 49-67, 2004.
- BHAT, R.; RAI, R. V.; KARIM, A. A. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 9, n. 1, p. 57-81, 2010.
- BOND, E. J. **Manual of fumigation for insect control**. Rome FAO, 1984.
- BORUGĂ, O.; JIANU, C.; MIȘCĂ, C.; GOLEȚ, I.; GRUIA, A. T.; HORHAT, F. G. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. **Journal of medicine and life**, v. 7, n. Spec Iss 3, p. 56-60, 2014.
- BRASIL. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. **ANVISA**, 2011.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

- CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 319-323, 2002.
- CARDOSO, B. R.; DUARTE, G. B. S.; REIS, B. Z.; COZZOLINO, S. M. F. Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects. **Food Research International**, v. 100, p. 9-18, 2017.
- CASTRILLÓN, A. L.; PURCHIO, A. Fungos contaminantes e produtores de aflatoxinas em castanha do Pará (*Bertholletia excelsa* HUMB. & BONPL 1808). **Acta Amazonica**, v. 18, n. 3-4, p. 173-183, 1988.
- CATENACCI, F. S. **Lecythidaceae poit. na região do alto Rio Madeira, Rondônia**. 2016. 245 p. Tese (Mestrado em Botânica) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2016.
- CHEE, H. Y.; MM, H.; LEE, M. H. *In vitro* antifungal activity of limonene against *Trichophyton rubrum*. **Mycobiology**, v. 37, n. 3, p. 243-246, 2009.
- CORRÊA, R. M.; PINTO, J. E. B. P.; REIS, E. S.; COSTA, L. C. B.; ALVES, P. B.; NICULAN, E. S.; BRANT, R. S. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 80-89, 2010.
- DA ROCHA, R. P.; CASTRO MELO, E.; CORBIN, J. B.; BARBOSA, L. C. A.; BERBET, P. A. Influência do processo de secagem sobre a qualidade do óleo essencial de tomilho. **VI Simpósio Iberoamericano de Plantas Mediciniais**, 2012.
- DA SILVA, R. F.; ASCHERI, J. L. R.; DE SOUZA, J. M. L. Influência do processo de beneficiamento na qualidade de amêndoas de castanha-do-brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 445-450, 2010.
- DE SOUZA, J. M. L.; CARTAXO, C. B. C.; LEITE, F. M. N.; SOUZA, L. M. **Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da Castanha do Brasil**. 2004.
- DI PASQUA, R.; MAMONE, G.; FERRANTI, P.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, v. 10, n. 5, p. 1040-1049, 2010.

DONEGA, M. A.; FERREZINI, G.; MELLO, S. C.; MINAMI, K.; SILVA, S. R. Recipientes e substratos na produção de mudas e no cultivo hidropônico de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 271-274, 2014.

EUROPEAN COMMISSION - EC. Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. **Off. J. Eur. Union**, v. 50, p. 8-12, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO, **Food and Agricultural commodities**. 2020. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 10 fevereiro 2020.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, U. S. Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed. US Department of Health and Human Services. **Food and Drug Administration**, 2018. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ChemicalContaminantsMetalsNaturalToxinsPesticides/ucm077969.htm>>. Acesso em: 6 abril 2019.

GASPERINI, A. M. **Efeito de óleos essenciais sobre o crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus***. 2014. 111 p. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 2014.

GHANNADI, A.; SAJJADI, S. E.; KABOUCHE, A.; KABOUCHE, Z. *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut.-A potential source of thymol-rich essential oil in North Africa. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 59, n. 3-4, p. 187-189, 2004.

GUEVARA, P.; REYNA-SEGURA, J.; ZUÑIGA-RUIZ, B.; LLANOS-ROMERO, R. E.; ANDRÉS-YEVES, M. F.; BARAJAS-GUZMÁN, M. G.; ECHEVERRI, F.; LEÓN-RIVERA, I. Biocidal effect of a hexane-soluble extract of *Lippia graveolens* Kunth (Verbenaceae). **Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat**, v. 17, n. 4, p. 342-349, 2018.

HANS, J. **Method of producing thymol**. U.S. Patent n. 1 768 257, 1930.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H.-L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.

- HU, L-B.; BAN, F-F.; LI, H-B.; QING, P-P.; SHEN, Q-S.; ZHAO, Y-Y.; MO, H-Z.; ZHOU, X. Thymol induces conidial apoptosis in *Aspergillus flavus* via stimulating K+ eruption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 32, p. 8530-8536, 2018.
- HUA, H., XING, F., SELVARAJ, J. N., WANG, Y., ZHAO, Y., ZHOU, L., LIU, X., LIU, Y. Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. 1-10, 2014.
- HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-24, 2012.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção da extração vegetal e da silvicultura 2016. **Rio de Janeiro: IBGE**, v. 31, 2017.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção da extração vegetal e da silvicultura 2018. **Rio de Janeiro: IBGE**, v.33 – Informativo, 2019.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. Aflatoxins. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**, v.100 - F, p. 225-248, 2012.
- JAFRI, H.; ANSARI, F. A.; AHMAD, I. Prospects of essential oils in controlling pathogenic biofilm. In: KHAN, M. S. A.; AHMAD, I.; CHATTOPADHYAY, D. (Eds.), **New look to phytomedicine - Advancements in Herbal Products as Novel Drug Leads**. Academic Press, Cambridge, 2019. p. 203-236.
- KABOUCHE, A.; GHANNADI, A.; KABOUCHE, Z. *Thymus ciliatus*—The highest thymol containing essential oil of the genus. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 9, 2009.
- KALOUSTIAN, J.; ABOU, L.; MIKAIL, C.; AMIOT, M. J.; PORTUGAL, H. Southern French thyme oils: chromatographic study of chemotypes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 14, p. 2437-2444, 2005.
- KEDIA, A., DWIVEDY, A. K., JHA, D. K., DUBEY, N. K. Efficacy of *Mentha spicata* essential oil in suppression of *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in chickpea with particular emphasis to mode of antifungal action. **Protoplasma**, v. 253, n. 3, p. 647-653, 2016.
- KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish

*Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8788-8795, 2008.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRASAD, C. S.; DUBEY, N. K. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 4, p. 575-580, 2008.

KWON-CHUNG, K. J. *Aspergillus*: Diagnosis and Description of the Genus. In: BOSSCHE, H. V. D.; MACKENZIE, D. W. R.; CAUWENBERGH, G. (Ed.). ***Aspergillus and aspergillosis***. Plenum Press, p. 11-23, 1988.

LEAL, L. K. A. M.; OLIVEIRA, V. M.; ARARUNA, S. M.; MIRANDA, M. C. C.; OLIVEIRA, F. M. A. Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham.(alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 9-11, 2003.

LEE, S.-J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K.-G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

LÓPEZ-MENESES, A. K., PLASCENCIA-JATOMEA, M., LIZARDI-MENDOZA, J., ROSAS-BURGOS, E. C., LUQUE-ALCARAZ, A. G., CORTEZ-ROCHA, M. O. 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.

MASSOUD, M. A.; SAAD, A. S. A.; SOLIMAN, E. A.; EL-MOGHAZY, A. Y. Antifungal activity of some essential oils applied as fumigants against two stored grains fungi. **J Adv Agric Res (Fac Agric Saba Basha)**, v. 17, n. 2, p. 296-306, 2012.

MAUÉS, M. M.; KRUG, C.; WADT, L. H. O.; DRUMOND, P. M.; CAVALCANTE, M. C.; DOS SANTOS, A. C. S. A castanheira-do-brasil: avanços no conhecimento das práticas amigáveis à polinização. **Embrapa Amazônia Oriental-Livro científico (ALICE)**, 2015.

MICHEL, B. E., RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, v. 87, n.1, p. 126-130, 1995.

- MILADI, H.; SLAMA, R. B.; MILI, D.; ZOUARI, S.; BAKHROUF, A.; AMMAR, E. Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Natural Science**, v. 5, n. 6, p. 729-739, 2013.
- MISHRA, P. K.; SINGH, P.; PRAKASH, B.; KEDIA, A.; DUBEY, N. K.; CHANOTIYA, C. S. Assessing essential oil components as plant-based preservatives against fungi that deteriorate herbal raw materials. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 80, p. 16-21, 2013.
- MORALES, R. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: STAHL-BISKUP, E.; SÁEZ, F. (Ed.). **Thyme: the genus *Thymus***. CRC Press, 2003.
- MORI, S. A. The Brazil nut industry-past, present and future. In: PLOTKIN, M. J.; FAMOLARE, L. M. (Ed.). **Sustainable harvest and marketing of rain forest products**, 1992, p. 241-251.
- MORI, S. A.; PRANCE, G. T. Taxonomy, ecology, and economic botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). **Advances in Economic Botany**, v. 8, p. 130-150, 1990.
- MOTA, K. S. DE L., PEREIRA, F. DE O., DE OLIVEIRA, W. A., LIMA, I. O., LIMA, E. DE O. Antifungal Activity of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil and Its Constituent Phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with Ergosterol. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14418-14433, 2012.
- MOURA, E. S.; FARONI, L R D'A.; HELENO, F. F.; RODRIGUES, A. A. Z. ; PRATES, L. H. F.; DE QUEIROZ, M. E. L. R. Optimal Extraction of *Ocimum basilicum* Essential Oil by Association of Ultrasound and Hydrodistillation and Its Potential as a Biopesticide against a Major Stored Grains Pest. **Molecules**, v. 25, p. 2-17, 2020.
- MÜLLER, C. H.; CALZAVARA, B. B. G. Castanha-do-Brasil: recomendações básicas. **EMBRAPA-CPATU**, Belém, Brasil, 1989.
- NABAVI, S. M.; MARCHESE, A.; IZADI, M.; CURTI, V.; DAGLIA, M.; NABAVI, S. F. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. **Food chemistry**, v. 173, p. 339-347, 2015.

OMIDBEYGI, M.; BARZEGAR, M.; HAMIDI, Z.; NAGHDIBADI, H. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. **Food control**, v. 18, n. 12, p. 1518-1523, 2007.

PANDEY, D. K., TRIPATHI, N. N., TRIPATHI, R. D., DIXIT, S. N. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. **J. Plant Dis. Prot.**, v. 89, n. 6, p. 344-349, 1982.

PINA-VAZ, C.; GONÇALVES RODRIGUES, A.; PINTO, E.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; TAVARES, C.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C.; GONÇALVES, M. J.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 18, n. 1, p. 73-78, 2004.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Aspergillus* and Related Teleomorphs. In: PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. New York: Springer, 2009a. p. 275-338.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Methods for Isolation, Enumeration and Identification. In: PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. New York: Springer, 2009b. p. 19-52.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Chemical composition of *Thymus vulgaris* L.(Thyme) essential oil from the Rio de Janeiro state, Brazil. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 73, n. 3, p. 307-310, 2008.

RAJKOVIC, K.; PEKMEZOVIC, M.; BARAC, A.; NIKODINOVIC-RUNIC, J.; ARSENIJEVIĆ, V. A. Inhibitory effect of thyme and cinnamon essential oils on *Aspergillus flavus*: Optimization and activity prediction model development. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 7-13, 2015.

REIS, G. M. **Variabilidade genética de cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim**. 2009. Tese (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. 2009.

RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.

SALEHI, B.; MISHRA, A. P.; SHUKLA, I.; SHARIFI-RAD, M.; CONTRERAS, M. del M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FATHI, H.; NASRABADI, N. N.; KOBARFARD, F.;

- SHARIFI-RAD, J. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p. 1688-1706, 2018.
- SANTANA, E. S.; OLIVEIRA, F. H.; BARNABÉ, A. C. S.; MENDES, F. R.; ANDRADE, M. A. Uso de antibióticos e quimioterápicos na avicultura. **Enciclopédia Biosfera**, 2011.
- SATYAL, P.; MURRAY, B. L.; MCFEETERS, R. L.; SETZER, W. N. Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. **Foods**, v. 5, n. 4, p. 70-81, 2016.
- ŠEGVIĆ KLARIĆ, M.; KOSALEC, I.; MASTELIĆ, J.; PIECKOVÁ, E.; PEPELJNAK, S. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 36-42, 2007.
- SHAHIDI, F.; TAN, Z. Bioactives and Health Benefits of Brazil Nut. In: ALASALVAR, C.; SHAHIDI, F. (Ed.). **Tree nuts: composition, phytochemicals, and health effects**. CRC Press, 2008. p. 143-157.
- SHEN, Q.; ZHOU, W.; LI, H.; HU, L.; MO, H. ROS involves the fungicidal actions of thymol against spores of *Aspergillus flavus* via the induction of nitric oxide. **Plos One**, v. 11, n. 5, 2016.
- SMID, E. J., WITTE, Y. DE, GORRIS, L. G. M. Secondary plant metabolites as control agents of postharvest *Penicillium* rot on tulip bulbs. **Postharvest Biol. Technol.**, v. 6, n. 3-4, p. 303-312, 1995.
- SOUZA, M. F. de; GOMES, P. A.; SOUZA JÚNIOR, I. T. de; FONSECA, M. M.; SIQUEIRA, C. S.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R. Influência do sombreamento na produção de fitomassa e óleo essencial em alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 108-110, 2007.
- STAHL-BISKUP, E.; VENSKUTONIS, R. P. Thyme. In: PETER, K. V. (Ed.). **Handbook of Herbs and Spices**. Woodhead publishing, v. 2, 2006.
- SUZUKI, O. H.; FLEMMING, J. S.; SILVA, M. E. T. Uso de óleos essenciais® na alimentação de leitões. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 6, n. 4, p. 519-526, 2008.

TANIWAKI, M. H., PITT, J. I., IAMANAKA, B. T., SARTORI, D., COPETTI, M. V., BALAJEE, A., FUNGARO, M. H. P., FRISVAD, J. C. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil Nuts. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. 6-12, 2012.

THOZET, A.; PERRIN, M. Structure of 2-isopropyl-5-methylphenol (thymol). **Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 1444-1447, 1980.

XU, J.; ZHOU, F.; JI, B.-P.; PEI, R.-S.; XU, N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in applied microbiology**, v. 47, n. 3, p. 174-179, 2008.

WILLIAMS, J. H.; PHILLIPS, T. D.; JOLLY, P. E.; STILES, J. K.; JOLLY, C. M.; AGGARWAL, D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **The American journal of clinical nutrition**, v. 80, n. 5, p. 1106-1122, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Aflatoxins. **WHO**, 2018.