

MONIQUE PEREIRA DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA ARRUDA
(*Ruta graveolens* Linnaeus) PARA O TRATAMENTO DE CAMA DE
AVIÁRIO.**

Assis
2015

MONIQUE PEREIRA DA SILVA

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ARRUDA (*Ruta graveolens* Linnaeus) PARA O TRATAMENTO DE CAMA DE AVIÁRIO.

Trabalho de conclusão de curso de Curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação

Orientador: Mary Leiva de Faria

Área de Concentração: Química

Assis
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

SILVA, Monique Pereira da

Atividade antifúngica do óleo essencial de arruda (*Ruta graveolens* Linnaeus) para o tratamento de cama de aviário/
Monique Pereira da Silva. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA - Assis, 2015.

61p.

Orientador: Mary Leiva de Faria.

Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

1. Óleo essencial. 2. *Ruta graveolens*. 3. Cama de aviário.

CDD:660
Biblioteca da FEMA

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ARRUDA (*Ruta graveolens* Linnaeus) PARA O TRATAMENTO DE CAMA DE AVIÁRIO

MONIQUE PEREIRA DA SILVA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação, analisado pela seguinte comissão examinadora:

Orientador: Prof^a Dr^a Mary Leiva de Faria

Analisador: Prof.^a Ms. Elaine Amorim Soares Menegon

Assis
2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, em especial a minha mãe pelo carinho e incentivo, e a todos que contribuíram para a minha formação profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

À minha professora orientadora Mary, a quem eu admiro não apenas por sua competência profissional, mas pelo seu caráter, por seus ensinamentos, pela paciência na orientação e pelo constante estímulo transmitido durante o trabalho.

À banca examinadora, Elaine Amorim Soares Menegon, que além das correções, foi muito importante na realização das práticas no centro de pesquisa, as quais contribuíram para o meu aprendizado e para o enriquecimento do trabalho.

À minha amiga Amanda por sempre estar ao meu lado me ajudando em todas as minhas dificuldades através de seu companheirismo, e a todos que colaboraram direta ou indiretamente, na execução deste trabalho.

Aos meu queridos colegas Tiago, Iranete e Michele, pela complicidade ao longo desses quatro anos.

Aos professores, Gilcelene, Elaine, Patricia, Ébano, Cleiton, Silvia, Idécio, Alexandre, Raphael e Bia que contribuíram diretamente para o meu crescimento pessoal e profissional.

À minha Mãe Maria Cristina que me incentivou desde o começo, e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós”

Chico Xavier

RESUMO

A carne de frango vem ganhando um espaço cada vez maior no mercado consumidor, fazendo com que a indústria avícola no Brasil crescesse consideravelmente quando comparada aos demais setores da economia. Contudo uma atenção especial deve ser dada a cama de aviário, por que é atribuída à mesma a responsabilidade pela contaminação fúngica das aves. Desta forma, é de grande importância que o tratamento do material a ser utilizado possua comprovada ação antifúngica. Os óleos essenciais são uma alternativa para esse tratamento, visto que apresentam em sua composição compostos com propriedades fungicidas e/ou fungitóxicas. Assim visando o desenvolvimento de um método alternativo para o tratamento de cama de aviários e que também contribua para a preservação do meio ambiente, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Ruta graveolens* foi feito o estudo das amostras de bagaço sem e com a aplicação do óleo essencial. Para o tratamento do bagaço, utilizou as concentrações 4% e 6% do óleo essencial, realizando as diluições 10^{-1} a 10^{-3} . As diluições fora feitas em duplicatas em placas de Pétri com o meio ABG. As placas foram incubadas a 25°C por 7 dias. O estudo foi repetido efetuando-se diluições de 10^{-5} a 10^{-6} . Os resultados das placas com as concentrações 4% e 6% do óleo essencial, não se mostraram satisfatório pois não foi possível observar a inibição e realizar a contagem de bolores e leveduras, o que levou a repetição do experimento utilizando em maiores diluições (10^{-5} , 10^{-7}). Nessas diluições observou-se inibição, mas não houve reprodutibilidade. Os resultados indicaram que as concentrações do óleo essencial em relação à quantidade de bagaço utilizada, não se mostraram eficiente frente à atividade antifúngica, não sendo possível realizar a contagem total de bolores e leveduras. Contudo o resultado sugere uma continuação do trabalho, utilizando uma menor quantidade de amostra de bagaço de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Óleo essencial, *Ruta graveolens*, Cama de aviário

ABSTRACT

Chicken meat is gaining more and more space in the consumer market, causing the poultry industry in Brazil grew considerably compared to other sectors of the economy. However special attention should be given to poultry litter, why is assigned the same responsibility for fungal contamination of birds. Thus, it is of great importance that the treatment of the material to be used has proven antifungal action. Essential oils are an alternative to this treatment, since they exhibit in their composition compounds with fungicidal and / or antifungal activities. Thus aiming to develop an alternative method for treating poultry bed and also to contribute to the preservation of the environment, the aim of this study was to evaluate the antifungal activity of the essential oil of rue in the total count of molds and yeasts in materials of poultry bed. To verify the antifungal activity of the essential oil of *Ruta graveolens* was made the study of residue samples with and without the application of essential oil. For the treatment of bagasse, the concentrations used 4% and 6% of the essential oil by performing the dilutions 10^{-1} and 10^{-3} . The dilution was done in duplicate into Petri plates with the medium ABG. The plates were incubated at 25 ° C for 7 days .The study was repeated making dilutions of 10^{-5} to 10^{-6} .Os results of the concentrations plates with 4% and 6% of essential oil, were not satisfactory because It was not observed and the inhibition perform molds and yeasts, which led to repeat the experiment using at higher dilutions (10^{-5} , 10^{-7}). In these dilutions inhibition was observed, but there was no reproducibility. The results indicated that the essential oil concentrations relative to the amount of bagasse used, were not effective against the antifungal activity is not possible to carry out the total count of molds and yeasts. However, the results suggested a continuation of the work using a smaller amount of sample sugarcane bagasse.

Keywords: Essential oil, *Ruta graveolens*, Bed aviary.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Exemplos de compostos monoterpênicos de ocorrência em óleos essenciais.....	17
Figura 2– Exemplos de compostos sesquiterpênicos de ocorrência em óleos essenciais.....	17
Figura 3 – <i>Ruta graveolens</i> L. (arruda)	20
Figura 4 – Estrutura química dos principais constituintes químicos presentes nas folhas de arruda: (a) quercetina, (b) rutina, (c) psoraleno e (d) alantoína	21
Figura 5 – Compostos identificados na amostra do óleo essencial extraído das folhas de arruda.....	24
Figura 6 – Antibióticos de origem fúngica: penicilina F e cefalosporina C.....	28
Figura 7 – Micrografia eletrônica de hifas.....	29
Figura 8 – Morango mofado. Ilustração da formação do micélio.....	30
Figura 9 – Representação individual da cabeça aspergilar das espécies de <i>Aspergillus</i> . a) <i>Aspergillus flavus</i> (conidióforo unisseriado); b) <i>Aspergillus flavus</i> (conidióforo bisseriado)	31
Figura 10 - Colônia de <i>Aspergillus flavus</i> em meio Sabouraud dextrose agar incubada por 7 dias à 25°C.	31
Figura 11 – Exemplo de contaminação do milho por <i>Aspergillus flavus</i>	32
Figura 12 – Colônia de <i>Apergillus fumigatus</i> em MEA, após crescimento de 2 dias, a 27,5°C.	33
Figura 13 –Aspecto microscópico: Cabeças aspergilares de <i>Aspergillus fumigatus</i>	34
Figura 14 –Representação individual da cabeça aspergilar das espécies <i>Aspergillus fumigatus</i>	34
Figura 15– Patologia por <i>Aspergillus fumigatus</i> . Lesão nos sacos aéreos e difusão no sistema respiratório de granulomas de tons brancos em <i>Gallus gallus</i>	35
Figura 16 – Modo de infecção por inalação de conídios de <i>Aspergillus fumigatus</i>	36
Figura 17 – Resultado das placas contendo só o bagaço de cana-de-açúcar	45
Figura 18- Resultado das placas contendo só o bagaço de cana-de-açúcar na	

diluição 10 ⁻²	46
Figura 19 – Resultado das placas contendo só o bagaço de cana-de- açúcar na diluição 10 ⁻³	46
Figura 20 –Resultados da placa contendo o Tween 80.	47
Figura 21 – Resultados das placas contendo a solução 4% na diluição 10 ⁻¹	47
Figura 22 – Resultados das placas contendo a solução 4% na diluição 10 ⁻²	48
Figura 23 – Resultados das placas contendo a solução 4% na diluição 10 ⁻³	48
Figura 24 – Resultados das placas contendo a solução 6% na diluição 10 ⁻¹	49
Figura 25 – Resultados das placas contendo a solução 6% na diluição 10 ⁻²	49
Figura 26 – Resultados das placas contendo a solução 6% na diluição 10 ⁻³	50
Figura 27 – Resultado das placas contendo só o bagaço de cana-de-açúcar na diluição 10 ⁻⁵	50
Figura 28 – Resultado das placas contendo só o bagaço de cana-de-açúcar na diluição10 ⁻⁶	51
Figura 29 – Resultados das placas contendo a solução 6% na diluição 10 ⁻⁵	51
Figura 30 – Resultados das placas contendo a solução 6% na diluição 10 ⁻⁶	52
Figura 31 – Resultado das placas contendo a solução 8% do óleo essencial na diluição 10 ⁻⁵	52
Figura 32 – Resultado das placas contendo a solução 8% do óleo essencial na diluição 10 ⁻⁶	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	ÓLEO ESSENCIAIS OU VOLÁTEIS.....	16
3	<i>Ruta graveolens</i> Linnaeus (ARRUDA).....	20
3.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA ARRUDA.....	22
4	CAMA DE AVIÁRIO.....	25
5	FUNGOS	27
5.1	<i>Aspergillus flavus</i>	30
5.2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	33
6	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ARRUDA: UMA ALTERNATIVA PARA UM ESTUDO INTERDISCIPLINAR.....	37
6.1	MATERIAIS E REAGENTES.....	39
6.2	PROCEDIMENTO.....	39
7	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
7.1	MATERIAIS.....	40
7.1.1	Equipamentos.....	40
7.1.2	Materiais	40
7.1.3	Reagentes.....	41
7.1.4	Óleo essencial da arruda e bagaço de can-de-açúcar.....	41
7.2	MÉTODOS.....	41
7.2.1	Prparo dos meios ABG (Potato Dextrose Agar).....	41
7.2.2	Preparo da Solução salina a 0,85%, adicionada de peptona a 0,1%.....	41
7.2.3	Preparo da solução 10% de óleo essencial de arruda.....	42
7.2.4	Preparo da solução 8% de óleo essencial de arruda.....	42

7.2.5	Preparo das soluções 6% e 4% de óleo essencial de arruda.....	42
7.2.6	Avaliação do grau de contaminação fúngica antes do tratamento com o antifúngico (solução de óleo de arruda).....	43
7.2.7	Tratamento do bagaço de can-de-açúcar com o antifúngico (soluções de 4% e 6% óleo de arruda) e tween 80.....	43
7.2.8	Contagem de bolores e leveduras.....	43
8	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
9	CONCLUSÃO.....	55
10	REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

A carne de frango está ganhando um espaço cada vez maior no mercado consumidor, o que faz com que a indústria avícola no Brasil crescesse consideravelmente quando comparada aos demais setores da economia (REIS; RODRIGUES; LEITÃO, 2009).

Para o maior desenvolvimento da avicultura, uma atenção especial deve ser dada a cama de aviário, pois ela pode constituir um dos grandes entraves ao progresso do setor, particularmente quanto à sua qualidade sanitária (SANTOS et al., 2008). Vários materiais podem compor a cama avícola como casca de arroz, casca de amendoim, maravalha, bagaço de cana-de-açúcar e feno de capim naipê (REIS; RODRIGUES; LEITÃO, 2009, GARCIA et al., 2013). A maravalha é um dos materiais mais utilizados como cama no Brasil, contudo, dependendo da sua disponibilidade nas várias regiões do país, seu preço pode se tornar alto. Dentre vários outros materiais estudados, o bagaço de cana-de-açúcar tem sido considerado o melhor em termos de maciez e rápida absorção de umidade (TEIXEIRA et al., 2012).

Habitualmente é atribuída à cama do aviário a responsabilidade pela contaminação fúngica das aves. Esta contaminação se dá em decorrência do material empregado na cama de aviário, ser contaminado durante a estocagem em depósitos. Encontra-se com mais frequência em materiais de cama de aviários os fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente o *Aspergillus flavus* e *A. fumigatus* (SANTOS et al., 2008).

Os fungos são encontrados abundantemente na natureza na forma de esporos, conseguindo crescer nos mais diferentes materiais. A contaminação das aves é feita no momento em que elas inalam os esporos, os quais podem estar presentes no material utilizado como a cama. Esta contaminação leva o desenvolvimento de aspergilose respiratória, a qual é a mais grave e mais frequente, podendo gerar altas perdas econômicas por mortalidade elevada, em aves jovens e por dispor à ascite (SANTOS et al., 2008).

Desta forma, para assegurar que a cama utilizada nos aviários apresente baixa contaminação ou esteja livre de fungos, é de vital importância que o material a ser utilizado como cama para aves seja tratado com algum produto de comprovada ação antifúngica. Uma alternativa para esse tratamento são os óleos essenciais de plantas, visto que apresentam em sua composição, compostos com propriedades fungicidas e/ou fungitóxicas. Estes compostos naturais apresentam a vantagem de serem geralmente, menos prejudiciais ao homem e a ao meio ambiente (VENTUROSO et al., 2011; SANTOS et al., 2008).

Segundo Venturoso et al (2011), estudos realizados com extrato bruto de óleo essencial obtidos de plantas medicinais, indicaram que as mesmas apresentam potencial para o controle fúngico, por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos.

Orlanda (2011), em seu estudo sobre atividade antifúngica do óleo essencial de *Ruta graveolens* L. (arruda), verificou que para inibir o crescimento de *Sacchromyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatos* e *Aspergillus níger*, é necessário uma concentração mínima de 4% (v/v) de óleo essencial. Já para fungos *Candida tropicalis* e *Candida glabarata*, a concentração inibitória mínima foi de 0.75%, mostrando que estas linhagens fúngicas são mais susceptíveis ao óleo essencial de arruda.

Visando o desenvolvimento de um método alternativo para o tratamento de cama de aviários e que também contribua para a preservação do meio ambiente, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de arruda na contagem total de bolores e leveduras, em materiais de cama de aviários.

2. ÓLEOS ESSENCIAIS OU VOLÁTEIS

Os óleos essenciais são caracterizados como compostos naturais, voláteis e complexos que possuem um forte odor, sendo sintetizados por plantas aromáticas durante o metabolismo secundário para sua sobrevivência. Podem ser sintetizados por todos os órgãos das plantas: flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira e cascas da árvore. São normalmente extraídos de plantas encontradas em países quentes, como as do mediterrâneo e dos trópicos, onde representam parte importante da farmacopéia tradicional. (MACHADO, JUNIOR 2011; MAIA, DONATO & FRAGA, 2015).

São quimicamente caracterizados como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, sendo alguns altamente voláteis, capazes de gerar sabores e/ou aromas. Apresentam-se fisicamente no estado líquido à temperatura ambiente, com aspecto incolor ou claro. Não se misturam à água, e podem ser extraídos de diferentes modos, como hidrodestilação, CO₂ supercrítico, ou com a utilização de solventes orgânicos ou gorduras (PROBST, 2012). Na grande maioria das vezes os óleos essenciais são extraídos através da técnica de arraste a vapor, e também pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos, como por exemplo, flores (rosas), folhas (eucalipto), cascas (canela), rizomas (gengibre), e frutos (laranja) (BIZZO, HOWELL & REZENDE, 2009; MAIA, DONATO & FRAGA, 2015).

Os constituintes dos óleos essenciais variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis e compostos aromáticos encontrados em todos os tecidos vivos das plantas. Sempre ocorre a predominância de uma, duas ou três substâncias que constituem os óleos essenciais, os quais caracterizarão as fragrâncias. (GODINHO, 2012). Os terpenos representam a maioria dos componentes e ocorrem com muito mais frequência e abundância (BELTRAME et. al, 2010). Os compostos terpênicos mais comuns nos óleos essenciais são os monoterpenos e os sesquiterpenos (GODINHO, 2012). A figura 1 apresenta alguns monoterpenos divididos nos seus três subgrupos:

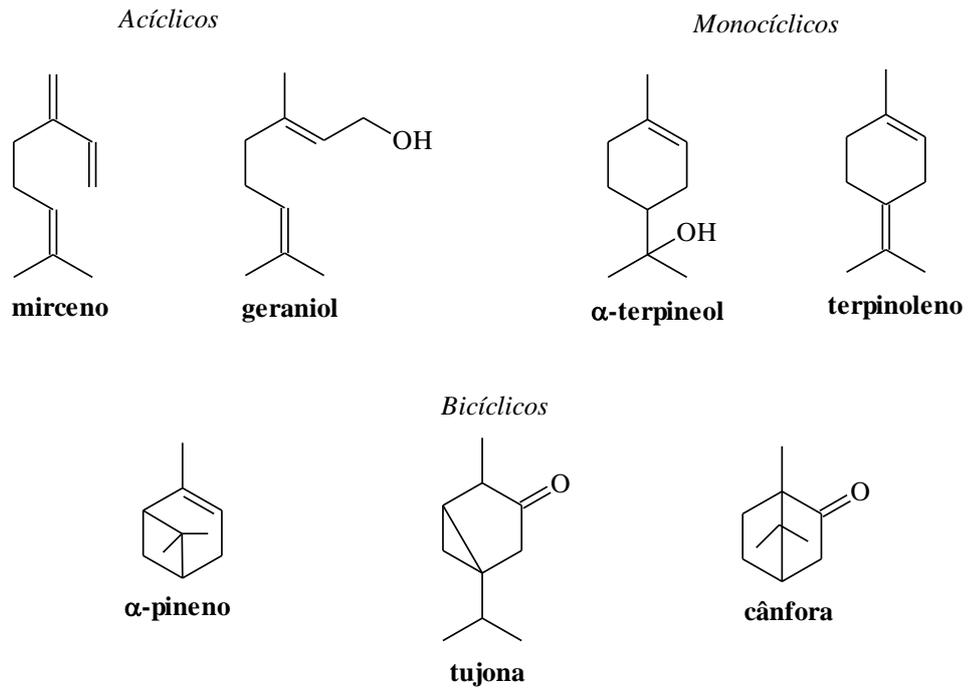


Figura 1 – Exemplos de compostos monoterpênicos de ocorrência em óleos essenciais (In: SIMÕES et al., 2000, p. 391).

A figura 2 apresenta alguns sesquiterpenos, divididos nos seus subgrupos.

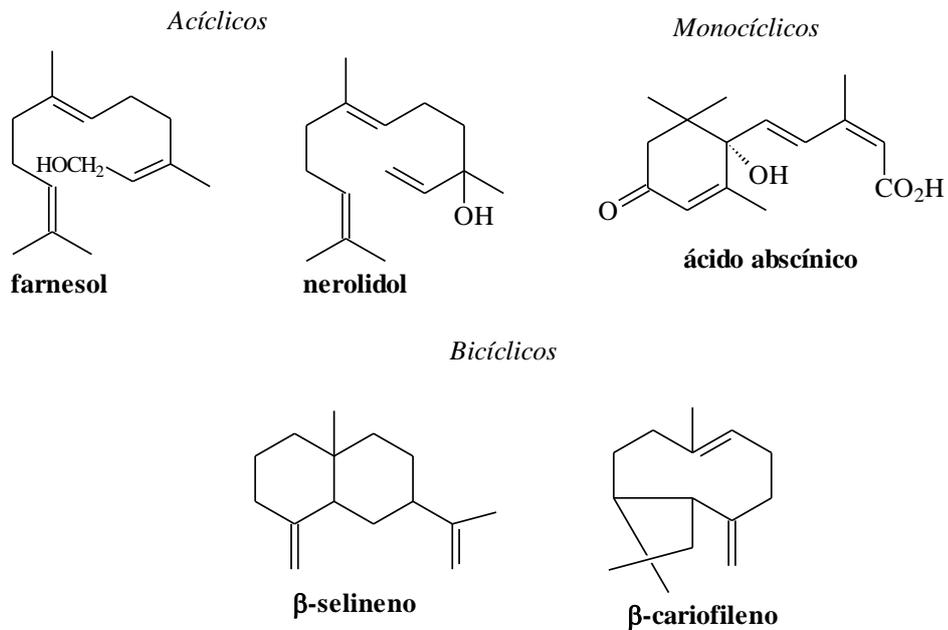


Figura 2– Exemplos de compostos sesquiterpênicos de ocorrência em óleos essenciais (In: SIMÕES et al., 2000, p. 391).

Por possuírem grande importância industrial os óleos essenciais são empregados nas indústrias de perfumaria e cosmética, devido a sua complexa e refinada composição aromática, alimentícia, devido ao seu potencial como flavorizante, farmacêutica, devido ao seu potencial terapêutico, área de aromatização ambiental e produtos sanitários, bem como na área da moda, onde os óleos essenciais inicialmente retidos nas fibras confeccionadas vão sendo liberados na medida de sua utilização (MAIA, DONATO & FRAGA, 2015).

Algumas substâncias presentes nos óleos essenciais possuem alto valor comercial. Essas substâncias podem ser isoladas do óleo ou mesmo sintetizadas em laboratório. Um exemplo é o mentol das espécies de menta. (TRANCOSO, 2013).

Vale frisar que nem todos os óleos essenciais possuem aroma agradável e nem sempre as espécies que os contêm apresentam propriedades terapêuticas (TRANCOSO, 2013).

Para caracterização química dos óleos essenciais utiliza-se cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Alguns óleos apresentam mais de 60 compostos diferentes. Os componentes majoritários representam às vezes mais de 85% do total, enquanto outros compostos aparecem em quantidades pequenas, ainda que a proporção não esteja relacionada com a grandeza de sua atividade, pode esta proporção ser fundamental para a ação farmacológica dos demais (PROBST, 2012).

Os óleos essenciais apresentam diferentes propriedades biológicas, tais como, ação larvicida, atividade antioxidante, ação analgésica e antiinflamatória, fungicida, antibacteriana e atividade antitumoral. Em virtude dessas propriedades, os óleos essenciais vêm sendo estudados na área médica e para preservação de alimentos (MACHADO & JUNIOR, 2011; GODINHO, 2012). Observa-se, portanto, que os óleos essenciais estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência da planta, sendo fundamental na defesa contra micro-organismos. Estudos indicam que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% propriedades antibacterianas (MAIA, DONATO & FRAGA, 2015).

Com o objetivo de identificar substâncias alternativas ao uso de medicamentos tradicionais, existem diversos estudos sobre a atividade antimicrobiana de óleos

essenciais. Dessa forma, buscam-se os produtos naturais que apresentem uma ação antifúngica eficiente frente a micro-organismos resistentes (CAVALCANTI, ALMEIDA & PADILHA, 2011).

3. *Ruta graveolens* Linnaeus (ARRUDA)

A arruda (*Ruta graveolens* L.) (figura 3) popularmente conhecida como arruda-fedorenta, ruta-de-cheiro-forte, arruda-doméstica e arruda-dos-jardins é uma espécie perene, pertencente à família *Rutaceae*, largamente utilizada como recurso medicinal pela população local em todo o Brasil (YAMASHITA et al., 2009).



Figura 3- *Ruta graveolens* L. (arruda) (In: ORLANDA 2011, p.8)

A arruda é uma planta de existência longa, que se renova a cada primavera. Chega a atingir cerca de um metro de altura, apresentando haste lenhosa com ramificações desde a base. As flores são de cor verde-amarelada e os frutos têm a forma de cápsulas arredondadas e as sementes são pardas e rugosas (SILVA et al, 2010; ORLANDA, 2011; TORIANI & OLIVEIRA 2006).

Todas as partes da planta estão repletas de pontos transparentes e, as folhas, cobertas por pequenas glândulas que contém óleo com peculiar odor balsâmico, de forte cheiro fétido e ativo, devido ao óleo essencial que encerra de sabor amargo e

muito espesso (ORLANDA, 2011).

Popularmente é conhecida como uma planta mágica, utilizada desde muito tempo em rituais de proteção, principalmente contra o mal olhado, desordens menstruais, inflamações na pele, câimbras, doenças dos olhos, sarna, micoses e piolhos podendo também ser usada para tratar dor de ouvido e problemas nos olhos, (ORLANDA, 2011; SOUZA et al., 2011).

A espécie *Ruta graveolens* pode apresentar diversas atividades, entres elas: analgésica, anti-hemorrágica, antiinflamatória, calmante, estimulante, repelente, vermícida. Justamente por apresentar essas propriedades medicinais, atrai a atenção dos pesquisadores, fazendo com que venha sendo muito estudada nos últimos anos. (SILVA et al., 2010).

A variedade genética e os fatores ambientais variam a composição química da arruda. Nesta planta são encontrados princípios amargos, resinas, gomas, taninos, flavonóides, rutina, psoraleno, quercetina, alcalóides, ácidos orgânicos, alantoína, saponina (figura 4) (ORLANDA, 2011; TORIANI & OLIVEIRA, 2006).

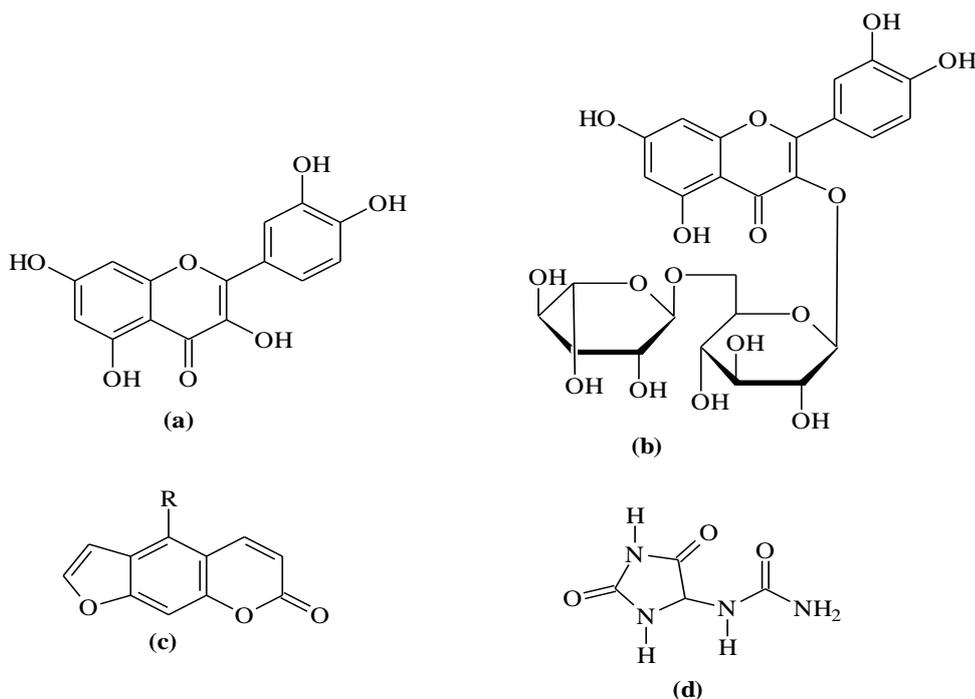


Figura 4 - Estrutura química dos principais constituintes químicos presentes nas folhas de arruda: (a) quercetina, (b) rutina, (c) psoraleno e (d) alantoína (In: ORLANDA 2011, p.9)

São atribuídas à quercetina as propriedades analgésica, antialérgica, bactericida, antidiabética, carminativa, anti-gástrica, hepatoprotetora, anti-histamínica, anti-inflamatória, antioxidante, antiespasmódica, antitumoral, antiviral e larvostático. O psoraleno é empregado em casos de vitiligo e psoríase (ORLANDA, 2011)

A rutina presente na composição química facilita a absorção da vitamina C pelo organismo, o que promove a inibição da aldose-redutase combatendo a fragilidade dos capilares. A rutina também apresenta atividade antibacteriana e alelopática (SANTOS et al., 2009).

A alantoína é responsável pelo efeito cicatrizante, possui ação anti-irritante o que auxilia o sistema de defesa da pele no processo de proliferação de novas células e apresenta ação hidratante e queratolítica, que por esta razão é usada no tratamento da psoríase, ictiose e hiperqueratoses. A presença de mucilagem contribui para o efeito emoliente e restaurar a oleosidade perdida devido ao ressecamento da pele (ORLANDA, 2011).

A planta também produz um óleo essencial rico em substâncias voláteis, que possuem propriedades calmantes, que ao serem aspiradas, aliviam as dores e diminuem a ansiedade (ORLANDA, 2011).

3. 1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA ARRUDA

Segundo Laszlo (2013), o óleo essencial de arruda é rico principalmente em cetonas. A tabela 1 apresenta os componentes presente no óleo essencial e suas respectivas porcentagens.

COMPONENTES	%
18-Cineol	0.64
Nonan-2-ona	2.71
Decan-2-ona	1.3
Cânfora	0.22
Undecan-2-ona	89.43
Dodecan-2-ona	0.46
Undecan-2-ol	0.85
Tridecan-2-ona	0.19
trans-Anetol	0.41
Carvacrol	1.5
TOTAL	97.71

Tabela 1 - Componentes do óleo essencial da Arruda (In LASZLO, 2013, p.2)

SILVA et al., (2010) obtiveram em seus estudos, o óleo essencial de *R. graveolens* através de hidrodestilação em doseador tipo Cleavenger, sendo identificado 50% de seus componentes, os quais equivalem a cerca de 90% da constituição química do óleo. Os componentes majoritários identificados foram: nonan-2-ona (33,9%), decan-2-ona (1,3%) e undecan-2-ona (56,8%) (figura 5).

Orlanda (2011) determinou a composição química do óleo essencial da arruda (*Ruta Graveolens L.*) via cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa (CG-MS). Esta metodologia permitiu a identificar os compostos nonan-2-ona, decan-2-ona, undecan-2-ona e dodecan-2-ona, os quais pertencem à classe metilcetônica ou monoterpenóide. Foram identificados também os ésteres, acetato de octila, ftalato de etila e acetato de pentadecanila (figura 5). Segundo o mesmo autor, o cromatograma do óleo essencial de arruda mostrou dois picos mais intensos, que

foram definidos como majoritários, os quais correspondiam aos compostos nonan-2-ona e undecan-2-ona.

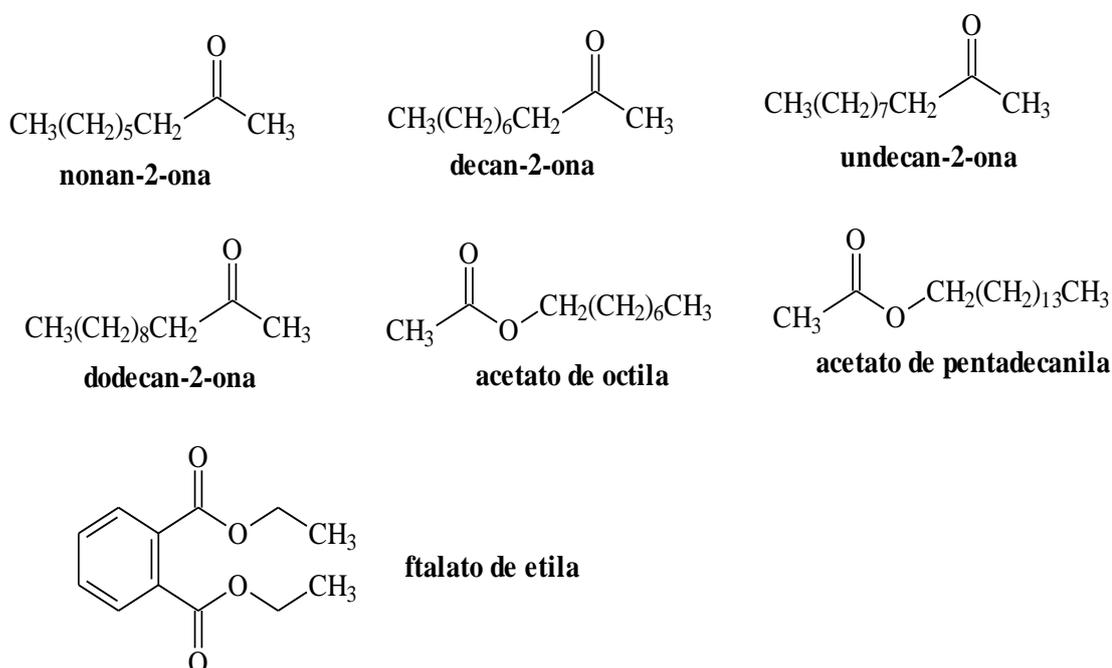


Figura 5– Compostos identificados na amostra do óleo essencial extraído das folhas de arruda (In: ORLANDA, 2011, p. 57)

Lima (2013), utilizando a técnica do headspace para a determinação dos compostos orgânicos voláteis, obteve também os compostos nonan-2-ona e undecan-2-ona das folhas da arruda (*Ruta Graveolens L.*).

Segundo Orlanda (2011), as metilcetonas nonan-2-ona e undecan-2-ona apresentam as seguintes propriedades comprovadas: bactericida, fungicida, aleloquímicos, antioxidante, inseticida, repelente, alelopático, expectorantes, antivirais, descongestionantes hepáticos, estimulantes da circulação e do sistema nervoso central.

De acordo com (LASZLO, 2013), as cetonas como undecan-2-ona, nonan-2-ona, e decan-2-ona, presentes no óleo de arruda, são uma classe química geralmente com potencial antimicrobial vasto (fungos, bactérias e vírus), algo notável no óleo essencial de

4. CAMA DE AVIÁRIO

A cama de frango consiste na mistura de excretas juntamente com material absorvente, utilizado como substrato para receber e absorver a umidade das excretas, penas e descamações da pele das aves e restos de alimento que caem dos comedouros. Auxilia na redução das oscilações de temperatura no aviário e, conseqüentemente, na melhoria do conforto das aves que de uma forma está associado ao bem estar animal. (VIRTUOSO et al., 2015).

Resíduos orgânicos, como a cama de frango, são considerados insumos de baixo custo e de alto retorno econômico para a agropecuária, além do retorno direto da atividade (BRATTI, 2013).

A boa qualidade da cama deve ser indispensável, independente do material utilizado, deve cobrir o piso do galpão de maneira uniforme, atingindo espessura de 5 a 8 cm no verão e 8 a 10 cm no inverno, possibilitando o bem-estar das aves e seu desempenho produtivo (VIRTUOSO et al., 2015).

O conhecimento de sua composição química é importante para um correto manejo deste resíduo, que de forma geral é composto predominantemente de água e carbono, com menores quantidades de nitrogênio e fósforo e leves traços de cloro, cálcio, magnésio, sódio, manganês, ferro, cobre, zinco e arsênico, média de 14% de proteína bruta, 16% de fibra bruta, 13% de matéria mineral, e 0,41% de extrato etéreo. Esta composição é muito variável, porém, rica em nutrientes o que propicia o desenvolvimento de bactérias e fungos. Além disso, as próprias condições ambientais, como as variações de temperatura de 20 a 32°C, dependendo da semana de criação, tornam favoráveis a proliferação desses micro-organismos (SANTOS et al., 2012 ; CARVALHO et al, 2011).

Diversos fatores podem afetar a composição da cama aviária, como: tipo ou composição da ração, natureza e quantidade do material de cobertura do piso do galpão, período de permanência das aves sobre o material, número de aves por área, condições e período de estocagem, temperatura ambiente e utilização de

equipamentos de resfriamento, como nebulizadores e ventiladores, entre outros. O tamanho das partículas também tem grande importância sobre a compactação da cama, absorção de umidade, diminuição de calos de peito e escoriações (GARCIA et al., 2013).

Segundo Virtuoso et al. (2015), a escolha do material a ser utilizado como cama é de grande importância, uma vez que as aves passarão todo seu ciclo de vida em contato direto com o material que será utilizado para composição da cama de frango. Uma boa escolha da cama contribui para diminuir a incidência de lesões em regiões como peito, articulações e coxim plantar das aves, devendo possuir, entre suas características, capacidade de absorção e liberação de umidade, isolamento térmico, facilidade de obtenção e baixo custo (VIRTUOSO, et al., 2015).

Um dos materiais mais utilizados como cama no Brasil é a maravalha, contudo, dependendo da sua disponibilidade nas várias regiões do país, seu preço pode se tornar alto. Dentre vários outros materiais estudados, o bagaço de cana-de-açúcar tem sido considerado o melhor em termos de maciez e rápida absorção de umidade (TEIXEIRA et al., 2012).

5. FUNGOS

Os fungos são conhecidos popularmente como mofos e bolores (SILVA & COELHO 2006). Compreendem um grupo heterogêneo de micro-organismos heterotróficos como sapróbios ou parasitas, com menos frequência como simbioses, e vivem em associação com outros organismos (OLIVEIRA, 2005).

Os fungos são micro-organismos que crescem em diversos ambientes possíveis, devido o sistema enzimático altamente desenvolvido (RIBEIRO, 2013). Os esporos dos fungos são abundantemente encontrados na natureza, germinam rapidamente no solo, em plantas, em alimentos, em papel e até em vidros. Os alimentos armazenados representam excelente campo para a proliferação dos fungos, principalmente quando os princípios básicos de secagem adequada e armazenamento correto são desconhecidos ou desprezados (PEREIRA; CARVALHO & PRADO, 2002).

Na maior parte das vezes, são lembrados somente pelos danos que causam, seja parasitando plantas, causando problemas de saúde para o ser humano, e deterioração de grande variedade de materiais. No entanto todos os dias somos beneficiados por produtos originados direta ou indiretamente de fungos, por exemplo: ação fermentativa de fungos na síntese de álcool etílico e dióxido de carbono, (produção de bebidas como vinho e cerveja, alimentos como pães e massas em geral). Podem ainda proporcionar sabor e aroma distintos em diferentes tipos de queijos e consumo de cogumelos comestíveis (SILVA & COELHO, 2006).

Para a indústria farmacêutica, importantes fármacos de uso clínico em várias patologias são obtidos de fungos, destacam-se como os exemplos mais conhecidos, os antibióticos penicilina, produzida por fungos do gênero *Penicillium*, descoberta em 1928 por Alexander Fleming, e a cefalosporina, isolada de culturas de *Cephalosporium acremonium* em 1948 por Brotzu, (figura 6) (OLIVEIRA, 2010).

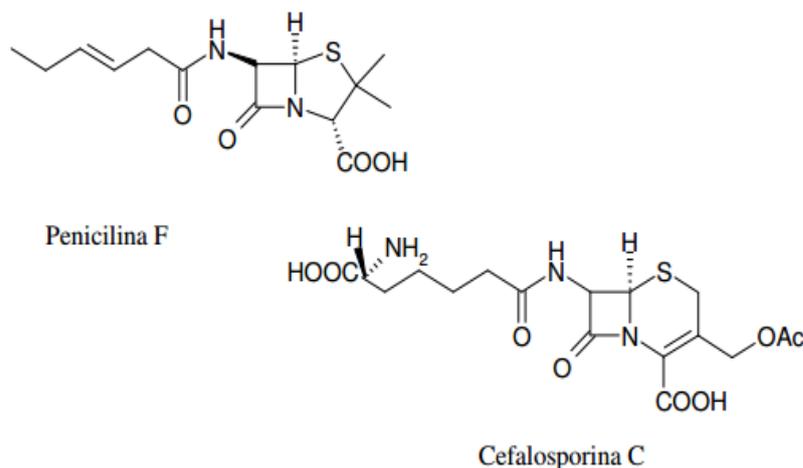


Figura 6- Antibióticos de origem fúngica: penicilina F e cefalosporina C.(In: OLIVEIRA, 2010, p.11).

Fonte do inóculo, substrato ideal, água, oxigênio e temperatura adequada, são os cinco fatores principais para a proliferação de fungos em qualquer substrato, devem ser levado em consideração também os níveis de CO₂, o pH e, em alguns casos, pressão, luz, e outras formas de radiação (RIBEIRO, 2013). Os fungos crescem em substratos que outros organismos não são capazes de crescer, por exemplo: crescimento com atividade de água reduzida ($a_w > 0,65$ até $a_w < 0,99$), crescimento em valores de pH reduzido: 3,0 e abaixo, crescimento em uma grande variedade de temperatura: maior que 0°C a menor que 40°C, utilização de uma grande variedade de substrato, capacidade de esporulação e disseminação em diferentes condições (RITTER, 2007).

Os bolores são multicelulares e crescem em compridos filamentos chamados hifas (figura 7). Essas, da maioria das espécies são divididas em seções que contem geralmente muitos núcleos por seção (JONES & GAUDIN, 2000). A observação microscópica do sistema reprodutivo é fundamental para a classificação desses fungos, o que permite a identificação do gênero e da espécie (PEREIRA, 2012). Já as leveduras são fungos unicelular com reprodução por gemulação ou brotamento por blastoconídios, algumas apresentam a capacidade para a produção de hifas, cuja, podem surgir de um blastoconídio denominadas hifas verdadeiras, ou as pseudo-hifas que surgem da conjunção de vários blastoconídios, se mantendo unidos após a formação (PERREIRA, 2012).

Essencialmente aeróbica com limitada capacidade anaeróbica, acumula glicogênio como material reserva (PEREIRA, 2012). Embora comparado muitas vezes com os vegetais, os fungos são organismos que não possuem clorofila em suas células, ou seja, não realizam fotossíntese. Todos os fungos são eucariotos. Normalmente possuem dois núcleos em suas células os quais podem ser visualizados pelo microscópio óptico empregando-se técnicas de coloração apropriadas. São organismos heterotróficos (obtem nutrientes por absorção, ou seja, lançam enzimas aos substratos onde colonizam e absorvem os nutrientes através da parede e membrana celular) (SILVA & COELHO, 2006), unicelulares ou pluricelulares, estes últimos caracterizados pela formação de estruturas filamentosas, as hifas, que constituem o micélio (figura 8). O micélio pode ter duas funções distintas: promover a fixação do bolor no substrato (micélio vegetativo) e promover reprodução através da produção de esporos (micélio reprodutivo) (RITTER, 2007). Na fase reprodutiva, o micélio forma estruturas assexuadas e/ou sexuadas que originam os esporos, principais responsáveis pela propagação das espécies. (MAIA & JUNIOR, 2010).

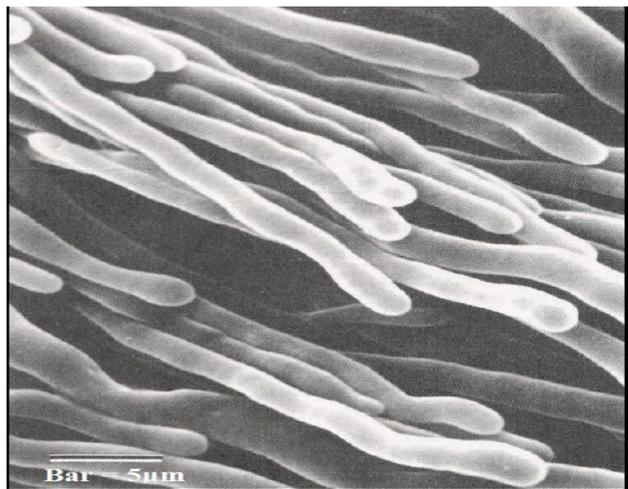


Figura 7: Micrografia eletrônica de hifas.(In: SILVA & COELHO, 2006, p.4)

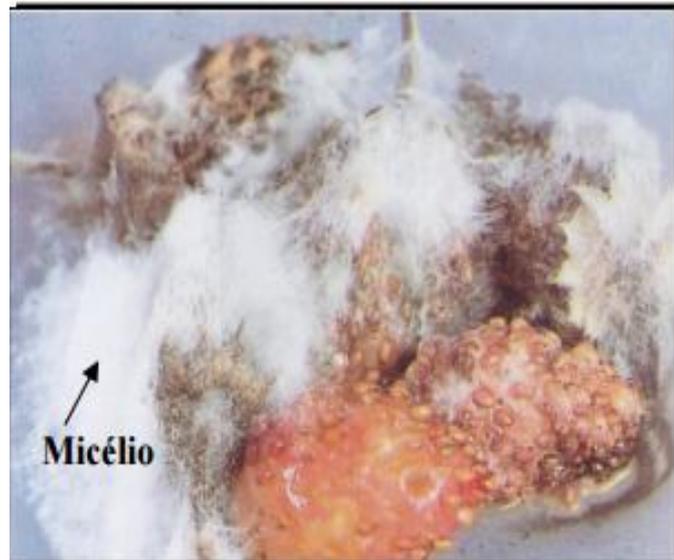


Figura 8: Morango mofado. Ilustração da formação do micélio. (In : SILVA & COELHO, 2006, p.4)

5.1 *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus é um fungo filamentosos, pertencente à classe *Ascomycetes*, subclasse *Eurotiomycetidae*; ordem *Eurotiales*, família *Trichomaceae* e gênero *Aspergillus* (PINHEIRO, 2004). *A. flavus* foi descrito pela primeira vez por Link em 1809 (CARVALHO, 2013), seus conidióforos surgem a partir de hifas vegetativas septadas. As fiálides podem surgir diretamente de uma vesícula globosa (condição unisseriada) ou a partir da métula que envolve uma vesícula (condição bisseriada) representadas respectivamente na figura 9. A cabeça conidial (vesícula, métula, fiálides e adeias de conídeos) é variável na espécie *A. flavus* (REIS, 2009).

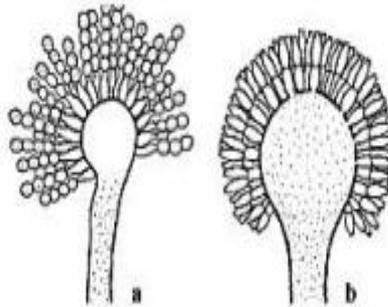


Figura 9- Representação individual da cabeça aspergilar das espécies de *Aspergillus*. a) *Aspergillus flavus* (conidióforo unisseriado); b) *Aspergillus flavus* (conidióforo bisseriado). (In: VALENTE, 2014, p.8)

Macroscopicamente, as colônias pertencentes ao gênero *Aspergillus* caracterizam-se pelo desenvolvimento de colônia coloridas e brilhantes. As colônias *A. Flavus* (figura 10), são caracteristicamente verdes a amarelo-oliva, embora eventualmente possam apresentar coloração amarelo puro tornando-se acinzentadas com a idade (CASTRO, 2011).



Figura 10 - Colônia de *Aspergillus flavus* em meio Sabouraud dextrose agar incubada por 7 dias à 25°C. (In: CARVALHO, 2013, p.7)

O gênero *A.flavus* cresce em substratos com umidade entre 22-23% e UR entre 90-100%. A faixa de umidade relativa para a produção aflatoxinas é de 80 a 85%, umidade relativa ótima para esporulação: 85% (RITTER, 2007). Atividade de água (Aa) mínima para se desenvolverem é de 0.78, com teor de umidade mínima de 16% (REIS, 2007), umidade relativa do ar entre 80 e 90%, temperatura acima de 25°C favorece o crescimento de *A.flavus*, caracterizando-o como fungo de armazenamento, e temperatura ótima de crescimento 35°C (CASTRO, 2011).

Embora *Aspergillus flavus* tenha a capacidade de afetar os seres humanos, a sua maior ameaça para a saúde é através da produção de aflatoxinas (CARVALHO, 2013) e ácido ciclopiazônico (GONÇALEZ et al., 2013) que contaminam as culturas alimentares, incluindo o milho, amendoim e nozes (figura 11), sendo que a presença dessas micotoxinas em alimentos e rações pode levar a um efeito tóxico no homem e em animais (GONÇALEZ et al., 2013).



Figura 11- Exemplo de contaminação do milho por *Aspergillus flavus*. (In: CARVALHO, 2013, p.8).

O consumo de alimentos contaminados com essas micotoxinas pode levar à aflatoxicose aguda que resulta em morte ou à aflatoxicose crônica que resulta em situações patológicas mais prolongadas, incluindo cancro e imunossupressão. O fígado é o principal órgão alvo, e os danos hepáticos têm sido documentados em roedores, aves domésticas, após a ingestão da aflatoxina (CARVALHO, 2013).

5.2 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus foi descrito pela primeira vez em 1863, pelo médico Johann B. G. W. Fresenius (CARVALHO, 2013). É considerado o maior e comum etiológico agente patogênico responsável pelas primeiras causas de morbidade e mortalidade e por 90% de infecções em variadas espécies de animais, com incidência especial em aves domésticas (frangos, perus, patos) e espécies de aves selvagens (VALENTE, 2014).

Em relação ao aspecto macroscópico das colônias de *A. fumigatus*, geralmente tem um aspeto aveludado, de coloração cinza-esverdeado ou cinza-azulada (CARVALHO, 2013).

Aspergillus fumigatus é termotolerante e cresce a temperaturas variando entre 15°C a 53°C (CARVALHO, 2013). As colônias deste fungo, quando em presença de condições propícias, em meios de cultura de MEA e a temperaturas correspondentes ao seu ótimo desenvolvimento (de 25 a 37°C), permitem a observação macroscópica das suas particularidades (figura 12). Contudo, este fungo apresenta-se como um fungo filamentoso (VALENTE, 2014).



Figura 12 - Colónia de *Aspergillus fumigatus* em MEA, após crescimento de 2 dias, a 27,5°C. (In: VALENTE, 2014, p.12)

O nome *Fumigatus* é derivado do latim “fumigave”, que significa fumaça referindo-se ao micélio azul-cinza esfumado (figura 13) (CARVALHO, 2013).

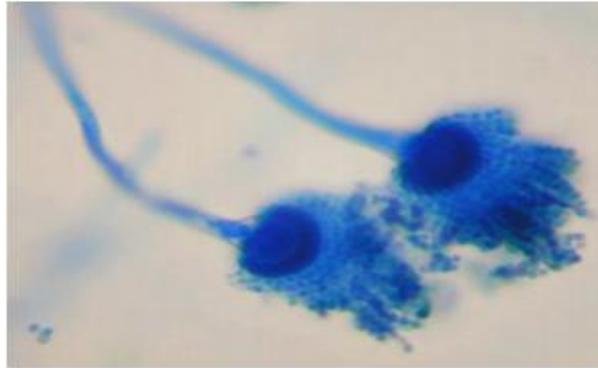


Figura 13 - Aspecto microscópico: Cabeças aspergílares de *Aspergillus fumigatus* (In: CARVALHO, 2013, p. 4).

Aspergillus fumigatus dispõe de conidióforos curtos, lisos sem irregularidades, hialinos e de dimensões de 100-500 x 5-8 μm ; as vesículas são subglobosas com fiálides com disposição colunar e unisseriadas (sem a presença de métula) e hialinas, com dimensões de 20-30 μm . Os seus conídios (unidade reprodutiva assexuada) são pequenos, incolores e com uma forma globosa, de tamanho 2-5 μm , (figura 14) (VALENTE, 2014).



Figura 14 - Representação individual da cabeça aspergílar das espécies *Aspergillus fumigatus* (In: VALENTE, 2014, p.8).

Aspergillus fumigatus é o agente causal de vários tipos de infecções, tanto em humanos como em animais, que ocorrem nos pulmões, ossos, olhos, aparelho cardiovascular e no sistema nervoso central (CARVALHO, 2013).

A aspergilose ou pneumonia micótica é causada por diversas espécies de fungos do gênero *Aspergillus* é a micose mais comum em aves (FISCHER; SOUZA & BERSELLI, 2012). Considerada a principal enfermidade micótica na exploração econômica da avicultura comercial, dentre as mais diversas formas de apresentação clínica da doença, a forma respiratória, que afeta principalmente os pulmões e sacos aéreos em aves, são as de maior importância (figura 15) (FISCHER; SOUZA & BERSELLI, 2012).



Figura 15– Patologia por *Aspergillus fumigatus*. Lesão nos sacos aéreos e difusão no sistema respiratório de granulomas de tons brancos em *Gallus gallus* (In: VALENTE, 2014, p.21).

Considerada uma micose oportunista, a aspergilose acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos. *Aspergillus fumigatus* é um importante patógeno de fungos filamentosos que causa infecção invasiva grave e pneumonia nesses hospedeiros imunocomprometidos o que resulta em altas taxas de mortalidade (FISCHER; SOUZA & BERSELLI, 2012). O conídio inalado (figura 16) alcança e acumula-se nos pulmões (órgão-alvo), onde se iniciaria uma inflamação, acompanhada por liberação de enzimas fúngicas gerais (elastases, proteases e fosfolipases), bem como produção de gliotoxina, específica de *A. fumigatus sensu*

stricto (a sua detecção foi verificada em 93% dos isolados clínicos com Aspergilose Invasiva comprovada) resultando danos nos tecidos e disseminação para outros órgãos através da circulação sanguínea, gerando Aspergilose invasiva e outras doenças (VALENTE, 2014)

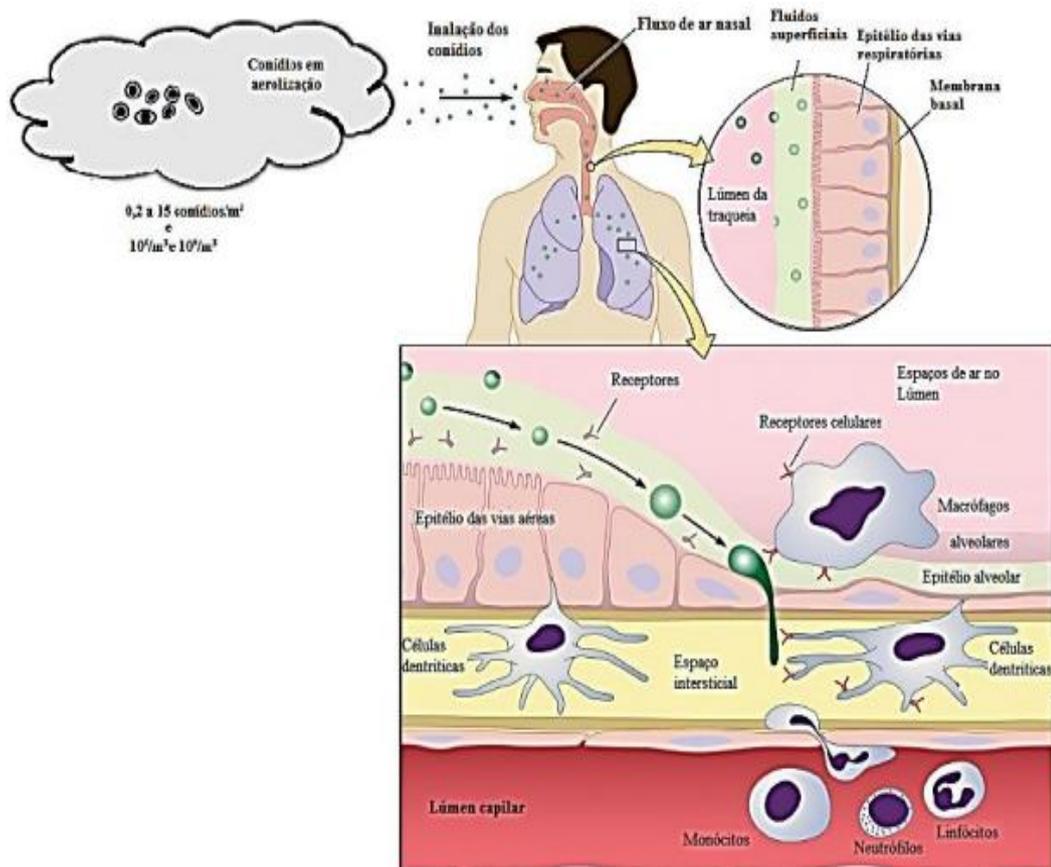


Figura 16- Modo de infecção por inalação de conídios de *Aspergillus fumigatus*. (In: VALENTE, 2014, p.18).

6. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ARRUDA: UMA ALTERNATIVA PARA UM ESTUDO INTERDISCIPLINAR NO ENSINO MÉDIO

A Lei de Diretrizes e Bases da Educação Nacional – nº 9394/96 estabelece como finalidades do Ensino Médio, o aprimoramento do educando como ser humano, sua formação ética, o desenvolvimento de sua autonomia intelectual e de seu pensamento crítico, sua preparação para o mundo do trabalho e o desenvolvimento de competências para continuar seu aprendizado (Art.35) (CAVAGLIER, 2011)

A química é a ciência que estuda a natureza da matéria, as transformações e a energia envolvida nesses processos. Quando o estudante ingressa no ensino médio, aprende algumas ciências separadas, sendo a química uma delas. Esta disciplina pode ser vista com um olhar mais particular do que durante as séries anteriores, quando era tratada por ciências. Não só o estudo da química, mas como também de outras áreas do conhecimento, é fundamental para desenvolver a capacidade de raciocinar logicamente, observar, redigir com clareza, experimentar e buscar explicações sobre o que se vê e o que se lê, para compreender e refletir sobre os fatos do cotidiano ou sobre questões veiculadas pela imprensa ou pela televisão (CLEMENTINA, 2011).

A grande maioria dos alunos demonstra dificuldades no aprendizado de química, devido na maioria das vezes, não conseguirem perceber o significado ou importância, do que estudam. Os conteúdos são trabalhados de forma descontextualizada, tornando-se distantes da realidade e difíceis de compreender, não despertando o interesse e a motivação dos alunos. Além do mais os professores de química demonstram dificuldades em relacionar os conteúdos científicos com eventos da vida cotidiana, priorizando a reprodução do conhecimento, a cópia e a memorização, esquecendo, muitas vezes, de associar a teoria com a prática (PONTES et al., 2008).

É de grande importância que os professores estejam atentos a enorme distância que tende a se estabelecer entre o mundo da ciência e o mundo do cotidiano, distância

essa que o academismo exagerado da escola pode tornar ainda maior. Convenções, enunciados, conceitos, teorias, modelos e leis podem à primeira vista serem tão incompreensíveis quanto palavras e frases de uma língua estrangeira. Sem dúvida nenhuma, o papel do docente como mediador do processo de ensino-aprendizagem é essencial (CLEMENTINA, 2011).

Através do experimento proposto neste trabalho pode-se discutir sobre as propriedades biológicas do óleo essencial da arruda tais como as atividades: analgésica, anti-hemorragica, antiinflamatória, calmante, estimulante, repelente, vermífida e larvífida. Essa última atividade está relacionada ao mosquito *Aedes aegypti* e é devido à presença de compostos terpênicos, alcoóis e aldeídos presentes no óleo essencial (figuras 4 e 5).

Através da apresentação da estrutura desses constituintes, é possível focar nos grupos funcionais e ensinar as funções orgânicas e as propriedades físicas dos compostos orgânicos, como: polaridade, solubilidade, ponto de fusão e ponto de ebulição.

Segundo Correia et al., (2004), a abordagem interdisciplinar dos temas das Ciências Naturais favorece a integração de conteúdos, evita a visão fragmentada do conhecimento e expõe os alunos à complexidade do processo de geração do conhecimento.

Neste contexto, o óleo de *Ruta graveolens* por apresentar atividade antifúngica, pode ser utilizado como ponto de partida para abordar o conteúdo de microbiologia, relacionando com o Reino Fungi, suas características gerais e específicas, a proliferação de fungos no dia a dia, bem como seu crescimento em alimentos. Este crescimento poderia ser exemplificado com fatos corriqueiros no dia-a-dia do aluno como, por exemplo, o pão mofado, e mostrar aos alunos como os compostos químicos dos óleos essenciais atuam contra esses microorganismos, danificando suas células. Isto permite abordar a relação entre a estrutura química e atividade biológica dos compostos. Desta forma, observa-se que existe a possibilidade de integrar diferentes áreas, promovendo a interdisciplinaridade.

Propõem-se então, um experimento visando a extração do óleo essencial de arruda utilizando um solvente orgânico (álcool), para relacionar sua atividade antifúngica em

amostras de morangos.

A prática poderia fazer com que o professor além de discutir as técnicas utilizadas para extração de óleos essenciais e suas aplicações nas indústrias (farmacêuticas, alimentícias, perfumaria entre outras), abordar na prática a atividade antifúngica e sua importância no dia a dia.

O experimento proposto juntamente com os materiais e reagentes, estão apresentados a seguir :

6.1 MATERIAIS E REAGENTES

- Folhas de arruda
- Álcool 70%
- Pistilo
- Béquer
- Medidor

6.2 PROCEDIMENTO

Para que se possa extrair o óleo essencial, inicialmente as folhas de arruda devem ser trituradas com o auxílio do pistilo.

Em seguida colocar as folhas trituradas em um béquer (ou outro recipiente de vidro) juntamente com o álcool, e deixar em repouso por 30 minutos.

Após esse tempo, com o auxílio de uma peneira, separar a solução das folhas.

Para verificar a atividade do extrato alcóolico do óleo essencial de arruda, utilizar dois morangos: um sem a aplicação da solução e o outro morango tratado com 20 mL da solução. Deixar os morangos em repouso por 7 dias em temperatura ambiente. Dado os 7 dias, visualizar o crescimento de mofo nos dois morangos.

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 MATERIAIS

7.1.1 Equipamentos

- Estufa Bacteriológica MA 032 (MARCONI)
- Auto-Clave Vertical (PHOENIX)
- Balança semi-analítica (Radwag RS 232)
- Capela para plaqueamento (fluxo laminar) - Série 1341 - Filtros TROX (MERCK)

7.1.2 Materiais

- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| - Balão Volumétrico de 25 mL | - Erlenmayer 500 mL |
| - Placa de Pétri | -Proveta 300 mL |
| - Bastão de Vidro | - Pipeta Graduada 1 mL |
| - Alça de drigalski | - Pipeta Volumétrica 2 mL |
| | -Pipeta volumétrica 20 mL |

7.1.3 Reagentes

- Álcool 70%
- Tween 80
- Meio de cultura ABG (Potato Dextrose Agar)
- Óleo essencial de arruda

7.1.4 Óleo Essencial De Arruda e Bagaço De Cana-de-açúcar

Utilizou-se para o estudo o óleo essencial de arruda comercial, produzido na cidade de Juíz de Fora (MG).

A amostra de bagaço de cana-de-açúcar é proveniente do Sítio São Pedro, Taquarussu, Candido Mota –SP .

7.2 MÉTODOS

7.2.1 Preparo dos meios ABG (Potato Dextrose Agar)

Pesou-se em 2 erlenmeyers de 500 mL, 11,7g do meio ABG (Potato dextrose Agar). Através de uma proveta transferiu-se 300 mL de água destilada em cada erlenmeyer e a solução foi misturada. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a uma temperatura de 121 °C. O meio foi retirado da autoclave e resfriado até atingir 50 °C. Em seguida foi adicionado 3 mL do ácido tartárico 10% para acidificar o meio, e depois o meio foi distribuído em placas de Pétri estéreis.

7.2.2 Preparo da Solução Salina a 0,85%, adicionada de peptona a 0,1%.

Pesou-se em um becker de 1000 mL, 7,65g de NaCl e 0,9g de peptona .Através de uma proveta, transferiu-se 900 mL de água destilada e agitou-se com o auxílio de

um bastão de vidro até a dissolução. Em uma proveta de 250 mL mediu-se 225 mL e transferiu-se para 4 erlenmeyer de 500 mL, os quais foram autoclavados a 121°C por 20 minutos e depois resfriados a 50°C.

7.2.3 Preparo da solução 10% de óleo essencial de arruda

Com o auxílio de uma pipeta volumétrica e adicionou-se ao balão volumétrico de 25 mL 2,5 mL do óleo essencial de arruda. Em seguida com o auxílio de uma pipeta graduada adicionou-se 0,25 mL de tween 80. A mistura foi homogeneizada e aos poucos completou-se o volume com água destilada.

7.2.4 Preparo da solução 8% de óleo essencial de arruda

Com o auxílio de uma pipeta volumétrica e adicionou-se ao balão volumétrico de 25 mL 2,0 mL do óleo essencial de arruda. Em seguida com o auxílio de uma pipeta graduada adicionou-se 0,20 mL de tween 80. A mistura foi homogeneizada e aos poucos completou-se o volume com água destilada.

7.2.5 Preparo das soluções 6% e 4% de óleo essencial de arruda

As soluções de 6% e 4% foram preparadas a partir da solução 10% (v/v). Para preparar estas soluções foram transferidas, respectivamente, alíquotas de 15 mL e 10 mL para balões de 25 mL. Em seguida o volume dos balões foi completado com água destilada.

7.2.6 Avaliação do Grau de Contaminação Fúngica, antes do Tratamento com o antifúngico (soluções de óleo de arruda)

Para esta avaliação preparou-se um frasco de vidro estéril com 225 mL da solução salina a 0,85%, adicionada de peptona a 0,1%. Em seguida o frasco recebeu 25 g de bagaço de cana-de-açúcar, obtendo-se a diluição de 10^{-1} . Após a devida homogeneização do conteúdo do frasco efetuou-se as de mais diluições até 10^{-3} . De cada diluição semeou-se 1,0 mL em placas de Pétri com o meio ABG. Todas as diluições foram feitas em duplicata. As placas foram incubadas a 25°C por 7 dias e depois feita a contagem de fungos, sendo expressa em Unidade Formadora de Colônia por um grama de amostra (UFC/g).

O estudo foi repetido efetuando-se diluições de 10^{-5} a 10^{-7} .

7.2.7 Tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com o antifúngico (soluções de 4% e 6% óleo de arruda) e Tween 80.

Para a composição dos tratamentos, pesou-se 50 g de bagaço de cana-de-açúcar e espalhou-se em 3 bandejas de polipropileno de 23x30 centímetros de superfície, e posteriormente realizou-se a incorporação dos produtos testados.

Na primeira amostra adicionou-se 20 mL do Tween 80 e na segunda e terceira amostras, 20 mL de solução de óleo essencial de arruda a 4% e 6%, respectivamente, misturando bem os produtos testados com o bagaço de cana-de-açúcar. Após a incorporação, os tratamentos foram deixados em repouso por 48 horas à temperatura ambiente.

7.2.8 Contagem de Bolores e Leveduras.

Após este tempo e para a avaliação da atividade antifúngica dos tratamentos efetuados no estudo, foram pesados 25 g de cada amostra de bagaço de cana-de-açúcar de cada tratamento, que foram diluídos em 225 mL de solução salina a 0,85%, adicionado de 0,1% de peptona, obtendo-se diluição 10^{-1} , seguindo-se com

diluições até 10^{-3} e repetindo-se o que foi feito para as amostras de bagaço de cana-de-açúcar antes da aplicação do Tween 80 e das soluções de óleo essencial de arruda a 4% e 6%.

O mesmo estudo foi feito com o bagaço de cana-de-açúcar tratado com óleo essencial de arruda nas concentrações 6% e 8%, mas utilizando-se diluições 10^{-4} a 10^{-6} . A repetição do estudo com o bagaço sem tratamento foi feito a diluições 10^{-5} a 10^{-7} . Os inóculos foram feitos pela técnica de superfície em PDA. Após inocular, as placas foram incubadas por 7 dias à 25°C .

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

O trabalho para verificação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Ruta graveolens* seguiu a metodologia Orlanda (2011) e Santos et al., (2008) com adaptações. Os resultados estão relacionados aos fungos presentes nas amostras de bagaço de cana-de-açúcar sem e com a aplicação do óleo essencial. As figuras 17, 18 e 19 mostram os resultados obtidos contendo apenas o bagaço, e a figura 20 os resultados contendo a solução de tween 80, este precisou ser verificado para constatar se apresentaria alguma inibição que atrapalhasse o estudo.



Figura 17 - Resultado das placas contendo só o bagaço de cana-de-açúcar na diluição 10^{-1}

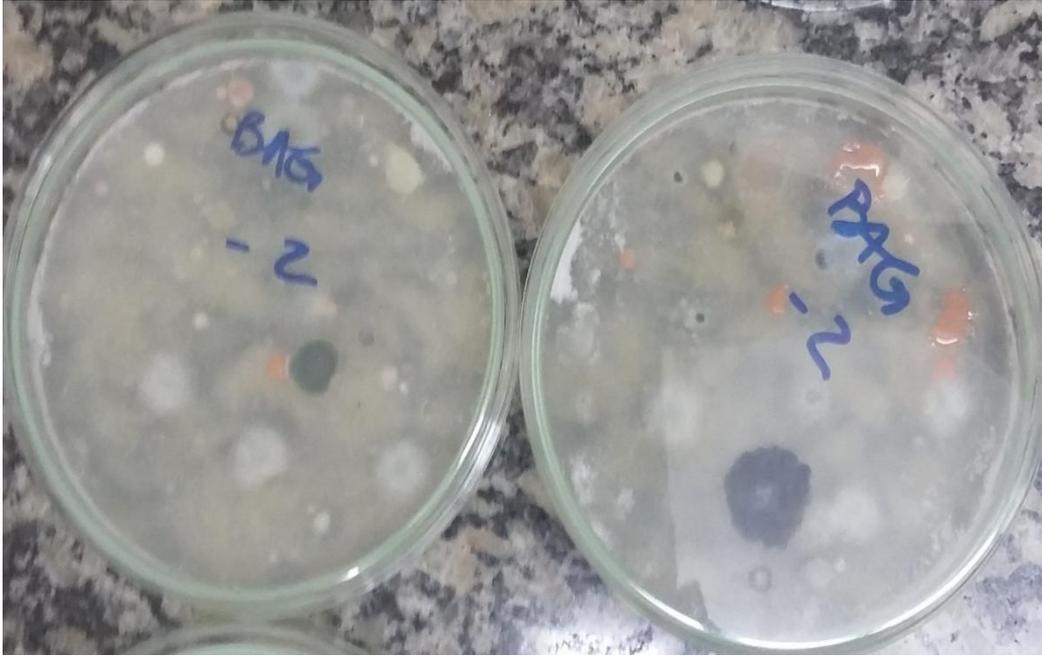


Figura 18- Resultado das placas contendo só o bagaço de cana-de-açúcar na diluição 10^{-2}



Figura 19 - Resultado das placas contendo só o bagaço de cana-de- açúcar na diluição 10^{-3}



Figura 20 - Resultados da placa contendo o Tween 80.

Nas placas contendo apenas o bagaço e a solução de tween 80, (figuras 17, 18, 19 e 20) verificou-se um grande crescimento de colônias fúngicas, indicando que a solução de tween 80 não apresenta atividade antifúngica.

As figuras 21, 22, 23, 24 25 e 26 representam as placas referente ao bagaço de cana-de-açúcar com a solução 4% e 6% do óleo essencial.

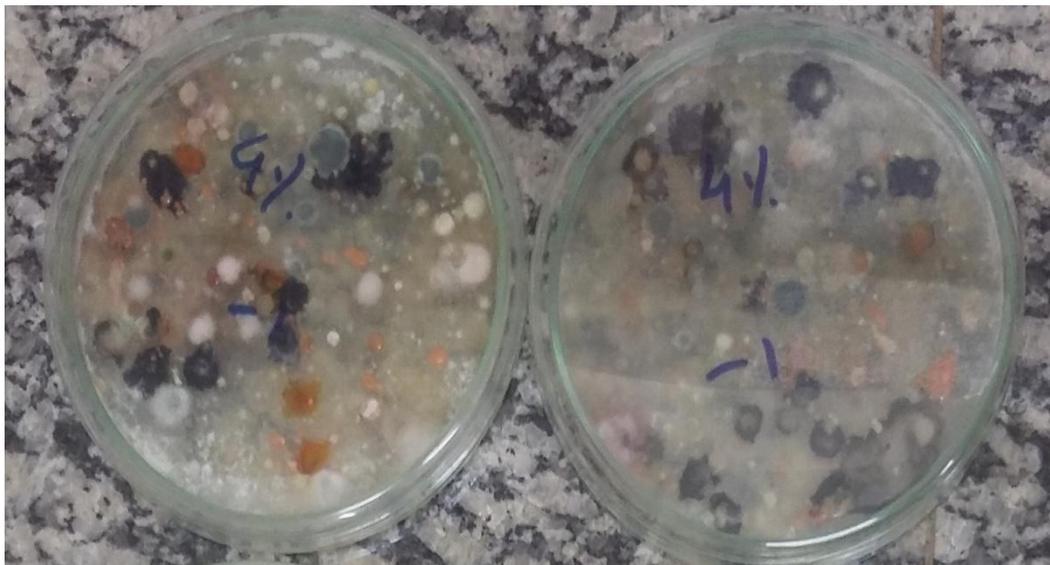


Figura 21- Resultados das placas contendo a solução 4% na diluição 10^{-1}

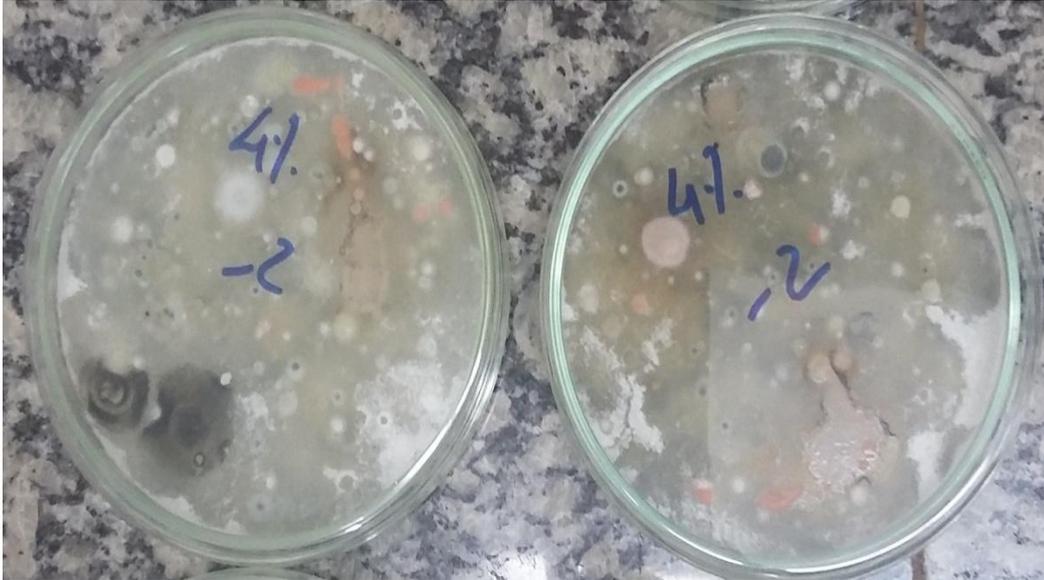


Figura 22 - Resultados das placas contendo a solução 4% na diluição 10^{-2}

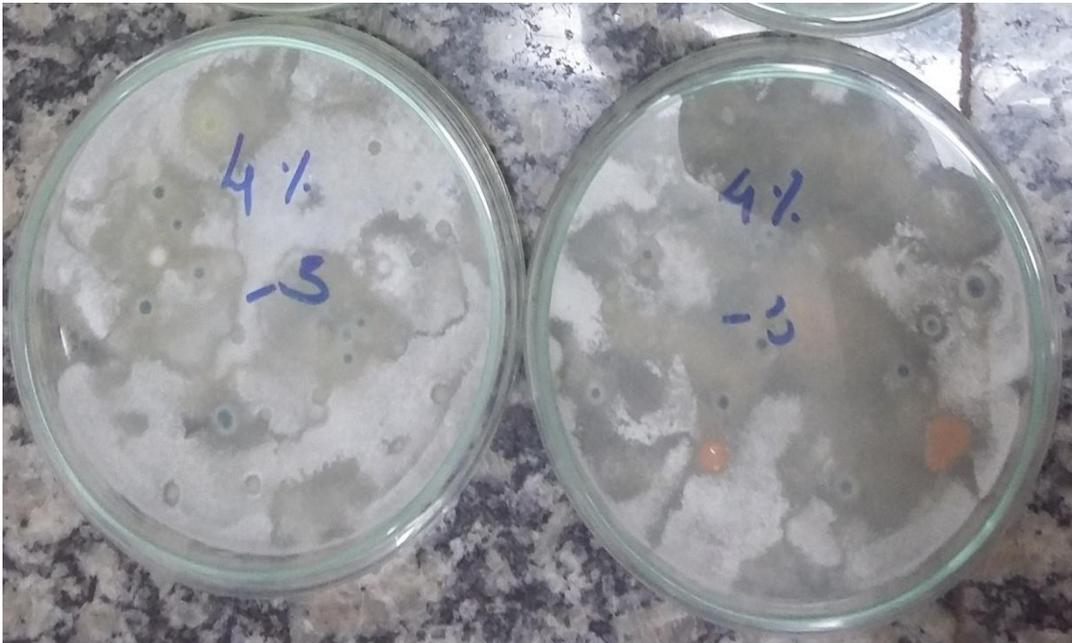


Figura 23 - Resultados das placas contendo a solução 4% na diluição 10^{-3}

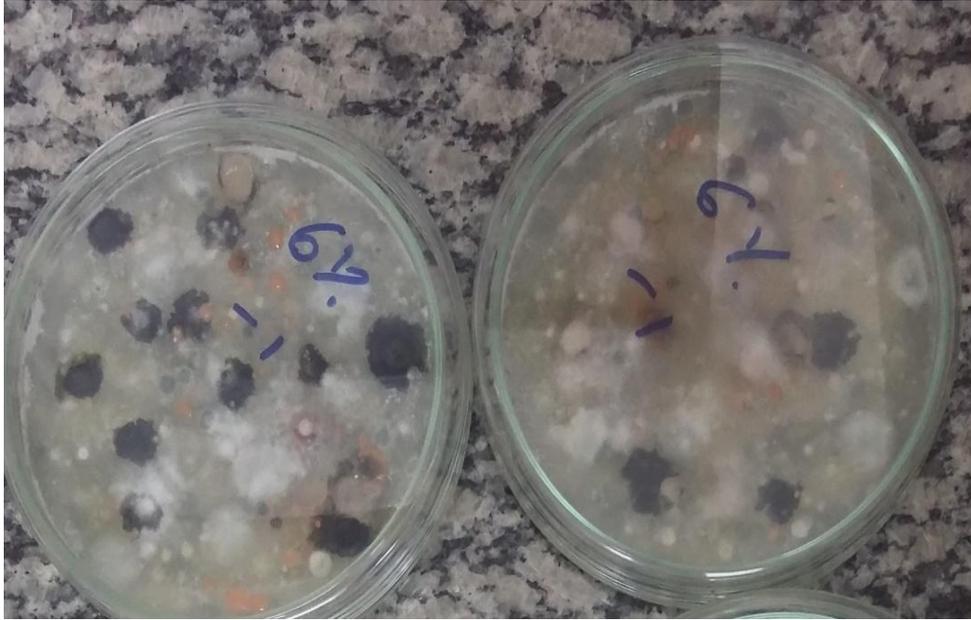


Figura 24 - Resultados das placas contendo a solução 6% na diluição 10⁻¹

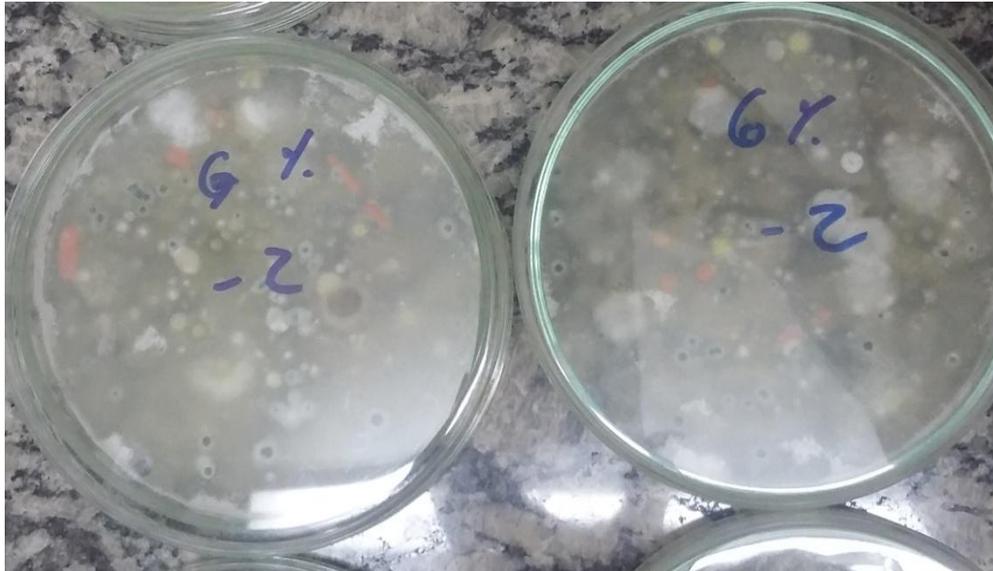


Figura 25- Resultados das placas contendo a solução 6% na diluição 10⁻²



Figura 26 - Resultados das placas contendo a solução 6% na diluição 10^{-3}

Os resultados obtidos indicam que nas concentrações de óleo essencial utilizadas (4% e 6%) e nas diluições empregadas, não foi possível realizar a contagem de bolores e leveduras, devido ao alto crescimento de colônias. Estes resultados indicaram a necessidade da repetição do experimento em maiores diluições, 10^{-5} até 10^{-6} para o bagaço, 10^{-4} até 10^{-7} para o bagaço tratado. Foram obtidos melhores resultados nas diluições 10^{-5} a 10^{-6} do bagaço tratado, cujo estes, estão apresentados nas figuras, 27, 28, 29, 30, 31 e 32.

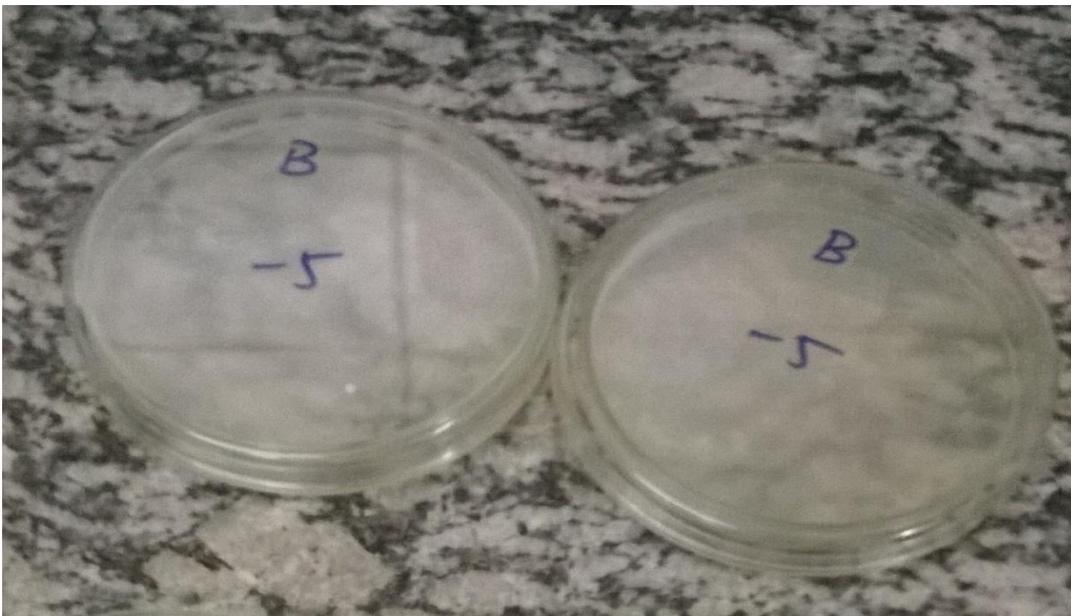


Figura 27- Resultado das placas contendo só o bagaço de cana-de-açúcar na diluição 10^{-5}

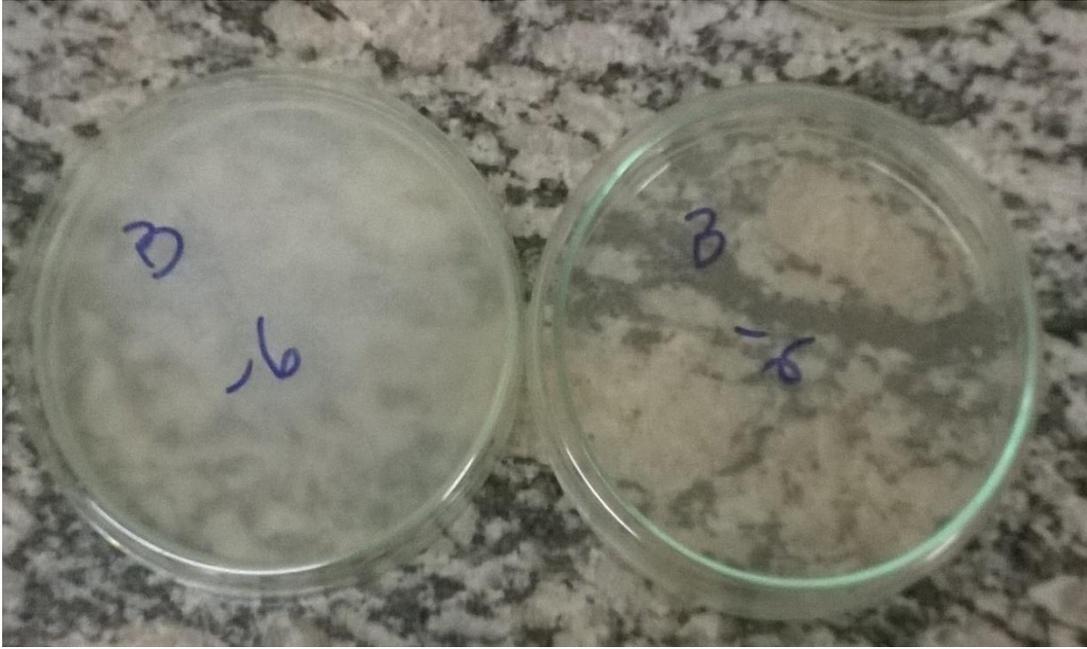


Figura 28 - Resultado das placas contendo só o bagaço de cana-de-açúcar na diluição 10^{-6}



Figura 29 - Resultados das placas contendo a solução 6% na diluição 10^{-5}

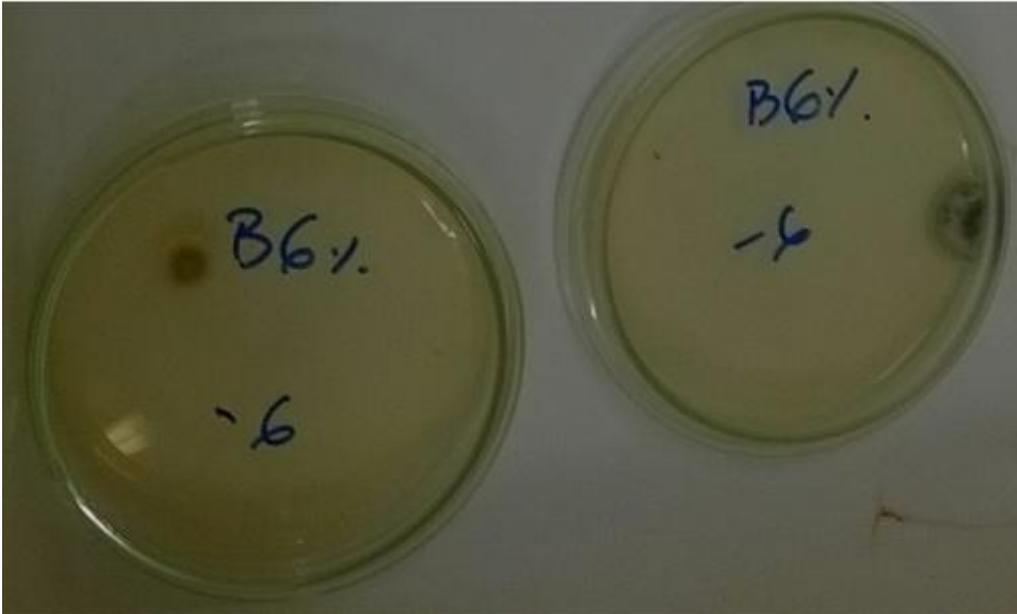


Figura 30 - Resultados das placas contendo a solução 6% na diluição 10^{-6}

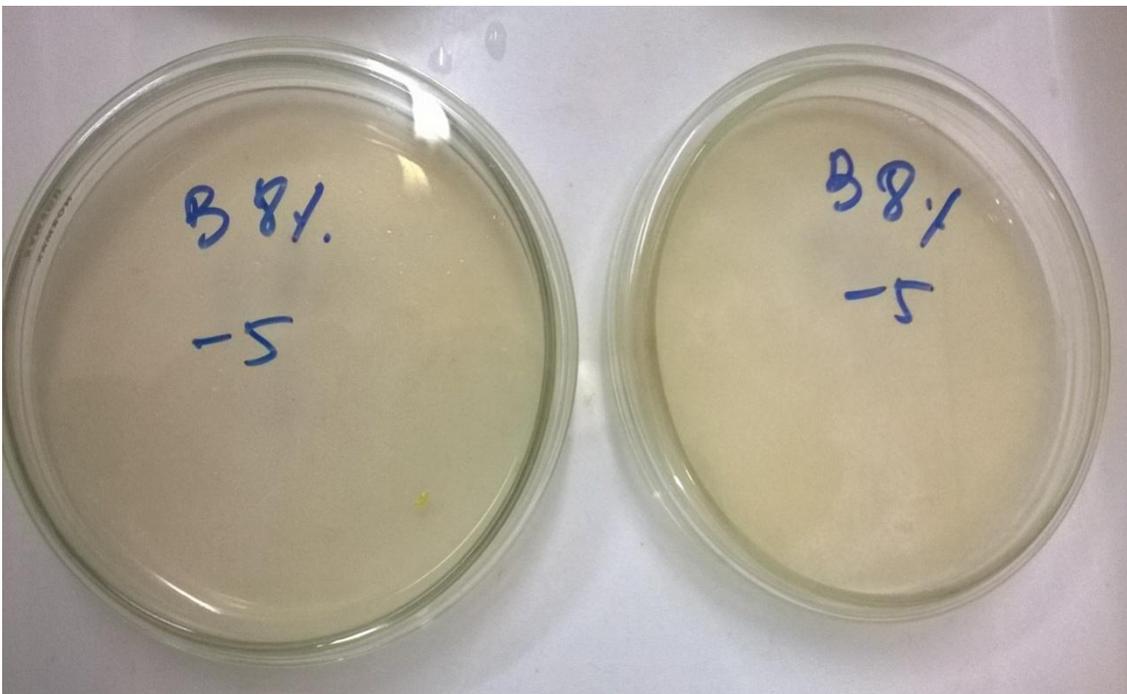


Figura 31 - Resultado das placas contendo a solução 8% do óleo essencial na diluição 10^{-5}

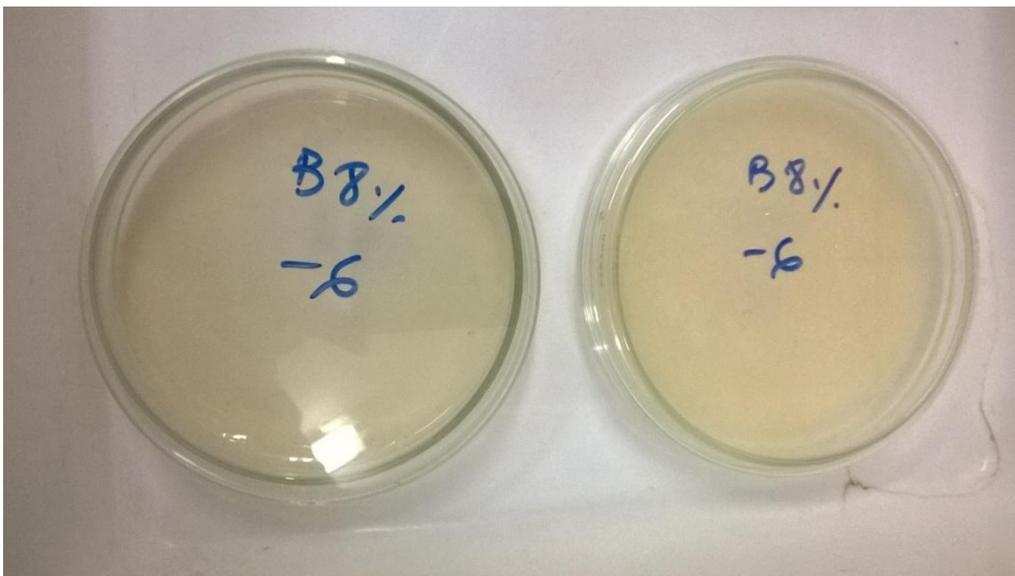


Figura 32- Resultado das placas contendo a solução 8% do óleo essencial na diluição 10^{-6}

Os resultados obtidos mostram que para a quantidade empregada do bagaço de cana-de-açúcar, as soluções 4% e 6% do óleo essencial de *Ruta graveolens* não mostraram eficiência antifúngica esperada, mesmo procedendo a maiores diluições (10^{-5} , 10^{-6}) a fim de facilitar a contagem total de bolores e leveduras em relação à concentração anterior, observou-se que houve inibição, mas não reprodutibilidade. Isto sugere um novo estudo, utilizando uma quantidade menor do bagaço de cana-de-açúcar com as mesmas diluições proposta para este trabalho.

Em comparação à estudos realizados para verificação da atividade antifúngica do óleo essencial de arruda, Orlanda (2011), verificou que para inibir o crescimento de *Sacchromyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatos* e *Aspergillus níger*, é necessário uma concentração mínima de 4% (v/v) de óleo essencial de arruda. Os fungos testes foram cultivados em placas de Petri, contendo ágar Sabouraud.

Santos et al (2008) em seu estudo sobre avaliação da atividade antifúngica de alguns composto recomendados para o tratamento de cama de aviário, realizou a pesquisa com três antifúngicos: composto A - constituído de ácido propiônico a 38%, ácido fórmico a 34% e hidróxido de amônia a 32%; composto B – constituído de cloreto de dodecil dimetil amônio e cloreto de alquil dimetil; e composto C –

constituído de ácido sulfúrico a 46%, incorporado em argila. O autor concluiu que o composto (A) apresenta eficácia elevada no controle de fungo podendo ser usado para o tratamento de cama de aviário.

Esse estudo foi realizado com compostos químicos que apresentam uma maior eficácia em relação ao um composto natural, no caso o óleo essencial de arruda.

9. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que para a quantidade empregada do bagaço de cana-de-açúcar, as soluções 4% e 6% do óleo essencial de *Ruta graveolens* não mostraram eficiência antifúngica esperada, mesmo procedendo a maiores diluições (10^{-5} , 10^{-6}) a fim de facilitar a contagem total de bolores e leveduras em relação à concentração anterior, observou-se que houve inibição, mas não reprodutibilidade. Isto sugere um novo estudo, utilizando uma quantidade menor do bagaço de cana-de-açúcar com as mesmas diluições proposta para este trabalho.

10. REFERÊNCIAS

BELTRAME, Jeovandro Maria; LOBO Viviane da Silva; DOTTO, Flavia; MARQUES, Karin Becker; ANGNES, Ricardo Almir. Estudo de Obtenção de óleos essenciais e fatores de influência em sua composição, In :II Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica.Paraná. **Anais do II ENDICT**. Outubro , 2010, p.31-35.

BIZZO, Humberto R.; HOVELL, Ana Maria C.; REZENDE, Claudia M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**. V. 32, nº. 3, 2009, p. 588-594.

BRATTI, Fabio Cesar; **Uso da Cama de Aviário como Fertilizante Orgânico na Produção de Aveia Preta e Milho**, 2013. 66p. Mestrado- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013.

CARVALHO, Luísa Isabel Correi. **Aspergillus e Aspegilose – Desafios no Combate da doença**. 2013 43p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Fernando Pessoa Porto, 2013.

CARVALHO, Thayla Morandi Ridolfi de; MOURA, Daniella Jorge de; SOUZA, Zigomar Menezes de; SOUZA, Gustavo Soares de; BUENO, Leda Gobbo de Freitas. Qualidade da cama e do ar em diferentes condições de alojamento de frangos de corte. **Revista Pesquisa Agropec. Bras.**, V. 46, nº.4, abril, 2011, p.351-361.

CASTRO, Fabiane Lucy Ferreira. **Interação entre fungos toxigenico (Aspergillus flavus e Fusarium Verticilliodes) e caruncho (Sitophilus zeamais) em amostras de grãos de milho**. Tese (Doutorado)- Instituto de ciências Biomedias - Universidade de São Paulo, 2011.

CAVAGLIER, Maria Cristina dos Santos. **Plantas Mediciniais Na Educação De Jovens E Adultos: Uma Proposta Interdisciplinar Para Biologia E Química**. 2011. 98p. Dissertação (Pós-Graduação)- Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. Nilópolis, Rio de Janeiro, 2011.

CAVALCANTI, Yuri Wanderley; ALMEIDA, Leopoldina de Fátima Dantas de; PADILHA, Wílton Wilney Nascimento . Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre cepas de cândida. **Revista Odontologia Clínico-Científica (online)**. V.10 ,n.3, 2011, p.243-246.

CLEMENTINA, Carla Marli. **A Importância Do Ensino Da Química No Cotidiano Dos Alunos Do Colégio Estadual São Carlos Do Ivaí De São Carlos Do Ivaí-Pr.** 2011. 49p. Monografia (Licenciado em Química) - Faculdade Integrada da Grande Fortaleza – FGF. São Carlos do Ivaí-PR, 2011.

CORREIA, Paulo R.M; DAZZANI, Melissa; MARCONDES, Maria Eunice R.; TORRES, Bayardo B. A Bioquímica como ferramenta interdisciplinar: Vencendo o Desafio da Integração de conteúdos No Ensino Médio. **Revista Química Nova na Escola**, nº. 19, Maio, p.19-23 2004.

FISCHER Paula Francinel; SOUZA, Manaina de ; BERSELLI, Michele. Aspergilose Aviária – Revisão Bibliográfica In: VII Seminário Interinstitucional de ensino, pesquisa e extensão. 2012, Rio Grande do Sul. **Anais do VII Seminário Interinstitucional de ensino, pesquisa e extensão.** Novembro, 2012, p.1-4.

GARCIA, Rodrigo Garófallo; PAZ, Ibiara Correia de Lima Almeida; CALDARA, Fabiana Ribeiro; NAAZ, Irenilza de Alencar; FREITAS, Leonardo Willian; BORILLE, Rodrigo; ROYER, Ana Flávia Basso; SANTANA, Mayara Rodrigues de. Alternativas para a composição de cama de frango. **Revista Agrarian.** V.6, nº.19, 2013, p.81-89.

GODINHO, Grazielle Cristina. **Atividade Antibacteriana do Óleo essencial do Manjeriço**, 2012, 78p, Trabalho de Conclusão de Curso, Fundação Educacional do Município de Assis FEMA/Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis - IMESA.

GONÇALEZ Edlayne; Silva Lara da; REIS, Tatiana Alves dos; NAKAI, Viviane Kobushi; FELICIO, Joana D’Arc; CORRÊA, Benedito. Produção de Aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isolados de amendoim. **Revista Arq.Ins Biol**, v. 80, nº. 3, ago. 2013, p.312-317.

JONES, Kenneth C; GAUDIN, Anthony J. **Introdução a Biologia**, 3ª ed Tradução de A. Xavier da Cunha. Lisboa . Editora Fundação calouste Gulbenkian, 2000.

LASZLO, Fabian. **Óleo Essencial de Arruda (Ruta Graveolens) : Muito mais do que só um óleo para mau olhado.** 2013. Disponível em: <<http://laszlo.ind.br/campanhas/OLEO-DE-ARRUDA-LASZLO.pdf>>. Acesso em: 25 fev. de 2015.

LIMA, Rodrigo Gallotti. Identificação dos compostos da arruda através de cromatografia e uso do amostrador Headspace. **Revista Eletrônica Científica do IFBA**, Ano. 4, nº.4, janeiro-julho, 2013, p.100-109.

LIMA, Igara de Oliveira; OLIVEIRA, Rinalda de Araújo Guerra.; LIMA, Edeltrudes de Oliveira; FARIAS, Nilma Maria Porto; SOUZA, Evandro Leite de. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, V. 16, nº 2, 2006, p.197-201.

MACHADO, Paula Marcelly Alves. **A química da criação de perfumes: uma abordagem educativa. 2011. 69p.** Tese de conclusão de curso – Instituto de química – Universidade de Brasília. Brasília, Distrito Federal, 2011.

MAIA, Tatiana Faria; DONATO, Alexandre de; FRAGA; Marcelo Elias. Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais de Plantas, **Revista Brasileira de produtos Agroindustriais**, V. 17, nº 1, p. 105-116, 2015.

MAIA, Leonor C; JUNIOR, Anibal A. de Carvalho. Introdução: Os Fungos do Brasil. **Revista Scielo Livros**, 2010, p. 43-48.

OLIVEIRA, Luciana Gonçalves de. **Caracterização quanto a fatores de patogenicidade de fungos filamentosos isolados de praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes PE.** 2005. 52p. Dissertação (Pós-Graduação) – Centro de Ciências Biológicas Departamento de Micologia – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

OLIVEIRA, Rafael Lopes e. **Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos de *Piper hispidum*.** 2010. 82p. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus – AM. 2010.

ORLANDA, José Fábio França; **Estudo da composição química e atividade biológica do óleo essencial de *Ruta graveolens* Linneau (*Rutaceae*)** 2011. 122p. Tese de doutorado- -Centro de Ciências exatas e da Natureza- Universidade Federal da Paraíba (Programa de pós-graduação em química), 2011.

PEREIRA, Carolina de Queiroz Moreira. **Identificação de espécies de fungos causadores de onicomicose em idosos institucionalizados no município de São Bernardo do Campo.** 2012. 71p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

PEREIRA, Maria Lucia Gomes; CARVALHO, Eliana Pinheiro; PRADO, Guilherme. Crescimento e Produção de Aflatoxinas Por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Revista B.CEPPA**, v. 20, nº. 1, jan./jun. 2002, p.142-156.

PINHEIRO, Maria dos Reis. **Estudo de Variabilidade Genética de *Aspergillus flavus* como Base para o desenvolvimento de PCR multiples para Detecção de fungos produtores de aflatoxinas em castanha – do - Brasil e castanha de caju.** 2004. 149p. Dissertação (Pós-Graduação) – Universidade Católica de Brasília – UCB. Brasília, 2004.

PONTES, Altem Nascimento; SERRÃO, Caio Renan Goes; FREITAS, Cíntya Kércya Araújo de; SANTOS, Diellem Cristina Paiva dos; BATALHA, Sarah Suely Alves. O Ensino de Química no Nível Médio: Um Olhar a Respeito da Motivação. In: XIV ENCONTRO NACIONAL DE ENSINO DE QUÍMICA (XIV ENEQ). 2008. Curitiba PR. **Anais do XIV Encontro Nacional de Ensino de Química (XIV ENEQ)**, 2008. 10p.

PROBST, Isabella da Silva. **ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E AVALIAÇÃO DE POTENCIAL SINÉRGICO.** 2012. 112 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Botucatu, 2012.

REIS, Gabriela Martins. **Variabilidade Genética de Cepas de *Aspergillus flavus* Isolados de amendoim.** 2009. 41p. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

REIS, H.P.O; RODRIGUES, E.A.; LEITÃO, R. A. Avaliação de Diferentes Tipos de Cama na Criação de Frangos de Corte. In: II SEMINÁRIO INICIAÇÃO CIENTÍFICA–IFTM, 2009 Campus Uberaba, MG. **Anais do II Seminário Iniciação Científica.** Outubro de 2009. 3p.

RIBEIRO, Evandro Leão. Fungos na Biodeterioração de livros em ambientes bibliotecários nos últimos 35 anos (1977 – 2012). **Revista Brasileira de Biblioteconomia e Documentação**, v. 9, nº. 1, jan./dez, 2013, p.17-27.

RITTER, Ana Carolina. **Potencial toxigenico de *Aspergillus flavus* testado em diferentes meios e condições.** 2007. 63p. Dissertação (Mestrado)- Bióloga-URI- dissertação (mestrado). Porto alegre RS Brasil 2007. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente- Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 2007.

SANTOS, Bernadete Miranda dos; MARÍN, Sandra Yuliet Gómez; PENA, Lindomar José; PEREIRA, Claiton Gonçalves; MOREIRA, Huedy Flávio Vasconcelos. Avaliação da atividade antifúngica de alguns compostos recomendados para o tratamento de cama de aviário. **Revista Ceres**. Set/Out, 2008 p.365-368.

SANTOS, L. M.; SENS, R. C. V.; DIAS, J. F. G.; BALESTRIM, L; KALEGARI, M; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Avaliação da atividade alelopática de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) na germinação e crescimento de sementes de *Lactuca sativa* cv. Babá. **Revista Visão Acadêmica**, Curitiba, V.10, nº.1, Jan.-Jun./2009 - ISSN 1518-5192.

SANTOS, Marcos José Batista dos; SAMAY, Alcilene Maria Andrade Tavares; SILVA, Demóstenes Arabutan Travasso; RABELLO, Carlos Bôa-Viagem; TORRES, Thaysa Rodrigues; SANTOS, Priscila Antão do; CAMELO, Luiz Carlos Lemos. Manejo e Tratamento de Cama Durante a Criação de Aves, **Revista Eletrônica Nutritime**. V. 9, nº. 3, Maio/Junho, 2012, p.1801-1815.

SILVA, Ricardo Ribeiro da; COELHO, Glauciane Danuza. **Fungos, Principais Grupos e Aplicações Biotecnológicas**. 2006. 20p. Doutorado – Programa de Pós – Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. – Instituto de Botânica. São Paulo, São Paulo 2006.

SILVA, Francisca Gleiciane Eloi da; MENDES, Francisco Rogênio da; CAVALCANTE, Fábio Lima; BARBOSA, Francisco Geraldo; ASSUNÇÃO, João Carlos da Costa; Composição Química e Atividade Nematicida do óleo Essencial de *Ruta Graveolens* (Arruda). In: V Congresso Norte-Nordetes de Pesquisa e Inovação. CONGRESSO, 5, 2010. Maceió-Alagoas. **Anais do V Congresso Norte-Nordeste de Pesquisa e Inovação**. Maceió. 2010, 5p.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; MELLO, João Carlos Palazzo de; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 2ª ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2000.

SOUZA, Janaina de; ROSA, Michele L. S; POSSENTI, Cecilia G. R; DIAZ, Jorge Damián Stumpfs. **Ensaio na utilização de Arruda (*Ruta graveolens* L.) em piolhos de búfalos (*Haemaphysalis tuberculatus*)**. In: Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 16, 2011, Cruz Alta. Outubro de 2011, p 1-5.

TRANCOSO, Marcelo Delena. Projeto Óleos Essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano, **Revista Práxis**, ano V, nº 9, 2013, p. 90-96.

TEIXEIRA, Adriely Suzian; GOMES, Alex Rodrigues; OLIVEIRA, Maria Cristina de; MENEZES, June Faria Scherrer; GONÇALVES, Bruno Nunes; GOUBEIA, Bruno Matias. Características de Camas de Frango Compostas por Bagaço de Cana e/ou Maravalha. In: I CONGRESSO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO DO CÂMPUS RIO VERDE DO IFGOIANO. 2012. **Anais do I Congresso de Pesquisa e Pós-Graduação do Câmpus Rio Verde IFGoiano**. 06 e 07 de novembro de 2012.

TORIANI, Ana Lúcia Trinquinato ; OLIVEIRA, Lourenço de . **Ruta graveolens L.(arruda). O conhecimento e suas particularidades**. 2006. 70p. Dissertação (Pós Graduação)-Curso de especialização em Fitoterapia-Faculdades Integradas "Espirita", Curitiba, 2006.

VALENTE, Joana Rita dos Santos. **Estudo molecular de estirpes de *Aspergillus fumigatus* isolados em aviários e em aves diagnosticada com aspergilose. Possíveis implicações na Saúde Pública**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências e Tecnologia , Universidade Nova de Lisboa. 2014.

VENTUROSOSO, Luciano dos Reis; BACCHI, Lilian Maria Arruda; GAVASSONI, Walber Luiz; CONUS, Lenita Aparecida; PONTIM, Bruno Cesar Alvaro; BERGAMIN, Anderson Cristian. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, V.37, nº.1, 2011 p.18-23.

VIRTUOSO, Marcos Cláudio da Silva; OLIVEIRA, Danielli Gonçalves de; DIAS, Lays Nathany de Siqueir; FAGUNDES, Pedro Sérgio de Freitas; LEITE, Paulo Ricardo de Sá da Costa, Reutilização da Cama e Frango, **Revista Eletrônica Nutritime**, V. 12, nº. 2, Março/Abril, 2015, p. 3964– 3979.

YAMASHITA, O.M.; FERNANDES NETO, E.; CAMPOS, O.R.; GUIMARÃES, S.C. Fatores que afetam a germinação de sementes e emergência de plântulas de arruda (*Ruta graveolens* L.) **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, V.11, nº. 2, 2009, p. 202-208