Universidade Federal de Pelotas

Faculdade de agronomia Eliseu Maciel

Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Dissertação

Óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*): Atividade antimicrobiana contra fungos isolados de alimentos e aplicação como componente ativo em filme de acetato de celulose

Maria Fernanda Fernandes Siqueira

Química de Alimentos

Pelotas, 2021

Maria Fernanda Fernandes Siqueira

Óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*): Atividade antimicrobiana contra fungos isolados de alimentos e aplicação como componente ativo em filme de acetato de celulose

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de pelotas com requisito final à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.ª Drª. Ângela Maria Fiorentini

Co-orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S111o Siqueira, Maria Fernanda Fernandes

Óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*): Atividade antimicrobiana contra fungos isolados de alimentos e aplicação como componente ativo em filme de acetato de celulose / Maria Fernanda Fernandes Siqueira ; Angela Maria Fiorentini, orientadora ; Wladimir Padilha da Silva, Eliezer Ávila Gandra, coorientadores. — Pelotas, 2021.

64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Embalagem ativa. 2. Fungos filamentosos. 3. Conservação. I. Fiorentini, Angela Maria, orient. II. Silva, Wladimir Padilha da, coorient. III. Gandra, Eliezer Ávila, coorient. IV. Título.

CDD : 664

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Maria Fernanda Fernandes Siqueira

Óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*): Atividade antimicrobiana contra fungos isolados de alimentos e aplicação como componente ativo em filme de acetato de celulose

Dissertação de mestrado aprovada, como requisito final para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 25 de agosto de 2021.

Banca examinadora:

Prof.ª Dra. Ângela Maria Fiorentini (orientadora) - Presidente

Doutora em Ciências dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC.

Dr. Claudio Eduardo dos Santos Cruxen - Membro titular

Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas/UFPel.

Drª. Graciele Daiane Funck - Membro titular

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas/UFPel.

Drª. Tatiane Kuka Valente Gandra- Membro titular

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas/UFPel.

Agradecimentos

A minha mãe Marisa e ao meu pai Fernando, por todo apoio, conforto e amor a mim dedicados ao longo desses anos da minha trajetória acadêmica, sem o acalanto de vocês não conseguira ter desenvolvido toda a resiliência necessária para chegar até aqui. Vocês foram e sempre serão fundamentais para mais essa conquista e muitas outras que não são só minhas, mas nossas.

A minha orientadora, professora, conselheira, amiga Ângela, por toda ajuda, disponibilidade, incentivo e paciência durante o desenvolvimento desse trabalho, sem a sua insistência e confiança no meu potencial, não teria chegado até aqui, pois os momentos de duvidas foram muitos, mas a senhora sempre estava no final do túnel com uma lanterna para me ajudar, obrigada por isso.

Aos professores Wladimir e Eliezer meus coorientadores, pelos ensinamentos, por sanarem dúvidas e pelo acolhimento dentro do laboratório.

As minhas amigas Helena e Khadija, por estarem sempre dispostas a me ajudar e ensinar. Vocês foram extremamente essenciais nos momentos em que a visualização de uma solução para algum problema estava complicada, estavam sempre ali para clarear as minhas ideias. Helena obrigada por trazer alegria nos pequenos momentos do nosso dia a dia com toda a sua espontaneidade e sarcasmo, tornou alguns momentos mais leves, cheios de risada acompanhados de um bom chimarrão. Khadija obrigada por ser a minha versão do filme clássico natalino onde somos levados ao passado presente e futuro, e me ensinar a ter uma melhor perspectiva das situações e suas consequências, ter você ao meu lado enriqueceu muito o meu desenvolvimento profissional e pessoal, muito obrigada!

Aos membros da banca pela disponibilidade em participar, e pelas suas considerações.

A todos os integrantes do Laboratório de Processamento de Produtos de Origem Animal (LPOA) - UFPel, e ex-integrantes, especialmente à Kamila Furtado da Cunha e ao Guilherme da Silva Dannenberg, pelo auxílio na elaboração do filme de acetato de celulose.

Aos integrantes do Laboratório de Microbiologia por toda a ajuda, e dúvidas sanadas.

A todos que auxiliaram, ou estiveram presentes, direta ou indiretamente, obrigada!

Resumo

SIQUEIRA, Maria Fernanda Fernandes. **Óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*): Atividade antimicrobiana contra fungos isolados de alimentos e aplicação como componente ativo em filme de acetato de celulose.** 2021. 64f (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

O desenvolvimento de fungos em alimentos, além de causar alterações sensoriais consideráveis, também apresenta um potencial risco à saúde, devido a possível presença de micotoxinas. Buscando minimizar os riscos de contaminação microbiana nos alimentos, e a crescente demanda pela utilização de compostos mais naturais e sustentáveis nas indústrias do setor alimentício, a elaboração de embalagens ativas e biodegradáveis, ganha destaque. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris)* - OET contra fungos isolados de alimentos, bem como avaliar seu potencial como componente ativo em filme de acetato de celulose. A ação antifúngica do OET foi avaliada *in vitro*, através das metodologias de difusão em ágar, micro-atmosfera, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM), com isolados fúngicos de queijos comercializados na região de Pelotas-RS*.* Os isolados obtidos foram identificados molecularmente como sendo *Penicillium crustosum*, *Aspergillus flavus e Fusarium oxysporum.* Nos testes de ação antifúngica de difusão em ágar e micro-atmosfera, o OET apresentou ação de inibição frente a todos os fungos testados, com zonas de inibição superiores a 10 mm. O isolado *Peniculiium crustosum* apresentou uma CIM de 1 µL/mL e CFM de 3 µL/mL, enquanto *Aspergillus flavus* apresentou uma CIM de 0,8 µL/mL e CFM de 4 µL/mL, e o isolado *Fusarium oxysporum* apresentou uma CIM de 0,7 µL/mL e CFM de 3 µL/mL. Nos testes *in vitro* da atividade do filme ativo, destaca-se a inibição sobre o isolado *Penicillium crustosum* que apresentou uma maior sensibilidade ao filme ativo e *Fusarium oxysporum* com menor sensibilidade, quando comparado aos demais isolados fúngicos. Conclui-se que o OET tem potencial ação antifúngica contra as diferentes espécies testadas, e quando adicionado em filme de acetato de celulose, mostrou-se eficaz no controle fúngico, principalmente, contra *Fusarium oxysporum*.

Palavras chave: Embalagem ativa, Fungos filamentosos, Conservação.

Abstract

SIQUEIRA, Maria Fernanda Fernandes. **Thyme essential oil (*Thymus vulgaris*): Antimicrobial activity against fungi obtained from food and application as an active component in cellulose acetate film**. 2021. 64f (Masters in Food Science and Technology) - Postgraduate Program in Food Science and Technology, Federal University of Pelotas

The development of fungi in food, in addition to causing considerable sensory changes, also poses a potential health risk due to the possible presence of mycotoxins. Seeking to minimize the risks of microbial contamination in food, and the growing demand for the use of more natural and sustainable compounds in the food industry, the development of active and biodegradable packaging is highlighted. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil - OET against fungi isolated from food, as well as to evaluate its potential as an active component in cellulose acetate film. The antifungal action of OET was evaluated *in vitro*, through the methodologies of diffusion in agar, micro-atmosphere, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC), with fungal isolates from cheeses sold in the region of Pelotas-RS. The isolated fungi were molecularly identified as *Penicillium crustosum*, *Aspergillus flavus* and *Fusarium oxysporum*. In the antifungal action tests of diffusion in agar and micro-atmosphere, the OET showed an inhibitory action against all tested fungi, with inhibition zone greater than 10 mm. *Peniculiium crustosum* isolate had a MIC of 1 µL/mL and a CFM of 3 µL/mL, while *Aspergillus flavus* had a MIC of 0.8 µL/mL and a CFM of 4 µL/mL and *Fusarium oxysporum* isolate had a MIC of 0 .7 µL/mL and CFM 3 µL/mL In the *in vitro* tests of the active film activity, the inhibition on the *Penicillium crustosum* isolate stands out, which showed a greater sensitivity to the active film and *Fusarium oxysporum* with lower sensitivity, when compared to the other fungal isolates. It is concluded that OET has potential antifungal action against the different species tested, and when added to a cellulose acetate film, it was effective in fungal control, mainly against *Fusarium oxysporum*.

Key words: Active packaging, Filamentous fungi, Conservation

Lista de Figuras

Figura 1- Morfologia do conidióforo de *Penicillium* 19
Figura 2- Morfologia do conidióforo de *Aspergillus* 20
Figura 3-Estrutura morfológica do gênero *Fusarium* 21
Figura 4- Reação para obtenção do AC tri-substituído 26
Figura 5- Crescimento do isolado fúngico do gênero *Penicillium* (QCP1) em ágar BDA, procedente da superfície de queijo. 34
Figura 6- Crescimento do isolado fúngico do gênero *Aspergillus* (QCA1) em ágar BDA, procedente da superfície de queijo. 35
Figura 7- Crescimento do isolado fúngico do gênero *Fusarium* (QFA1) em ágar BDA, procedente da superfície de queijo. 35
Figura 8 - Micrografia por microscopia óptica do isolado fúngico gênero *Penicillium* (QCPI), procedente da superfície de queijo (ampliação total de 400X)..... 36
Figura 9 - Micrografia por microscopia óptica do isolado fúngico gênero *Penicillium* (QCPI), procedente da superfície de queijo (ampliação total de 1.000X)..... 36
Figura 10- Micrografia por microscopia óptica do isolado fúngico, gênero *Aspergillus* (QCA2), procedente da superfície de queijo (ampliação total de 200X)..... 37
Figura 11- Micrografia por microscopia óptica do isolado fúngico, gênero *Aspergillus* (QCA2), procedente da superfície de queijo (ampliação total de 1.000X)..... 38
Figura 12- Micrografia por microscopia óptica do isolado fúngico, gênero *Fusarium* (QAF1), procedente da superfície de queijo (ampliação total de 200X)..... 39
Figura 13- Micrografia por microscopia óptica do isolado fúngico, gênero *Fusarium* (QAF1), procedente da superfície de queijo (ampliação total de 1000X)..... 39

Lista de Tabelas

Tabela 1- Identificação molecular (número de acesso Genbank) e respectiva classificação taxonômica dos isolados fúngicos, pertencentes ao Filo Ascomycota, procedentes de queijos 40
Tabela 2 - Atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho (OET), pela técnica de difusão em ágar. 41
Tabela 3 - Atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho (OET), pela técnica de micro-atmosfera. 43
Tabela 4- Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de tomilho (OET), frente aos isolados fúngicos. 45
Tabela 5 - Atividade antifúngica do filme de acetato de celulose contendo OET, pela técnica de difusão em ágar..... 47
Tabela 6 – Equivalência dos valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM e Concentração Fungicida Mínima (CFM) de µL/mL para µg/m, dos isolados fúngicos. 62
Tabela 7- Laudo Técnico Descritivo do Óleo Essencial de *Thymus vulgaris*. .. 64

Sumário

1 Introdução 12

2 Objetivos 15

2.1 Geral 15

2.2 Específicos 15

3 Revisão da literatura 16

3.1 Contaminação microbiana em alimentos 16

3.2 Fungos Filamentosos 16

3.2.1 Gênero *Penicillium* 18

3.2.2 Gênero *Aspergillus* 19

3.2.3 Gênero *Fusarium* 20

3.3 Óleos essenciais 21

3.3.1 Aplicação de óleos essenciais na área de alimentos 22

3.3.1.2 Óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris)* 23

3.4 Embalagens ativas 25

3.5 Acetato de celulose 26

4 Material e Métodos 28

4.1 Óleo essencial 28

4.2 Isolamentos de fungos 28

4.3 Identificação macroscópica dos isolados fúngicos 28

4.4 Identificação microscópica dos isolados fúngicos 29

4.5 Identificação molecular dos isolados fúngicos 29

4.7 Atividade antifúngica 30

4.7.1 Preparo do inóculo 30

4.7.2 Difusão em ágar 30

4.7.3 Micro-atmosfera 31

4.7.4 Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM) 31

4.8 Elaboração do Filme de acetato de celulose (AC) 32
4.8.1 Atividade antifúngica do filme 33
4.9 Análise estatística 33
5 Resultados e Discussão 34
5.1 Isolamento e caracterização dos isolados 34
5.1.3 Caracterização molecular dos isolados fúngicos 40
5.2 Atividade antifúngica do OET *in vitro* 40
5.2.1 Difusão em ágar 40
5.2.2 Micro-atmosfera 42
5.2.3 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) 44
5.2.4 Atividade antifúngica do filme de acetato de celulose contendo OET . 47
6 Conclusão 49
7 Considerações Finais 50
8 Referências 51
Apêndices 61
Anexos 63

1 Introdução

Em qualquer segmento da indústria de alimentos, a conservação dos produtos e o fornecimento de alimentos seguros e de qualidade, são de extrema importância. E para que isso ocorra, é necessário que todo o processo de industrialização seja monitorado, para que sejam evitadas contaminações de origem biológica, química e física (MACWAN et al., 2016). A contaminação microbiana afeta diretamente a qualidade dos alimentos, comprometendo tanto a segurança como a conservação, através do desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes, respectivamente (ROBY et al., 2013).

Quanto a contaminação microbiana destaca-se os fungos, como agentes contaminantes responsáveis por alterações indesejadas, causando perdas de alimentos, em torno de 5 a 10%. Os fungos se desenvolvem em diversos alimentos, como, leite e derivados, cereais, vegetais, frutas e carnes, causando alterações como acidificação, descoloração, deterioração e sabores indesejáveis (OLAGUNJU et al., 2018; GROOT, ABEE, BOKHORST-VAN, 2019). Podem apresentar risco à saúde, devido a possível presença de micotoxinas, que são metabólitos secundários produzidos por alguns fungos (ZACARCHENCO et al., 2011), como aflatoxinas por *Aspergillus (*SOUZA et al., 2017), fumosinas por *Fusarium* (FERREIRA, 2014*),* e ocratoxinas por *Aspergillus* e *Penicillium* (PRADO, 2014).

A indústria faz uso da implementação de métodos de controle como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), com a finalidade de evitar qualquer tipo de contaminação. Além disso, é permitida pela legislação brasileira a utilização de aditivos alimentares da classe dos conservantes, mais especificamente com ação antifúngica como sorbato de potássio e benzoato de sódio (MACWAN et al., 2016; BRASIL, 2017; RIBEIRO et al., 2017).

Entretanto, nos últimos anos, as substâncias naturais que demonstram uma possível ação antimicrobiana, equivalente e até superior, quando comparadas com os conservantes sintéticos, estão cada vez mais, sendo valorizadas no mercado (ALZOREKY, NAKAHARA, 2003). Dentre esses

compostos com ação antimicrobiana destacam-se os óleos essenciais (OE), substâncias com potencial aplicação em alimentos e em embalagens, devido ao fato de seus constituintes serem substâncias bioativas de baixa toxicidade (MIR et al., 2018).

Os OE são metabólitos secundários produzidos pelas plantas, com a finalidade de promover resistência a condições de variação climática, ataque de microrganismos e ataque de insetos (KAVOOSI, ROWSHAN, 2013). São constituídos de compostos voláteis, e também por substâncias bioativas, que concedem características como atividade antioxidante e antimicrobiana (SALGUEIRO, MARTINS, CORREIA, 2010).

Dentre os óleos essenciais podemos citar o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris)* (OET) com uma eficácia interessante quanto a inibição de bactérias patogênicas como *Campylobacter jejuni, S.* Enteritidis*, E. coli, S. aureus e L. monocytogenes* (MANDAL, DEB-MANDAL 2016*).* Também foi relatada ação antifúngica do OET (pela volatilização de seus compostos) contra *Aspergillus* spp*., A. oryzae, A. brasiliensis, A. flavus* (DOBRE, GAGIU, PETRU 2011)*.*

Consequentemente, a aplicação de OE como conservante natural em alimentos, tem sido considerada uma alternativa interessante aos aditivos sintéticos. Entretanto, sua aplicação direta no alimento, como um ingrediente poderia alterar características sensoriais, desta forma, uma alternativa seria a sua incorporação em uma matriz polimérica biodegradável, produzindo-se assim, uma embalagem primária biodegradável com um componente ativo.

Entre os diversos polímeros biodegradáveis que vêm sendo estudados, está o acetato de celulose (AC). É um dos derivados da celulose, com maior importância comercial devido as suas propriedades, dentre elas ser amorfo e possibilitar a obtenção de filmes transparentes e, com um custo relativamente baixo (CERQUEIRA et al., 2009). O AC necessita de baixas temperaturas e se destaca por sua versatilidade, podendo ser aplicado na forma de fibras, filmes ou membranas (WU, 2014).

Portanto, avaliar a capacidade antifúngica de óleos essenciais é uma vertente de estudo promissora, devido a composição química e a ação antimicrobiana dos mesmos, já relatados na literatura. No entanto, os OE diferem quanto a composição química, bem como a resposta dos diferentes microrganismos a um determinado OE, justificando o presente estudo sobre ação antimicrobiana de OET frente a isolados fúngicos, procedentes da superfície de queijos.

2 Objetivos

2.1 Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) contra fungos isolados de alimentos, bem como avaliar seu potencial como componente ativo em filme de acetato de celulose.

2.2 Específicos

- Isolar e identificar fungos provenientes da superfície de queijos.
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Thymus vulgaris* frente aos isolados de alimentos.
- Determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações fungicidas mínimas (CFM), do óleo essencial de *Thymus vulgaris.*
- Desenvolver um filme ativo com acetato de celulose adicionado do óleo essencial de *Thymus vulgaris*.
- Avaliar a capacidade antifúngica do filme de acetato de celulose adicionado do óleo essencial de *Thymus vulgaris in vitro.*

3 Revisão da literatura

3.1 Contaminação microbiana em alimentos

A produção de um alimento seguro e de qualidade é o principal objetivo das indústrias do setor alimentício, sendo um parâmetro crítico para a garantia da saúde pública (PLACHIKKATTU et al., 2021). Dentro desse contexto, a contaminação por microrganismos (tanto fungos como bactérias) é considerada um fator prejudicial à segurança e qualidade do produto entregue ao consumidor (MACWAN et al., 2016).

A contaminação de origem microbiana nos alimentos, está diretamente relacionada com a sobrevivência e multiplicação celular, e seu desenvolvimento é facilitado através de processos de aquecimento e refrigeração inadequados, bem como as condições de estocagem/armazenamento. Sua origem, na maioria dos casos, é relacionada ao manipulador e também à contaminação cruzada (FORSYTHE, 2013).

Além da implementação de programas de controle da qualidade como, BPF (Boas Práticas de Fabricação) e APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), a indústria de alimentos utiliza conservantes para garantir a segurança microbiológica de seus produtos (CALO et al., 2015; MACWAN et al., 2016). A utilização dessas substâncias químicas sintéticas é permitida para aplicação como aditivos alimentares, pois tem sua segurança comprovada por órgãos governamentais responsáveis, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2017). No entanto, algumas indústrias, como de lácteos, podem também fazer uso de conservantes naturais como natamicina, nisina e lisozima (BRASIL, 1996).

3.2 Fungos Filamentosos

Os fungos pertencem ao Reino Fungi (Domínio Eucarya), são seres eucariontes, heterotróficos e estão amplamente difundidos no ambiente (solo, ar, água), são seres macro ou microscópicos, uni ou pluricelulares e cerca de 1,5 milhão de espécies já foram identificadas. Alguns fungos são utilizados para fins culinários, participam da fermentação de alimentos (pães, vinho) e até

mesmo com fins medicinais, entretanto, muitos são considerados parasitas, causadores de doenças em plantas, animais e seres humanos (SOUZA, 2016).

Os fungos filamentosos têm a sua estrutura básica formada por filamentos, denominados hifas, que agregados formam o micélio. O micélio pode ser classificado em dois tipos, o vegetativo que tem como função promover a fixação do fungo, e o micélio reprodutivo, que tem como função propagar a reprodução do fungo, através de esporos. Essa estrutura micelial dos fungos filamentosos, é responsável pelo aspecto característico de cada espécie e gênero, podendo ser cotonoso, gelatinoso e úmido (BUEÉ et al., 2007).

Para a identificação dos fungos, é necessário ter como base suas características morfológicas, quanto ao tamanho, textura, bordas, pigmentação, e relevo das colônias (SOUZA, 2016). Na identificação morfológica dos fungos filamentosos é importante que as características macroscópicas e microscópicas sejam levadas em consideração, sendo as características microscópicas as que contêm uma maior riqueza e importância para a identificação (SAMSON et al., 2010).

O Reino Fungi compreende 4 filos Chytrydiomycota, Zygomycota, Basidiomycota e Ascomycota (FAIA, 2011). Os fungos pertencentes ao filo Chytrydiomycota são semelhantes aos fungos superiores, contém somente uma classe e possuem características como estrutura cenocítica do talo e conversão do zigoto em esporângio de resistência (ZOTTARELLI, GOMES, 2007). Os fungos pertencentes ao filo Zygomycota possuem características como: micélio não septado, crescimento rápido e reprodução através dos esporangióforos (reprodução assexuada). A reprodução sexuada e a presença de micélios septados são características pertencentes a Filos mais desenvolvidos como o Basidiomycota e Ascomycota (*Penicillium, Aspergillus, Fusarium*), porém, paralelamente a reprodução sexuada também pode acontecer a reprodução assexuada, através da produção de esporos (FAIA, 2011).

Os fungos apresentam uma grande facilidade para se desenvolver em substratos e condições em que outros microrganismos apresentam dificuldades

como: atividade de água (a_w) reduzida (> 0,65 até < 0,99), pH reduzido < 3,0, ampla faixa de temperatura inferior a 0 ºC e superior a 40 ºC, devido a sua elevada capacidade de esporulação (MEDINA et al., 2006).

Na literatura, há relatos de diversas espécies de fungos como agentes deteriorantes de alimentos, dentre eles o queijo, devendo ser considerados como riscos nos programas de garantia de qualidade e segurança dos alimentos, dentro das indústrias desse setor (SOUZA, 2016). A contaminação de origem fúngica é considerada um potencial problema de segurança dos alimentos, devido ao fato de que algumas espécies de fungos produzem micotoxinas (KURE, SKAAR, BRENDEHAUG, 2004).

No contexto da contaminação de alimentos de origem láctea, os fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* são comumente mencionados como agentes deteriorantes (BERNADI et al., 2021). Geralmente, os fungos envolvidos no processo de deterioração têm origem no ambiente de produção, incluindo o ar, superfícies de trabalho, matéria prima, equipamentos e manipuladores (VACHEYROU et al., 2011).

3.2.1 Gênero *Penicillium*

Os fungos pertencentes ao gênero *Penicillium*, ganham destaque quando se refere à contaminação alimentar, são amplamente difundidos no ambiente, estando presentes no ar, solo, vegetação em deterioração, etc.... Entretanto, algumas espécies pertencentes a esse gênero apresentam um valor particular como no caso de *Penicillium notatum* produtor do antibiótico penicilina e em nível industrial ganham destaque *Penicillium camemberti* e *Penicillium roqueforti* que estão associados ao processo produtivo de alguns tipos de queijos (SOUZA, 2016).

O gênero *Penicillium* pertence ao Filo Ascomycota, Classe Eurotomycetes, ordem Eurotiales e à família Trichocomanaceae. (HOUBRAKEN, SAMSON, 2011). Apresentam hifas septadas e reprodução assexuada, por meio de corpos de frutificação denominados conídios (RAMOS,

2018). A estrutura morfológica do gênero *Penicillium*, pode ser observada na Figura 1.

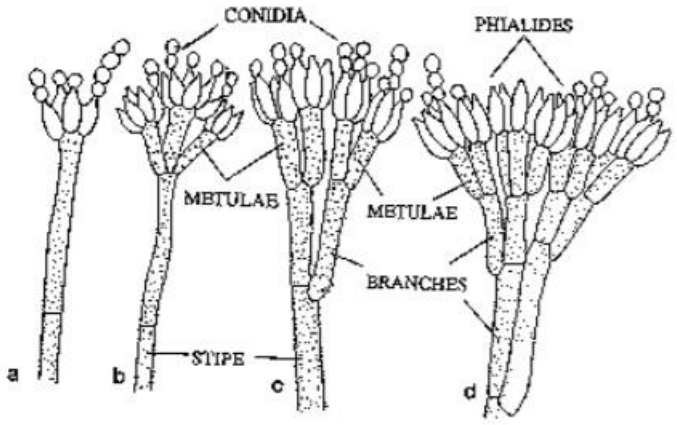

Figura 1- Morfologia do conidióforo de *Penicillium*
Fonte: Monteiro (2012)

3.2.2 Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus,* engloba mais de 260 espécies, pertence ao Filo Ascomycota, Classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales e à família Aspergilaceae, é amplamente distribuído na natureza, sendo isolado com mais facilidade de regiões com climas tropicais. Em relação a sua morfologia, as colônias apresentam bastante variação principalmente na sua coloração, sendo encontradas colônias com a coloração em verde, amarelo, branco, marrom, preto e cinza (MONTEIRO, 2012). As características morfológicas podem ser observadas na Figura 2.

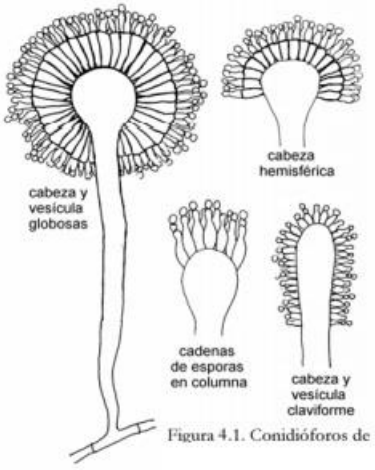

Figura 2- Morfologia do conidióforo de *Aspergillus*
Fonte: Monteiro (2012)

O gênero *Aspergillus* apresenta impactos negativos e positivos. É responsável por causar diversas doenças em plantas e em produtos vegetais, sendo *Aspergilus niger, Aspergilus flavus, Aspergillus parasiticus, Aspergillus achraceus e Aspergillus alliaceus* causadores de patogênese, contaminando os produtos em diferentes fases, desde a pré-colheita ao processamento e manuseio (PERRONE et al., 2007). A ocorrência de contaminação pelo gênero *Aspergillus* é expressiva em grãos de arroz, aveia, cevada, ervilha, feijão, milho soja e amendoim (COSTA et al., 2020).

3.2.3 Gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium* apresenta uma diversidade fisiológica e morfológica, estando presente na grande maioria dos nichos ecossistêmicos. A maioria das espécies de *Fusarium* são habitantes comuns do solo, onde permanecem na forma de micélio (KARLSSON et al., 2016). Esse gênero é classificado como pertencente ao Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales, Família Nectriaceae (LAZAROTTO, 2013). A estrutura morfológica pode ser observada na Figura 3.

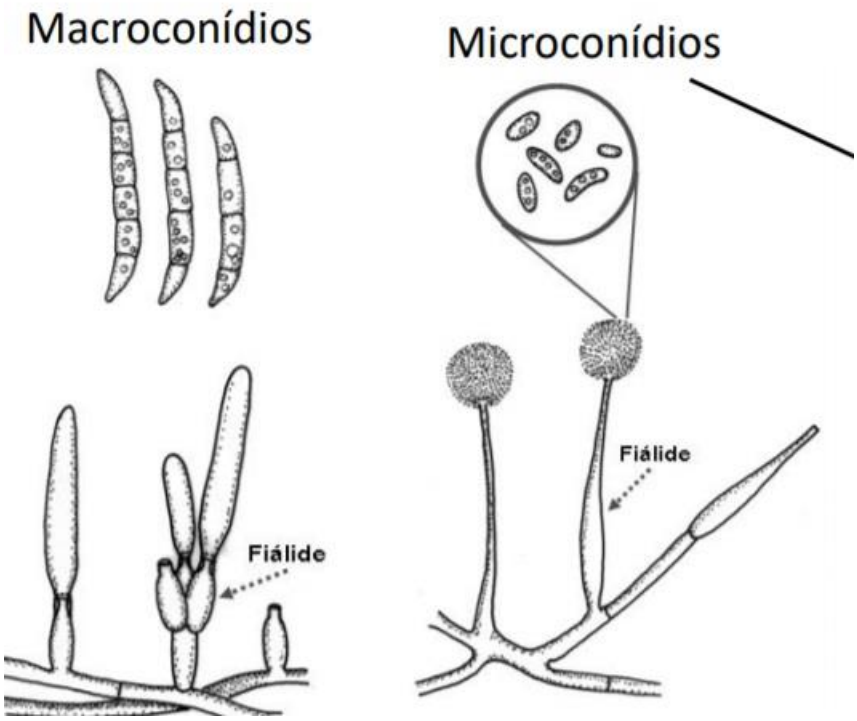

Figura 3-Estrutura morfológica do gênero *Fusarium*
Fonte: Santos (2020)

A importância do gênero foi retratada por Dean et al. (2012), onde *F. oxysporum* é associado entre os dez mais importantes patógenos, do ponto de vista científico e econômico, devido ao fato de estar relacionado com diversas enfermidades em diversas culturas como tomate, algodão, e banana (BARRETO, 2018), encontrados também em cereais como arroz, cevada, sorgo e milho (SOUZA et al., 2017).

3.3 Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE), também chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, podem ser definidos sob três diferentes óticas: química, física e biológica (BURT, 2004; SIMÕES et al., 2010).

Fisicamente, os OE podem ser definidos como líquido viscoso, lipofílico de natureza volátil (BURT, 2004). Sua definição como óleo está restrita às propriedades físicas (viscosidade, translucidez, imiscibilidade em água) dessa

classe de compostos, porém, não devem ser confundidos com lipídeos (SIMÕES et al, 2010).

Do ponto de vista da perspectiva química, os OE podem ser retratados como uma mistura complexa de substâncias voláteis, sendo majoritariamente, compostos por terpenóides como os monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), e também fenilpropenos. Apresentam uma variação, principalmente, nas funções orgânicas presentes em suas cadeias (álcoois, ácidos, cetonas, ésteres, aminas, sulfatos e aldeídos) (CALO et al., 2015). Diferentes terpenos principalmente, diterpenos (C_{20}) também foram apontados como constituintes dos OE (BERNARDI et al., 2021).

Dentro da ótica biológica, os OE são definidos como substâncias derivadas do metabolismo secundário da planta. Garantem a sobrevivência às condições adversas como a falta de nutrientes, estresse hídrico, mudanças abruptas de temperatura e também protegem o vegetal de ataques de patógenos e herbívoros. Além de exercer funções defensivas, os OE também desempenham um papel importante na atração de agentes polinizadores (ANDRADE et al., 2014). Também podem atuar em reações oxidativas, exercendo a função de antioxidante, doando um hidrogênio, especialmente na presença de luz (EVANS, 2009).

A obtenção dos OE pode ser a partir de qualquer estrutura do vegetal (flores, cascas, folhas, frutos, raízes). Sua extração pode ser realizada por diversos métodos como extração por solventes orgânicos, extração com fluido supercrítico, e a hidrodestilação sendo este último o método mais utilizado, pelo fato de apresentar como grande vantagem a não utilização de solventes que podem gerar alguma toxicidade (SILVEIRA et al., 2012; ANDRADE et al., 2014).

3.3.1 Aplicação de óleos essenciais na área de alimentos

Nos últimos anos, a indústria de alimentos vem demonstrando um grande interesse na utilização de compostos com menor impacto ambiental, dentre eles, extratos de origem vegetal estão ganhando mais espaço,

principalmente como agente antimicrobiano (HABERBECK 2011; MENEZES, 2016). Além disso, nos últimos anos os consumidores estão gerando uma nova tendência no mercado, através da redução do consumo de produtos produzidos com substâncias sintéticas, aumentando a procura por produtos mais naturais (SILVA, 2014). Nesse contexto, a utilização dos OE de plantas e especiarias tem conquistado certo destaque, tornando-se o foco de estudos sobre sua composição e atividade biológica (MENEZES, 2016).

Diversos estudos relatam que, os OE possuem propriedades bactericida, fungicida, analgésica, sedativa, anti-inflamatória e também antioxidante (PAGANINI, 2017). As possibilidades de aplicação dos OE em alimentos são diversas, principalmente pelo fato de ser considerado um composto geralmente seguro GRAS (*Generally Recognizd As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (FDA, 2016).

Entre os OE que podem ser utilizados pelas indústrias do setor alimentício, está o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris)*. Este OE pode ser aplicado como intensificador de sabor, além de atividade antioxidante e antimicrobiana, características já reladas na literatura (MANDAL, DEB-MANDAL, 2016).

3.3.1.2 Óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris)*

O tomilho é um subarbusto perene de caule lenhoso e, com uma estimativa de ciclo de vida entre 10 e 15 anos. A planta adulta pode ter 25 cm de altura, suas folhas sem pedúnculo têm 6-12 mm de comprimento e são ovais, seu período de floração é de junho a julho (MANDAL, DEB-MANDAL 2016).

É uma planta originada na região do mediterrâneo, condimentar, medicinal, aromática, pertence à família Lamiaceae e o gênero *Thymus* contém 215 espécies. É cultivado em todo o mundo, e sua reprodução pode ser feita através de sementes, partes vegetativas e também por estacas da raiz. (MANDAL, DEB-MANDAL, 2016).

Na medicina tradicional, o tomilho é amplamente utilizado em chás e infusões, por conter compostos bioativos assim como, os constituintes presentes no óleo essencial de tomilho (OET), tais como flavonóides, ácidos fenólicos, timol e carvacrol. Esses compostos possuem atividade antioxidante, antimicrobiana, expectorante, entre outros. Algumas pesquisas relatam que alguns compostos fenólicos presentes no OET, reagem diretamente com os radicais livres e inibem a peroxidação lipídica nos alimentos (KHAZDAIR, ANAEIGOUDARI, MOHEBBATI, 2018).

A ação antimicrobiana do OET torna-o um importante candidato para utilização como agente antimicrobiano alternativo, especialmente frente a patógenos fúngicos que apresentam resistência a fármacos como fluconazol, anfotericina B e equinocandinas (BURT, 2004). O OET possui na sua composição β-cariofileno, ρ-cimeno, timol, carvacrol e γ-terpineno (BURT, 2004; BORUGA et al., 2014).

Yaagoubi et al. (2021), realizaram um levantamento em diversos estudos sobre a composição química e atividade biológica do óleo essencial de tomilho de diversas espécies, esse levantamento inclui a espécie *Thymus vulgaris,* demonstrando uma variação na concentração de seus compostos majoritários sendo eles carvacrol (70,97% a 81,29%), timol (35,87% a 47,49%), γ-terpineno 5,89% a 12,86%) e ρ-cimeno (3,89% a 24,13%).

Muitos estudos demonstraram a atividade antimicrobiana do OET, como Oliveira et al. (2020), que relataram a atividade antifúngica do OET, contra *Aspergillus flavus.* Nguefack et al. (2009), observaram o potencial de aplicação do OET como conservante em alimentos*,* com a inibição de *Aspergillus ochraceus, Penicillium expansum* e *Penicillium verrucosum* e Burt e Reinders (2003) relatam atividade bactericida e bacteriostática de OET contra *E. coli* O157:H7. O efeito do timol, um dos principais componentes do OET, como inibidor do efeito fúngico foi relatado por Souza et al (2004).

3.4 Embalagens ativas

As embalagens exercem três principais funções, quando se trata de alimentos: conter o alimento, proteger de degradações de origem microbiana ou física, garantir a preservação das características sensoriais e a segurança (BARSKA, WYRWA, 2016; GHAANI et al., 2016). Entretanto, nos últimos anos, a embalagem passou a cumprir mais funções além das denominadas como básicas, a partir do desenvolvimento de embalagens mais interativas, classificadas como embalagens inteligentes e também embalagens ativas. Desta forma, atende as expectativas do consumidor quanto ao aumento da vida útil e visualização da qualidade dos produtos alimentícios embalados (DOBRUCKA, CIERPISZEWSKI, 2014).

As embalagens ativas consistem na interação da mesma com o produto, a fim de se evitar que ocorra alguma alteração indesejável, através da absorção ou emissão de substâncias que interagem com o ambiente interno da embalagem (LOPES et al., 2014; DANNENBERG et al., 2017; BHARGAVA et al., 2020). E com o intuito de reduzir danos causados pelo desenvolvimento de microrganismos, algumas pesquisas propõe a utilização, em embalagens, de substâncias com propriedades antimicrobianas, como ácidos, sais, enzimas, bacteriocinas e também óleos essenciais (PINTADO et al., 2010; LOPES et al., 2014).

Os componentes ativos podem ser incorporados ao material constituinte da embalagem e liberados, gradativamente, durante o período de armazenamento, além disso, também podem estar presentes de forma separada da embalagem, como em sachês (LOPES et al., 2014; RIBEIRO et al., 2017).

Em um estudo realizado por Dannenberg et al. (2017), constataram que a utilização do acetato de celulose como matriz polimérica para a produção de filmes ativos é promissora. Uma vez que a solução polimérica é formada em baixas temperaturas, evitando a volatilização dos compostos do OE, quando o mesmo for utilizado como componente ativo. Além disso, nesse estudo também foi evidenciado que o filme formado por essa matriz polimérica tem a

capacidade de liberação gradativa do componente ativo em diferentes meios de aplicação (líquido, sólido, micro atmosfera).

Dentre os derivados obtidos da celulose, o acetato de celulose, é o de maior importância econômica e industrial, sendo amplamente utilizado em diversas atividades como: componente de revestimentos, membranas e principalmente, como filtro de cigarro (BRUM et al., 2012). O polímero formado através do acetato de celulose apresenta uma grande aplicabilidade comercial, pela formação de um filme transparente, com um baixo custo, e também pela sua versatilidade de formatação, podendo ser moldado em forma de membrana, fibras e também filmes plásticos (WU, 2014).

3.5 Acetato de celulose

O acetato de celulose (AC) é um material que vem ganhado destaque no setor de embalagens por conta das suas diversas aplicabilidades, filtros, fibras e membranas (PAGANINI, 2017). É produzido através da reação de esterificação da celulose pela substituição dos grupos hidroxila por grupos acetila. O número médio de grupos acetila por unidade glicosídica é denominado grau de substituição (ENDRES, SIEBERT-RATHS, 2011). A estrutura do AC pode ser observada na Figura 4.

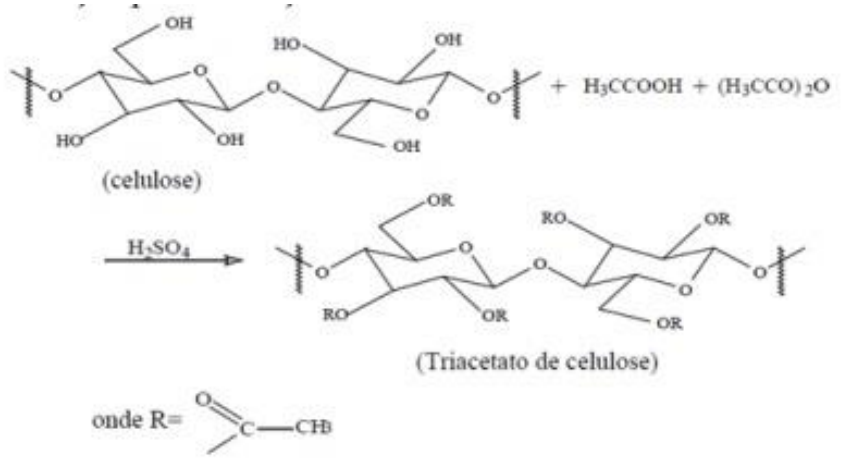

Figura 4- Reação para obtenção do AC tri-substituído
Fonte: Paganini (2017)

As propriedades e aplicações do AC são denominadas pelo grau de substituição, que vai influenciar principalmente na sua solubilidade e

compatibilidade, que consequentemente influenciam as suas propriedades químicas, mecânicas e físicas. O AC é classificado como GRAS, é um produto amorfo, podendo ser encontrado na forma de pó, ou em flocos. Não apresenta toxicidade, é inodoro, insípido, não inflamável, apresenta alta resistência ao calor (ENDRES, SIEBERT-RATHS, 2011).

O AC é considerado um biopolímero, entretanto, a sua biodegradabilidade é influenciada pelo grau de substituição, ou seja, quanto maior o grau de substituição menor a biodegradação do AC. A degradação do AC devido a presença dos grupos acetila, requer a presença de enzimas esterases, normalmente produzidas por microrganismos (PULS, WILSON, HÖLTER 2011)

4 Material e Métodos

4.1 Óleo essencial

O óleo essencial de Tomilho (OET), utilizado no experimento foi obtido, comercialmente, pela empresa Ferquima/Brasil, com CAS Number: 8007-46-3 INCI. O OET é extraído de flores e folhas por extração a vapor e apresenta como compostos majoritários. Timol= 50%, p-cimeno= 30%, γ-terpineno= 6%, conforme especificações do fornecedor (Tabela 7 - Anexo A).

4.2 Isolamentos de fungos

Três amostras de queijos (pedaços) foram adquiridas no comércio local em supermercados (2) e feiras (1), com 20 dias e 10 dias de maturação, respectivamente, conforme informação dos fornecedores. Foram mantidas sob as condições ideais, para seu consumo e armazenamento, e não às condições favoráveis ao desenvolvimento de fungos. Após alguns dias (5-7 dias), foi possível observar crescimento fúngico na superfície (casca) dos queijos, procedendo-se então, o isolamento.

A metodologia utilizada para isolamento de fungos do alimento consistiu de isolamento direto do material contaminado para placas de petri com Ágar Batata Dextrose (BDA), segundo Silva (2011).

A transferência de estruturas dos fungos, foi viabilizada com o auxílio de swab esterilizado e embebido em solução salina (0,85%), foi realizado um esfregaço sobre a superfície do queijo com crescimento fúngico, que se apresentava mais uniforme. O material coletado foi transferido para a superfície de BDA em placa de petri, seguindo a incubação a 25 ºC por 5 dias.

4.3 Identificação macroscópica dos isolados fúngicos

Após 5 dias de incubação, foram observadas algumas características morfológicas dos isolados como a textura da colônia (algodonosa, aveludada, granular), topografia da colônia (rugosa, umbilicada, verrugosa) coloração, margem, coloração do verso e reverso. Essas características observadas foram

utilizadas como orientação para a identificação dos isolados e não como critério absoluto (CORRÊA, 2003).

4.4 Identificação microscópica dos isolados fúngicos

Para a identificação fenotípica, em nível de gênero dos isolados, foi realizada uma observação microscópica das estruturas morfológicas. As características utilizadas para a identificação foram a septação das hifas do micélio, a estrutura que dá origem aos conídios e o tipo de conídios.

A análise foi realizada através da coleta de uma alçada da colônia, em ágar BDA, depositada sob uma lâmina de vidro, e sobre o material foi adicionada uma gota de azul de metileno (1g/L em ácido lático 88%). Após, uma lamínula foi sobreposta sobre o material, e na sequência visualização em microscópio óptico, com ampliação total de 200x, 400x e 1000x.

4.5 Identificação molecular dos isolados fúngicos

Para a identificação molecular os isolados foram inoculados em BDA e incubados por 5 dias a 25 ºC, para ativação celular.

A identificação dos fungos foi realizada pela Empresa Neoprospecta (Neoprospecta Microbiome Technologies, Brasil), utilizando o sequenciamento de alto desempenho da região ITS. Foi realizada a amplificação para a região ITS, utilizando *primer*, ITS1 (GAACCWGCGGARGGATCA) (SCHMIDT et al., 2013) e *primer*, ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) (WHITE et al., 1990). O sequenciamento foi realizado através do equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA). As sequências foram analisadas por meio do pipeline Sentinel. No pipeline Sentinel os arquivos fastq foram avaliados quanto à qualidade Phred (QP) usando o programa FastQC v.0.11.8 (ANDREWS, 2010).

4.7 Atividade antifúngica

4.7.1 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo fúngico para os testes de atividade antifúngica foi realizado conforme as metodologias descritas por Gurgel et al. (2005) e Fontenelle et al. (2007), com adaptações. Primeiramente, os isolados foram estriados, com auxílio de uma alça, na superfície de BDA e incubadas a 25 ºC, por 5 dias. Após esse período de cinco dias de incubação, os cultivos fúngicos foram cobertos com 2 mL de solução salina esterilizada e com auxílio de alça microbiológica foram realizadas raspagens da superfície de cada cultura, a fim de obter uma suspensão livre de fragmentos do meio de cultura. As suspensões foram transferidas para tubos de ensaio esterilizados e, em seguida, deixados em repouso a 28 °C por 5 minutos. O sobrenadante destas suspensões foi utilizado para obtenção de um inóculo, padronizado em aproximadamente, 10^8 UFC. mL^{-1} através da adição de solução salina e correspondente a 0,5 da escala de *Mac Farland*.

4.7.2 Difusão em ágar

A metodologia para avaliar a atividade antifúngica através da difusão em ágar, seguiu conforme descrito por Fontenelle et al. (2007). Um poço com diâmetro de 6 mm foi feito no ágar BDA, no centro de cada placa de petri (90mm de diâmetro), posteriormente, cada inóculo previamente padronizado (10^8 UFC. mL^{-1}), foi espalhado na superfície do ágar com o auxílio de *swab* esterilizado. Em cada poço foi adicionado 50 µL do OET, após as placas foram incubadas a 25 ºC e as leituras foram feitas nos 3 primeiros dias de incubação. O diâmetro da zona de inibição ao redor do poço foi medido em quatro zonas radiais com o uso de um paquímetro, e expresso em milímetros (mm). Como controle, foi utilizada solução salina esterilizada. Foi considerada uma ação antifúngica satisfatória a presença de zona de inibição igual ou superior a 10 mm, de acordo com Fontenelle et al. (2007). A análise foi realizada em triplicata para cada isolado.

4.7.3 Micro-atmosfera

A análise da ação antifúngica do OET por micro-atmosfera seguiu a metodologia proposta por Delespaul et al. (2011). Em placas de petri (90 mm de diâmetro), o inóculo padronizado em 10^8 UFC. mL^{-1} foi espalhado no ágar BDA com auxílio de *swab*. Posteriormente, na tampa de cada placa foi adicionado um disco de papel filtro de 6 mm de diâmetro previamente esterilizado, e adicionado 10 µL do OET. As placas foram incubadas invertidas a 28 ºC e as leituras foram feitas em 3 dias de incubação. O diâmetro da zona de inibição foi medido em quatro zonas radiais com o uso de um paquímetro e expresso milímetros (mm). Como controle foi utilizado solução salina esterilizada. Foi considerada uma ação antifúngica satisfatória a presença de zona de inibição igual ou superior a 10 mm de acordo com Fontenelle et al. (2007). A análise foi realizada em triplicata para cada isolado.

4.7.4 Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM)

A CIM e a CFM foram determinadas através da metodologia descrita por Gakuubi, Maina e Wagacha (2017), com algumas modificações. Placas de petri com BDA foram inoculadas com cada um dos isolados e cepa padrão, sendo incubadas a 28 ºC por 7 dias. Após esse período de incubação, pequenos discos com 6 mm de diâmetro foram cortados assepticamente, com o auxílio de uma broca de cortiça, para uso na sequência

Para a análise da CIM, o OET foi adicionado ao BDA, após o seu preparo (meio fundido e resfriado a ± 45 ºC). Foram testadas concentrações entre 1µL /mL e 0,6 µL /mL de OET, juntamente com 0,5% (v/v) de tween 80. Em cada placa de petri, foram vertidos 20 mL de meio contendo OET. Após a solidificação do BDA, poços de 6 mm de diâmetro foram feitos no centro de cada placa, onde os discos contendo os inóculos foram colocados e incubados a 25 ºC por 4 dias, sendo as leituras realizadas todos os dias. Para controle, foram utilizadas placas de BDA sem a adição do OET. O crescimento micelial

dos isolados foi medido com o auxílio de um paquímetro e expresso em milímetros (mm).

Os resultados foram calculados, conforme a inibição do crescimento micelial, descrito na Equação 1 abaixo, onde *dc* é o diâmetro do crescimento micelial da cultura controle e *dt* é o diâmetro do crescimento micelial da cultura com o OET. Foi considerada como CIM a concentração que inibiu em 100% o crescimento micelial. As análises foram realizadas em triplicatas, para cada concentração testada.

$$\frac{dc-dt}{dt} \text{ X100} \qquad (1)$$

Para a determinação da CFM, discos dos isolados (que tiveram o seu crescimento micelial inibido em 100%, no teste da CIM), foram transferidos para uma nova placa de petri contendo BDA (com um poço no centro da placa para receber o disco com o isolado fúngico) e em seguida as placas foram incubadas a 28 ºC por 72 horas. Foi considerada como CFM, a concentração na qual os isolados mesmo depois de terem o seu crescimento micelial afetado pela CIM, não se desenvolveram no novo meio de cultura, após 72 horas de incubação.

4.8 Elaboração do Filme de acetato de celulose (AC)

O filme de acetato de celulose foi elaborado a partir de uma solução filmogênica (SF) formada por AC em acetona (3% m/v). A adição do OET foi feita levando em consideração a CFM de cada isolado. A metodologia seguida, foi a descrita por Dannenberg et al. (2017), com modificações especificadas a seguir.

Em um béquer foi adicionado o volume necessário de acetona, e posteriormente o AC, sendo a SF homogeneizada em *ultra-turrax* (15.000 rpm/10minutos) mantida em banho de gelo. Após o OET foi adicionado, e a SF foi homogeneizada nas mesmas condições, por mais 2 minutos. Posteriormente, a SF foi distribuída em placas de petri com 60 mm de diâmetro, em cada placa foi adicionado 6 mL de SF. A secagem da SF foi feita

em estufa com circulação de ar a 25 ºC, as placas foram mantidas fechadas, e no interior da estufa foram distribuídos frascos contendo sílica com a finalidade de controlar a umidade, o período de secagem foi de 24 horas.

4.8.1 Atividade antifúngica do filme

A atividade antifúngica do filme ativo foi avaliada por difusão em ágar, de forma similar à técnica de disco difusão (CLSI, 2019). Os filmes foram cortados assepticamente em discos de 6 mm de diâmetro, posteriormente os discos foram depositados em placas com BDA já inoculadas com os isolados, previamente padronizados (10^8 UFC.mL^{-1}). As placas foram incubadas a 28 ºC por 5 dias. O diâmetro da zona de inibição ao redor dos discos foi medido em quatro zonas radiais com o uso de um paquímetro e expresso em milímetros (mm), no período de 3 e 5 dias de incubação. Como controle foi utilizado um filme elaborado sem a adição do OET. Foi considerada uma ação antifúngica satisfatória a presença de zona de inibição igual ou superior a 10 mm de acordo com Fontenelle et al. (2007). A análise foi realizada em triplicata, para cada isolado.

4.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância através da ANOVA e pós teste Tukey $p \leq 0,05$ com o programa Graphpad versão 8.0.1.

5 Resultados e Discussão

5.1 Isolamento e caracterização dos isolados

A utilização do método de isolamento direto apresentou como principal vantagem à diminuição da probabilidade de contaminação das colônias, visto que não ocorre a homogeneização da amostra e a coleta é feita de forma mais assertiva. Com base nas características macroscópicas e microscópicas observadas nos isolados, foi presumido que um isolado pertencia ao gênero *Penicillium* (QCP1), um isolado ao gênero *Aspergillus* (QCA2) e um isolado pertencente ao gênero *Fusarium* (QAF1).

Para o isolado QCP1, as características macroscópicas observadas da colônia foram coloração verde azulada, rebordo esbranquiçado, textura aveludada e topografia rugosa, conforme apresentado na Figura 5.

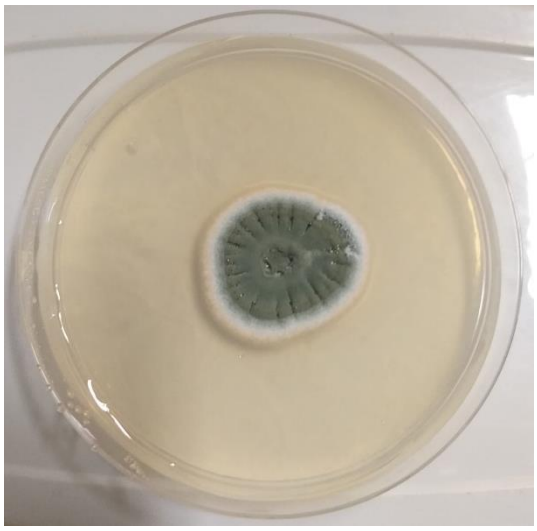

Figura 5- Crescimento do isolado fúngico do gênero *Penicillium* (QCP1) em ágar BDA, procedente da superfície de queijo.

As colônias que representam o isolado QCA1, apresentaram coloração verde limão, textura aveludada e rebordo esbranquiçado, conforme a Figura 6.

Figura 6- Crescimento do isolado fúngico do gênero *Aspergillus* (QCA1) em ágar BDA, procedente da superfície de queijo.

Para caracterização do isolado QAF1, a colônia apresentou coloração esbranquiçada e reverso roxo, textura algodonosa e topografia umbilicada, conforme Figura 7.

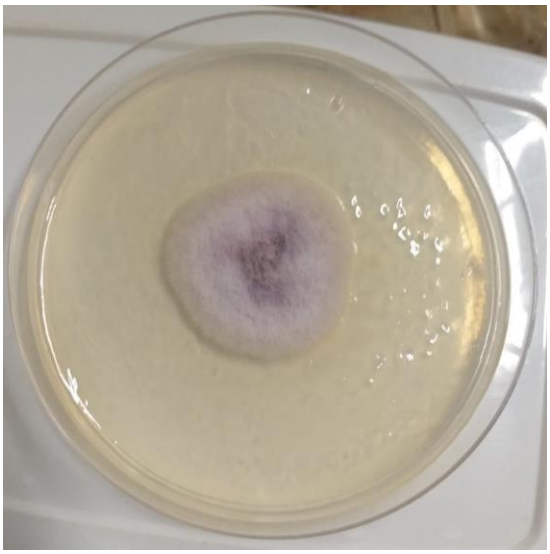

Figura 7- Crescimento do isolado fúngico do gênero *Fusarium* (QFA1) em ágar BDA, procedente da superfície de queijo.

5.1.1 Caracterização microscópica dos isolados fúngicos

Através da análise microscópica, as imagens obtidas possibilitaram identificar as estruturas morfológicas dos isolados e, consequentemente realizar a identificação em nível de gênero. Com base nas estruturas

observadas, foi possível identificar o isolado QCP1 como pertencente ao gênero *Penicillium*, conforme Figura 8 e 9.

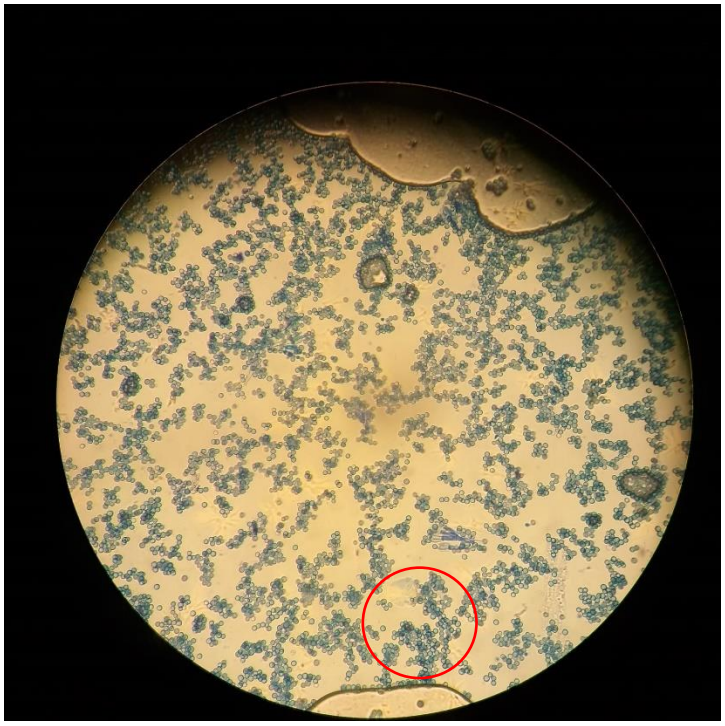

Figura 8 - Micrografia por microscopia óptica do isolado fúngico gênero *Penicillium* (QCPI), procedente da superfície de queijo (ampliação total de 400X).

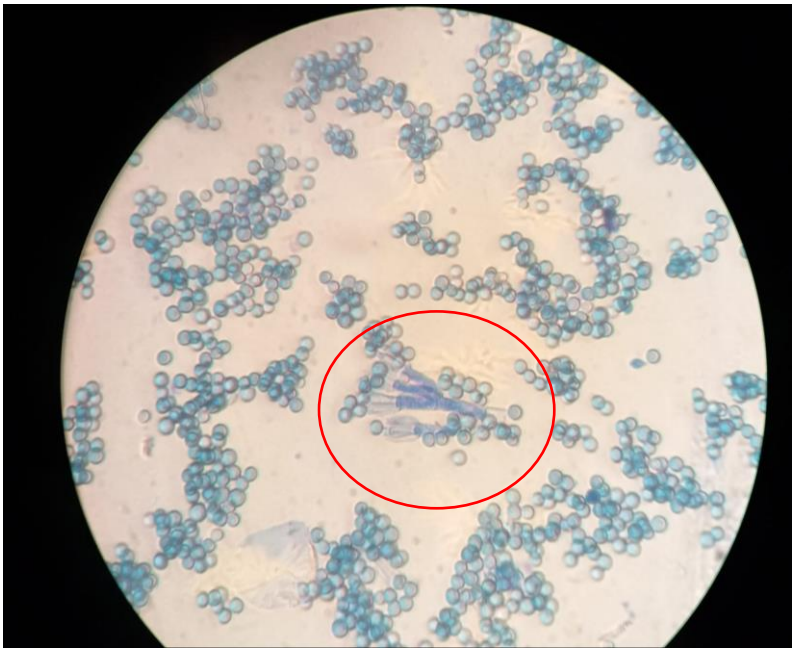

Figura 9 - Micrografia por microscopia óptica do isolado fúngico gênero *Penicillium* (QCPI), procedente da superfície de queijo (ampliação total de 1.000X).

A análise microscópica realizada para o isolado QCA2, possibilitou a identificação de estruturas morfológicas caraterísticas ao gênero *Aspergillus*, conforme a Figura 10 e 11.

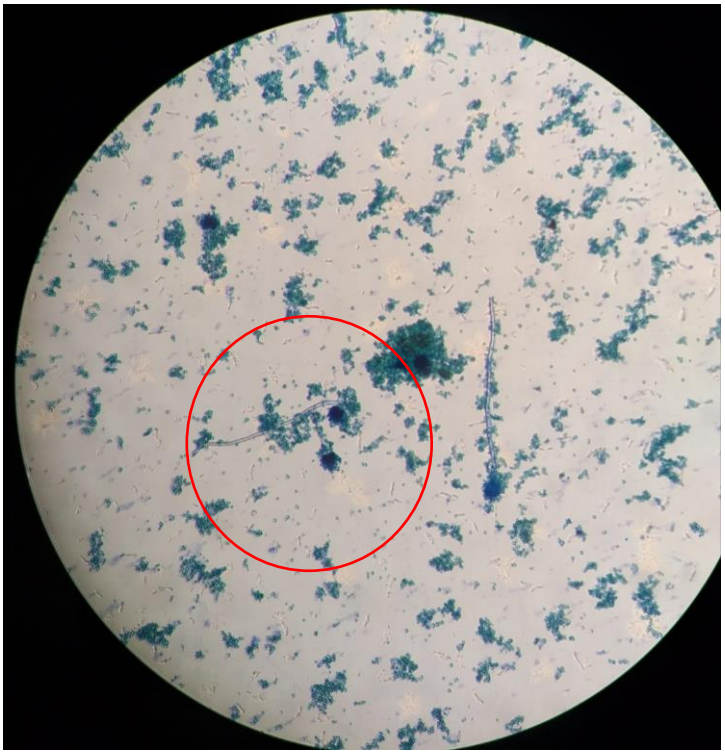

Figura 10- Micrografia por microscopia óptica do isolado fúngico, gênero *Aspergillus* (QCA2), procedente da superfície de queijo (ampliação total de 200X).

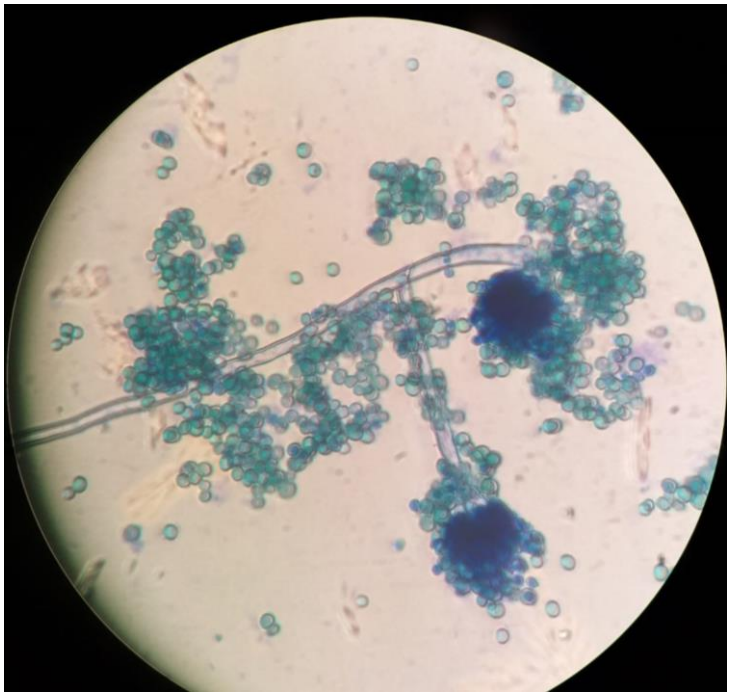

Figura 11- Micrografia por microscopia óptica do isolado fúngico, gênero *Aspergillus* (QCA2), procedente da superfície de queijo (ampliação total de 1.000X).

A análise microscópica realizada com o isolado QAF1 possibilitou a identificação de estruturas morfológicas características do gênero *Fusarium,* conforme Figura 12 e 13.

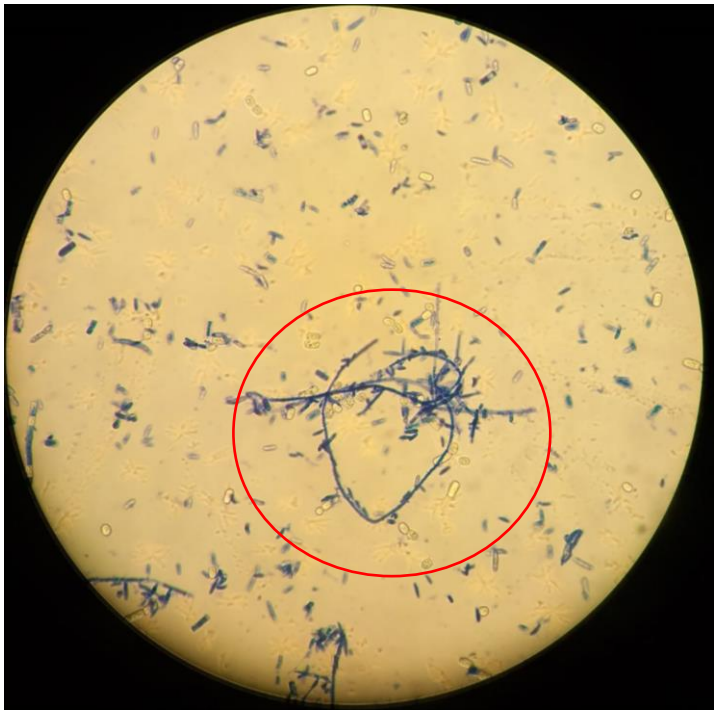

Figura 12- Micrografia por microscopia óptica do isolado fúngico, gênero *Fusarium* (QAF1), procedente da superfície de queijo (ampliação total de 200X).

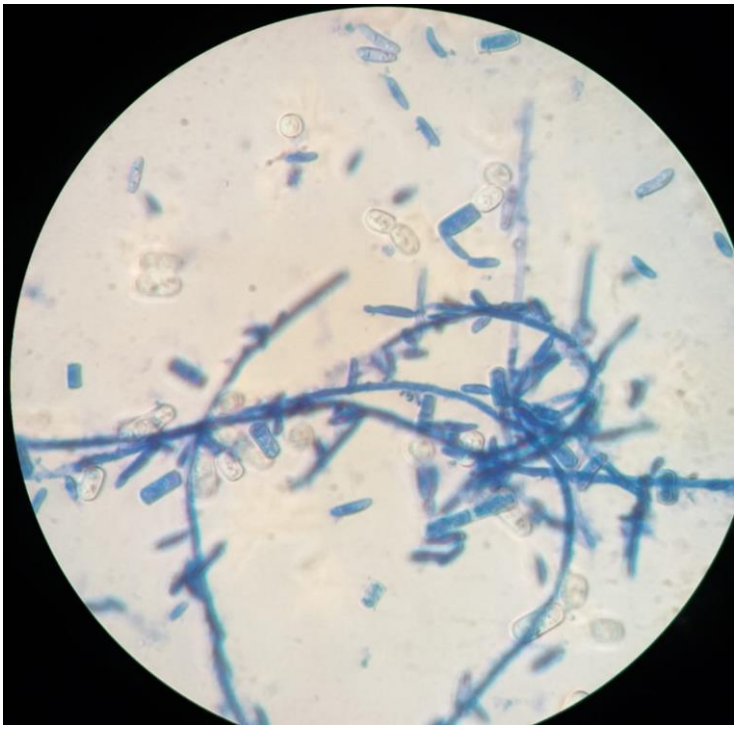

Figura 13- Micrografia por microscopia óptica do isolado fúngico, gênero *Fusarium* (QAF1), procedente da superfície de queijo (ampliação total de 1000X).

5.1.3 Caracterização molecular dos isolados fúngicos

A análise molecular realizada forneceu a confirmação dos gêneros identificados pela análise microscópica para todos os isolados (exceto QAF1), além da identificação da espécie a que pertence cada isolado. Os três isolados fazem parte do Reino Fungi/ Filo Ascomycota, pertencentes às seguintes espécies: QCP1 identificado como *Penicillium crustosum,* QCA2 como *Aspergillus flavus,* porém o isolado fúngico QAF1, não apresentou uma identificação precisa, apresentando características para *Fusarium oxysporum/ Geotrichum candidum*, conforme Tabela1.

O isolado QCP1 - *Penicillium crustosum* apresentou 100% de compatibilidade com 53 isolados cadastrados no Genbank®. O isolado de QCA2 - *Aspergillus flavus* apresentou compatibilidade de 100% com 70 isolados depositados no Genbank®, já o isolado QAF1- apresentou compatibilidade de 51,02% com 63 isolados depositados no Genbank® para a espécie *Fusarium oxysporum e* de 48,98% de compatibilidade com 14 isolados depositados no Genbank® para a espécie *Geotrichum candidum.* Assim, seguiu-se o estudo identificando QAF1 - *Fusarium oxysporum*, após testes de purificação em ágar e análises microscópicas.

Tabela 1- Identificação molecular (número de acesso Genbank) e respectiva classificação taxonômica dos isolados fúngicos, pertencentes ao Filo Ascomycota, procedentes de queijos

Isolado	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie	Número de acesso
QCP1	*Eurotiomycetes*	*Eurotiales*	*Aspergilaceae*	*Penicillium*	*crustosum*	MT582770
QCA2	*Eurotiomycetes*	*Eurotiales*	*Aspergilaceae*	*Aspergillus*	*flavus*	MZ317324
QAF1	*Sordariomycetes*	*Hypocreales*	*Nectriaceae*	*Fusarium*	*oxysporum*	MZ224479
QAF1	Saccaromycetes	Saccaromycetales	Dipodascaceae	*Geotrichum*	*candidum*	MN913466

5.2 Atividade antifúngica do OET *in vitro*

5.2.1 Difusão em ágar

O OET demonstrou atividade antifúngica contra todos os isolados testados nesse estudo, conforme resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho (OET), pela técnica de difusão em ágar.

Isolados/Fungos	Zona de inibição (mm)		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
***Penicillium crustosum*/ QCP1**	41,0 ± 0,28^{Aa}	23,0 ± 0,1^{Bb}	23,0 ± 0,1^{Cb}
***Aspergillus flavus*/ QCA2**	44,0 ± 1,21 ^{Aa}	44,0 ± 1,21^{Aa}	44,0 ± 1,21 ^{Aa}
***Fusarium oxysporum*/ QAF1**	0,0 ± 0,0 ^{Bb}	40,0 ± 3,54 ^{Aa}	37,0 ± 3,59 ^{Ba}

Resultados expressos como média (n=3) ± DP: desvio padrão; sobrescritos (^{ABC}) diferentes em cada coluna indicam diferença significativa (P<0,05), pelo teste de Tukey; sobescritos (^{ab}) diferentes em cada linha indicam diferença significativa (P<0,05), pelo teste de Tukey.

Em relação ao isolado *Penicillium crustosum/* QCP1 foi observada uma diminuição da atividade do OET, através da diminuição da zona de inibição, que passou de 41 mm para 23 mm do primeiro para o segundo dia de análise.

A ação do OET frente ao isolado *Aspergillus flavus/* QAC2*,* demonstrou uma maior estabilidade tendo em vista que as zonas de inibição permaneceram sem alteração ao longo do período de análise (44,1 mm). Para o isolado *Fusarium oxysporum/* QAF1 foi observado também uma diminuição da atividade do OET, em consequência da redução da zona de inibição (40 mm para 37 mm), no período de observação, porém não diferiu estatisticamente.

No primeiro dia de análise foi identificada uma diferença significativa (p<0,05) na inibição do crescimento de *Penicillium crustosum*/ QCP1 e *Aspergillus flavus*/ QAF2. Já no segundo dia de análise, houve diferença significativa na inibição do crescimento de *Penicillium crustosum/* QCP1 e os demais fungos. No terceiro dia de leitura, a inibição do crescimento micelial dos isolados *Penicillium crustosum/* QCP1- e *Fusarium Oxysporum/* QAF1 apresentou diferença significativa entre os demais isolados.

Entretanto, mesmo com diferenças significavas na inibição do crescimento entre os fungos durante o período de análise, foi possível constatar que o OET exerceu atividade antifúngica frente a todos os isolados, considerando como critério a zona de inibição superior a 10 mm, para caracterizar a ação antifúngica.

Em um estudo realizado por Silva e Rangel (2010), a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Thymus vulgaris* foi avaliada pelo

método de difusão em ágar, em três concentrações diferentes (50 mg/mL, 100mg/mL e 200mg/mL), frente à *Candida albicans, Candida glabrata, Candida parapsilosis, Cryptococcus neoformans.* A ação antifúngica foi considerada em zonas com diâmetro superior a 10 mm, sendo essa ação observada na concentração de 50 mg/mL somente para a *Candida glabrata.* Frente aos demais fungos o extrato não apresentou ação antifúngica. Nesse estudo a ação do extrato também foi avaliada frente a bactérias como *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis,* nas mesmas concentrações e a ação antimicrobiana foi observada nas concentrações de 50 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL para *Staphylococcus aureus*, para todas as outras bactérias o extrato não apresentou inibição suficiente.

Mota et al. (2012), testaram OET contra oito isolados de *Rhizopus oryzae* pelo método de ágar difusão e, identificaram ação antifúngica do OET, através da variação na zona de inibição de 28 mm a 38 mm. Apesar de não pertencer a mesma espécie dos isolados do presente estudo, demonstra a importância do OET na ação antifúngica.

5.2.2 Micro-atmosfera

Com relação aos resultados obtidos para a ação antifúngica do OET, através da técnica de micro-atmosfera, todos os fungos testados apresentaram sensibilidade ao OET, conforme resultados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho (OET), pela técnica de micro-atmosfera.

Isolados/Fungos	Zona de inibição (mm)		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
***Penicillium crustosum*/ QCP1**	0,0 ± 0,0 ^{Bb}	55,0 ± 1,0 ^{Aa}	55,0 ± 1,0 ^{Aa}
***Aspergillus flavus*/ QCA2**	44,0 ± 0,82 ^{Aa}	44,0 ± 0,82 ^{Aa}	44,0 ± 0,82 ^{Aa}
***Fusarium oxysporum*/ QAF1**	0,0 ± 0,0 ^{Bb}	49,0 ± 0,36 ^{Aa}	49,0 ± 0,36 ^{Aa}

Resultados expressos como média (n=3) ± DP: desvio padrão; sobrescrito (^{ABC}) diferentes em cada coluna indicam diferença significativa (P<0,05), pelo teste de Tukey; sobescritos diferentes em cada linha (^{ab}) indicam diferença significativa (P<0,05), pelo teste de Tukey.

Dentre os resultados obtidos destaca-se a ação antifúngica do OET frente ao isolado *Penicillium crustosum*/ QCP1 que apresentou uma maior sensibilidade, com uma zona maior de inibição (55 mm).

Com os resultados coletados foi possível observar que no primeiro dia de análise *Aspergillus flavus*/QCA2 foi o único fungo a apresentar crescimento e, consequentemente apresentou diferença significativa na zona de inibição do crescimento, quando comparado aos demais fungos. No segundo e terceiro dia de análise, a zona de inibição se manteve, não apresentando diferença significativa entre a inibição do crescimento micelial dos demais fungos.

Em um estudo realizado por Kumar et al. (2008), foi relatada ação antifúngica do OET em condições de micro-atmosfera frente a diferentes espécies de *Aspergillus.* Foram obtidas zonas de inibição de 55 mm contra *A. oryzae*, 70 mm para *A. brasiliensis*, e 62 mm de inibição para *A. flavus*. Já em um estudo realizado por Santos et al. (2018) onde foi testado o efeito antifúngico do óleo essencial de tomilho branco frente aos isolados de *Aspergillus* sp. e de *Fusarium* sp., observaram zonas de inibição de 70 e 86 mm, respectivamente.

Os resultados obtidos demonstram que a aplicação do OET, de forma que o mesmo não tenha contato direto com a superfície contaminada, pode exercer uma ação antimicrobiana expressiva, devido à volatilização de seus compostos. As zonas de inibição obtidas no teste de micro-atmosfera variaram de 44 mm a 55 mm, e os resultados obtidos no teste de difusão em ágar variaram de 23 mm a 44 mm. Levando em consideração que as concentrações utilizadas foram diferentes (10 µL e 50 µL, respectivamente, para ambos os

métodos), pode-se dizer que o desempenho antifúngico do OET foi superior pela técnica de micro-atmosfera.

Portanto, ao comparar os resultados obtidos com ambas as técnicas (difusão em ágar e micro-atmosfera), é possível constatar que a aplicação do OET com o foco na sua ação antifúngica, é favorecida quando a volatilização de seus compostos é facilitada, sendo necessária uma concentração menor de OE para que a atividade de inibição seja satisfatória (zona de inibição ≥ 10 mm).

5.2.3 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) os isolados foram testatos frente às concentrações de 0,6 µL, 0,7 µL, 0,8 µL, 0,9 µL e 1,0 µL do OET, iniciando da menor para a maior concentração, sendo os resultados da CIM obtidos a partir de testes realizados em triplicata. Os resultados para a CIM podem ser observados na Tabela 4.

.

Tabela 4- Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de tomilho (OET), frente aos isolados fúngicos.

Concentração	***Penicillium crustosum*/ QCP1**	***Aspergillus flavus*/QCA2**	***Fusarium oxysporum*/ QAF1**
CIM (µL)	1,0	0,8	0,7
CFM (µL)	3,0	4,0	3,0

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CFM: Concentração Fungicida Mínima

Para o isolado *Penicillium crustosum/*QCP1 foi observada a concentração de 1 µL, como a menor concentração capaz de inibir em 100% o crescimento micelial, ao final do quarto dia de análise. As demais concentrações testadas, 0,7 µL e 0,8 µL apresentaram inibição de 88,89% e 74,07% respectivamente, ao final do quarto dia de análise. Para o isolado *Aspergillus flavus*/QCA2 a CIM com capacidade de inibição do crescimento micelial em 100% foi de 0,8 µL. Durante o período das análises, a concentração de 0,7 µL no segundo dia já apresentava uma capacidade de inibição significativa de 83,87%, porém ao final do quarto dia reduziu para 58,06%.

Em relação aos resultados obtidos para a CIM do isolado *Fusarium oxysporum*/ QAF1, a concentração determinada como CIM foi a de 0,7 µL. Ao terceiro dia de análise a concentração de 0,6 µL, apresentava uma inibição de 91,39% para o crescimento micelial, porém, essa porcentagem de inibição reduziu ao quarto dia de análise para 61,29%, para o isolado QAF1.

Ao analisar a CIM capaz de inibir o desenvolvimento dos isolados, foi possível observar que o OET teve uma capacidade de inibição menor para *Penicillium crustosum*/QCP1, em relação aos demais, sendo necessária a utilização de uma concentração maior para que o isolado seja inibido.

Em relação aos resultados da CFM, foi obtida para o isolado *Penicillium crustosum*/QCP1 CFM de 3,0 µL, para *Aspergillus flavus*/QCA2 CFM de 4,0 µL e *Fusarium oxysporum/*QAF1 com 3,0 µL de concentração fungicida mínima.

Šegvić et al. (2007), avaliaram a ação antifúngica do OET (CIM e CFM), porém através da técnica de micro-diluição em placas, frente a diversos fungos filamentosos e obtiveram concentrações variáveis de CIM e CFM: *Aspergillus*

flavus (CIM 9,35 µg/mL e CFM 31,76 µg/mL)*, Aspergillus niger* (CIM 9,35 µg/mL e CFM 22,5 µg/mL)*, Penicillium* spp. (CIM 18,95 µg/mL e CFM 28,13 µg/mL) e *Rhizopus* spp. (CIM 12,6 µg/mL e CFM 25,0 µg/mL).

Mesmo que a metodologia utilizada por Šegvić et al. (2007) tenha sido diferente, foi possível identificar uma semelhança entre os gêneros de fungos filamentosos estudados, sendo que para o gênero *Penicillium* foi necessária uma concentração maior de OET para que a inibição ocorresse, assim como o encontrado no presente estudo, quando comparamos *Penicillium crustosum*/ QCP1 com os demais, foi o isolado que necessitou de uma maior CIM.

Levando em consideração, a equivalência das unidades (µg/mL e µL/mL) que representam a concentração do OET, entre os resultados expressos de outros estudos com os obtidos no presente estudo, respectivamente, para CIM e CFM, podemos observar a CIM de 7,18 µg/mL e CFM de 35,92 µg/mL, para *Aspergillus flavus/*QCA2, já para o Isolado *Penicillium crustosum*/QCP1 a CIM corresponde a 8,98 µg/mL e CFM de 26,94 µg/mL e para o isolado *Fusarium oxysporum*/ QAF1, a conversão foi de 6,98 µg/mL para CIM e CFM de 26,94 µg/mL (Tabela 6 – Apêndice A).

Desta forma, observa-se que as concentrações de CIM e CFM para os isolados de fungos testados diferiram em relação aos resultados encontrados na literatura, para o isolado *Aspergillus flavus/*QCA2 a CIM foi inferior e a CFM superior, já para o isolado *Penicillium crustosum*/QCP1 tanto a CIM e CFM encontradas são inferiores aos valores apresentados na literatura.

Esta ação antifúngica do OET, observada nos testes qualitativos e quantitativos, provavelmente, é atribuída ao composto majoritário (timol), pelo fato de apresentar certo nível de hidrofobicidade, conseguindo assim alterar a permeabilidade da membrana celular, ocasionando na perda de íons e moléculas, consequentemente altera o funcionamento celular e ocasionando a apoptose (BURT, 2004).

No presente estudo, foram encontrados resultados diferentes para a ação antifúngica do OET, tanto nos testes de difusão em ágar, micro-atmosfera, CIM e CFM, quando comparamos com os valores encontrados na

literatura. Entretanto, essa diferença pode ser justificada com base na composição química do OET, que segundo Dosoky e Setzer (2018), é diretamente influenciada por diversos fatores extrínsecos, e consequentemente a variação da composição química do OET afeta a sua ação antifúngica. Além da variação da composição química do OET, a diferença também é justificada pelos microrganismos testados, apesar de pertencerem ao mesmo gênero, a ação do OE é específica para cada cepa.

5.2.4 Atividade antifúngica do filme de acetato de celulose contendo OET

O filme de acetato de celulose incorporado como OET, apresentou ação antifúngica para todos os isolados, conforme resultados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Atividade antifúngica do filme de acetato de celulose contendo OET, pela técnica de difusão em ágar.

Isolados/Fungos	**Concentração**	**Zona de inibição (mm) = DP**		
		Dia 1	**Dia 2**	**Dia 3**
***Penicillium crustosum*/ QCP1**	10 x CFM	$10 \pm 0,0^{Ba}$	$10 \pm 0,11^{Ba}$	$7 \pm 0,15^{Ba}$
***Aspergillus flavus*/ QCA2**	10 x CFM	$23 \pm 0,32^{Aa}$	$14 \pm 0,35^{Bb}$	$9 \pm 0,06^{Bb}$
***Fusarium oxysporum*/ QAF1**	8 x CFM	$0 \pm 0,0^{Ca}$	$29 \pm 0,17^{Ab}$	$24 \pm 0,12^{Ac}$

Resultados expressos como média (n=3) ± DP: desvio padrão; sobrescritos diferentes em cada coluna (^{ABC}) indicam diferença significativa; sobescritos diferentes em cada linha (^{abc}) indicam diferença significativa (P<0,05), pelo teste de Tukey.

Em relação a *Penicillium crustosum*/QCP1 e *Aspergillus flavus*/QCA2 foi possível observar que a concentração testada exerceu atividade antifúngica durante os dois primeiros dias de análise, enquanto que no terceiro dia, zonas de inibição obtidas, não se enquadravam nos parâmetros para considerar atividade antifúngica (≥ 10 mm). Dentre os isolados, *Penicillium crustosum/*QCP1, foi o que apresentou uma menor sensibilidade ao filme ativo.

Durante os três dias de análise, a ação do filme ativo para *Fusarium oxysporum*/ QAF1 foi observada a partir do segundo dia, sendo esse isolado o que apresentou maior sensibilidade ao filme, com zonas de inibição de 29 mm e 24 mm, nos dias 2 e 3, respectivamente, bem como foi a menor concentração de OET, aplicada ao filme.

Em um estudo realizado por Medeiros et al. (2016), onde foi elaborado um filme de acetato de celulose incorporado com óleo essencial de orégano

(*Origanum vulgare* L.) e avaliada a sua ação antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, foram observadas zonas de inibição com 20 mm de diâmetro.

Botre et al. (2010), desenvolveram um filme de base celulósica incorporado com OE de orégano, onde o filme ativo apresentou ação inibitória do crescimento de *Penicillium* spp. e *S. aureus*, enquanto que para bactérias psicrotróficas o crescimento não foi inibido. Para fungos filamentosos, o tratamento que se mostrou mais eficiente foi o que utilizou uma concentração de 50% de OE com temperatura de armazenamento de 7 ºC, entretanto o efeito inibitório deste tratamento só foi observado após 15 dias, fato esse que pode ser justificado devido a diminuição da volatilidade dos OE, quando submetidos a baixas temperaturas.

A redução da ação do filme ativo de acetato de celulose pode ser justificada segundo Ugalde (2014), que defende o fato do polímero de acetato de celulose possuir uma alta capacidade de incorporar o OE, entretanto, o polímero pode dificultar a liberação dos princípios ativos para o ágar (teste de difusão em ágar) não ocorrendo consequentemente a inibição microbiana, ou diminuindo a eficácia do OE.

6 Conclusão

Com base nos resultados obtidos, foi possível constatar a atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho (OET). Em ambos os testes *in vitro*, o OET apresentou potencial de inibição do crescimento micelial dos isolados, *Penicillium crustosum, Aspergillus flavus, Fusarium oxysporum,* procedentes da superfície de queijos, e quando o OET foi incorporado em filme de acetato de celulose, mostrou-se eficaz no controle fúngico, principalmente, contra *Fusarium oxysporum*.

7 Considerações Finais

Com a realização do presente estudo, nos possibilitou conhecer a microbiota fúngica, que se desenvolve na superfície (casca) de alguns queijos (industrializado e artesanal) após o processamento, durante a vida útil do produto, através do isolamento e identificação molecular dos isolados.

De modo geral, o óleo essencial de tomilho (OET), nos testes *in vitro* realizados, apresentou resultados positivos para atividade antifúngica, de forma direta ou adicionado em filme ativo, que o qualifica para futuras aplicações em matriz alimentar.

Estava previsto no projeto inicial, a aplicação dos filmes ativos contendo OET em matriz alimentar, mais especificamente, em queijos fatiados. No entanto, com a interrupção das atividades presenciais, em virtude da pandemia (COVID-19), reduziu significativamente, o tempo para realização das atividades experimentais. Sendo assim, a perspectiva é de que esta parte do estudo, com aplicação *in situ* do filme ativo de acetato de celulose, ainda será realizada.

8 Referências

ALZOREKY, N. S.; NAKAHARA, K. Antimicrobial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p. 223-230, 2003.

ANDRADE, B. F. M.; BARBOSA, L. N.; PROBST, I. S.; JUNIOR, A. F. Antimicrobial activity of essential oils, **JEOR**, V.26, p.34-40, 2014.

ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Disponível em: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc

BARRETO, G. G. **Caracterização morfológica de *Fusarium* spp. do Feijão fava e controle biológico via sementes-plântulas**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB, 2018.

BARSKA, A.; WYRWA, J. Consumer perception of active intelligent food packaging. **Problems of Agricultural Economics**, v. 349, n.4, p.138–159, 2016.

BERNARDI, A. O.; STEFANELLO, A.; GARCIA, M. V.; COPETTI, V. M. The control of cheese ante meat product spoilage fungi by sanitizers: in vitro testing and food industry usage. **LWT**, v.144, 2021.

BHARGAVA, N.; SHARANAGAT, V. S.; MOR, R., S., KUMAR, K. Active and intelligent biodegradable packaging films using food and foods bioactive compounds: A review. **Trends in Food Science &Technology**, v.105, p.385-401, 2020.

BORUGA, O.; JIANU, C.; MISCA, C.; GOLET¸ I.; GRUIA, A.T.; HORHAT, F.G. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. **J. Med Life**, v.7 2014.

BOTRE, D. A.; SOARES, N. F. F.; ESPITIA, P. J. P.; DE SOUSA, S.; RENHE, I. R. T. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Rev. Ceres**, v. 57, n.3, p. 283-291, 2010.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução CNS/MS n.º 149, autoriza o uso de aditivos alimentares coadjuvantes de

tecnologias em diversas categorias de alimentos. **Diário Oficial da União,** Brasília, DF, 29 de março de 2017.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº 146 aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, DF, 7 de março, de 1996.

BRUM, S. S; OLIVEIRA, L. C. A.; GUERREIRO, M. C. Síntese de Acetato de Celulose a partir da Palha de Feijão Utilizando N-bromossuccinimida (NBS) como Catalisador. **Polímeros**, v.22, p. 447-452, 2012.

BUEÉ, M.; COURTY, P. E.; MIGNOT, D.; GARBAYE, J. Soil niche effect on species diversity and catabolic activities in a ectomycorrhizal fungal community. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1947-1955, 2007.

BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas selecionadas contra *Escherichia coli* O157: H7. **Lett. Appl. Microbiol**, v.36, n.3, 2003.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. **Internat. Food Microb**. v.94, p.223-253, 2004.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential Oils as Antimicrobials in Food Systems– A Review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015.

CERQUEIRA, D. A.; FILHO, G. R.; CARVALHO, R. A.; VALENTE, A. J. M. Caracterização de Acetato de Celulose Obtido a partir do Bagaço de Cana de-Açúcar por H-RMN. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 10, p. 20-27, 2009.

CLSI, 2019 **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Method for antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of yeasts**; M44, 29th Edition.

CORRÊA, W. E. **Isolamento e identificação de fungos filamentosos encontrados em peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10%.** Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade do Vale do Paraíba, 2003.

COSTA, B. E. G. N.; OLIVEIRA, B. S.; CORREIA, C. S.; FERNANDES, K. L. A.; COELHO, L. B. M.; LEAL, M. M. F. V.; GUIMARÃES, M. A. L.; SILVA, P. M. F.; ALVES, Y. L C.; LOCATELLI, G. O. Contaminações alimentares por *Aspergillus* spp. e o papel do nutricionista: uma revisão. **Evidencia,** v.20, p. 69-80, 2020.

DANNENBERG, G. DA S.; FUNK, G. D.; CRUXEN, C. E SANTOS.; Marques, J. L.; DA SILA, W. P.; FIORENTINI, A. M. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, n.2242 p. 314–318, 2017.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A. L.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology,** p. 414-430, 2012.

DELESPAUL, Q.; BILLERBECK, V. G.; ROQUES, C. G.; MICHEL, G.; VIÑUALES, C. M.; BESSIÈRE, J. M. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. **Journal of Essential Oil Research**, v.12, p.256-266. 2011.

DOBRE, A.; GAGIU, V.; PETRU, N. Preliminary studies on the antimicrobial activity of essential oils against food borne bacteria and toxigenic fungi. **Food Technol**, v.35, n.2, p.16–26, 2011.

DOBRUCKA, R.; CIERPISZEWSKI, R. Active and intelligent packaging food–research and development–a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.64, n.1, p.7–15, 2014.

DOSOKY, N. S.; SETZER, W. N. Biological Activities and safety of *Citrus* spp. Essential Oils, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, 2018.

ENDRES, H. J.; SIEBERT-RATHS, A. **Engineering biopolymers: markets, manufacturing, properties, and applications**. Munich: Hanser Publishers, 2011.

EVANS, W. C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. Edinburgh: Saunders. Elsevier, 2009.

FAIA, A. M. **Isolamento e identificação de fungos filamentosos e leveduras em alguns pontos de uma rede de distribuição de água**. Orientador: Prof. Dr. Rogério Tenreiro. 2011. 52f. Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Vegetal da Faculdade de ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, 2011.

FERREIRA, M. C.; FREITAS, D.; MOREIRA, E. M.; Identificação de aflatoxinas em paçocas de amendoim comercializadas na cidade de Lavras-MG. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, p.717-722, 2014.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO E. H. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; NASCIMENTO, N. R. F.; KERNTOPF, M. R.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M.F.G. Antifungal activity of essential oils *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**, v, 104, n. 5, p. 1383-1390, 2007.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

GAKUUBI, M. M.; MAINA, A. W.; WAGACHA, J. M. Antifungal Activity of Essential Oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. Against Selected *Fusarium* spp. **International Journal of Microbiology**, 2017.

GHAANI, M.; COZZOLINO, C. A.; CASTELLI, G.; FARRIS, S. An overview of the intelligent packaging technologies in the food sector. **Trends in Food Science & Technology**, v.51, p.1–11, 2016.

GROOT, M. N.; ABEE T, BOKHORST-VAN, V. H. Inactivation of conidia from three *Penicillium* spp. isolated from fruit juices by conventional and alternative mild preservation technologies and disinfection treatments. **Food Microbiol,** v. 81, p.108-114, 2019.

GURGEL, L. A.; SIDRIM, J. J. C.; MARTINS, D. T.; CECHINEL-FILHO, V.; RAO, V. S. In vitro antifungal activity of dragon"s blood from *Croton urucurana* against dermatophytes, **Journal Ethnopharmaco**l, v.97, p.409- 412, 2005.

HABERBECK, L. U. **Modelagem de inativação isotérmica e não isotérmica de *Bacillus coagulans*, por tratamento termoquímico utilizado óleo essencial de orégano.** Orientadora: Prof.ª Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão. 2011. 105f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

HERNÁNDEZ, L. L.; TORO, C. R.; RUIZ, H. A.; VALDÉS, J. A. A.; GONZALEZ, M. A. A.; HERRERA, R. R.; AGUILAR, C.N. *Rhizopus oryzae*- Ancient microbial resource with importance in modern food industry. **International Journal of Food Microbiology,** v.257, p. 110-127, 2017.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. **Studies in Mycology**, v.70, p.1–51, 2011.

KARLSSON, I.; EDEL HERMANN, V.; GAUTHERON. N.; DURLING, M. B.; KOLSETH, A. K.; STEINBERG. C.; PERSSON, P.; FRIBERG, H. Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples. **Applied and Environment Microbiology**, v.82, p.491–501, 2016.

KAVOOSI, G.; ROWSHAN, V. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: Effect of collection time. **Food Chemistry**, n. 138, p. 2180-2187, 2013.

KHAZDAIR, M. R.; ANAEIGOUDARI, A.; HASHEMZEHI, M.; MOHEBBATI, R. Neuroprotective potency of some spice herbs, a literature review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, V.30, p.98-105, 2018.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRASAD, C. S.; DUBE, N. K. . Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities**. Innov. Food Sci**. **Emerg. Technol**, v.9, p.575–580, 2008.

KURE, C. F.; SKAAR, I.; BRENDEHAUG, J. Mould contaminant in production of semi-hard cheese. **Int. J. Food Microbiol**, v. 93, p.41-49, 2004.

LAZAROTTO, M. **Identificação e caracterização de *Fusarium* spp e *Pestalotiopsis* spp. Associados a *Carya illinoinensis* no Rio Grande do Sul**. Orientadora: Marlove Fátima Brião Muniz. 2013. 156f.Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de concentração: Silvicultura da Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria- RS, 2013.

LOPES, G. V.; MICHAEL, G. B.; CARDOSO, M.; SCHWARZ, S. Indentification and characterization of *Salmonella* Enterica subsp. Enterica Derby isolates carrying a new add A26 gene cassete in a class 1 integron obtained at pig slaughthehouses, **FEMS**, v.356 n.32, p.71-78, 2014.

MACWAN, S. R.; DABHI, B, K.; APARNATHI, K. D.; PRAJAPATI, J. Essential Oils of Herbs and Spices: Their Antimicrobial Activity and Application in Preservation of Food. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 885–901, 2016.

MANDAL, S.; DEB MANDAL, M. *Thyme* (*Thymus vulgaris* L.) oils. **Essential oils in food preservation, flavor and safety,** p. 825-834, 2016.

MEDEIROS, E. A. A.; CARDOSO, R. R.; BOGGIONE. D. M. G.; ALVES, R. B.T.; ÂNGULO, J. D. V.; SOARES, N. F. F. Atividade antimicrobiana do filme de acetato de celulose incorporado com óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L) em queijo minas frescal. In: XXV congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos: Alimentação: a árvore que sustenta a vida, 2016. **Anais eletrônicos**, Gramado: FAURGS Disponível em: http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/xxvcbcta/anais/files/250.pdf. Acesso em: 15 ago. 2021.

MEDINA, A.; VALLE-ALGARRA, F. M.; MATEO, R.; GIMENO-ADELANTADO, J. V.; MARTO, F.; JIMÉNEZ. Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of Alternaria, *Aspergillus* and *Fusarium*. **Internacional Journal Food Microbiology**, v. 108, p. 196-203, 2006.

MENEZES, N. M. C. **Efeito da adição de óleo essencial de orégano sobre a vida útil de presunto fatiado embalado a vácuo: modelagem em condições isotérmicas e não isotérmicas.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MIR, S. A.; DAR, B. N.; WANI, A. A.; SHAH, M. A. Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packing films. **Trends in Food and Science Technology**, v.80, p.141-154, 2018.

MONTEIRO, M. C. P.; **Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras, Lavras- MG, 2012.

MOTA, K. S. L.; PEREIRA. F. O.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, I. O.; LIMA, E. O. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with ergosterol. **Molecules**, v.17, p.14418-14433, 2012.

NGUEFACK, J. DONGMO, J. B.; DAKOLE, C. D.; LETH, V.; VISMER, H. F.; TORP, J. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi**. Int. J. Food Microbiol**, v.131, p.151–156, 2009.

OLAGUNJU, O.; MCHUNU, N.; VENTER, S.; GUIBERT, B.; DURAND, N.; METAYER, I.; MONTET, D.; IJABADENIYI, O. Fungal contamination of food commodities in Durban, South Africa. **J. Food Safety**. 2018.

OLIVEIRA, R. C.; CARVAJAL, M. M.; CORREA, B.; ROJO, C. F. Cellular, physiological and molecular approaches to investigate the antifungal and anti aflatoxigenic effects of thyme essential oil on *Aspergillus flavus*. **Food Chem**, v. 315, 2020.

PAGANINI, C., C. **Ação Antimicrobiana de Filme Ativo Incorporado com Óleo Essencial de Orégano no Crescimento de *Weissella viridescens* e *Pseudomonas flourescens***. Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2017.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRLICH, K.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; MEIJER, M.; NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R. A. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 53-66, 2007.

PINTADO, C. M. B. S.; FERREIRA, M. A. S. S.; SOUSA, I. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. **Food Control**, v. 21, n. 3, p.240–246, 2010.

PLACHIKKATTU, P. A.; SUNOOJ, K. V.; AALIYA, B.; NAVAF, M.; SUDHEESH, C.; SABU, S.; SASIDHARAN, A.; MIR, S. A.; GEORGE, J.; KHANEGHAH, A. M. Application of electromagnetic radiations for decontamination of fungi and mycotoxins in food products: A comprehensive review. **Trends in food Science and Technology**, v. 114, p 399-409, 2021.

PRADO, G. Contaminação de alimentos por micotoxinas no Brasil e no mundo. **Revista de saúde pública do SUS/mg**, v. 2, p. 11-24, 2014.

PULS, J.; WILSON, S. A.; HÖLTER, D. Degradation of Cellulose Acetate Based Materials: A Review. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 19, n. 1, p. 152–165, 2011.

RAMOS, H., B., V., S. **Pesquisa de Fungos Filamentosos que Apresentam Resistencia ao Mercúrio**. Trabalho de conclusão decurso apresentado ao Curso de Graduação de Ciências Biológicas da Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de janeiro, 2018.

RIBEIRO, S. R.; SILVA, A. S.; ANDRADE, M.; MELO, N. R. Use of essential oils in active food packaging. **Recent advances and future trends**, v. 61, p. 132-140, 2017.

ROBY, M. H. H.; SARHAN, M. A.; SELIM, K. A.; KHALEL, K. L. Antioxidant and Antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). **Industrial Crops and Products**, n. 44, p. 437– 445, 2013.

SALGUEIRO, L.; MARTINS, A. P.; CORREIA, H. Raw materials: the importance of quality and safety. A review. **Flavour Fragrance Journal**, n. 25, p. 253-271, 2010.

SAMSON, R.A., HOUBRAKEN, J., THRANE, U., FRISVAD, J.C., ANDERSEN, B. Food and Indoor Fungi. **CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre,** v. 2, 2010.

SANTOS, L. H, N.; OLIVEIRA, B. M.; LUCINI, G. F.; DOMENICO, A. S. Ação de óleos essenciais na inibição da germinação de esporos de *Aspergillus sp.* e *Fusarium* sp. In: VII Conferência Brasileira de Pós-Colheita-*2018.* Londrina. **Anais eletrônicos** ABRAPOS. Disponível em: https://eventos.abrapos.org.br/anais/paperfile/910_20181103_02-30-46_800.pdf. Acesso em: 10 ago. 2021.

SANTOS, R. F.; SIMÕES, A. L. T.; GONÇALVES, M. P.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. **Guia de diagnose para aulas práticas de fitopatologia ESALQ/USP LFN 0424- Fitopatologia**, 2020, DOI: 10.11606/9786587391021.

SCHMIDT, P. A.; BÁLINT, M.; BANDOW, C.; ROMBKE, J.; SHMITT, I. Illumina metabarcording of a soil fungal community. **Soil Biology & Biochemistry**, v 30, 2013.

ŠEGVIĆ-KLARIĆ, M., KOSALEC, I., MASTELIĆ, J., PIECKOVÁ, E., PEPEL-JNAK, S. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. **Letters in Applied Microbiology**, 2007.

SILVA, T. B.; RANGEL, E. T. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico do tomilho (*Thymus vulgaris) in vitro.* **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.7, p.48-58, 2010.

SILVA, L., F., **Capacidade de Deterioração de Cepas de *Eucalypyus spp* Por Fungos Xilófagos**. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo. Jerônimo Monteiro, 2011.

SILVA, R. M. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de condimentos portugueses e óleos essenciais de plantas aromáticas frente a bactérias patogênicas e/ou deteriorantes de alimentos**. 2014. 124f. Dissertação (Mestre em Segurança Alimentar), Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal, 2014.

SILVEIRA, C. J.; BUSATO, N. V.; COSTA, A. O. S.; JUNIOR, E. F. C. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15, p.2038-2052, 2012.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELO, J. C. P. de, MENTZ, L. A., & PETROVICK, P. **Farmacognosia - da planta ao medicamento** 6ª edição. Porto Alegre / RS, 2010.

SOUZA, D.R.; SOUZA, G. A.; ARAÚJO, I. F. B.; PEREIRA, L. M.; BEZERRA, V. S.; MARQUES, R. B. Efeitos tóxicos dos fungos nos alimentos. **Revinter**. V. 10, n.2, p.73-84, 2017.

SOUZA, E. C. **Ocorrência de Fungos Deteriorantes e de Micotoxinas em Queijo Parmesão**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de alimentos, do instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2016.

SOUZA, S. M. C.; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L.; PIMENTA, C. J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciênci. Agrotec**, V28, n.3, p.685-690, 2004.

UGALDE, M. L. **Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, 2014.

VACHEYROU, M.; NORMAND, A. C.; GUYOT, P.; CASSAGNE, C.; PIARROUX, R.; BOUTON, Y. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. **International Journal of Food Microbiology**, v.146, n. 3, p.253-262, 2011.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **PCR protocols: A guide to methods and aplications**: **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. Academic press, 1990.

WU, C.S. Mechanical properties, biocompatibility, and biodegradation of cross-linked cellulose acetate reinforced polyester composites. **Carbohydr. Polym.**, v.105, p.41–48, 2014.

YAAGOUBI, M. E.; MECHQOQ, H.; HAMDAOUI, A. E.; MUKKU, V. J.; MOUSADIK, A. E.; MSANDA, F.; AOUAD, N. E. A review on Moroccan *Thymus* species: traditional uses, essential oils chemical composition and biological effects. **Jornal of Ethnopharmacology**, v. 278, 2021.

ZACARCHENCO, P. B.; TRENTO, F. K. H. S.; SPADOTI, L. M.; GALLINA, D.A.; ALVES, A. T. S. Bolores e leveduras em queijo: uma revisão sobre a contaminação de queijos por bolores e leveduras, defeitos causados e mecanismos de controle. **Leite e derivados**, n. 129, set./out., 2011.

ZOTTARELLI, C., L., A., P. GOMES, A., L. Contribuição para o conhecimento de chytridiomycota da “reserva biológica de Paranapiacaba” Santo André-SP Brasil. **Biota Neotrop**, v.7 n. 3, 2007.

Apêndices

Apêndice A- Equivalência dos valores de CIM e CFM

Tabela 6 – Equivalência dos valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM e Concentração Fungicida Mínima (CFM) de µL/mL para µg/m, dos isolados fúngicos.

Isolado	CIM		CFM	
	Concentração		Concentração	
	µL/mL	µg/mL	µL/mL	µg/mL
QAF1/ *Fusarium oxysporum*	0,7	6,28	3	26,94
QCA2/ *Aspergillus flavus*	0,8	7,18	4	35,92
QCP1/ *Penicillium crustosum*	1	8,98	3	26,94

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima.

Anexos

Anexo A – Óleo essencial de tomilho: especificações técnicas

Tabela 7- Laudo Técnico Descritivo do Óleo Essencial de *Thymus vulgaris.*

Itens controlados	**Especificações**
Aparência	Líquido límpido
Cor	Incolor a amarelo claro
Impurezas	Isento
Odor	Característico
Densidade (20 ºC)	0,900 – 0,940
Índice de Refração (20 ºC)	1,490 – 1,510
Rotação ótica	[-3,0º; -0,1º]
Principais componentes (valores aproximados)	Timol= 50% p-cimeno= 30% γ-terpineno= 6% Linalol= 5% Carvacrol= 5% α-pineno= 2% Mirceno= 2%
Obtenção	Destilação a vapor das flores e folhas
Origem	Espanha
Peso	1 mL =0,898g

FONTE: Indústria FERQUIMA/ Vargem Grande Paulista- SP /Brasil