

Avaliação da atividade fungicida de óleos essenciais e suas substâncias ativas no controlo de fungos de armazenamento

Miguel Galvão Rodrigues Bento

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica, especialização em Proteção de Plantas

Orientadores: Professor Doutor António Maria Marques Mexia

Doutora Ana Maria da Costa Aldir Magro

Juri:

Presidente: Doutora Maria José Antão Pais de Almeida Cerejeira, Professora Associada com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutor Arlindo Lima, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Ana Maria da Costa Aldir Magro, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, orientadora.

AGRADECIMENTOS

À presidência do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia do Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior pelo financiamento do projeto MICROPROTECT - Uso de óleos essenciais encapsulados para proteção de cereais e leguminosas armazenados (PTDC/AGR-ALI/119270/2010).

Ao Professor Doutor António Marques Mexia, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, por ser meu orientador e ter contribuído com o seu valioso conhecimento para a minha aprendizagem.

À Doutora Ana Magro, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, por ser minha co-orientadora e ter-me ensinado muito do que usei para o desenvolvimento da investigação que conduziu a este trabalho.

À Professora Doutora Margarida Monteiro Bastos, Professora Auxiliar da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (LEBAPE), coordenadora do projeto MICROPROTECT - Uso de óleos essenciais encapsulados para proteção de cereais e leguminosas armazenados (PTDC/AGR-ALI/119270/2010).

Ao Professor Doutor Arlindo Lima, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa pela disponibilidade e pela forma cordial com que sempre me recebeu nos pedidos de esclarecimento para identificação de fungos.

Às Doutoradas Maria da Graça Barros e Maria José Silva, Investigadoras Auxiliares do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, pela simpatia, bom ambiente e incentivo.

Aos amigos e à minha família por todo o apoio, boa disposição e pelo estímulo constante.

RESUMO

Face à legislação cada vez mais restritiva do número de moléculas de pesticidas sintéticos autorizados, da limitação total na aplicação de fungicidas em produtos agrícolas secos armazenados, do aumento populacional e da consciência ecológica crescente, tornou-se necessário a utilização de alternativas para proteção destes produtos no armazenamento, de modo a diminuir os prejuízos devido a fatores bióticos e abióticos. Deste modo, este trabalho teve como objetivo a avaliação da eficácia dos óleos essenciais de cravinho e poejo e dos seus compostos ativos principais eugenol e pulegona e do composto ativo limoneno, para poder utilizá-los como fungicidas em proteção integrada de produtos agrícolas secos armazenados em atmosfera saturada.

Para isso, utilizaram-se 100 amostras de grãos de milho e de feijão para cada ensaio. Dos resultados obtidos verificou-se que o óleo de cravinho teve uma ação antifúngica mais eficaz, seguido do eugenol, da pulegona, do óleo de poejo e, por fim, sem qualquer ação fungistática, o limoneno.

Foram identificados 9 taxa de fungos nos grãos de milho, em que *Aspergillus niger* foi o mais frequente nos ensaios em branco e *A. flavus* e *A. terreus* como os mais frequentes nos das misturas de eugenol e pulegona. Nos ensaios do feijão foram identificados 25 taxa de fungos com *Penicillium corylophilum* como o mais frequente nos ensaios em branco e na concentração 1,0 µL/mL e o género *Monilia* sp. como o mais frequente na concentração 2,5 µL/mL.

Adicionalmente, as concentrações 2,5 µL/mL de eugenol e cravinho e a mistura de eugenol e pulegona (2,5 µL/mL:2,5µL/mL) tiveram uma atividade fungicida nos contaminantes do feijão.

Palavras-chave: *Syzygium aromaticum*, *Mentha pulegium*, óleos essenciais, armazenamento, atividade fungicida.

ABSTRACT

Due to the increasingly restrictive number of authorized synthetic pesticides molecules in legislation, the total limitation in the application of fungicides in stored grains, population growth and the growing environmental awareness; it has become necessary to use alternatives for protection of these grains in storage in order to reduce losses from biotic and abiotic factors. Thus, this study aimed to evaluate the effectiveness of essential oils of clove and pennyroyal and their main active compounds eugenol and pulegone, and still the active compound limonene to be able to use them in the future as fungicides in integrated protection of stored grain in an saturated atmosphere.

For this, were used 100 samples of maize grains and beans for each trial. From the results obtained it was found that clove oil had a more effective antifungal action, followed by eugenol, pulegone, pennyroyal oil, and finally, limonene without any fungistatic action.

Nine fungal *taxa* were identified in maize, in which *Aspergillus niger* was the most frequent in the control trials and *A. flavus* and *A. terreus* as the most frequent in the mixtures of eugenol and pulegone. In the trials related to beans were identified 25 *taxa* of fungi with *Penicillium corylophilum* as the most frequent in the control trials and in the concentration of 1,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and *Monilia* sp. as the most frequent in the concentration of 2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Additionally, concentrations of 2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of eugenol and clove oil and the mixture of eugenol and pulegone (2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$:2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) had a fungicidal activity on contaminants of common beans.

Keywords: *Syzygium aromaticum*, *Mentha pulegium*, essential oils, storage, fungicide activity.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. MILHO	4
2.2. FEIJÃO	7
2.3. ARMAZENAMENTO	9
2.3.1. OS FUNGOS EM PRODUTOS ARMAZENADOS	9
2.3.2. FATORES QUE INFLUENCIAM O ARMAZENAMENTO	10
2.3.2.1. Teor de água do produto	11
2.3.2.2. Atividade da água (a_w)	12
2.3.2.3. Temperatura	13
2.3.2.4. Agentes biológicos	13
2.3.2.5. Interação entre fatores	14
2.3.3. ESTRAGOS E PREJUÍZOS NO ARMAZENAMENTO	14
2.3.3.1. Micotoxinas	15
2.3.3.2. Controlo das micotoxinas	17
2.3.4. MEDIDAS PREVENTIVAS E MEIOS DE PROTEÇÃO	18
2.3.4.1. Extratos de plantas, óleos essenciais e compostos ativos principais	20
2.3.4.1.1. Cravinho e eugenol	28
2.3.4.1.2. Poejo e pulegona	30
2.3.4.1.3. Limoneno	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	34
3.2. ÓLEOS ESSENCIAIS E COMPOSTOS ATIVOS PRINCIPAIS	34
3.3. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DOS COMPOSTOS ATIVOS PRINCIPAIS EM ATMOSFERA SATURADA	34
3.4. IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ASSOCIADOS À AMOSTRAS DE GRÃOS DE MILHO E FEIJÃO	36
3.5. ANÁLISE DE RESULTADOS	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5. CONCLUSÕES	55

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	78
Anexo I. Classificadores dos géneros e espécies de fungos	78
Anexo II. Registo fotográfico de alguns isolados	81
Anexo III. Características biométricas dos isolados	87
Anexo IV. Meios de cultura	92
Anexo V. Composição química dos óleos essenciais de cravinho e de poejo	93
Anexo VI. Registo das observações do número de grãos de milho e feijões contaminados por semana	95

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Métodos de extração de óleos essenciais	22
Quadro 2. Consumo mundial de cada óleo essencial e suas aplicações industriais	25
Quadro 3. Óleos essenciais e compostos ativos principais e suas concentrações utilizados nos ensaios em grãos de milho e em feijão	35
Quadro 4. Misturas de compostos ativos principais e concentrações utilizadas nos ensaios em grãos de milho e em feijão	35
Quadro 5. Número de observações para os ensaios do milho	38
Quadro 6. Número de observações para os ensaios do feijão	38
Quadro 7. Lista de fungos identificados nas diversas amostras de milho e de feijão	47
Quadro 8. Frequências absolutas e relativas dos fungos isolados a partir das amostras de milho	48
Quadro 9. Frequências absolutas e relativas dos fungos isolados a partir das amostras de feijão	52
Quadro I1. Classificadores das espécies de plantas	78
Quadro I2. Classificadores das espécies de insetos	79
Quadro I3. Classificadores dos géneros de fungos	79
Quadro I4. Classificadores das espécies de fungos	80
Quadro V1. Composição em percentagem do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	93
Quadro V2. Composição em percentagem do óleo essencial de <i>Mentha pulegium</i>	94
Quadro VI1. Registo do número de grãos de milho contaminados nos ensaios das misturas de eugenol e pulegona	95
Quadro VI2. Registo do número de feijões contaminados nos ensaios com a concentração de 0,5µL/mL de poejo, pulegona, cravinho e eugenol	101
Quadro VI3. Registo do número de feijões contaminados nos ensaios com a concentração de 1,0µL/mL de poejo, pulegona, cravinho e eugenol.....	102
Quadro VI4. Registo do número de feijões contaminados nos ensaios com a concentração de 2,5µL/mL de poejo, pulegona, cravinho e eugenol.....	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Produção mundial de milho em milhões de toneladas	5
Figura 2. Maiores produtores mundiais de milho em milhões de toneladas	5
Figura 3. Proporção da produção de milho por continente	5
Figura 4. Tipos de milho e proporções relativas do endosperma farináceo e vítrio	6
Figura 5. Produção mundial de feijão seco em milhões de toneladas	8
Figura 6. Maiores produtores mundiais de feijão seco em milhões de toneladas	8
Figura 7. Proporção da produção de feijão seco por continente	8
Figura 8. Estrutura química do eugenol	30
Figura 9. Estrutura química da pulegona	31
Figura 10. Estrutura química do limoneno	32
Figura 11. Evolução da percentagem de grãos de milho contaminados nos ensaios com misturas de 0,75µL/mL:0,75µL/mL, 1,0µL/mL:0,5µL/mL e 2,5µL/mL:2,5µL/mL de eugenol e pulegona, ao longo de 23 semanas	39
Figura 12. Evolução da percentagem de feijão contaminado no ensaio com 0,5µL/mL de pulegona, poejo, eugenol e cravinho ao longo de 6 semanas de observação	40
Figura 13. Evolução da percentagem de feijão contaminado no ensaio com 1,0µL/mL de pulegona, poejo, eugenol e cravinho ao longo de 24 semanas de observação	41
Figura 14. Evolução da percentagem de feijão contaminado no ensaio com 2,5µL/mL de pulegona, poejo, eugenol e cravinho ao longo de 24 semanas de observação	42
Figura II1. A1 e A2- <i>Acremonium</i> sp.; B1 e B2- <i>Alternaria alternata</i> ; C1 e C2- <i>Alternaria infectoria</i> ; D1 e D2- <i>Aspergillus</i> spp.	81
Figura II2. E1 e E2- <i>A. flavus</i> ; F1 e F2- <i>A. melleus</i> ; G1 e G2- <i>A. niger</i> ; H1 e H2- <i>A. niveus</i> ; I1 e I2- <i>A. parvulus</i>	82
Figura II3. J1 e J2- <i>A. sydowii</i> ; K1 e K2- <i>A. terreus</i> ; L1 e L2- <i>A. ustus</i> ; M1 e M2- <i>Cladosporium</i> sp.; N1 e N2- <i>E. chevalieri</i>	83
Figura II4. O1 e O2- <i>F. culmorum</i> ; P1 e P2- <i>F. oxysporum</i> ; Q1 e Q2- <i>P. auranteogriseum</i> ; R1 e R2- <i>P. chrysogenum</i> ; S1 e S2- <i>P. citrinum</i>	84
Figura II5. T1 e T2- <i>P. corylophilum</i> ; U1 e U2- <i>P. glabrum</i> ; V1 e V2- <i>P. purpurogenum</i> ; W1 e W2- <i>P. verrucosum</i> .; X1 e X2- <i>Stemphylium</i> sp.	85
Figura II6. Y1 e Y2- <i>Ulocladium</i> sp.	86

LISTA DE ABREVIATURAS

aC- antes de Cristo

AO- Ocratoxina A

a_w - Atividade da água

CAP- Composto ativo principal

CE- Conselho Europeu

CEFS- Committee of Experts on Flavoring Substances

CO₂- Dióxido de carbono

DHHS- Department of Health and Human Services

EUA- Estados Unidos da América

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations

FAOSTAT- The Statistics Division of FAO

FDA- Food and Drug Administration

GC- Cromatografia gasosa

GC-MS- Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

GRAS- Generally recognized as safe

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência

HRE- Humidade relativa de equilíbrio

IARC- International Agency for Research on Cancer

LC₅₀- Concentração letal para 50% da população.

MEA- Meio de Malte Agar

NICNAS- National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme

OE- óleo essencial

PDA- Meio de Agar de Batata Dextrosada

pH- Potencial de hidrogénio

PICS - Purdue Improved Crop Storage

TLC- Cromatografia de camada fina

WHO- World Health Organization

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*¹) é um dos cereais produzidos mundialmente com maior importância económica. Em 2013, com uma produção de 1018 milhões de toneladas, foi o cereal mais produzido no mundo, seguido do arroz com 741 milhões de toneladas e o trigo com 716 milhões de toneladas, sendo o continente americano responsável por 53% da produção mundial (FAOSTAT, s.d.). Caracteriza-se por ser um produto com diversas utilizações desde a alimentação humana e animal até à indústria química, farmacêutica, têxtil e do papel. Cerca de 70% da produção mundial de milho destina-se à alimentação animal e apenas 15% destina-se ao consumo humano, de forma direta ou indireta. A sua utilização depende das propriedades físicas e químicas do grão. Na alimentação animal são utilizados grãos com alto teor de óleo (6 a 7,5%) e de proteína (>12%), na indústria alimentar e na indústria do papel utilizam-se grãos com alto teor de amilose. O milho com alto teor de amilopectina é utilizado na indústria alimentar e na indústria química na produção de adesivos, com alto teor de ácido oleico é utilizado na produção de óleos e com amido de fácil extração é destinado à produção de etanol (Paes, 2006).

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) é a espécie mais cultivada dentro do seu género e a leguminosa mais importante para a alimentação mundial. Caracteriza-se por ser uma cultura com um grande número de variedades (mais de 40000), o que se traduz nos vários tipos de crescimento, nas características das sementes em termos de tamanho, forma e cor, no tempo de maturação e adaptação a vários climas e solos (Jones, 1999). Os feijões secos representam uma importante fonte proteica na dieta humana, principalmente nos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais (Yokoyama, 2003). O continente asiático com 45% da produção mundial de feijão seco (incluindo o feijão frade (*Vigna unguiculata*) e o continente americano com 35% da produção mundial de 22,5 milhões de toneladas em 2013 foram os maiores contribuidores para a produção mundial desta leguminosa. Dentro destes, a Índia e o Brasil foram os maiores produtores com mais de três milhões de toneladas (FAOSTAT, s.d.).

Os grãos de milho e os feijões são frequentemente contaminados por fungos e pelas toxinas produzidas, associadas a alguns deles durante o armazenamento, o que resulta em reduções de qualidade, quantidade, composição nutricional e, por consequência, redução de valor de mercado. O armazenamento de cereais e leguminosas cria um ecossistema dependente de vários factores e das suas interações como por exemplo o teor de água do produto, a atividade da água, a temperatura e a presença de agentes biológicos. Nos grandes produtores é mais fácil criar ambientes propícios à boa

¹ Classificadores de todas as plantas presentes no texto estão descritos no Anexo I.

conservação dos grãos, mas sabemos que estas condições não existem em países tecnologicamente menos evoluídos nem em produtores com menores recursos financeiros. Prevê-se que o consumo de cereais aumente nas próximas décadas atingindo-se em 2050 um consumo de 3,3 mil milhões de toneladas, 800 milhões de toneladas a mais do que em 2014 (FAO, 2016). Assim, é cada vez mais fundamental investigar quais as melhores condições de criar um bom armazenamento de produtos agrícolas secos duráveis.

Várias substâncias químicas sintéticas contribuíram e contribuem para a preservação de alimentos durante o armazenamento, no entanto, a maioria manifesta efeitos secundários em humanos e no ambiente, e também, a ressurgência de inimigos potenciais e ocasionais devido à não biodegradabilidade destas substâncias e do seu uso excessivo (Brul & Coote, 1999). No caso dos fungicidas, a sua proibição é total no armazenamento de grãos (Semple et al., s.d.).

O aumento populacional, com as pressões negativas provenientes do uso de pesticidas sintéticos, aliados à cada vez maior consciência dos cidadãos para as questões ecológicas fazem com que haja maior interesse na proteção integrada e na utilização de alternativas a esse tipo de pesticidas. De entre as várias possibilidades para novos fungicidas, as substâncias naturais possuem um grande interesse ao fornecerem inúmeras opções de isolamento de compostos ativos devido à diversidade das moléculas existentes (Odds, 2005; Cos et al, 2006). Particularmente, dado que os óleos essenciais e seus compostos ativos principais produzidos pelas plantas são menos poluentes que os pesticidas sintéticos e considerados seguros para o ambiente e para a saúde humana (produtos GRAS – “generally recognised as safe”) são uma alternativa para a proteção de culturas e conservação de produtos armazenados (Matos et al., 2013).

Este trabalho tem o intuito de contribuir para que a utilização dessas alternativas nos meios de proteção integrada de grãos armazenados contra o crescimento de fungos de armazenamento seja uma realidade. Para isso, utilizaram-se os óleos essenciais de cravinho e poejo e os seus compostos ativos principais eugenol e pulegona e, ainda, o limoneno verificando-se a sua eficácia em atmosfera saturada em grãos de milho e em feijão manteiga. Assim, de acordo com a eficácia, avaliar-se-á se estas substâncias poderão ser usadas como produtos de proteção biológica alternativos aos pesticidas convencionais na proteção integrada de produtos agrícolas secos armazenados. Pretende-se também, como integrante do objetivo principal, a identificação ao nível do género e da espécie dos fungos isolados associados aos grãos estudados.

O estudo foi desenvolvido no âmbito do projeto “MICROPROTECT - Uso de óleos essenciais encapsulados para proteção de cereais e leguminosas armazenados (PTDC/AGR-ALI/119270/2010)”. A dissertação está dividida em cinco capítulos. Na Introdução é feita uma abordagem superficial ao tema e aos objetivos propostos. No segundo é feita uma revisão bibliográfica em que se realça a importância do milho e do feijão na alimentação, se definem os fatores que influenciam o armazenamento, os estragos e prejuízos dos fungos e de outros agentes biológicos nos produtos agrícolas secos armazenados e medidas de meios de proteção. A uma destas medidas, utilização de óleos essenciais de plantas e compostos ativos principais, é dada a devida relevância. Em Material e Métodos, terceiro capítulo, apresenta-se a metodologia utilizada para os objetivos do trabalho. No quarto capítulo apresentam-se e discutem-se os resultados, confrontando-os com estudos de outros autores. No quinto, as principais conclusões são evidenciadas. Seguem as Referências bibliográficas e os Anexos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MILHO

O cultivo do milho é originário da América central, a partir do qual se espalhou a norte para o Canadá e a sul para a Argentina. A planta mais antiga, com cerca de 7000 anos foi encontrada por arqueologistas em Teotihuacan, um vale perto de Puebla, no México; no entanto, é possível que haja outras origens no continente americano. Este cereal foi preponderante nas civilizações Maias e Aztecas, com um papel nas suas crenças religiosas, festividades e nutrição. No final do século XV, depois da descoberta do continente americano por Cristovão Colombo, o milho foi introduzido na Europa através da Espanha (FAO, 1992).

O milho (*Zea mays*) pertence à família Poaceae, sendo anual monoica de polinização cruzada. A semente desenvolve-se na espiga, na maioria, uma por caule e pode, teoricamente e aproximadamente, ter 700 grãos. A produtividade pode ser expressa pelo peso da espiga por mil grão e no milho varia entre 190g e 300g, dependendo do genótipo, condições ambientais e práticas culturais (FAO, 1992).

A cultura cresce desde climas temperados a tropicais no período em que as temperaturas médias diárias superam os 15°C e sem geadas. A adaptabilidade das variedades varia bastante em diferentes climas, e, deste modo, a escolha correcta da variedade coincidirá o período de crescimento da cultura com o comprimento da época de crescimento. Quando as temperaturas médias diárias durante a época de crescimento superam os 20°C, as variedades temporãs demoram 80 a 110 dias enquanto que as médias demoram 110 a 140 dias a atingir a maturação. Quando as temperaturas médias diárias ficam abaixo de 20°C, existe um prolongamento de 10 a 20 dias, na maturação, por cada decréscimo de meio grau Celsius, dependendo da variedade. Com uma temperatura média diária de 10°C a 15°C o milho é cultivado como cultura forrageira devido aos problemas de vingamento e maturação. É uma cultura moderadamente sensível à salinidade e muito sensível à geada mas tolera dias quentes e secos se tiver água disponível suficiente e as temperaturas não ultrapassem os 45°C. Relativamente à duração dos dias, a planta do milho é considerada neutra ou de dias curtos (FAO Water Development and Management Unit, s.d.).

Esta cultura, com uma produção em 2013 de 1018 milhões de toneladas (Figura 1), foi o cereal mais produzido no mundo, seguido do arroz com 741 milhões de toneladas e o trigo com 716 milhões de

toneladas (FAOSTAT, s.d.), fornecendo nutrientes para humanos e animais e tendo sido também utilizado como matéria prima para a produção de amido, proteína, óleo, bebidas alcoólicas, adoçantes, combustível e silagem. O maior produtor mundial é os Estados Unidos da América (EUA) seguido da China, Brasil, México e Argentina (Figura 2), sendo por isso o continente americano responsável por metade da produção mundial em 2013 (Figura 3). De modo a satisfazer a procura das inúmeras indústrias de processamento de milho ao longo do ano, este cereal de Verão, tem de ser armazenado em condições favoráveis à sua preservação (Paraginski et al., 2014).

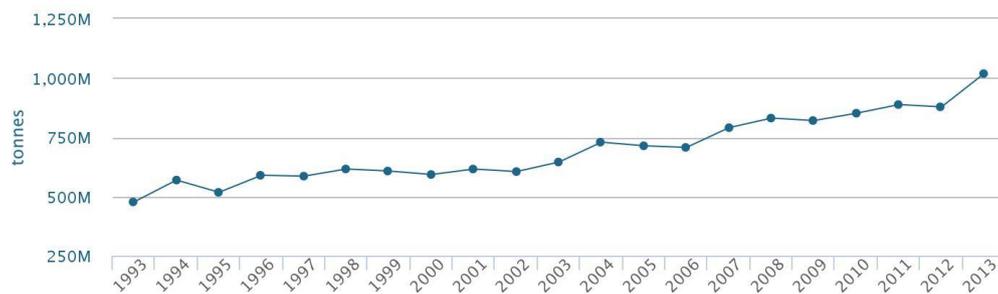


Figura 1. Produção mundial de milho em milhões de toneladas (FAOSTAT, s.d.).

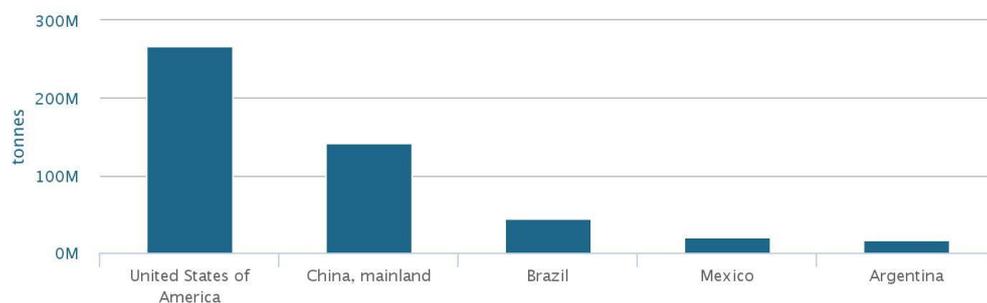


Figura 2. Maiores produtores mundiais de milho em milhões de toneladas (FAOSTAT, s.d.).

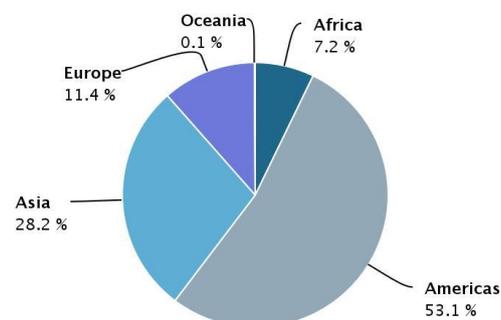


Figura 3. Proporção da produção de milho por continente (FAOSTAT, s.d.).

Diferentes tipos de milho são cultivados por todo o mundo, em que, uma das diferenças é a cor, que pode ser desde branca a amarela até vermelha a preta. A maioria do milho cultivado nos EUA é amarelo, enquanto que a população africana e sul americana prefere milho branco. As razões associadas à preferência da população africana ao milho branco são relativas à condição social, associando o milho amarelo às ajudas humanitárias e a populações pobres. Adicionalmente a alimentação animal é feita com a folhagem do milho amarelo (National Chamber of Milling, 2008). Contudo, a principal razão é a tradição, este hábito leva a que as populações consumam menos carotenoides e criptoxantina, precursores da vitamina A. Também nas farinhas é dada preferência às refinadas, mais claras, com menos fibras, vitaminas e minerais (Doebley, 2004).

Existe uma classificação do milho com base no tamanho e composição nutricional do endosperma, resultando numa classificação por tipo de grão: dentado, duro, farináceo e pipoca (Figura 4) (Paes, 2006). Outro critério de classificação é pela quantidade de açúcar, sendo que esta quantidade depende da variedade e da maturação. O milho doce tem um menor poder de conservação e deve ser consumido fresco, embalado ou congelado. As variedades doces não podem ser suplementadas nutricionalmente (Brown & Darrah. 1985; Gibson & Benson, 2002).

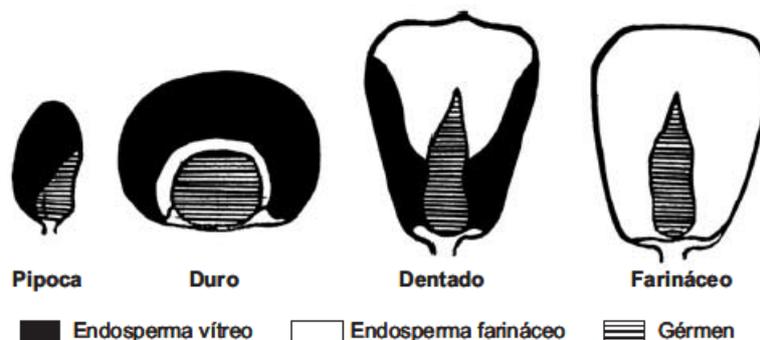


Figura 4. Tipos de milho e proporções relativas do endosperma farináceo e vítreo (Paes, 2006).

As maiores pragas de armazenamento do milho são *Sitophilus zeamais*², *Sitophilus oryzae*, *Prostephanus truncatus* pertencentes à ordem Coleoptera e *Sitotroga cerealella* da ordem Lepidoptera (Taruvunga et al., 2014).

² Classificadores de todos os insetos presentes no texto estão descritos no Anexo I.

2.2. FEIJÃO

Feijão é a denominação comum dada à leguminosa com grande número de variedades, cujo nome científico é *Phaseolus vulgaris*. Podem ser cultivadas variedades para consumo em fresco ou em seco, sendo estas últimas as interessantes sob o ponto de vista do armazenamento. O processo de domesticação desta planta ocorreu a partir de variedades selvagens desde a América Central até à zona dos Andes (Gepts, 1998). É uma cultura sensível à salinidade e à humidade, provocando, o excesso de humidade, a queda das flores e vagens e a severidade de doenças, o que limita as boas rentabilidades quando cultivada nos trópicos húmidos. A temperaturas médias diárias altas, acima de 20°C, aumenta a quantidade de fibras na vagem (FAOWater Development and Management Unit, s.d.).

Esta leguminosa ao fixar o azoto atmosférico no solo pode ser usada em rotação com gramíneas, e, para além de ser uma boa fonte de proteína bruta (15% a 25%) e de amido (27 a 58%) (Reddy et al., 1984), também fomenta interesse pelo conteúdo em micronutrientes e propriedades funcionais de alguns componentes (Amarowicz & Pegg, 2008; Campos-Vega et al., 2010; Hernández-Ramírez et al., 2009).

O consumo do feijão está associado à redução do risco de algumas doenças cardiovasculares e cancro. Os efeitos fisiológicos do feijão provêm da presença abundante de, entre outros, polifenóis, que conferem propriedades anticarcinogénicas e antioxidantes (Atchibri et al., 2010).

A produção mundial de feijão, que inclui também o feijão frade (*Vigna unguiculata*), atingiu um pico de produção em 2010, tendo-se mantido acima das 22,5 milhões de toneladas até 2013 (Figura 5). As regiões de maior consumo desta leguminosa incluem toda a América latina, África subsariana e a Índia (Uebersax, 2006), o que confere com os maiores produtores mundiais, Índia e Brasil (Figura 6), sendo que os continentes Asiático e Americano produzem quase 80% da produção mundial (Figura 7).

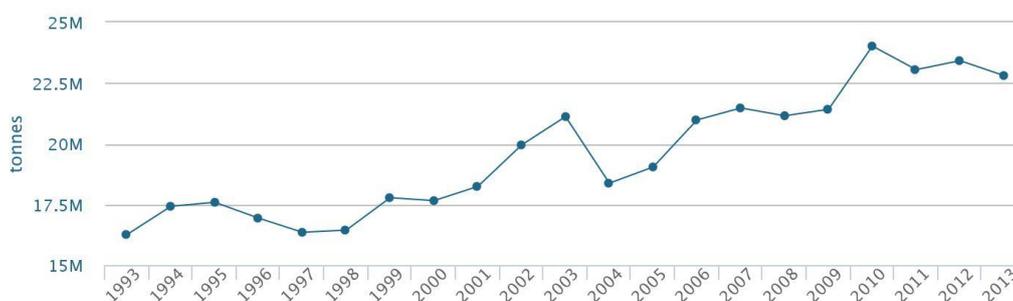


Figura 5. Produção mundial de feijão seco em milhões de toneladas (FAOSTAT, s.d.).

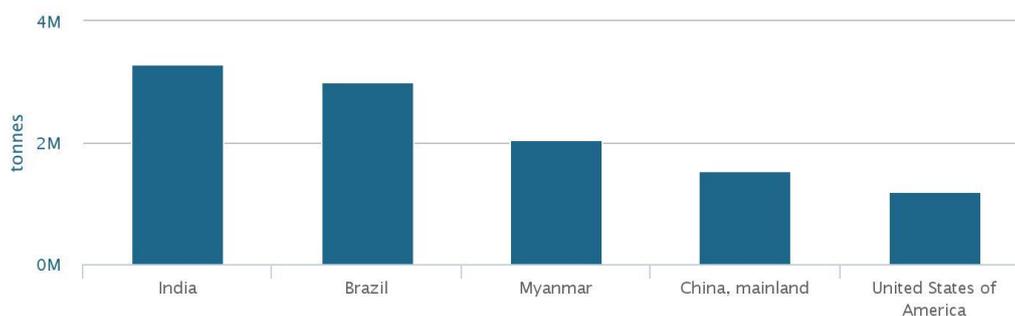


Figura 6. Maiores produtores mundiais de feijão seco em milhões de toneladas (FAOSTAT, s.d.).

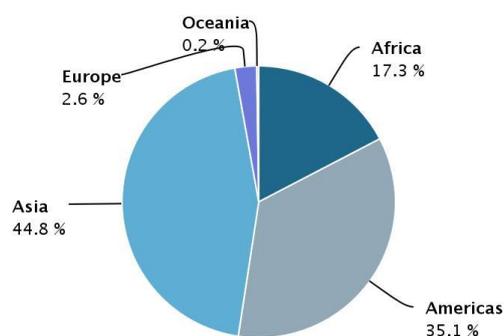


Figura 7. Proporção da produção de feijão seco por continente (FAOSTAT, s.d.).

Geralmente o desenvolvimento de fungos no armazenamento do feijão não é problemático quando o teor de água do produto é inferior a 14%. Existem três grandes pragas de armazenamento, da ordem Coleoptera e família Bruchidae, *Zabrotes subfasciatus*, *Acanthoscelides obtectus* e *Callosobruchus maculatus*. As outras pragas causam menos estragos no feijão e provêm de diferentes produtos armazenados no mesmo armazém (Jones, 1999; Taruvinga et al., 2014).

2.3. ARMAZENAMENTO

O armazenamento compreende uma das fases intermédias entre a colheita e o consumidor visando manter a qualidade do produto armazenado num prazo mais ou menos alargado (Matos, 2004). Este pode ser a granel ou ensacado, depende da dimensão, condições sócioeconómicas e logística da exploração ou indústria transformadora. O grão armazenado é um organismo vivo no estado de dormência que pode permanecer inalterado por longos períodos de tempo, sendo o componente principal do ecossistema de armazenamento de cereais e leguminosas (Navarro et al., 2002a).

Assim, o armazenamento tem uma importância fulcral na segurança alimentar das populações, permitindo a manutenção das características nutricionais e sabor originais dos produtos durante vários meses, além de minimizar o impacto das flutuações de preços ao longo do tempo. Dado que os cereais e as leguminosas estão na base da alimentação humana, principalmente para famílias de países em desenvolvimento, a fase de armazenamento destes produtos assume clara importância.

Para um bom armazenamento é necessário que se cumpram vários parâmetros tanto no campo como no armazém e deve ser dada primazia às ações preventivas. Quando as condições não são as ideais para o tempo em armazém pretendido, os alimentos perdem qualidades nutricionais, devido a alterações da composição química e física dos grãos (Christensen & Sauer, 1982). As alterações da composição química devem-se, por um lado, a alterações estruturais e actividade das enzimas endógenas e, por outro, à actividade dos contaminantes fúngicos (Onigbinde & Akinyele (1990).

2.3.1. OS FUNGOS EM PRODUTOS ARMAZENADOS

Os fungos presentes nos produtos agrícolas estão divididos em fungos de campo e fungos de armazenamento, como forma de simplificação, embora haja fungos que se possam inserir em ambas as denominações.

Os fungos de campo invadem o grão antes da colheita e são menos importantes na deterioração do grão após a colheita, a não ser que os grãos permaneçam sujeitos a condições ótimas ambientais. A contaminação de uma determinada cultura resulta, usualmente, de um fungo específico devido a condições meteorológicas, região ou localização geográfica, susceptibilidade da planta e práticas culturais propícias (Pitt & Hocking, 2009).

Ao necessitarem de um elevado teor de água do produto, os fungos de campo ficam com o crescimento limitado, ou sobrevivem numa forma latente, nos grãos, durante o armazenamento (Lacey et al., 1980). Os géneros mais vulgarmente encontrados são *Alternaria*³, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Curvularia*, *Stemphylium* e *Nigrospora* (Wallace, 1973).

São denominados fungos de armazenamento os organismos, adaptados a baixos teores de água do produto, que contaminam os grãos armazenados, provocando a deterioração e redução de qualidade.

³ Classificadores de todos os fungos presentes no texto estão descritos no Anexo I.

(Christensen, 1967; Mourato, 1984). Os géneros aos quais pertencem os fungos de armazenamento são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Paecilomyces* (Christensen & Kaufman, 1969).

O inóculo de fungos de armazenamento pode ser encontrado em alguns grãos presentes no armazém sob a forma de esporos dormentes à sua superfície (mais abundante), ou imediatamente abaixo do pericarpo sob a forma de micélio dormente (Magro, 2001).

O género *Fusarium* é comumente dominante no campo quando a atividade da água (a_w) não é um factor limitativo para a maioria do período de crescimento da cultura cerealífera; continua o seu desenvolvimento no armazenamento se a secagem dos grãos não for feita convenientemente (Magan & Lacey, 1984a, 1984b, 1984c). O género *Aspergillus*, pelo contrário é mais xerofílico e dominará a micoflora em situações mais limitantes, mesmo que tenha sido demonstrado que fungos do género *Fusarium* sejam mais competitivos que *Aspergillus* e *Penicillium* (Marin et al., 1998). Relativamente ao género *Penicillium* e, tal como no género *Aspergillus*, algumas espécies conseguem crescer a valores de a_w reduzidos (menores que 0,80) como são os casos de *P. brevicompactum* e *P. chrysogenum*. Bastantes espécies deste género são psicrotróficas conseguindo deteriorar alimentos guardados em ambientes refrigerados (Pitt & Hocking, 1997).

2.3.2. FATORES QUE INFLUENCIAM O ARMAZENAMENTO

Os fatores que influenciam a deterioração de produtos armazenados podem ser de natureza abiótica ou biótica. As alterações no grão podem ser devidas à temperatura, à atividade da água, ao teor de água do produto, à composição nutricional, ao metabolismo e à integridade do próprio grão, ao grau de contaminação fúngica dos grãos antes do armazenamento, à presença de insetos, ácaros, roedores e aves, ao período de armazenamento, à presença de resíduos vegetais e outros materiais estranhos e às condições do próprio armazém (Magro, 2009).

2.3.2.1. Teor de água do produto

O teor de água do grão provém de três origens: da água do próprio grão, da humidade do ar e da atividade biológica. A secagem dos grãos previne a germinação, o desenvolvimento de fungos e bactérias e as condições favoráveis para os insetos. Este processo depende das condições locais, clima, estação, volume da colheita, situação financeira do agricultor e equipamento disponível.

Tendo em conta que a digestão nos fungos é extracelular, quanto mais elevado for o teor de água no grão danificado, mais fácil é o desenvolvimento fúngico devido à disponibilidade de nutrientes (Richardson, 1999). Assim, o teor de água no produto é o fator mais preponderante que condiciona o crescimento de fungos em produtos armazenados uma vez que, a água assume um papel importante como meio de transporte de nutrientes (Sweets, 2000).

Os fungos desenvolvem-se melhor em ambientes húmidos e quentes; no entanto, mesmo a baixas temperaturas, o desenvolvimento de alguns fungos pode ocorrer. O baixo teor de água do produto não impede que os esporos que são resistentes a condições secas permaneçam viáveis durante um longo período de tempo (de Groot, 2004).

O controlo do teor de água do grão é vital para evitar a sua alteração por fungos. Geralmente, um valor acima de 18% levará a que se tenha de realizar a secagem. O tempo correto para se atingir o teor de água depende da temperatura do grão: uma combinação de alta temperatura e humidade resulta num risco maior de desenvolvimento de fungos e de consequente produção de micotoxinas (HGCA, 2011).

Uma vez que o grão troca água com o ar à sua volta até alcançar, em locais fechados, um balanço da humidade relativa de equilíbrio (HRE), é mais seguro o armazenamento a uma menor temperatura; à medida que a temperatura diminui, a HRE também diminui (HGCA, 2011).

No caso do milho, o teor de água deve ser reduzido para 22% em 24 horas e 11% a 13% em 48 horas (Lee, 1994). O teor de água do produto entre 11% a 14% pode ser suficientemente baixo para prevenir a deterioração dos grãos armazenados por um período de tempo inferior a um ano mas, é necessário baixar para 10% a 12% para um período temporal maior (Brackett, 1997). A susceptibilidade à quebra dos grãos é maior com o aumento do teor de água do milho na colheita e da temperatura do ar de secagem. Assim, para evitar a quebra do grão durante a secagem, o grão deve ter 15% a 16,5% na colheita e ser seco a temperaturas de 40°C a 60 °C. Também se deve ter em conta que quanto mais seco estiver o grão, maiores serão as reduções no peso (Alves et al., 2001).

A acidez e a percentagem dos grãos visivelmente infectados por fungos de armazenamento estão bastante dependentes do teor de água do produto (Paraginski et al., 2014). A humidade aliada à temperatura, não favoráveis, causam alterações na acidez e pH dos cereais e produtos de cereais (Huyghbact & Schoner, 1999; Savich & Joldaspaeva, 1993; Zhang et al., 1997).

2.3.2.2. Atividade da água (a_w)

A atividade da água quantifica a relação entre o teor de água do produto e a capacidade dos microrganismos crescerem nesse produto e define-se como $a_w = p/p_0$, em que p é a pressão parcial do vapor de água no material de teste e p_0 é a pressão de saturação do vapor de água pura sob as mesmas condições. Por exemplo, a_w de 0,80 significa que a pressão de vapor é 80% do mesmo em água pura; é um parâmetro ou variável que aumenta com a temperatura. A condição de humidade de um produto pode ser medido como a HRE expressa em percentagem ou como a atividade da água expressa decimalmente (FDA, 1987).

Este conceito é usado para expressar a disponibilidade de água para o crescimento de microrganismos e para a atividade enzimática (Lacey & Magan, 1991).

Geralmente, os grãos e seus subprodutos são resistentes à deterioração provocada por fungos devido à sua baixa a_w , o que faz com que haja uma diminuição da taxa de crescimento fúngico, devido ao aumento da fase *lag* (fase de adaptação) da curva de crescimento (International Commission on Microbiological Specifications for foods, 1980). O grau de tolerância a um baixo valor de a_w é expresso, de forma simplificada, como o menor valor de a_w a que um fungo se consegue desenvolver. São designados xerófilos, os fungos que crescem a valores de a_w menores que 0,85 (Pitt, 1975). O valor limite para o qual os fungos não se conseguem desenvolver, situa-se entre 0,60 a 0,65 (Snow et al., 1944).

2.3.2.3. Temperatura

A temperatura atmosférica, a temperatura do grão e a temperatura intergranular são factores importantes que permitem controlar mais eficazmente a atividade de todos os inimigos dos produtos armazenados, de uma forma geral.

O intervalo de temperatura ótima para o desenvolvimento da maioria dos insectos e fungos no armazenamento situa-se entre os 25°C e os 34°C e os 15°C e os 30°C, respectivamente (Taruvinga et al., 2014). No entanto, algumas espécies de *Fusarium* (Joffe, 1962) e *Penicillium* (Mislivec & Tuit, 1970) crescem a temperatura negativas, entre -7°C e 0°C. Algumas espécies de *Aspergillus* toleram intervalos

de temperatura bastante alargados (termotolerantes), crescendo entre 8°C a 45°C como são exemplo *A. flavus* e *A. niger* (Panasenko, 1967).

O metabolismo do grão, a atividade de insetos e fungos, produzem calor que se pode concentrar num local específico dentro da massa de grãos armazenados causando, na nomenclatura anglo-saxónica, os *hot spots*. Um *hot spot* causa a migração de insetos e a condensação de vapor de água em zonas mais frescas dos grãos, perto da superfície. Consequentemente o crescimento de fungos e o processo de germinação da semente ocorrem, o que leva à formação de novos *hot spots*. Assim, este processo, alimentado positivamente pelo teor de água do produto, autoestimula-se e o prejuízo dos grãos aumenta (de Groot, 2004).

2.3.2.4. Agentes biológicos

A presença de agentes biológicos durante o armazenamento é passível de causar elevados estragos e prejuízos aos grãos armazenados. Por agentes biológicos compreendem-se os mais relevantes, os artrópodes e fungos, seguidos por roedores e aves.

Os produtos destinados ao armazenamento devem ser protegidos no campo contra ataques de insetos que facilitam a contaminação por fungos e que se tornarão no inóculo para a posterior infeção durante o armazenamento (Magan & Aldred, 2007).

Apesar dos insetos e ácaros serem, por si só, importantes causas de deterioração dos grãos armazenados, também intervêm, de diferentes formas, na colonização fúngica. Mais propriamente, os artrópodes produzem água proveniente do seu metabolismo, o que aumentará o teor de água do produto e a humidade relativa (Lacey et al., 1980; Sweets, 2000). Adicionalmente, na sua atividade alimentar, danificam o tegumento originando locais de fácil penetração dos fungos (Wallace & Sinha, 1981). Para além disso, são vectores de esporos de fungos quer no campo, quer no armazém e o seu material fecal serve como substrato para facilitar a contaminação fúngica (Dunkel, 1988; Wallace & Sinha, 1981).

Os roedores são responsáveis por estragos durante o armazenamento, devido ao facto de serem bastante comuns em toda parte, terem alta taxa de reprodução e difícil controlo ou erradicação. Para além dos grãos consumidos, os roedores podem causar estragos nas instalações ou nos sacos/embalagens de armazenamento dos grãos, contaminar os produtos com dejetos e propagar doenças como a toxoplasmose, leptospirose e febres causadas por bactérias do género *Rickettsia*, da

Rocha Lima, ou pelo Hantavírus. Os estragos causados por aves não costumam ser problemáticos, a não ser que se negligencie as boas práticas no armazenamento. No entanto podem causar problemas no campo ou nas pilhas de secagem de instalações abertas, contaminando os grãos com dejetos e serem vectores de *Salmonella* sp. (Taruvunga et al., 2014).

2.3.2.5. Interação entre fatores

A relação entre a_w e o teor de água difere entre grãos ricos em amido e grãos ricos em lípidos e, em menor extensão entre diferentes tipos de grãos e variedades. Deste modo, o teor de água é expresso pela atividade da água, para poder-se comparar a disponibilidade de água para o crescimento microbiano em diferentes tipos de grãos.

As condições sub-ótimas de um fator diminuem a capacidade do fungo tolerar condições extremas de outro fator. O mínimo de a_w necessário para permitir o crescimento ocorre quando se atinge o ótimo de temperatura, assim como o intervalo ótimo de temperatura é atingido quando a a_w é ótima. A a_w interatua com a composição gasosa intergranular (Lacey et al., 1990).

2.3.3. ESTRAGOS E PREJUÍZOS NO ARMAZENAMENTO

Segundo Amaro (2003), a designação de estrago define-se como o efeito inconveniente provocado, direta ou indiretamente, pelos inimigos das culturas, no desenvolvimento das culturas ou nos seus produtos, enquanto que prejuízo define-se como a redução, com importância económica, da produção de uma cultura, quer em quantidade quer em qualidade, causada por inimigos da cultura.

Assim o estrago pode ser tolerado se não implicar consequências económicas num nível previamente definido. Especificamente para o armazenamento, a diferença entre estes dois conceitos pode ser muito ténue, devido ao facto de, num local confinado, os estragos poderem atingir rapidamente prejuízos. Se não forem implementadas boas práticas no armazenamento, as reduções de produtos agrícolas após a colheita, principalmente em agricultura de subsistência ou de pequena escala, podem chegar a 30% (Taruvunga et al., 2014).

O tipo de substrato, a atividade da água, a composição do ar e a temperatura são os parâmetros mais importantes que irão afetar o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas, sendo assim, fundamental o seu controlo (Magan et al., 2003).

Os fungos são responsáveis pela alteração do sabor, textura e aparência dos grãos. Contribuem para o aquecimento e para a redução de matéria seca dos grãos devido à utilização dos glúcidos como fonte de energia, degradação de proteínas e lípidos, para a redução da qualidade nutricional e viabilidade da semente (Magan & Aldred, 2007). Para além disso, há inúmeras espécies que podem causar problemas de saúde recorrentes da inalação dos esporos como alergias, asma e outros problemas broncopulmonares (Zabka et al., 2014).

Durante o processo metabólico primário dos fungos um grande número de metabolitos são formados e podem-se acumular em certas condições, nomeadamente na decomposição dos hidratos de carbono, o etanol e ácidos orgânicos ou também a acumulação de glicogénio e lípidos (Filtenborg et al., 2004).

Adicionalmente, os fungos produzem um vasto número de metabolitos secundários tais como, micotoxinas, insecticidas, antibióticos, inibidores de crescimentos das plantas e compostos voláteis como, por exemplo, o 3-metil-1-butanol, o hexanal e a 3-octanona a que se atribuem alterações das propriedades originais dos alimentos (Magro, 2001).

2.3.3.1. Micotoxinas

As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos tanto no campo como no armazenamento, sendo que apresentam efeitos tóxicos para os animais e para o Homem (Capriotti et al., 2012; Bertiller et al., 2013).

De entre centenas de micotoxinas conhecidas as mais importantes, pela sua toxicidade e percentagem e dispersão das estirpes produtoras, são as aflatoxinas, ocratoxinas, desoxinivalenol, zearalenona, fumonisinas e tricotecenos (Wagacha & Muthomi, 2008). No entanto, existem outras menos comuns, prejudiciais para a saúde e com potencial efeito sinérgico ou aditivo como o ácido penicílico, à ocratoxina A, xantomegnina, viomeleina e vioxantina (Lindenfelser et al., 1973; Stoev et al., 2001). O efeito sinérgico que tem a substância de baixa toxicidade, culmorina, com o desoxinivalenol, demonstrado em lagartas (Dowd et al., 1989) ou até o ácido ciclopiazónico (CPA) e as aflatoxinas, uma vez, que ocorrem em estirpes de *A. flavus* isoladas de amendoins (Vaamonde et al., 2003) e milho (Resnik et al., 1996).

As aflatoxinas têm efeitos carcinogénicos, hepatocarcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, de hepatotoxicidade e de imunotoxicidade (Raisuddin, 1993; Groopman et al., 2008). Os compostos produzidos são designados de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e M1. São produzidas por cerca de 40% das estirpes de fungos da espécie *A. flavus*, que tem grande afinidade para a contaminação de culturas de milho, amendoins e outros frutos secos e sementes de algodão. Esta micotoxina é produzida por *Aspergillus parasiticus* em amendoins, em que todos os isolados conhecidos produzem ambas aflatoxinas B e G (Frisvad et al., 2006). Outras espécies produtoras são *A. nominus*, *A. arachidicola* e *A. minisclerotigenes* (Samson et al., 2010).

A ocratoxina A (OA) é uma nefrotoxina com possibilidade de causar efeitos carcinogénicos, teratogénicos, de imunotoxicidade, de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (Beardall & Miller, 1994; Kuiper-Goodman & Scott, 1989; Pléstina, 1996; Schlatter et al., 1996), cujos principais fungos produtores do género *Aspergillus* pertencem ao subgénero *Circumdati*, nomeadamente, *A. westerdijkiae*, *A. steynii*, *A. ochraceus* que podem ser encontrados em cereais. *A. carbonarius* e *Petromyces alliaceus* são importantes produtores desta toxina e podem ser encontrados em uvas e figos respectivamente. Apesar de *A. niger* ter poucas estirpes produtoras de OA, ao ser bastante comum e produzir OA em cultura pura, deve ser tido em conta. O género *Penicillium* contém dois importantes produtores de ocratoxina A, particularmente as espécies *P. verrucosum* em cereais armazenados e *P. nordicum* em carnes (Frisvad et al., 2006).

No género *Fusarium*, destacam-se as fumonisinas, desoxinivalenol e T-2 (tricotecenos) e a zearalenona. As fumonisinas são, a par das aflatoxinas, consideradas as mais relevantes micotoxinas em alimentos. As fumonisinas são hepatotóxicas em todas as espécies testadas e nefrotóxicas em muitas delas, para além de poderem potenciar carcinomas (Cousin et al., 2005). As espécies que produzem esta micotoxina são *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* e *F. verticillioides* (Samson et al., 2010). Com efeitos hematotóxicos e imunossupressores, existem centenas de tricotecenos identificados, destacando-se, porém, o desoxinivalenol produzido por *F. graminearum* e *F. culmorum* sobretudo em cereais e a toxina T-2 produzidas por *F. sporotrichioides* e *F. langsethiae* isolados igualmente de cereais. Zearalenona é uma micotoxina estrogénica, causando hiperestrogenismo, encontrada na cultura de trigo e milho em plantas atacadas por fusarioses. Esta é produzida por *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti* e *F. semitectum* e pode potenciar tumores de dependência hormonal e problemas graves no aparelho reprodutor (Cousin et al., 2005; Frisvad et al., 2006; Samson et al., 2010).

2.3.3.2. Controlo das micotoxinas

O controlo dos níveis de toxinas nas culturas pode ser feito em três fases: na produção, no armazenamento e no processamento. Medidas de prevenção que evitem tratamentos com fungicidas são, declaradamente, mais eficazes se tivermos em conta todos os fatores socioeconómicos e ambientais. Na produção, o controlo dos fungos patogénicos faz-se através da proteção contra pragas, rega, fertilização, rotações culturais, colheita precoce e enterramento dos restos da cultura (Munkvold, 2003; Champeil et al., 2004). A utilização de sementes melhoradas que conferem resistência contra pragas, no sentido clássico do melhoramento ou através da biotecnologia vegetal, são já usadas na agricultura como é o caso do milho transgénico que expressa a toxina de *Bacillus thuringiensis* Berliner (*bt*) em relação à resistência contra pragas. Além disto, a investigação no avanço da resistência da planta diretamente ao ataque do fungo é um objetivo a alcançar, uma vez que a existência de pragas é um factor que amplia a contaminação mas não é o único. Neste âmbito existem duas estratégias, uma através do controlo transgénico da capacidade do fungo conseguir colonizar a espiga pode ser obtido através da sobre expressão de genes que produzam proteínas e metabolitos anti fúngicos específicas ou do aumento da resistência da própria planta nos tecidos das espigas. Outra estratégia insere-se na prevenção da biossíntese de micotoxinas ou desintoxicação das micotoxinas na planta quando existe um maior risco de estirpes produtoras destas ou condições para a sua formação (Duvick, 2001). Todavia, nem todo este conhecimento está no mercado, daí que tem sido realizada investigação no âmbito da proteção biológica. Nos EUA, em 2001, conseguiram-se reduzir os níveis de aflatoxinas em 80%, em sementes de algodão através da introdução de estirpes de *A. flavus* não toxigénicas (Robens & Riley, 2002), tal como Luongo et al. (2005) obtiveram a supressão parcial da colonização e esporulação de *F. verticillioides* e *F. proliferatum* pela introdução de fungos não patogénicos do género *Fusarium*; foi demonstrado que estirpes de *Trichoderma* controlam fungos patogénicos através de mecanismos de competição de espaço e nutrientes, antibioses, micoparasitismo, fertilização e estimulação das defesas das plantas (Benitez et al., 2004).

2.3.4. MEDIDAS PREVENTIVAS E MEIOS DE PROTEÇÃO

As medidas preventivas começam no campo, na escolha de variedades menos susceptíveis a ataques de fungos e de insetos, escolhendo aquelas que têm sementes com um tegumento mais compacto e resistente e ainda realizar a colheita precocemente.

A escolha e preparação do local temporário ou definitivo é uma etapa fundamental na garantia da segurança do armazenamento de grãos. A instalação deve incluir algumas características, como por exemplo, ser construída fora de locais propensos a cheias, longe dos campos de onde vieram os grãos e longe de empresas agropecuárias, limitando a contaminação por insectos e conseqüentemente por fungos (de Groot, 2004). Além disso os locais devem estar limpos de detritos, de colheitas anteriores, sem fugas ou rachas e com os equipamentos desinfectados (HGCA, 2011).

Os grãos devem ser armazenados não danificados, sem restos de cultura e com um nível de humidade compatível com as boas práticas de conservação (de Groot, 2004).

No caso de culturas como o milho, milho miúdo e sorgo é possível deixá-las secar antes da colheita. Na secagem industrial é possível aniquilar, pelas maiores temperaturas atingidas, ovos e larvas de insectos mesmo dentro dos grãos. Também é possível recorrer a cinza de madeira e de palha, argila cozida e arroz tostado como materiais absorventes adicionados à pilha do produto a secar em agricultura de subsistência principalmente em África (de Groot, 2004).

No caso de ocorrência de flutuações de temperatura diárias, estas, devem ser minimizadas através do sombreamento, arejamento ou outro método (de Groot, 2004). Para um armazenamento de 12 meses, sem haver alterações no pH, amarelecimento ou acastanhamento, aumentos de acidez, solubilidade proteica e propriedades plásticas, o milho deve ser mantido a 5°C (Paraginski et al., 2014).

Por fim, é necessário que se façam inspeções regulares aos grãos e que se mantenha um registo do tempo de armazenamento, das condições abióticas e medidas de controlo adotadas (de Groot, 2004). Ao combinarem-se diferentes estratégias preventivas que limitem estragos pelas pragas e doenças, permitirá que a utilização de pesticidas seja minimizada.

Outros meios de luta podem ser utilizados na proteção dos grãos armazenados, especificamente, a radiação ionizante que danifica o DNA cromossómico dos fungos, os conservantes químicos nos quais se incluem os ácidos acético, láctico, propiónico, sórbico e benzoico, embora a maioria seja

bacteriostática ou fungistática e apenas para consumo animal, as atmosferas controladas com a manipulação da concentração de um ou mais gases, a utilização de ozono, o arrefecimento, o congelamento, a redução de a_w , a restrição de nutrientes, a adição de substâncias naturais de origem vegetal nomeadamente os óleos essenciais e seus compostos ativos principais (Magro, 2001). No entanto, alguns destes métodos apresentam condicionantes quer económicas, quer físicas ou químicas.

O ozono usado como fumigante neutraliza várias pragas de produtos armazenados como *Tribolium castaneum*, *Rhyzopertha dominica*, *Oryzaephilus surinamensis*, *S. oryzae* e *Ephestia elutella* (Sousa et al., 2008). Adicionalmente, através de estudos em laboratório e de campo, comprovou-se a eficácia do ozono no controlo de insectos resistentes à fosfina (insecticida) (Qin et al., 2003). Assim, esta técnica é uma alternativa eficaz e ambientalmente aceitável no controlo de pragas dos grãos armazenados de cereais e leguminosas.

Outra alternativa ao armazenamento tradicional que previne a contaminação de produtos armazenados consiste na utilização de sacos herméticos que criam uma alteração na composição do ar dentro dos próprios, baixando os níveis de oxigénio e aumentando os de dióxido de carbono devido ao metabolismo dos grãos, dos insectos e dos fungos (Quezada et al., 2006). Um deste tipo de sacos herméticos designa-se de “Purdue Improved Crop Storage” (PICS) que são compostos por duas camadas de polietileno de alta densidade com 80 mm de espessura e uma camada exterior de polipropileno para permitir o manuseamento. Esta tecnologia permite que os grãos armazenados sejam menos contaminados do que noutro tipo de sacos uma vez que, ao impedir as trocas gasosas com o exterior, provoca hipoxia e hipercarbia diminuindo o ataque de insectos como, por exemplo, *P. truncatus*, *S. zeamais* e *R. dominica* e a dispersão dos esporos de fungos devido ao movimento dos insectos entre os grãos armazenados (Ellis et al., 1994; Hell et al., 2000; IFPRI, 2010). A tripla camada dos PICS *bags* diminui, também, os estragos causados pelas perfurações dos insectos, protege contra as variações da humidade relativa do ambiente exterior e contribui para a melhoria da capacidade germinativa dos grãos na maioria dos casos (Baoua et al., 2014). Os PICS *bags* inibem o desenvolvimento de *A. flavus* e a produção de aflatoxinas em vários teores de água do produto. Giorni et al. (2008) observaram que o ar com 25% de dióxido de carbono é suficiente para reduzir o crescimento de *A. flavus*. O grão de milho pode ser armazenado em PICS *bags* mesmo se não tiver sido convenientemente seco (com 18% a 21% de teor de água). No entanto, isto causa a perda total de capacidade germinativa em poucas semanas e a possibilidade de ocorrência de fermentação. Neste caso, os grãos para semente devem ser armazenados a 15% ou menos de teor de água (Williams et al., 2014).

2.3.4.1. Extratos de plantas, óleos essenciais e compostos ativos principais

As plantas sintetizam um vasto conjunto de metabolitos secundários que resultam de mecanismos de defesa, adaptativos a stresses bióticos e abióticos e a interações com o ambiente, nomeadamente, flavonóides, terpenos, terpenóides, carotenóides, cumarinas, alcalóides, aminoácidos não proteicos e compostos fenólicos (Bassole & Juliani, 2012; Matos et al., 2013). Estes metabolitos são utilizados como fragrâncias, estimulantes, tintas, alucinogéneos, venenos ou pesticidas (Matos 2001; Hill & Wang 2009). Alguns destes metabolitos secundários fazem parte da composição de óleos essenciais obtidos a partir das plantas.

Os óleos essenciais ocupam um lugar de destaque na história da humanidade. Vários registos documentais foram encontrados sobre a extração e uso destes na Índia (5000 aC), Mesopotâmia ou Grécia (3000 aC) (Burdock & Carabin, 2009; Schmidt, 2010). Há quatro milénios, o óleo de canela era o principal ingrediente de uma pomada santa mencionada no Exod. 32:22–26. Devido às propriedades conservantes, a canela e o óleo essencial de canela eram usados no embalsamento pelos Egípcios (Adams & Taylor, 2010). Em 1480 aC, a rainha Hatshepsut do Egito enviou uma expedição até Punt (Somália) para recolha de plantas aromáticas para a produção de perfumes, medicamentos, aromas e conservação de cadáveres (Brud, 2010).

As primeiras investigações dos compostos dos óleos essenciais são atribuídas ao químico Francês M.J. Dumas (1800-1884) que analisou alguns compostos oxigenados, hidrocarbonados, sulfurados e azotados, publicando os seus resultados em 1833 (Kubeczka, 2010). No entanto, as investigações mais importantes foram realizadas por O. Wallach (1847-1931), observando que diversos terpenos descritos com diferentes nomes dependendo das diferentes origens eram quimicamente idênticos. Tentou também isolar e estudar as propriedades de cada composto (Nobelprize.org, 2014).

Os óleos essenciais, também conhecidos por óleos voláteis, são misturas complexas de compostos ativos sintetizados por plantas pertencentes às famílias Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Cupressaceae e Poaceae (Bassole & Juliani, 2012; Morcia et al., 2013). Estão armazenados em tecidos secretores como tricomas glandulares ou cavidades secretoras da parede celular e estão presentes como líquidos nas folhas, caules, cascas, flores, raízes e frutos. As características aromáticas dos óleos essenciais fornecem várias funções para as plantas, incluindo a atração ou repulsão de insetos, a proteção contra o calor ou o frio e a utilização dos compostos ativos como defesa contra organismos patogénicos (Robu et al., 2015).

De acordo com a Norma Portuguesa NP-90 de 1987, designam-se por óleos essenciais *“os produtos aromáticos obtidos por destilação pelo vapor de água, de matérias vegetais de origem botânica determinada ou por expressão do pericarpo dos citrinos, e separados da fase aquosa por processos físicos e, ainda por alargamento, outros produtos aromáticos obtidos a partir de matérias vegetais, por outros processos de destilação ou por destilação fracionada, ou submetidos durante a sua preparação a tratamentos auxiliares tais como a filtração, a centrifugação, a retificação, o tratamento por adsorventes, por concentração seletiva ou por eliminação de certos constituintes”*.

São vários os fatores que influenciam a composição química dos óleos essenciais, como, por exemplo, a variedade da planta e a variação genética da mesma, a fertilização e a nutrição, a localização geográfica e as variações climáticas, a rega, o período fenológico da colheita e as condições de armazenamento. Adicionalmente, a parte da planta utilizada e o método de extração determinam o rendimento e a composição do óleo e, conseqüentemente, determinará as propriedades biológicas (Croteau, 1986; Alvarez-Castellanos & Pascual-Villalobos, 2003; Hussain et al., 2008).

Os óleos essenciais podem ser extraídos por vários métodos (Quadro 1). O método utilizado depende do material vegetal, do estado e da forma desse material. O método de extração é um dos fatores mais importantes que determinam a qualidade de óleo essencial. Se o processo for inadequado pode levar a redução das características naturais e das propriedades bioativas.

Quadro 1. Métodos de extração de óleos essenciais (Dima & Dima, 2015).

Métodos convencionais	Métodos inovadores	Métodos de pequena escala
Hidrodestilação	Extração com fluido supercrítica	Destilação por método de “Clevenger”
Destilação a vapor	Extração com líquido subcrítica	Microdestilação
Destilação por hidrodifusão	Extração assistida por ultrassons	Extração em “headspace”.
Extração com solvente orgânico	Extração assistida por micro-ondas	Microextração em fase sólida
Prensagem a frio	Hidrodifusão com micro-ondas	
Destilação a seco	Destilação a vapor com micro-ondas	
	Extração por micro-ondas sem solvente.	

A destilação a vapor é o método mais utilizado com capacidade de extração de 93% (Masango, 2005). A amostra é colocada em água a ferver ou em contacto com vapor de água que é responsável pela destruição das estruturas celulares. Como consequência, os compostos voláteis são libertados (Perineau et al., 1992). A hidrodestilação tornou-se no método padrão de extração de óleos essenciais de vários materiais vegetais como de madeira ou flores. O processo envolve a imersão da amostra em água, seguido de fervura. Este método fornece uma maior proteção em relação à destilação a vapor porque a água protege o óleo do sobreaquecimento. A extração por hidrodifusão é um tipo de destilação cuja diferença para a destilação a vapor está na entrada do vapor de água na parte de cima do reator, levando a menor tempo de extração e maior rendimento. Este método é utilizado quando o material foi previamente seco, uma vez que não é danificado à temperatura de ebulição. Em materiais frágeis ou delicados que não são tolerantes ao calor utiliza-se a extração por solvente, que consiste em misturar o solvente com a planta, aquecendo a mistura e seguido de filtração. O filtrado é depois concentrado e misturado com álcool, que evapora permanecendo o óleo extraído. Devido ao tempo de duração do processo, este método torna-se mais dispendioso (Li et al., 2009).

Os métodos convencionais apresentam várias desvantagens, preparação morosa, grandes quantidades de solventes orgânicos usados que poderão contaminar o óleo, perdas e degradação de compostos voláteis e menores eficiências de extração (Deng et al., 2005; Jimenez-Carmona et al., 1999).

Novas técnicas de extração permitem eliminar muitas desvantagens dos métodos convencionais. A extração assistida por ultrassons e a extração assistida por micro-ondas utilizam formas alternativas de energia enquanto que a extração com líquido subcrítica e a extração com fluido supercrítica melhoram as características do solvente. O CO₂ é maioritariamente utilizado na extração com fluido

supercrítica devido às suas propriedades como os baixos valores para os pontos críticos de temperatura e pressão, baixa reatividade, baixo preço e baixa toxicidade. A baixa pressão, o gás passa à fase líquida servindo de meio seguro, inerte e elevada difusividade para extração dos compostos aromáticos da amostra, não deixando resíduos (Dima & Dima, 2015).

Na extração com líquido subcrítica, em que a água é usada como meio de extração, obtém-se um óleo essencial mais valioso, com maior quantidade de compostos oxigenados e menos terpenos, poupando tempo, custos energéticos e menos quantidade de amostra usada do que a hidrodestilação (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

O método de extração por micro-ondas sem solvente é uma combinação de aquecimento por micro-ondas e destilação a seco à pressão atmosférica, sem o uso de água ou solventes que permite a rápida extração dos óleos essenciais de plantas aromáticas, especiarias e frutos secos. As vantagens associadas a este método são maior rendimento e seletividade, menor período de extração, menor produção de resíduos, menores custos energéticos (Lopez-Avila et al., 1994; Farhat et al., 2010).

Os compostos ativos dos óleos essenciais são terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos), compostos aromáticos (aldeídos, fenóis, álcoois, derivados de grupos metoxi) e terpenóides (isoprenóides) (Bakkali et al., 2008). Os monoterpenos são os constituintes maioritários da maioria dos óleos essenciais e dão às plantas propriedades odoríficas únicas devido às baixas temperaturas de ebulição. Estes podem ser classificados em dois grandes grupos, monoterpenos hidrocarbonados e monoterpenos oxigenados. O segundo grupo inclui os álcoois, os aldeídos, as cetonas, os éteres e os ácidos (Templeton, 1969).

As diferentes técnicas que permitem a identificação destes compostos são a cromatografia de camada fina (TLC), cromatografia gasosa (GC), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Magro, 2009).

A integridade dos óleos essenciais pode ser alterada devido a fatores físico-químicos como o oxigénio, luz, temperatura e pH. O oxigénio na presença da luz leva à oxidação dos componentes insaturados, levando à formação de radicais livres. A perda por volatilização é maior quando a temperatura aumenta. Alguns compostos são bastante instáveis com a variação do pH, como por exemplo o citral que é decomposto em ambiente ácido (Choi et al., 2009). A encapsulação é um processo que visa a redução das perdas dos óleos essenciais devido aos fatores ambientais, a preservação do sabor, da

atividade biológica, a redução das alterações organoléticas dos alimentos em contacto com os óleos e a transformação destes em pós solúveis em água (Augustin & Sanguansri, 2012).

Na União Europeia, as utilizações mais comuns dos óleos essenciais são em intensificadores de sabor em alimentos, perfumes e em produtos farmacêuticos pelas suas propriedades funcionais (Van Welie, 1997; Van de Braak & Leijten, 1999). Podem ter outras utilizações relevantes em agronomia, em cosmética e em produtos para desinfecção (Bakkali et al., 2008). No quadro 2 são apresentados os óleos essenciais mais utilizados e suas aplicações.

Os extratos e os óleos essenciais de diversas plantas têm sido utilizados de forma tradicional, tanto na medicina como no controlo de pragas e doenças. No entanto, depois da segunda guerra mundial, foi dada primazia à utilização de pesticidas sintéticos baratos, produzidos e utilizados em larga escala, com grande espectro de ação, acarretando problemas graves e contaminação dos ecossistemas e levando ao aparecimento de resistências (Kumar et al., 2011).

Na maioria dos países, o tipo e a dose dos fungicidas homologados para a aplicação em produtos armazenados estão restritos devido ao longo período de degradação e efeitos prejudiciais aos alimentos e à saúde e risco de resistências, o que fez com que os mais eficazes saíssem do mercado. No entanto, para produtos secos armazenados (cereais e leguminosas) esta restrição é total (Semple et al., s.d.). Adicionalmente, a preocupação da população em geral sobre a contaminação dos alimentos com pesticidas químicos alcançou uma maior proporção. Assim, considerando estes fatores, serão necessárias alternativas seguras e ao mesmo tempo económicas de controlo de fungos e insetos dos produtos armazenados (Cabral et al., 2013).

As preferências dos consumidores seguem, cada vez mais, no sentido dos alimentos que contêm menores conservantes químicos e exibem um aspeto e características mais naturais. Os sais dos ácidos fracos, como o benzoato de sódio e sorbato de potássio, conseguem inibir o crescimento de vários fungos de armazenamento. O uso destas substâncias apresenta factos positivos como a reduzida toxicidade em mamíferos, largo espectro de ação e reduzidos custos, no entanto, são necessárias grandes quantidades para haver resultados fungicidas, trazendo potenciais alterações no sabor dos alimentos (Cabral et al., 2013).

Quadro 2. Consumo mundial de cada óleo essencial e suas aplicações industriais (Brud, 2010).

Nome	Consumo (toneladas)	Aplicações
Laranja (<i>C. sinensis</i>)	50000	Refrigerantes, doces e fragrâncias
<i>Mentha arvensis</i>	25000	Dentríficos, pastilhas elásticas, confeitaria, fragrancias e cristais de mentol.
Hortelã-pimenta (<i>Mentha piperita</i>)	4500	Dentríficos, pastilhas elásticas, confeitaria, bebidas alcoólicas e fragrâncias.
Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i>)	4000	Dentríficos, pastilhas elásticas, confeitaria, produtos farmacêuticos e fragrâncias.
Limão (Citrus limon)	3500	Refrigerantes, doces, laticínios, fragrâncias e produtos químicos domésticos.
Citronela (<i>Cymbopogon nardus</i>)	3000	Perfumaria, produtos de higiene pessoal e produtos químicos domésticos.
Eucalipto-Limão (<i>Corymbia citriodora</i>)	2100	Dentríficos, pastilhas elásticas, confeitaria, produtos farmacêuticos, fragrâncias.
Cravinho (folha) (<i>Syzygium aromaticum</i>)	2000	Condimentos, doces, produtos farmacêuticos, tabaco, produtos de higiene pessoal e produtos químicos domésticos.
<i>Mentha spicata</i>	2000	Dentríficos, pastilhas elásticas e confeitaria.
Cedro (<i>Juniperus virginiana</i>)	1500	Perfumaria, produtos de higiene pessoal e produtos químicos domésticos.
Lima (Citrus aurantifolia)	1500	Refrigerantes, doces, laticínios e fragrâncias.
Lavanda (<i>Lavandula angustifolia</i>)	1000	Perfumaria, cosméticos e produtos de higiene pessoal.
May Chang (<i>Litsea cubeba</i>)	1000	Citral para refrigerantes e fragrâncias.
Cedro (<i>Cupressus funebris</i>)	800	Perfumaria, produtos de higiene pessoal e produtos químicos domésticos.
Canforeiro (<i>Cinnamomum camphora</i>)	700	Produtos farmacêuticos.
Coentro (<i>Coriandrum sativum</i>)	700	Condimentos, conservas, alimentos processados e fragrâncias.
Toranja (<i>Citrus paradisi</i>)	700	Refrigerantes e fragrâncias.
Anis-estrelado (<i>Illicium verum</i>)	700	Bebidas alcoólicas, doces, panificação e produtos químicos domésticos.

Os óleos essenciais têm a vantagem de serem biodegradáveis o que pode ser explorado como uma opção mais ecológica nos programas de proteção integrada, aliada ao facto da crescente consciência relativamente à sustentabilidade da agricultura. Assim, mais produtos produzidos pelas plantas, como

os compostos ativos principais, poderão ser explorados de modo a substituir os químicos sintéticos (Prakash et al., 2015). Numerosos óleos essenciais apresentam atividade biológica contra agentes patogénicos, bactérias, fungos, insetos e vírus (Marandi et al., 2011; Prakash, et al., 2012; Xing et al., 2012).

Relativamente aos mecanismos de actuação, a lipofilicidade dos óleos essenciais dá-lhes a capacidade de penetrar facilmente nas membranas dos fungos, resultando na expansão, no aumento da fluidez e permeabilidade destas, na alteração do funcionamento das proteínas constituintes das membranas, na inibição da respiração, na alteração do transporte iónico e na perda de iões e de conteúdo citoplasmático (Oonmetta-aree et al., 2006; Khan et al., 2010; Fadli et al., 2012).

Os compostos fenólicos podem actuar por via da inibição enzimática, possivelmente pela reação com os grupos sulfidrílo ou por interações com proteínas (Dambolena et al., 2008). A relativa atividade antifúngica dos óleos essenciais não é facilmente correlacionada com o efeito de um componente ativo particular na célula alvo, mas sim com a mistura dos diferentes compostos ativos principais e sua percentagem nos óleos (Ranasinghe et al., 2002; Hashem et al., 2010).

Em teoria o uso combinado de moléculas proporciona um maior espectro de ação, com maior eficácia antifúngica. No entanto, a combinação pode provocar três tipos de efeitos, efeitos aditivos, antagonistas e sinérgicos. Os efeitos aditivos ocorrem quando a ação de dois compostos ativos resulta no dobro dos efeitos de quando são usados independentemente. Os antagonistas referem-se à eficácia reduzida dos dois compostos relativamente à soma dos resultados dos dois, testados independentemente. Por fim, os efeitos sinérgicos ocorrem quando existe um aumento da atividade antifúngica, acima da proporcionada pela soma dos resultados individualizados (López-Malo, 2005).

Existem fungicidas no mercado internacional que usam óleos essenciais nas suas formulações. Entre outros, o fungicida Sporatec AG™ com 18% de óleo essencial de alecrim, 10% de cravinho e 10% de tomilho (Brandt, s.d.), o Fitofortificante Ecológico Anti Fungos com 0,02% de extracto de algas marinhas (*Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis), 0,3% óleo essencial de canela, de cavalinha e de tomilho (Battle, s.d.), o Canol, com 70% de óleo essencial de canela (Biagro, s.d.), o Zero Tolerance™ que contém os óleos essenciais da planta de tomilho, de cravinho, de alecrim e de *Gaultheria procumbens* (Z-tolerance, s.d.), Fungastop™ que tem na sua composição ácido cítrico e óleo essencial de menta (SoilTech, s.d.), Garden Safe® e Trilogy® baseados em óleo de “neem” (Gardensafe, s.d.; Peaceful Valley Farm & Garden Supply, s.d.), Final Stop® com óleo essencial de cravinho, de alecrim, de hortelã-pimenta e ácido málico (Dr. Earth, s.d.), All Natural 3 in 1 com 10% de óleo essencial de cravinho e 20%

de alecrim (Monterey, s.d.), GC-3™ e Mildew cure® que usam na sua formulação os óleos das sementes da planta do algodão (30%), do milho (30%) e de alho (23%) (JH Biotech, s.d.).

No entanto, a comercialização de pesticidas baseados em óleos essenciais compreende três barreiras principais: a escassez de matéria prima, a necessidade de controlo de qualidade e standardização do processo químico e as dificuldades de registo, principalmente financeiras (Isman, 2000). Adicionalmente, os óleos essenciais detêm várias limitações para o seu uso industrial, nomeadamente as interações sinérgicas ou antagónicas entre compostos ativos de diferentes óleos ou outros conservantes, a diferença de resultados entre os testes *in vitro* e os *in vivo*, por falta de encapsulamento eficaz, principalmente devido a alterações de pH, temperatura, humidade, perda do óleo essencial por evaporação ou alteração do mesmo, o que influenciará as concentrações mínimas de inibição e, por fim, a possibilidade de alteração das propriedades organolépticas dos alimentos (Prakash et al., 2015).

Em relação à segurança na ingestão dos óleos essenciais e seus compostos ativos, nos últimos anos têm sido feitos vários testes toxicológicos, com resultados positivos, fazendo com que estes sejam reconhecidos como substâncias seguras (Generally recognized as safe: GRAS) (US Code of Federal Regulations, 2013).

O facto da baixa toxicidade em mamíferos, torna os óleos essenciais e os seus compostos ativos particularmente atrativos. Todavia, não são integralmente inócuos; o poejo pode causar hemorragia interna dos pulmões de cães levando à morte (Sudekum et al., 1992). Os efeitos tóxicos dos terpenoides cetonas são conhecidos. O metil iso-eugenol tem efeitos carcinogénicos em ratos. A pulegona e o mentofurano do óleo essencial do poejo tem efeitos hepatotóxicos (Gordon et al., 1982; Vigan, 2010). O limoneno é nefrotóxico e carcinogénico em ratos, fetotóxico e teratogénico em ratos e coelhos. No entanto, é difícil extrapolar estes efeitos para os humanos, uma vez que diferem de acordo com as espécies e o género (Vigan, 2010). Todos os dados dos estudos realizados suportam a conclusão de que os tumores renais produzidos pelo limoneno em ratos machos não são relevantes para os humanos (IARC, 1998).

A toxicidade em humanos tem sido observada em várias situações como, por exemplo, exposição por contacto, ingestão acidental, ensaios clínicos. A ingestão de limoneno pode causar diarreia e proteinúria transitória em voluntários saudáveis. Os compostos ativos, 1,8-ineole, fencon, pulegona, canfora, mentol e mentona são conhecidos por exercer efeitos tóxicos em humanos levando a convulsões, necrose hepática, demência, ataxia e alucinações (Vigan, 2010). O óleo de cravinho é

conhecido como irritante (Dijoux et al., 2006; Dweck, 2009) e o composto ativo metil eugenol é carcinogénico em roedores (Burkey et al., 2000).

A aplicação de óleos essenciais como fumigantes no controlo de agentes patogénicos após a colheita é uma vantagem pelo facto de os óleos, na fase líquida, poderem causar mais facilmente alterações organolépticas nos produtos armazenados. Além disso, a opção pela utilização de atmosferas saturadas limitará os riscos de toxicidade para a saúde humana (Anthony et al., 2003, Arrebola et al., 2010, Laird & Phillips, 2011).

2.3.4.1.1. Cravinho e eugenol

O cravinho, cujo nome científico é *Syzygium aromaticum*, é uma árvore de médio porte, 8 a 12 metros, da família *Myrtaceae*, nativa da Indonésia. Os botões florais, a parte comercializável desta especiaria, começam a ser colhidos a partir do quarto ano e antes da floração. Os maiores produtores são a Indonésia, Índia, Malásia, Sri Lanka, Madagascar e Tanzânia (Cortés-Rojas et al., 2014)

Esta planta representa uma das mais importantes fontes de compostos fenólicos, nomeadamente, flavonóides, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinamicos e propenos hidroxifenilos (Neveu et al., 2010).

O óleo de cravinho é utilizado na medicina tradicional como medicamento diurético, odontálgico, gástrico, cardíaco e ajudante carminativo e estimulante (Muruganadan et al., 2001). Pode-se extrair óleo de três partes da planta, cada um com diferente composição e sabor, da folha, do caule e do botão floral, que é o de maior qualidade e mais dispendioso. Este óleo tem propriedades antioxidantes e, deste modo, pode ser usado para minimizar a oxidação de alimentos e medicamentos, retardando a formação de produtos tóxicos oxidantes, mantendo a qualidade nutricional e química, prolongando a durabilidade destes (El-Mesallamy et al., 2012).

O consumo de óleo essencial de cravinho é considerado seguro para uma dose de 1500 mg por kg de comida ingerida. Adicionalmente, a Organização Mundial de Saúde estabeleceu o valor diário máximo aceitável de 2,5 mg/kg de massa corporal (Gülçin et al., 2012).

Testes de toxicidade em água parada usando juvenis de truta (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) baseados nos valores de LC₅₀ (96h), indicaram que o eugenol, principal composto ativo do óleo de

cravinho, é 1500 vezes menos tóxico que o inseticida piretrina, 15000 vezes menos tóxico que o pesticida organofosforado azinfosmetil (Strohl et al., 1998). Adicionalmente o eugenol não é persistente em ecossistemas de água doce, enquanto que, no solo, é completamente degradado em ácidos orgânicos por bactérias presentes, do género *Pseudomonas* (Rabenhorst, 1996).

As propriedades bactericidas do óleo de cravinho são comparáveis às dos desinfetantes aplicados em hospitais e foi provado que o eugenol consegue neutralizar bactérias resistentes a antibióticos como, por exemplo, *Listeria monocytogenes* (Murray, Webb & Swann.) Pirie, *Escherichia. coli* T. Escherich (Gill & Holley, 2006; Nostro et al., 2004).

A composição química do óleo essencial de cravinho varia consoante a região geográfica e o órgão da planta que é extraído. O composto em maior concentração no óleo essencial de cravinho, é o eugenol em valores superiores a 70,0%. Seguidamente aparecem o β -cariofileno (4,2% a 19,3%), o acetato de eugenol (0,4% a 18,9%) e o α -humuleno (0,8% a 2,2%) (El-Mesallamy et al., 2012; Bluma & Etcheverry, 2008; Manganyi et al., 2015; Srivastava et al., 2005). Como o cravinho é uma especiaria dispendiosa, o eugenol pode ser obtido comercialmente de outras fontes, nomeadamente, de *Ocimum gratissimum*, *Ocimum tenuiflorum*, *O. sanctum*, *Cassia fistula* e *Zieria smithii*. (Reddy et al., 2007). O óleo obtido da planta da canela (*Cinnamomum verum*) é, geralmente, rico em eugenol (86,0%) (Patel et al., 2007).

O eugenol é um composto fenólico anfipático cuja estrutura química se encontra na Figura 8 (Freires et al., 2015). Usa-se na medicina dentária como calmante neural depois da remoção de cáries; ao adicionar óxido de zinco, o eugenol forma um cimento usado pelos dentistas, também como estabilizantes e antioxidantes de plásticos e borrachas, na indústria (Lee & Shibamoto, 2001) e como ingrediente precursor da produção de vanilina (Srivastava et al., 2005). Este composto ativo principal está registado na Comissão Europeia para o uso como aromas em alimentos devido ao não efeito toxicológico em mamíferos e ao potencial conservativo (Hyldgaard, 2012; Tajkarimi, 2010).

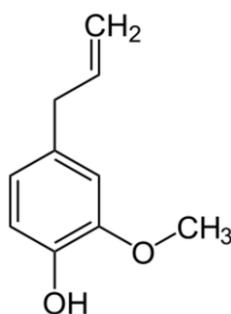


Figura 8. Estrutura química do eugenol (Freires et al., 2015).

O eugenol exibe tanto atividade antifúngica como antimicrobiana (Goñi et al., 2009). O eugenol consegue inibir tanto o crescimento como a produção de micotoxinas. Jayashree & Subranyam (1999), expuseram que o eugenol inibiu a produção de aflatoxina sem efeitos significativos no crescimento do organismo até uma concentração de 0,75mmol/L. Os mesmos autores expuseram que a ação antiaflatoxigénica do eugenol pode estar relacionada com a inibição das etapas ternárias da biossíntese da aflatoxina envolvendo peroxidação e oxigenação dos lípidos.

2.3.4.1.2. Poejo e pulegona

O género *Mentha* pertence à família *Labiatae*, que inclui 20 a 25 espécies dispersas pelo mundo (Erhan et al., 2012). Uma vez que várias plantas deste género são usadas na indústria alimentar e na aromaterapia, aumenta o interesse no seu uso como pesticida. Nas últimas décadas têm sido realizados vários estudos com o objectivo de estudar a sua eficácia, principalmente insecticida. O poejo (*Mentha pulegium*) é uma planta nativa da Europa, África e da Ásia temperada, que pode atingir caules de 40cm, de folhas escamosas e lanceoladas, com flores rosadas globosas, que se propaga facilmente por meio de rizomas (Kumar et al., 2011).

Dependendo do tipo de planta e dos factores bióticos e abióticos a que estão sujeitas, que vão influenciar as vias metabólicas, o género *Mentha* pode ser dividido em espécies produtoras de óleos essenciais ricos em mentol, ricos em carvona e ricos em pulegona/piperitona (Kumar et al., 2011).

A pulegona é um monoterpene orgânico predominante na composição dos óleos essenciais de *M. pulegium* e *M. microphylla*, usado como condimento, em perfumes e aromaterapia (Lawrence, 1998; Aziz & Abbass, 2010). A sua estrutura química é apresentada na Figura 9. Dependendo da variedade da planta, da localização e modo de produção, de acordo com El Asbahani et al. (2015), Aziz & Craker

(2010), Zabka et al. (2014) e Bouchra et al. (2003), o óleo essencial de poejo contém pulegona numa proporção superior a 70%, seguida de isómeros de mentona (2,9% a 5,75%), do mentadieno-3,8- α -tujona (5,3%), octeno-3-ol (2,4%), do isopulegol (1,8%), do limoneno (1,4%), e outros de concentrações menores. A pulegona também está presente em várias concentrações em óleos das folhas de *Agathosma betulina* e *Agathosma crenulata* com 3% e 50%, respectivamente (Kaiser et al., 1975).

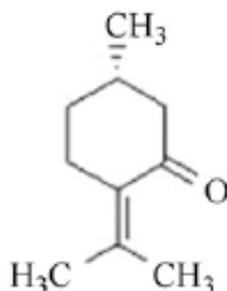


Figura 9. Estrutura química da pulegona (Kumar et al., 2011).

A adição da pulegona em alimentos tem sido regulada impondo limites à sua utilização. De acordo com “Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives” (Speijers, 2001), a dose estimada *per capita* de pulegona é 2 μg por dia e 0,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por dia na Europa e 12 μg por dia e 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por dia nos EUA). Segundo o regulamento (CE) Nº 1334/2008 e o “Committee of Experts on Flavoring Substances” (CEFS) estão impostos os limites de 250 mg/kg para confeitos que contenham hortelã ou hortelã-pimenta (género *Mentha*), de 2000 mg/kg para rebuçados para refrescar o hálito, de 350 mg/kg para pastilhas elásticas, de 20 mg/kg para bebidas não alcoólicas que contenham hortelã ou hortelã-pimenta e alimentos, de 100 mg/kg para bebidas alcoólicas que contenham hortelã ou hortelã-pimenta. Nos EUA a utilização de pulegona está proibida como substância sintética aromatizante (DHHS-FDA, 2012) e a sua concentração não deve exceder 1% em cosméticos (Nair, 2001).

O poejo e a pulegona têm sido utilizados em numerosos estudos contra pragas, nomeadamente causando 100% de mortalidade na praga de campo *Mayetiola destructor* (Lamiri et al., 2001); mostrando a maior eficácia como fumigante e como produto tóxico de contacto contra insetos vetores de doenças em comparação com outras mentas em vez de produto tóxico tópico; atuando como inibidor da actividade reprodutora de *Callosobruchus maculatus* (82 a 88%) (Aziz & Abass, 2010); mostrando 100% de actividade insecticida contra *Musca domestica*, *Blattella germanica*, *T. castaneum*, *S. oryzae* e *O. surinamensis*. Assim, a pulegona apresenta a maior eficácia contra insectos em comparação com a carvona e o linalol e o mentol. Os monoterpenos oxigenados (carvacrol, linalol e terpineol) têm maior actividade insecticida em relação aos não oxigenados (*p*-cimeno, cinnamaldeído,

anetol) e, dentro dos oxigenados, a atividade biológica é diferenciada pelos grupos químicos e saturações. A diferença na actividade destes monoterpenos pode ser atribuída a diferentes mecanismos de ação, capacidade de difusão e lipofilicidade (Kumar et al., 2011).

2.3.4.1.3. Limoneno

O limoneno como outros monoterpenos, ocorre naturalmente em certas plantas. Existe na casca dos citrinos, endro, cominho, erva-doce e aipo, e na terebentina obtida da resina de coníferas. Os monoterpenos são libertados em quantidades significativas para a atmosfera, sendo que as fontes de emissões dos processos naturais poderão exceder as dos processos industriais (Dimitriades, 1981; Altshuller, 1983; Lamb et al., 1987).

Este hidrocarboneto monocíclico cuja estrutura química se encontra na Figura 10, é utilizado como substituto de hidrocarbonetos, clorofluorcarbonetos e outros solventes como desengordurante em metais antes da pintura industrial, em limpeza na indústria electrónica e de impressão e como solvente de tintas. O limoneno é também utilizado como solvente nos laboratórios histológicos e como um aditivo de sabor e de aroma em alimentos, produtos de limpeza doméstica e perfumes. Para além disso, este composto tem sido utilizado como um solubilizante em caso de litíase biliar em seres humanos (Igimi et al., 1976, 1991).

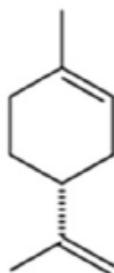


Figura 10. Estrutura química do limoneno (Kumar et al., 2011).

O limoneno, tal como o eugenol e a pulegona, é um líquido incolor com um característico aroma cítrico à temperatura ambiente (NICNAS, 2003).

A pressão de vapor nos isómeros de limoneno (*l*-limoneno e *d*-limoneno) não é elevada, contudo a taxa de evaporação no ambiente pode ser elevada devido à baixa solubilidade em água e a um valor

elevado da constante de Henry. Estes isómeros são designados como compostos orgânicos voláteis. Na presença da luz e ar a oxidação do limoneno ocorre dando origem a variados terpenos monocíclicos oxigenados. Os produtos da oxidação primária são hidroperóxidos, instáveis e rapidamente degradados em produtos secundários como a carvona, se sujeitos continuamente à luz e ao ar (Nilsson et al., 1999). Se o processo de oxidação continuar são criados polímeros e o líquido se tornará viscoso (Karlberg & Dooms-Goossens, 1997).

O composto ativo principal dos óleos essenciais de plantas do género *Citrus* é o limoneno extraído principalmente da casca de *Citrus sinensis* e *Citrus limon*. Mais especificamente, encontra-se em *Citrus reticulata*, de 60,7% a 80,3% (Tao et al., 2009; Tao et al, 2014; Sawamura et al., 2004), *Citrus sinensis*, 84,2% (Sharma & Tripathi, 2006, 2008) e em *Citrus limon*, 65,9% (Stević et al., 2014).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras de milho farináceo e de feijão manteiga provieram de uma exploração agrícola da região da Malveira em Setembro de 2014. Foram congeladas a 18°C negativos durante quinze dias e posteriormente refrigeradas a 6°C.

3.2. ÓLEOS ESSENCIAIS E COMPOSTOS ATIVOS PRINCIPAIS

Os óleos essenciais de poejo e cravinho foram adquiridos à empresa Quimind. Os compostos ativos principais pulegona e limoneno foram adquiridos à empresa Sigma-Aldrich e o eugenol à empresa Arcos. A composição química dos óleos essenciais de poejo e cravinho e as metodologias de quantificação e identificação estão referidos no anexo V.

3.3. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DOS COMPOSTOS ATIVOS PRINCIPAIS EM ATMOSFERA SATURADA

Estes ensaios foram realizados no âmbito do projeto “MICROPROTECT - Uso de óleos essenciais encapsulados para proteção de cereais e leguminosas armazenados (PTDC/AGR-ALI/119270/2010)” que já estava a decorrer.

Colocaram-se em caixas de Petri, com 90mm de diâmetro, 20mL de meio de Agar de Batata Dextrosada (PDA) suplementado com cloranfenicol (1%). Este meio foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Em seguida foram colocadas por caixa 10 sementes equitativamente separadas. Na parte superior de cada caixa colocou-se uma folha de papel de filtro esterilizado (Whatman nº1) impregnado com a substância a estudar. Estas caixas foram seladas com parafilm e colocadas numa estufa a 28°C, verificando, semanalmente o aparecimento e desenvolvimento de fungos. Fizeram-se dez repetições por caixa por substância a estudar num total de 100 grãos/feijões por ensaio.

Para os ensaios em branco, foi feita a esterilização dos grãos superficialmente durante cinco minutos com hipoclorito de sódio a 2% pelo método descrito por Pitt & Hocking (2009) e Magro (2009).

Nos Quadros 3 e 4 encontram-se o resumo de todos ensaios efectuados em atmosfera saturada com os óleos essenciais, os compostos ativos principais e as suas misturas.

Quadro 3. Óleos essenciais e compostos ativos principais e suas concentrações utilizados nos ensaios em grãos de milho e em feijão.

Produto	OE/CAP	Volume (mL)	Concentração (µL/mL)
Milho	limoneno	100 ; 250	1,0 ; 2,5
Feijão	cravinho	50 ; 100 ; 250	0,5 ; 1,0 ; 2,5
	poejo	50 ; 100 ; 250	0,5 ; 1,0 ; 2,5
	eugenol	50 ; 100 ; 250	0,5 ; 1,0 ; 2,5
	pulegona	50 ; 100 ; 250	0,5 ; 1,0 ; 2,5
	limoneno	100 ; 250	1,0 ; 2,5

Nota: OE-óleo essencial; CAP-composto ativo principal.

Quadro 4. Misturas de compostos ativos principais e concentrações utilizadas nos ensaios em grãos de milho e em feijão.

Produto	Mistura de CAP	Volume (mL)	Concentrações (µL/mL)
Milho	eugenol e pulegona	75 ; 75	0,75 : 0,75
		100 ; 50	1,0 : 0,5
		250 ; 250	2,5 : 2,5
Feijão		250 ; 250	2,5 : 2,5

Nota: CAP- composto ativo principal.

Após o término dos ensaios em atmosfera saturada, foram retirados os grãos das caixas de Petri apenas no caso de se ter verificado a ausência de contaminações nas 10 caixas e colocados novamente em caixas com 20mL de PDA sem a adição de nenhuma substância, na estufa a 28°C. Este procedimento serviu para verificar se a ação da inibição de crescimento de fungos foi fungicida ou apenas fungistática.

3.4. IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ASSOCIADOS À AMOSTRAS DE GRÃOS DE MILHO E EM FEIJÃO

Nos ensaios em branco foram isolados os fungos que apareceram nos grãos de milho e no feijão para novas caixas de Petri contendo na mesma 20mL de PDA, de modo a proceder-se ao seu isolamento e identificação ao nível de género e de espécie. Tendo-se para o efeito utilizado uma lupa binocular e um microscópio óptico. Sempre que necessário executaram-se repicagens sucessivas para obtenção de culturas puras.

As medições das estruturas de frutificação foram feitas através de uma lâmina rápida ou através da técnica da câmara de Riddell.

A técnica da câmara de Riddell consiste na inoculação do fungo em dois lados extremos de um quadrado fino de meio de agar ou PDA colocado numa lâmina esterilizada, com dimensões menores da lamela esterilizada que o cobre. A lâmina coloca-se numa caixa de Petri com água destilada esterilizada sobre uma vareta com forma em vê. A caixa permanece numa estufa a 28°C até se verificar um crescimento suficiente para a observação microscópica. Para isso, retira-se a lamela com a ajuda de uma pinça e agulha esterilizadas e coloca-se numa nova lâmina com lactofenol ou azul de algodão, dependendo se o fungo a observar é hialino ou não. Esta técnica é importante para medição do conidióforo e de outras estruturas em que, no uso da técnica da lâmina rápida, se encontram demasiado danificadas devido à ação mecânica invasiva da ansa ou agulha na sua colheita ou com uma elevada densidade de conídios na colónia.

A identificação ao nível da espécie foi possibilitada através da observação do tipo de estrutura, da medição do comprimento e largura de trinta estruturas de reprodução diferentes, nomeadamente para as espécies do género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Fusarium*. Para a identificação apenas ao nível do género, como o caso dos géneros *Cladosporium*, *Stemphylium*, *Ulocladium*, *Acremonium*, *Papularia*, *Monilia* e *Rhizopus*, observaram-se as formas das suas estruturas de reprodução no microscópio óptico.

A medição dos fungos e a caracterização macroscópica das colónias foram feitas após sete dias de crescimento numa estufa a 28°C, numa caixa de Petri com 20 mL de meio de malte agar (MEA) com inóculo inicial de 5mm de diâmetro. A caracterização macroscópica incluiu a identificação da cor recorrendo ao Manual de Rayner (1970), a textura da colónia, o tipo de margem da colónia, a existência de sulcos e de exsudados.

Para a identificação dos fungos isolados recorreu-se aos manuais de identificação e respectivas chaves dicotómicas, que incluem características culturais, estruturas reprodutoras e morfológicas, de Booth (1971), Ellis (1971), Barnett & Hunter (1972), Raper & Fennel (1977), Pitt & Hocking (1997), Klich (2002) e Samson et al. (2004).

No caso dos fungos que não produziram estruturas de reprodução, foi induzida a esporulação através da introdução de inóculo numa folha de gramínea em caixa de Petri com 20mL de agar e colocado numa estufa a 28°C. Especificamente para os fungos do género *Fusarium* foram utilizadas folhas de craveiro.

3.5. ANÁLISE DE RESULTADOS

Para analisar e comparar os resultados obtidos do número de espécies identificadas nos ensaios em branco e dos ensaios com os óleos essenciais calcularam-se as frequências absolutas (ni) e relativas (fi) dos diferentes *taxa* isolados. A frequência absoluta representa o número de vezes que esse indivíduo é isolado e a frequência relativa corresponde ao quociente entre a frequência absoluta e o número total de indivíduos isolados das diferentes *taxa* multiplicando por cem.

Para o cálculo da percentagem de grãos contaminados ao longo do tempo, subtraiu-se os grãos contaminados por bactérias ao total de grãos disponíveis.

Em relação à frequência relativa e, segundo Tan et al. (1981) e Poonyth et al. (2001), as espécies de fungos podem ser classificadas como “muito frequentes” acima de 20%, “frequentes” entre 10 a 20% e “pouco frequentes” se for inferior a 10%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A evolução da percentagem de grãos e feijões contaminados ao longo do tempo está apresentada nas Figuras 11 a 14. As observações do número de contaminações iniciaram-se após uma semana do começo do ensaio e a duração do ensaio encontra-se descrita nos quadros 5 e 6. O número limitado de observações nos ensaios do milho 0,75µL/mL:0,75µL/mL de eugenol e pulegona, no feijão nas concentrações 0,5 µL/mL de pulegona, poejo, eugenol e cravinho e em todos os ensaios do limoneno deve-se aos elevados valores de contaminação em pouco tempo, o que torna as concentrações em questão desinteressantes na ótica do armazenamento destes produtos por várias semanas.

Quadro 5. Número de observações para os ensaios do milho.

Produto	OE/CAP	Mistura de CAP	Concentração (µL/mL)	Número de observações (semanas)
Milho		limoneno	1,0	1
			2,0	1
		eugenol:pulegona	0,75 : 0,75	7
			1,0 : 0,5	23
			2,5 : 2,5	23

Quadro 6. Número de observações para os ensaios do feijão.

OE/CAP	Mistura de CAP	Concentração (µL/mL)	Número de observações (semanas)
cravinho ; poejo ; eugenol ; pulegona		0,5	6
		1,0	24
		2,5	24
limoneno		1,0	1
		2,5	1
		eugenol:pulegona	2,5 : 2,5

Para a determinação das percentagens de contaminação foram subtraídos ao total de grãos disponíveis, os contaminados com bactérias, uma vez que aquando da colonização por bactérias, existirá menor possibilidade dos fungos identificados neste trabalho crescerem nesse grão. No armazenamento interessa a menor contaminação possível e, assim, quanto menor a percentagem de contaminação, melhor serão os resultados.

Através da observação da composição do óleo de cravinho utilizado e apresentado no Quadro V1 do anexo 5, constata-se que os três compostos ativos de maior concentração são eugenol (78,1%), β-

cariofileno (13,4%) e acetato de eugenol (5,2%) e estão de acordo com os resultados obtidos por El-Mesallamy et al. (2012); Bluma & Etcheverry (2008); Manganyi et al. (2015); Srivastava et al. (2005). No Quadro V2 do mesmo anexo está descrita a composição química do óleo de poejo, com os três compostos ativos de maior concentração a serem 86,0% de pulegona, 2,5% de *cis*-isopulegona e 2,2% de piperitenona. De acordo com El Asbahani et al. (2015), Aziz & Craker (2001) em, Aziz & Abbas (2010), Zabka et al. (2014) e Bouchra et al. (2003), a pulegona é o composto ativo maioritário do óleo essencial de poejo. Comparando o óleo essencial de cravinho e o óleo essencial de poejo verificou-se que este último apresenta na sua constituição uma maior variação dos compostos presentes, como se pode constatar nos ensaios executados por Bouchra et al. (2003) em que foi utilizada uma amostra proveniente de Marrocos em que o segundo composto maioritário era mentadieno-3,8- α -tujona, composto esse ausente de todas as outras amostras de óleo essencial de poejo.

Nas Figuras 11, 12, 13 e 14 estão representadas as percentagens de grãos de milho e de feijões contaminados com fungos, ao longo das semanas, para os óleos essenciais e compostos ativos testados.

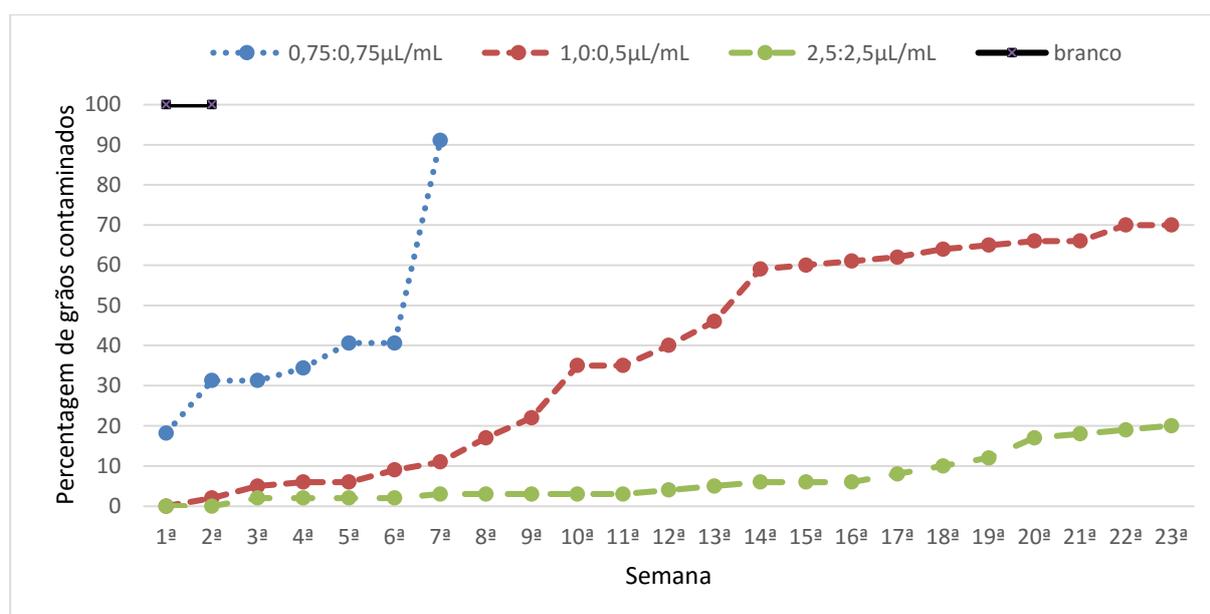


Figura 11. Evolução da percentagem de grãos de milho contaminados nos ensaios com misturas de 0,75 μ L/mL:0,75 μ L/mL, 1,0 μ L/mL:0,5 μ L/mL e 2,5 μ L/mL:2,5 μ L/mL de eugenol e pulegona, ao longo de 23 semanas.

Pela observação dos ensaios feitos com misturas de eugenol e pulegona em grãos de milho (Figura 11), constata-se que, quanto maior a concentração de eugenol melhor os resultados, independentemente da concentração de pulegona, uma vez que comparando os resultados das concentrações 0,75µL/mL:0,75µL/mL e 1,0µL/mL:0,5µL/mL há menor contaminação para a mesmo período de observação. Mais propriamente, no primeiro caso a contaminação dos grãos ultrapassa os 90% em apenas sete semanas enquanto que no segundo a percentagem de contaminações chega aos 70% em 23 semanas. No mesmo período e na concentração mais elevada, ainda houve cerca de 20% de grãos contaminados.

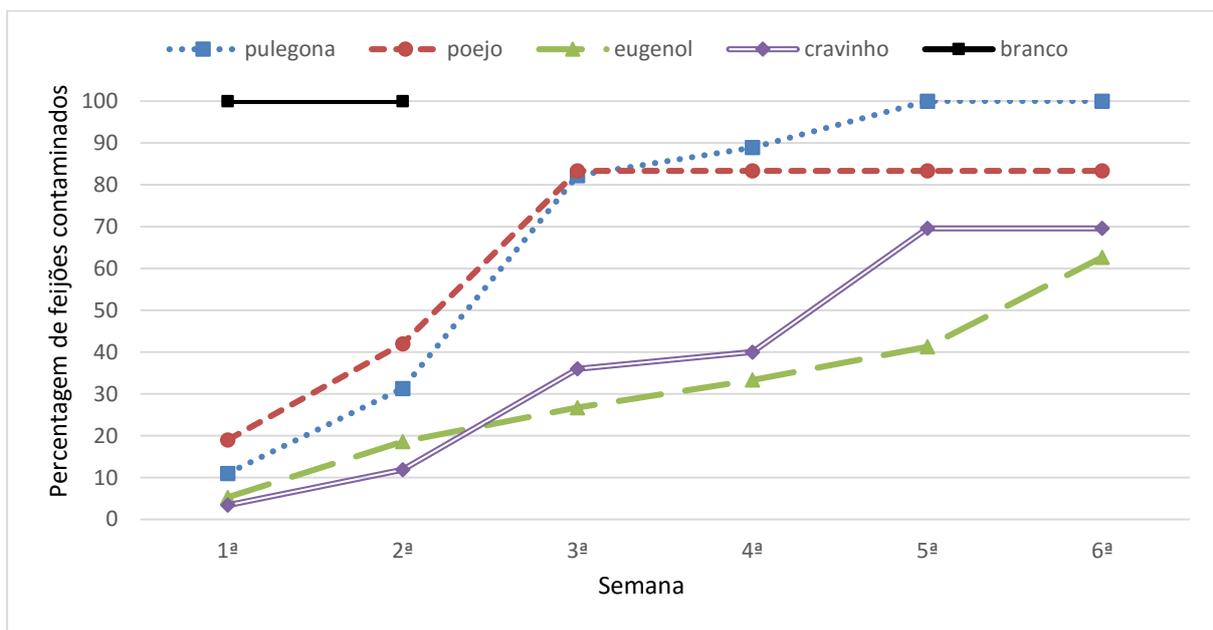


Figura 12. Evolução da percentagem de feijão contaminado no ensaio com 0,5µL/mL de pulegona, poejo, eugenol e cravinho ao longo de 6 semanas de observação.

Na Figura 12 estão representados os resultados respeitantes ao ensaio em feijão com a concentração de 0,5µL/mL de pulegona, poejo, cravinho e eugenol, em que, ao longo de apenas seis semanas se chegou a níveis de contaminação, respectivamente, de 100%, 83%, 70% e 63%. Nesta concentração não é possível armazenar feijão por 24 semanas.

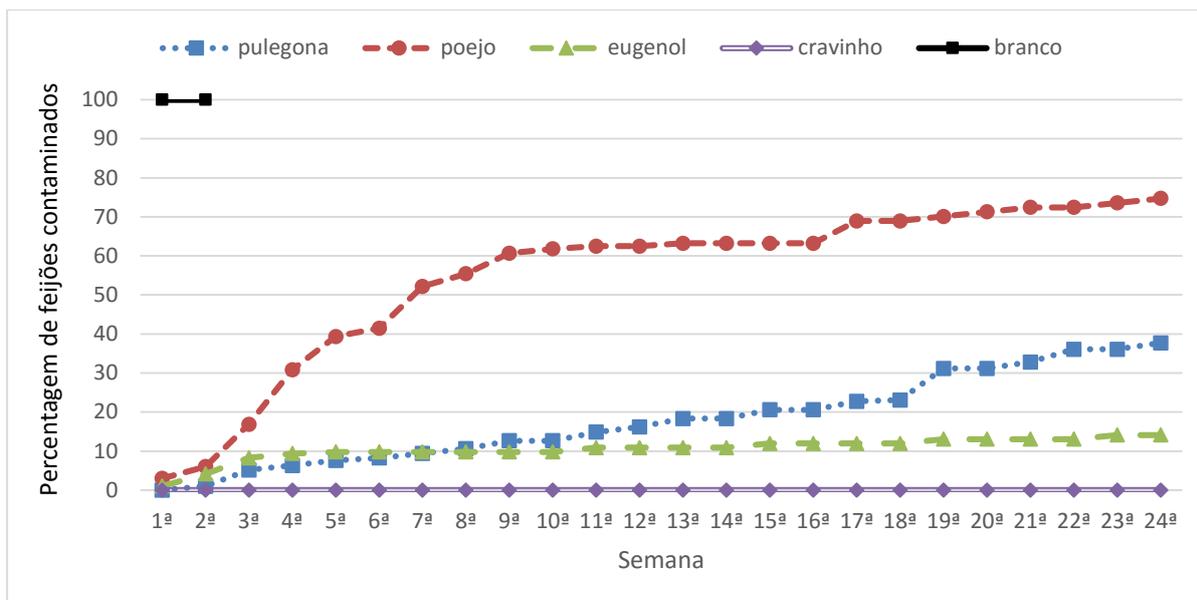


Figura 13. Evolução da porcentagem de feijão contaminado no ensaio com 1,0 μ L/mL de pulegona, poejo, eugenol e cravinho ao longo de 24 semanas de observação.

A concentração de 1,0 μ L/mL (Figura 13) possibilitou melhores resultados que na anterior (Figura 12) em 24 semanas de contagens. No ensaio com o óleo essencial de poejo foi onde se registaram piores resultados apresentando contaminações de 75% em comparação com 38% de pulegona, 14% de eugenol e 0% de cravinho. Assim e, tendo em conta a menor eficácia do óleo essencial de poejo e o seu composto ativo principal, a pulegona, pode existir um ou mais antagonismos entre os compostos ativos deste óleo essencial.

No caso do óleo essencial de cravinho verifica-se que este é mais eficaz que o eugenol. Este resultado poderá resultar de sinergismos entre um ou mais compostos que estão presentes no óleo essencial.

Neste ensaio observaram-se diversas contaminações com bactérias resistentes ao cloranfenicol, principalmente nas caixas saturadas com óleo de cravinho, não tendo sido identificadas por não ser um objetivo deste trabalho.

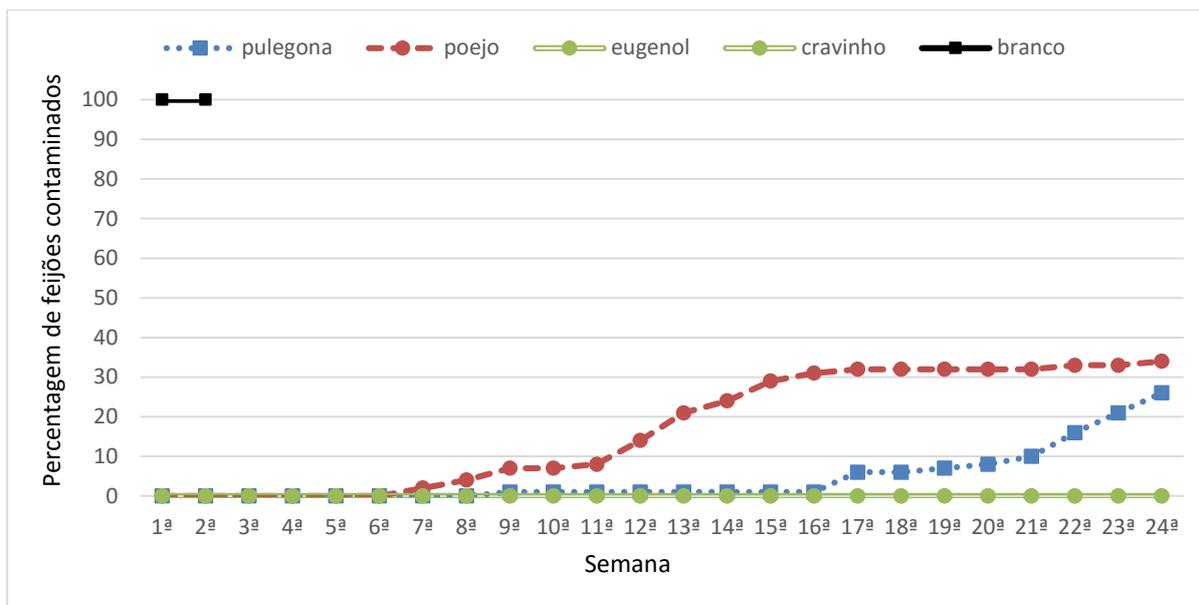


Figura 14. Evolução da porcentagem de feijão contaminado no ensaio com 2,5µL/mL de pulegona, poejo, eugenol e cravinho ao longo de 24 semanas de observação.

A Figura 14 representa a evolução da porcentagem de contaminação de feijão, ao longo das semanas, com os mesmos óleos essenciais e compostos ativos principais, mas a uma concentração de 2,5µL/mL. Tal como na Figura 13, o óleo essencial de poejo foi aquele que apresentou piores resultados uma vez que à 16ª semana verificou-se que 31% dos feijões estavam contaminados, quando comparado com o ensaio com a pulegona verificou-se que apenas 1% dos feijões estavam contaminados. No entanto no final do período de observação a diferença entre os valores obtidos no caso do óleo essencial de poejo e no caso da pulegona era de apenas 8% sendo a percentagem de contaminados de 34% e 26%, respectivamente. Neste caso a pulegona começou a perder eficácia após a 16ª semana.

Para a concentração 2,5µL/mL, o óleo essencial de cravinho e o eugenol inibiram completamente o crescimento de fungos. Para se verificar a ação fungicida ou fungistática destas substâncias, os feijões provenientes destes ensaios foram colocados em meio de PDA sem óleo essencial de cravinho ou eugenol, tendo-se verificado que, nesta concentração, estas substâncias apresentaram ação fungicida.

Neste trabalho o óleo essencial de cravinho foi o mais eficaz como antifúngico seguido do eugenol, da pulegona e do óleo essencial de poejo. Isto significa que para além dos 78,1% de eugenol, um ou mais compostos ativos em menor proporção no óleo essencial, podem ter influenciado positivamente a sua eficácia (efeito sinérgico ou aditivo). Marín et al. (2004) observaram que os óleos essenciais de canela e de cravinho, tendo o eugenol como o componente principal, respectivamente 82,3% e 88,2%, apresentaram efeitos diferentes na inibição da produção de zearalenona por parte de *Fusarium graminearum*; o óleo essencial de cravinho inibiu a produção enquanto que o óleo essencial de canela

não teve efeito significativo. Pelo contrário, Combrinck et al. (2011) observaram que o eugenol apresentou uma inibição de crescimento mais elevada quando comparado com óleo essencial de cravinho, de fungos patogênicos de fruta (*Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria citrii*, *Botrytis cinerea* e *Penicillium digitatum*). Estes resultados mostram a possível importância e o efeito dos compostos ativos em menor percentagem nos óleos essenciais que podem justificar estes resultados.

Para espécies de *Aspergillus* da secção *flavi* o óleo essencial de cravinho teve um efeito inibitório de crescimento e produção de aflatoxina B1 menor que os óleos essenciais de *Peumus boldus*, de *Hedeoma multiflora* e de *Lippia integrifolia* mas maior do que o de *Pimpinella anisum* (Bluma & Etcheverry, 2008). Montes-Belmont e Carvajal (1998) avaliaram as propriedades fungicidas de *Cinnamomum zeylanicum*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Dysphania ambrosioides*, *Syzygium aromaticum*, e *Thymus vulgaris*. Estes óleos essenciais inibiram crescimento de *Aspergillus flavus* nos grãos a concentrações entre 3% a 8%.

Manganyi et al. (2015) reportaram a igual eficácia da concentração de 0,5 µL/mL dos óleos essenciais de tomilho e cravinho e dos compostos ativos timol, eugenol e citral na inibição de crescimento de *Fusarium oxysporum* durante nove dias. Neste trabalho apenas foi identificado *F. oxysporum* numa amostra de 1,0 µL/mL de pulegona (Quadro 9). El-Mesallamy et al. (2012) verificaram que o óleo essencial de cravinho teve eficácia inibitória crescente para *Trichoderma* sp, *A. niger*, *F. oxysporum* e *Penicillium* sp. Estes resultados não estão de acordo com o verificado para os ensaios de grãos de milho que mostraram a maior sensibilidade de *A. niger* em várias misturas de eugenol e pulegona (Quadro 8). O óleo essencial de cravinho mostrou atividade antifúngica contra várias espécies do género *Colletotrichum*, embora aquém dos resultados proporcionados pelo gengibre amarelo (*Curcuma longa*) e pela noz moscada (*Myristica fragrans*) (Radwan et al, 2014).

O eugenol inibiu totalmente o crescimento e a produção de aflatoxina B1 por *A. flavus* em grãos de sorgo e, adicionalmente, provocou a inibição da germinação das sementes (Komala et al., 2012). Similarmente, resultados positivos na inibição do crescimento e produção de micotoxinas por *A. flavus* em vários valores de a_w , foi reportado por Passone et al. (2012). Abd-ElSalam & Khokhlov (2015) verificaram que o eugenol inibiu não só o crescimento radial de *F. oxysporum*, mas também a esporulação e a pigmentação, causando distorções, tumefacções e bifurcações anómalas no micélio.

Morcia et al. (2012) testaram a eficácia de cinco moléculas, o timol, o eugenol, a carvona, o terpineno-4-ol e o 1,8-cineol, tendo verificado que estas evidenciaram diferentes níveis de eficácia, de acordo

com uma escala decrescente: timol, eugenol, carvona, terpineno-4-ol e 1,8-cineol. Também Kurita e Koike (1983) observaram que a atividade antifúngica dos óleos essenciais dependem dos seus compostos ativos principais e seguem a regra por ordem decrescente de eficiência: fenol, álcool, aldeído, cetona, éter e hidrocarboneto.

Para além de *S. aromaticum* outras plantas podem ter na sua composição química uma proporção em eugenol que lhes confere atividade inibidora no crescimento fúngico e na produção de micotoxinas. Fandohan et al. (2004) observaram que o óleo essencial de *Ocimum basilicum* do Benin, com 22% de eugenol inibiu a produção de fumonisina pelo fungo *F. verticillioides*, enquanto que Dambolena et al. (2010) concluíram que o óleo essencial da mesma planta do Quênia, sem eugenol, não teve qualquer efeito na produção desta toxina pelo mesmo fungo. Dos mesmo autores o óleo essencial proveniente das folhas de *Ocimum gratissimum*, colhidas em dois locais no Quênia (70.1% e 95.5% de eugenol), tiveram uma elevada actividade inibitória na produção de fumonisina, o que pode ser explicado pelo seu conteúdo em eugenol (Dambolena et al., 2010).

O eugenol atua na membrana celular por um mecanismo que envolve a inibição da biossíntese de ergosterol (de Oliveira et al., 2013). Como é um composto lipofílico, consegue entrar entre as cadeias de ácidos gordos que compõem a dupla camada da membrana celular, alterando, assim, a permeabilidade e fluidez das membranas celulares (Gill & Holley, 2006; Braga et al., 2007).

Apesar de ser um bom inseticida o óleo essencial de poejo e a pulegona têm efeitos medianos no combate a fungos de armazenamento, quando comparado com os resultados obtidos com o óleo essencial de cravinho e o eugenol deste trabalho. Estes resultados estão de acordo com Magro (2009), que verificou que é necessária uma concentração de 5,0µL/mL de óleo essencial de poejo para inibir durante, pelo menos, 25 semanas *A. candidus* e *A. niger* ao contrário da concentração mínima de 1,0µL/mL de eugenol e de óleo essencial de cravinho. El Asbahani et al. (2015) também observaram a baixa eficácia do óleo essencial de *M. pulegium*, na inibição de crescimento de *A. niger* e *P. funiculosum* em comparação com o óleo essencial de tomilho (*Thymus leptobotrys*), mais eficaz, e ao óleo essencial de pelargónio (*Pelargonium graveolens*), segundo mais eficaz. A ação moderada na inibição de fungos do género *Fusarium* foi observada por Daferera et al. (2003); para uma redução de 50% do crescimento de *Fusarium* sp. foram necessários 400 µg/mL de concentração de óleo essencial de poejo, comparando com 50 µg/mL de orégão, 71 µg/mL de tomilho, 668 µg/mL de alecrim e 1000 µg/mL de salvia. Zabka et al. (2014), estudaram os efeitos inibidores de 1 µg/mL de vários óleos essenciais em fungos patogénicos vulgarmente presentes no interior de edifícios húmidos e com mau arejamento, nomeadamente, *Alternaria alternata*, *Stachybotrys chartarum*, *Cladosporium cladosporioides* e *A.*

niger. O óleo essencial de poejo inibiu, respectivamente pela respectiva ordem referida dos fungos citados, 88,6%, 96,0%, 91,8% e 44,4%, contrastando com o poder inibitório de 100% de óleos essenciais de plantas mais eficazes como *Origanum vulgari*, *Thymus vulgaris* e *T. satureioides* Coss. & Ball. e *Pimenta racemosa* (Mill.) J.W.Moore.

O limoneno apresentou uma baixa atividade fungicida em fungos de armazenamento, tanto em feijão como no milho, nas concentrações testadas. Dado que após uma semana depois da realização do ensaio os grãos de milho e os feijões estarem totalmente contaminados, fez-se apenas uma observação e que nos leva a concluir que esta substância às concentrações 1,0 µL/mL e 2,5 µL/mL, não tem qualquer efeito fungicida quando existem condições ideais para o desenvolvimento de fungos. De acordo com Marei et al. (2012), num ensaio de eficácia de monoterpenos contra fungos patogênicos de plantas, mais especificamente *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum* e *A. niger* o limoneno a par do 1,8-cineol revelaram eficácia contra *R. solani*, *P. digitatum* e *A. niger* e eficácia moderada na inibição de *F. oxysporum*, comparativamente à substância mais eficiente que foi o timol. Contrariamente, a (R)-carvona e o (R)-cânfora exibiram pior eficácia antifúngica.

Neste ensaio foi também estudado o efeito do limoneno nas enzimas celulasas e da pectinametilesterase. A inibição da celulase por parte dos compostos ativos reduz os patogenicidade dos fungos, uma vez que esta enzima é usada por estes para degradar as paredes celulares dos hospedeiros. A enzima pectinametilesterase modifica o grau da metilesterificação das pectinas que são o componente principal das paredes celulares dos fungos e, alterações das estruturas da pectina, são associadas a mudanças na adesão celular, plasticidade, pH e constituintes iônicos. O limoneno inibiu mais eficazmente a atividade das celulasas de *A. niger* e *P. digitatum* e da pectinametilesterase de *R. solani* e *P. digitatum*.

Segundo Tao et al. (2014), a concentração mínima inibitória do óleo essencial de *Citrus reticulata* com, entre outros compostos ativos, 60,7% de d-limoneno, 10,0% de γ -terpineno e 7,4% de β -mirceno foi de 2,5 µL.mL⁻¹ e 40,0 µL.mL⁻¹ para *P. italicum* e *P. digitatum*, respetivamente, enquanto que, dos mesmos autores, o limoneno exibiu uma atividade moderada contra *P. digitatum* e estimulou o crescimento micelial de *P. italicum*. As concentrações para as quais houve uma inibição do crescimento destes fungos provocaram alterações na morfologia das hifas, nomeadamente, ramificação irregular, perda de linearidade, e a formação de superfícies rugosas. Ao nível das células verificou-se um aumento da condutividade e diminuição do conteúdo em lípidos. Adicionalmente, em relação apenas a *P. italicum*, o óleo essencial de *C. reticulata* provocou a rutura de células, a formação de uma camada de exsudados que cobriu partes do micélio e, para *P. digitatum*, o aparecimento de pequenas vesículas

à superfície das hifas, o que pode inferir na redução da estrutura e estabilidade da membrana celular. Noutro ensaio, o óleo essencial de *C. sinensis* com as concentrações dos compostos ativos de maior proporção, 84,2% de limoneno, 4,4% de linalol e 4,1% de mirceno, inibiu integralmente o crescimento de *A. niger* a 3,0 µg/mL e a germinação de esporos a 1,5 µg/mL. Das observações microscópicas, os autores identificaram diversas mudanças morfológicas, como por exemplo, alterações na pigmentação, falhas na esporulação e desenvolvimento aberrante dos conidióforos, aparecimento de zonas tumefactas, bifurcações anómalas nas hifas e espaçamento claro entre a parede celular e o citoplasma. Estas observações indicam que o óleo essencial, através de processos enzimáticos, perturba a estrutura e a síntese da parede celular (Sharma & Tripathi, 2008). Dos mesmo autores (Sharma & Tripathi, 2006), verificou-se que 300 a 500 ppm do mesmo óleo essencial, inibem a germinação de esporos de vários fungos de armazenamento de frutos, como *A. alternata*, *P. expansum*, *A. mali*, *C. cladosporioides*, entre outros. Por outro lado, o limoneno e o óleo essencial de *C. sinensis* apresentaram baixa eficácia na inibição de *L. theobromae*, *C. gloeosporioides*, *A. citrii* e *P. digitatum*, no entanto o limoneno apresentou boa eficácia em relação ao fungo *B. cinerea*, contrastando com a elevada eficácia dos óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Thymus vulgaris* e dos compostos ativos timol e eugenol (Combrinck et al., 2011).

Seguidamente apresenta-se, no Quadro 7, a lista de fungos identificados nos ensaios em branco e nos ensaios sobre a influência dos óleos essenciais e compostos ativos principais estudados em grãos de milho e em feijão.

Quadro 7. Lista de fungos identificados nas diversas amostras de milho e de feijão.

Taxa	Milho		Feijão	
	Branco	Óleos essenciais	Branco	Óleos essenciais
<i>Acremonium</i> sp.*	-	X	-	-
<i>Alternaria alternata</i> *	-	-	X	-
<i>Alternaria infectoria</i> *	-	-	X	X
<i>Aspergillus</i> sp.(1)**	-	X	-	-
<i>Aspergillus flavus</i> **	X	X	-	X
<i>Aspergillus niger</i> **	X	-	-	-
<i>Aspergillus niveus</i> **	-	X	-	-
<i>Aspergillus melleus</i> **	-	X	-	-
<i>Aspergillus parvulus</i> **	X	-	-	-
<i>Aspergillus sydowii</i> **	-	-	-	X
<i>Aspergillus terreus</i> **	-	X	-	-
<i>Aspergillus ustus</i> **	-	-	X	-
<i>Cladosporium</i> sp.*	-	-	X	X
<i>Eurotium chevalieri</i> **	-	-	X	-
<i>Fusarium culmorum</i> **	-	-	X	-
<i>Fusarium oxysporum</i> **	-	-	-	X
<i>Monilia</i> sp*	-	-	-	X
<i>Papularia</i> sp.*	-	-	-	X
<i>Penicillium</i> sp.(1)**	-	-	X	-
<i>Penicillium</i> sp.(2)**	-	-	X	-
<i>Penicillium</i> sp.(3)**	-	-	X	-
<i>Penicillium</i> sp.(4)**	-	X	-	-
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> **	-	-	-	X
<i>Penicillium chrysogenum</i> **	-	-	-	X
<i>Penicillium citrinum</i> **	-	-	X	X
<i>Penicillium corylophilum</i> **	-	-	X	X
<i>Penicillium glabrum</i> **	-	-	X	-
<i>Penicillium purpurogenum</i> **	-	-	X	X
<i>Penicillium verrucosum</i> **	-	-	X	-
<i>Rhizopus</i> sp.*	X	-	X	-
<i>Stemphylium</i> sp.*	-	-	X	-
<i>Ulocladium</i> sp.*	-	-	X	-

Nota: (*) - fungos de campo e (**) - fungos de armazenamento

Através da análise do Quadro 7 podemos observar o reduzido número de espécies encontradas nos ensaios em branco do milho, o que pode ser explicado pela contaminação quase limitada a um *taxum*, neste caso, *A. niger*. Este facto é corroborado pelo quadro do cálculo das frequências absolutas e relativas (Quadro 8).

A impossibilidade de discriminação das espécies de fungos dos ensaios em branco do feijão, três do género *Penicillium*, deveu-se à perda destas devido a uma contaminação das estufas por ácaros micetófagos. No caso dos ensaios dos óleos essenciais, no género *Aspergillus* e *Penicillium* no milho, a

alteração morfológica dos fungos devido à ação do eugenol e da pulegona impediu a sua identificação ao nível da espécie.

Quadro 8. Frequências absolutas e relativas dos fungos isolados a partir das amostras de milho.

Taxa	branco		eugenol e pulegona 0,75µL/mL:0,75µL/mL		eugenol e pulegona 1,0 µL/mL:0,5µL/mL		eugenol e pulegona 2,5µL/mL:2,5µL/mL	
	ni	fi	ni	fi	ni	fi	ni	fi
<i>Acremonium</i> sp.	-	-	17	19,5	2	2,5	-	-
<i>Aspergillus</i> sp.(1)	-	-	19	21,8	9	11,3	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	2	0,6	40	46,0	44	55,0	17	65,4
<i>Aspergillus niger</i>	180	58,3	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niveus</i>	-	-	-	-	-	-	2	7,7
<i>Aspergillus parvulus</i>	1	0,3	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-	-	25	31,3	7	26,9
<i>Penicillium</i> sp.(4)	-	-	11	12,6	-	-	-	-
<i>Rhizopus</i> sp.	126	40,8	-	-	-	-	-	-
Total de indivíduos	309		87		80		26	

Nota: ni – frequência absoluta e fi – frequência relativa (ni/total*100); (-)fungo não isolado na amostra.

Para avaliar a proporção de contaminação nos grãos, dos fungos identificados nas diferentes amostras, foram calculadas as frequências absolutas e relativas destes (Quadro 8). Para os grãos de milho e no ensaio em branco, *A. niger* e *Rhizopus* sp. foram muito frequentes enquanto que *A. flavus* e *A. parvulus* apareceram pouco frequentes. No ensaio de eugenol e pulegona a 0,75µL/mL:0,75µL/mL os fungos muito frequentes foram *Aspergillus* sp.(1) e *A. flavus*, *Acremonium* sp. e como frequente *Penicillium* sp.(4). No ensaio eugenol e pulegona a 1,0µL/mL:0,5µL/mL, as espécies muito frequentes foram *A. flavus* e *A. terreus*, enquanto que *Aspergillus* sp.(1) foi frequente e *Acremonium* sp. pouco frequente. Às concentrações de 2,5µL/mL:2,5µL/mL de eugenol e pulegona, *A. flavus* e *A. terreus* apareceram muito frequente nos grãos contaminados enquanto que *Aspergillus niveus* apareceu como pouco frequente. Destes resultados observa-se que as amostras de milho vinham inicialmente muito contaminadas com *A. niger*, o que limita a comparação entre ensaios em branco e ensaios com os óleos essenciais, mas que nos leva a concluir que este fungo é predominante na micoflora encontrada, quando as condições de desenvolvimento são ótimas.

A resistência a altas temperaturas ou a altas exposições solares faz com que indivíduos da espécie *A. niger* ou da secção *Nigri* sejam comuns no solo, contaminem culturas em amadurecimento que serão posteriormente armazenadas na zona mediterrânica, subtropical e tropical (Soares et al., 2013). Dos mesmos autores, foi observada uma elevada incidência de contaminação de grãos de milho por *A. niger* no Ribatejo e Alentejo. Sendo também, segundo Pitt & Hocking (1997), um dos contaminantes

de alimentos mais vulgarmente isolado, justifica a elevada frequência encontrada nas amostras estudadas.

Ao longo das crescentes concentrações de eugenol e das concentrações de pulegona associadas a esse ensaio composto (com misturas dos dois), observa-se que *A. niger* é muito sensível à ação do eugenol e da pulegona. Houve a substituição da sua presença, principalmente e crescentemente por *A. flavus*, pelo fungo de campo *Acremonium* sp., cuja frequência diminui com o aumento da concentração de eugenol, e *A. terreus*, cujo aparecimento ocorreu no ensaio 1,0µL/mL:0,5µL/ml e 2,5µL/mL:2,5µL/ml com uma frequência relativa semelhante, devido à inibição de crescimento, nestas concentrações, dos fungos de desenvolvimento mais rápido (*Acremonium* sp. e *Aspergillus* spp.).

Nas amostras estudadas, uma nota para a presença de apenas fungos do género *Aspergillus* na concentração mais elevada, o que prova a maior resistência deste género a condições adversas, estando de acordo com o verificado por Magro (2009).

De acordo com Kpodo et al. (2000) e Gonzáles et al. (2003), o grão de milho é um bom substrato para a infeção fúngica e potencial produção de micotoxinas perigosas para a saúde de humanos e animais. Os fungos mais comuns encontrados durante a fase de produção são *A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *Penicillium* spp. e *Stenocarpella maydis*. Em milho armazenado no Estado do Iowa os fungos isolados de maior importância encontrados foram do género *Eurotium* (principalmente *E. amstelodami* e *E. chevalieri*), *Aspergillus restrictus* e duas espécies do género *Penicillium*, *P. aurantiogriseum* e *P. viridicatum* (Barron & Lichtwardt, 1959). De amostras de milho da Tailândia, similarmente e não só o género *Eurotium* foi muito frequente, mas também os fungos *Wallemia sebi*, *A. flavus*, *A. wentii*, *A. tamarii* e *A. niger* foram identificados. Resultados semelhantes foram obtidos de amostras de milho da Indonésia e Filipinas (Pitt et al., 1993).

Especificamente para as espécies do género *Penicillium* que contaminam os grãos de milho, Mislivec & Tuite (1970a,b) observaram que apesar de ser comum no campo, *P. funiculosum* raramente foi isolado no armazém, ao contrário de *P. aurantiogriseum* e *P. viridicatum*; *P. citrinum* e *P. oxalicum* que estiveram sempre presentes. Na Tailândia, Indonésia e Filipinas, *P. citrinum* foi o fungo mais frequente isolado de milho, seguido por *P. funiculosum*, *P. pinophilum*, *P. oxalicum* e *P. raistrickii* (Pitt & Hocking, 1997). Dawood & Elshamry (2015), ao estudarem o milho proveniente da Arábia Saudita, 10% do total de contaminantes da micoflora interna e 8,3% da micoflora externa dos grãos pertenciam a espécies do género *Penicillium*. Em Espanha, 16,8% das amostras de farinha de milho testadas foram contaminadas com fungos do género *Penicillium* (Albroch et al., 2012). Nesta dissertação, apenas foi

identificado uma espécie de *Penicillium* 12,6% (frequente) no ensaio eugenol e pulegona 0,75µL/mL:0,75µL/mL o que dificulta a comparação dos resultados com a bibliografia.

Na fase de crescimento e amadurecimento da cultura do milho, os fungos do género *Fusarium* são os maiores patogénios responsáveis pela deterioração da espiga, sendo os mais comuns *F. graminearum*, *F. verticillioides* e *F. subglutinans*. Os fungos adquiridos do campo, nomeadamente *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* e *A. flavus*, podem persistir no milho armazenado e o micélio, conídios e metabolitos secundários aparecerem em produtos como farinhas, snacks, tortilhas e cereais de pequeno almoço (Bullerman & Tsai, 1994; Zohri et al., 1995).

De amostras de milho do Paquistão recolhidas de mercados tradicionais e identificadas por Saleemi et al. (2012), *P. verrucosum*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. flavus* foram as espécies mais frequentes. Hell et al. (2003) investigaram a micoflora de grãos de milho de vários locais do Benin e observaram que das espécies de *Fusarium* identificadas 62,8% correspondiam à espécie *F. verticillioides*, 25,7% correspondiam a *F. proliferatum*, 8,6% a *F. oxysporum* e 2,9% a *F. poae*. Do género *Aspergillus* 82% pertenciam a *A. flavus*, 12% a *A. niger* e 2% a *A. tamarii*. Do mesmo país, e depois de armazenados durante sete a nove meses, foram identificados como mais frequentes *A. versicolor*, *F. verticillioides*, *Penicillium* spp., *A. glaucus*, *A. flavus* e *A. fumigatus*, nos grãos de milho (Ayalew, 2010). De amostras armazenadas por mais de seis meses em três regiões do Uganda os contaminantes fúngicos de maior incidência correspondem às espécies *A. flavus*, *F. verticillioides*, *A. wentii* e *R. stolonifer* (Kaaya & Kyamuhangire, 2006). As espécies de fungos identificados mais frequentemente de amostras de milho provenientes de silos de metal das Honduras foram *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *Stenocarpella maydis*, *Acremonium* spp. e *P. oxalicum* (Julian et al., 1995).

Neste trabalho, nas amostras de milho, não foram identificados fungos do género *Fusarium*, revelando três possíveis factores: este género é menos agressivo na colonização do que *A. niger* e bastante sensível à ação dos óleos essenciais e dos compostos ativos principais estudados ou as amostras não vieram contaminadas, o que contrasta com a bibliografia consultada em que pelo menos uma destas espécies, *F. verticillioides* ou *F. oxysporum* foram identificadas como frequentes ou muito frequentes na micoflora do grão ou farinha de milho em amostras provenientes do Paquistão, Arábia Saudita, Etiópia e Espanha (Albroch et al., 2012; Dubale et al., 2014; Dawood & Elshamry, 2015; Hussain et al., 2013).

No Quadro 9 estão presentes as frequências absolutas e relativas calculadas para os taxa de fungos identificados nos feijões, para os ensaios em branco e para as diferentes concentrações do óleo

essencial de poejo e componentes ativos principais utilizados. Dos ensaios com os óleos, não estão representados o cravinho na concentração 1,0µL/mL nem o eugenol e o cravinho na concentração 2,5µL/mL por não ter ocorrido qualquer contaminação fungica no período de observação. Nas amostras dos ensaios em branco os fungos muito frequentes foram *Penicillium corylophilum* e *Stemphylium* sp., frequente foi apenas *Rhizopus* sp. e, por fim, os restantes, pouco frequentes, nomeadamente, *Alternaria alternata*, *A. infectoria*, *Aspergillus ustus*, *Cladosporium* sp., *Eurotium chevalieri*, *Fusarium culmorum*, *Penicillium* sp.(1), *Penicillium* sp.(2), *Penicillium* sp.(3), *P. citrinum*, *P. glabrum*, *P. purpurogenum*, *P. verrucosum* e *Ulocladium* sp. Verificou-se que a ação dos óleos ao inibir alguns indivíduos como *A. alternata*, *A. ustus*, *Rhizopus* sp., *Stemphylium* sp., *Ulocladium* sp., diminuindo a variabilidade encontrada, possibilitou o aparecimento de fungos de campo não antes identificados, como o género *Papularia* que apareceu frequentemente em poejo 1,0µL/mL e o género *Monilia* dominante (muito frequente) em todos os ensaios em que houve contaminações. Apenas foi identificada uma espécie do género *Fusarium* (*F. oxysporum*) e pouco frequente. *Cladosporium* sp., pouco frequente nos ensaios em branco, dado o seu crescimento lento e rapidamente superado por espécies mais competitivas, apareceu em 16% dos feijões sob efeito da concentração 1,0µL/mL de pulegona. Adicionalmente, foram identificados novos fungos de armazenamento como *A. flavus*, muito frequente, em pulegona e poejo a 2,5µL/mL, *A. melleus*, cuja frequência diminui no sentido de maiores concentrações e maior sensibilidade ao poejo que à pulegona, *A. sydowii* passando de pouco frequente a frequente, de 1,0µL/mL a 2,5µL/mL de pulegona. Apenas *A. sydowii* e *Monilia* sp. foram identificados na concentração de 1,0µL/mL de eugenol, respetivamente, frequente e muito frequente. *Penicillium corylophilum* é a espécie que predominantemente contaminou estas amostras de sementes de feijão e, ainda dentro deste género, *P. purpurogenum* e *P. citrinum* não foram inibidos pela pulegona nas concentrações 1,0µL/mL e 2,5µL/mL, respetivamente. Como as restantes espécies identificadas (*P. aurantiogriseum* e *P. chrysogenum*), não apareceram nos ensaios em branco, impossibilita concluir sobre a maior ou menor ação inibitória dos óleos nestes fungos. *P. corylophilum* tal como *P. citrinum*, *P. aurantiogriseum* e *P. chrysogenum* são quatro espécies bastante comuns em diversos substratos, alimentos incluídos, nas regiões temperadas (Samson et al., 2010).

Quadro 9. Frequências absolutas e relativas dos fungos isolados a partir das amostras de feijão.

Taxa	1,0 µL/mL								2,5 µL/mL			
	branco		eugenol		pulegona		poejo		pulegona		poejo	
	ni	fi	ni	fi	ni	fi	ni	fi	ni	fi	ni	fi
<i>Alternaria alternata</i>	12	6,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria infectoria</i>	1	0,6	-	-	1	4,0	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	10	33,3	6	26,1
<i>Aspergillus melleus</i>	-	-	-	-	6	24,0	10	17,5	4	13,3	1	4,3
<i>Aspergillus sydowii</i>	-	-	1	14,3	1	4,0	-	-	4	13,3	-	-
<i>Aspergillus ustus</i>	10	5,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium sp.</i>	1	0,6	-	-	4	16,0	1	1,8	-	-	-	-
<i>Eurotium chevalieri</i>	1	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium culmorum</i>	1	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	-	-	1	4,0	-	-	-	-	-	-
<i>Monilia sp.</i>	-	-	6	85,7	-	-	11	19,3	7	23,3	10	43,5
<i>Papularia sp.</i>	-	-	-	-	-	-	6	10,5	-	-	-	-
<i>Penicillium sp.(1)</i>	2	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium sp.(2)</i>	2	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pencillium sp. (3)</i>	1	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	-	-	-	-	-	-	6	10,5	-	-	-	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	-	-	1	4,0	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium citrinum</i>	2	1,1	-	-	-	-	-	-	5	16,7	-	-
<i>Penicillium corylophilum</i>	63	35,6	-	-	8	32,0	23	40,4	-	-	6	26,1
<i>Penicillium glabrum</i>	3	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium purpurogenum</i>	4	2,3	-	-	3	12,0	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium verrucosum</i>	6	3,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizopus sp.</i>	20	11,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stemphylium sp.</i>	41	23,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ulocladium sp.</i>	7	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total de indivíduos	177		7		25		57		30		23	

Nota: ni – frequência absoluta e fi – frequência relativa (ni/total*100); (-) fungo não isolado na amostra.

Yesuf & Sangchote (2005) ao estudarem a micoflora de feijão comum de amostras da Etiópia, identificaram como fungo mais comum *Colletotrichum lindemuthianum*, seguido de *Phaeoisariopsis griseola*, *Ascochyta phaseolorum* e *Macrophomina phaseoli*. Mahmoud et al., 2013, de amostras do Egito, identificaram *R. solani* como fungo mais frequente seguido por *F. oxysporum*. Nenhum destes fungos de campo foram identificados nas amostras de feijão excepto apenas um feijão com *F. oxysporum*.

A. alternata foi a espécie mais frequente da micoflora de amostras recolhidas na Argentina juntamente com outras frequentes como *Sclerotinia sclerotiorum*, *R. solani*, *Fusarium semitectum*, *Acremonium strictum* e *F. graminearum* (Castillo et al., 2004). Igualmente para amostras de sementes de feijão da Polónia, *Alternaria alternata* foi a espécie dominante secundada por *Fusarium spp.* e *Penicillium spp.*,

num total de 13 géneros diferentes identificados (Tylkowska et al., 2010). De 22 fungos identificados da micoflora de duas variedades de feijão (Varun e Waghya) provenientes da Índia, os três mais dominantes foram, por ordem, *Macrophomina phaseoli*, *A. niger* e *F. oxysporum* (Mahamune & Kakde, 2011). Excepcionalmente, da bibliografia pesquisada, apenas em amostras de feijão da Arábia Saudita, os fungos de armazenamento apareceram com incidência elevada, tendo sido identificados *A. flavus*, *A. niger*, *A. sydowii*, *Rhizopus stolonifer*, *P. citrinum* e *F. oxysporum* (Abdel-Hafez, 1984). Estes resultados estão de acordo com os obtidos nos ensaios em branco e sob efeito dos óleos e compostos ativos principais. Assim, *A. flavus*, *A. niger*, *A. sydowii* e *A. terreus* são espécies bastante comuns no armazenamento de grãos e leguminosas, principalmente nas zonas tropicais e subtropicais (Pitt & Hocking, 1997).

Apesar de serem diferentes em termos botânicos e de composição nutricional, os dados de estudos sobre a micoflora de feijões de *Vigna unguiculata* e *Vigna radiata* podem permitir compreender os contaminantes fúngicos que eventualmente poderão ser contaminantes de *Phaseolus vulgaris*. Os contaminantes fúngicos mais frequentes encontrados em amostras de *Vigna unguiculata* colhidas em mercados de rua na África do Sul foram *A. flavus*, *A. niger*, *Cladosporium* sp., *Phoma* sp e *Penicillium* sp., e no Benin foram *A. flavus*, *Curvularia* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Mucor* sp. (Kritzinger et al., 2003). Os contaminantes fúngicos mais frequentes em *Vigna radiata* na Tailândia, Indonésia e Filipinas foram *A. flavus*, *A. niger*, *Eurotium rubrum*, *E. chevalieri*, *P. citrinum* e, apenas em algumas amostras da Tailândia e Indonésia, *P. olsonii* (Pitt et al., 1994). De amostras provenientes da Índia e depois de seis meses armazenadas, as espécies mais comuns do género *Aspergillus* identificadas foram *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* e *A. versicolor* (Gopinath et al., 2011).

Os fungos do género *Alternaria* são encontrados mundialmente e algumas espécies estão associadas a determinados alimentos ou plantas ou a ambientes de interior. As espécies pertencentes ao grupo *A. infectoria* estão mais associadas a cereais, enquanto que as do grupo de *A. arborescens* a pomóideas e prunoideas (Samson et al., 2010). Ao contrário destas, *A. alternata* além de ser um patógeno de algumas plantas, é o fungo saprófita mais comum e com grande variedade de substratos do seu género (Pitt & Hocking, 1997). Igualmente, *Cladosporium* sp. é um género encontrado em numerosas zonas do globo. Tanto *taxa* do género *Stemphylium*, *Cladosporium* e *Acremonium* podem ser fungos patogénicos de plantas ou saprófitas e, deste modo, serem encontrados em alimentos ou restos de materiais vegetais (Samson et al., 2010). Apesar de o género *Ulocladium* estar amplamente distribuído no mundo e, exceptuando o mais comum *U. botrytis*, não é frequentemente isolado de alimentos (Simmons, 1967). No entanto, Pitt et al. (1993,1994) isolaram espécies deste género em feijão comum vermelho. Este tipo de fungos pode aparecer mais ou menos frequentemente nas amostras de vários

tipos de alimentos, uma vez que os seus esporos permanecem viáveis, apesar de não se desenvolverem durante as condições restritas do armazenamento.

5. CONCLUSÕES

O grande conhecimento que hoje existe sobre as plantas aromáticas e a utilidade dos seus compostos ativos na indústria deve ser aproveitado para uma continuação de estudos dos mecanismos de ação biológicos em novas aplicações na saúde, na agricultura e no ambiente.

A elevada volatilidade dos óleos essenciais, o preço e a possibilidade de alterar as propriedades organolépticas dos alimentos se utilizados na fase líquida são os maiores problemas na aplicação dos óleos essenciais na indústria alimentar. Os seus custos podem ser minimizados com a produção em larga escala utilizando variedades de plantas mais rentáveis. Esta situação pode levantar problemas devido ao facto de ser necessário grandes áreas de cultivo para se obter quantidades moderadas do produto e pode também provocar a redução de variabilidade genética por se utilizarem apenas as variedades mais produtivas. No entanto, a vantagem da utilização de compostos ativos principais dos óleos essenciais ultrapassa os fatores negativos da utilização dos próprios óleos essenciais.

A maior vantagem dos óleos essenciais e seus compostos ativos é a sua bioatividade na fase de vapor, o que possibilita a aplicação como fumigante em atmosferas saturadas diminuindo os riscos de alteração organoléptica dos alimentos, a presença de resíduos nos mesmos e os problemas toxicológicos para os consumidores.

A concentração mínima inibitória (CMI) é o indicador mais utilizado pela maioria dos investigadores como medida da eficácia antibacteriológica e antifúngica. A definição da CMI varia entre as publicações o que dificulta comparações entre estudos. Adicionalmente, outros fatores afetam a linearidade das comparações dos métodos científicos. O tipo de procedimento de extração do óleo e a parte da planta usada, volume do inóculo, o meio de cultura e o tempo de incubação e as condições abióticas são alguns destes fatores.

Neste estudo, foi demonstrado que o óleo essencial de cravinho possui maior eficácia antifúngica, seguido do composto ativo principal eugenol, da pulegona e do óleo essencial de poejo. O óleo essencial de cravinho possui na sua constituição outros compostos que lhe podem conferir maior eficácia, um efeito aditivo ou sinérgico. Apesar disto, o eugenol também mostrou elevada eficácia no controlo de fungos de armazenamento e, ao ser uma molécula biodegradável e produzida laboratorialmente é uma melhor opção em termos financeiros, comparando com o óleo essencial de cravinho. O óleo essencial de poejo, ao ser menos eficaz que a pulegona, mostra que pode existir um ou mais antagonismos nos seus compostos ativos. A eficácia destes dois compostos pode não ser

suficiente para serem utilizados como meio de proteção contra fungos em grãos de milho ou em feijões armazenados. A escolha dependerá do período de armazenamento desejado. No entanto, face a estudos de vários autores sobre a eficácia do poejo e da pulegona na proteção contra pragas, faz sentido que estes compostos sejam utilizados numa mistura com o óleo essencial de cravinho ou com o eugenol, acautelando os possíveis riscos de antagonismos entre elas. A mistura de eugenol e pulegona (2,5µL/mL:2,5µL/mL), tal como os 2,5µL/mL de eugenol e cravinho, tiveram uma atividade fungicida nos contaminantes do feijão.

O limoneno é um composto ativo principal que mostrou não ser eficaz na inibição do crescimento da microflora tanto nos grãos de milho como no feijão.

De um modo geral, os resultados desta investigação são concordantes com os encontrados na bibliografia à excepção do limoneno que, nesses estudos, apresenta uma atividade antifúngica moderada.

Relativamente à ação dos óleos e dos compostos ativos estudados sobre os fungos que contaminaram as amostras de milho e feijão, conclui-se que os fungos do género *Aspergillus* são os mais resistentes em condições restritas excepto a espécie *A. niger*, apesar de ser um dos fungos mais agressivos no crescimento em condições óptimas. A contaminação das amostras de milho com *A. niger* impossibilitou o estudo mais aprofundado de outros fungos da microflora e eficácia dos antifúngicos utilizados nestes.

No futuro, deverá ser investigado o modo de ação dos óleos essenciais e compostos ativos principais na morfologia dos fungos de forma a perceber mais pormenorizadamente os mecanismos a nível celular. Por fim, terá de se passar dos estudos laboratoriais para estudos no armazém. Esta passagem constituirá um outro nível de investigação mais próximo da realidade permitindo obter dados mais fiáveis.

A descoberta de novas estratégias para proteção das culturas e controlo de contaminantes biológicos no armazenamento com base em moléculas naturais está a direccionar-se para uma abordagem mais integrada, podendo envolver várias disciplinas. Através do melhor conhecimento dos mecanismos de ação dos compostos ativos a nível celular é possível otimizar a sua utilização, sozinhos ou combinados e maximizar o efeito antifúngico.

A redução dos prejuízos no armazenamento é um objetivo perseguido por muitos produtores e armazenistas no mundo. Através das boas práticas agrícolas e boas práticas no armazenamento e aliando-as à proteção integrada no armazenamento esse objectivo é cumprido. Os óleos essenciais e os seus compostos ativos são uma alternativa sem os efeitos secundários atribuídos a muitos meios de proteção, ou um complemento aos compostos sintéticos, de modo a atingir-se um efeito sinérgico no combate aos fungos de armazenamento de produtos agrícolas secos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-ElSalam, K.A., Khokhlov, A.R. (2015). Eugenol oil nanoemulsion: antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfestum* and phytotoxicity on cottonseeds. *Applied Nanoscience*, 5, 255-265.
- Abdel-Hafez, S. (1984). Mycoflora of bean, broad bean, lentil, lupine and pea seeds in Saudi Arabia. *Mycopathologia*, 88, 45-49.
- El Asbahani, A., Jilale, A., Voisin, S.N., Addi, E.H.A., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D.J., Renaud, N.R. (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of nine essential oils obtained by steam distillation of plants from the Souss-Massa Region (Morocco). *Journal of Essential Oil Research*, 27(1), 34-44.
- Adams, T.B., Taylor, S.V. (2010). Safety Evaluation of Essential Oils: A Constituent-Based Approach. In K. H. Başer & G. Buchbauer, *Handbook of essential oils: science, technology and applications* (pp.186-208). Boca Raton: CRC Press.
- Augustin, M.A., Sanguansri, L. (2012). Challenges in developing delivery systems for food additives, nutraceuticals and dietary supplements. In N. Garti, D.J. McClements, *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals* (pp. 19-48). Cambridge: Woodhead Publishing Limited. (cit. In Dima & Dima, 2015).
- Albroch, L., Bragulat, M.R., Castellá, G., Abarca, M.L., Cabañes, F.J. (2012). Mycobiota and mycotoxin contamination of maize flours and popcorn kernels for human consumption commercialized in Spain. *Food Microbiology*, 32, 97-103.
- Altshuller, A.P. (1983). Review: Natural volatile organic substances and their effect on air quality in the United States. *Atmospheric environment*, 17(11), 2131–2165. (cit. In Filipsson et al., 1998).
- Alvarez-Castellanos, P.P., Pascual-Villalobos, M.J. (2003). Effect of fertilizer on yield and composition of lower head essential oil of *Chrysanthemum coronarium* (Asteraceae) cultivated in Spain. *Industrial Crops and Products*, 17, 77–81. (cit. In Raut & Karuppaiyil, 2014).
- Alves, W.M., Faroni, L.R., Queiroz, D.M., Corrêa, P.C., Galvão, J.C. (2001). Qualidade dos grãos de milho em função da umidade de milho em função da umidade de colheita e da temperatura de secagem. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 5(3), 469-474.
- Amaro, P. (2003). *A protecção integrada*. Lisboa: ISA/Press.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B. (2008). Legumes as a source of natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 865–878. (cit. In Nichols et al., 2014).
- Anthony, S., Abeywickrama, K., Wijeratnam, S.W. (2003). The effect of spraying essential oils of *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon flexuosus* and *Ocimum basilicum* on postharvest diseases and storage life of Embul banana. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78, 780-785. (cit. In Sivakumar & Bautista-Baños, 2014).
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Bacigalupo, R., Korsten, L. (2010). Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. *Crop Protection*, 29, 369-377. (cit. In Sivakumar & Bautista-Baños, 2014).

- Atchibri A.L., Brou, K.D., Kouakou, T.H., Kouadio, Y.J., Gnakri, D.. (2010). Evaluation of bioactive components in seeds of *Phaseolus vulgaris* L. (fabaceae) cultivated in Côte d'Ivoire. *Journal of applied Biosciences*, 31, 1928 – 1934. (cit. In Nyau, 2014).
- Ayalew, A. (2010). Mycotoxins and surface and internal fungi of maize from Ethiopia. *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development*, 10(9), 4109-4143.
- Aziz, E.E., Abbass, M.H., (2010). Chemical composition and efficiency of five essential oils against *Callosobruchus maculatus* (F.) on *Vigna radiata* seeds. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 8(4), 411–419.
- Aziz, E.E., Craker, L.E. (2010). Essential Oil Constituents of Peppermint, Pennyroyal, and Apple Mint Grown in a Desert Agrosystem. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 15(4), 361-367. (cit. In Aziz & Abbas, 2010).
- Azzous, M.A., Bullerman, L.B. (1982). Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *Journal of Food Protection*, 45, 1298-1301. (cit. In López-Malo et al., 2006).
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils-a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
- Baoua, I.B., Amadou, L., Ousmane, B., Baributsa, D., Murdock, L.L. (2014). PICS bags for post-harvest storage of maize grain in West Africa, *Journal of Stored Products Research*, 58, 20-28.
- Barnett, H.L., Hunter, B.B. (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi*. (3rd ed.). Minneapolis: Burgess Publishing Company.
- Barron, G.L., Lichtwardt, R.W. (1959). Quantitative estimations of the fungi associated with deterioration of stored corn in Iowa. *Iowa state journal of science*, 34, 147-155. (cit. In Pitt & Hocking, 1997).
- Bassole, I.H., Juliani, H.R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17, 3989–4006. (cit. In Matusinsky et al., 2015).
- Beardall, J. M., Miller, J. D. (1994). Disease in humans with mycotoxins as possible causes. In J. D. Miller, & H. L. Trenholm (Eds.), *Mycotoxins in grains: Compounds other than aflatoxin* (pp. 487-539). USA: St. Paul Eagen Press. (cit. In da Rocha et al., 2014).
- Benítez, T., Ana, M., Rincón, M., Carmen, L.A., Codón, C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7, 249–260. (cit. In Wagacha & Muthomi, 2008).
- Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., De Saeger, S., Haesaert, G., Karlovsky, P., et al. (2013). Masked mycotoxins: a review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(1), 165-186. (cit. In Kamala et al., 2015).
- Biological Records Centre. (s.d.). Database of insects and their food plants. Consultado em Maio, 17, 2016, em <http://www.brc.ac.uk/dbif/invertebrates.aspx>
- Bluma, R.V., Etcheverry, M.G. (2008). Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology*, 25, 324-334.
- Booth, C. (1971). The genus *Fusarium*. Kew: Commonwealth Micological Institute.

- Bouchra, C., Achouri, M., Hassani, L.I., Hmamouchi, M. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 165-169.
- Brackett, R.E. (1997). Fruits, vegetables and grains. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville (Eds), *Food microbiology fundamentals and frontiers* (pp. 117-126). Washington D.C.: ASM Press. (cit. In Magro, 2009).
- Braga P.C., Sasso M.D., Culici M., Alfieri M. (2007). Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. *Fitoterapia*, 78, 396–400. (cit. In Abd-ElSalam & Khokhlov, 2015).
- Brandt. Sporatec Broad Spectrum Fungicide. Consultado em fevereiro 25, 2016, em <http://brandt.co/PostHarvest/Disinfectants/tabid/139/language/en-US/Default.aspx/SustainableControls/Fungicides/tabid/143/language/zh-CN/Default.aspx>
- Brown, W., Darrah, L. (1985). *Origin, Adaptation, and Types of Corn*. National Corn Handbook. Cooperative Extension Service. Iowa: Iowa State University. (cit. In Ranum et al., 2014).
- Brud, W.S. (2010). Industrial Uses of Essential Oils. In K. H. Başer & G. Buchbauer, *Handbook of essential oils: science, technology and applications* (pp.843-853). Boca Raton: CRC Press.
- Brul, S., Coote, P. (1999). Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1-17. (cit. In Prakash et al., 2015).
- Bullerman, L.B., Tsai, W-Y.J. (1994). Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. *Journal of Food Protection*, 57, 541-546. (cit. In Pitt & Hocking, 1997).
- Burdock, G.A., Carabin, I.G. (2009). Safety assessment of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 22-34. (cit. In Dima & Dima, 2015).
- Burkey, J.L., Sauer, J.M., McQueen, C.A., Sipes, I.G. (2000). Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners – a mechanism of activation for methyleugenol. *Mutation Research*, 453, 25–33. (cit. In Bakkali et al., 2008).
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Cabral, L.C., Pinto, V.F., Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 1-14.
- Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., Oomah, B.D. (2010). Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Research International*, 43, 461–482. (cit. In Nichols et al., 2014).
- Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Samperi, R., Lagana, A. (2012). Multiclass mycotoxin analysis in food, environmental and biological matrices with chromatography/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 31(4), 466-503. (cit. In Kamala et al., 2015).
- Castillo, M.D., González, H., Martínez, E.J., Pacin, A.M., Resnik, S.L. (2004). Mycoflora and potential for mycotoxin production of freshly harvested black bean from the Argentinean main production area. *Mycopathologia*, 158, 107-112.

- Champeil, A., Fourbet, J. F., Dore, T. Rossignol, L. (2004). Influence of cropping system of *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop Protection*, 23, 531–537. (cit. In Gnonlonfin et al., 2015).
- Choi, S.J., Decker, E.A., Henson, L., Popplewell, L.M., McClements, D.J. (2009). Stability of citral in oil-in-water emulsions prepared with medium-chain triacylglycerols and triacetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 11349-11353. (cit. In Dima & Dima, 2015).
- Christensen, C.M. (1967). A note on invasion of durum wheat by storage fungi. *Cereal Chemistry*, 44, 100-103. (cit. In Pera, 2009).
- Christensen, C.M., Kaufmann, H.H. (1969). *Grain Storage: The role of fungi in quality loss*. Minneapolis: University of Minnesota Press.
- Christensen C.M., Sauer B. D. (1982). Mycoflora. In C. M. Christensen (Ed.), *Storage of cereal grains and their products* (pp. 219-240). St. Paul: American Association of Cereal Chemists Inc. (cit. In Moreno-Martínez et al., 1998).
- Combrinck, S., Regnier, T., Kamatou, G.P.P. (2011). *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products*, 33, 344-349.
- Cousin, M.A., Riley, R.T., Pestka, J.J. (2005). Foodborne mycotoxins: chemistry, biology, ecology and toxicology. In P.M. Fratamico, A.K. Bhunia & J.L. Smith (Eds), *Foodborne Pathogens Microbiology and Molecular Biology* (pp. 163-226). Norfolk U.K.: Horizon scientific press.
- Cos P., Vlietink, A., Van den Berghe, D., Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: how to develop a stonger *in vitro* “proof-of-concept”. *Journal of Ethnopharmacology*, 106, 290-302. (cit. In Svetaz et al., 2013).
- Cortés-Rojas, D.F., De Souza, C.R.F., Oliveira, W.P. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(2), 90-96.
- Cross, D.E., McDevitt, R.M., Hillman, K., Acamovic, T. (2007). The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *British Poultry Science*, 48, 496–506. (cit. In Erhan et al., 2012).
- Croteau, R. (1986). Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of the essential oils. *Herbs, spices and medicinal plants: Recent Advances in Botany, Horticulture, and Pharmacology*, 1, 81–135. (cit. In Raut & Karuppayil, 2014).
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G. (2003). The effectiveness of plant oilson the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, 22, 39-44.
- Dambolena, J.S., López, A.G., Cánepa, M.C., Theumer, M.G., Zygodlo, J.A., Rubinstein, H.R. (2008). Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthoneand thymol) on *Fusarium verticillioides* MRC 826 growth and FUMO B1 biosynthesis. *Toxicon*, 51, 37–44. (cit. In Matusinsky et al., 2015).
- Dambolena, J.S., Zunino, M.P., López, A.G., Rubinstein, H.R., Zygodlo, J.A., Mwangi, J.W., Thoithi, G.N., Kibwage, I.O., Mwalukumbi, J.M., Kariuki, S.T. (2010). Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 410–414.

- da Rocha, M.E., Freire, F.O., Maia, F.E., Guedes, M.I., Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36, 159-165.
- Dawood, E.S., Elshamry, M.K. (2015). Mycoflora of maize (*Zea mays*) at different locations in Hail area – Saudi Arabia. *International Journal of Scientific & Technology research*, 4(6), 227-230.
- de Groot, I. (2004). Protection of stored grains and pulses (5th ed.). *Agrodok 18*. Wageningen: Agromisa Foundation.
- de Oliveira P.F., Mendes J.M., de Oliveira L.E. (2013). Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. *Medical Mycology*, 51, 507–513. (cit. In Abd-ELSalam & Khokhlov, 2015).
- Deng C., Yao N., Wang A., Zhang X. (2005). Determination of essential oil in a traditional Chinese medicine, *Fructus amomi* by pressurized hot water extraction followed by liquid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 536, 237–244. (cit. In Tongnuanchan & Benjakul, 2014).
- Dijoux, N., Guingand, Y., Bourgeois, C., Durand, S., Fromageot, C., Combe, C., Ferret, P.J. (2006). Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. *Toxicology in Vitro*, 20, 480–489. (cit. In Raut & Karuppayil, 2014).
- Dima, C., Dima, S. (2015). Essential oils in foods: extraction, stabilization and toxicity. *Current Opinion in Food Science*, 5, 29-35.
- Dimitriades, B. (1981). The role of natural organics in photochemical air pollution — issues and research needs. *Journal of the Air Pollution Association*, 31(3), 229–235. (cit. In Filipsson et al., 1998).
- DHHS-FDA (2012). *Synthetic flavouring substances and adjuvants*. 21CFR182.60. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (cit. In IARC, 2015).
- Doebley, J. (2004). The genetics of maize evolution. *Annual Review of Genetics*, 38, 37–59. (cit. In Ranum et al., 2014).
- Dowd, P.F., Miller, J.D., Greenhalgh, R. (1989). Toxicity and interactions of some *fusarium graminearum* metabolites to caterpillars. *Mycologia*, 81, 646-650. (cit. In Frisvad et. al., 2006).
- Dr. Earth®. Final Stop® Disease Control Fungicide. Consultado em fevereiro 25, 2016, em <http://drearth.net/products/organic-killer-sprays/disease-control-fungicide/>
- Dubale, B., Solomon, S., Geremew, B., Sethumadhava, G., Waktole, S. (2014). Mycoflora of grain maize (*Zea mays* L.) stored in traditional storage containers (gombisa and sacks) in selected woredas of Jimma zone, Ethiopia. *African Journal of Food Agriculture, Nutrition and Development*, 14(2), 8676-8694.
- Dunkel, F.V. (1988). The relationship of insects to the deterioration of stored grain by fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 7, 227-244. (cit. In Magro, 2001).
- Duvick, J. (2001). Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification. *Environmental Health Perspectives*, 109(2), 337-342.
- Dweck, A.C. (2009). Toxicology of essential oils reviewed. *Personal Care*, 65–77. (cit. In Raut & Karuppayil, 2014).

Ed Rosenthal's ZERO TOLERANCE™ Herbal Fungicide. Consultado em fevereiro 25, 2016, em <http://z-tolerance.com/zt-herbal-fungicide/>

El-Mesallamy, A.M., El-Gerby, M., Azim, M.H., Awad, A. (2012). Antioxidant, Antimicrobial Activities and Volatile Constituents of Clove Flower Buds Oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(6), 900-907.

Ellis, M.B. (1971). Dematiaceous Hyphomycetes. Kew: Commonwealth Mycological Institute.

Ellis, W.O., Smith, J.P., Simpson, B.K., Ramaswamy, H., Doyon, G. (1994). Growth of and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts stored under modified atmosphere packaging (MAP) conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 22(2), 173-187. (cit. In Baoua et al., 2014).

Entomological Society of America (2015). Common Names of Insects and Related Organisms. Consultado em Maio, 17, 2016, em http://www.entsoc.org/pubs/common_names

Erhan, M.K., Bölükbaşı, Ş.C., Ürüşan, H. (2012). Biological activities of pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) in broilers. *Livestock Science*, 146, 189-192.

Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezriouia, N. E., Pagès, J. M. (2012). Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection-bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*, 19, 464–471. (cit. In Tao et al., 2014).

Fandohan, P., Gbenou, J.D., Gnonlonfin, B., Hell, K., Marasas, W.F., Wingfield, M.J. (2004). Effect of Essential Oils on the Growth of *Fusarium verticillioides* and Fumonisin Contamination in Corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6824-6829.

FAOSTAT: Statistics Division. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/E>

FAO (1992). *Maize in Human Nutrition*. Rome: FAO. Consultado em dezembro 20, 2015, em <http://www.fao.org/docrep/t0395e/T0395E00.htm#Contents>

FAO (2016). *Save and Grow in practice: maize, rice, wheat. A guide to sustainable cereal production*. Consultado em Janeiro 20, 2016, em <http://www.fao.org/3/a-i5318e.pdf>

FAOWater Development and Management Unit. Bean. In *Crop Water Information*. Consultado em dezembro 20, 2015, em: http://www.fao.org/nr/water/cropinfo_bean.html

FAOWater Development and Management Unit. Maize. In *Crop Water Information*. Consultado em Novembro 26, 2015, em: http://www.fao.org/nr/water/cropinfo_maize.html

Farhat A., Fabiano-Tixier A.S., Visinoni F., Romdhane M., Chemat F. (2010). A surprising method for green extraction of essential oil from dry spices: microwave dry-diffusion and gravity. *Journal of Chromatography A*, 1217, 7345–7350. (cit. In Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

Faria, J.M., Sena, I., Maleita, C.M., da Silva, I.V., Ascensão, L., Abrantes, I., Bennett, R.N., Mota, M., Figueiredo, A.C. (2014). In vitro co-culture of *Solanum tuberosum* hairy roots with *Meloidogyne chitwoodi*: structure, growth and production of volatiles. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 118, 519–530.

Filipsson, A.F., Bard, J., Karlsson, S. (1998). *Limonene*. Concise International Chemical Assessment Document 5. Geneva: World Health Organization. Consultado em Novembro 29, 2015, em <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad05.pdf>

Filtborg, O., Frisvad, J.C., Samson, R.A. (2004). Specific association of fungi to foods and influence of physical environment factors. In R.A. Samson, E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad (Eds.), *Introduction to food and airborne fungi* (pp. 306-320). Wageningen: Ponsen & Looyen.

Freires, I.A., Denny, C., Benso, B., de Alencar, S.M., Rosalen, P.L. (2015). Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. *Molecules*, *20*, 7329-7358.

Frisvad, J.C., Thrane, U., Samson, R.A., Pitt, J.I. (2006). Important mycotoxins and the fungi which produce them. In J.C. Frisvad, U. Thrane, R.A. Samson & J.I. Pitt (Eds), *Advances in food mycology* (pp. 3-32). U.S.A.: Springer.

Food and Drug Administration (1987). Water Activity (a_w) in Foods. In *Inspection Technical Guides*, 39. Consultado em Julho 10, 2015, em <http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/InspectionTechnicalGuides/ucm072916.htm>

Garden Safe®. Brand Fungicide3®. Consultado em fevereiro 25, 2016, em <http://www.gardensafe.com/Products-and-Solutions/Fungicide/Garden-Safe-Brand-Fungicide3.aspx>

Gepts, P. (1998). Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. *HortScience*, *33*(7), 1124-1130.

Gibson, L., Benson, G., (2002). *Origin, History, and Uses of Corn (Zea mays)*. Iowa State University, Department of Agronomy. (cit. In Ranum et al., 2014).

Gill, A.O., Holley, R.A. (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, *108*(1), 1–9. (cit. In Goñi et al., 2009).

Gill A.O., Holley R.A. (2006). Inhibition of membrane bound ATPase of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, *111*(2), 170–174. (cit. In Abd-ElSalam & Khokhlov, 2015).

Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A., Naresh, M. 2008. Effect of a_w and CO₂ level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize postharvest. *International Journal of Food Microbiology*, *122*, 109-113. (cit. In Williams et al. 2014).

Gnonlonfin, G.J.B., Hell, K., Adjovi, Y., Fandohan, P., Koudande, D.O., Mensah, G.A., Sanni, A., Brimer, L. (2013). A review on aflatoxin contamination and its implications in the developing world: A Sub-Saharan African perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *53*(4), 349-365.

Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, *116*, 982–989. (cit. In Goñi et al., 2009).

González, H.L., Resnik, S.L., Pacin, A.M. (2003). Mycoflora of freshly harvested flint corn from Northwestern Provinces in Argentina. *Mycopathologia*, *155*, 207–211. (cit. In Kumar et al., 2008).

Gopinath, M.R., Muralikrishanab, G., Niranjana, S.R. (2011). Effect of storage on redgram [*Cajanus cajan* (L.) Millsp] and greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] varieties with particular reference to carbohydrate composition. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *44* (16), 1609–1620.

- Gordon, W.P., Forte, A.J., MacMurtry, R.J., Gal, R.J., Nelson, S.D. (1982). Hepatotoxicity and pulmonary toxicity of Pennyroyal oil and its constituent terpenes in the mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 65, 413–424. (cit. In Raut & Karuppayil, 2014).
- Gregori, R., Meriggi, P., Pietri, A., Formenti, S., Baccharini, G., Battilani. (2013). Dynamics of fungi and related mycotoxins during cereal storage in silo bags. *Food Control*, 30, 280-287.
- Groopman, J. D., Kensler, T. W., Wild, C. P. (2008). Protective interventions to prevent aflatoxin-induced Carcinogenesis in developing countries. *Annual Review of Public Health*, 29, 187-203. (cit. In da Rocha et al., 2014).
- Gülçin, I., Elmastas, M., Aboul-Enein, H.Y. (2012). Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. *Arabian Journal of Chemistry*, 5(4), 489-499.
- Hashem, M., Moharam, A.M., Zaied, A.A., Saleh, F.E.M. (2010). Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. *Crop Protection*, 29, 1111–1117. (cit. In Matusinsky et al., 2015).
- Hell, K., Cardwell, K.F., Poehling, H.M. (2003). Relationship between Management Practices, Fungal Infection and Aflatoxin for Stored Maize in Benin. *Journal of Phytopathology*, 151, 690-698.
- Hell, K., Cardwell, K.F., Sétamou, M., Schulthess, F. (2000). Influence of insect infestation on aflatoxin contamination of stored maize in four agroecological regions in Benin. *African Entomology*, 8, 169-177. (cit. In Baoua et al., 2014).
- Hernández-Ramirez, R.U., Galván-Portillo, M.V., Ward, M.H., Agudo, A., González, C.A., Oñate-Ocaña, L.F., Herrera-Goepfert, R., Palma-Coca, O., López-Carrillo, L. (2009). Dietary intake of polyphenols, nitrate and nitrite and gastric cancer risk in Mexico City. *International Journal of Cancer*, 125, 1424–1430. (cit. In Nichols et al., 2014).
- HGCA (2011). *Grain storage guide for cereals and oilseeds* (3rd ed.), guide 52. Agriculture and Horticulture Development Board.
- Hill, L., Wang, T.L. (2009). Approaches to the analysis of plant-derived natural products. In A.E. Osbourn, V. Lanzotti (Eds.), *Plant-derived natural products* (pp.97-125). New York: Springer. (cit. In Matos et al., 2013).
- Hussain, A.I., Anwar, F., HussainSherazi, S.T., Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108, 986–995. (cit. In Raut & Karuppayil, 2014).
- Hussain, N., Hussain, A., Ishtiaq, M., Azam, S., Hussain, T. (2013). Pathogenicity of two seed-borne fungi commonly involved in maize seeds of eight districts of Azad Jammu and Kashmir, Pakistan. *African Journal of Biotechnology*, 12(12), 1363-1370.
- Huyghcbact, G., & Schoner, F. J. (1999). Influence of storage and addition of enzyme on metabolizable energy content of wheat. *Arch Gefluegelkd*, 63, 13–20. (cit. In Zia-Ur-Rehman, 2006).
- Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 25, 3-12. (cit. In Prakash et al., 2015).
- IFPRI (2010). *Aflatoxin in Kenya: an Overview*. Afla Control Project Note 1. (cit. In Baoua et al., 2014).

Igimi, H., Hisatsugu, T., Nishimura, M. (1976). The use of d-limonene preparation as a dissolving agent of gallstones. *Digestive diseases and science*, 21, 926–939. (cit. In Filipsson et al., 1998).

Igimi, H., Tamura, R., Toraishi, K., Yamamoto, F., Kataoka, A., Ikejiri, Y., Hisatsugu, T., Shimura, H. (1991). Medical dissolution of gallstones. Clinical experience of d-limonene as a simple, safe and effective solvent. *Digestive diseases and science*, 36, 200–208. (cit. In Filipsson et al., 1998).

International Agency for Research on Cancer (1999). d-Limonene. In *Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances*, volume 73. Lyon: World Health Organization. Consultado em Novembro 29, 2015, em <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol73/mono73-16.pdf>

International Agency for Research on Cancer (2015). Pulegone. In *Some drugs and herbal products*, volume 108 (pp. 141-154). Lyon: World Health Organisation. Consultado em Novembro 29, 2015, em <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol108/mono108-05.pdf>

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1980). Reduced water activity. In J.H. Silliker et al. (Eds), *Microbial ecology of foods*, vol I. Factors affecting life and death of microorganisms (pp. 70-91). New York: Academic Press. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville (Eds.), *Food microbiology fundamentals and frontiers* (pp. 497-519). Washington D.C.: ASM Press. (cit. In Magro, 2001).

International Mycological Association. *Mycobank database: fungal databases, nomenclature & species banks*. Disponível em <http://www.mycobank.org/defaultinfo.aspx?Page=Home>
Isman, M.B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19, 603-608.

Jayashree, T., Subramanyam, C., 1999. Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Letters in Applied Microbiology*, 28, 179–183. (cit. In Bluma & Etcheverry, 2008).

JH Biotech, Inc. Mildew Cure® – Organic Fungicide. Consultado em fevereiro 25, 2016, em <http://jhbiotech.com/plant-products/mildewcure-organic-fungicide/>

Jimenez-Carmona M.M., Ubera J.L., de Castro M.D. (1999). Comparison of continuous subcritical water extraction and hydrodistillation of majoram essential oil. *Journal of Chromatography A*, 855, 625–632. (cit. In Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

Joffe, A.Z. (1962). Biological properties of some toxic fungi isolated from over-wintered cereals. *Mycopathology Mycology Applied*, 16, 201-221. (cit. In Magro, 2001).

Jones, A.L. (1999). *Phaseolus Bean: Post-harvest Operations*. AGSI/FAO: D. Mejia & B. Lewis. Consultado em dezembro 20, 2015, em <http://www.fao.org/3/a-av015e.pdf>

Julian, M.A., Wareing, P.W., Phillips, S.I., Medlock, V., MacDonald, M.V., del Rio, L. (1995). Fungal contamination and selected mycotoxins in pre- and post-harvest maize in Honduras. *Mycopathologia*, 129, 5-16.

Kaaya, A.N., Kyamuhangire, W. (2006). The effect of storage time and agroecological zone on mould incidence and aflatoxin contamination of maize from traders in Uganda. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 217–223.

Kaiser, R., Lamparsky D., Schudel P. (1975). Analysis of buchu leaf oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(5), 943–50. (cit. In IARC, 2015).

Kamala, A., Ortiz, J., Kimanya M., Haesaert, G., Donoso, S., Tiisekwa, B., De Meulenaere, B. (2015). Multiple mycotoxin co-occurrence in maize grown in three agro-ecological zones of Tanzania. *Food Control*, 54, 208-215.

- Karlberg, A.T., Dooms-Goossens, A. (1997). Contact allergy to oxidized d-limonene among dermatitis patients. *Contact Dermatitis*, 36, 201-206. (cit. In em NICNAS, 2003).
- Khan, A., Ahmad, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L. A. (2010). *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. *Research in Microbiology*, 161, 816–823. (cit. In Tao et al., 2014).
- Klich, M.A. (2002). *Identification of common Aspergillus species*. (1st ed.). Utrecht: Centraalbureau Voor Schimmelcultures.
- Komala, V.V. Ratnavathi, C.V., Kumar, B.S.V., Das, J.K. (2012). Inhibition of aflatoxin B₁ production by an antifungal component, eugenol in stored sorghum grains. *Food Control*, 26, 139-146.
- Kpodo, K., Thrane, U., Hald, B. (2000). *Fusaria* and fumonisins in maize from Ghana and their co-occurrence with aflatoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 147–157. (cit. In Kumar et al., 2008).
- Kritzing, Q., Aveling, T.A., Marasas, W.F., Rheeder, J.P., Van der Westhuizen, L., Shephard, G.S. (2003). Mycoflora and fumonisin mycotoxins associated with cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2188-2192.
- Kubeczka, K-H. (2010). History and Sources of Essential Oil Research. In K. H. Baser & G. Buchbauer, *Handbook of essential oils: science, technology and applications* (pp.3-38). Boca Raton: CRC Press.
- Kuipere-Goodman, T., Scott, P. M. (1989). Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical Environmental Science*, 2, 179-248. (cit. In da Rocha et al., 2014).
- Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., Satya, S. (2011). Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. *Industrial Crops and Products*, 34, 802-817.
- Kumar, V., Basu, M.S., Rajendran, T.P. (2008). Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection*, 27, 891-905.
- Kuete, V., Alibert-Franco, S., Eyong, K.O., Ngameni, B., Folefoc, G.N., Nguemeving, J.R., Tangmouo, J.G., Fotso, G.W., Komguem, J., Ouahouo, B.M., Bolla, J.M., Chevalier, J., Ngadjui, B.T., Nkengfack, A.E., Pagès, J.M. (2011). Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(2), 156-161. (cit. In Morcia et al., 2013).
- Kurita N, Koike S. (1983). Synergistic antimicrobial effect of ethanol, sodium chloride, acetic acid and essential oil components. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 67–75. (cit. In Morcia et al., 2012).
- Labuschagne, M., Phalafala, L., Osthoff, G., van Biljon, A. (2014). The influence of storage conditions on starch and amylose content of South African quality protein maize and normal maize hybrids. *Journal of Stored Products Research*, 56, 16-20.
- Lacey, J., Hill, S.T., Edwards, M.A. (1980). Micro-organisms in stored grains: their enumeration and significance. *Tropical Stored Products Information*, 39, 19-33. (cit. In Magro, 2001).
- Lacey, J., Paster, N., Fanelli, C., Kennedy, R., Shekara, S.H., Mora, M. (1990). Integrated strategies for the control of moulding in grain. *Proceedings of the 5th International Working Conference on Stored-Product Protection*, 1 (pp. 255-260). (cit. In Magro, 2001).

- Lacey, J., Magan, N. (1991). Fungi cereal grains: their occurrence and water and temperature relationships. In J. Chelkowski (ed.), *Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage* (pp.77-118). New York: Elsevier. (cit. In Magro, 2009).
- Laird, K., Phillips, C. (2011). Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? *Letters in Applied Microbiology*, *54*, 169-174. (cit. In Sivakumar & Bautista-Baños, 2014).
- Lamb, B., Guenther, A., Gay, D., Westberg, H. (1987). A national inventory of biogenic hydrocarbon emissions. *Atmospheric environment*, *21*(8), 1695–1705. (cit. In Filipsson et al., 1998).
- Lamiri, A., Lhaloui, S., Benjilali, B., Berrada, M. (2001). Insecticidal effects of Hessian Fly against *Mayetiola destructor* (Say). *Field Crop Research*, *71*, 9–15. (Kumar et al., 2011).
- Lee, K. and Shibamoto, T. (2001). Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. *Food Chemistry*, *74*, 443-448. (cit. In El-Mesallamy et al., 2012).
- Li X.M., Tian S.L., Pang Z.C., Shi J.Y., Feng Z.S., Zhang Y.M. (2009). Extraction of *Cuminum cyminum* essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and steam distillation. *Food Chemistry*, *115*, 1114–1119. (cit. In Tongnuanchan & Benjakul, 2014).
- Lindenfelser, L.A., Lillehoj, E.B., Milburn, M.S. (1973). Ochratoxin and penicillic acid in tumorigenic and acute toxicity tests with mice. *Developments in industrial microbiology*, *14*, 331-336. (cit. In Frisvad et. al., 2006).
- Lopez-Avila V., Young R., Beckert W.F. (1994). Microwave-assisted extraction of organic compounds from standard reference soils and sediments. *Analytical Chemistry*, *66*, 1097–1106. (cit. In Tongnuanchan & Benjakul, 2014).
- López-Malo, A., Palou, H., León-Cruz, R., Alzamora, S.M. (2005). Mixtures of natural and synthetic antifungal agents. In J.C. Frisvad, U. Thrane, R.A. Samson & J.I. Pitt (Eds), *Advances in food mycology* (pp. 261-286). U.S.A.: Springer.
- Luongo, L., Galli, M., Corazza, L., Meeke, E., De Haas, L., Lombaers, V. & Köhl J. (2005). Potential of fungal antagonists for biocontrol of *Fusarium* spp. in wheat and maize through competition in crop debris. *Biocontrol Science and Technology*, *15*(3), 229-242.
- Magan, N., Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, *119*, 131-139. (cit. In Gregori et al., 2013).
- Magan, N., Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, *119*, 131–139. (cit Cabral et al., 2013).
- Magan, N., Lacey, J. (1984a). Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, *82*(1), 71-81. (cit. In Gregori et al., 2013).
- Magan, N., Lacey, J. (1984b). Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, *82*(1), 83-93. (cit. In Gregori et al., 2013).
- Magan, N., Lacey, J. (1984c). Effects of gas composition and water activity on growth of field and storage fungi and their interactions. *Transactions of the British Mycological Society*, *82*(2), 305-314. (cit. In Gregori et al., 2013).

- Magan, N., Hope, R., Cairns, V., Aldred, D. (2003). Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain (Special issue: Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi). *European Journal of Plant Pathology*, 109(7), 723-730. (cit. In Gregori et al., 2013).
- Magro, A. (2001). *A problemática dos fungos no armazenamento de produtos agrícolas duráveis*. Trabalho de síntese para provas de acesso a Assistente de Investigação. Instituto de investigação científica tropical (IICT), Lisboa.
- Magro, A. (2009). *Avaliação das actividades fungistática e fungicida de extratos de plantas e seus constituintes em produtos agrícolas secos armazenados*. Dissertação de doutoramento, ISA/UTL, Lisboa, Portugal.
- Mahamune, S.E., Kakde, R.B. (2011). Incidence of seed-borne mycoflora on French bean mutants and its antagonistic activity against *Trichodema harzianum*. *Recent Research in Science and Technology*, 3(5), 62-67.
- Mahmoud, S., Hosseney, M., El-shaikh, K., Obiadalla, A., Mohamed, Y. (2013). Seed borne fungal pathogens associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds and their impact on germination. *Journal of Environmental Studies*, 11, 19-26.
- Manganyi, M.C., Regnier, T., Olivier, E.I. (2015). Antimicrobial activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* isolates and their biofilms. *South African Journal of Botany*, 99, 115–121.
- Marandi, R. J., Hassani, A., Ghosta, Y., Abdollahi, A., Pirzad, A., & Sefidkon, F. (2011). Improving postharvest quality of table grape cv. “rish baba” using *Thymus kotschyanus* and *Carum copticum* essential oils. *Journal of Food Safety*, 31, 132-139. (cit. In Prakash et al., 2015).
- Marei, G.I.Kh., Abdel Rasoul, M.A., Abdelgaleil, S.A.M. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103, 56-61.
- Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A. J., Vinas, I., Magan, N. (1998). Environmental factors, in vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research*, 102(7), 831-837. (cit. In Gregori et al., 2013).
- Marín, S., Velluti, A., Ramos, A.J., Sanchis, V.(2004). Effect of essential oils on zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* in non-sterilized maize grain. *Food Microbiology*, 21, 313–318.
- Masango P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, 13, 833–839. (cit. In Tongnuanchan & Benjakul, 2014).
- Matos, O.C. (2001). *Estudo de espécies nativas Portuguesas. Produção de substâncias com actividade biológica (Study of Portuguese native plant species. Production of substances with biological activity)*. Tese das Provas de Acesso à categoria de Investigador Auxiliar, Instituto Nacional de Investigação Agrária-Estação Agronómica Nacional, Oeiras. (cit. In Matos et al., 2013).
- Matos, O., Magro, A., Mexia, A. (2013). Usefulness of plant derived products to protect rice against fungi in Western europe. In M. Razzaghi-Abyaneh & M. Rai (Eds.), *Antifungal metabolites from plants* (pp.369-399). Heidelberg: Springer.
- Matos, R.E. (2004). *O papel do armazenamento para a segurança alimentar: Um estudo de caso na área periurbana de Luanda-Angola*. Tese de Mestrado, ISA/UTL, Lisboa, Portugal. (cit. In Pera, 2009).
- Matusinsky, P., Zouhar, M., Pavela, R., Novy, P. (2015). Antifungal effect of five essential oils against important pathogenic fungi of cereals. *Industrial Crops and Products*, 67, 208-215.

Mislivec, P.B., Tuite, J. (1970a). Species of *Penicillium* occurring in freshly-harvested and in stored dent corn kernels. *Mycologia*, 62, 67-74. (cit. In Pitt & Hocking, 1997).

Mislivec, P.B., Tuite, J. (1970b). Temperature and relative humidity requirements of species of *Penicillium* isolated from yellow dent corn kernels, *Mycologia*, 62, 75-88. (cit. In Pitt & Hocking, 1997).

Mislivec, P.B., Tuite, J. (1970). Temperature and relative humidity requirements of species of *Penicillium* isolated from yellow dent corn kernels. *Mycologia*, 62, 75-88. (cit. In Magro, 2001).

Mohan, R.J., Sangeetha, A., Narasimha, H.V., Tiwari, B.K. (2011). Post-harvest technology of pulses. In B.K. Tiwari, A. Gowen, B. McKenna (Eds), *Pulse foods: processing, quality and nutraceutical applications* (pp. 171-192). London: Academic Press.

Monterey Lawn and Garden Products. Disease Control. Consultado em fevereiro 25, 2016, em http://www.montereylawnandgarden.com/product_category.aspx?242000p=7c28ab97-ec13-4fbe-864a-d9da1e8d6bd2

Montes-Belmont, R., Carvajal, M. (1998). Control of *aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *Journal of Food Protection*, 61, 616-619. (cit. In Morcia et al., 2013).

Morcia, C., Malnatib, M., Terzia, V. (2012). In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Additives and Contaminants*, 29(3), 415-422.

Morcia, C., Tumino, G., Terzi, V. (2013). Plant bioactive metabolites for cereal protection against fungal pathogens. In M. Razzaghi-Abyaneh & M. Rai (Eds.), *Antifungal metabolites from plants* (pp.401-427). Heidelberg: Springer.

Moreno-Martínez, E., Rivera, A., Badillo, M.V. (1998). Effect of fungi and fungicides on the preservation of wheat seed stored with high and low moisture content. *Journal of Stored Products Research*, (34)4, 231-236.

Mourato, M.A. (1984). Alguns aspectos do problema dos fungos em produtos armazenados. *Revista Ciência Agronômica*, 49-65. (cit. In Pera, 2009).

Munkvold, G. P. (2003). Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology*, 41, 99-116. (cit. In Gnonlonfin et al., 2015).

Muruganadan, S., Srinivasan, K., Chandra, S., Tandan, S.K., Lal, J. and Raviprakash, V. (2001). Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. *Fitoterapia*, 72, 369-375. (cit. In El-Mesallamy et al., 2012).

Nair, B. (2001). Final report on the safety assessment of *Mentha Piperita* (Peppermint) Oil, *Mentha Piperita* (Peppermint) Leaf Extract, *Mentha Piperita* (Peppermint) Leaf, and *Mentha Piperita* (Peppermint) Leaf Water. *International Journal of Toxicology*, 20(4),Suppl. 3, 61-73. (cit. In IARC, 2015).

National Chamber of Milling. (2008). Cultivars: Maize. South Africa. (cit. In Ranum et al., 2014).

National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme. (2002). *Limonene: Priority Existing Chemical Assessment Report Nº22*. Consultado em Novembro 27, 2015, em: http://www.nicnas.gov.au/_data/assets/pdf_file/0018/4383/PEC_22_Limonene_Full_Report_PDF.pdf

Natural Resources Conservation Service. (s.d.). Plants database. United States Department of Agriculture. Consultado em Maio 17, 2016, em <http://plants.usda.gov/java/>

Navarro, S., Noyes, R., Jayas, D. (2002a). Stored grain ecosystem and heat, and moisture transfer in grain bulk. In S. Navarro & R. Noyes (Eds.). *The mechanics and physics of modern grain aeration management* (pp. 38-78). Boca Raton: CRC Press. (cit. In Pera, 2009).

Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., Scalbert, A. (2010). Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *The Journal of Biological Databases and Curation*, 1-9. (cit. In Cortés-Rojas, 2014).

Nichols, N., Sutivisedsak, N., Dien, B., Biswas, A., Lesch, W., Cotta, M. (2011). Conversion of starch from dry common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to ethanol. *Industrial Crops and products*, 33, 644–647.

Nilsson, U., Magnusson, K., Karlberg, O., Karlberg, A.T. (1999). Are contact allergens stable in patch test preparations? Investigation of the degradation of d-limonene hyperperoxides in petrolatum. *Contact Dermatitis*, 40(3), 127-132. (cit. In em NICNAS, 2003).

Nguefack, J., Leth, V., Amvam Zollo, P.H., Mathur, S.B. (2004). Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 329-334.

Nobelprize.org. (2014). *The Nobel Prize in Chemistry 1910*. Nobel Media AB. Consultado em Abril 17, 2016, em http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1910/

Norma Portuguesa 90 (1987). *Óleos essenciais*. Definição. Instituto Português da Qualidade – CT 5, 5ª Edição, Lisboa, Portugal. (cit. In Magro, 2009).

Nostro, A., Blanco, A.R., Cannatelli, M.A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I. Roccaro A.S., Alonzo V. (2004). Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *Fems Microbiology Letters*, 230(2), 191–195. (cit. In Goñi et al., 2009).

Nyau, V. (2014). Nutraceutical perspectives and utilization of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.): a review. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 14(7), 9483-9496.

Odds, F. (2005). Genomics, molecular targets and the discovery of antifungal drugs. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22, 229-237. (cit. In Svetaz et al., 2013).

Onigbinde, A.O., Akinyele, I.O. (1990). Compositional and protein digestibility changes in maize (*Z. mays*) and cowpea (*V. unguiculata*) after storage at ambient conditions. *Food Chemistry*, 36, 315-321. (cit. In Paraginski et al., 2014).

Oonmetta-aree, J., Suzuki, T., Gasaluck, P. (2006). Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT – Food Science and Technology*, 39, 1214–1220. (cit. In Tao et al., 2014).

Paes, M. (2006). *Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho*. Circular Técnica 75. Minas Gerais: Embrapa. Consultado em Março 4, 2016, em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/489376/1/Circ75.pdf>

- Panasenko, V.T. (1967). ecology of microfungi. The Botanical Review, 33. In J.I. Pitt & A.D. Hocking (Eds), *Fungi and food spoilage* (pp. 189-215). London: Blackie Academic & Professional. (cit. In Magro, 2001).
- Paraginski, R.T., Vanier, N.L., Berrios, J., Oliveira, M., Elias, M.C. (2014). Physicochemical and pasting properties of maize as affected by storage temperature. *Journal of Stored Products Research*, 59, 209-214.
- Passone, M.A., Girardi, N.S., Ferrand, C.A., Etchverry, M. (2012). *In vitro* evaluation of five oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored peanuts from *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* contamination. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 70, 82-88.
- Patel, K., Ali, S., Sotheeswaran, S., Dufor, J.P. (2007). Composition of the leaf essential oil of *Cinnamomum verum* (Lauraceae) from Fiji islands. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 10(5), 374-377.
- Peaceful Valley Farm & Garden Supply. Trilogy Neem Oil. Consultado em fevereiro 25, 2016, em <http://www.groworganic.com/trilogy-neem-oil-2-5-gallon.html>
- Pera, S. (2009). *Micobiota do arroz armazenado numa fábrica de processamento*. Dissertação de Mestrado, ISA/UTL, Lisboa, Portugal.
- Perineau F., Ganou L., Vilarem G. (1992). Studying production of lovage essential oils in a hydrodistillation pilot unit equipped with a cohobation system. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 53, 165–171. (cit. In Tongnuanchan & Benjakul, 2014).
- Pitt, J.I. (1975). Zerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin. In R.B. Duckworth (ed.), *Water relations of foods* (pp. 273-307). London: Academic Press. (cit. In Pitt & Hocking, 1997).
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. (1997). *Fungi and food spoilage*. (2nd ed.). London: Springer.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2009). *Fungi and food spoilage*. (3rd ed.) London: Springer.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A., Tanbonn-Ek, P. (1993). The normal mycoflora of commodities from Thailand. 1.Nuts and oilseeds. *International Journal of Food Microbiology*, 20, 211-226. (cit. In Pitt & Hocking, 1997).
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A., Tanboon-Ek, P. (1994). The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 35-53. (cit. In Pitt & Hocking, 1997).
- Pléstina, R. (1996). Nephrotoxicity of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 13, 49-50. (cit. In da Rocha et al., 2014).
- Poonyth, A.D., Hyde, K.D., Peerally, A. (2001). Colonization of *Bruguiera gymnorrhiza* and *Rhizophora mucronata* wood of marine fungi. *Botanica Marina*, 44, 75-80. (cit. In Magro, 2009).
- Prakash, B., Singh, P., Mishra, P. K., Dubey, N. K. (2012). Safety assessment of *Zanthoxylum alatum* Roxb.essential oil, its antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 183-191. (cit. In Prakash et al., 2015).
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P.K., Dubey, N.K. (2015). Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. *Food Control*, 47, 381-391.

- Qin, Z.G., Wu, X., Deng, G., Yan, X.P., He, X.C., Xi, D.K., Liao, X.W. (2003). Investigation of the use of ozone fumigation to control several species of stored grain insects. In *Advances in stored product protection* (pp. 846-851). Massachusetts: CABI publishing. (cit. In Mohan et al., 2011).
- Quezada, M.Y., Moreno, J., Vazquez, M.E., Mendoza, M., Mendex-Albores, A., Moreno-Martinez, E. (2006). Hermetic storage system preventing the proliferation of *Prostephanus truncatus* Horn and storage fungi in maize with different moisture contents. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 321-326. (cit. In Sudini et al., 2015).
- Rabenhorst, J. (1996). Production of methoxyphenol-type natural aroma chemicals by biotransformation of eugenol with a new *Pseudomonas* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46, 470-474. (cit. In Isman, 2000).
- Radwan, M.M., Tabanca, N., Wedge, D.E., Tarawneh, A.H., Cutler, S.J. (2014). Antifungal compounds from turmeric and nutmeg with activity against plant pathogens. *Fitoterapia*, 99, 341-346.
- Raisuddin, S. (1993). Toxic responses to aflatoxins in a developing host. *Journal of Toxicology Toxin Reviews*, 12, 175-201. (cit. In da Rocha et al., 2014).
- Raper, K.B., Fennell, D.I. (1977). The genus *Aspergillus*. (3rd ed.). New York: Robert E. Krieger Publishing Company.
- Ranasinghe, L., Jayawardena, B., Abeywickrama, K.P. (2002). Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 208–211. (cit. In Matusinsky et al., 2015).
- Ranum, P., Peñha-Rosas, J.P., Garcia-Casal, M.N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1312, 105–112.
- Raut, J.S., Karuppayil, M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250-264.
- Rayner, R.W. (1970). *A Mycological Colour Chart*. Commonwealth mycological institute Kew, Surrey & British Mycological Society.
- Reddy, C. S., Reddy, R. N., Prameela, M., Mangala, U. N., Muralidharan, K. (2007). Identification of antifungal component in clove that inhibits *Aspergillus* spp. colonizing rice grains. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 37(1), 87-94. (cit. In Komala et al., 2012).
- Reddy, N.R., Pierson, M.D., Sathe, S.K., Salunkhe, D.K. (1984). Chemical, nutritional and physiological aspects of dry bean carbohydrates—a review. *Food Chemistry*, 13, 25–68. (cit. In Nichols et al., 2014).
- Resnik, S.L., González, H.L., Pacin, A.M., Viora, M., Cabalero, G.M., Gros, E.G. (1996). Cyclopiazonic acid and aflatoxins production by *aspergillus flavus* isolated from Argentinian corn. *Mycotoxin Research*, 12, 61-66. (cit. In Vaamonde et al., 2006).
- Richardson, K. (1999). Moulds: their effect on nutrition and prevention. In J. Zuxun, L. Quan, L. Yongsheng, T. Xianchang, G. Lianghua (Eds), *Proceedings of the 7th International Working Conference on Stored-Product Protection*, 1 (pp. 255-260). (cit. In Magro, 2001).
- Rios, J.L., Recio, M.C., Villar, A. (1988). Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23, 127–149. (cit. In Burt 2004).

- Robens, J., Riley, R.T. (ed.) (2002). Proceedings of the 1st fungal genomics, 2nd fumonisin elimination and 14th aflatoxin elimination workshops. *Mycopathologia*, 155, 1-164. (cit. In Cousin et al., 2005).
- Robu, V., Covaci, G., Popercu, I.M. (2015). The use of essential oils in organic farming. *Research Journal of Agricultural Science*, 47, (4), 134-137.
- Saleemi, M.K., Khan, M.Z., Khan, A., Javed, I., Ul Hasan, Z., Hameed, M.R., Hameed, S., Mehmood, M.A. (2012). Occurrence of toxigenic fungi in maize and maize-gluten meal from Pakistan, *Phytopathologia Mediterranea*, 51, 1, 219-224.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. (2004). *Introduction to food and airborne fungi*. (7th ed.). Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Andersen, B. (2010). *Food and Indoor Fungi* (1st ed.). Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Savich, I. M., Joldaspaeva, G. M. (1993). Digestibility of corn proteins. *Fiziol. Biokhim. Kult. Rast*, 25, 452-458. (cit. In Zia-Ur-Rehman, 2006).
- Sawamura, M., Thi Minh Tu, N., Onishi, Y., Ogawa, E., & Choi, H. S. (2004). Characteristic odor components of *Citrus reticulata* Blanco (Ponkan) coldpressed oil. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68, 1690-1697. (cit. In Tao et al., 2014).
- Schlatter, C. H., Studer-Rohr, J., Rásonyi, T. H. (1996). Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 13, 43-44. (cit. In da Rocha et al., 2014).
- Schmidt, E. (2010). Production of Essential Oils. In K. H. Başer & G. Buchbauer, *Handbook of essential oils: science, technology and applications* (pp. 83-118). Boca Raton: CRC Press. (cit. In Dima & Dima, 2015).
- Semillas Batlle. Fitofortificante ecológico anti hongos. Consultado em fevereiro 25, 2016, em <http://semillasbatlle.es/es/fitofortificante-ecologico-anti-hongos>.
- Semple, R.L., Frio, A.S., Hicks, P.A., Lozare, J.V. (Eds.). (s.d.). *Mycotoxin prevention and control in foodgrains*. Roma: FAO. Consultado em Janeiro 6, 2016 em <http://www.fao.org/docrep/X5036E/x5036E00.htm#Contents>
- Sharma, N., Tripathi, A. (2006). Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 587-593.
- Sharma, N., Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (V.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 163, 337-344.
- Simmons, E.G. (1967). Typification of *Alternaria*, *Stemphylium* and *Ulocladium*. *Mycologia*, 59, 67-92. (cit. In Pitt & Hocking, 1997).
- Sivakumar, D., Bautista-Baños, S. (2014). A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*, 64, 27-37.
- Snow, D., Crichton, M.H., Wright, N.C. (1944). Mould deterioration of feeding-stuffs on relation to humidity of storage. Part II, The water uptake of feeding-stuffs to different humidities. *Annals of Applied Biology*, 31, 111-116. (cit. In Magro, 2001).
- Soares, C., Calado, T., Venancio, A. (2013). Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 9-13.
- Soil Technologies Corporation. Fungastop - Broad Spectrum Fungicide. Consultado em fevereiro 25, 2016, em <http://www.soiltechcorp.com/product/fungastop/> <http://z-tolerance.com/>

- Sousa, A.H., Faroni, L.R., Guedes, R.N., Tótola, M.R., Urruchi, W.I. (2008) Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect pests of stored products. *Journal of Stored Products Res*, 44, 379-385. (cit. In Mohan et al., 2011).
- Speijers, G.J. (2001). Pulegone and related substances. In JECFA, *Safety evaluation of certain food additives and contaminants*. Who food additives series, 46. Geneva: World Health Organization. Consultado em Abril 17, 2016, em http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v46je10.htm#_46101100
- Srivastava, A.K., Srivastava, S.K., Syamsundar, K.V. (2005). Bud and leaf essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from India and Madagascar. *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 51-53.
- Stević, T., Berić, T., Šavikin, K., Soković, M., Gođevac, D., Dimkić, I., Stanković, S. (2014). Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, 55, 116–122.
- Stoev, S.D., Vitanov, S., Anguelov, G., Petkova-Bocharova, T., Creppy, E.E. (2001). Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a diet containing ochratoxin A and penicillic acid. *Veterinary Research Communications*, 25, 205-223. (cit. In Frisvad et. al., 2006).
- Stroh, J., Wan, M.T., Isman, M.B., Moul, D.J., (1998). Evaluation of the acute toxicity to juvenile pacific coho salmon and rainbow trout of some plant essential oils, a formulated product, and the carrier. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60, 923-930. (cit. In Isman, 2000).
- Sudekum, M., Poppenga, R.H., Raju, N.A., Braselton, W.E. (1992). Pennyroyal oil toxicosis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 200, 817–818. (cit. In Raut & Karuppayil, 2014).
- Sudini, H., Rao, G.V., Gowda, C.L., Chandrika, R., Margam, V., Rathores, A., Murdock, L.L. (2015). Purdue Improved Crop Storage (PICS) bags for safe storage of groundnuts. *Journal of Stored Products Research*, 64, 133-138.
- Sweets, L. (2000). *Stored Grain Fungi*. In <http://agebb.missouri.edu/storage/disease/sgfungi.htm> (cit. In Magro, 2001).
- Svetaz, L., Derita, M., Rodríguez, Ma.V., Postigo, A., Butassi, E., Castelli, Ma.V., Sortino, M., Petenatti, E., Zacchino, S. (2013). Antifungal compounds from latin american plants. In M. Razzaghi-Abyaneh & M. Rai (Eds.), *Antifungal metabolites from plants* (pp.3-26). Heidelberg: Springer.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, 1199-1218. (cit. In Prakash et al., 2015).
- Tan, T.K., Leong, V.F., Jones, E.B. (1981). Sucession of fungi on Wood of *Avicennia alba* and *A. lanata* in Singapore. *Canadian Journal of Botany*, 67, 2686-2691. (cit. In Magro, 2009).
- Tao, N. G., Liu, Y. J., Tang, Y. F., & Zeng, H. Y. (2009). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Citrus reticulata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 45, 437–438. (cit. In Tao et al., 2014).
- Tao, N., jia, L., Zhou, H. (2014). Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*, 153, 265-271.
- Taruvunga, C., Mejia, D., Alvarez, J.S. (2014). *Appropriate Seed and Grain Storage Systems for Small-scale Farmers*. J.S. Alvarez & E. O'Brien (Coord.). Roma:FAO. Consultado em Janeiro 20, 2016, em <http://www.fao.org/3/a-i3769e.pdf>

- Templeton, W. (1969). *An introduction of chemistry of terpenoids and steroids*. London: Butterworths. (cit. In Marei et al., 2012).
- Tongnuanchan, P., Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*, 79(7), 1231-1249.
- Tylkowska, K., Turek, M., Prieto, R.B. (2010). Health, germination and vigour of common bean seeds in relation to microwave irradiation. *Phytopathologia*, 55, 5-12.
- Uebersax, M.A. (2006). *Dry Edible Beans: Indigenous Staple and Healthy Cuisine*. The Forum on Public Policy. (cit. In Nyau, 2014).
- U.S. (2013). *Code of federal regulations*. Título 21, Parte 182, Sección 182.20. (cit. In Prakash et al., 2015).
- Vaamonde, G., Patriarca, A., Pinto, F.V., Comerio, R. Degrossi, C. (2003). Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 79-84.(cit. In Vaamonde et al., 2006).
- Vaamonde, G., Patriarca, A., Pinto, V.E.F. (2006). Effect of water activity and temperature on production of aflatoxin and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* in peanuts. In J.C. Frisvad, U. Thrane, R.A. Samson & J.I. Pitt (Eds), *Advances in food mycology* (pp. 225-235). U.S.A.: Springer.
- Van de Braak, S.A., Leijten, G.C. (1999). *Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union*. Rotterdam : CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries. (cit. In Burt 2004).
- Van Welie, R.T. (1997). *Alle cosmetica ingredienten en hun functies*. Nieuwegein: Nederlandse Cosmetica Vereniging. (cit. In Burt 2004).
- Vigan, M. (2010). Essential oils: renewal of interest and toxicity. *European Journal of Dermatology*, 20(6), 685-692.
- Wagacha, J.M., Muthomi, J.W. (2008). Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 1-12.
- Wallace, H.A. (1973). Fungi and other organisms associated with stored grain. In R.N. Sinha & W.E. Muir (Eds). *Grain storage: part of a system* (pp. 71-98). Connecticut: AVI Publishing Company. (cit. In Magro, 2001).
- Wallace, H.A., Sinha, R.N. (1981). Causal factors operative in distributional patterns and abundance of fungi: a multivariate study. In J. Chelkowski (ed.) (1991). *Cereal grain mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. New York: Elsevier. (cit. In Magro, 2001).
- Williams, S.B., Baributsa, D., Woloshuk, C. (2014). Assessing Purdue Improved Crop Storage (PICS) bags to mitigate fungal growth and aflatoxin contamination. *Journal of Stored Products Research*, 59, 190-196.
- Williams, P., Losa, R. (2001). The use of essential oils and their compounds in poultry nutrition. *World's Poultry Science Journal*, 17, 14–15. (cit. In Erhan et al., 2012).
- Xing, Y., Xu, Q., Li, X., Che, Z., Yun, J. (2012). Antifungal activities of clove oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* in vitro and in wounded fruit test. *Journal of Food Safety*, 32, 84-93. (cit. In Prakash et al., 2015).

Yesuf, M., Sangchote, S. (2005). Occurrence and distribution of major seedborne fungi associated with *Phaseolus* beans seeds in Ethiopia. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 39, 216-225.

Yokoyama, L.P. (2003). Cultivo do feijoeiro comum. *Sistemas de Produção*, 2. Brasil: Embrapa. Consultado em fevereiro 26, 2016, em <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/importancia.htm>

Zabka, M., Pavela, R., Prokinova, E. (2014). Antifungal activity and chemical composition of twenty essential oils against significant indoor and outdoor toxigenic and aeroallergenic fungi. *Chemosphere*, 112, 443-448.

Zhang, J., Wang, T., Zhou, C., Zhang, C. (1997). Changes of wheat protein stored under different conditions. *Zhengzhou Lianggh Xueyuan Xuchao*, 18, 72–76. (cit. In Zia-Ur-Rehman, 2006).

Zohri, A.A., Abdel-Sater, M.A., Ismail, M.A. (1995). Incidence of aflatoxins and mould flora in corn snacks. *Journal of Food Science Technology*, 32, 289-294. (cit. In Pitt & Hocking, 1997).

Zia-Ur-Rehman. (2006). Storage effects on nutritional quality of commonly consumed cereals. *Food Chemistry*, 95, 53–57.

ANEXOS

Anexo I. Classificadores das espécies de plantas, das espécies de insetos e dos gêneros e espécies de fungos.

Quadro I1. Classificadores das espécies de plantas (segundo Natural Resources Conservation Service, s.d.).

Agathosma betulina (Berg.) Pillans	Mentha arvensis L.
Agathosma crenulata (L.) Pillans	Mentha microphylla C. Koch
Cassia fistula L.	Mentha piperita L.
Cinnamomum camphora L.	Mentha pulegium L.
Cinnamomum verum J.Presl	Mentha spicata L.
Cinnamomum zeylanicum L.	Myristica fragrans Houtt.
Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle	Ocimum basilicum L.
Citrus limon (L.) Burm.f.	Ocimum gratissimum L.
Citrus paradisi Macfad.	Ocimum sanctum L.
Citrus reticulata Blanco	Ocimum tenuiflorum L.
Citrus sinensis (L.) Osbeck	Origanum vulgare L.
Coriandrum sativum L.	Pelargonium graveolens L'Hér.
Cupressus funebris Endl.	Peumus boldus Mol.
Curcuma longa L.	Phaseolus vulgaris L.
Cymbopogon nardus (L.) Rendle	Pimenta racemosa (Mill.) J.W.Moore.
Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants	Pimpinella anisum L.
Eucalyptus globulus Labill	Syzygium aromaticum (L.) Merrill & Perry
Gaultheria procumbens L.	Thymus leptobotrys Murb.
Hedeoma multiflora Benth	Thymus satureioides Coss. & Ball.
Illicium verum Hook.f.	Thymus vulgaris L.
Juniperus virginiana L.	Vigna radiata (L.) R. Wilczek
Lavandula angustifolia Mill.	Vigna unguiculata (L.) Walp.
Lippia integrifolia (Griseb.) Hieron	Zea mays L.
Litsea cubeba (Lour.) Pers.	Zieria smithii Jacks

Quadro I2. Classificadores das espécies de insetos (segundo Biological Records Centre, s.d.; Entomological Society of America, 2015).

<i>Acanthoscelides obtectus</i> Say	<i>Prostephanus truncatus</i> Horn.
<i>Blattella germanica</i> L.	<i>Rhyzopertha dominica</i> Fabricius
<i>Callosobruchus maculatus</i> Fabricius	<i>Sitophilus oryzae</i> L.
<i>Ephestia elutella</i> Hübner	<i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky
<i>Mayetiola destructor</i> Say	<i>Sitotroga cerealella</i> Olivier
<i>Musca domestica</i> L.	<i>Tribolium castaneum</i> Herbst
<i>Oryzaephilus surinamensis</i> L.	<i>Zabrotes subfasciatus</i> Boheman

Quadro I3. Classificadores dos géneros de fungos (segundo Pitt & Hocking, 1997; Samson et al., 2004; Mycobank, s.d.).

<i>Acremonium</i> Link	<i>Papularia</i> Fr.
<i>Alternaria</i> Nees:Fr.	<i>Penicillium</i> Link
<i>Ascochyta</i> Libert	<i>Petromyces</i> Malloch & Cain
<i>Aspergillus</i> Fr.:Fr.	<i>Phaeoisariopsis</i> Ferraris
<i>Botrytis</i> P. Micheli:Fr	<i>Phoma</i> Saccardo
<i>Cladosporium</i> Link	<i>Rhizoctonia</i> DeCandolle
<i>Colletotrichum</i> Corda	<i>Rhizopus</i> Ehrenb.
<i>Curvularia</i> Boedjin	<i>Sclerotinia</i> Fuckel
<i>Eurotium</i> Link: Fr.	<i>Stachybotrys</i> Corda
<i>Fusarium</i> Link	<i>Stemphylium</i> Wallr.
<i>Helminthosporium</i> Link	<i>Stenocarpella</i> Sydow & P. Sydow
<i>Lasiodiplodia</i> Ellis & Everh.	<i>Trichoderma</i> Pers.
<i>Macrophomina</i> Petrak	<i>Ulocladium</i> Preuss
<i>Monilia</i> Bonord.	<i>Wallemia</i> Johan-Olsen
<i>Mucor</i> Fresenius	
<i>Paecilomyces</i> Bainier	

Quadro I4. Classificadores das espécies de fungos (segundo Pitt & Hocking, 1997; Samson et al., 2004; Mycobank, s.d.).

<i>Acremonium strictum</i> W. Gams	<i>F. proliferatum</i> (Matsush.) Nirenberg
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	<i>F. semitectum</i> Berk. & Ravenel
<i>A. infectoria</i> E.G. Simmons	<i>F. sporotrichioides</i> Sherb.
<i>A. mali</i> Roberts	<i>F. subglutinans</i> (Wollenw. & Reinking) P.E. Nelson, Toussoun & Marasas
	<i>F. verticillioides</i> (Sacc.) Nirenberg
<i>Ascochyta phaseolorum</i> Saccardo	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griffon & Maubl.
<i>Aspergillus</i> spp. Fr.:Fr.	<i>Macrophomina phaseoli</i> (Maublanc) S.F. Ashby
<i>A. arachidicola</i> Pildain, Frisvad & Samson	
<i>A. candidus</i> Link	<i>Penicillium</i> spp. Link
<i>A. carbonarius</i> (Bainier) Thom	<i>P. aurantiogriseum</i> Dierckx
<i>A. flavus</i> Link	<i>P. brevicompactum</i> Dierckx
<i>A. fumigatus</i> Fresen.	<i>P. chrysogenum</i> Thom
<i>A. glaucus</i> (L.) Link	<i>P. citrinum</i> Thom
<i>A. melleus</i> Yukawa	<i>P. corylophilum</i> Dierckx
<i>A. minisclerotigenes</i> Vaamonde, Frisvad & Samson	<i>P. digitatum</i> (Pers.: Fr.) Sacc.
<i>A. niger</i> van Tiegh. <i>nom. cons.</i>	<i>P. expansum</i> Thom
<i>A. niveus</i> Blochwitz	<i>P. funiculosum</i> Thom
<i>A. nominus</i> Kurtzman, B.W. Horn & Hesselt.	<i>P. glabrum</i> (Wehmer) Westling
<i>A. ochraceus</i> K. Wilh.	<i>P. italicum</i> Wehmer
<i>A. parasiticus</i> Speare	<i>P. oxalicum</i> Currie & Thom
<i>A. parvulus</i> G. Smith	<i>P. pinophilum</i> Hedgcock
<i>A. steynii</i> Frisvad & Samson	<i>P. purpurogenum</i> Stoll
<i>A. sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	<i>P. nordicum</i> Dragoni & Cantoni
<i>A. tamarii</i> Kita	<i>P. raistrickii</i> G. Sm.
<i>A. terreus</i> Thom	<i>P. verrucosum</i> Dierckx
<i>A. ustus</i> (Bainier) Thom & Church	<i>P. viridicatum</i> Westling
<i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	
<i>A. wentii</i> Wehmer	<i>Petromyces alliaceus</i> Malloch & Cain
<i>A. westerdijkiae</i> Frisvad & Samson	
<i>Botrytis cinerea</i> Pers	<i>Phaeoisariopsis griseola</i> (Saccardo) Ferraris
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	<i>Rhizoctonia solani</i> J.G. Kühn
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penzig) Penzig & Saccardo	<i>Rhizopus stonolifer</i> (Ehrenb.: Fr.) Linder
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (Saccardo & Magnus) Briosi & Cavara	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary
<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin	<i>Stachybotrys chartarum</i> (Ehrenb.) S. Hughes
<i>Eurotium chevalieri</i> L. Mangin	
<i>Eurotium rubrum</i> König, Spieckermann & Bremer.	<i>Stenocarpella maydis</i> (Berkeley) B. Sutton
<i>Fusarium cerealis</i> (Cooke) Sacc.	
<i>F. culmorum</i> (W.G.Smith) Sacc.	<i>Ulocladium botrytis</i> Preuss
<i>F. equiseti</i> (Corda) Sacc.	
<i>F. graminearum</i> Schwabe	<i>Wallemia sebi</i> (Fries) Arx
<i>F. langsethiae</i> Torp & Nirenberg	
<i>F. oxysporum</i> Schlecht.	
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> W.C. Snyder & H.N. Hansen	
<i>F. poae</i> (Peck) Wollenw	

Anexo II. Registo fotográfico de alguns isolados

Registo fotográfico da face superior (1) e inferior (2) de alguns isolados em meio de MEA em 7 dias (exceto *Cladosporium* sp. e *E. chevalieri* em 14 dias).

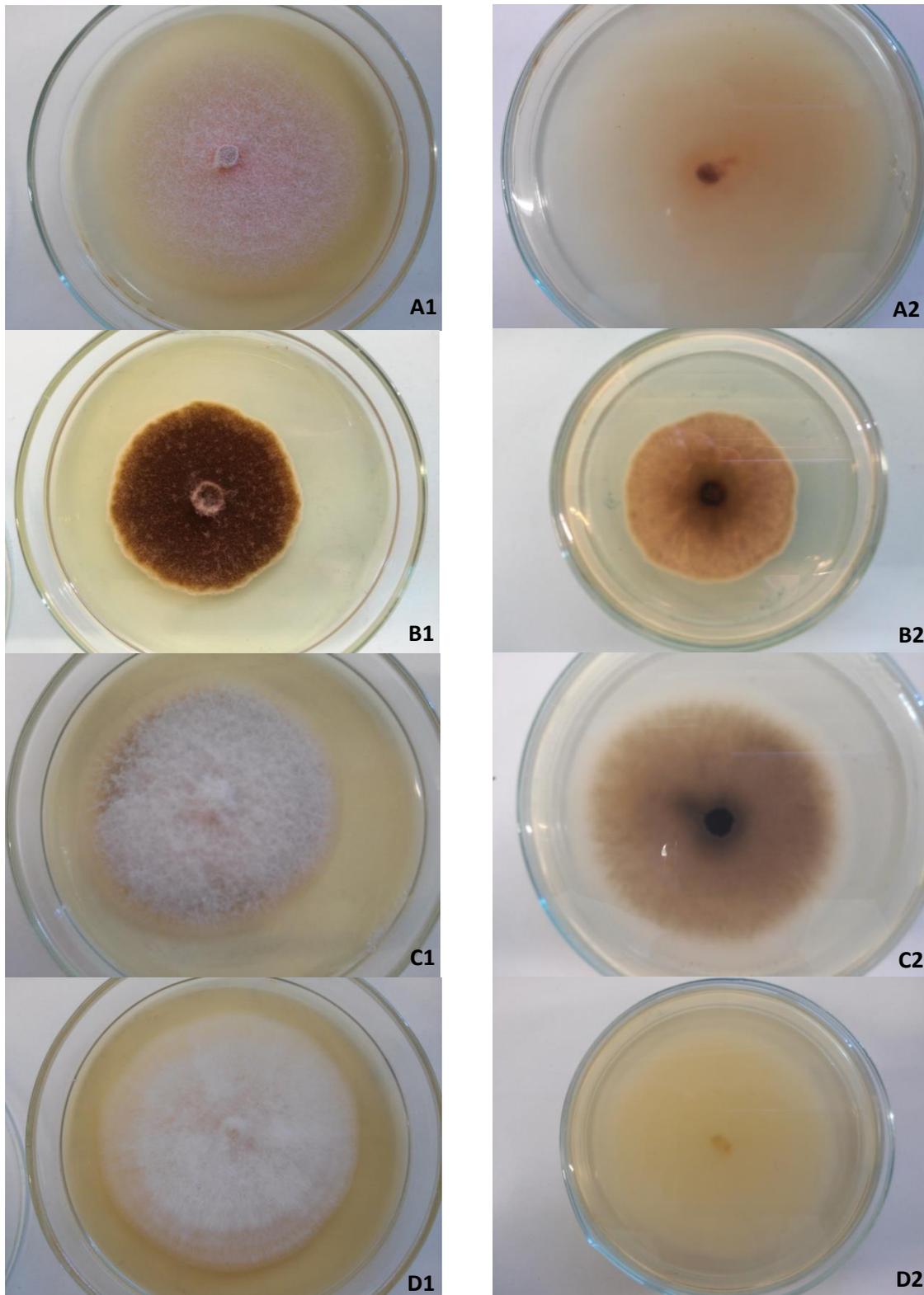


Figura II.1. A1 e A2-*Acremonium* sp.; B1 e B2-*Alternaria alternata*; C1 e C2-*Alternaria infectoria*; D1 e D2-*Aspergillus* spp.

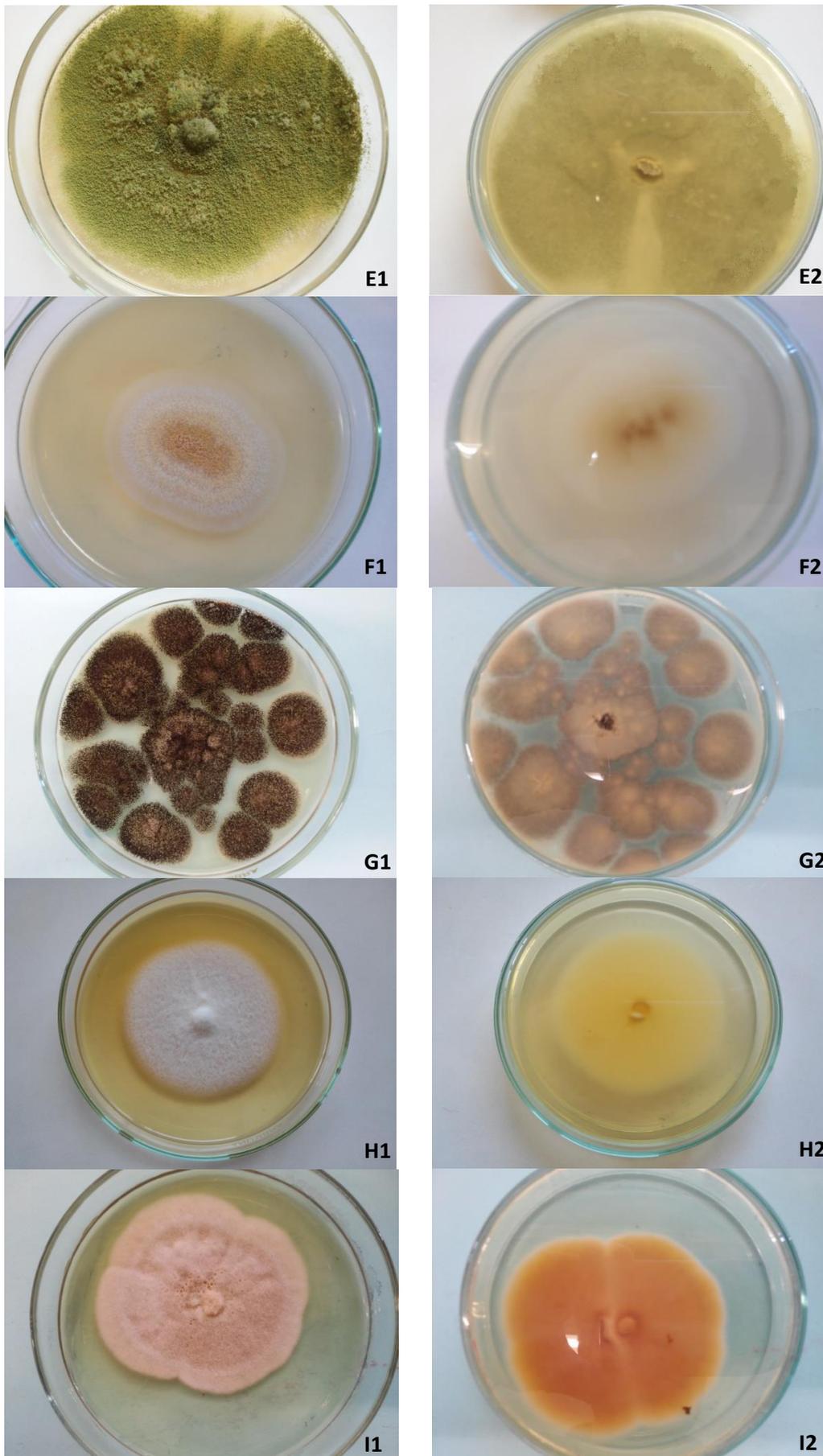


Figura II.2. E1 e E2-*A. flavus*; F1 e F2-*A. melleus*; G1 e G2-*A. niger*; H1 e H2-*A. niveus*; I1 e I2-*A. parvulus*.

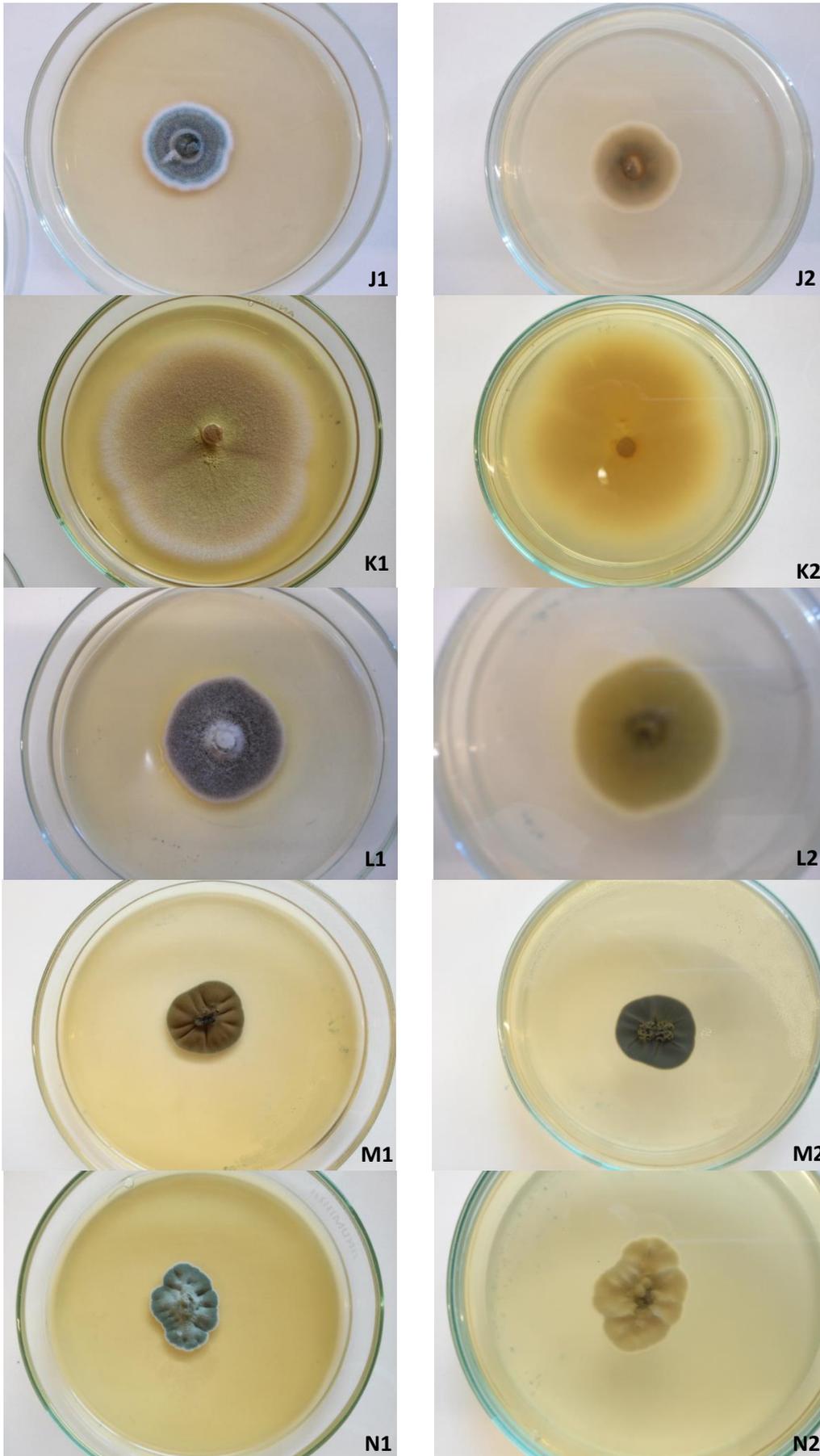


Figura II3. J1 e J2-*A. sydowii*; K1 e K2-*A. terreus*; L1 e L2-*A. ustus*; M1 e M2-*Cladosporium* sp.; N1 e N2-*E. chevalieri*.

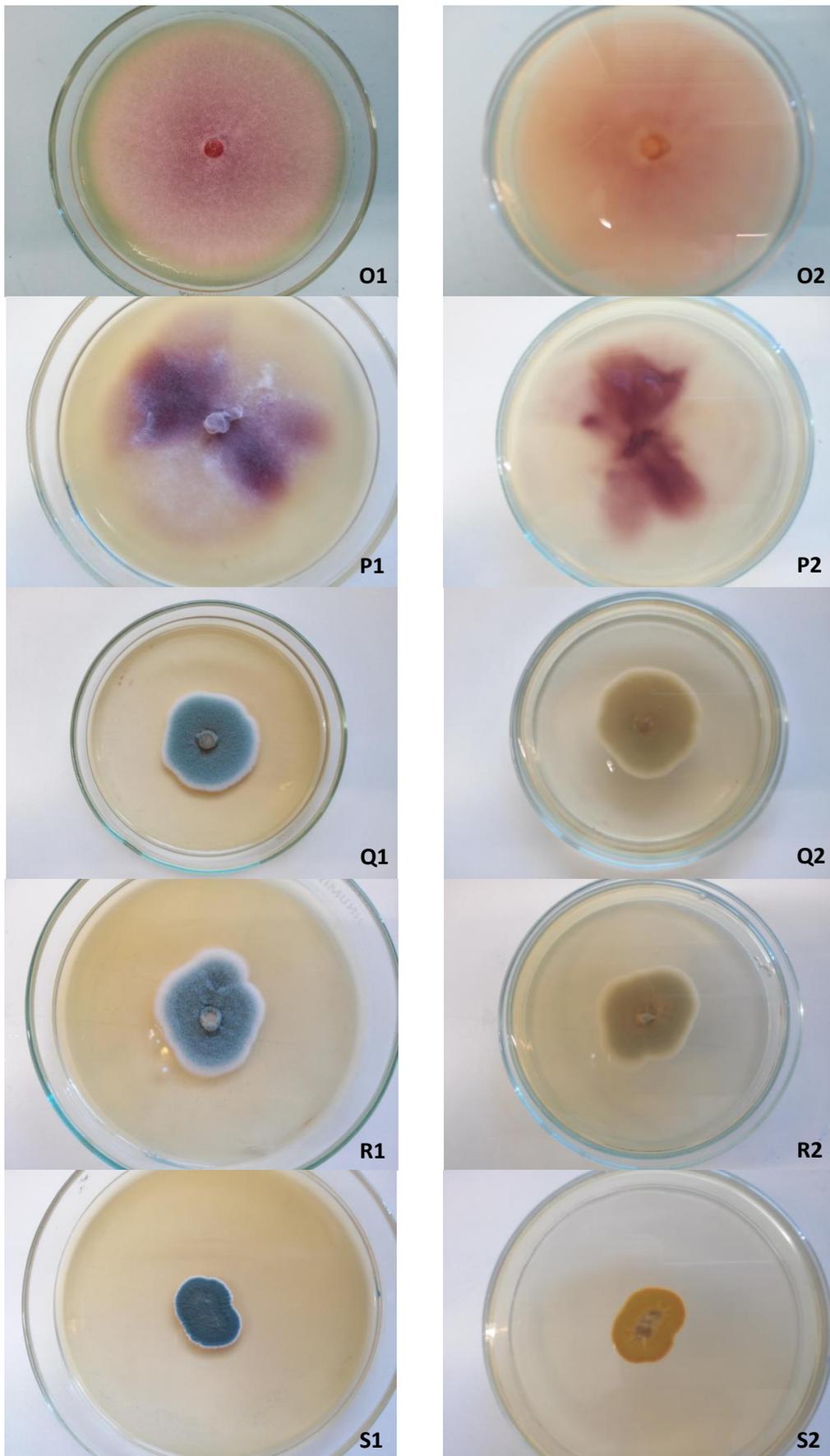


Figura II4. O1 e O2-*F. culmorum*; P1 e P2-*F. oxysporum*; Q1 e Q2-*P. auranteogriseum*; R1 e R2-*P. chrysogenum*; S1 e S2-*P. citrinum*.

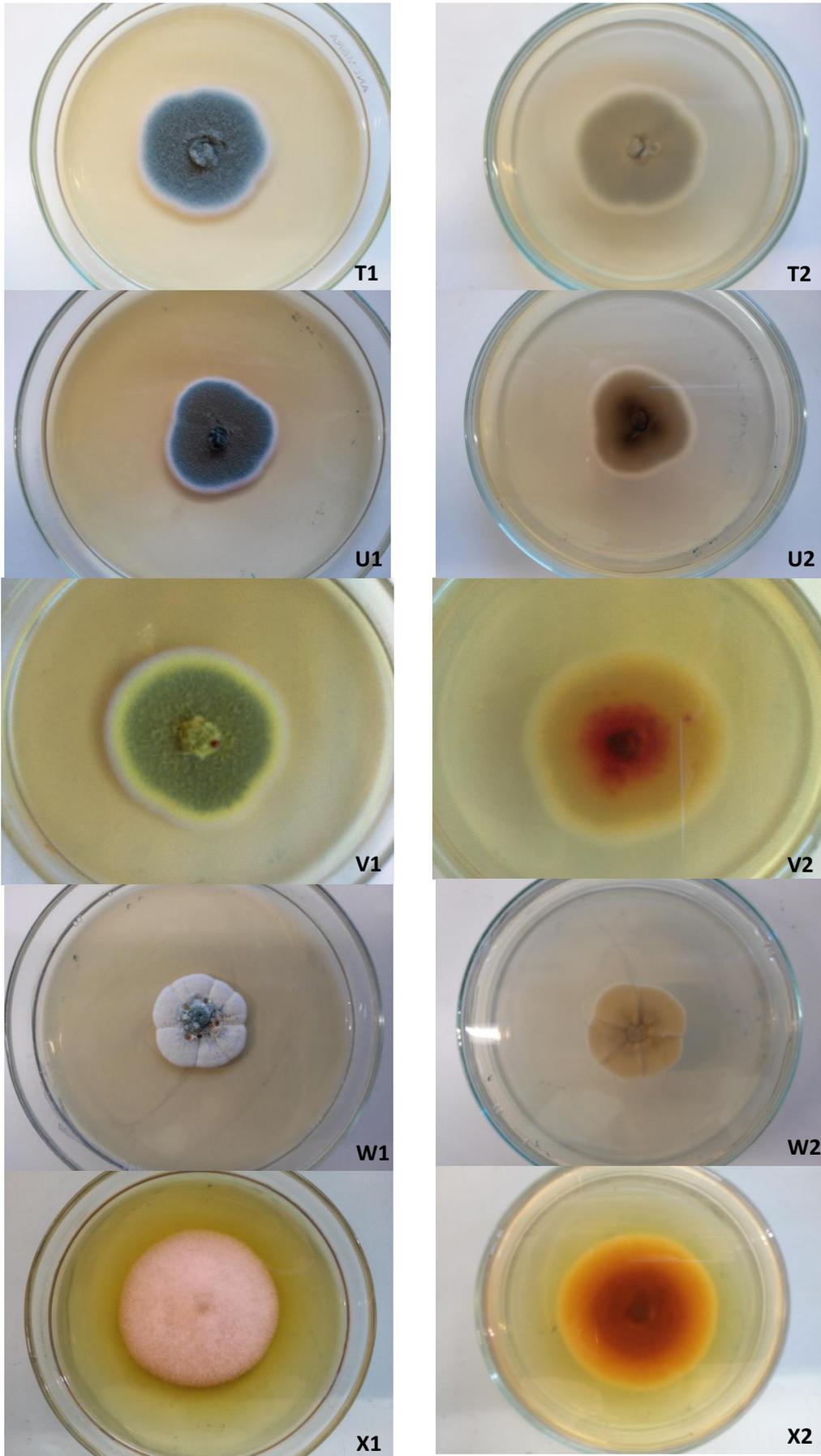


Figura II5. T1 e T2-*P. corylophilum*;U1 e U2-*P. glabrum*; V1 e V2-*P. purpurogenum*;W1 e W2-*P. verrucosum*.;X1 e X2-*Stemphylium* sp.

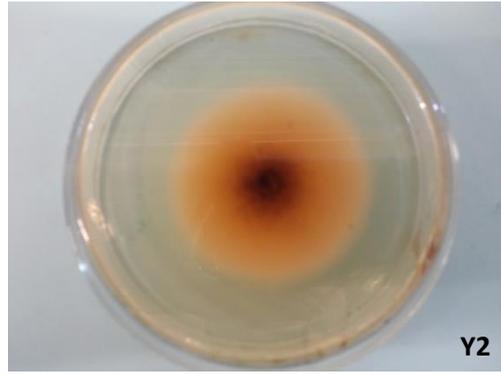
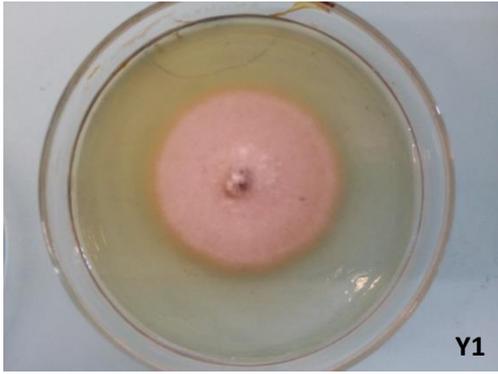


Figura II6. Y1 e Y2-*Ulocladium* sp.

Anexo III. Características biométricas dos isolados

Acremonium sp.

Em meio de MEA, a colônia mostrou, a face superior cor de rosa ténue (Flesh 37⁴), aspecto micelial farinoso, sem zonagem ou exsudado, crescimento regular e face inferior bege (Saffron 10). O diâmetro médio de crescimento da colônia após 7 dias a 28°C foi de 7,5cm.

Micélio vegetativo constituído pr hifas hialinas deptadas regularmente, Fiálides 11,4-25,7 µm; Conídios 5,7-11,4 µm, hialinos, unicelulares, cilíndricos a elipsoidais, agrupados por gota mucilaginosa, parede lisa.

Alternaria alternata

Em meio de MEA, a colônia apresentou, a face superior verde oliva escura (Olevaceous Black 108), densidade do micélio média a forte de aspecto uniforme e feltroso, margem regular e ausência de exsudado e de zonagem. A face inferior mostrou uma cor acastanhada (Greyish Sepia 106). A dimensão da colônia em 7 dias a temperatura de 28°C variou entre 5,6cm de diâmetro médio.

Micélio vegetativo constituído por hifas septadas reglurmente; Conídios 14,3-37,1 x 5,7-12,8 µm, piriformes a clavados, parede lisa a ligeiramente ornamentada, com septos transversais e longitudinais, sendo os transversais mais numerosos que os longitudinais.

Alternaria infectoria

Em meio de MEA, a colônia apresentou, a face superior cinzento pérola (Pale Purplish Gray 127), margem regular, densidade do micélio média de aspecto uniforme cotonoso e ausência de exsudado e zonagem. A face inferior apresentou uma cor cinzento escuro acastanhado (Fuscous Black 104). O diâmetro médio de crescimento da colônia após 7 dias a 28°C foi de 6,4cm.

Micélio vegetativo constituído por hifas septadas reglurmente; Conídios 17,1-31,4 x 5,7-8,6 µm, elípticos a ovóides, parede lisa, com septos transversais.

Aspergillus flavus

Em meio de MEA, a face superior da colônia mostrou-se verde amarelada (Citrine 13), margem regular, micélio de aspecto irregular cotonoso a farinoso com densidade média, por vezes com a presença de esclerócios. A face inferior mostrou uma cor verde com tons de amarelo e cinzento (Greyish Yellow Green 68). O diâmetro médio de crescimento da colônia após 7 dias a 28°C foi de 8,3cm.

Micélio vegetativo hialino, com hifas septadas regularmente; Cabeças conidiogénicas radiadas; Vesículas 11,5-71,3 µm de diâmetro, hialinas, globosas a subglobosas; Conídios 3,7-5,7 µm, hialinos, globosos a subglobosos e equinulados.

Aspergillus melleus

Em meio de MEA, a face superior apresentou uma cor ocre (Ochreous 44) com margem radial de crescimento branca, micélio de densidade média de aspecto farinoso, margem regular e a margem inferior apresentou uma cor amarela (Ambar 47). O diâmetro médio de crescimento da colônia após 7 dias a 28°C foi de 4,0cm.

⁴ Carta de cores de Rayner (1970).

Cabeças conidiogénicas globosas; Vesículas globosas 32,2-46 µm; Métulas 12,8-17,1 µm; Fiálides 8-11,4 µm; Conídios 2,9-3,1 µm, globosos, lisos. Presença de esclerócios globosos com cerca de 300 µm.

Aspergillus niger

Em meio de MEA, a face superior da colónia apresentou uma cor negra fuliginosa (Fuscous Black 104), aspecto micelial farinoso e zonagem ausente. A face inferior mostrou-se de cor cinzenta clara (Greyish Sepia 106). O diâmetro médio de crescimento da colónia após 7 dias a 28°C foi de 8,1 cm.

Cabeças conidiogénicas radiadas; Vesículas 36,3-57,0 µm de diâmetro, globosas a sub-globosas; Conídios 2,9-4,3 µm globosos a subglobosos, castanhos e ornamentados

Aspergillus niveus

Em meio de MEA, a face superior da colónia mostrou-se de cor branca, de aspecto cotonoso, com margem regular. A face inferior apresentou uma cor amarelada (Amber 47). O diâmetro médio de crescimento da colónia após 7 dias a 28°C foi de 6,9 cm.

Micélio vegetativo hialino, com hifas septadas regularmente. Vesículas 8,6-17,1 µm de diâmetro, hemisféricas; Conídios 2,9 µm, esféricos, lisos a levemente rugosos.

Aspergillus parvulus

Em meio de MEA, a face superior mostrou-se de cor bege rosada (Vinaceus Buff 86) de aspecto micelial denso e feltroso, margem regular, com exsudado incolor. A face inferior exibiu uma cor ocre (Ochreous 44). O diâmetro médio de crescimento da colónia após 7 dias a 28°C foi de 6,0 cm.

Cabeças conidiogénicas pequenas e esparsamente radiadas; Vesículas arredondadas em forma de garrafa 8,6-11,4 µm; Fiálides 5,7-11,4 µm; Conídios 2,9-4,3 µm, globosos e lisos.

Aspergillus sydowii

Em meio de MEA, a face superior apresentou uma cor verde acinzentada (Mouse Grey 118), com zonagem radial por vezes em tons azulados e uma margem de crescimento branca e de crescimento regular e um aspecto micelial feltroso. A face inferior apresentou uma cor castanha (Hazel 88). Apresentou exsudados pretos durante a fase de crescimento inicial em meio de PDA. O diâmetro médio de crescimento da colónia após 7 dias a 28°C foi de 2,8 cm.

Micélio vegetativo hialino, com hifas septadas regularmente. Cabeças conidiogénicas radiadas e por vezes bastante reduzidas e simples; Vesículas 7,1-17,1 µm de diâmetro, hialinas, globosas, por vezes espatuladas a subclavadas com paredes ligeiramente rugosas; Conídios 3,2-4,3 µm hialinos, globosos e equinulados.

Aspergillus terreus

Em meio de MEA, a face superior mostrou-se de cor castanha com pigmentos amarelos (Hazel 88) e zonagem radial de crescimento branca, com margem regular, aspecto micelial farinoso. A face inferior apresentou uma cor amarela alaranjada (Luteous 12). O diâmetro médio de crescimento da colónia após 7 dias a 28°C foi de 7,5 cm.

Micélio vegetativo hialino, com hifas septadas regularmente; Cabeças conidiogénicas compactas com aspecto levemente colunar; Vesículas 12,8-17,1 µm de diâmetro, hialinas e subglobosas; Conídios 2,0-3,1 µm, hialinos, globosos e lisos.

Aspergillus ustus

Em meio de MEA, a colônia exibiu uma cor cinzenta arroxeada (Vinaceous Gray 116) na face superior, margem regular, micélio feltroso a cotonoso e cor de mel (Honey 64) na face inferior. O diâmetro médio de crescimento da colônia após 7 dias a 28°C foi de 3,7 cm.

Cabeças conidiogênicas radiadas a hemisféricas; Vesículas subglobosas 5,7-14,3 µm de diâmetro; Métulas 2,9-5,7 µm; Fiálides 5,7-8,6 µm; Conídios 2,9-4,6 µm, globosos, equinulados, acastanhados; Células de hülle abundantes.

Cladosporium sp.

Em meio de MEA, a colônia apresentou uma cor na face superior verde oliva (Olevaceous 44), margem regular, micélio com textura feltrosa e com sulcos. Na face inferior exibiu uma cor verde oliva escuro (Olevaceous Black 108). O diâmetro médio de crescimento da colônia após 14 dias a 28°C foi de 2,0 cm.

Células (ramos) que dão origem aos conídios com 8,6-20,0 µm, cilíndricos. Conídios 5,7-8,6 µm, elipsoidais ou com forma de limão, lisos a ligeiramente rugosos.

Eurotium chevalieri

Em meio de MEA, a colônia apresentou na face superior zonagem radial com uma cor verde oliva acinzentada (Olevaceous Grey 121) na margem e verde oliva acinzentado claro (Pale Olevaceous Grey 120) no centro, frente de crescimento regular, com sulcos e micélio de aspecto feltroso. A face inferior exibiu uma cor de mel (Honey 64). O diâmetro médio de crescimento da colônia após 14 dias a 28°C foi de 2,4 cm.

Cabeças conidiogênicas radiadas devido às cadeias de conídios divergentes; Vesículas 5,7-22,8 µm, globosas; Conídios 2,9 esféricos e equinulados; Cleistotecas 54,2-111,2 µm, alaranjadas, globosas a subglobosas; Ascósporos 5,7-6,3 µm, de forma lenticular, com paredes lisas, surgindo na zona equatorial sulcos salientes em forma de disco.

Fusarium culmorum

Em meio de MEA, a face superior da colônia surgiu de cor roxa clara (Pale Vinaceous 85), com crescimento de margem regular e aspecto micelial farinoso. A face inferior mostrou-se com uma coloração vermelha clara arrozeada (Livid Red 56). O diâmetro médio de crescimento da colônia após 7 dias a 28°C foi de 8,1 cm.

Fusarium oxysporum

Em meio de MEA, a colônia exibiu uma cor na face superior e inferior creme (Buff 45) com zonagem de cor violeta (Livid Vinaceous 83) e violeta escuro (Dark Vinaceous 82), um crescimento de margens regulares, com aspecto micelial farinoso. O diâmetro médio de crescimento da colônia após 7 dias a 28°C foi de 8,4 cm.

Microconídios 4,3-9,1 X 2,9 µm, elipsoidais a cilíndricos, na sua maioria com ausência de septos, desenvolvidos a partir de monofiálides laterais a partir das hifas ou a partir de conidióforos curtos. Macroconídios 20,0-34,2 µm, fusiformes e com 2 a 3 septos. Presença de clamidósporos simples, duplos e em cadeia com diâmetro 8,6-11,4 µm.

Monilia sp.

Em meio de PDA, a colônia apresentou a face superior branca nas zonas de crescimento mais recente e uma cor creme (Buff 45) nas mais antigas, fortemente sulcada, de margem regular e de aspeto micelial cotonoso. A face

inferior exibiu uma cor (Sienna 8). A colónia não se desenvolveu em meio de MEA. Dado que as condições de crescimento em meio de PDA e a 28°C para este isolado não tenham sido as propícias e se ter observado um crescimento da colónia após 14 dias inexistente, foi definido um diâmetro de 0,5 cm correspondente ao inóculo inicial.

Papularia sp.

Em meio de MEA, tanto a face superior como a inferior mostraram-se de cor branca. No entanto após o desenvolvimento dos conídios a colónia foi escurecendo. O crescimento micelial teve um aspecto farinoso de margem regular. O diâmetro médio de crescimento da colónia após 7 dias a 28°C foi de 8,7 cm.

Penicillium aurantiogriseum

Em meio de MEA, a face superior da colónia apresentou-se de cor azul acinzentada (Glaucous Grey 109) com zonagem de crescimento exterior branca, margem regular e aspeto micelial feltroso. A face inferior apresentou uma cor verde acastanhada (Olevaceous Buff 89). O diâmetro médio de crescimento da colónia após 7 dias a 28°C foi de 3,0 cm.

Na maioria terverticilado; Métulas 10,0-14,3 µm de comprimento; Fiálides ampuliformes com 5,7 a 8,6 µm; conídios com 2,9 µm e diâmetro, esféricos e lisos.

Penicillium corylophilum

Em meio de MEA, a colónia apresentou na face superior uma cor verde acinzentada (Olevaceous Gray 121), com zonagem radial branca na margem regular e aspeto micelial feltroso. A face inferior apresentou uma cor verde acastanhada (Olevaceous Buff 89). O diâmetro médio de crescimento da colónia após 7 dias a 28°C foi de 4,0 cm.

Biverticilado mas frequentemente Monoverticilado em meio de MEA; Métulas 10,0-12,8 µm; Fiálides 8,6-11,4 µm ampuliformes; Conídios 2,9-3,4 µm, esféricos e lisos.

Penicillium citrinum

Em meio de MEA, a colónia exibiu uma cor verde escuro acinzentada (Iron Grey 122) na face superior, margem de crescimento branca e regular e aspeto micelial feltroso. A face inferior mostrou-se alaranjada (Luteous 12). O diâmetro médio de crescimento da colónia após 7 dias a 28°C foi de 2,0 cm.

Biverticilado; Métulas 8,6-16,1 µm; Fiálides 4,3-9,1 µm ampuliformes; Conídios 2,6-3,1 µm esféricos a subsféricos lisos em longas e bem definidas cadeias.

Penicillium chrysogenum

Em meio de MEA, a face superior da colónia surgiu verde azulada (Glaucous Blue Green 94), margens regulares com zonagem branca na zona de crescimento mais recente e aspeto micelial feltroso. A face inferior apresentou uma cor verde acastanhada (Olevaceous Buff 89). O diâmetro médio de crescimento da colónia após 7 dias a 28°C foi de 4,0 cm.

Terverticilado; Métulas 8,6 a 14,3 µm; Fiálides ampuliformes 5,7-10,0 µm; conídios 2,9-3,4 µm lisos, elipsoidais, formando cadeias longas e irregulares.

Penicillium glabrum

Em meio de MEA, a colónia apresentou uma face superior com três zonas distintas, a do centro de cor castanha (Greyish sépia 106), a intermédia azul (Leaden Grey 112) e a exterior branca. De margem regular e o aspeto micelial feltroso. A face inferior apresentou uma cor castanha escura (Brown Vinaceous 84) no centro e uma

castanha (Hazel 88) na zona mais nova da colónia. O diâmetro médio de crescimento da colónia após 7 dias a 28°C foi de 3,5 cm.

Monoverticilado com vesícula; Fiálides 11,4-14,3 µm ampuliformes; Conídios 3,1-3,6 µm esféricos a subsféricos, lisos e em longas cadeias bem definidas.

Penicillium purpurogenum

Em meio de MEA, a colónia apresentou na face superior zonagem radial com uma cor verde amarelada (Yellow Green 71) no centro, uma zona nas extremidades amarelada (Primrose 66) e ainda uma zona de crescimento micelial branca. Caracterizou-se pelas margens regulares, presença de exsudado laranja e um aspecto micelial feltroso. A face inferior exibiu uma cor ocre (Ochreous 44) e a produção de corante vermelho. O diâmetro médio de crescimento da colónia após 7 dias a 28°C foi de 4,2 cm.

Biverticilado; Métulas 10,0-12,0 µm; Fiálides 6,3-10,0 µm unidas; Conídios 2,85-3,1 µm elipsoidais, lisos formando cadeias curtas.

Penicillium verrucosum

Em meio de MEA, a colónia exibiu zonagem radial, na face superior, de cor cinzenta no interior (Mouse Gray 118) e creme no exterior (Buff 45), margem regular, com sulcos, exsudado incolor e aspeto micelial feltroso. A face inferior surgiu cor creme (Saffron 10). O diâmetro médio de crescimento da colónia após 7 dias a 28°C foi de 2,8 cm.

Biverticilado e Terverticilado; Métulas 10,0-12,8 µm; Fiálides 7,1-8,6 µm, ampuliformes; Conídios 2,3-2,9 µm esféricos a subsféricos e lisos.

Rhizopus sp.

Em meio de PDA, a colónia apresentou a face superior e inferior de cor cinzenta clara (Pale Purplish Grey 127), margem regular, densidade de micélio fraca, aspeto micelial farinoso. O diâmetro médio de crescimento da colónia após 7 dias a 28°C foi de 9,0 cm.

Micélio constituídos por hifas hialinas asseptadas.

Stemphylium sp.

Em meio de MEA, a face superior apresentou-se com cor branca/creme (Salmon 41), frente de crescimento regular e aspeto micelial cotonoso. A face inferior apresentou duas cores, no centro laranja escuro (Sienna 8) e no resto laranja (Orange 7). Observou-se a produção de corante amarelo. O diâmetro médio de crescimento da colónia após 7 dias a 28°C foi de 5,0 cm.

Conídios 11,4-18,8 µm x 5,7-11,4 µm, solitários, oblongos, arredondados nas extremidades, coloração castanha e com septos transversais e longitudinais.

Ulocladium sp.

Em meio de MEA, a face superior apresentou-se com cor branca/creme (Salmon 41), frente de crescimento regular e aspeto micelial cotonoso. A face inferior apresentou duas cores, no centro avermelhado (Rust 39) e no resto ocre (Ochreus 44). O diâmetro médio de crescimento da colónia após 7 dias a 28°C foi de 5,4 cm.

Conídios 14,3-20,0 x 11,4-17,1 µm solitários, ovoides ou piriformes, acastanhados, lisos e com septos transversais e longitudinais.

Anexo IV. Meios de cultura (retirado de Magro, 2009).

Meio de Agar a 1,5%

- Pesar 15 g de Agar-agar
- Dissolver em 1000 mL de água destilada
- Esterilizar o meio de cultura em autoclave a 121°C durante 15 minutos
- Retirar e colocar em caixas de Petri

Meio de Agar com extrato de folhas de craveiro

- Cortar folhas de craveiro saudáveis, sem traços de fungicidas ou inseticidas, em pedaços de 5 mm imediatamente após a colheita
- Secar a cerca de 70°C durante 2 horas
- As folhas são então esterilizadas por radiação gama ou com óxido de propileno
- Os pedaços estéreis são colocados, em condições de assepsia, em caixas de Petri contendo Meio de Agar (1,5%), previamente preparado.

Meio de Agar com material vegetal

- Cortar fragmentos de folha de gramínea
- Colocar os fragmentos em caixas de Petri
- Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Colocar um fragmento por caixa de Petri contendo Meio de Agar (1,5%), previamente preparado.

Meio de Agar com Extrato de Malte

- Extrato de Malte – 20 g
- Glucose – 20 g
- Peptona – 1 g
- Agar – 15 g
- Água destilada – 1000 mL
- Esterilizar o meio de cultura em autoclave a 115°C durante 45 minutos
- Retirar e colocar 20 mL de meio em caixas de Petri.

Meio de Agar de Batata Dextrosada

- Pesar 39 g do meio de cultura e juntar 1000 mL de água destilada
- Dissolver homogeneamente
- Esterilizar o meio de cultura em autoclave a 121°C durante 15 minutos
- Retirar e colocar 20 mL de meio em caixas de Petri

Anexo V. Composição química dos óleos essenciais de cravinho e de poejo.

As análises químicas dos óleos essenciais de cravinho e poejo foram efetuadas no Centro de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa pela Prof. Doutora Ana Cristina Figueiredo em 2014. Para a quantificação foi utilizado o método de cromatografia gasosa e para a identificação dos compostos ativos foi utilizada cromatografia gasosa combinada com espectrometria de massa, segundo Faria et al. (2014). Os resultados obtidos estão descritos nos Quadros V1 e V2.

Quadro V1. Composição em percentagem do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*.

Compostos	IR	<i>Syzygium aromaticum</i>
Salicilato de metilo	1159	0,1
Eugenol	1327	78,1
α -Cubebeno	1345	0,1
α -Copaeno	1375	0,3
β -Cariofileno	1414	13,4
α -Humuleno	1447	1,5
Acetato de eugenol	1493	5,2
<i>trans,trans</i> - α -Farneseno	1500	0,1
<i>trans</i> -Calameneno	1505	0,1
δ -Cadineno	1505	0,1
Óxido de β -cariofileno	1561	0,4
Epóxido de humuleno*	1580	0,1
% de Identificação		99,5
Compostos agrupados		
Fenilpropanóides		83,3
Sesquiterpenos hidrocarbonados		15,6
Sesquiterpenos oxigenados		0,5
Derivados de ácidos benzóicos		0,1

Nota: (IR) Índices de retenção relativos a uma série de *n*-alcanos C₉-C₁₅, numa coluna DB-1.

Quadro V2. Composição em percentagem do óleo essencial de *Mentha pulegium*.

Compostos	IR	<i>Mentha pulegium</i>
3-Metil-ciclohexanona	914	0,3
α -Pirino	930	0,5
Canfeno	938	t
Sabineno	958	0,1
β -Pirino	963	0,4
3-Octanol	974	0,8
<i>p</i> -Cimeno	1000	t
1,8-Cineole	1005	0,1
Limoneno	1009	0,9
Terpinoleno	1064	0,1
Mentona	1120	0,3
<i>p</i> -Men-3-te-8-ol*	1120	0,8
Isomentona	1126	0,2
Mentofurão	1134	t
<i>cis</i> -Isopulegona	1134	2,5
Pulegona	1207	86,0
Piperitenona	1289	2,2
β -Cariofileno	1414	0,7
α -Humuleno	1447	1,1
Óxido de β -Cariofileno	1561	0,1
Epóxido de Humuleno	1580	0,2
% de Identificação		97,3
Compostos agrupados		
Hidrocarbonetos monoterpénicos		2,0
Monoterpenos oxigenados		92,1
Sesquiterpenos hidrocarbonados		1,8
Sesquiterpenos oxigenados		0,3
Outros		1,1

Nota: (IR) Índices de retenção relativos a uma série de *n*-alcanos C₉-C₁₅, numa coluna DB-1.

Anexo VI. Registo das observações do número de feijões e grãos de milho contaminados por semana.

Quadro VI1. Registo do número de grãos de milho contaminados nos ensaios das misturas de eugenol e pulegona.

Semana	0,75µL/mL:0,75µL/mL		1,0 µL/mL:0,5µL/mL		2,5 µL/mL:2,5µL/mL	
1ª semana	placa 1	2 contaminados	placa 1	sem contaminações	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	1 bact.	placa 2	sem contaminações	placa 2	Sem contaminações
	placa 3	4 contaminados	placa 3	sem contaminações	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	2 contaminados	placa 4	sem contaminações	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	3 contaminados	placa 5	sem contaminações	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	1 contaminado	placa 6	sem contaminações	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	1 contaminado	placa 7	sem contaminações	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	sem contaminações	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	5 contaminados	placa 9	sem contaminações	placa 9	Sem contaminações
	placa 10	sem contaminações	placa 10	sem contaminações	placa 10	Sem contaminações
2ª semana	placa 1	2 contaminados	placa 1	sem contaminações	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	4 bact.	placa 2	sem contaminações	placa 2	Sem contaminações
	placa 3	4 contaminados	placa 3	sem contaminações	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	4 contaminados	placa 4	sem contaminações	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	5 contaminados	placa 5	sem contaminações	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	3 contaminados	placa 6	sem contaminações	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	4 contaminados	placa 7	2 contaminados	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	2 contaminados	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	6 contaminados	placa 9	sem contaminações	placa 9	Sem contaminações
	placa 10	sem contaminações	placa 10	sem contaminações	placa 10	Sem contaminações
3ª semana	placa 1	2 contaminados	placa 1	1 contaminado	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	4 bact.	placa 2	sem contaminações	placa 2	Sem contaminações
	placa 3	4 contaminados	placa 3	sem contaminações	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	4 contaminados	placa 4	1 contaminado	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	5 contaminados	placa 5	sem contaminações	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	3 contaminados	placa 6	1 contaminado	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	4 contaminados	placa 7	2 contaminados	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	2 contaminados	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	6 contaminados	placa 9	sem contaminações	placa 9	1 contaminado
	placa 10	sem contaminações	placa 10	sem contaminações	placa 10	1 contaminado
4ª semana	placa 1	2 contaminados	placa 1	1 contaminado	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	4 bact.	placa 2	sem contaminações	placa 2	Sem contaminações
	placa 3	4 contaminados	placa 3	sem contaminações	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	6 contaminados	placa 4	1 contaminado	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	5 contaminados	placa 5	1 contaminado	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	4 contaminados	placa 6	1 contaminado	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	5 contaminados	placa 7	2 contaminados	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	2 contaminados	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	4 contaminados	placa 9	sem contaminações	placa 9	1 contaminado
	placa 10	1 contaminado	placa 10	sem contaminações	placa 10	1 contaminado

continua

Quadro VI1. Registo do número de grãos de milho contaminados nos ensaios das misturas de eugenol e pulegona (cont.).

5ª semana	placa 1	2 contaminados	placa 1	1 contaminado	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	4 bact.	placa 2	sem contaminações	placa 2	Sem contaminações
	placa 3	4 contaminados	placa 3	sem contaminações	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	6 contaminados	placa 4	1 contaminado	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	5 contaminados	placa 5	1 contaminado	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	4 contaminados	placa 6	1 contaminado	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	5 contaminados	placa 7	2 contaminados	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	2 contaminados	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	tudo contaminado	placa 9	sem contaminações	placa 9	1 contaminado
	placa 10	1 contaminado	placa 10	sem contaminações	placa 10	1 contaminado
6ª semana	placa 1	2 contaminados	placa 1	1 contaminado	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	4 bact.	placa 2	sem contaminações	placa 2	Sem contaminações
	placa 3	4 contaminados	placa 3	sem contaminações	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	6 contaminados	placa 4	1 contaminado	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	5 contaminados	placa 5	3 contaminado	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	4 contaminados	placa 6	2 contaminados	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	5 contaminados	placa 7	2 contaminados	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	2 contaminados	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	tudo contaminado	placa 9	sem contaminações	placa 9	1 contaminado
	placa 10	1 contaminado	placa 10	sem contaminações	placa 10	1 contaminado
7ª semana	placa 1	tudo contaminado	placa 1	1 contaminado	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	10 bact.	placa 2	sem contaminações	placa 2	1 contaminado
	placa 3	tudo contaminado	placa 3	sem contaminações	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	tudo contaminado	placa 4	1 contaminado	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	tudo contaminado	placa 5	3 contaminado	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	4 contaminados	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	tudo contaminado	placa 7	2 contaminados	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	2 contaminados	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	tudo contaminado	placa 9	sem contaminações	placa 9	1 contaminado
	placa 10	tudo contaminado	placa 10	sem contaminações	placa 10	1 contaminado
8ª semana			placa 1	2 contaminados	placa 1	Sem contaminações
			placa 2	sem contaminações	placa 2	1 contaminado
			placa 3	sem contaminações	placa 3	Sem contaminações
			placa 4	2 contaminados	placa 4	Sem contaminações
			placa 5	4 contaminados	placa 5	Sem contaminações
			placa 6	7 contaminados	placa 6	Sem contaminações
			placa 7	2 contaminados	placa 7	Sem contaminações
			placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
			placa 9	sem contaminações	placa 9	1 contaminado
			placa 10	sem contaminações	placa 10	1 contaminado

Continua

Quadro VI1. Registo do número de grãos de milho contaminados nos ensaios das misturas de eugenol e pulegona (cont.).

9ª semana	placa 1	2 contaminados	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	sem contaminações	placa 2	1 contaminado
	placa 3	sem contaminações	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	5 contaminados	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	4 contaminados	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	9 contaminados	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	2 contaminados	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	sem contaminações	placa 9	1 contaminado
	placa 10	sem contaminações	placa 10	1 contaminado
10ª semana	placa 1	3 contaminados	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	sem contaminações	placa 2	1 contaminado
	placa 3	1 contaminado	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	8 contaminados	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	7 contaminados	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	5 contaminados	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	sem contaminações	placa 9	1 contaminado
	placa 10	1 contaminado	placa 10	1 contaminado
11ª semana	placa 1	3 contaminados	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	sem contaminações	placa 2	1 contaminado
	placa 3	1 contaminado	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	8 contaminados	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	7 contaminados	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	5 contaminados	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	sem contaminações	placa 9	1 contaminado
	placa 10	1 contaminado	placa 10	1 contaminado
12ª semana	placa 1	7 contaminados	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	sem contaminações	placa 2	2 contaminados
	placa 3	3 contaminados	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	5 contaminados	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	8 contaminados	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	7 contaminados	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	sem contaminações	placa 9	1 contaminado
	placa 10	sem contaminações	placa 10	1 contaminado

Continua

Quadro VI1. Registo do número de grãos de milho contaminados nos ensaios das misturas de eugenol e pulegona (cont.).

13ª semana	placa 1	8 contaminados	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	sem contaminações	placa 2	3 contaminados
	placa 3	5 contaminados	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	5 contaminados	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	tudo contaminado	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	8 contaminados	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	sem contaminações	placa 9	1 contaminado
	placa 10	sem contaminações	placa 10	1 contaminado
14ª semana	placa 1	tudo contaminado	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	sem contaminações	placa 2	4 contaminados
	placa 3	8 contaminados	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	tudo contaminado	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	tudo contaminado	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	tudo contaminado	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	sem contaminações	placa 9	1 contaminado
	placa 10	1 contaminado	placa 10	1 contaminado
15ª semana	placa 1	tudo contaminado	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	sem contaminações	placa 2	4 contaminados
	placa 3	9 contaminados	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	tudo contaminado	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	tudo contaminado	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	tudo contaminado	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	sem contaminações	placa 9	1 contaminado
	placa 10	1 contaminado	placa 10	1 contaminado
16ª semana	placa 1	tudo contaminado	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	sem contaminações	placa 2	4 contaminados
	placa 3	9 contaminados	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	tudo contaminado	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	tudo contaminado	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	tudo contaminado	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	sem contaminações	placa 9	1 contaminado
	placa 10	2 contaminados	placa 10	1 contaminado

Continua

Quadro VI1. Registo do número de grãos de milho contaminados nos ensaios das misturas de eugenol e pulegona (cont.).

17ª semana	placa 1	tudo contaminado	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	sem contaminações	placa 2	6 contaminados
	placa 3	9 contaminados	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	tudo contaminado	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	tudo contaminado	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	tudo contaminado	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	sem contaminações	placa 9	1 contaminado
	placa 10	3 contaminados	placa 10	1 contaminado
18ª semana	placa 1	tudo contaminado	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	sem contaminações	placa 2	8 contaminados
	placa 3	9 contaminados	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	tudo contaminado	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	tudo contaminado	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	tudo contaminado	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	sem contaminações	placa 9	1 contaminado
	placa 10	5 contaminados	placa 10	1 contaminado
19ª semana	placa 1	tudo contaminado	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	sem contaminações	placa 2	Tudo contaminado
	placa 3	tudo contaminado	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	tudo contaminado	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	tudo contaminado	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	tudo contaminado	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	sem contaminações	placa 9	1 contaminado
	placa 10	5 contaminados	placa 10	1 contaminado
20ª semana	placa 1	tudo contaminado	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	sem contaminações	placa 2	Tudo contaminado
	placa 3	tudo contaminado	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	tudo contaminado	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	tudo contaminado	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	tudo contaminado	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	sem contaminações	placa 9	6 contaminados
	placa 10	6 contaminados	placa 10	1 contaminado

Continua

Quadro VI1. Registo do número de grãos de milho contaminados nos ensaios das misturas de eugenol e pulegona (cont.).

21ª semana	placa 1	tudo contaminado	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	sem contaminações	placa 2	Tudo contaminado
	placa 3	tudo contaminado	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	tudo contaminado	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	tudo contaminado	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	tudo contaminado	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	sem contaminações	placa 9	7 contaminados
	placa 10	6 contaminados	placa 10	1 contaminado
22ª semana	placa 1	tudo contaminado	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	sem contaminações	placa 2	Tudo contaminado
	placa 3	tudo contaminado	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	tudo contaminado	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	tudo contaminado	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	tudo contaminado	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	sem contaminações	placa 9	8 contaminados
	placa 10	tudo contaminado	placa 10	1 contaminado
23ª semana	placa 1	tudo contaminado	placa 1	Sem contaminações
	placa 2	sem contaminações	placa 2	Tudo contaminado
	placa 3	tudo contaminado	placa 3	Sem contaminações
	placa 4	tudo contaminado	placa 4	Sem contaminações
	placa 5	tudo contaminado	placa 5	Sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	Sem contaminações
	placa 7	tudo contaminado	placa 7	Sem contaminações
	placa 8	sem contaminações	placa 8	Sem contaminações
	placa 9	sem contaminações	placa 9	9 contaminados
	placa 10	tudo contaminado	placa 10	1 contaminado

Quadro VI2. Registo do número de feijões contaminados nos ensaios com a concentração de 0,5µL/mL de poejo, pulegona, eugenol e cravinho.

Semana	poejo		pulegona		eugenol		cravinho	
1ª semana	placa 1	sem contaminações	placa 1	sem contaminações	placa 1	sem contaminações	placa 1	1 bact.
	placa 2	3 contaminados	placa 2	sem contaminações	placa 2	1 contaminado	placa 2	1 contaminado
	placa 3	3 contaminados	placa 3	sem contaminações	placa 3	sem contaminações	placa 3	4 bact.
	placa 4	sem contaminações	placa 4	sem contaminações	placa 4	sem contaminações	placa 4	1 contaminado
	placa 5	sem contaminações	placa 5	9 contaminados	placa 5	1 contaminado; 1 bact.	placa 5	3 bact.
	placa 6	6 contaminados	placa 6	sem contaminações	placa 6	2 bact.	placa 6	1 contaminado
	placa 7	4 contaminados	placa 7	sem contaminações	placa 7	1 contaminado; 2 bact.	placa 7	2 bact.
	placa 8	3 contaminados	placa 8	2 contaminados	placa 8	sem contaminações	placa 8	sem contaminações
	placa 9	sem contaminações	placa 9	sem contaminações	placa 9	sem contaminações	placa 9	1 bact.
	placa 10	sem contaminações	placa 10	sem contaminações	placa 10	2 contaminados	placa 10	1 bact.
2ª semana	placa 1	4 contaminados	placa 1	5 contaminados	placa 1	sem contaminações	placa 1	2 bact.
	placa 2	10 contaminados	placa 2	5 contaminados	placa 2	2 contaminados; 1 bact.	placa 2	3 contaminados
	placa 3	4 contaminados	placa 3	1 bact.	placa 3	sem contaminações	placa 3	6 bact.
	placa 4	sem contaminações	placa 4	sem contaminações	placa 4	sem contaminações	placa 4	1 contaminado; 3 bact.
	placa 5	1 contaminado	placa 5	tudo contaminado	placa 5	2 contaminados; 1 bact.	placa 5	7 bact.
	placa 6	9 contaminados	placa 6	2 contaminados	placa 6	tudo são	placa 6	3 contaminados; 1 bact.
	placa 7	7 contaminados	placa 7	2 contaminados	placa 7	7 contaminados; bact.	placa 7	2 bact.
	placa 8	5 contaminados	placa 8	4 contaminados	placa 8	1 contaminado	placa 8	5 bact.
	placa 9	2 contaminados	placa 9	1 contaminado	placa 9	10 bact.	placa 9	6 bact.
	placa 10	sem contaminações	placa 10	2 contaminados	placa 10	4 contaminados	placa 10	9 bact.
3ª semana	placa 1	10 contaminados	placa 1	tudo contaminado	placa 1	sem contaminações	placa 1	3 bact.
	placa 2	10 contaminados	placa 2	6 contaminados	placa 2	3 contaminados; 1 bact.	placa 2	5 contaminados
	placa 3	10 contaminados	placa 3	10 bact.	placa 3	sem contaminações	placa 3	8 bact.
	placa 4	sem contaminações	placa 4	8 contaminados	placa 4	sem contaminações	placa 4	8 contaminados
	placa 5	5 contaminados	placa 5	tudo contaminado	placa 5	2 contaminados; 1 bact.	placa 5	10 bact.
	placa 6	10 contaminados	placa 6	8 contaminados	placa 6	2 contaminados	placa 6	3 contaminados; 7 bact.
	placa 7	10 contaminados	placa 7	tudo contaminado	placa 7	8 contaminados; 2 bact.	placa 7	4 bact.
	placa 8	10 contaminados	placa 8	tudo contaminado	placa 8	3 contaminados	placa 8	7 bact.
	placa 9	10 contaminados	placa 9	2 contaminados	placa 9	10 bact.	placa 9	6 bact.
	placa 10	sem contaminações	placa 10	tudo contaminado	placa 10	5 contaminados	placa 10	10 bact.
4ª semana	placa 1	10 contaminados	placa 1	tudo contaminado	placa 1	sem contaminações	placa 1	3 bact.
	placa 2	10 contaminados	placa 2	7 contaminados	placa 2	3 contaminados; 1 bact.	placa 2	5 contaminados
	placa 3	10 contaminados	placa 3	10 bact.	placa 3	sem contaminações	placa 3	10 bact.
	placa 4	sem contaminações	placa 4	9 contaminados	placa 4	sem contaminações	placa 4	8 contaminados
	placa 5	5 contaminados	placa 5	tudo contaminado	placa 5	2 contaminados; 1 bact.	placa 5	4 bact.
	placa 6	10 contaminados	placa 6	tudo contaminado	placa 6	6 contaminados	placa 6	3 contaminados; 7 bact.
	placa 7	10 contaminados	placa 7	tudo contaminado	placa 7	8 contaminados; 2 bact.	placa 7	8 bact.
	placa 8	10 contaminados	placa 8	tudo contaminado	placa 8	3 contaminados; 5 bact.	placa 8	10 bact.
	placa 9	10 contaminados	placa 9	4 contaminados	placa 9	10 bact.	placa 9	8 bact.
	placa 10	10 bact.	placa 10	tudo contaminado	placa 10	5 contaminados	placa 10	10 bact.

continua

Quadro VI2. Registo do número de feijões contaminados nos ensaios com a concentração de 0,5µL/mL de poejo, pulegona, eugenol e cravinho (cont.).

5ª semana	placa 1	10 contaminados	placa 1	tudo contaminado	placa 1	sem contaminações	placa 1	10 bact.
	placa 2	10 contaminados	placa 2	tudo contaminado	placa 2	5 contaminados; 1 bact	placa 2	5 contaminados
	placa 3	10 contaminados	placa 3	10 bact.	placa 3	sem contaminações	placa 3	10 bact.
	placa 4	sem contaminações	placa 4	tudo contaminado	placa 4	sem contaminações	placa 4	8 contaminados
	placa 5	5 contaminados	placa 5	tudo contaminado	placa 5	2 contaminados; 1 bact.	placa 5	10 bacterias
	placa 6	10 contaminados	placa 6	tudo contaminado	placa 6	tudo contaminado	placa 6	3 contaminados; 7 bact.
	placa 7	10 contaminados	placa 7	tudo contaminado	placa 7	8 contaminados; 2 bact.	placa 7	10 bact.
	placa 8	10 contaminados	placa 8	tudo contaminado	placa 8	3 contaminados; 5 bact.	placa 8	10 bact.
	placa 9	10 contaminados	placa 9	tudo contaminado	placa 9	10 bact.	placa 9	10 bact.
	placa 10	10 bact.	placa 10	tudo contaminado	placa 10	5 contaminados	placa 10	10 bact.
6ª semana	placa 1	tudo contaminado	placa 1	tudo contaminado	placa 1	6 bact.	placa 1	10 bact.
	placa 2	tudo contaminado	placa 2	tudo contaminado	placa 2	9 contaminados; 1 bact	placa 2	5 contaminados
	placa 3	tudo contaminado	placa 3	10 bact.	placa 3	3 contaminados	placa 3	10 bact.
	placa 4	sem contaminações	placa 4	tudo contaminado	placa 4	sem contaminações	placa 4	8 contaminados
	placa 5	5 contaminados	placa 5	tudo contaminado	placa 5	5 contaminados; 1 bact.	placa 5	10 bacterias
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	tudo contaminado	placa 6	tudo contaminado	placa 6	3 contaminados; 7 bact.
	placa 7	tudo contaminado	placa 7	tudo contaminado	placa 7	8 contaminados; 2 bact.	placa 7	10 bact.
	placa 8	tudo contaminado	placa 8	tudo contaminado	placa 8	5 contaminados; 5 bact.	placa 8	10 bact.
	placa 9	tudo contaminado	placa 9	tudo contaminado	placa 9	10 bact.	placa 9	10 bact.
	placa 10	10 bact.	placa 10	tudo contaminado	placa 10	7 contaminados	placa 10	10 bact.

Quadro VI3. Registo do número de feijões contaminados nos ensaios com a concentração de 1,0µL/mL de poejo, pulegona, cravinho e eugenol.

Semana	poejo		pulegona		cravinho		eugenol	
1ª semana	placa 1	sem contaminação	placa 1	sem contaminação	placa 1	sem contaminação	placa 1	1 contaminado; 3 bact.
	placa 2	sem contaminação	placa 2	sem contaminação	placa 2	sem contaminação	placa 2	sem contaminação
	placa 3	sem contaminação	placa 3	sem contaminação	placa 3	sem contaminação	placa 3	sem contaminação
	placa 4	1 contaminado	placa 4	sem contaminação	placa 4	2 bact.	placa 4	sem contaminação
	placa 5	sem contaminação	placa 5	sem contaminação	placa 5	sem contaminação	placa 5	sem contaminação
	placa 6	1 contaminado	placa 6	sem contaminação	placa 6	sem contaminação	placa 6	sem contaminação
	placa 7	sem contaminação	placa 7	sem contaminação	placa 7	sem contaminação	placa 7	sem contaminação
	placa 8	sem contaminação	placa 8	sem contaminação	placa 8	sem contaminação	placa 8	sem contaminação
	placa 9	sem contaminação	placa 9	sem contaminação	placa 9	sem contaminação	placa 9	sem contaminação
	placa 10	1 contaminado	placa 10	sem contaminação	placa 10	sem contaminação	placa 10	sem contaminação
2ª semana	placa 1	sem contaminações	placa 1	sem contaminação	placa 1	sem contaminação	placa 1	2 contaminados; 3 bact.
	placa 2	sem contaminações	placa 2	sem contaminação	placa 2	sem contaminação	placa 2	sem contaminações
	placa 3	sem contaminações	placa 3	sem contaminação	placa 3	sem contaminação	placa 3	sem contaminações
	placa 4	1 contaminado	placa 4	sem contaminação	placa 4	6 bact.	placa 4	1 contaminado
	placa 5	sem contaminações	placa 5	sem contaminação	placa 5	sem contaminação	placa 5	sem contaminações
	placa 6	2 contaminados	placa 6	1 contaminado	placa 6	sem contaminação	placa 6	1 contaminado
	placa 7	sem contaminações	placa 7	sem contaminação	placa 7	sem contaminação	placa 7	sem contaminações
	placa 8	sem contaminações	placa 8	sem contaminação	placa 8	sem contaminação	placa 8	sem contaminações
	placa 9	sem contaminações	placa 9	sem contaminação	placa 9	5 bact.	placa 9	sem contaminações
	placa 10	3 contaminados	placa 10	sem contaminação	placa 10	sem contaminação	placa 10	sem contaminações

Continua

Quadro VI3. Registo do número de feijões contaminados nos ensaios com a concentração de 1,0µL/mL de poejo, pulegona, cravinho e eugenol (cont.).

3ª semana	placa 1	sem contaminações	placa 1	sem contaminações	placa 1	sem contaminação	placa 1	2 contaminados; 3 bact.
	placa 2	sem contaminações	placa 2	1 bact.	placa 2	sem contaminação	placa 2	sem contaminações
	placa 3	sem contaminações	placa 3	1 bact.	placa 3	sem contaminação	placa 3	sem contaminações
	placa 4	4 contaminados	placa 4	sem contaminações	placa 4	10 bact.	placa 4	5 contaminados
	placa 5	1 contaminado	placa 5	1 bact.	placa 5	1 bact.	placa 5	sem contaminações
	placa 6	4 contaminados	placa 6	5 contaminados	placa 6	1 bact.	placa 6	1 contaminado
	placa 7	sem contaminações	placa 7	sem contaminações	placa 7	sem contaminação	placa 7	sem contaminações
	placa 8	2 contaminados	placa 8	sem contaminações	placa 8	sem contaminação	placa 8	sem contaminações
	placa 9	sem contaminações	placa 9	sem contaminações	placa 9	10 bact.	placa 9	sem contaminações
	placa 10	5 contaminados; 5 bact.	placa 10	sem contaminações	placa 10	sem contaminação	placa 10	sem contaminações
4ª semana	placa 1	sem contaminações	placa 1	sem contaminações	placa 1	sem contaminação	placa 1	2 contaminados; 4 bact.
	placa 2	sem contaminações	placa 2	1 bact.	placa 2	sem contaminação	placa 2	sem contaminações
	placa 3	sem contaminações	placa 3	1 bact.	placa 3	sem contaminação	placa 3	sem contaminações
	placa 4	5 contaminados	placa 4	sem contaminações	placa 4	10 bact.	placa 4	5 contaminados
	placa 5	5 contaminados	placa 5	1 bact.	placa 5	8 bact.	placa 5	sem contaminações
	placa 6	8 contaminados	placa 6	6 contaminados	placa 6	7 bact.	placa 6	2 contaminados
	placa 7	sem contaminações	placa 7	sem contaminações	placa 7	sem contaminação	placa 7	sem contaminações
	placa 8	6 contaminados	placa 8	sem contaminações	placa 8	sem contaminação	placa 8	sem contaminações
	placa 9	1 bact.	placa 9	2 bact.	placa 9	10 bact.	placa 9	sem contaminações
	placa 10	5 contaminados; 5 bact.	placa 10	sem contaminações	placa 10	sem contaminação	placa 10	sem contaminações
5ª semana	placa 1	sem contaminações	placa 1	sem contaminações	placa 1	sem contaminação	placa 1	2 contaminados; 8 bact.
	placa 2	sem contaminações	placa 2	2 bact.	placa 2	sem contaminação	placa 2	sem contaminações
	placa 3	sem contaminações	placa 3	1 bact.	placa 3	sem contaminação	placa 3	sem contaminações
	placa 4	5 contaminados	placa 4	sem contaminações	placa 4	10 bact.	placa 4	5 contaminados
	placa 5	tudo contaminado	placa 5	1 bact.	placa 5	10 bact.	placa 5	sem contaminações
	placa 6	9 contaminados	placa 6	7 contaminados	placa 6	10 bact.	placa 6	2 contaminados
	placa 7	1 contaminado	placa 7	sem contaminações	placa 7	sem contaminação	placa 7	sem contaminações
	placa 8	7 contaminados	placa 8	sem contaminações	placa 8	sem contaminação	placa 8	sem contaminações
	placa 9	1 bact.	placa 9	4 bact.	placa 9	10 bact.	placa 9	sem contaminações
	placa 10	5 contaminados; 5 bact.	placa 10	sem contaminações	placa 10	sem contaminação	placa 10	sem contaminações
6ª semana	placa 1	sem contaminações	placa 1	sem contaminações	placa 1	sem contaminação	placa 1	2 contaminados; 8 bact.
	placa 2	sem contaminações	placa 2	2 bact.	placa 2	sem contaminação	placa 2	sem contaminações
	placa 3	sem contaminações	placa 3	1 bact.	placa 3	sem contaminação	placa 3	sem contaminações
	placa 4	6 contaminados	placa 4	sem contaminações	placa 4	10 bact.	placa 4	5 contaminados
	placa 5	tudo contaminado	placa 5	2 bact.	placa 5	10 bact.	placa 5	sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	7 contaminados	placa 6	10 bact.	placa 6	2 contaminados
	placa 7	1 contaminado	placa 7	sem contaminações	placa 7	sem contaminação	placa 7	sem contaminações
	placa 8	7 contaminados	placa 8	sem contaminações	placa 8	sem contaminação	placa 8	sem contaminações
	placa 9	1 bact.	placa 9	10 bact.	placa 9	10 bact.	placa 9	sem contaminações
	placa 10	5 contaminados; 5 bact.	placa 10	sem contaminações	placa 10	sem contaminação	placa 10	sem contaminações

Continua

Quadro VI3. Registo do número de feijões contaminados nos ensaios com a concentração de 1,0µL/mL de poejo, pulegona, cravinho e eugenol (cont.).

22ª semana	placa 1	2 contaminados	placa 1	3 contaminados	placa 1	sem contaminação	placa 1	2 contaminados; 8 bact.
	placa 2	7 contaminados	placa 2	1 contaminado; 9 bact.	placa 2	sem contaminação	placa 2	sem contaminações
	placa 3	sem contaminações	placa 3	10 bact.	placa 3	sem contaminação	placa 3	sem contaminações
	placa 4	tudo contaminado	placa 4	4 contaminados	placa 4	10 bact.	placa 4	7 contaminados
	placa 5	tudo contaminado	placa 5	10 bact.	placa 5	10 bact.	placa 5	sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	tudo contaminado	placa 6	10 bact.	placa 6	3 contaminados
	placa 7	7 contaminados	placa 7	sem contaminações	placa 7	sem contaminação	placa 7	sem contaminações
	placa 8	tudo contaminado	placa 8	4 contaminados	placa 8	sem contaminação	placa 8	sem contaminações
	placa 9	2 contaminados; 8 bact.	placa 9	10 bact.	placa 9	10 bact.	placa 9	sem contaminações
	placa 10	5 contaminados; 5 bact.	placa 10	sem contaminações	placa 10	sem contaminação	placa 10	sem contaminações
23ª semana	placa 1	2 contaminados	placa 1	3 contaminados	placa 1	sem contaminação	placa 1	2 contaminados; 8 bact.
	placa 2	7 contaminados	placa 2	1 contaminado; 9 bact.	placa 2	sem contaminação	placa 2	sem contaminações
	placa 3	sem contaminações	placa 3	10 bact.	placa 3	sem contaminação	placa 3	sem contaminações
	placa 4	tudo contaminado	placa 4	4 contaminados	placa 4	10 bact.	placa 4	7 contaminados
	placa 5	tudo contaminado	placa 5	10 bact.	placa 5	10 bact.	placa 5	sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	tudo contaminado	placa 6	10 bact.	placa 6	4 contaminados
	placa 7	8 contaminados	placa 7	sem contaminações	placa 7	sem contaminação	placa 7	sem contaminações
	placa 8	tudo contaminado	placa 8	4 contaminados	placa 8	sem contaminação	placa 8	sem contaminações
	placa 9	2 contaminados; 8 bact.	placa 9	10 bact.	placa 9	10 bact.	placa 9	sem contaminações
	placa 10	5 contaminados; 5 bact.	placa 10	sem contaminações	placa 10	sem contaminação	placa 10	sem contaminações
24ª semana	placa 1	2 contaminados	placa 1	3 contaminados	placa 1	sem contaminação	placa 1	2 contaminados; 8 bact.
	placa 2	7 contaminados	placa 2	1 contaminado; 9 bact.	placa 2	sem contaminação	placa 2	sem contaminações
	placa 3	sem contaminações	placa 3	10 bact.	placa 3	sem contaminação	placa 3	sem contaminações
	placa 4	tudo contaminado	placa 4	4 contaminados	placa 4	10 bact.	placa 4	7 contaminados
	placa 5	tudo contaminado	placa 5	10 bact.	placa 5	10 bact.	placa 5	sem contaminações
	placa 6	tudo contaminado	placa 6	tudo contaminado	placa 6	10 bact.	placa 6	4 contaminados
	placa 7	9 contaminados	placa 7	sem contaminações	placa 7	sem contaminação	placa 7	sem contaminações
	placa 8	tudo contaminado	placa 8	5 contaminados	placa 8	sem contaminação	placa 8	sem contaminações
	placa 9	2 contaminados; 8 bact.	placa 9	10 bact.	placa 9	10 bact.	placa 9	sem contaminações
	placa 10	5 contaminados; 5 bact.	placa 10	sem contaminações	placa 10	sem contaminação	placa 10	sem contaminações

Quadro VI4. Registo do número de feijões contaminados nos ensaios com a concentração de 2,5µL/mL de poejo, pulegona, cravinho e eugenol.

Semana	poejo		pulegona		cravinho		eugenol	
1ª semana	placa 1	sem contaminações	placa 1	sem contaminações	placa 1	sem contaminações	placa 1	sem contaminação
	placa 2	sem contaminações	placa 2	sem contaminações	placa 2	sem contaminações	placa 2	sem contaminação
	placa 3	sem contaminações	placa 3	sem contaminações	placa 3	sem contaminações	placa 3	sem contaminação
	placa 4	sem contaminações	placa 4	sem contaminações	placa 4	sem contaminações	placa 4	sem contaminação
	placa 5	sem contaminações	placa 5	sem contaminações	placa 5	sem contaminações	placa 5	sem contaminação
	placa 6	sem contaminações	placa 6	sem contaminações	placa 6	sem contaminações	placa 6	sem contaminação
	placa 7	sem contaminações	placa 7	sem contaminações	placa 7	sem contaminações	placa 7	sem contaminação
	placa 8	sem contaminações	placa 8	sem contaminações	placa 8	sem contaminações	placa 8	sem contaminação
	placa 9	sem contaminações	placa 9	sem contaminações	placa 9	sem contaminações	placa 9	sem contaminação
	placa 10	sem contaminações	placa 10	sem contaminações	placa 10	sem contaminações	placa 10	sem contaminação

Continua

