



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI

CAMPUS ALTO PARAÓPEBA

BACHARELADO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Tauane Fernandes Braz

**Avaliação da atividade antifúngica do óleo de sementes e extrato de folhas de
Moringa oleifera sobre espécies produtoras de micotoxinas**

Trabalho de conclusão de curso

OURO BRANCO - MG

2018

Tauane Fernandes Braz

Avaliação da atividade antifúngica do óleo de sementes e extrato de folhas de *Moringa oleifera* sobre espécies produtoras de micotoxinas

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal de São João del Rei - Campus Alto Paraopeba, como requisito para obtenção de título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Orientadora: Doutora Mariana Dias Moreira.

OURO BRANCO - MG

2018

**Avaliação da atividade antifúngica do óleo de sementes e extrato de folhas de
Moringa oleífera sobre espécies produtoras de micotoxinas**

Tauane Fernandes Braz

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Doutora Mariana Dias Moreira – UFSJ
(Orientadora)

Prof. Doutor José Carlos de Magalhães – UFSJ

Profa. Doutora Cristiane Medina Finzi Quintão – UFSJ

Ouro Branco, ____/____/____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conduzir ao longo desta caminhada e por me conceder saúde física e mental para chegar à etapa final da graduação.

A minha família, amigos e namorado, por todo apoio e incentivo, sobretudo na reta final.

Agradeço à professora orientadora Mariana Dias Moreira, não somente pelo direcionamento, mas também pelo incentivo, paciência e otimismo ao longo da elaboração deste trabalho.

À professora Cristiane Medina Finzi Quintão e seus alunos Jean e Rauny por cederem a folhas e o óleo de sementes de moringa.

Agradeço aos professores José Carlos de Magalhães e Enio Nazaré de Oliveira Júnior, responsáveis pelos laboratórios nos quais os experimentos foram realizados e aos técnicos Priscila e Wesley pelo suporte prestado.

RESUMO

Várias etapas do processamento de alimentos, como cultivo, colheita ou armazenamento, estão susceptíveis à contaminação por microrganismos, principalmente de fungos filamentosos. A presença de fungos filamentosos em alimentos é preocupante, não somente pelo rápido crescimento e decomposição, mas também pela possível presença de espécies produtoras de micotoxinas. A indústria alimentícia dispõe de diversos métodos físicos e químicos de conservação, os quais são empregados a fim de inibir a proliferação de microrganismos. Dentre eles, os agentes químicos antimicrobianos ainda são muito empregados, porém, a utilização dos antimicrobianos sintéticos tem sido questionada quanto a seus efeitos na saúde humana e no meio ambiente. Os antimicrobianos de origem natural surgem como alternativa aos antimicrobianos sintéticos, podendo ser aplicados na conservação de alimentos, na formulação de cosméticos e medicamentos. Nas últimas décadas, a moringa (*Moringa oleifera*), se tornou alvo de pesquisas, sobretudo quanto às suas propriedades antimicrobianas. O presente trabalho avaliou a atividade antifúngica da *Moringa oleifera* sobre as espécies de fungos produtores de micotoxinas *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus parasiticus*, verificando o potencial fungistático e fungicida do óleo das sementes de moringa e do extrato das folhas de moringa. Constatou-se que o óleo de sementes de moringa e o extrato de folhas de moringa atuam na inibição de fungos *A. flavus*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus* e *A. parasiticus*, apresentando maior percentual de inibição sobre *A. carbonarius* e *A. ochraceus*. O óleo de sementes de moringa apresentou concentração mínima inibitória de 100 mg/mL sobre os fungos *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* e concentração mínima fungistática de 100 mg/mL sobre *Aspergillus carbonarius*. O extrato de folhas de moringa apresentou concentração mínima inibitória de 3 mg/mL sobre os fungos *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* e concentração mínima fungistática de 3 mg/mL sobre *Aspergillus carbonarius*. Ambos os tratamentos apresentaram percentual de inibição abaixo de 90% sobre os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, impossibilitando a determinação das concentrações mínimas inibitórias sobre estes fungos. Nas concentrações testadas, o óleo de sementes de moringa e o extrato de folhas de moringa não apresentaram atividade fungicida.

Palavras-chave: *Moringa oleifera*, *Aspergillus sp.*, micotoxinas, antifúngico, fungicida.

ABSTRACT

Several stages of food processing, such as cultivation, harvesting or storage, are susceptible to contamination by microorganisms, especially filamentous fungi. The presence of filamentous fungi in food is worrying, not only for the rapid growth and decomposition, but also for the possible presence of mycotoxins producing species. The food industry has several physical and chemical methods of conservation, which are employed in order to inhibit the proliferation of microorganisms. Among them, antimicrobial chemical agents are still widely used, but the use of synthetic antimicrobials has been questioned about their effects on human and environment health. Natural antimicrobials are an alternative to synthetic antimicrobials, and can be applied to food preservation, cosmetics and medicines. In the last decades, moringa (*Moringa oleifera*), has become the target of research, mainly regarding its antimicrobial properties. The present work evaluated the antifungal activity of *Moringa oleifera* on the species of mycotoxins producing fungi *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*. . It was verified that the moringa seeds oil and the moringa leaves extract act in the inhibition of fungi *A. flavus*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus* and *A. parasiticus*, with a higher percentage of inhibition against *A. carbonarius* e *A. ochraceus*. Moringa seed oil showed minimal inhibitory concentration of 100 mg/mL against the fungi *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* and minimal fungistatic concentration of 100 mg / mL against *Aspergillus carbonarius*. The extract of moringa leaves presented minimum inhibitory concentration of 3 mg/mL against the fungi *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* and minimal fungistatic concentration of 3mg/mL against *Aspergillus carbonarius*. Both treatments showed a percentage of inhibition below 90% on the fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, making the determination of minimal inhibitory concentrations impossible. At the concentrations tested, the moringa seed oil and the moringa leaf extract showed no fungicidal activity.

Key words: *Moringa oleifera*, *Aspergillus* sp., Mycotoxins, antifungal, fungicide.

LISTA DE ABREVIATURAS

A. parasiticus – *Aspergillus parasiticus*

ANVISA – Agência Nacional de Saúde

C. albicans – *Candida albicans*

A. carbonarius – *Aspergillus carbonarius*

CMI – Concentração mínima inibitória

CLSI – Clinical and laboratory standards institute

DNA – ácido desoxirribonucleico

E. xoccosum – *Epidermophyton xoccosum*

Fab – fragmento de ligação de antígeno.

A. flavus – *Aspergillus flavus*

HDRA – Henry Doubleday Research Association

IARC – International Agency for Research on Cancer

M. canis – *Microsporum canis*

A. ochraceus – *Aspergillus ochraceus*

OTA – Ocratoxina A

sp. – *specie*

T. mentagrophytes – *Trichophyton mentagrophytes*

T. rubrum – *Trichophyton rubrum*

WHO – World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vagem de <i>Moringa oleifera</i>	18
Figura 2. Sementes de <i>Moringa oleifera</i>	18
Figura 3. Folhagem de <i>Moringa oleifera</i>	19
Figura 4. Flores de <i>Moringa oleifera</i>	19
Figura 10. Solução de extrato de folhas de moringa de concentração 6 mg/mL	38
Figura 11. Óleo de sementes de moringa.	39
Figura 12. Solução de óleo de semente de moringa de concentração 400 mg/mL ...	40
Figura 13. Percentual de inibição do óleo de sementes de moringa nas concentrações 100, 50 e 25 mg/mL sobre os fungos <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	42
Figura 15. Resultado do teste de concentração mínima fungicida do óleo de sementes de moringa ao final de 7 dias de incubação das placas.	45
Figura 16. Resultado do teste de concentração mínima fungicida do extrato de folhas de moringa após 7 dias de incubação das placas.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade antimicrobiana de derivados de <i>Moringa oleifera</i> descritos em literatura.....	21
Tabela 2. Análise qualitativa de fitoquímicos de extratos etanólicos obtidos a partir de vagens de <i>Moringa oleifera</i>	22
Tabela 3. Composição do óleo de moringa.	24
Tabela 4. Principais substratos alvos de fungos produtores de micotoxinas e principais efeitos das respectivas micotoxinas em homens e animais.....	26
Tabela 5. Percentual de inibição do óleo de semente de moringa e do extrato de folhas de moringa sobre os fungos <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	41

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
2. Referencial teórico.....	14
2.1. Antimicrobianos naturais e suas aplicações industriais	14
2.2. Compostos bioativos em vegetais	16
2.3. Moringa e suas propriedades antimicrobianas.	17
2.4. Micotoxinas e alimentos.....	25
2.5. Fungos filamentosos produtores de micotoxinas	27
3. Objetivos.....	31
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. Metodologia	32
4.1. Preparo do extrato de folhas de moringa.....	32
4.2. Preparo da solução de óleo de moringa	33
4.4. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos compostos bioativos da moringa.....	33
4.5. Determinação das concentrações mínimas fungicida e fungistática do óleo de sementes de moringa e do extrato de folhas de moringa.	36
5. Resultados e discussão.....	37
5.1. Extrato de folhas de moringa	37
5.2. Solução de óleo de moringa	38
5.3. Concentração mínima inibitória (CMI) do óleo de sementes de moringa e do extrato de folhas de moringa	40
5.4. Concentrações mínimas fungicida e fungistática do óleo de sementes de moringa e do extrato de folhas de moringa.....	43
6. Conclusão.....	48
7. Referências.....	49

1. Introdução

Nas últimas décadas, a busca pela redução de aditivos químicos antimicrobianos na indústria alimentícia tem sido constante, bem como tem sido crescente o número de microrganismos resistentes aos antimicrobianos sintéticos convencionais. (NAZZARO et al., 2017)

A contaminação microbiana sempre foi uma grande preocupação para a agroindústria. Devido suas características altamente nutricionais, os alimentos estão suscetíveis à proliferação de microrganismos, os quais atuam na deterioração dos produtos alimentares, tornando-os impróprios para consumo.

Seja no cultivo, na colheita ou no armazenamento, diversas culturas estão susceptíveis à proliferação de fungos filamentosos, mais do que a bactérias e leveduras. (EVANGELISTA, 2008; IMANAKA, OLIVEIRA e TANIWAKI, 2010) A contaminação dos alimentos por fungos filamentosos se torna preocupante, não somente pela rápida proliferação, mas também pela produção de micotoxinas. (BENNETT, 1987)

Micotoxinas são compostos químicos tóxicos, produzidos naturalmente por fungos filamentosos como metabólitos secundários. Apresentam grande diversidade química, sendo assim agrupados somente pela característica de toxicidade a humanos e outros vertebrados. (BENNETT, 1987) Dentre as mais de 400 toxinas já catalogadas, as de maior ocorrência em alimentos são as aflatoxinas, citrinina, ergotamina, fumonisinas, ocratoxina, patulina, zearalenona e tricotecenos. (SOARES, ABRUNHOSA e VENÂNCIO, 2013; BENNETT e KLICH, 2003) Micotoxinas estão presentes em diversas culturas, como cereais, frutas e grãos, sendo persistentes em sucos e vinhos. (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2009)

Atualmente, a indústria alimentícia dispõe de diversos métodos físicos e químicos de conservação, os quais são empregados a fim de inibir a proliferação de microrganismos e manter as características físicas, sensoriais e nutricionais. Dentre eles, os agentes químicos antimicrobianos ainda são muito empregados na indústria de alimentos. (ORDONEZ et al., 2005)

Apesar de garantir a segurança alimentar dos produtos, a utilização dos antimicrobianos sintéticos tem sido questionada quanto a seus efeitos na saúde

humana e no meio ambiente. (PERIAGO e MOEZELAAR, 2001; SPADOTTO, 2009) Dessa forma, a busca por novas moléculas antimicrobianas de origem natural tem sido alvo de pesquisas científicas. O reino vegetal tem se destacado devido à grande variedade de espécies e presença de fitocompostos bioativos. Plantas com propriedades antimicrobianas têm sido empregadas desde o princípio da humanidade, seja na medicina tradicional, na conservação de alimentos ou no combate a pragas. O conhecimento empírico sobre as propriedades dessas espécies tem sido passado ao longo das gerações, e atualmente servem de guia para estudos que buscam comprovar, cientificamente, sua atividade antimicrobiana. (FILHO e YUNES, 1997)

Os antimicrobianos de origem natural surgem como alternativa aos antimicrobianos sintéticos, podendo ser aplicados não somente na conservação de alimentos, mas também na formulação de cosméticos bioativos, medicamentos antibacterianos e antifúngicos e até mesmo ser incorporado em curativos e próteses cirúrgicas. (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010 A. 2010b, SIMONETTI, 2006)

Algumas espécies já conhecidas popularmente, têm suas propriedades antimicrobianas comprovadas na literatura, como Capim limão (*Cymbopogon citratus*), hortelã pimenta (*Mentha piperita* L.), erva cidreira (*Lippia alba*), Gengibre (*Zingiber officinalles*) e açafrão (*Curcuma longa*). (CORTEZ ET AL, 2015; RAMOS et al. 2017; SOARES, 2009) Nas últimas décadas, a moringa (*Moringa oleifera*) se tornou alvo de pesquisas, sobretudo quanto suas propriedades antimicrobianas. Husnan e Alkahtani (2016) demonstrou a atividade inibitória do extrato de folhas de moringa sobre *Bacillus cereus*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus cloacae*; *Salmonella typhi*, *Alternaria sp.*, *Proteus vulgaris*, *Aspergillus. niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium italicum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*. Riad e Abdallah (2014) confirmaram a atividade antimicrobiana do extrato e óleo de sementes de moringa sobre *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Altenaria solani*, *Altenaria alternate*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Macrophomina phaseolina*.

Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica da *Moringa oleifera* sobre fungos *Aspergillus sp.* produtores de micotoxinas, verificando o potencial fungistático e fungicida do óleo das sementes

de moringa e do extrato de folhas de moringa a partir da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima fungicida (CMF) do óleo de sementes de moringa e do extrato de folhas de moringa sobre os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus parasiticus*.

2. Referencial teórico

2.1. Antimicrobianos naturais e suas aplicações industriais

Desde o princípio da humanidade, produtos naturais são empregados pelo homem, seja para fins medicinais, controle de pragas, fins cosméticos ou conservação de alimentos. Porém, com o avanço tecnológico e a evolução dos processos de síntese química, os fitocompostos cederam lugar aos compostos sintetizados quimicamente.

Contudo, nas últimas décadas, nota-se um crescente movimento defensor de produtos de origem natural, impulsionando a pesquisa e desenvolvimento de produtos bioativos em diferentes setores da indústria. Tal crescimento pode estar relacionado à evolução científica, sobretudo dos estudos químicos e farmacológicos destinados a comprovar a eficácia terapêutica de plantas medicinais tradicionalmente empregadas na medicina popular (FILHO e YUNES, 1997)

Na indústria farmacêutica, as plantas medicinais apresentam importante papel no desenvolvimento de medicamentos à base de fitocompostos. Plantas medicinais são aquelas capazes de tratar enfermidades, sendo empregadas popularmente como chás ou infusões. A partir do momento que determinada planta medicinal é industrializada para se obter um medicamento, tem-se o fitoterápico. (ANVISA, 2016)

Estimava-se em 2011, que em torno de 25% dos medicamentos atuais são desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de plantas, sobretudo pela aplicação da medicina popular aos conceitos científicos e tecnológicos atuais. (CALIXTO et al., 2001) Grande parte da população brasileira utiliza de produtos à base de plantas medicinais em seus cuidados com a saúde, seja apoiado aos conhecimentos da medicina tradicional ou aos sistemas oficiais de saúde, sob os princípios e diretrizes do Sistema Único de Saúde (SUS). (BRASIL, 2012)

Em 2016 a ANVISA publicou o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira, visando orientar a prescrição de plantas medicinal e fitoterápica, catalogando 29 espécies segundo seu nome científico e popular. Este documento foi baseado em conteúdos científicos e apresenta informações quanto a indicação terapêutica, posologia, contraindicações, entre outras informações destinadas a orientar a

prescrição destas espécies para fins terapêuticos. Dentre as espécies catalogados se encontram fitoterápicos indicados no tratamento de doenças do trato respiratório, depressão, queimaduras, doenças do trato gastrointestinal, doenças venosas, entre outras; como alternativa ou complemento aos medicamentos sintetizados quimicamente; além de compostos indicados como antissépticos e antimicrobianos. (ANVISA, 2016)

O conhecimento e comprovação da atividade antimicrobiana de fitocompostos vêm sendo alvo de estudos nas últimas décadas, sobretudo com o crescente desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos tradicionais.

Óleos e extratos vegetais com propriedades antimicrobianas já vêm sendo aplicados em próteses dentárias e é crescente o estudo para aplicação destes compostos bioativos em revestimentos de próteses cirúrgicas, a fim de evitar a formação de biofilmes e rejeição (ARAÚJO, 2014; SIMONETTI, 2006) Para isso tem sido estudada a geração de nanopartículas a partir de extratos vegetais. Além de facilitar a aplicação em diversos materiais, o tamanho extremamente reduzido das nanopartículas podem intensificar as propriedades bioativas da planta. Nanopartículas de prata já são reconhecidas como antimicrobianas e vem sendo associadas à conservação de alimentos. (SAORIN, 2015) Porém Araújo (2014) demonstrou ser possível produzir nanopartículas bioativas a partir da goma de cajueiro, sendo o primeiro estudo a comprovar a eficácia desse tipo de nanopartícula na inibição de fungos e bactérias.

Os fitocompostos encontrados nas plantas medicinais são empregados não somente na indústria farmacêutica, mas também na indústria cosmética. Extratos de vegetais são aplicados como base na elaboração de cosméticos; seja por suas propriedades hidratantes, emolientes, aromáticas, antioxidantes, corantes ou antimicrobianas. (RUIVO, 2012) A escolha de extratos ou compostos de plantas é baseada em diversos fatores, como atividade biológica, estabilidade e sinergia, avaliação toxicológica, entre outros aspectos; de modo a garantir estabilidade, segurança e eficiência do produto final. (SANTOS, CORREA e CORILLI, 2015)

Os antimicrobianos naturais, capazes de inibir o crescimento de fungos, bactérias e leveduras, vêm sendo empregados tanto na agroindústria quanto na indústria de alimentos e bebidas, de forma a garantir a segurança alimentar e

qualidade dos alimentos. Especiarias e óleos essenciais são empregados na indústria alimentícia como conservantes naturais, uma vez que possuem ação antimicrobiana, reduzindo ou eliminando as bactérias patogênicas e prolongando o tempo de prateleira dos alimentos. (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010b)

Há anos o uso de compostos naturais vem crescendo, sobretudo, na indústria Europeia, sendo combinados com outras técnicas de controle, como a análise de riscos e o controle de pontos críticos. Em alguns países, como a Nigéria, extratos naturais com propriedades conservantes são mais utilizados do que os antimicrobianos sintéticos. (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010b)

2.2. Compostos bioativos em vegetais

Óleos vegetais são óleos naturais, extraídos de sementes, castanhas e algumas frutas e são constituídos principalmente de triacilgliceróis e pequenas quantidades de mono e diacilgliceróis, as quais variam de acordo com a espécie e parte vegetal empregada. (NELSON, 2011). Os óleos vegetais são comumente empregados na indústria de alimentos e cosméticos, devido suas propriedades nutricionais e hidratantes. A prensagem a frio é a maneira mais simples de se obter óleos vegetais, mas em casos de difícil extração e para obtenção de óleos de maior pureza, empregam-se os métodos de extração por solvente ou métodos mais elaborados, como extração por fluido pressurizado, a extração com fluido supercrítico, a extração por microondas e extração por sonicação. (Fonseca, 2012)

Diferentemente dos óleos vegetais, os óleos essenciais são compostos voláteis de composição complexa. (KOKETSU E GONÇALVES, 1991) Portanto, no ponto de vista físico-químico, óleos essenciais não podem ser considerados óleos, sendo assim chamados devido à hidrofobicidade e lipossolubilidade características. Segundo Bajpai et al.(2008), citado por Valeriano et al. (2012) “os óleos essenciais são constituídos por uma mistura de compostos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, e derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, éster, éteres, cetonas, fenóis e óxidos)”. Os óleos essenciais podem ser obtidos a partir de diferentes partes da planta; flores, folhas, caule, sementes e frutos; por destilação a vapor ou hidrodestilação. (KOKETSU e GONÇALVES, 1991)

Muitas vezes, a extração de óleos vegetais e óleos essenciais apresentam baixo rendimento. Neste caso podem-se extrair os compostos ativos da planta por meio de

preparações concentradas chamadas de extratos vegetais. Os extratos vegetais são comumente preparados a partir de matérias-primas secas, como caule, folhas, flores ou raízes; as quais são maceradas e submetidas à extração por solvente. Após determinado tempo de extração, a solução é filtrada e submetida à evaporação para remoção total ou parcial do solvente. (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2010a)

Tanto os óleos e extratos vegetais quanto os óleos essenciais são ricos em compostos secundários, metabólitos produzidos por vegetais que atuam como defesa contra o ataque de herbívoros e microrganismos patogênicos. (ELDIN e DUNFORD, 2001)

Devido o baixo rendimento e alto custo do processo de extração de óleos essenciais, há uma tendência em se estudar a aplicação de óleos e extratos vegetais como antimicrobianos, pois apresentam processos de extração mais simples, rentáveis e de baixo custo.

2.3. Moringa e suas propriedades antimicrobianas.

A *Moringa oleifera*, conhecida popularmente como moringa, é uma planta arbórea da família Moringácea, nativa da Índia e atualmente difundida pelo mundo. É uma árvore de rápido crescimento, podendo atingir mais de 10 metros de altura e seu tronco apresentarem entre 20 e 40 centímetros de diâmetro, cuja casca verde acinzentada pode apresentar aparência levemente grossa. Sua fruta consiste em uma vagem alongada de comprimento entre 10 e 50 centímetros (Figura 1), a qual abriga sementes aladas protegidas por uma casca semipermeável (Figura 2). Apresenta vasta folhagem (Figura 3) e suas flores (Figura 4) abundantes apresentam perfume sutil e coloração variante entre branco, creme e avermelhada. (BIDIMA, 2016; HDRA, 2002)

Figura 1. Vagem de *Moringa oleifera*



Fonte: BENEDITO (2008)

Figura 2. Sementes de *Moringa oleifera*



Fonte: BENEDITO (2008)

Figura 3. Folhagem de *Moringa oleifera*



Fonte: BENEDITO (2008)

Figura 4. Flores de *Moringa oleifera*



Fonte: BENEDITO (2008)

Muitas propriedades são atribuídas à *Moringa oleifera*, sendo empregada na alimentação humana e animal, na medicina tradicional, na purificação de água, como fertilizante e pesticida natural, entre outros usos. (HDRA, 2002) O óleo de moringa pode ser empregado no preparo de alimentos, na fabricação de cosméticos e até mesmo na produção de biodiesel. A torta resultante da extração do óleo pode ser utilizada como fertilizante e condicionador de solo, ou adicionada à alimentação animal. (SANTANA et al., 2010) O extrato de moringa tem sido utilizado como alternativa na purificação da água, reduzindo não somente os agentes poluentes, mas também a carga microbiana. (LEONE et al., 2016)

Nas últimas décadas, a *Moringa oleifera* vem sendo alvo de muitos estudos devido suas propriedades antimicrobianas. Óleos e extratos obtidos a partir de sementes, folhas e flores de moringa tem demonstrado atividade contra fungos e bactéria como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana de derivados de *Moringa oleifera* descritos em literatura.

Material	Parte vegetal	Microrganismos testados	Resultados	Fonte
Extrato vegetal	Folhas	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Sarcina lutea</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Mycobacterium phlei</i> .	Demonstrou propriedades antimicrobianas sobre bactérias gram positivas, gram negativas e micobactérias testadas.	Pal et al. (1995)
Extrato vegetal e óleo essencial	Folhas e sementes	<i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> e <i>Microsporum canis</i> .	Ambos apresentaram atividade sobre <i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>E. floccosum</i> e <i>M. canis</i> e pouca atividade sobre fungos dermatófilos.	Chuang et al. (2007)
Extrato vegetal	Flores e talos	<i>Candida albicans</i> , <i>Microsporum canis</i> .	Ambos possuem atividade ante as cepas de <i>C. albicans</i> e <i>M. canis</i> <i>in vitro</i> e baixa toxicidade no modelo de <i>Artemia</i> sp.	Rocha et al. (2011)
Óleo essencial	Folhas	<i>Alternaria</i> sp., <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Fusarium</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp	Apresentou inibição dos fungos <i>Fusarium</i> sp., <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Alternaria</i> sp.	Guimarães (2014)
Extrato vegetal e óleo vegetal	Sementes	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Alternaria solani</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> e <i>Macrophomina phaseolina</i>	Ambos apresentaram atividade inibitória sobre todas espécies testadas.	Riad e Abdallah (2014)
Extrato vegetal	Folhas	<i>Rhizopus stolonifer</i> e <i>Microsporum gypseum</i>	Ambos os extratos, metanólico e acetato de etila, mostraram atividade antifúngica.	Zaffer et al. (2015)
Extrato vegetal	Folhas	<i>Bacillus cereus</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Enterococcus cloacae</i> ; <i>Salmonella typhi</i> , <i>Alternaria</i> sp., <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium italicum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i>	Apresentou inibição ante todos microrganismos testados	Husnan e Alkahtani (2016)

A composição química de derivados de moringa revela uma grande variedade de compostos biologicamente ativos, dentre eles compostos fenólicos, taninos, alcalóides, saponinas, terpenos, ácidos graxos de cadeia longa e preteínas ligantes a quitina. (SHARMA et al., 2011; SANTANA et al., 2010; GIFONI, et al, 2005; BATISTA, 2013) A atividade antifúngica destes compostos vem sendo estudada, a fim de elucidar o modo de ação sobre as células fúngicas.

Devido á complexidade dos extratos e óleos obtidos a partir da moringa, não é possível atribuir sua atividade antimicrobiana a somente um composto, mas sim a um conjunto de substâncias bioativas relacionadas à defesa da planta.

A análise fitoquímica de extratos etanólicos obtidos das vagens de *Moringa oleifera* revela a presença de vários compostos biotivos (Tabela 2), os quais são importantes compostos secundários produzidos por plantas como mecanismo de defesa a ataques de animais, pragas, fungos e bactérias, podendo ser responsáveis por sua atividade antimicrobiana. (SHARMA et al., 2011; ELDIN e DUNFORD, 2001)

Tabela 2. Análise qualitativa de fioquimicos de extratos etanólicos obtidos a partir de vagens de *Moringa oleifera*.

Fitoquímicos	Extrato etanólico de <i>Moringa oleifera</i>
Alcalóides	++
Saponinas	+
Fitoesteróis	+
Fenóis	+++
Terpenoids	+
Taninos	++
Phlonataninas	+
Cardioglicosideos	+
Proantocianinas	++

+

Máxima presença, ++ presença moderada, + presença mínima

Fonte: SHARMA et al (2011)

Sharma et al (2011) sugerem que os compostos fenólicos presentes na *Moringa oleifera* são importantes constituintes desta plantas, podendo ser responsável por alguns de seus efeitos farmacológicos. Alguns compostos fenólicos atuam na síntese lipídica, interferindo principalmente na integridade da membrana celular,

sendo muito efetivos contra bactérias gram-negativas, mas também ativos contra fungos e bactérias gram-positivas. (TORTORA, CASE e FUNKE, 2016)

Dentre estes compostos fenólicos os taninos são muito empregados na indústria alimentícia e farmacêutica, devido a suas propriedades adstringentes, antiinflamatória e antisséptica. (MONTEIRO e BRANDELLI, 2017) Eldin e Dunford (2001) atribuem a atividade antimicrobiana desses compostos a três características comuns aos taninos: capacidade de complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre alumínio, cálcio, entre outros); ligação e precipitação de aminoácidos e proteínas; atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres. A precipitação de proteínas e a complexação com íons metálicos pode ser considerada a chave para a atividade antimicrobiana dos taninos, comprometendo a ação de enzimas digestivas, modulação de receptores celulares e fatores transcricionais; além de perturbar agregados protéicos responsáveis pela regulação de funções celulares importantes, como crescimento e proliferação. (ELDIN e DUNFORD, 2001)

A atividade antifúngica das saponinas é pouco discutida em literatura, no entanto, Cunha e Roque (2005), citado por Castejon (2011), atribui a ação antifúngica desses compostos à sua capacidade de complexar com esteroides presentes nas paredes celulares de fungos.

As proantocianidinas, alcaloides e terpenos estão presentes em muitas espécies vegetais, sendo conhecidos na farmacognosia por suas propriedades antimicrobianas. No entanto, os estudos relacionados a atividade biológica destes compostos são, em sua maioria, voltados para inibição bacteriana. (FACCHINI, 2008; MONTEIRO e BRANDELLI, 2017)

Compostos fenólicos e taninos são os principais compostos relacionados a defesa vegetal, no entanto, proteínas e ácidos graxos de cadeia longa também podem atuar na defesa da planta, sendo alvo de estudos que buscam elucidar o mecanismo de ação contra bactérias e fungos.

A análise realizada por SANTANA et al. (2010) mostrou que o óleo de moringa composto principalmente por ácido oleico (Tabela 3), um ácido graxo insaturado de cadeia longa conhecido por suas propriedades antimicrobianas. (SANTANA et al., 2010; ZHENG et al, 2005)

Tabela 3. Composição do óleo de moringa.

Ácido	Composição (%)
Palmítico	7
Plamitleico	2
Estariático	4
Oleico	78
Linoleico	1
Araquídico	4
Behênico	4

Fonte: Santana et al (2010)

A atividade antibacteriana de ácidos graxos de cadeia longa é atribuída à inibição da enzima Fab I, essencial na síntese de ácidos graxos bacterianos; contudo, os mecanismos de sua atividade antifúngica são pouco conhecidos. (ZHENG et al, 2005). O estudo desenvolvido por Walters et al (2002) demonstrou que, mesmo em pequenas concentrações, os ácidos linoleico e oleico foram capazes de inibir o crescimento micelial de fungos e em maiores concentrações foi capaz de inibir completamente o crescimento.

Alguns estudos relacionam a atividade antifúngica da moringa a proteínas ligantes a quitina, capazes de interagir com a parede celular de fungos, causando danos celulares e inibição do crescimento (GIFONI, et al, 2005; BATISTA, 2013) Gifoni et al (2005) e Batista (2013) isolaram proteína ligantes à quitina presentes em sementes de moringa e demonstraram sua atividade antifúngica ante fungos fitopatogênicos. A proteína ligante a quitina demonstrou inibição sobre a germinação de conídeos e crescimento micelial, contudo, demonstrou perda de atividade em meio contendo extrato de levedura, talvez pela competição da mesma com o fungo filamentoso alvo. (GIFONI et al., 2005; BATISTA, 2013) Os estudos evidenciam que parte da ação antifúngica dessa proteínas está relacionada à interação eletrostática, responsável por alterar a permeabilidade da membrana celular. O tratamento com estas proteína resultou ainda na deformação dos conídeos desaparecimento do citosol, interrupção da membrana plasmática e deformação da parede celular. (GIFONI et al., 2005)

Apesar do grande potencial antifúngico da moringa, muitos aspectos podem influenciar na eficácia do tratamento, como a grande variedade genética nesta espécie, a forma de extração dos compostos ativos, parte da planta empregada e concentração aplicada nos testes. (HUSNAN e AKATANI, 2016; MAMKAA e GWA, 2018; GUIMARÃES, 2014) Os ativos apontados como inibidores do crescimento fúngico compreendem compostos secundários produzidos naturalmente pela planta como forma de defesa, assim, a disponibilidade destes componentes no material vegetal depende das condições ambientais a qual a planta foi exposta. (ELDIN e DUNFORD, 2001) Husnan e Akatani (2016) apontam que para maior reprodutividade e aplicação industrial de compostos derivados da planta seria importante a seleção e melhoramento da cultura da moringa.

2.4. Micotoxinas e alimentos

Microrganismos são seres ubíquos, estando presentes nos mais diversos ambientes. Sendo assim, a proliferação de microrganismos se torna preocupante, sobretudo quanto à conservação de alimentos. Em determinadas taxas, microrganismos podem promover a deterioração dos alimentos, causando modificações sensoriais; tais como liberação de odores, aparecimento de limosidade e acúmulo de ácidos; ou físico-químicas; tal como a precipitação de proteínas. (ORDONEZ et al, 2005) Alguns microrganismos podem metabolizar substâncias tóxicas, responsáveis por intoxicações alimentares. Os fungos são responsáveis pela ocorrência natural de micotoxinas em produtos agroalimentares, apresentando difícil controle. Acredita-se que 25% dos produtos agrícolas de todo mundo estejam contaminados por estas toxinas. (BENNETT e KLICH, 2003)

Micotoxinas são compostos químicos tóxicos de baixo peso molecular, produzidos naturalmente por fungos filamentosos como metabólitos secundários. Tais compostos apresentam grande diversidade química, sendo assim agrupados somente pela característica de toxicidade à humanos e outros vertebrados. (BENNETT, 1987) Os sintomas advindos da intoxicação por micotoxinas variam de acordo com o tipo e quantidade de micotoxina a que o indivíduo foi exposto, tempo de exposição e efeitos sinérgicos pouco compreendidos referentes ao indivíduo, tais como idade, sexo, estado alimentar, estado de saúde e interações com outros compostos tóxicos. (BENNETT e KLICH, 2003) Cerca de 400 micotoxinas já foram catalogadas, mas, entre eles as toxinas de maior ocorrência em alimentos são as

aflatoxinas, citrinina, ergotamina, fumonisinas, ocratoxina, patulina, zearalenona e tricotecenos. (SOARES, ABRUNHOSA e VENÂNCIO, 2013; BENNETT e KLICH, 2003)

Devido à formação de esporos, diversas culturas estão susceptíveis à proliferação de fungos, mais do que a bactérias e leveduras; seja no cultivo, na colheita ou no armazenamento. (EVANGELISTA, 2008; IMANAKA, OLIVEIRA e TANIWAKI, 2010) As micotoxinas são resistentes ao calor e condições ambientais, sendo persistentes nos produtos agroalimentares, mas o teor destas toxinas deve ser controlado a níveis que garantam a segurança alimentar. (BENNETT e KLICH, 2003)

Os principais alimentos de ocorrência de micotoxinas, as principais fontes fúngicas e os efeitos tóxicos de sua ingestão são citados na Tabela 4.

Tabela 4. Principais substratos alvos de fungos produtores de micotoxinas e principais efeitos das respectivas micotoxinas em homens e animais.

Principais substratos	Principais fungos produtores	Principal toxina	Efeitos
Amendoim, milho	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxina B1	Hepatotóxica, nefrotóxica e carcinogênica.
Trigo, aveia, cevada, milho e arroz.	<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinina	Nefrotóxica para suínos.
Centeio e grãos em geral.	<i>Claviceps purpurea</i>	Ergotamina	Gangrena de extremidades e convulsões
Milho	<i>Fusarium verticillioides</i>	Fumosinas	Câncer de esôfago
Cevada, café e vinho.	<i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i>	Ocratoxina	Hepatotóxica, vômitos e dermatites.
Frutas e sucos de frutas.	<i>Aspergillus expansum</i> e <i>Aspergillus griseofulvum</i>	Patulina	Toxicidade vagamente estabelecida
Milho, cevada, aveia, trigo e centeio.	<i>Fusarium</i> sp. <i>Myrothecium</i> sp. <i>Stachybotrys</i> sp. <i>Trichothecium</i> sp.	Tricotecenos	Hemorragia, vômito e dermatites.
Cereais	<i>Fusarium graminearum</i>	Zearalenona	Baixa toxicidade, síndrome de masculinização e deminização em suínos.

Fonte: FOOD INGREDIENTES BRASIL (2009).

2.5. Fungos filamentosos produtores de micotoxinas

Fungos produtores de micotoxinas podem surgir em produtos agroalimentares, tornando-os tóxicos a humanos e animais. Estas toxinas são produzidas principalmente por fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. (SOARES, ABRUNHOSA e VENÂNCIO, 2013) Este trabalho abordará o gênero *Aspergillus*, mais especificamente as espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus parasiticus*.

As espécies do gênero *Aspergillus* são representadas por fungos filamentosos pertencentes à família *Trichocomaceae*, caracterizados pela ubiquidade, podendo ser isolados do ar, solo ou água. Ocorrem em uma grande diversidade de ambientes, uma vez que crescem rapidamente, produzindo e dispersando grande quantidade de conídios. (FRAGA E PEREIRA, 2012) Ao contrário de fungos de outros gêneros, *Aspergillus* suportam baixos teores de umidade, podendo crescer em substratos de menor teor aquoso, tais como vegetais, grãos e cereais. (EVANGELISTA, 2008)

Aspergillus sp. são caracterizados pela presença de micélios tabiques e conidióforos eretos terminais em hifas, dos quais emergem radialmente conídios unicelulares de coloração, parda, verde, amarelada ou preta. Dentre as espécies de *Aspergillus*, algumas são reconhecidas como produtoras de micotoxinas. (ZUKIFLI e ZAKARIA, 2017; BENNETT e KLICH, 2003)

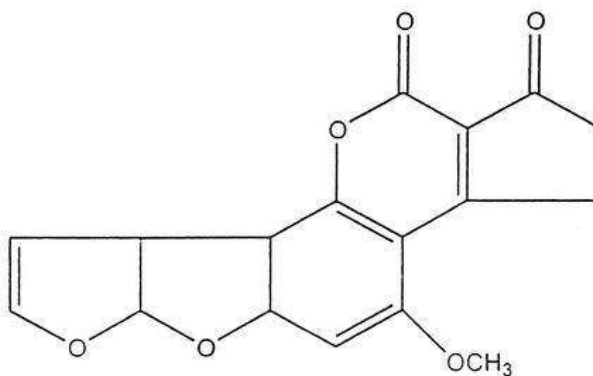
Aspergillus flavus e *Aspergillus parasiticus* estão relacionados à produção de aflatoxinas, estando presentes em grãos, alimentos e bebidas processadas. (WHO, 2001) As aflatoxinas são derivados de difuranocumarina, produzidas pela via de policetídeos. As quatro principais aflatoxinas são nomeadas com base em sua fluorescência sob luz ultravioleta e sua mobilidade durante a cromatografia em camada delgada, sendo que as aflatoxinas B1 e B2 emitem fluorescência azulada (*blue*) e as aflatoxinas G1 e G2 emitem fluorescência esverdeada (*green*). (BENNETT e KLICH, 2003; IARC, 1997)

Aspergillus flavus são caracterizados pela formação conidióforos longos e abundante formação de esporos de coloração verde oliva, verde amarelada ou amarela, de aparência granular a lanosa (Figura 7A). (FONSECA ET AL, 1974) Estão relacionados à produção de aflatoxinas B1 e B2. (IARC, 1997)

Colônias de *Aspergillus parasiticus* se assemelham às colônias de *Aspergillus flavus*, por sua densidade, aparência aveludada a pulverulenta e coloração verde oliva. (Figura 7B) *Aspergillus parasiticus* são produtores de aflatoxinas do tipo B1, B2, G1 e G2. (IARC, 1997)

A maior parte dos estudos sobre os efeitos da exposição às aflatoxinas concentra-se em seus efeitos carcinogênicos e mutagênicos, sobretudo da aflatoxina B1 (Figura 5), a qual apresenta uma dupla ligação nas posições 8,9, podendo ser metabolizada a um composto reativo AFB1-8,9-epóxido, capaz de se ligar a moléculas celulares, incluindo DNA. (IARC, 2012) Em vários estudos a aflatoxina B1 é considerada genotóxica, sendo responsável por alterações em células humanas e animais e anomalias cromossômicas em roedores e macacos, além de promover danos no DNA e mutação gênica em células humanas e de animais in vitro. (IARC, 1997)

Figura 5. Estrutura química da aflatoxina B1.

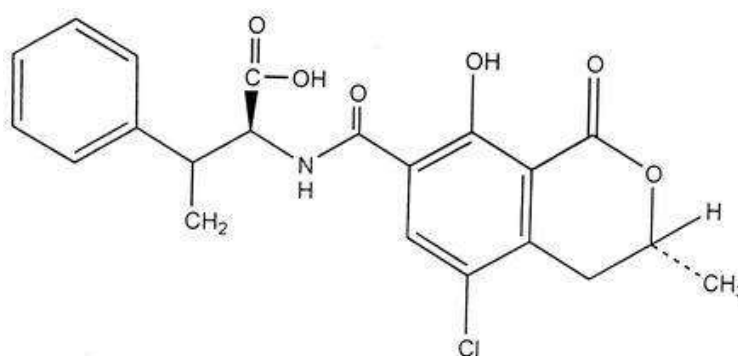


Fonte: Bennett e Klich (2003)

Outras espécies de *Aspergillus* estão relacionadas à produção de ocratoxinas. As ocratoxinas são uma classe de metabólitos secundários derivados de isocumarinas, ligada a um grupo amino que por sua vez se liga a um grupo L,β-fenilalanina. Dentre as ocratoxinas, a ocratoxina A (Figura 6) é uma das mais importantes, devido a sua alta toxicidade e incidência em grande variedade de culturas, estando

associada a doenças nefrológicas e câncer em humanos e animais (DUARTE, 2010; D'MELLO, 1997) A OTA é absorvida pelo trato gastrointestinal em mamíferos e se liga fortemente a proteínas do plasma sanguíneo, sobretudo albumina, sendo distribuída para os rins, fígado, músculos e tecido adiposo. (LESZKOWICZ E MANDERVILLE, 2007)

Figura 6. Estrutura química da Ocratoxina A



Fonte: BENNETT e KLICH, 2003

Dentre os fungos produtores de ocratoxina A estão os *Aspergillus A. ochraceus* e *A. carbonarius*. (WHO, 2001). *Aspergillus ochraceus* são caracterizados pela formação de colônias rugosas de crescimento lento e coloração amarela ocre. (Figura 7C) (TOMÉ E MARQUES, 2013) *Aspergillus carbonarius* caracterizam-se pela formação de colônias negras com esporos espaçados (Figura 7D), sendo considerado um dos principais produtores de ocratoxina A em uvas, a qual é persistente em sucos e vinhos. (FAVILLA et al.,2008)

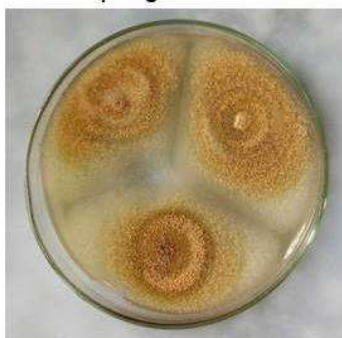
Figura 7. Aparência de colônias de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius* após sete dias de cultivo em meio ágar extrato de malte.



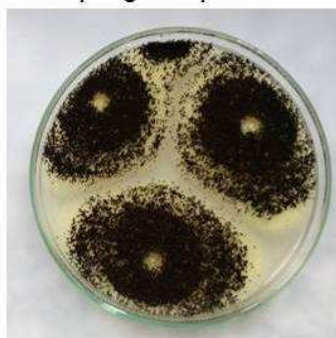
A: *Aspergillus flavus*



B: *Aspergillus parasiticus*



C: *Aspergillus ochraceus*



D: *Aspergillus carbonarius*

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica do óleo de sementes e extrato de folhas de *Moringa oleifera* sobre fungos *Aspergillus* sp. produtores de micotoxinas.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) do óleo de sementes de moringa e do extrato de folhas de moringa sobre os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus parasiticus* pelo método de microdiluição em placas.
- Determinar as concentrações mínimas fungicida e fungistática do óleo de sementes de moringa e do extrato de folhas de moringa sobre os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus parasiticus* pelo método ágar difusão em placas de Petri.

4. Metodologia

Os experimentos foram realizados no laboratório biotecnológico e no laboratório de Microbiologia e Enzimologia da Universidade Federal de São João del Rei - Campus Alto Paraopeba, Ouro Branco - MG

4.1. Preparo do extrato de folhas de moringa.

As folhas de *Moringa oleifera* foram cedidas pelo grupo de pesquisa coordenado pela professora Doutora Cristiane Medina Finzi Quintão, do departamento de Engenharia química estatística da Universidade Federal de São João del Rei - Campus Alto Paraopeba. O processo de extração foi baseado nos protocolos descritos por Oliveira J. M. G. et al (2016) e Teles et al.(2016), sendo adicionados 20 gramas das folhas secas e trituradas a 100 ml de solução hidroalcoólica a 90% (v/v). A mistura foi mantida sob agitação magnética por 5 minutos e permaneceu em repouso por 48 horas em frasco tampado sob abrigo da luz. O extrato foi filtrado e submetido a evaporação em rotaevaporador a 55°C para remoção do etanol. O extrato obtido foi mantido sob refrigeração e abrigo de luz até o momento dos testes. O rendimento da extração foi calculada a partir da equação 1, descrita por Rodrigues et al. (2011).

$$Re = \frac{Me}{Mf} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

Re – Rendimento de extração (g de extrato/g de folhas seca);

Me – massa de extrato obtido (g);

Mf – Massa de folhas secas utilizada (g).

Para o preparo da solução aplicada ao método de microdiluição, o extrato foi diluído em solução tween 80 a 2% (v/v), obtendo-se a concentração de 6 mg/mL.

4.2. Preparo da solução de óleo de moringa

O óleo de semente de moringa extraído segundo o método de Bhutada, Jadhav e Pinjari (2016), foi cedido pelo grupo de pesquisa coordenado pela professora Doutora Cristiane Medina Finzi Quintão, do departamento de Engenharia química e estatística da universidade Federal de São João del Rei - Campus alto Paraopeba.

Para o preparo da solução aplicada ao método de microdiluição, o óleo de sementes de moringa de foi diluído em solução tween 80 a 2% (v/v), obtendo-se a concentração de 400 mg/mL. A solução foi mantida sob refrigeração e abrigo da luz até o momento dos testes.

4.3. Preparo da solução de esporos

Os fungos *Aspergillus flavus* (CCDCA 10124), produtor de aflaoxinas B1 e B2; *Aspergillus carbonarius* (CCDCA 10104) e *Aspergillus ochraceus* (CCDCA 1099), produtores de ocratoxina A; e *Aspergillus parasiticus* (CCDCA 10122), produtor de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2; foram cedidos pela Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciências dos Alimentos - CCDCA da Universidade Federal de Lavras.

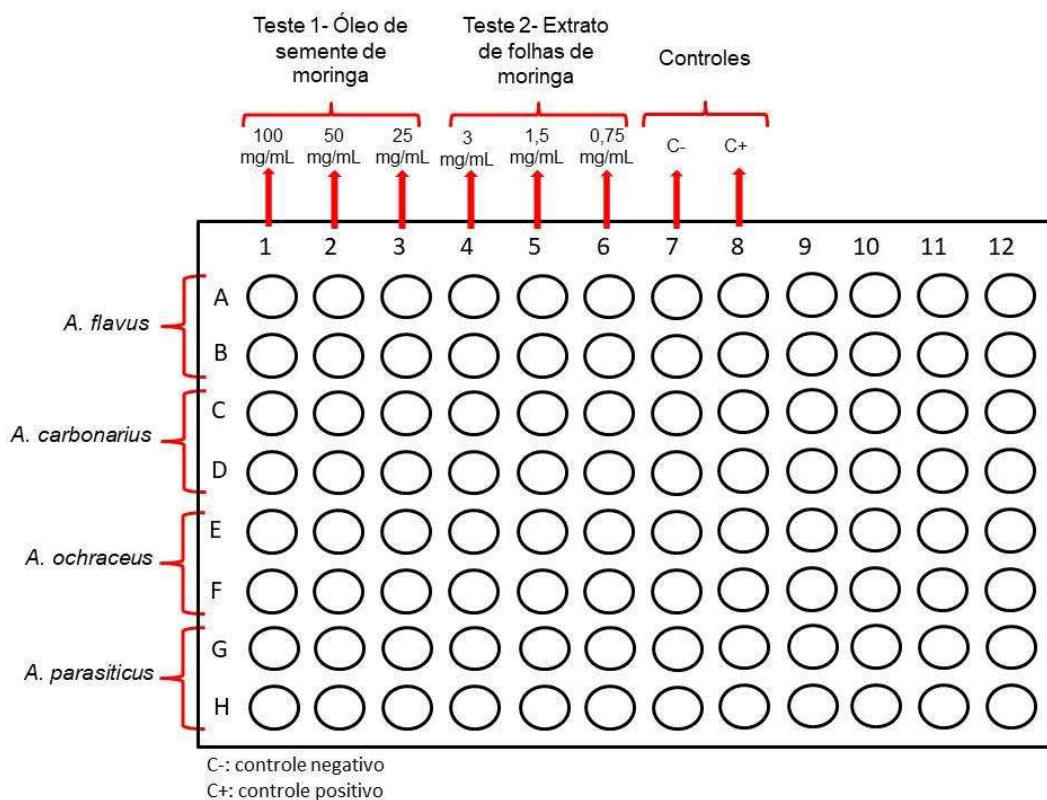
A reativação dos fungos foi realizada a partir do repique de cada um das placas “mãe” em placas contendo meio ágar extrato de malte, composto por extrato de malte (20 g/L), ágar (20 g/L), peptona (1 g/L) e glucose (10 g/L), seguido de incubação por 7 dias em estufa a 25°C. Verificada a pureza das culturas, as soluções de esporos foram preparadas, em solução de NaCl 0,85% (m/v) , seguido de raspagem dos esporos e filtração com gaze estéril. Foram realizadas as contagens de esporos em solução utilizando câmara de Neubauer, e as concentrações foram ajustadas para 10^5 esporos/mL pela adição de solução de NaCl 0,85%.

4.4. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos compostos bioativos da moringa

Os testes de concentração mínima inibitória para o óleo das sementes de moringa e para o extrato de folhas de moringa foram realizados em duplicata pelo método microdiluição segundo a norma M-38 (CLSI, 2017) adaptada, tomando como base os valores de MIC sobre fungos filamentosos descritos na literatura. Os testes

foram realizados em microplacas de 96 poços contendo inicialmente 100 µL de caldo extrato de malte, composto por malte (20 g/L), peptona (1 g/L) e glucose (20 g/L). A disposição dos testes está representada na Figura 8. As colunas 1, 2 e 3 foram destinadas ao teste 1, onde o óleo de sementes de moringa foi testado nas concentrações finais de 100, 50 e 25 mg/mL, respectivamente. As colunas 4, 5 e 6 foram destinadas ao teste 2, onde o extrato de folhas de moringa foi testado nas concentrações finais de 3, 1,5 e 0,75 mg/mL, respectivamente. As colunas 7 e 8 foram destinadas aos controles do experimento, sendo a coluna 7 destinada ao controle negativo (100 µL de solução Tween 80 a 2% v/v) e a coluna 8 ao controle positivo (100 µL de cetoconazol 100 µg/mL). Cada um dos poços recebeu 100 µL de solução de esporos a 10^5 esporos/mL. A microplaca foi incubada por 70 horas em estufa a 25°C. A leitura dos resultados foi realizada em leitor de absorbância de microplacas a 492 nm.

Figura 8. Representação da placa destinada aos testes de concentração mínima inibitória para o óleo de sementes e moringa e o extrato das folhas de moringa sobre os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus parasiticus* em concentração de 10^5 esporos/mL.



O percentual de inibição foi determinada pela equação 2, descrita por Rozatto (2012).

$$I = \frac{1 - At}{Ac} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

I - Percentual de inibição fúngicas (%);

At - Média das absorbâncias dos poços referentes aos testes 1 e 2 após 70 h de cultivo subtraída da média das absorbâncias iniciais;

Ac - Média das absorbâncias dos poços referentes ao controle negativo após 70 h de cultivo subtraída da média das absorbâncias iniciais.

A concentração mínima inibitória foi definida como as concentrações de óleo de semente de moringa e de extrato das folhas de moringa capazes de inibir 90% o crescimento dos fungos testados.

4.5. Determinação das concentrações mínimas fungicida e fungistática do óleo de sementes de moringa e do extrato de folhas de moringa.

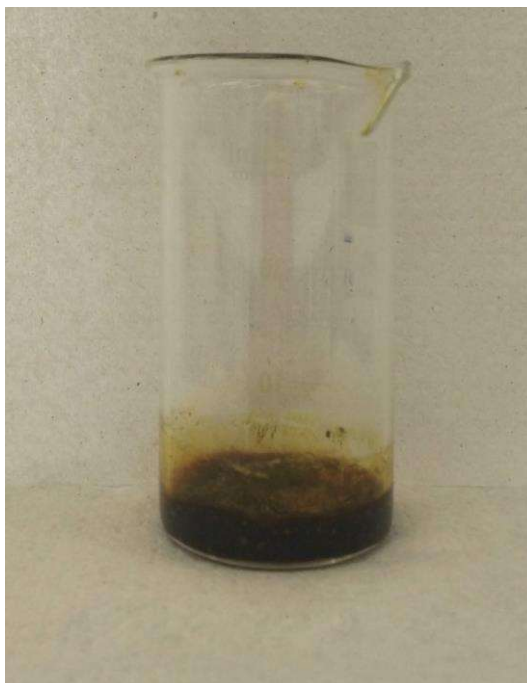
As concentrações mínimas fungicida e fungistática foram determinadas a partir do método descrito em Cortez et al (2015) adaptado, em duplicata. Foram transferidos 10 μ L do conteúdo dos poços da microplaca para placas de Petri contendo meio ágar extrato de malte, seguido de incubação por 7 dias em estufa a 25°C. As concentrações cujas placas não apresentaram crescimento foram definidas como a concentração mínima fungicida.

5. Resultados e discussão

5.1. Extrato de folhas de moringa

O processo de evaporação do solvente presente no extrato se deu a temperatura de 55°C até a total secagem do extrato, resultando em um composto viscoso e de coloração verde escura, levemente amarronzada, como mostra a Figura 9.

Figura 9. Extrato de folhas de moringa.



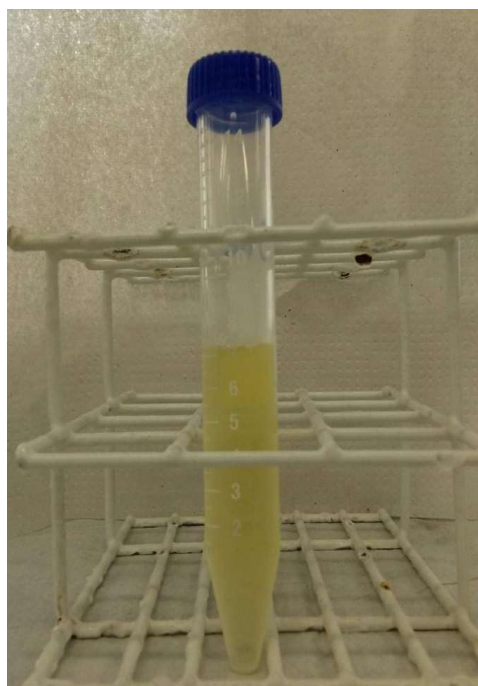
Obteve-se uma massa de 0,67g de extrato de folhas de moringa, o que representa um rendimento de 3,35% (g de extrato/g e folhas secas). Durante o processo houve uma pequena perda no volume final, atribuída principalmente ao processo de filtração e ao acúmulo de material no balão empregado na rotaevaporação.

A escolha do solvente empregado baseou-se em estudos anteriores, os quais apontam que soluções hidroalcólicas favorecem a extração de compostos ativos

omo taninos, flavonoides e compostos fenólicos. (OLIVEIRA, V. B. et al., 2016; MONTEIRO et al. 2015)

A solução de extrato de folhas de moringa a 6 mg/mL apresentou coloração amarelo clara e translúcida (Figura 10), podendo ser aplicada ao teste de CMI sem que haja interferência na leitura de absorbância dos poços.

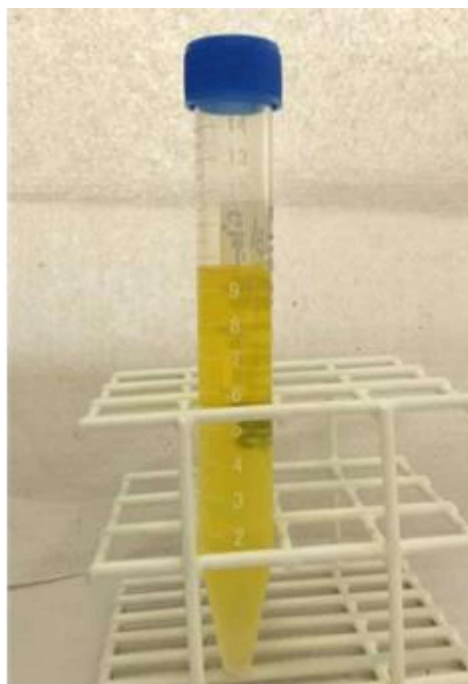
Figura 50. Solução de extrato de folhas de moringa de concentração 6 mg/mL



5.2. Solução de óleo de moringa

O óleo de moringa utilizado consiste em um óleo de coloração amarela, translúcido, líquido a temperatura ambiente e sólido sob refrigeração, como mostra a Figura 11.

Figura 6. Óleo de sementes de moringa.

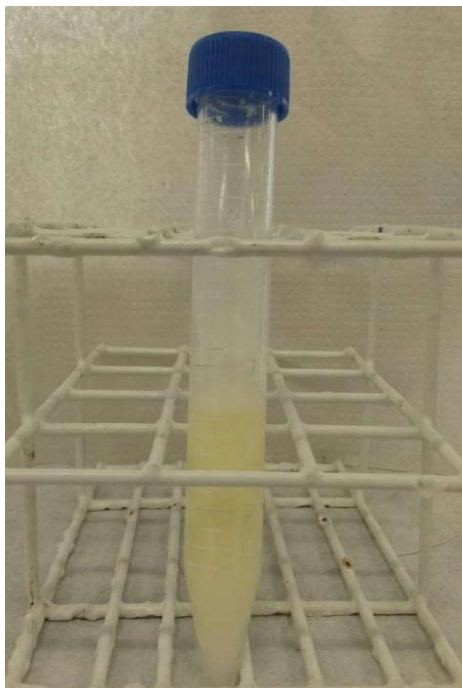


Para a realização do teste de concentração mínima inibitória do óleo de sementes de moringa foi necessária a realização prévia de testes de solubilidade, a fim de garantir a estabilidade das soluções e sua interação com o meio de cultura empregado.

Verificou-se que o óleo apresenta boa solubilidade em solução tween 2%, sendo assim empregada no preparo da solução inicial de concentração 400 mg/mL. O tween 80 ou polissorbato 80 é um líquido oleoso dispersível em água, que atua como tensoativo hidrofílico, sendo empregado como emulsificante. (PUBCHEM, 2018)

A solução de óleo de sementes de moringa de concentração 400 mg/mL apresentou coloração amarelada, levemente turva (Figura 12) e se manteve estável a temperatura ambiente até o momento do teste de CMI. Ao decorrer do período de incubação do teste CMI, não foi observada a separação de fases.

Figura 7. Solução de óleo de semente de moringa de concentração 400 mg/mL



5.3. Concentração mínima inibitória (CMI) do óleo de sementes de moringa e do extrato de folhas de moringa

O percentual de inibição do óleo de sementes de moringa e do extrato de folhas de moringa em diferentes concentrações sobre os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus parasiticus* estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5. Percentual de inibição do óleo de semente de moringa e do extrato de folhas de moringa sobre os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus parasiticus*.

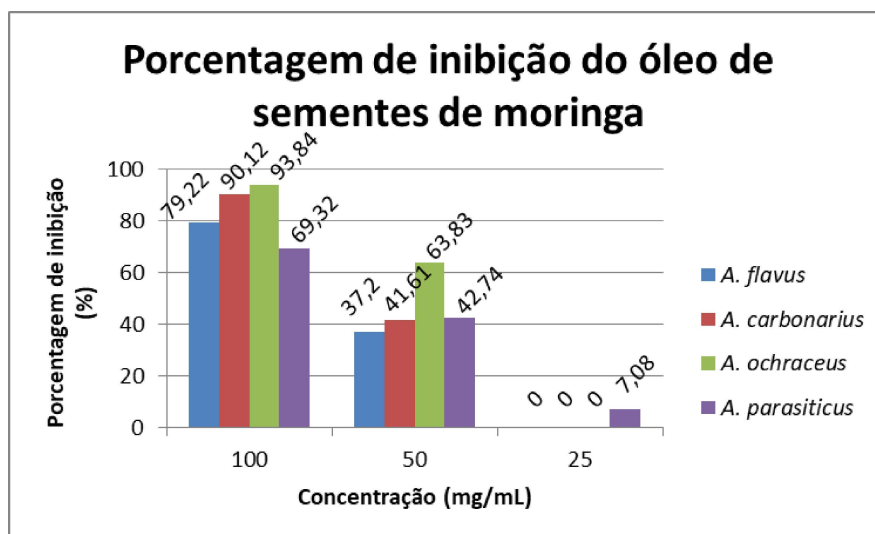
Percentual de inibição (%)							
Cepa	Óleo de sementes de moringa			Extrato de folhas de moringa			Controle positivo (µg/mL)
	(mg/mL)			(mg/mL)			
	100	50	25	3	1,5	0,75	100
<i>Aspergillus flavus</i>	79,22	37,20	ND	58,22	30,33	0,71	91,48
<i>Aspergillus carbonarius</i>	90,12	41,61	ND	90,05	50,80	10,38	97,05
<i>Aspergillus ochraceus</i>	93,84	63,83	ND	90,14	50,14	4,78	95,22
<i>Aspergillus parasiticus</i>	69,32	42,74	7,08	38,70	13,79	ND	96,12

ND: Não determinada

Nota-se que ambos os compostos apresentaram atividade contra os fungos toxigênicos testados, obtendo-se melhores resultados para os fungos *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*. No entanto, considerando a concentração mínima inibitória como aquela capaz de inibir 90% do crescimento fúngico, foi possível determinar apenas as CMI dos compostos testados sobre os fungos *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*.

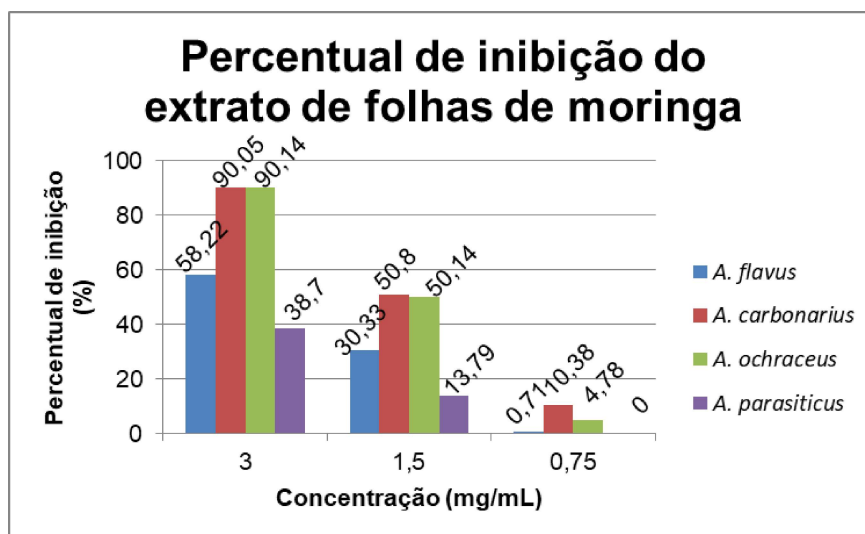
Analisando o gráfico representado na Figura 13, nota-se que a atividade inibitória do óleo de moringa cai à medida que se reduz concentração, sendo nula sobre os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* na concentração de 25 mg/mL. O óleo de sementes de moringa apresentou CMI de 100 mg/mL sobre os fungos *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*, alcançando 90,12% e 93,84% de inibição, respectivamente. Nesta concentração, o óleo de sementes de moringa foi capaz de inibir 79,22% do crescimento do fungo *Aspergillus flavus* e 69,32% do crescimento do fungo *Aspergillus parasiticus*.

Figura 8. Percentual de inibição do óleo de sementes de moringa nas concentrações 100, 50 e 25 mg/mL sobre os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus parasiticus*.



Analisando o gráfico representado na Figura 14, nota-se que a atividade inibitória do extrato de moringa é consideravelmente menor sobre os fungos *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* em todas as concentrações testadas. O extrato de folhas de moringa apresentou CMI de 3 mg/mL sobre os fungos *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*. Nesta mesma concentração o extrato de folhas de moringa inibiu 58, 22% e 38, 70% do crescimento dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, respectivamente.

Figura 14. Percentual de inibição do extrato de folhas de moringa nas concentrações 3, 1,5 e 0,75 mg/mL sobre os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus parasiticus*.



Os resultados demonstram que tanto o óleo de sementes de moringa quanto o extrato de folhas de moringa apresentam atividade inibitória sobre fungos *Aspergillus* sp. testados. No entanto, ambos demonstraram capacidade de inibição reduzida sobre os fungos *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*, não sendo possível determinar a CMI por meio dos testes realizados. Para melhores resultados, é necessária a realização de novos testes abrangendo uma faixa maior de concentrações.

Há uma grande variedade de trabalhos que demonstram a atividade antimicrobiana de extratos, óleos vegetais e óleos essenciais obtidos a partir de folhas, sementes, caule e flores de moringa. (PAL et al., 1995; CHUANG et al., 2007; ROCHA et al., 2011; GUIMARÃES, 2014; RIAD E ABDALLAH, 2014; HUSNAN E ALKAHTANI, 2016; ZAFFER et al., 2015) No entanto, poucos estudos são voltados para fungos *Aspergillus* sp. e há grande variação do método empregado na extração dos compostos ativos, dificultando a comparação entre resultados.

5.4. Concentrações mínimas fungicida e fungistática do óleo de sementes de moringa e do extrato de folhas de moringa

Após o período de 7 dias de incubação das placas de Petri referentes ao teste de concentrações mínimas fungicida e fungistática, verificou-se o crescimento de

todos os fungos submetidos aos tratamentos com óleo de semente de moringa e extrato de folhas de moringa em todas as concentrações testadas, como mostra os quadros representados nas figuras 15 e 16.

Os antifúngicos podem ser denominados fungicidas, quando são capazes de inviabilizar totalmente as células fúngicas; ou fungistáticos, quando são responsáveis por inibir o crescimento fúngico. (LEWIS, GRAYBILL e HARDIN, 1997. Dessa forma, não foi possível determinar a concentração mínima fungicida do óleo de sementes de moringa e do extrato de folhas de moringa sobre nenhum dos fungos testados, visto que houve crescimento em todas as placas.

A atividade fungistática de ambos os tratamentos foi evidente somente para o fungo *Aspergillus carbonarius*, de forma que as placas tratadas com maiores concentrações de óleo de semente de moringa e extrato de folhas de moringa apresentaram menor esporulação, quando comparadas ao controle negativo. Assim, temos definidas as concentrações mínimas fungistáticas do óleo de sementes de moringa e do extrato de folhas sobre o fungo como 100mg/mL e 3 mg/mL, respectivamente.

Figura 95. Resultado do teste de concentração mínima fungicida do óleo de sementes de moringa ao final de 7 dias de incubação das placas.

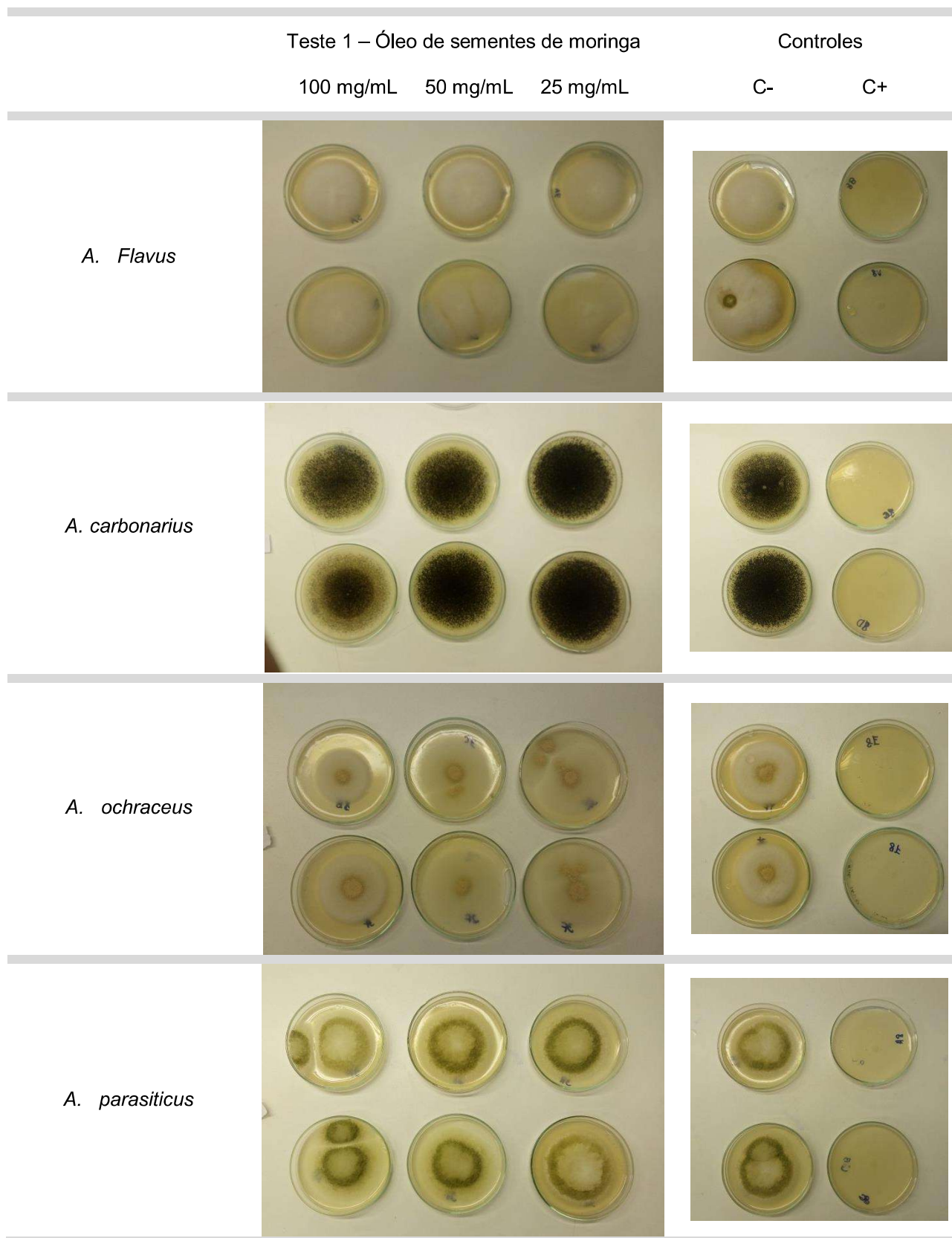
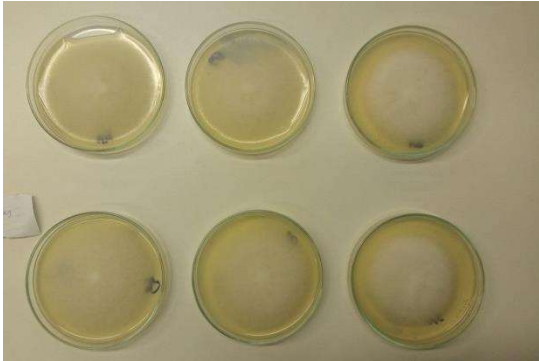
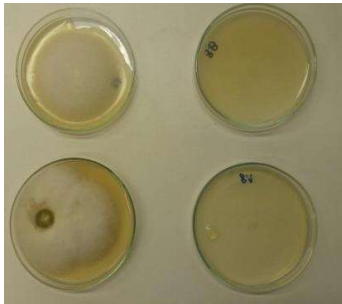
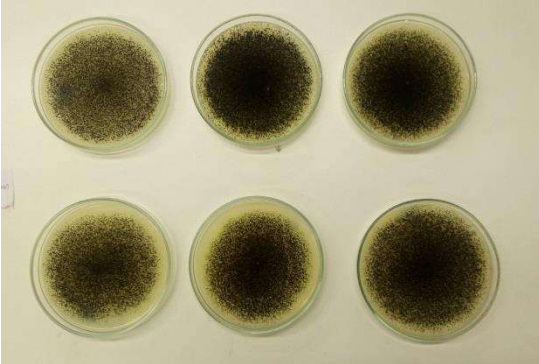
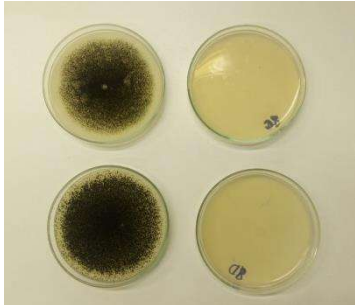
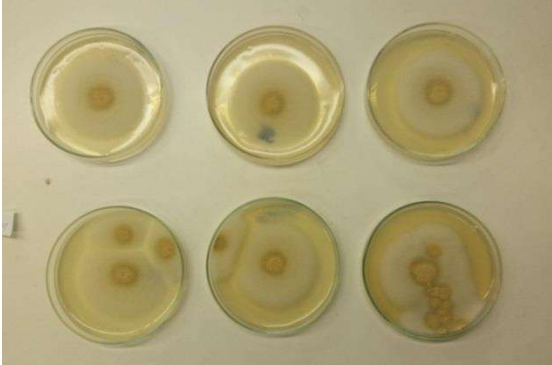
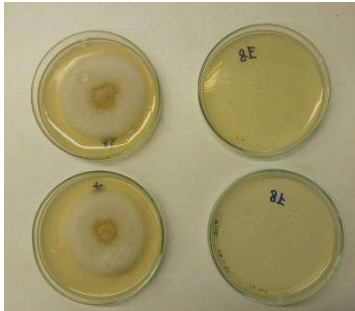
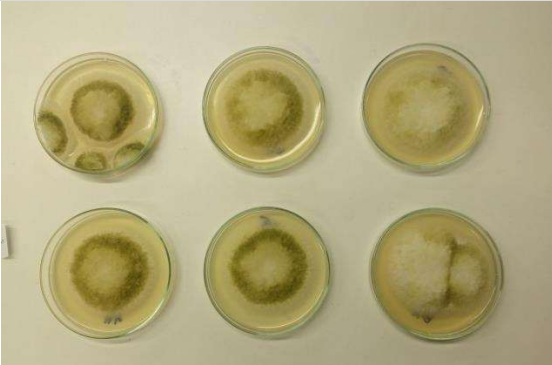
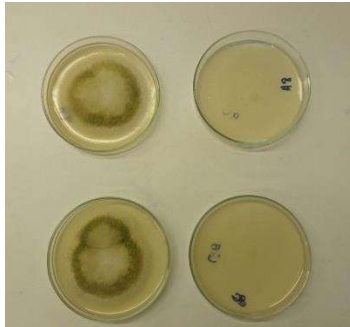


Figura 106. Resultado do teste de concentração mínima fungicida do extrato de folhas de moringa após 7 dias de incubação das placas.

	Teste 2 – Extrato de folhas de moringa			Controles	
	3 mg/mL	1,5 mg/mL	0,75 mg/mL	C-	C+
<i>A. flavus</i>					
<i>A. carbonarius</i>					
<i>A. ochraceus</i>					
<i>A. parasiticus</i>					

Aspergillus flavus não apresentou esporulação ao final dos 7 dias de incubação, no entanto, este comportamento não pode ser relacionado aos tratamentos aplicados, uma vez que se repete para o controle negativo.

A ausência do efeito fungicida pode estar relacionada ao fato de que nenhum dos tratamentos empregados foi capaz de inibir 100% o crescimento fúngico. Assim, pode-se considerar que, nas concentrações testadas, o óleo de semente de moringa e o extrato de folhas de moringa não são capazes de inviabilizar completamente os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus parasiticus*.

6. Conclusão

Conclui-se que o óleo de sementes e extrato de folhas de *Moringa oleifera* apresentam potencial antifúngico contra espécies toxigênicas, sendo capaz de inibir acima de 90% os fungos *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*. No entanto, para melhor avaliar os efeitos fungistático e fungicida de derivados de moringa contra fungos produtores de micotoxinas é necessária a otimização da metodologia, a fim de abranger faixas de concentração mais amplas e diferentes gêneros de fungos toxigênicos, avaliando a significância dos resultados.

A elucidação dos mecanismos de ação dos compostos ativos presentes na moringa é um fator determinante para a otimização das condições do tratamento antifúngico. Assim, deve-se estudar mais a fundo a composição de extratos e óleos derivados de diferentes partes da *Moringa oleifera* e avaliar seus efeitos sobre a morfologia de células fúngicas.

Os resultados obtidos *in vitro* abrem espaço para investigação dos efeitos práticos da utilização de derivados de moringa, os quais podem ser aplicados para redução da carga microbiana, seja na conservação alimentos e cosméticos naturais ou no tratamento de água e efluentes.

7. Referências

- ANVISA – Agência Nacional de Saúde. **Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira**. 1ª ed. Brasil. 2016.
- ARAUJO, J. A. **Nanopartículas, óleos essenciais e extratos vegetais no controle in vitro de fungos fitopatogênicos**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró, Rio Grande do Norte. 114p. 2014.
- BATISTA, A. B. **Caracterização estrutura da Mo-CBP3, uma albumina 2s de semente de *Moringa oleifera* Lamark e seu modo de ação contra fungos fitopatogênicos**. Dissertação (Doutorado em bioquímica). Universidade Federal do Ceará, 154 p. Ceará, 2013.
- BENEDITO A. ***Moringa oleifera***. Nov. 2008. Disponível em <<https://www.flickr.com/photos/andrebenedito/3048409637/in/photolist-5Donw8-5DsDDw-5Dojch-5DsAiy-5DofWv-5Dsx8Q-5DocH4-5DoaYR-5Do8gD-5Dso8f-5Dsmeb-5Dsj2G-5Dsht3-5DsfSU-5Dsed5-5DnTYR/>>_Acesso em 4 de abril de 2018.
- BENNETT, J. W. KLICH, M. **Mycotoxins**. Clinical microbiology reviews; v. 16, nº4, p. 497-516. Jul. 2003.
- BENNETT, J. W. **Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia**. Mycopalogy. Nova Orleans, p. 1, jun. 1987.
- BIDIMA, M. I. **Producing and process of moringa**. The Technical center for agricultural and rural cooperation. 2016.
- BOUKHATEM, M. N. et al. **Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs**. Libyan Journal of Medicine; v.9. 2014.
- BRASIL. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília. 2012.
- BHUTADA, P. R., JADHAV, A. J. , PINJARI, D. V., et al. **Solvent assisted extraction of oil from *Moringa oleifera* Lam. seeds**. Ind Crops Prod. V. 82, p 74–80. 2016
- CALIXTO, J.B. et al. **Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs**. Expert Opin Emerg Drugs; v.6, p. 261-279, out 2001.

- CASTEJON, F. V. **Taninos e saponinas**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. 26 p. Goiânia. 2011
- CHUANG. P. H. et al. **Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam.** Bioresource Technology; v. 98, p. 232–236 2007
- CLSI – Clinical and laboratory standards institute. **M-38: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**. 3 ed. Nov. 2017.
- CORTEZ, L. E. et al. **Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) e *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Poaceae).** O mundo da saúde; v. 39, nº4, p. 433-440. São Paulo. Nov 2015.
- DUARTE, T. L. **Ocratoxina A em alimentos e bebidas: uma revisão bibliográfica**. Dissertação (Graduação em Engenharia de alimentos), 41 p. Universidade Federal do rio Grande do Sul. Porto Alegre. RS. 2010.
- ELDIN, S. e DUNFORD, A. **Fitoterapia: na atenção primária à saúde**. Manole Ltda, 2001.
- Evangelista 2008, Livro tecnologia de alimentos, p. 58.
- FACCHINI, P. J. e ZIEGLER, J. **Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking**. Annual review of plant biology.; v. 59, p. 735-769. Jun. 2018.
- FAVILLA, M. et al. **Inhibition of Species of the *Aspergillus* Section *Nigri* and Ochratoxin A Production in Grapes by Fusapyrone**. Applied environmental microbiology; v.74, nº7. Abril, 2008.
- FILHO, V. C., e YUNES, R. A. **Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade**. Santa Catarina. 1997
- FONSECA, H et al. **Espécies de *Aspergillus* produtores de aflatoxinas na região araquarense, SP**. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz . V 31. p 519-535. 1974
- FONSECA, M. **Síntese e caracterização do polímero supramolecular à base de óleo desemente de mamão (*Carica papaya* L.) maleinizado-**

meglumina. Dissertação (Mestrado em química). 86p. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química. Araraquara. 2013.

- FOOD INGREDIENTES BRASIL. **As micotoxinas**. nº 7. 2009.
- FOOD INGREDIENTES BRASIL. **Extratos vegetais**. N 11. 2010a.
- FOOD INGREDIENTES BRASIL. Agentes antimicrobianos químicos e naturais. Nº 15. 2010b.
- FRAGA, M. E.; PEREIRA, M. G. **Diversidade de Trichocomaceae Isolada de Solo e Serrapilheira de Floresta Atlântica**. Floresta e Ambiente; v.19, nº4. p. 405-413. Out./dez. 2012.
- GIFONI, J. M. et al. **Proteínas de *Moringa oleifera* lam. ligantes à quitina e seu possível papel na defesa da planta**. Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC. Fortaleza, Ceará. Jul. 2005
- GRAYBILL, J.R., BURGESS, D. S. ; HARDIN, T. C. Key issues concerning fungistatic versus fungicidal drugs. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** . v. 16, n. 1., p 42-50, 1997.
- GUIMARÃES, L. L. **Utilização de óleo essencial de *Moringa oleifera* Lam na inibição de fungos fitopatogênicos da semente de feijão (*Phaseolus vulgaris*) do grupo comercial carioca**. Dissertação (Graduação em Tecnólogo em Gestão Ambiental) - Universidade tecnológica federal do Pará. Medianeira, Pará. 41p. 2014
- HDRA- Henry Doubleday Research Association. **Moringa oleífera: a multi-purpose tree**. 2002.
- HUSNAN, L. A.; ALKAHTANI, D. F. **Impact of *Moringa* aqueous extract on pathogenic bacteria and fungi *in vitro***. Annals of Agricultural sciences; v. 61, nº 2, p. 247-250. Dez. 2016.
- IAMANAKA, B. T; OLIVEIRA, I.S.; TANIWAKI, M; H. **Micotoxinas em alimentos**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica; v. 7, p.138-161. Recife. 2010.
- IARC - International Agency for Research on Cancer. **Mycotoxins and human health**. ; v (158), p 87-104. 2012.
- IARC - International Agency for Research on Cancer. **Sumaries e evaluations. Micotoxins**. Ago. 1997

- KOKETSU, M. ; GONÇALVES, S. I. **Óleos essenciais e sua extração por arrase a vapor**. EMBRAPA-CTAA, doc. 8, 24 p. Rio de Janeiro. 1991
- LESZKOWIC, A.P. E MANDERVILLE, R.A. **Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans**. Molecular Nutrition & Food Research. V. 51, n 1. 2006.
- MAMKAA, D. P. ; GWA, V. I. **Effect of Moringa oleifera and Vernonia amygdalina Leaf Extracts against Aspergillus flavus and Botryodiplodia theobromae Causing Rot of Cowpea (Vigna unguiculata (L.) Walp) Seeds**. International Journal of Applied Science-Research and Review. V. 5, n. 2. 2018.
- MONTEIRO, F. P. et al. **Avaliação do extrato hidroetanólico das folhas de Moringa oleifera no processo de cicatrização em lesões cutâneas de ratos**. Revista Saúde e Biologia, v.10, n.3, p.25-34, set./dez. 2015
- MONTEIRO, S. C.; BRANDELLI, C. L. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. Porto Alegre. Artmed. 2017.
- NAZZARO, F. et al. **Essential Oils and Antifungal Activity**. Pharmaceuticals; v. 10, n. 86. 2017
- NELSON, D. L. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Artmed. Porto Alegre. 2011.
- OLIVEIRA, J. M. G. **Toxicidade subaguda do extrato etanólico das folhas de Myracrodruon urundeuva sobre o ciclo estral de ratas Wistar**. Revista Brasileira Plantas medicinais. v.18, n.2, p.539-546. Campinas. 2016
- OLIVEIRA, V. B. et al. **Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clade de dicksonia sellowiana (presl.). Hook, dicksoniaceae**. Revista Brasil. v.18, n.1, supl.I, p. 230-239, Campinas. 2016
- ORDONEZ, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos**, v. 1. Artmed. Porto Alegre. 2005.
- PAL et al. **Antimicrobial action of the leaf extract of Moringa oleifera LAM**. Ancient Science of Life, v. XIV, n.3, p. 197 – 199. Jan. 1995.
- PERIAGO P. M.; MOEZELAAR, R. **Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains**

- of *Bacillus cereus***. International Journal Food Microbiology. V. 68, n. 1-2, p.141-8200. Ago. 2001.
- PUBCHEM. **Tween 80**. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/443315#section=Top>> Acesso em 16 de junho de 2018.
 - RAMOS, R. S. et al. **Chemical Composition and In Vitro Antioxidant, Cytotoxic, Antimicrobial, and Larvicidal Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. (Lamiaceae)**. Scientific World Journal. 2017.
 - RIAD, S. R. e ABDALLAH A.M. **Antifungal activity of *Moringa oleifera* oil and seed extract against some plant pathogenic fungi**. Middle East Journal of Agriculture Research; v. 3, nº2, p. 242-249. 2014.
 - ROCHA, M. F. et al. **Extratos de *Moringa oleifera* e *Vernonia sp.* sobre *Candida albicans* e *Microsporium canis* isolados de cães e gatos e análise da toxicidade em *Artemia sp.*** Ciencia Rural; v.41, nº 10. Santa Maria. Out. 2011.
 - RODRIGUES, T. S. et al. **Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo)** . Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. v.13, especial, p.587-590, Botucatu. 2011
 - ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista. 100 p. Araraquara. 2012.
 - RUIVO, J. S. P. **Fitocosmética: aplicação de extratos vegetais em cosmética e dermatologia**. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) Universidade Fernando Pessoa. Porto. 2012.
 - SANTANA et al. **Caracterização físico-química da moringa (*Moringa oleifera* Lam)**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v.12, n.1, p.55-60. Campina Grande, 2010.
 - SANTOS, B. J.; CORREA, M. A.; CHORILLI, M. **Sustentabilidade, cosméticos naturais e orgânicos: consumidor, produtos, eficácia, considerações toxicológicas e regulatórias**. JOURNAL Pharmaceutical. Science. v.51 n.1 São Paulo Jan./Mar. 2015

- SAORIN, F. **Estudo de vida útil de alimentos acondicionados em embalagens com partículas de prata incorporadas na estrutura do material**. 2015. 171 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
- SHARMA et al. **Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant activities of hydro-ethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam.** Pods. Journal of Pharmacy Research; v. 4, nº2, p. 554-557. 2011.
- SIMONETII, E. **Um Rolls-Royce vegetal - Óleo de mamona é transformado em próteses ósseas e muitos outros produtos**. IPEIA, desafios do conhecimento. Ano 3. 23 ed. Jun. 2006. ADUKWU, E. C. et al. **Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral**. Applied Microbiology Biotechnology; v.100, n.22, p. 9619–9627. 2006;
- SOARES, C.; ABRUNHOSA, L. VENÂNCIO, A. **Fungos produtores de micotoxinas**. Minho. Jul. 2013.
- SOARES, R. P. **Atividade biológica dos óleos essenciais de gengibre, açafrão e louro sobre o fungo *Aspergillus carbonarius***. Dissertação (Mestrado em agroquímica) - Universidade Federal de Lavras. 65p. Lavras, Minas Gerais. 2009
- SPADOTTO, C. A. **Avaliação de riscos ambientais do uso de defensivos agrícolas para a qualidade da água**. Horticultura Brasileira. Horticultura brasileira. v. 27, n. 2. Ago. 2009
- TELES, A. R. S. **Potencial antioxidante do extrato etanólico de folhas da *Moringa Oleifera* Lam.** In: Congresso brasileiro de ciência e tecnologia de alimentos. 24-27 out. 2016.
- TOMÉ, R.; MARQUES, G. *Aspergillus ochraceus*. **Atlas micologia**. 2013
- TORTORA, G. J., CASE, C.L. e FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 12 ed. Artmed Editora. Porto Alegre. RS. 2016.
- VALERIANO, C. et al. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar**. Revista brasileira de plantas medicinais; v.14, nº1. Botucatu. 2012.

- WALTERS, D. et al. **Antifungal activities of four fatty acids against Plant Pathogenic fungi.** Mycopathologia. p 87–90. 2004.
- WHO - World Health Organization. **Evaluation of certain mycotoxins in food.** Geneva. 2001.
- ZAFFER, M. et al. **Antifungal Efficacy of Moringa olei. fera Lam.** American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics. P 28-33. Jan. 2015.
- ZHENG, C. J. et al. **Fatty acids systhesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids.** Federation of European Biochemical Societies; v. 579. 2005
- ZUKIFLI, N. A.; ZAKARIA, L. **Morphological and Molecular Diversity of Aspergillus From Corn Grain Used as Livestock Feed.** Hayati Journal of Biosciences. v. 24, p. 26-34. Jan. 2017