

Teresa Cristina Castilho Gorayeb

**APLICAÇÃO DE BIOFUNGICIDAS NO CONTROLE DO FUNGO**  
***Aspergillus flavus* L. EM AMENDOIM (*Arachis hypogaea*)**

São José do Rio Preto  
2015

Teresa Cristina Castilho Gorayeb

**APLICAÇÃO DE BIOFUNGICIDAS NO CONTROLE DO FUNGO**  
***Aspergillus flavus* L. EM AMENDOIM (*Arachis hypogaea*)**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor junto ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciências e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> João Cláudio Thoméo

São José do Rio Preto  
2015

Gorayeb, Teresa Cristina Castilho.

Aplicação de biofungicidas no controle do fungo *Aspergillus flavus* L. em amendoim (*Arachis hypogaea*) / Teresa Cristina Castilho Gorayeb. -- São José do Rio Preto, 2015  
200 f. : il., tabs.

Orientador: João Cláudio Thoméo

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Fungos – Controle biológico.  
3. Fungicidas. 4. Amendoim – Doenças e pragas – Controle.  
5. *Aspergillus flavus*. 6. Aflatoxinas. 7. Secagem de alimentos.  
I. Thoméo, João Cláudio. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.  
III. Título.

CDU – 664

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Teresa Cristina Castilho Gorayeb

## **APLICAÇÃO DE BIOFUNGICIDAS NO CONTROLE DO FUNGO**

### ***Aspergillus flavus* L. EM AMENDOIM (*Arachis hypogaea*)**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor junto ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciências e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

#### Comissão Examinadora

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. João Cláudio Thoméo  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Vanildo Luiz Del Bianchi  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Aparecida de Oliveira Tiera  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cecilia Cristina Marques dos Santos  
IAL – Instituto Adolfo Lutz – São José do Rio Preto.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danila Comelis Bertolin  
FATEC RIO PRETO – São José do Rio Preto.

São José do Rio Preto, 05 de maio de 2015.

## **DEDICO ESTE TRABALHO**

*Ao meu esposo Miguel, meus filhos Maurício e João Miguel pelo amor incondicional, apoio em todos os momentos da minha vida e compreensão em cada instante durante a elaboração deste trabalho.*

*Aos meus pais João e Lúcia, por me darem a vida e o exemplo para seguir em frente nos meus sonhos com a força, amor e carinho.*

*Aos meus familiares, pelo apoio, incentivando-me a cada instante na conquista deste projeto.*

*E a todos amigos, pelo estímulo em continuar, acreditando que com paciência e carinho tudo é possível.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela força e direcionamento concedidos a mim para a preparação do projeto de Doutorado, execução e finalização deste trabalho.

Agradeço a minha querida Tia Thereza Passafaro Gonzales pelo modelo de pesquisadora em alimentos e a todo o seu incentivo para que esudasse engenheira de alimentos durante a minha vida.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. João Cláudio Thoméo pela confiança, oportunidades e ensinamentos durante a orientação deste trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Cecilia Cristina Marques dos Santos, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Vera Aparecida de Oliveira Tiera, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Danila Comelis Bertolin, Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup>. Crispin Humberto Garcia Cruz, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Raquel Guttierres Gomes e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Regina Generoso pela atenção, compreensão, apoio, orientação, incentivo e a gentileza de aceitar fazerem parte da comissão examinadora deste trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Maurício Boscolo e a Daniela pela orientação e auxílio nas análises cromatográficas desta tese.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Waldir Barros Fernandes Junior pela confiança, pelo apoio, incentivo e especialmente pela amizade em todos os momentos deste trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Adriano Luis Simonato pela orientação, ajuda, companheirismo durante todos os momentos deste trabalho.

À Rosemar e a todos da seção de técnica da pós graduação pelo apoio, carinho e auxílio com a documentação deste trabalho.

À Luciane pelo carinho, apoio e atenção ao me orientar as técnicas de formatação deste trabalho.

Ao Eng<sup>o</sup> Paulo Umberto Henn, a Eng<sup>a</sup> Talita Cristina Reich e a todos da Cooperativa dos Plantadores da Zona de Guariba – COPLANA, meu muito obrigado pelo apoio, incentivo, pelas amostras fornecidas para a parte experimental, pela oportunidade de acompanhar o processo de colheita e beneficiamento do amendoim e especialmente pela amizade em todos os momentos deste trabalho.

A Eng<sup>a</sup> Sandra Alexandre Maturana e a todos da empresa SIAMAR INDÚSTRIA ALIMENTICIA LTDA., muito obrigado pelas plantas gentilmente cedidas para este trabalho e por todo apoio.

Aos professores, aos técnicos Luiz Carlos Camolezi, Ginaldo Vieira Santos, João Jesuino e funcionários do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos – DETA, da UNESP de São José do Rio Preto – SP, pela atenção e carinho que me receberam e apoiaram na parte experimental e principalmente pela amizade.

A minha companheira de luta, aluna e amiga Giulliana pelo apoio, carinho, atenção, dedicação e principalmente ajuda no dia a dia deste trabalho.

A minhas estagiárias e amigas Yara, Juliana, Fabiana e Letícia pelo apoio, amizade, dedicação e carinho em todos os momentos da elaboração dos trabalhos realizados desta pesquisa.

Aos amigos do laboratório Eduardo, Lina, Viviane, Carolina, Isabela, Érica, Fabrício, Isabela Lopes, Fernanda, Priscila Leandra, Márcia, Mariana, Catileli, Renata e Camila pelo apoio, incentivo e especialmente pela amizade em todos os momentos deste trabalho.

A todos os professores, funcionários e amigos da FATEC RIO PRETO, pelo apoio e atenção dedicado durante todo o tempo deste trabalho, não medindo os esforços em meu auxílio.

***A TODOS, A MINHA ETERNA GRATIDÃO!***

---

*Teresa Cristina Castilho Gorayeb*

*Posso, tudo posso Naquele que me fortalece  
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir ...  
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou  
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar  
Vou persistir, continuar a esperar e crer...  
Vou cantando minha história, profetizando  
Que eu posso, tudo posso... em Jesus!*

**(Celina Borges)**



## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a viabilidade técnica da aplicação de biofungicidas extraídos de plantas no processamento de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), de modo a reduzir a infestação pelo fungo *Aspergillus flavus* L. e possível contaminação por aflatoxina. Foi realizado na primeira etapa o estudo da contaminação fúngica e de aflatoxina, nas Safras 2011/12, 2012/13 e 2013/14, nas etapas da colheita e pós-colheita das vagens de amendoim *Runner* IAC 886 na região de Jaboticabal – SP, e a proposta da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Os resultados da umidade das vagens mostraram uma redução, em média, de 65,65% base seca (b.s.) no arranquio, para 7,17% b.s. no armazenamento. A contaminação fúngica foi maior na Safra 2013/2014 e os índices de aflatoxinas estavam abaixo do exigido pela legislação vigente. O plano APPCC apresentou os pontos de controle (PC) nas etapas do arranquio, secagem ao sol, colheita mecânica e transportes; e os Pontos Críticos de Controle (PCC), nas etapas de recepção, secagem e armazenamento, concluindo-se que a melhor etapa para a aplicação do biofungicida é antes da secagem artificial. A segunda parte consistiu na obtenção de biofungicidas nas formas de extratos (aquoso e alcoólico) e de óleo essencial das plantas: canela (*Cinnamomum zeylanicum*), cravo (*Syzygium aromaticum*), cidreira (*Cymbopogon citratus*), oregano (*Origanum vulgare*) e manjerição (*Ocimum basilicum*), e na avaliação destes quanto à inibição do fungo *Aspergillus flavus* L. e síntese de aflatoxina. A eficiência de inibição dos biofungicidas sobre o *Aspergillus flavus* L. foi avaliada em meio Agar Dextrose Batata (BDA), pela técnica de inibição do crescimento micelial (ICM), concentração inibitória mínima (CIM) e por aplicações dos óleos mais eficientes nas vagens de amendoim contaminadas e armazenadas em umidades e temperaturas controladas do ambiente, determinando-se unidade formadora de colônias (UFC.g<sup>-1</sup>) e aflatoxinas. Os resultados das ICM dos extratos mostraram que não ocorreu inibição satisfatória. Para os óleos essenciais, a ICM foi de 100 % para os óleos de canela a 250 µg.mL<sup>-1</sup>. Na CIM, a total inibição ocorreu em concentração de 250 µg.mL<sup>-1</sup> para os óleos de canela e cravo. A melhor

inibição do *Aspergillus flavus* e das aflatoxinas nas vagens ocorreu com o óleo de canela, em concentração de 250 mg.mL<sup>-1</sup>. Na terceira etapa, foi aplicado o óleo de canela nas vagens de amendoim com contaminação de origem; essas foram secas em monocamada e camada espessa a 40 °C, em secador de leito fixo, e armazenadas em umidade e temperatura do ambiente controladas. A cada período, avaliaram-se as inibições fúngicas e de aflatoxinas. No armazenamento de 30 dias, as inibições da contaminação fúngica diminuíram nas concentrações de 50 e 250 mg.mL<sup>-1</sup>; a aflatoxina total não foi detectada nas vagens com o óleo na umidade do ambiente de 75,3%. Nos resultados obtidos das inibições nas vagens armazenadas após a secagem em camada espessa na ausência do óleo de canela, a contaminação fúngicas se manteve alta, assim como a de aflatoxina, porém não foram detectadas contaminações fúngicas e de aflatoxina nas vagens com o óleo em 30 dias; em 60 dias, houve contaminação somente no ambiente com umidade de 90,3%. Concluiu-se que o óleo essencial de canela apresentou resultado esperado no controle do *Aspergillus flavus* L. em meio de cultura, e mostrou-se eficiente nas aplicações em vagens de amendoim com *A. flavus* e com a microbiota de origem; porém, em concentração muito alta, a um custo elevado e causando um odor forte. Concluiu-se que os estudos realizados em meio de cultura não podem ser considerados como referenciais para a aplicação dos biofungicidas, sugerindo-se mais pesquisas na inibição da microbiota de origem. Concluiu-se também que, com a aplicação das Boas Práticas Agrícolas (BPA), do APPCC e de novas tecnologias, em toda a cadeia produtiva, é possível minimizar o perigo químico causado por aflatoxinas e alcançar melhoria da segurança alimentar do amendoim.

**Palavras - chave:** Amendoim (*Arachis hypogaea* L.); aflatoxina; crescimento fúngico; biofungicidas; secagem; APPCC.

## **ABSTRACT**

This study aims to evaluate the technical feasibility of the application of biofungicides extracted from plants in the processing of peanut (*Arachis hypogaea* L.), with the objective of reducing infestation by fungus *Aspergillus flavus* L., and consequent contamination by aflatoxin, a chemical hazard. Firstly, we studied the fungal and aflatoxin contamination for the 2011/12, 2012/13, and 2013/14 crops, during the *Runner* IAC 886 peanut pods' harvesting and post-harvesting stages, in the region of Jaboticabal, Sao Paulo, Brazil, and proposed the Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP). The results of the pods' humidity showed a decrease, on average, of 65.65% d.b. on uprooting, to 7.17% d.b. on storage, and the fungal contamination was higher for 2013/2014 crops; the aflatoxin levels were below the required by current legislation. HACCP showed the control points (CP) during uprooting, sun drying, mechanical harvesting, and transportation; and the PCCs during stages of reception, drying, and storage proved the best stage for biofungicide application is before artificial drying. The second stage consisted of obtaining biofungicides as aqueous, alcoholic, and essential oil extracts from the plants: cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), cloves (*Syzygium aromaticum*), lemon grass (*Cymbopogon citratus*), oregano (*Origanum vulgare*), and basil (*Ocimum basilicum*); then, we evaluated those in inhibiting the fungus *Aspergillus flavus* L. and synthesizing aflatoxin. The biofungicides' inhibiting efficiency on *Aspergillus flavus* L. was evaluated in Potato Dextrose Agar medium (PDA), by mycelial growth inhibition technique (MGI), by minimum inhibitory concentration (MIC), and by applying the most efficient oils on the contaminated peanut pods, stored in controlled humidity and room temperature, thus determining colony-forming units (CFU/g) and aflatoxins. The extracts' MGI results showed that there was no satisfactory inhibition. For the essential oils, the MGI was 100% for cinnamon at 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . For MIC, total inhibition happened at 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  concentration for cinnamon and cloves oils. The best inhibition of *Aspergillus flavus* and aflatoxins on the pods was obtained with cinnamon oil, at 250  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  concentration. On the third stage, we applied cinnamon oil on the peanut pods, which

were originally contaminated; these were dried in monolayer and thick layer at 40°C in fixed-bed dryer and stored at controlled humidity and room temperature. After each period, we evaluated the fungal and aflatoxins inhibitions. During the 30-day storage, the fungal contamination inhibitions decreased at concentrations of 50 and 250 mg.mL<sup>-1</sup>, the total aflatoxin was not detected on the pods with the oil at room humidity of 75.3%. As a result of the inhibition, the pods which were stored and dried in thick layer without the cinnamon oil presented high levels of both fungal and aflatoxin contamination; the pods with the oil did not present fungal or aflatoxin contamination in 30 days, and in 60 days it was detected only at room humidity of 90.3%. Therefore, the cinnamon essential oil showed efficiency in controlling *Aspergillus flavus* L. in culture medium, and also when applied to peanut pods with *A. flavus* and original microbiota. However, at a very high concentration, which generates a strong odor and a high cost. We conclude that the studies conducted in culture medium cannot be considered as reference to the application of the biofungicide; we suggest that more research should be carried out on inhibiting original microbiota. We also conclude that, with the application of Good Agricultural Practices (GAP), HACCP, and new technologies, in the entire productive chain, it is possible to minimize the chemical hazard caused by aflatoxins, and enhance food safety to what peanut is concerned.

**KEYWORDS:** Peanut (*Arachis hypogaea* L.); aflatoxin; fungal growth; biofungicides; drying; HACCP.

## **NOMENCLATURA**

|                 |  |
|-----------------|--|
| aw              | Atividade de água                        |
| B               | Perigo Biológico                         |
| b.s.            | Base seca                                |
| b.u.            | Base úmida                               |
| B <sub>1</sub>  | Aflatoxina B <sub>1</sub>                |
| B <sub>2</sub>  | Aflatoxina B <sub>2</sub>                |
| cm              | Centímetro                               |
| cm <sup>2</sup> | Centímetro quadrado                      |
| d.b.            | dry basis                                |
| Est             | Estimado                                 |
| F               | Perigo Físico                            |
| g               | Gramma                                   |
| G <sub>1</sub>  | Aflatoxina G <sub>1</sub>                |
| G <sub>2</sub>  | Aflatoxina G <sub>2</sub>                |
| h               | Hora                                     |
| há              | Hectar                                   |
| kg              | Quilograma                               |
| kGy             | Intensidade de irradiação dos raios gama |
| Km              | Quilometros                              |
| L               | Litro                                    |
| Log             | Logarítimo                               |
| m <sup>2</sup>  | Metro quadrado                           |
| m <sup>3</sup>  | Metro cúbico                             |
| Meq             | Teor de umidade de equilíbrio            |
| mg              | Miligramas                               |
| mil             | Mil unidades                             |
| mL              | Mililitro                                |

|                |                                |
|----------------|--------------------------------|
| mm             | Milímetro                      |
| n              | Número experimental            |
| ND             | Não detectado                  |
| nm             | Nanômetro                      |
| Nº             | Número                         |
| º              | Grau                           |
| º C            | Grau Celsius                   |
| pH             | Ponto de ionização de soluções |
| ppb            | Parte por bilhão               |
| Q              | Perigo Químico                 |
| R <sup>2</sup> | Coeficiente de determinação    |
| S              | Latitude                       |
| T              | Temperatura                    |
| t              | Tempo                          |
| ton            | Tonelada                       |
| UFC            | Unidade formadora de colônias  |
| UR             | Umidade Relativa               |
| v              | Volume                         |
| W              | Longitude                      |
| %              | Por cento                      |
| ‘              | Minutos                        |
| ”              | Segundos                       |
| <              | Menor                          |
| µg             | Micrograma                     |

## SUMÁRIO

|   | <i>Pág.</i> |
|---|-------------|
| RESUMO  |             |
| ABSTRACT  |             |
| NOMENCLATURA  |             |
| SUMÁRIO   |             |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL  | 21          |
| <i>Capítulo 1 Estudo da infestação fúngica e proposta de APPCC da colheita e pós-colheita de amendoim na região de Jaboticabal – SP</i> |             |
| 1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA   | 25          |
| 1.1.1 Amendoim ( <i>Arachis hypogaea</i> L.)  | 25          |
| 1.1.2 A contaminação fúngica e as aflatoxinas em amendoim   | 28          |
| 1.1.3 A segurança alimentar na cadeia produtiva do amendoim   | 32          |
| 1.2 MATERIAL E MÉTODOS  | 39          |
| 1.2.1 Materiais   | 39          |
| 1.2.1.1 Obtenção das amostras de solo e amendoim  | 39          |
| 1.2.2 Métodos   | 41          |
| 1.2.2.1 Análises das características climáticas   | 41          |
| 1.2.2.2 Obtenção das amostras do solo nas áreas   | 41          |
| 1.2.2.3 Obtenção das amostras de vagens no arranque e após a secagem ao sol   | 42          |
| 1.2.2.4 Obtenção das amostras de vagens após a colheita mecânica  | 42          |
| 1.2.2.5 Obtenção das amostras de vagens na recepção da COPLANA, por sonda mecânica  | 43          |

|          | <b>Pág.</b>   |
|----------|---|
| 1.2.2.6  | Obtenção das amostras após a secagem artificial nas<br>carretas secadoras ..... 44  |
| 1.2.2.7  | Obtenção das amostras após a secagem artificial e no<br>terceiro mês de armazenamento ..... 44                                |
| 1.2.2.8  | Análise de umidade e unidades formadoras de colônias<br>(UFC) do solo ..... 45  |
| 1.2.2.9  | Análise de umidade e unidades formadoras de colônias das<br>vagens de amendoim nas etapas da colheita e pós-colheita ..... 45 |
| 1.2.2.10 | Análise de umidade, impurezas, renda e aflatoxinas<br>realizadas na recepção da COPLANA ..... 46                              |
|          | a) Análise de umidade ..... 46  |
|          | b) Impurezas ..... 47   |
|          | c) Rendimento ..... 47  |
|          | d) Análise de aflatoxinas total ..... 47  |
| 1.2.2.11 | Elaboração do plano APPCC ..... 48  |
| 1.2.2.12 | Análises estatísticas ..... 49  |
| 1.3      | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 49  |
| 1.3.1    | Acompanhamento das informações agrometeorológicas ..... 49  |
| 1.3.2    | Umidade e infestação por fungos do solo ..... 52  |
| 1.3.3    | Umidade, aflatoxinas, impurezas e renda das vagens na<br>etapa da sonda na COPLANA ..... 54                                   |
| 1.3.4    | Umidade das vagens nas etapas desde o arranquio até o<br>armazenamento ..... 57   |
| 1.3.5    | Infestação fúngica das vagens de amendoim nas etapas<br>desde o arranquio até o armazenamento ..... 59                        |
| 1.3.6    | Plano APPCC nas etapas da colheita até o armazenamento<br>das vagens de amendoim ..... 60                                     |
| 1.3.6.1  | Fluxograma e descrição dos processos ..... 65   |
| 1.3.6.2  | Identificação dos pontos de controle e pontos críticos de<br>controle ..... 67  |
| 1.4      | CONSIDERAÇÕES ..... 68  |



|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| <b>Capítulo 2</b>  |             |
| <b><i>Ação fungitóxica de extratos e óleos essenciais de plantas sobre Aspergillus flavus L.</i></b> ..... | 69          |
| <b>2.1</b> REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 70          |
| <b>2.1.1</b> Biofungicidas extraídos de plantas .....  | 70          |
| <b>2.1.2</b> As plantas e suas ações antifúngicas .....  | 71          |
| <b>2.1.2.1</b> Canela ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> ) .....   | 71          |
| <b>2.1.2.2</b> Cravo-da-índia ( <i>Syzygium aromaticum L.</i> ) .....                                      | 72          |
| <b>2.1.2.3</b> Capim-cidreira ou Capim-limão ( <i>Cymbopogon citratus</i> ) .....                          | 74          |
| <b>2.1.2.4</b> Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ) .....   | 75          |
| <b>2.1.2.5</b> Manjeriço ou alfavaca ( <i>Ocimum basilicum</i> ) .....                                     | 76          |
| <b>2.1.3</b> O fungo <i>Aspergillus</i> sua sintetização da aflatoxina e a ação dos biofungicidas .....    | 77          |
| <b>2.2</b> MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 81          |
| <b>2.2.1</b> Materiais .....   | 82          |
| <b>2.2.1.1</b> Obtenção das amostras de plantas para as extrações .....                                    | 82          |
| <b>2.2.1.2</b> Amostras de amendoim para os ensaios de inibição do <i>Aspergillus flavus</i> .....         | 84          |
| <b>2.1.3</b> Isolado de <i>Aspergillus flavus L.</i> .....   | 84          |
| <b>2.1.4</b> Óleos essenciais comerciais e princípios ativos para os ensaios .....                         | 84          |
| <b>2.2.2</b> Métodos .....   | 85          |
| <b>2.2.2.1</b> Obtenção dos extratos e óleos essenciais das plantas .....                                  | 85          |
| a) Obtenção dos extrato aquosos (EA) .....   | 85          |
| b) Obtenção dos extratos alcoólicos (EO) .....   | 85          |
| c) Obtenção dos óleos essenciais (OE) .....  | 86          |
| <b>2.2.2.2</b> Caracterização dos extratos aquosos e alcoólicos, e dos óleos essenciais .....              | 87          |
| a) Quantificação da massa seca dos extratos aquosos e alcoólicos .....                                     | 87          |
| b) Rendimento dos extratos e óleos essenciais .....  | 87          |

**Pág.**

|                |  |     |
|----------------|--|-----|
|                | c) Determinação a concentração do composto fitoquímico majoritário dos óleos essenciais .....                                      | 88  |
| <b>2.2.2.3</b> | Inibição do crescimento micelial (ICM) do <i>Aspergillus flavus</i> .....  | 88  |
| <b>2.2.2.4</b> | Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais .....  | 90  |
| <b>2.2.2.5</b> | Inibição do crescimento fúngico em vagens de amendoim com aplicação do óleo de canela .....  | 90  |
|                | a) Avaliação da retenção de água nas vagens de amendoim .....  | 90  |
|                | b) Inibição do crescimento fúngico nas vagens irradiadas, com aplicação de suspensão de esporos de <i>Aspergillus flavus</i> ..... | 90  |
|                | c) Inibição do crescimento fúngico nas vagens com a contaminação de origem .....   | 91  |
|                | d) Análise de aflatoxina dos amendoins .....   | 93  |
| <b>2.2.2.6</b> | Análises estatísticas .....  | 94  |
| <b>2.3</b>     | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 95  |
| <b>2.3.1</b>   | Extrações aquosa, alcoólica e de óleos essenciais .....  | 95  |
| <b>2.3.1.1</b> | Extração aquosa .....  | 95  |
| <b>2.3.1.2</b> | Extração alcoólica .....   | 97  |
| <b>2.3.1.3</b> | Extração dos óleos essenciais .....  | 97  |
| <b>2.3.1.4</b> | Identificação e quantificação dos componentes majoritário dos óleos essenciais extraídos e adquiridos .....                        | 99  |
|                | a) Canela ( <i>Cinnamomun zeylanicum</i> ) .....   | 100 |
|                | b) Cravo-da-índia ( <i>Syzygium aromaticum</i> ) .....   | 102 |
|                | c) Capím-cidreira ( <i>Cymbopogon citratus</i> ) .....   | 103 |
| <b>2.3.2</b>   | Inibição do crescimento micelial (ICM) do <i>Aspergillus flavus</i> .....  | 105 |
| <b>2.3.2.1</b> | Inibição do crescimento micelial com os extratos aquosos .....   | 105 |
| <b>2.3.2.2</b> | Inibição do crescimento micelial com os extratos alcoólicos .....  | 107 |
| <b>2.3.2.3</b> | Inibição do crescimento micelial com os óleos essenciais .....   | 109 |

|   | <b>Pág.</b>  |
|---|--|
| 2.3.3   | Concentração inibitória mínima (CIM) do <i>A. flavus</i> em meio de cultura BDA ..... 114  |
| 2.3.4   | Inibição do crescimento microbiano em vagens de amendoim com aplicação do óleo de canela ..... 116                                       |
| 2.3.4.1   | Avaliação da retenção de água nas vagens de amendoim ..... 116   |
| 2.3.4.2   | Inibição do crescimento fungico das vagens irradiadas com aplicação de suspensão de esporos de <i>Aspergillus flavus</i> . ..... 117     |
| 2.3.4.3   | Inibição do crescimento fúngico nas vagens de amendoim com microbiota de origem ..... 119  |
|   | a) Inibição da microbiota fúngica de origem com óleo de canela em do ambiente com umidade relativa de 75.3% .. 119                       |
|   | b) Inibição da microbiota fúngica de origem com o óleo de canela em ambientes com umidades relativas e temperatura controladas ..... 122 |
| 2.4   | CONSIDERAÇÕES ..... 124  |
| <b><i>Estudo da aplicação do óleo essencial de Canela</i></b> |  |
| <b>Capítulo 3</b>   | <b><i>(Cinnamomum zeylanicum) em vagens de amendoim (Arachis hypogaea L.) com secagem e armazenamento</i></b> ..... 126                  |
| 3.1   | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ..... 127  |
| 3.1.1   | A aplicação do óleo essencial de canela ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> ) ..... 127   |
| 3.1.2   | A aplicação do biofungicidas e suas secagem ..... 129  |
| 3.2   | MATERIAIS E MÉTODOS ..... 134  |
| 3.2.1   | Materiais ..... 134  |
| 3.2.2   | Equipamento ..... 134  |
| 3.2.3   | Métodos ..... 136  |

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| <b>3.2.3.1</b> Secagem em monocamada .....  | 136         |
| a) Obtenção dos parâmetros de secagem em monocamada   | 136         |
| b) Aspersão do óleo essencial de canela nas vagens de amendoim para a secagem em monocamada .....   | 138         |
| c) Secagem em monocamada com a aplicação do óleo essencial de canela .....  | 139         |
| <b>3.2.3.2</b> Secagem em camada espessa .....  | 140         |
| a) Aspersão do óleo essencial de canela para a secagem em camada espessa .....  | 140         |
| b) Secagem em camada espessa das vagens de amendoim com aplicação do óleo essencial de canela e armazenamento em condições controladas.....       | 141         |
| <b>3.2.4</b> Análises estatísticas .....  | 143         |
| <b>3.3</b> RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 144         |
| <b>3.3.1</b> Secagem em monocamada das vagens de amendoim .....   | 144         |
| <b>3.3.1.1</b> Parâmetros de secagem das vagens de amendoim em monocamada .....   | 144         |
| <b>3.3.1.2</b> Aspersão do óleo essencial de canela nas vagens de amendoim para secagem em monocamada .....                                       | 147         |
| <b>3.3.1.3</b> Secagem em monocamada com a aplicação do óleo essencial de canela e armazenamento .....  | 148         |
| <b>3.3.2</b> Secagem em camada espessa de vagens de amendoim .....  | 154         |
| <b>3.3.2.1</b> Parâmetros da aspersão das vagens para a secagem em camada espessa .....   | 154         |
| <b>3.3.2.2</b> Umidade relativa e temperatura do ambiente durante a secagem em camada espessa .....   | 155         |
| <b>3.3.2.3</b> Umidade e temperatura das vagens de amendoim com a aplicação do óleo essencial de canela durante a secagem em camada espessa ..... | 157         |

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| <b>3.3.2.4</b> Umidade relativa e temperatura nas caixas de armazenamento das vagens de amendoim .....   | 157         |
| <b>3.3.2.5</b> Umidade das vagens de amendoim durante o armazenamento .....  | 158         |
| <b>3.3.2.6</b> Inibição da contaminação fúngica de origem do óleo de canela durante o armazenamento em umidade e temperatura do ambiente controladas ..... | 159         |
| <b>3.3.2.7</b> Inibição da contaminação das Aflatoxinas pelo óleo de canela durante o armazenamento em umidade e temperatura do ambiente controladas ..... | 161         |
| <b>3.4</b> CONSIDERAÇÕES .....   | 163         |
| <br>   |             |
| <b>Capítulo 4 CONCLUSÃO .....</b>  | <b>164</b>  |
| <br>   |             |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>167</b>  |
| <br>   | <b>190</b>  |
| <b>APENDICES .....</b>   |             |
| <br>   |             |
| <b>ANEXOS .....</b>  | <b>196</b>  |

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil o amendoim é consumido o ano todo na forma de paçoca, pé de moleque, torrado e salgado. A maior procura desses produtos ocorre no período das festas juninas, que fazem parte da cultura brasileira. Segundo a Associação Brasileira de Chocolate, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados - ABICAB, (2015), o consumo per capita de amendoim pelo brasileiro gira em torno de 850 gramas, número que cresceu 4% ao ano até 2012. Na safra de 2013/2014 o consumo aumentou devido à Copa do Mundo de Futebol que ocorreu no país, tendo havido estimativa de aumento de até 30 % pelos fabricantes.

Atualmente, o Brasil está na 20<sup>a</sup> posição na lista dos maiores produtores mundiais de amendoim, sendo 80% desta produção proveniente do estado de São Paulo, de acordo com o Instituto de Economia Agrícola - IEA (IEA, 2011; IEA, 2014). Nas últimas décadas, a produção de amendoim do país aumentou de 267,7 mil toneladas na safra de 2005/2006 para 294,7 mil toneladas na safra 2011/2012, para 336,7 mil toneladas na safra de 2012/2013 e na safra 2013/2014 a produção foi de 315,8 mil toneladas, com estimativa de 337,9 mil toneladas para a safra de 2014/2015. Esse aumento é importante para a região de Jaboticabal – SP., já que ela contribui com a maior parte da produção total do país, o que confere ao estado o aumento de 207,8 mil toneladas, em 2005, para 271,2 mil toneladas na safra 2013/2014 (CONAB b, 2013; CONAB, 2014; CONAB, 2015).

A contaminação por aflatoxinas é o principal problema em amendoim e seus produtos no Brasil. As aflatoxinas podem causar danos ao fígado e prejudicar a produtividade e eficiência reprodutiva em diferentes espécies animais (SABINO, 1999). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda um controle sistemático do nível de aflatoxina na dieta da população, principalmente em países localizados em áreas tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas favorecem o crescimento da infestação do amendoim por fungos e conseqüente produção de aflatoxina (WHO, 2013).

Para atingir a segurança alimentar em toda a cadeia produtiva do amendoim vários estudos estão sendo realizados por pesquisadores brasileiros e internacionais cujas pesquisas focalizam melhoramentos genéticos dos grãos, tratamentos nas

sementes e, principalmente, métodos que diminuam as contaminações por patógenos durante o plantio, colheita, pós-colheita, beneficiamento e processamento.

Uma das tecnologias aplicadas para a diminuição da infestação por fungos micotoxigênicos é o tratamento com agrotóxicos nas etapas de pré-colheita, colheita e pós-colheita, cujos resultados são contestáveis, devido à resistência adquirida pelos micro-organismos, danos severos ao meio ambiente e prováveis danos à saúde (CRUZ et al., 2009). Uma alternativa para o uso de fungicidas comerciais é o uso de extratos e óleos de plantas medicinais que possuam propriedades antimicrobianas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000; TATSAKJIEU et al., 2009). Essas propriedades dos condimentos e de seus óleos essenciais têm sido estudadas principalmente com relação ao efeito inibidor de micro-organismos patogênicos presentes em alimentos capazes de provocar danos à saúde humana e animal (CUNICO et al., 2003; MYTLE et al., 2004; SOUZA et al., 2004).

Outro aspecto que deve ser levado em consideração é a importância de um processo contínuo de gestão do perigo químico Aflatoxina, desde o plantio até a mesa do consumidor, utilizando a Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle - APPCC. Portanto, é necessário conhecer o uso dos biofungicidas extraídos de plantas, no controle do *Aspergillus flavus*, em vagens de amendoim, como aplicá-los e o seu comportamento durante o armazenamento.

Com base nas evidências apresentadas anteriormente e para contribuir com avanço tecnológico da aplicação de biofungicidas na cadeia de processamento do amendoim, este trabalho foi dividido nas três etapas que seguem, além das considerações finais.

O objetivo geral desta tese foi:

Avaliar a viabilidade técnica da aplicação de biofungicidas no processamento de amendoim (*Arachis hypogaea L.*), de modo a reduzir a infestação pelo fungo *Aspergillus flavus L.* e consequente contaminação por aflatoxina.

Os objetivos específicos foram:

**Capítulo 1:** Estudo da infestação fúngica e proposta de APPCC na colheita e pós-colheita de amendoim na região de Jaboticabal - SP.

- ✓ Analisar a presença dos fungos, a variação da umidade e ocorrência de aflatoxina durante as etapas de colheita, pós-colheita e armazenamento do amendoim em vagem de amendoim;
- ✓ Propor medidas preventivas por meio de um plano de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) que englobe a colheita e pós-colheita do amendoim, e assim estabelecer a melhor etapa em que poderia ser aplicado o biofungicida;

**Capítulo 2:** Ação fúngitóxica de extratos e óleos essenciais de plantas sobre *Aspergillus flavus* L.

- ✓ Avaliar a ação inibitória ao crescimento do fungo *Aspergillus flavus* L. pela aplicação de extratos aquosos, alcoólicos e óleos essenciais de plantas; estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM) em meio de cultura Dextrose-Batata-Agar (DBA) e em vagens de amendoim.

**Capítulo 3:** Aplicação do óleo essencial de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) em vagens de amendoim para a inibição do *Aspergillus flavus* L.

- ✓ Avaliar a eficiência da aplicação do biofungicida, óleo essencial de canela, contra a infestação fúngica e a produção de aflatoxina, quando da aplicação seguida de secagem em monocamada e camada espessa e armazenamento por um período após as secagens

**Capítulo 4:** Conclusão

- ✓ Apresentar as considerações finais deste trabalho e as sugestões para trabalhos futuros.



## ***CAPÍTULO 1***

### ***Estudo da infestação fúngica e proposta de APPCC da colheita e pós-colheita de amendoim na região de Jaboticabal – SP***

## 1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1.1 Amendoim (*Arachis hypogaea* L.)

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é um alimento muito calórico, rico em óleo, proteínas e vitaminas. É a quarta oleaginosa mais cultivada no mundo, sendo plantada em larga escala nos continentes americanos, africano e asiático. O plantio é realizado visando a produção de grãos, óleo, farelo, entre outros (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO), 2010; MARTINS, 2010; NETO; COSTA; CASTRO, 2012). São os grãos mais susceptíveis à contaminação por fungos micotoxigênicos, em especial os que produzem as aflatoxinas como *Aspergillus flavus* L. e *A. parasiticus*, podendo ocorrer praticamente em todas as etapas de sua cadeia produtiva. Para o controle da contaminação por aflatoxina devem-se levar em consideração todos os fatores agronômicos e ambientais que influenciam a ocorrência de infecção por fungos produtores dessas aflatoxinas nas vagens e sementes (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST), 2003; CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC), 2004, UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA), 2009).

A variedade *Runner* IAC 886 atende aos principais mercados das indústrias de confeitos, doces e confeitarias por seus grãos serem predominantemente de calibres 38/42 a 50/60, padrão de mercado internacional para elaboração dos tradicionais grãos blanchados (sem pele) entre outros produtos. O cultivar produzido em território brasileiro possui características apreciadas no mercado internacional por ser semelhante ao cultivo de produtos produzidos em outros países exportadores (LOURENZANI; LOURENZANI, 2006).

De acordo com o Instituto Agrônomo de Campinas - IAC (2015), o cultivar *Runner* IAC 886 é o mais plantado no estado de São Paulo. Trata-se de uma planta rasteira, com ramificação tipicamente espessa e ciclo longo de crescimento (de 125 - 130 dias); moderadamente resistente à mancha castanha, suscetível à mancha preta e ferrugem possui produtividade em média de 4.000 kg.ha<sup>-1</sup>, com potencial para 6.000 kg.ha<sup>-1</sup>.

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), (2013), na safra 2012/2013, ocorreu uma boa fase para o amendoim brasileiro, devido à

disponibilidade de áreas de renovação de cana-de-açúcar para o seu plantio e também à receptividade do produto na Europa, tradicional mercado importador do produto. Como consequência, ocorreu aumento de 16,6% na produção do país, concentrado principalmente no estado de São Paulo, onde o crescimento foi de 19,5% na produção. Contudo, com os efeitos do clima no estado de São Paulo, ocorreu uma redução nos níveis de produtividade de 13,3%. O resultado da safra 2013/14 foi uma produção de 315,8 mil toneladas, ante 326,3 mil toneladas da safra anterior seguindo o terceiro levantamento realizado em dezembro de 2013 (CONAB, 2013; CONAB, 2014; CONAB, 2015).

A produção esperada de amendoim do país para o ano de 2015 já alcançou a estimativa de 337,9 mil toneladas de acordo com estimativa realizada em março de 2015 no sexto levantamento da safra 2014/15 (CONAB, 2015). Em geral, a produção é realizada em áreas de renovação de canaviais sendo o estado de São Paulo o principal produtor com participação de 86,4% da safra brasileira. Como os investimentos na cana-de-açúcar têm se reduzido em função da conjuntura de preços do álcool e do açúcar, a tendência é de redução dos investimentos em tratamentos culturais no amendoim, o que deve refletir em seu rendimento médio, que no país deve cair 12,3% em relação ao mês anterior e em São Paulo, 13,7%, segundo os Grupos de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias (GCEA) (IBGE, 2015).

A Cooperativa dos Plantadores da Zona de Guariba – COPLANA, de Jaboticabal, São Paulo, possui mais de 130 produtores de amendoim, os quais plantaram, na safra 2013/2014, em mais de 19.500 hectares. Dentre as regiões de produção dos cooperados, destacam-se Alta Mogiana, no Estado de São Paulo, além de Minas Gerais e Tocantins. Um clima extremamente adverso marcou esta safra do amendoim. Apesar das incertezas provocadas pela forte seca, foram recebidos 3 milhões de sacos de 25 kg de amendoim em casca. Esse resultado ocorreu por causa da tecnologia empregada na pós-colheita e da qualidade do produto observada desde o campo que viabilizam as exportações para mercados com alto nível de exigência. Na safra 2013/2014, 70 mil toneladas foram estimadas à exportação, principalmente para a Europa, sendo a cooperativa responsável por 45% das exportações brasileiras.

Na safra 2013/2014, exportou-se 32 mil toneladas do grão, com aumento de 30% em comparação ao ano anterior (A CHUVA, 2014).

O processo para a colheita na produção de amendoim tem início com a etapa do arranquio das vagens de amendoim, as quais são colhidas por inversão mecânica e com umidade em torno de 35 e 50%. Plantas inteiras são removidas do solo, dispostas em leiras e secas ao ar livre. Após um tempo específico para que a umidade fique abaixo de 18%, as vagens de amendoins são mecanicamente recolhidas por colheitadeiras mecânicas e transportadas para o beneficiamento, onde as vagens são secas por secadores de leito fixo com ar aquecido de 35 a 38° C, evitando-se o aquecimento excessivo para evitar perda de sabor e ocorrer o despelculamento dos grãos, reduzindo a sua qualidade. Depois da fase de secagem, a umidade deve ser mantida em níveis inferiores a 10 %, para prevenir a multiplicação de fungos (TASSO; MARQUES; NOGUEIRA, 2004; SEGATO; PENARIOL, 2007).

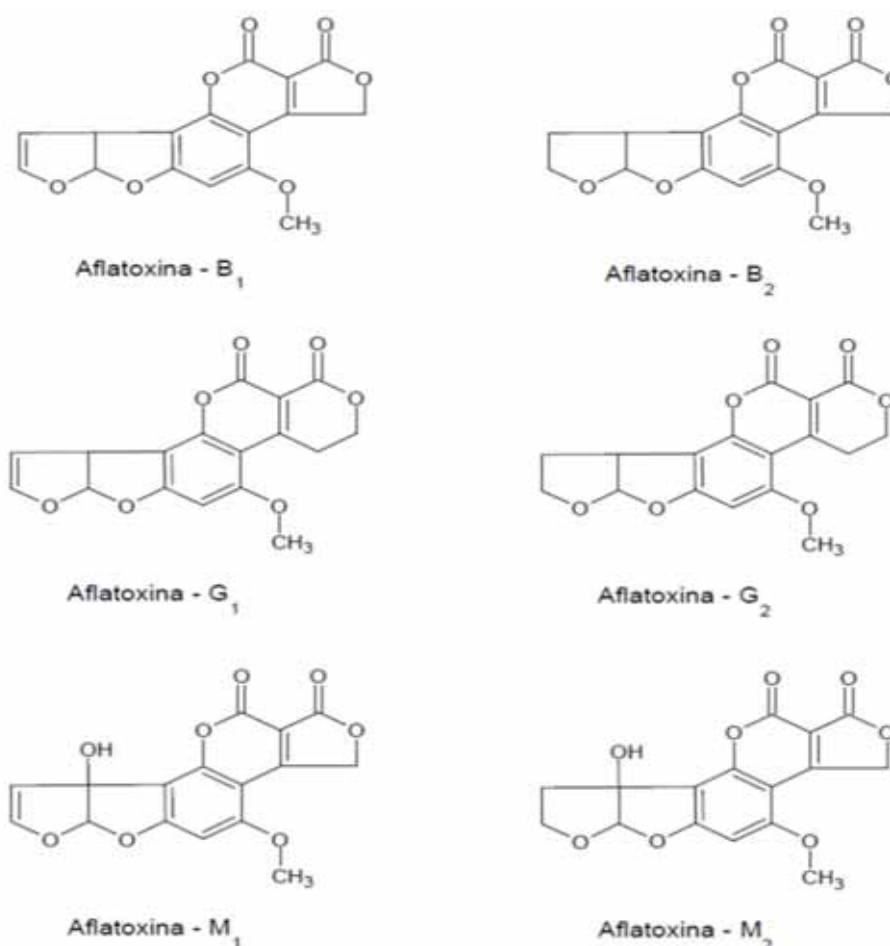
Após a etapa de secagem, o amendoim é acondicionado em *big bags* ou em sacos de 50 kg e o armazenamento seguro é em armazém com umidade relativa (UR) inferior a 70%, sob temperatura de no máximo 30° C. A condição ideal corresponde, aproximadamente, à umidade de 10 – 11% para a vagem e 6 - 8% para o amendoim descascado, a fim de evitar o desenvolvimento dos fungos do gênero *Aspergillus* (BRASIL a, 2003; MANUAL, 2004; GORAYEB et al. 2009). Na COPLANA, o armazém possui capacidade de 40.000 toneladas e o amendoim é mantido acondicionado durante 1 ano sem comprometimento de sua qualidade. O barracão é constituído de uma construção sólida, com 84 metros de largura e 12 m de altura, com uma estrutura que conserva a temperatura do amendoim deixando-o isento de pragas e longe de roedores por meio de um efetivo controle de pragas (MALAGOLLI; ASCANIO, 2007).

No beneficiamento, o amendoim passa por vários processos mecanizados: descasque, seleção e limpeza. A última inovação adotada pela COPLANA é o processo de “blancheamento”. Trata-se de um moderno sistema de retirada da película do grão por processo mecânico. Com isso, o produto recebe a denominação de amendoim “blancheado”, processo que agrega valor à matéria-prima e eleva o preço de mercado, proporcionando, assim, oportunidades de buscar novos mercados, como a Rússia. Para o mercado interno, o amendoim é vendido somente seco em grãos (MALAGOLLI; ASCANIO, 2007; GORAYEB, 2009).

### 1.1.2 A contaminação fúngica e as aflatoxinas em amendoim

As micotoxinas são contaminantes naturais encontradas nas matérias-primas, alimentos e rações. Algumas micotoxinas podem causar doenças autoimunes, possuem propriedades alergênicas e algumas delas são cancerígenas, teratogênicas ou mutagênicas. A ocorrência de micotoxinas é influenciada por certos fatores ambientais, assim, a extensão da contaminação de um determinado produto com uma determinada toxina varia com a localização geográfica, práticas agrícolas e processamento pós-colheita (CAST, 2003). Na Figura 1.1, são apresentadas as estruturas das aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub>. Essas micotoxinas são produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*.

**Figura 1.1:** Estruturas das aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub>)



Fonte: Adaptado de Souza, (2013, p.24).

A aflatoxina B<sub>1</sub> é a forma mais frequente e mais tóxica para os seres humanos. Os principais efeitos da aflatoxina são hepatocarcinoma e imunossupressão, que leva ao aumento da susceptibilidade a infecções e deficiência de crescimento em crianças devido à capacidade da aflatoxina de atravessar a placenta humana (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC, 2002).

A hepatite B e hepatite C são infecções crônicas, sendo fatores de risco para o câncer de fígado causado por aflatoxina. A toxina reside no fígado por um longo período causando danos aos genes supressores de tumor. Uma consequência imediata da exposição de aflatoxina pode ser aflatoxicose, ou intoxicação por aflatoxinas; sinais e sintomas incluem problemas gastrointestinais e lesões hepáticas (BHAT; RAI e KARIM, 2010; CHANG; SREEDHARAN e SCHNEIDER, 2013).

Ao avaliar a contaminação nas etapas da cadeia produtiva do amendoim no estado de São Paulo, alguns autores procuram diagnosticar os momentos mais propícios à infestação fúngica e a síntese de micotoxinas. Quando ocorrem períodos de estiagem antes da colheita, no período que compreende as últimas 4 a 6 seis semanas antes do final do ciclo, há um grande risco de contaminação por aflatoxinas em níveis muito elevados (SANDERS et al., 1984). Dessa forma, o cultivo do amendoim em áreas irrigadas ou com irrigação suplementar tem se constituído uma das recomendações de maior efeito na prevenção da contaminação da pré-colheita por aflatoxinas. O cultivo de amendoim em áreas de solo arenoso pode ser um fator favorável à contaminação, sendo altamente recomendável a utilização da irrigação para prevenir a contaminação por aflatoxinas. A suspensão da irrigação pode ser feita de 3 a 5 dias antes da colheita, evitando a exposição excessiva do plantio ao déficit hídrico. Danos nas vagens, causados devido à alta incidência de doenças, perfurações feitas por insetos ou pelo manuseio na colheita e despencamento podem ocasionar a contaminação por aflatoxinas no amendoim (FAO, 2003).

A contaminação por aflatoxina encontrada no amendoim e seus derivados está diminuindo. Na última década foram realizados monitoramentos dessa contaminação. Os resultados do estudo realizado na região nordeste do estado de São Paulo mostram uma diminuição no número de amostras que excederam o limite estabelecido pela legislação brasileira. Das 240 amostras analisadas, 3,7% apresentaram aflatoxinas (B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>) acima de 20 µg.kg<sup>-1</sup> (OLIVEIRA et al., 2009). No período de 2002 a 2012, foram realizadas 90 análises de amendoim “in

*natura*” e derivados nas regiões de Assis, Bauru e Marília, no estado de São Paulo. Dessas análises, 15 (16,7%) correspondiam a amendoim e 75 (83,3%) a produtos de amendoim (amendoim frito, com cobertura de chocolate, cobertura colorida, amendoim tipo japonês e paçoca), sendo 13 (14,4%) amostras positivas para aflatoxinas. Dentre os produtos de amendoim, foram detectadas aflatoxinas apenas em amostras de paçoca. Nas amostras de amendoim, os níveis de contaminação variaram de 5 a 300  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , enquanto nas amostras de paçoca a variação foi de 9 a 466  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; 2 (13,3%) amostras de amendoim e 4 (5,3%) amostras de paçoca estavam em desacordo com a legislação em vigor (SILVA; FERREIRA; STANCARI, 2013).

De acordo com Horn et al. (1994), a presença de *A. flavus* e *A. parasiticus* em amostras de solo é responsável pela contaminação das vagens de amendoim, pois o solo é reservatório primário desta microbiota. Estudos sugerem que é possível reduzir o potencial de produção de aflatoxina produzidas por *A. flavus* alterando as rotações de culturas e o tempo de corte para reduzir a incidência de cepas altamente toxigênicas e evitar expor as culturas aos períodos mais quentes propícios às contaminações. Eventos de contaminação severa têm sido atribuídos à interações de sincronismo de cultura com fatores ambientais (LEWIS et al., 2005; COTTY; JAIME-GARCIA, 2007).

Gonzalez et al. (2008) verificaram a presença de *A. flavus* em 17% das amostras de amendoim analisadas desde o plantio até a colheita no município de Junqueirópolis – SP. Santos et al. (2013) observaram que os fungos mais frequentes em sementes de amendoim Runner 886 e IAC 503, em armazenamentos nos municípios de Campinas, Jaboticabal, Marília e Sertãozinho, foram os dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizopus*.

A umidade do substrato e a umidade relativa constituem pontos críticos na produção da aflatoxina. A produção máxima de aflatoxina em grãos de cereais ocorre em umidade de 25% a 30 °C. A umidade relativa mínima exigida para a produção da micotoxina é de 83 % e alguns autores observaram aumento na produção de aflatoxina com umidade relativa acima de 90% (DIENER; DAVIS, 1966; PRADO et al., 1991; GORAYEB, 2007).

A contaminação do amendoim é um grande problema econômico para a indústria e um perigo para a saúde humana e animal, mas com uma boa gestão do

ambiente agrícola é possível reduzir a contaminação por fungos e das micotoxinas toxigênicas. Nas diferentes fases da maturação das vagens, estas são expostas a condições ambientais variáveis durante a sua formação até a colheita: nas análises de 25 amostras, os resultados mostraram que foram detectadas aflatoxinas em 4 % das amostras no estágio de granação, 16 % dos grãos após a maturação e em 4 % dos grãos após a secagem (GONÇALEZ et al., 2008).

Para minimizar a ocorrência das aflatoxinas é importante um monitoramento sistemático em amendoim e seus derivados em toda a sua cadeia alimentar, bem como adotar um controle efetivo das condições de plantio, cultivo, colheita, trato pós-colheita, transporte ao beneficiador, beneficiamento, processamento dos grãos visando à obtenção de produtos e sua distribuição e comercialização (SANTOS; LOPES, E KOSSEKI, 2001; GORAYEB et al., 2009; TOREGANI-MENDES et al., 2011).

Os padrões microbiológicos, de micotoxinas e físico-químicos para o amendoim e seus derivados são observados na Tabela 1.1. O Brasil regulamentou a RDC nº 12 de 2001, para padrões microbiológicos dos alimentos, a RDC 172, de 2003 e a RDC nº 7 de 2011, para limites de micotoxinas e umidade das vagens e grãos, deliberadas pelo Ministério da Saúde – MS, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2001; BRASIL a, 2003; BRASILa, 2011). Os Estados Unidos da América (USA), por meio do Conselho Americano de Amendoim (APC), elaboraram o guia para controle de contaminantes em alimentos de baixa umidade e os limites estão listados na Tabela 1.1 (USDA, 2009). A *European Food Safety Authority* (EFSA) (2010), alterou os teores máximos de aflatoxinas totais no amendoim para 4 mg.kg<sup>-1</sup> e outras oleaginosas e em produtos transformados, destinados ao consumo humano direto ou uso como ingrediente de gêneros alimentícios, com exceção de: óleos vegetais brutos destinados a refinação e refinado de óleos vegetais.

A prevenção do aumento de aflatoxinas durante o armazenamento e o transporte dependem de manter um baixo teor de umidade da temperatura do ambiente e das condições de higiene. *A. flavus* e *A. parasiticus* não podem crescer ou produzir aflatoxinas em atividades de água inferior a 0,7. A umidade relativa do ar deve ser mantida abaixo de 70 % e temperaturas entre 0 e 10 ° C são ideais para minimizar a deterioração e crescimento de fungos durante o armazenamento por longo tempo (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2012).



**Tabela 1.1:** Limites nacional e internacional para micro-organismos, micotoxinas e umidade para amendoim

| <b>Microorganismos</b>  | <b>USDA*</b>            | <b>BRASIL</b>            | <b>EC**</b>             |
|---|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Mofos, bolores  | <100 UFC/g              | < 5x10 <sup>3</sup> /g   | < 100 UFC/g             |
| <b>Micotoxinas</b>  |                         |                          |                         |
| Aflatoxinas<br>(Soma = AFB <sub>1</sub> +AFG <sub>1</sub> +<br>AFB <sub>2</sub> +AFG <sub>2</sub> ) | <15 mg.kg <sup>-1</sup> | < 20 mg.kg <sup>-1</sup> | < 4 mg.kg <sup>-1</sup> |
| <b>Umidades</b>   |                         |                          |                         |
| Grãos   | < 9%                    | < 8%                     | < 9 %                   |
| Vagens  | <10%                    | < 11%                    | 10%                     |

\* *United States Department of Agriculture (USDA)*

\*\* *European Commission (EC)*

**Fonte:** USDA, 2009, BRASIL, 2001; BRASIL a, 2003, CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2003; EFSA, 2005 e 2010.

### 1.1.3 A segurança alimentar na cadeia produtiva do amendoim

Quando tentamos entender a definição de cadeia produtiva, estudiosos definem *filiière* (cadeia) como uma sucessão de operações de transformação dissociáveis, capazes de serem separadas e ligadas entre si por um encadeamento técnico; é também um conjunto de relações comerciais e financeiras entre fornecedores e clientes e um conjunto de ações econômicas que valorizam os meios de produção e asseguram a articulação das operações (MORVAN, 1985; BATALHA et al., 2008).

Na cadeia produtiva do amendoim são realizadas operações desde a produção primária, nas agroindústrias, distribuidoras e comercializadoras, com a junção necessária para a fabricação dos produtos que os consumidores solicitam. No Quadro 1 estão apresentadas as operações realizadas nos Microsistemas dessa cadeia no Brasil.

A primeira operação é o plantio das sementes do amendoim, porém os melhores solos para o plantio são arenosos por serem estes mais suscetíveis ao déficit hídrico. Contudo, nem sempre os solos de renovação de cana possuem essas características, mas é importante garantir umidade para a cultura, em caso de estiagem, com irrigação suplementar; também atentar-se para o calendário de plantio

a fim de evitar estiagem no período que antecede a colheita, realizar o controle adequadamente para insetos, pragas, ervas daninhas e doenças e por fim, utilizar irrigação suplementar no final do ciclo (EMBRAPA ALGODÃO, 2008 *apud* SUASSUNA et al., 2005).

No cultivo, os pontos favoráveis são a não necessidade de um sistema de irrigação- o que reduz os custos de produção- e o favorecimento do crescimento das plantas devido à safra ocorrer na época das águas. Por outro lado, o ponto negativo da colheita coincidir com a época das chuvas ocorre possível favorecimento do aumento da umidade dos grãos e, conseqüentemente, o aumento do risco de contaminação por aflatoxina. Para evitar esse problema, o ideal seria que o amendoim fosse colhido em um período pós-chuvas, mas essa medida pode trazer conseqüências ao índice de maturação dos grãos (SCALCO; MACHADO; QUEIROZ, 2008).

**Quadro 1.1:** Operações realizadas na cadeia produtiva do amendoim no Brasil

| MACROSISTEMA RURAL/<br>PRODUÇÃO   | MACROSISTEMA INDUSTRIAL/<br>TRANSFORMAÇÃO  |   | MACROSISTEMA DE<br>DISTRIBUIÇÃO/<br>COMERCIALIZAÇÃO  |
|---|--|---|--|
| Produção Primária   | Indústria de beneficiamento e<br>armazenamento*  | Indústria de derivados amendoim<br>(doce de paçoca) *   | Distribuição e<br>Comercialização  |
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Preparo da semente e escolha do cultivar;</li> <li>2. Escolha da área;</li> <li>3. Análise e preparo do solo</li> <li>4. Plantio;</li> <li>5. Cultivo: (controle de plantas daninhas, doenças e pragas, monitoramento da umidade do solo e irrigação);</li> <li>6. Colheita: (arranquio; secagem ao sol, colheita mecanizada com a separação das vagens das folhas, transbordo) e</li> <li>7. Transporte em caminhões graneleiros a indústria beneficiadora.</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Recebimento do amendoim úmido (vagem) e coleta das amostras (análises);</li> <li>2. Pesagem;</li> <li>3. Pré-limpeza I;</li> <li>4. Secagem artificial (secador de leito fixo);</li> <li>5. Ensacamento em <i>big beg</i>;</li> <li>6. Armazenamento do amendoim (vagem);</li> <li>7. Pré-limpeza II, Análises físico-químicas II – Umidade e rendimento;</li> <li>8. Descascamento;</li> <li>9. Seleção Eletrônica;</li> <li>10. Seleção Manual;</li> <li>11. Classificação por tamanho;</li> <li>12. Ensaque (Análises);</li> <li>13. Detecção de metais, (análises);</li> <li>14. Armazenamento de grãos em sacas;</li> <li>15. Expedição</li> <li>16. Transporte para a indústria de doces e derivados.</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Recebimento das sacas de grãos de amendoim, análises;</li> <li>2. Armazenamento das sacas;</li> <li>3. Torra dos grãos;</li> <li>4. Despeliculização;</li> <li>5. Moagem do amendoim;</li> <li>6. Pesagem;</li> <li>7. Mistura com os ingrediente (açúcar, aditivos);</li> <li>8. Cocção de paçocas;</li> <li>9. Corte da paçoca e secagem;</li> <li>10. Acondicionamento dos doces em embalagens;</li> <li>11. Estocagem dos produtos, análises;</li> <li>12. Transporte para as distribuidoras e/ou comercializadoras.</li> </ol> | <p><b>Distribuidores:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Recebimento;</li> <li>2. Armazenamento dos produtos;</li> <li>3. Expedição e</li> <li>4. Transportes.</li> </ol> <p><b>Comercialização</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Recebimento;</li> <li>2. Disposição nas gondolas do estabelecimento;</li> <li>3. Acondicionamento em embalagens para o transporte;</li> <li>4. Consumidor.</li> </ol> |

**Fonte:** \* Extraído de Gorayeb, (2007).

Depois do arranquio, o amendoim começa a perder umidade numa velocidade que depende do clima (sol, chuvas, dias nublados, etc.) e da maneira como a planta for disposta no chão para secar (com as vagens para cima). Enquanto a umidade estiver acima de 20-22%, a atividade metabólica da vagem oferece resistência à penetração do fungo e o risco de contaminação é baixo. O intervalo de 22 até 11% de umidade é, portanto, o período crítico e se houver demora da secagem nessa fase, a probabilidade de contaminação do amendoim será grande. Dessa forma, após o arranque, o amendoim deve ser seco o mais rapidamente possível, e só então ser recolhido para o envio ao beneficiador a fim de evitar o desenvolvimento de fungos e, conseqüentemente, contaminação com a aflatoxina (FONSECA, 2015).

Para se realizar a colheita e pós-colheita adequada do amendoim é necessário um planejamento do ponto ótimo de maturidade dos grãos e um período de quatro a seis semanas de déficit hídrico, uma vez que a colheita precoce ou tardia aumenta a proporção de vagens imaturas ou que passaram do padrão de maturidade, aumentando a contaminação por aflatoxina principalmente se as condições climáticas não forem favoráveis (MANUAL, 2004).

Ainda que houvesse amplo gerenciamento de segurança alimentar, a contaminação do amendoim por aflatoxina não poderia ser totalmente evitada (DORNER, 2008). Portanto, a importância da gestão da segurança de produtos agrícolas deve ser conduzida pela aplicação de práticas e procedimentos planejados, desde a etapa de seleção da área física para cultivo até a expedição do produto agrícola pelo produtor rural, os quais permitam o controle de perigos imediatos e mediatos. As Boas Práticas Agrícolas (BPA), assim como os princípios do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) são ferramentas de gestão indispensáveis para a segurança na produção primária. Determinados perigos, em especial os de natureza química como insumos agrícolas permanecerão no produto caso não sejam controlados no campo (MANUAL, 2004; GORAYEB et al. 2009).

Quando realizadas corretamente, as inovações devem resultar em redução dos níveis de aflatoxinas. Portanto, a utilização do sistema APPCC como um sistema de gestão de segurança alimentar tem muitas vantagens sobre os tipos de sistemas de controle de gestão em alguns segmentos da indústria de alimentos. Já no campo, há muitos fatores não controlados que influenciam a contaminação por aflatoxinas dos amendoins, principalmente os ambientais, tais como fatores meteorológicos e insetos.

Deve ser dada especial atenção à população do fungo de solo, à saúde das sementes, ao *stress* de déficit de umidade de solo nos estágios de maturidade de formação das vagens e às chuvas no período da colheita (CODEX ALIMENTARIUS, 2004).

Os fatores mais importantes que determinam o desenvolvimento de fungos em grãos armazenados são: grau de umidade dos grãos, temperatura, grau de contaminação, impurezas, presença de insetos e ácaros, condições físicas dos grãos, período de armazenamento e atmosfera favorável. Esses fatores estão todos inter-relacionados formando um sistema complexo e devem ser considerados em conjunto (BOLONHEZI; MUTTON; MARTINS, 2007, GORAYEB et al., 2009).

Na implantação das Boas Práticas Agrícolas (BPA) o monitoramento do nível de aflatoxina, que pode ser feito por análises químicas em todas as etapas da cadeia produtiva, em lotes aleatorizados é importante e aqueles que apresentarem contaminação devem ser separados dos livres ou com pouca contaminação. Considerando que a distribuição da aflatoxina em um lote é heterogênea, a seleção de grãos e vagens danificados e com crescimento do fungo, começando na colheita e cura, constitui em medidas que mais causam impacto no controle e prevenção da contaminação por aflatoxina. Vale ressaltar que a ausência do controle da umidade dos grãos após a colheita invalida os cuidados adotados anteriormente (MAUAL, 2004).

Com esse crescente mercado, além do aprimoramento tecnológico, houve maior organização do segmento, condição fundamental para a criação e a adoção de normas essenciais para produtos destinados ao consumo humano. Dessa forma, em 2001, foi lançado pela indústria confeitaria, por meio da ABICAB, o programa Pró-Amendoim, destinado principalmente ao controle e detecção da aflatoxina (ABICAB, 2001). Outro fator importante foi a publicação, em 2003, da Resolução RDC 172 (BRASIL a, 2003), que dispõe sobre o regulamento técnico de Boas Práticas de Fabricação (BPF) para estabelecimentos que industrializam amendoins processados e derivados, uma iniciativa que contou com a ação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Além disso, em 2009, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Instrução Normativa 03 (BRASIL, 2009), que estabelece critérios e procedimentos de Controle Higiênico Sanitário (CHS) na cadeia de produção do amendoim e seus subprodutos destinados ao consumo humano para os mercados interno e externo. Foi regulamentada a Resolução – RDC nº 7, de 18 de

fevereiro de 2011, que contém o regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT), para micotoxinas em alimentos (BRASIL a, 2011).

Dentre as ações adotadas, estão a criação do sistema de rastreabilidade, a implantação dos programas de Boas Práticas Agrícolas (BPA) e de Fabricação (BPF), a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), a certificação do CHS, o controle das exportações e importações, bem como a definição das normas amostrais para detecção e controle de aflatoxina (MARTINS; VICENTE, 2010). 23h48

Nas agroindústrias de beneficiamento de grãos é fundamental a implantação dos planos APPCC, são planos em que constam a análise de perigos e pontos críticos de controle. Essa análise, por sua vez, trata-se de um sistema que envolve uma abordagem proativa e preventiva para controlar riscos potenciais de segurança alimentar). O sistema fornece um mecanismo para prevenir, eliminar ou reduzir os riscos na segurança alimentar a níveis aceitáveis de todos os perigos envolvidos no alimento em questão. Quando se utiliza os planos APPCC, os perigos biológicos, químicos e físicos são identificados; o grau dos riscos associados a saúde são avaliados; os pontos de controles (PC) pertencentes aos programas de pré-requisitos são propostos; os pontos críticos de controle (PCC) são identificados, definidos os seus limites críticos com seus métodos para controle; são identificados e critérios para medidas preventivas e ações corretivas estão claramente determinadas. Estes princípios do APPCC e orientações de aplicação são descritas nos Estados Unidos da América – USA, pelo *National Advisory Committee On Microbiological Criteria For Foods* (NACMCF, 1998) e internacionalmente pela Comissão do Codex Alimentarius (CAC) (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2003).

No Brasil, as empresas têm investido muito para a melhoria da qualidade do amendoim produzido, além de se comprometerem a adotar o comportamento ético industrial implantando Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), a fim de atender a legislação em vigor, em especial a Portaria MS 1428/93, Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RDC Nº 275/02, de 21.10.2002, a Resolução ANVISA RDC Nº 274/02, de 16.10.2002 (produtos finais) e a Portaria do ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) nº 183/1996, para matéria-prima, em que são determinados os limites máximos permitidos de aflatoxinas ( $20 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), para oferecer alimentos seguros e respeitar o consumidor final regido pelo Código de Defesa do

Consumidor, ou seja, a Lei 8.078, de 11 de setembro de 1990 (BRASIL, 1990; BRASIL, 1993; BRASIL, 1996; BRASIL a, 2002; BRASIL b, 2002).

No documento do Codex Alimentarius Commission (1997), o plano APPCC apresenta um processo sistemático aplicado para garantir a inocuidade dos alimentos que consiste em sete princípios:

1. Efetuar uma análise de perigos e identificar as medidas preventivas respectivas;
2. Identificar os pontos críticos de controle (PCC's);
3. Estabelecer limites críticos para as medidas preventivas associadas com cada PCC;
4. Estabelecer os requisitos de controle (monitorização) dos PCC's, com procedimentos para utilização dos resultados da monitorização para ajustar o processo e mantê-lo sob controle;
5. Estabelecer ações corretivas para o caso de desvio dos limites críticos;
6. Estabelecer um sistema para registro de todos os controles; e
7. Estabelecer procedimentos de verificação para conferir se o sistema está funcionando adequadamente.

Os perigos à saúde do consumidor são classificados em três: os perigos químicos, físicos e biológicos. Tais perigos variam quanto ao grau de severidade e riscos potenciais de manifestação em consumidores, além de serem específicos para cada produto. Os **perigos biológicos** compreendem bactérias patogênicas (infecciosas ou toxigênicas), fungos, mofo, vírus, parasitas e peixes venenosos e suas toxinas, e príons; **os físicos** incluem cacos de vidro, espículas de osso, fios de cabelo, entre outros, que podem causar somente injúrias menores ou até casos que necessitem de intervenções cirúrgicas; já **os químicos** têm como exemplo os defensivos agrícolas, antibióticos, micotoxinas, sanitizantes, e uma grande quantidade de produtos que podem entrar em contato com o alimento (MANUAL, 2004; RIBEIRO-FURTINI; ABREU, 2006; FONSECA et al., 2013).

## **1.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Bioprocessos e no Laboratório de Engenharia de Processos e Biorreatores do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos (DETA), do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), na Universidade Estadual de “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP/São José do Rio Preto.

As coletas de amostras foram feitas em três safras na região de Jaboticabal, com o apoio da Cooperativa dos Plantadores da Zona de Guariba – COPLANA, de Jaboticabal, São Paulo.

As análises na etapa da recepção (sonda) foram realizadas no laboratório da Recepção de matéria primas da Cooperativa dos Plantadores da Zona de Guariba – COPLANA, de Jaboticabal, São Paulo.

### **1.2.1 Materiais**

#### **1.2.1.1 Obtenção das amostras de solo e amendoim**

Em cada época de colheita foram coletadas amostras dos lotes da safra 2011/2012, 2012/2013 e 2013/2014, nas plantações de amendoim *Runner* IAC 886 e Graneleiro em solos de renovação de cana-de-açúcar, num raio de 100 km da sede da COPLANA. A agroindústria possui um trabalho contínuo de Boas Práticas Agrícolas (BPA), com orientação técnica e apoio aos cooperados em todas etapas do plantio, cultivo, colheita e pós-colheita. As áreas foram escolhidas, aleatoriamente, nos locais apresentados na Figura 1.2, identificados a seguir:



**Figura 1. 2:** Locais de coleta num raio de 100 km do município de Jaboticabal – SP



**Fonte:** Elaborado pela autora e adaptado de Jaboticabal – estado de São Paulo (JABOTICABAL, 2015), site: <https://www.google.com.br/maps/place/Jaboticabal-SP>

### **Safra 2011/2012:**

**Área 1:** Usina Santa Adélia, Jaboticabal, Rodovia SP 326, Km, 332. Estado de São Paulo, Brasil. Coordenadas geográficas - 21° 19', 99" S e - 48° 19', 03" W. Área plantada: 25 hectares. Tipo: *Runner* IAC 886.

**Área 2:** Fazenda Santo Antônio, Estrada Municipal Lusitânia, Pitangueiras. Estado de São Paulo, Brasil. Coordenadas - 21° 00', 34" S e - 48° 13', 18" W. Área plantada: 20 hectares. Tipo: *Runner* IAC 886.

**Área 3:** Fazenda Floresta, Estrada Municipal para Guapiaçu. Estado de São Paulo, Brasil. Coordenadas geográficas - 22° 47', 42" S e - 49° 13', 13" W. Área plantada: 42 hectares. Tipo: *Runner* IAC 886

### **Safra 2012/2013:**

**Área 1:** Fazenda Santa Elisa, Rodovia Armando Sales de Oliveira, Avenida 01, Rua Antônio Capelin, Conjunto Habitacional Lúcia Fabro Sverzut, Sertãozinho. Estado de São Paulo, Brasil. Coordenadas geográficas - 21° 08' 16" S e - 47° 59' 25" W. Área plantada: 62 hectares. Tipo: *Runner* IAC 886.

**Área 2:** Sítio Tijuco, Estrada Velha de Taquaritinga, Jaboticabal. Estado de São Paulo, Brasil. Coordenadas geográficas - 21° 15', 17" S e - 48° 19', 20" W. Área plantada: 20 hectares. Tipo: *Runner* IAC 886.

**Área 3:** Fazenda Jatobá, Bairro Lajeado, Rodovia Laurentino Mascari, Km 170,5, Itápolis. Estado de São Paulo, Brasil, coordenadas - 21° 35' 44" S e - 48° 48', 48" W. Área plantada: 20 hectares. Tipo: *Runner* IAC 886

#### **Safra 2013/2014:**

**Área 1:** Fazenda Bela Vista Usina Colombo S/A - Açúcar e Álcool. Est Municipal - Santa Adélia. Estado de São Paulo, Brasil, coordenadas - 20°02'23.6"S 50° 40' 33. 0" W. Área plantada: 180 hectares. Tipo: *Runner* graneleiro

**Área 2:** Fazenda São Domingos, Usina Santa Adélia, Rod SP 326, 2150014870-Jaboticabal. Estado de São Paulo, Brasil, coordenadas - 21° 20 '06 6" S 48° 18' 27.7" W. Área plantada: 20 hectares.

**Área 3:** Fazenda Santa Elisa, Rodovia Armando Sales de Oliveira, Avenida 01, Rua Antônio Capelin, Conjunto Habitacional Lúcia Fabro Sverzut, Sertãozinho. Estado de São Paulo, Brasil, coordenadas - 21° 08' 16" S e - 47° 59' 25" W. Área plantada: 78 hectares. Tipo: *Runner* graneleiro

### **1.2.2 Métodos**

#### **1.2.2.1 Análises das características climáticas**

Para a determinação dos índices pluviométricos, temperatura média das áreas foram coletados os dados em cada safra no município de Jaboticabal – SP., com o levantamento dos dados da resenha meteorológica do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO, 2015).

#### **1.2.2.2 Obtenção das amostras do solo nas áreas**

As amostras de solo, para as análises de umidade e de contaminação fúngica, foram coletadas em todos os lotes analisados, sendo coletadas 10 sub-amostras de 100 g, em ziguezague, equiespaçadas, em uma área de um hectare (GOULART,

2009). As amostras foram colocadas em sacos plásticos de polietileno de alta densidade e logo após foram misturadas de modo a constituir uma amostra composta representativa da área. As amostras foram armazenadas em câmara de refrigeração a  $4 \pm 1^\circ \text{C}$  por no máximo 12 horas antes das análises.

### 1.2.2.3 Obtenção das amostras de vagens no arranque e após a secagem ao sol

Para as amostragens das vagens de amendoim no campo de cultivo nas etapas de colheita, foram utilizadas as normas da legislação RDC 274 de 2002, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – Ministério da Saúde – MS (BRASILa, 2002). Foram coletados de 5 a 7 kg de amostras.ha<sup>-1</sup>, em subamostras de 200 gramas, sendo as 25 posições equiespaçadas e percorridas em zig zag, conforme apresentado na Figura 1.3.

**Figura 1.3:** Coleta das amostras nas etapas do solo, arranque e após a secagem ao sol, em zig zag manualmente



Fonte: Elaborado pela autora

### 1.2.2.4 Obtenção das amostras de vagens após a colheita mecânica

Posteriormente, foram coletados de 5 a 7 kg de amostra na colheitadeira mecânica, de acordo com a Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003, (BRASIL c, 2003), em subamostras de 1000 g em 5 pontos com o auxílio de um amostrador de 3 Zonas - BS3-IT – MICROCLAR, na colheitadeira e na carreta secadora, Figura 1.4. As

amostras foram colocadas em sacos plásticos resistentes e transportadas até a câmara fria do DETA.

**Figura 1.4:** Coleta de amostras após a colheita mecânica, na colheitadeira



Fonte: Elaborado pela autora

#### 1.2.2.5 Obtenção das amostras de vagens na recepção da COPLANA, por sonda mecânica

Na sonda, a coleta das amostras foram realizadas com o auxílio de sonda mecânica composta por um coletor de amostras de cereais com deslocamento, apresentado na Figura 1.5, em três pontos aleatórios para cada caminhão. Foram coletados 30 kg de vagens no total e encaminhados para as análises de impurezas, rendimento, aflatoxina, umidade.

**Figura 1.5:** Coleta de amostras na recepção por sonda mecânica



Fonte: Fotos cedidas pela Cooperativa dos Plantadores da Zona de Guariba – COPLANA, de Jaboticabal, São Paulo

### 1.2.2.6 Coletas das amostras após a secagem artificial nas carretas secadoras

Após a secagem a  $38 \pm 1^\circ\text{C}$  até atingir índice de umidade menor que 8% b. s., ainda nas carretas secadoras, Figura 1.6, foram coletados de 5 a 7 kg de amostras com o auxílio do amostrador e elas foram acondicionadas em sacos plásticos para o transporte até a câmara fria do DETA, onde a temperatura é de  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ .

**Figura 1.6:** Coleta de amostras após a secagem na carreta secadora



**Fonte:** Foto cedida pela Cooperativa dos Plantadores da Zona de Guariba – COPLANA, de Jaboticabal, São Paulo

### 1.2.2.7 Obtenção das amostras após a secagem artificial no terceiro mês de armazenamento

As coletas das amostras das vagens no terceiro mês de armazenamento foi realizada com o auxílio de amostrador, apresentado na Figura 1.7, retirando aproximadamente 5 kg dos *big begs*, acondicionados em sacos plásticos de camada espessa, colocados em isopor e transportados até a câmara fria do DETA.

**Figura 1.7:** Coleta de amostras no armazenamento, no 3º Mês, com o auxílio de amostrador de fases



**Fonte:** Foto cedida pela Cooperativa dos Plantadores da Zona de Guariba – COPLANA, de Jaboticabal, São Paulo

#### **1.2.2.8 Análise de umidade e unidades formadoras de colônias (UFC) do solo**

As amostras de solo foram coletadas no campo, transportadas para o laboratório, homogeneizadas manualmente e assim pesadas em três sub-amostras de 10 g, as quais foram submetidas ao teste de umidade, colocando-as em estufa a  $105 \pm 1$  °C, durante 24 horas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

As análises de unidades formadoras de colônias (UFC) foram realizadas em três sub-amostras de 10 g de cada solo, suspendendo-se as amostras em 90 mL de água destilada estéril, e agitando-as por 15 minutos. Desta solução original, foram realizadas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ , adicionando-se água destilada. Um mL destas diluições foi colocado em placa de petri, em seguida foi vertido o meio de cultura BDA (20 mL). As amostras foram incubadas a  $25$  °C  $\pm$   $1$  °C em câmara DBO durante sete dias, seguindo-se de contagem das UFC com o auxílio da lupa própria de contagem (EMBRAPA, 1997).

#### **1.2.2.9 Análise de umidade e unidades formadoras de colônias das vagens de amendoim nas etapas da colheita e pós-colheita**

Todas as amostras foram transportadas em sacos plásticos de polietileno de alta densidade e armazenadas sob refrigeração em câmara fria ( $4$  °C  $\pm$   $1$  °C) até a sua

utilização em no máximo 12 horas. Posteriormente, as amostras de cada saco foram homogeneizadas manualmente e três subamostras de 10 g foram pesadas em balança analítica e secas em estufa a  $105 \pm 1$  °C, durante 24 horas para a determinação do teor de umidade (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

As análises da contaminação fúngica por UFC das vagens de amendoim foram realizadas através do método descrito por Swanson et al. (1992), por meio do qual 25 g de amostra foram colocadas, com o auxílio de uma pinça flambada, em 225mL de solução água peptonada a 0,1% g/v, seguido de homogeneização manual e posterior diluições decimais seriadas até  $10^{-6}$ , empregando-se 1 mL de suspensão em 9 mL do mesmo diluente. Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram misturadas em 15 mL de meio de cultura de BDA acidificado (pH 5,6), fundido a 45 ° C, seguido de homogeneização. Após a solidificação do Agar, as placas foram incubadas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  °C em câmara DBO, durante sete dias sendo realizada a contagem das UFC, com o auxílio de um contador de colônias com lupa. Para quantidades elevadas de UFC (acima de 100 UFC/cm<sup>2</sup>), considerou-se como valor estimado  $65 \times 100 \times 10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> (Est), na maior diluição, uma vez que as placas de vidro empregadas na incubação tinham área de 65 cm<sup>2</sup> (PELCZAR JUNIOR, 1996; ALVES; MORAES, 1998).

#### **1.2.2.10 Análise de umidade, impurezas, renda e aflatoxinas realizadas na recepção da COPLANA**

Foram coletadas amostras com 30 kg, extraídas de cada carga do caminhão por meio da sonda mecânica na recepção. O amendoim em vagem foi quarteado (dividido em partes) até obter-se as sub-amostras de 2,5 kg, as quais foram descascadas e submetidas às análises descritas a seguir.

##### **a) Análise de umidade**

As análises de umidade foram realizadas na etapa da sonda, quarteada e debulhada. Em seguida foi utilizado o medidor de umidade capacitivo de bancada modelo GEHAKA AGRI G929. As análises foram realizadas em triplicata no laboratório da recepção da COPLANA. O método de estufa foi realizado mensalmente para conferir os resultados dos determinadores a  $105 \pm 1$  °C, durante 24 horas para a determinação do teor de umidade (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

## **b) Impurezas**

As análises de impurezas foram realizadas nas amostras coletadas no caminhão, por sonda (aproximadamente 30kg). Cada amostra foi pesada, passada em peneira rotativa para separar as impurezas e debulhados da roça. Em seguida, na mesa de seleção, 4 selecionadoras separaram as impurezas, restando a amostra limpa. Pesou-se novamente a amostra, dessa vez sem impurezas. O cálculo de impureza foi obtido por diferença de peso da amostra inicial menos o peso da amostra final (sem casca) e o peso de debulhado de roça.

## **c) Rendimento**

Pesa-se 2500g de vagens de grãos, realiza-se a separação da casca, debulha-se, e então pesou-se apenas os grãos. A porcentagem de grãos internos representa o rendimento por saco de 25kg.

## **d) Análise de aflatoxinas total**

Para as análises de aflatoxina, foi empregada uma técnica fluométrica com coluna de imunoafinidade da marca "Afla-Test" da © 1993 VICAM LP - Afla B, sendo a leitura feita em fluorímetro, aprovada pela AOAC b (2000). As amostras foram coletadas na etapa da sonda descrita anteriormente, em que para cada análise foi realizado o preparo das sub-amostras conforme o procedimento da COPLANA, seguindo a RDC 274 de 2002, ANVISA – Ministério da Saúde – MS (BRASIL a, 2002).

Para a amostra de amendoim foram debulhados 25 kg de vagens, e separados 5 kg de grãos. Em seguida os grãos foram transformados em pasta homogênea, moída em malha 14, em sua totalidade, homogeneizada e, posteriormente, dividida em no mínimo em três partes. No laboratório de análises de aflatoxina, foram pesados 50 gramas de amostras, em triplicata; foi preparado o solvente de extração, misturando 7 partes de metanol com 3 partes de água destilada; a amostra foi colocada em um copo do liquidificador limpo e adicionada de 5,0 g de NaCl e 125 mL de metanol 70%; os grãos foram triturados com os solventes por 1 minuto em alta velocidade. O material homogeneizado foi filtrado, utilizando-se filtro qualitativo e 20



mL do extrato foi diluído em 40 mL de água destilada. Para a cromatografia em coluna de imunoafinidade, adicionou-se 15 mL do extrato diluído na coluna, mantendo-se um fluxo de uma a duas gotas por segundo; as colunas foram lavadas com 2 mL de água, mantendo-se um fluxo de uma a duas gotas por segundo; eluiu-se a coluna com 1 mL de metanol, mantendo-se um fluxo de uma a duas gotas por segundo, e recolheu-se o eluente em uma cubeta limpa; adicionou-se 1 mL do revelador diluído (1:10) na cubeta e agitou-se o conteúdo. Colocou-se num fluorímetro, previamente calibrado, e fez-se a leitura após 60 segundos (STROKA; ANKLAM, 2000). O fluorímetro foi calibrado previamente empregando-se amostras padrões de aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em concentrações conhecidas.

#### **1.2.2.11 Elaboração do plano APPCC**

Para a elaboração do plano APPCC, foram acompanhadas as etapas dos processos no campo, nas visitas durante as três safras, nas nove áreas e na COPLANA, desde do arranquio das vagens de amendoim até o 3º Mês de armazenamento, em que foram colhidos os dados para a elaboração do plano APPCC através de análise subjetiva e levantamento dos controles já realizados para o perigo químico aflatoxina.

Nessas visitas, os coordenadores de qualidade da empresa, os agrônomos e os produtores descreveram detalhadamente as etapas da produção e dos processos, e para cada etapa foram aplicados os sete princípios do APPCC, analisando os perigos biológicos, físicos e químicos elaborando as medidas preventivas, seu monitoramento e os limites de segurança e críticos, capazes de prevenir a sintetização da Aflatoxina pelos fungos. Para tanto foi adotada a metodologia do Codex Alimentarius Commission, (1997). Para a elaboração do plano foram aplicados os sete princípios do APPCC analisando-se o perigo químico Aflatoxina e suas medidas preventivas nas etapas dos fluxogramas. A descrição dos processos foi realizada através de relatos feitos pelos coordenadores de cada empresa e avaliações subjetivas no local.

### 1.2.2.12 Análises estatísticas

Os resultados das análises de solo de umidade e unidade formadoras de colônias foram constituídos por delineamento inteiramente casualizados utilizando ANOVA, a qual foi realizada com o software Minitab 16 (Minitab Inc., Pensilvânia, EUA). Os valores médios foram comparados por meio do teste de Tukey em  $p \leq 0,05$ .

Os resultados para a análise do solo e das vagens para, umidade e unidades formadoras de colônias foram analisados utilizando ANOVA para o delineamento experimental adotando blocos ao acaso em parcela subdividida (*“Split-plot”*), com três repetições usando o software Minitab® 16 (Minitab® Inc., Pensilvânia, EUA) (MINITAB, 2015). Os valores médios foram comparados por meio do teste de Tukey em  $p \leq 0,05$ .

As parcelas foram constituídas por três épocas de colheitas **S**<sub>1</sub> – Safra 1 (2011/2012), **S**<sub>2</sub> – Safra 2 (2012/2013), **S**<sub>3</sub> – Safra 3 (2013/2014); com seis subparcelas compostas das etapas desde a colheita a pós-colheita (**E**<sub>1</sub> - Arranque, **E**<sub>2</sub> – Antes da colheita mecânica, **E**<sub>3</sub> – Depois da colheita mecânica, **E**<sub>4</sub> – Sonda - Recepção, **E**<sub>5</sub> – Após o secador e **E**<sub>6</sub> – Terceiro mês de armazenamento), para as análises de umidade e unidade formadoras de colônias de fungos por grama (UFC.g<sup>-1</sup>) das vagens de amendoim.

## 1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1.3.1 Acompanhamento das informações agrometeorológicas

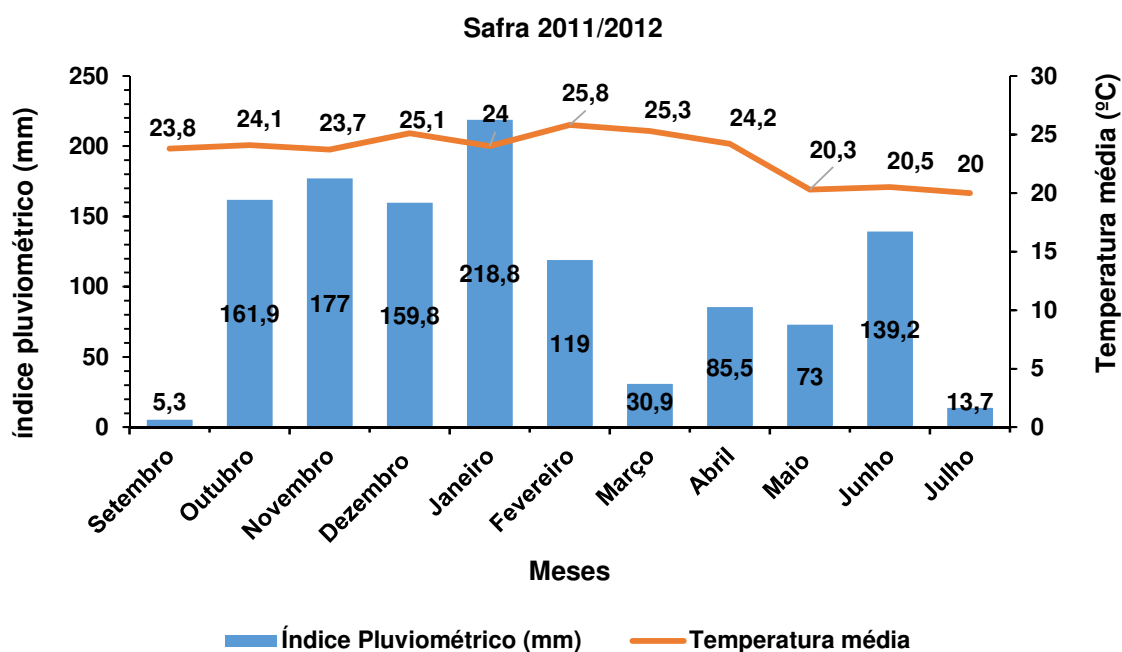
As colheitas foram feitas com o acompanhamento dos índices pluviométricos, informados pela própria COPLANA e por meio da previsão do tempo fornecida pelo Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO, 2015), conforme apresentado na Figura 1.8, 1.9 e 1.10. Pode-se observar os índices do mês de setembro ao mês de maio, período desde o plantio até a colheita. A data da colheita pode ter início no final do mês de fevereiro e se estende até o início de maio, conforme a data em que o produtor verifica o grau de maturação das vagens, que tem que estar de 60 a 70% das 200 vagens que compõem uma amostra coletada em cada área,

ideal para a sua realização. O mês de março da Safra 2011/2012 apresentou a precipitação de 30,9 milímetros de chuvas. Assim as colheitas ocorreram em março e abril que apresentaram índices ideais para a realização do arranque e secagem ao sol até atingir os índices de umidade em aproximadamente três dias, porém foi possível observar que na safra 2011/2012 no período de setembro a julho o total de chuvas acumulado foi de 1184,1 mm, com a temperatura média de 23,3°C e nesta safra a produção total foi de 294,7 mil toneladas (CONAB b, 2013; CIIAGRO, 2015).

Na safra de 2012/2013, a temperatura média foi de 23,9 °C e o total de precipitação de chuvas acumulado de setembro a julho foi de 1393,5 mm, foi possível verificar que as chuvas vieram no momento necessário para a granação das vagens e na época da colheita os índices foram menores. Isso resultou em uma produção recordi de 336,7 mil toneladas nesta safra (CONAB b, 2013; CIIAGRO, 2015).

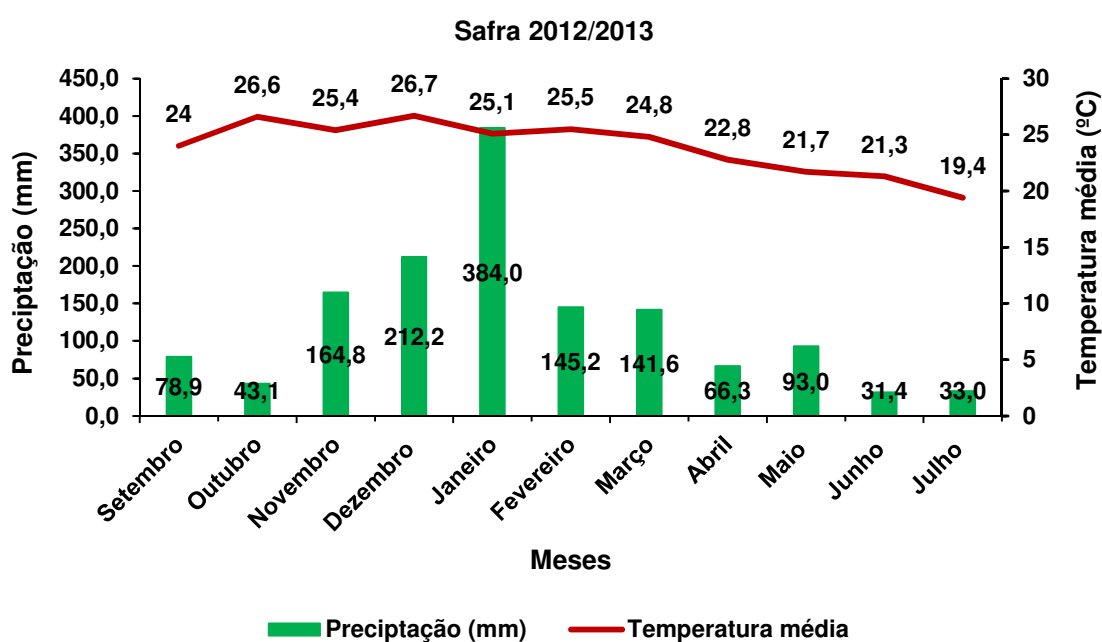
Na safra de 2013/2014 a temperatura média foi de 24 °C, sendo a precipitação acumulada dos meses de setembro a julho da foi de 920,3 mm, bem menor que nos anos anteriores, o que causou o *stress* hídrico na cultura, não proporcionando um aumento esperado na produção do Estado, pois naquele momento o volume de chuvas necessário para o crescimento da plantas e maturação dos grãos não ocorreu. A porcentagem de diminuição da produção em relação à safra 2012/2013 foi de 5,2 %, com um total produzido de 315,8 mil toneladas (CONAB, 2014; CIIAGRO, 2015).

**Figura 1.8:** Índice pluviométrico e temperatura média no município de Jaboticabal na safra de 2011/2012



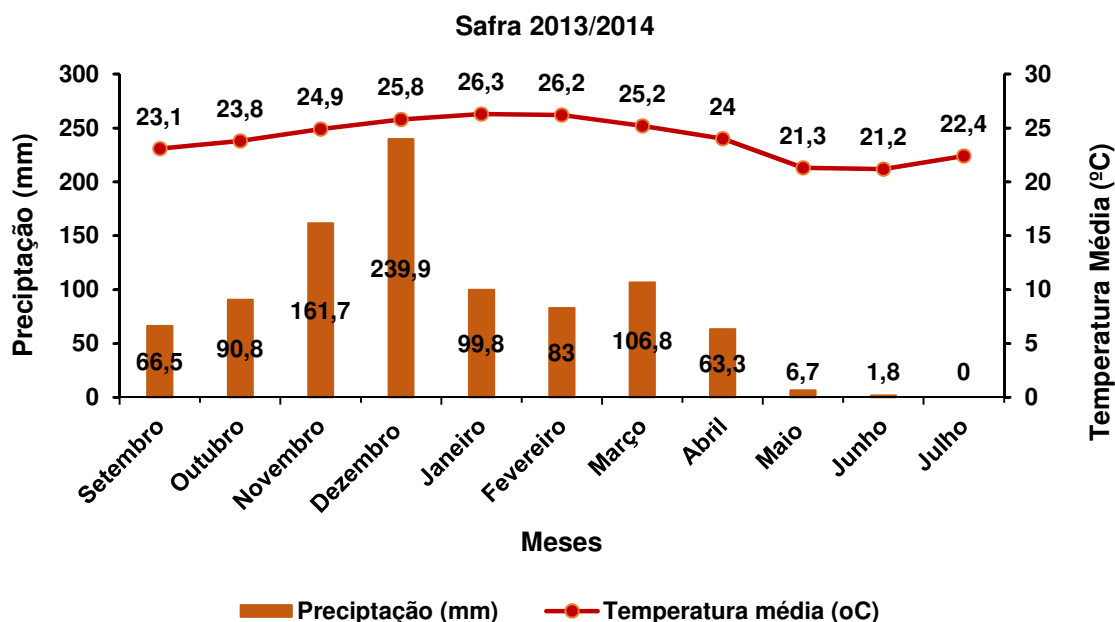
**Fonte:** Adaptado pela autora, extraído da resenha agrometeorológica do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO, 2015).

**Figura 1.9:** Índice pluviométrico e temperatura média no município de Jaboticabal na safra de 2012/2013



**Fonte:** Adaptado pela autora, extraído da Resenha agrometeorológica do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO, 2015).

**Figura 1.10:** Índice pluviométrico e temperatura média no município de Jaboticabal na safra de 2013/2014



**Fonte:** Adaptado pela autora, extraído da Resenha agrometeorológica do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO, 2015).

### 1.3.2 Umidade e infestação por fungos do solo

Na Tabela 1.2 são apresentados os resultados das análises das amostras de solo de cada área, nas três safras. Os resultados foram analisados e a análise de variância (ANOVA) esta apresentada no APÊNDICE A1, para a umidade, em base seca (b. s.) e no APÊNDICE A2, para a infestação por fungos, em unidades formadoras de colônias (UFC/g).

Na Safra 1, a umidade foi em média de 4,89 % b.s., apresentando-se baixa pois a colheita foi realizada no mês de abril e maio, meses em que os índices pluviométricos foram de 92,3 e 7 mm, respectivamente. Vale ressaltar que no mês de março, o índice foi muito alto, com 218,8 mm no momento de término da maturação dos grãos. A infestação fúngica apresentou-se em média de 6,42 Log UFC/g.

A Safra 2 apresentou 17,65 % b. s. de umidade média dos solos, bem mais alta que a safra anterior. Este acontecimento ocorreu pois a Área 1 realizou a sua

colheita após dias de chuvas intensas. Mesmo assim a contaminação fúngica apresentou o menor índice de infestação no solo que foi de 5,89 Log UFC/g.

Observou-se que na Safra 3 a média da umidade do solo foi de 15,69 % b.s., com um índice pluviométrico do mês de março de 106,8 mm e de abril de 63,3 mm. Nesta safra, nos meses do término da maturação ocorreu uma seca nos meses de janeiro e fevereiro como apresentado na Figura 1.10. As chuvas foram escassas, o que afetou a produção com um decréscimo de 5,2% da safra anterior. Ocorreu também um aumento da contaminação fúngica em média de 8,28 Log UFC/g. Foi possível avaliar que a contaminação fúngica foi elevada na safra S<sub>3</sub>, principalmente na Área 1 onde no solo apresentou a presença de *Aspergillus flavus*.

Nos solos analisados dessa pesquisa, foi possível observar a presença de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. Niger*, *A. fumigatus* entre outros fungos, que são característicos de um reservatório de inóculo primário. Também Horn et al. (2005), ao avaliar a contaminação fúngica de solos com plantação de amendoim observaram, nas diferentes áreas, a presença de *Aspergillus flavus*, *A. alliaceus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. terreus* e *A. fumigatus*, sendo a incidência de colonização em sementes analisadas e grãos de amendoim na ordem de 60,0% pela seção de *Aspergillus Flavi*, que incluía todas as espécies presentes no solo de campo.

Resultados semelhantes foram encontrados por Gonzalez, et al. (2008). Ao analisarem 20 amostras de solo da região de Junqueirópolis – SP., isolaram a espécie *A. flavus* na coleta de solo onde o grau de maturação do fruto do amendoim estava próximo da colheita com uma contagem de  $5,0 \times 10^3$  UFC/g, na frequência de 8,8 % das amostras, sendo que a atividade de água do solo variou de 0,93 a 0,99.

**Tabela 1.2:** Dados relativos a umidade base seca (% b.s.) e Unidade Formadoras de Colônias de fungos (log UFC/g) do solo na etapa do arranquio

| Safras                  | Áreas  | Médias das umidades<br>b. s. (%) $\pm$ desvio padrão | Log UFC/g<br>$\pm$ desvio padrão |
|-------------------------|--------|--|----------------------------------|
| Safr 1 – S <sub>1</sub> | Área 1 | 4,89 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>                         | 6,44 $\pm$ 0,41 <sup>A</sup>     |
|                         | Área 2 | 5,75 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>                         | 6,54 $\pm$ 0,06 <sup>A</sup>     |
|                         | Área 3 | 4,01 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>                         | 6,29 $\pm$ 0,20 <sup>A</sup>     |
| Safr 2 – S <sub>2</sub> | Área 1 | 25,21 $\pm$ 0,56 <sup>c</sup>                        | 5,63 $\pm$ 0,35 <sup>A</sup>     |
|                         | Área 2 | 13,27 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup>                        | 5,70 $\pm$ 0,35 <sup>A</sup>     |
|                         | Área 3 | 14,48 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>                        | 6,35 $\pm$ 0,38 <sup>A</sup>     |
| Safr 3 – S <sub>3</sub> | Área 1 | 11,21 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>                        | 9,77 $\pm$ 0,40 <sup>B</sup>     |
|                         | Área 2 | 16,54 $\pm$ 0,51 <sup>b</sup>                        | 7,42 $\pm$ 0,43 <sup>B</sup>     |
|                         | Área 3 | 19,34 $\pm$ 0,61 <sup>b</sup>                        | 7,67 $\pm$ 2,08 <sup>B</sup>     |

Diferentes letras minúsculas indicam que as safras diferiram estatisticamente entre si, em relação à umidade, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).  $n = 3$ .

Diferentes letras minúsculas indicam que as safras diferiram estatisticamente entre si, em relação à unidade formadora de fungos (UFC/g), pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).  $n = 3$ .

### 1.3.3 Umidade, aflatoxinas, impurezas e renda das vagens na etapa da sonda na coplana

Na Tabela 1.3 são apresentados os resultados das análises realizadas pela COPLANA na recepção (sonda), nas áreas selecionadas em cada safra. Observa-se que não há uma correlação efetiva entre a umidade dos grãos com os índices detectados de aflatoxina, uma vez que se observa os lotes com alta umidade e baixo teor de aflatoxina, por exemplo na Safra 2 a Área 2, ao passo que há áreas com umidades intermediárias e alto teor de aflatoxinas (Safra 1 - Área 3). Há uma tendência, a qual indica que valores muito baixos de umidade resultam em baixos teores de aflatoxinas (Safra 2 – Área 1; Safra 3 – Área 3).

Observou-se que na Safra 1 e Área 3, as impurezas foram de 13,27 %, com a maior porcentagem de todas as áreas. Sua concentração de aflatoxinas foi de 18,0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , a mais alta de todas as áreas.

Também pôde-se avaliar que as amostras de todas as áreas apresentaram umidade inferior a 22 % na recepção do beneficiamento, limite exigido pela legislação

(BRASIL, 2009), para serem secas artificialmente. O limite solicitado pela indústria, como segurança, tem como ideal estar menor de 16 % b.s.

**Tabela 1.3:** Dados relativos a umidade base úmida (b. u.), Aflatoxina total, Impurezas e Renda das vagens de amendoim na recepção da COPLANA

| Safra   | Área   | Umidade<br>(% b.s.) | Log<br>UFC.g <sup>-1</sup> | Aflatoxina<br>(µg.kg <sup>-1</sup> ) | Impurezas<br>% | Rendimento<br>% |
|---------|--------|---------------------|----------------------------|--------------------------------------|----------------|-----------------|
| Safra 1 | Área 1 | 16,5                | 6,77 ± 0,06                | 4,0                                  | 1,59           | 76,52           |
|         | Área 2 | 15,1                | 6,54 ± 0,29                | ND                                   | 10,45          | 74,32           |
|         | Área 3 | 12,5                | 6,48 ± 0,48                | 18,0                                 | 13,27          | 76,04           |
| Safra 2 | Área 1 | 7,0                 | 5,24 ± 1,75                | 2,0                                  | 5,6            | 80,0            |
|         | Área 2 | 17,7                | 8,15 ± 0,21                | 1,0                                  | 6,44           | 78,40           |
|         | Área 3 | 12,3                | 4,98 ± 0,71                | ND                                   | 10,42          | 78,72           |
| Safra 3 | Área 1 | 14,7                | 6,72 ± 0,22                | ND                                   | 8,84           | 76,16           |
|         | Área 2 | 17,5                | 8,00 ± 0,01                | 10,0                                 | 6,14           | 78,80           |
|         | Área 3 | 9,5                 | 6,93 ± 1,01                | 1,0                                  | 10,65          | 72,12           |

(\*) ND: não detectado

**Fonte:** Dados cedidos pela Cooperativa dos Plantadores da Zona de Guariba – COPLANA, de Jaboticabal, São Paulo.

Analisando-se as áreas de plantio isoladamente, apresentadas na Tabela 1.4, não é possível estabelecer-se uma relação direta entre teor de umidade e a contaminação fúngica das vagens com os teores detectados de aflatoxina. Nota-se que, ao mesmo tempo que um terço das amostras tiveram concentrações não detectadas de aflatoxina, duas amostras tiveram teores muito elevados, acima dos limites preconizados pelas legislações mais severas. Apesar da empresa adotar técnica de amostragem de vagens nos caminhões recomendada pela legislação vigente (BRASIL, 2013), é provável que tais amostras com teores elevados sejam correspondentes à colônias muito desenvolvidas do fungo, não sendo representativa da média das vagens. Ainda assim, representa um perigo evidente para o consumo humano. Embora não haja certeza estatística, observa-se uma tendência de aumento do teor de aflatoxina com o aumento da umidade das vagens quando a média dos teores entre as áreas, para a mesma safra, são comparados. Ao analisar a média das umidades entre as safras, constata-se uma variabilidade relativamente baixa (CV= 26,8%), o que facilita a programação da etapa de secagem no beneficiador.



**Tabela 1.4:** Dados relativos a umidade dos grãos (b. s.), Unidade Formadoras de colônias de fungos (Log UFC.g<sup>-1</sup>) e aflatoxina total das vagens de amendoim na recepção da COPLANA

| Safras             | Umidade das vagens (b. s.) | Média na safra (b. s.) | DP  | IC   | Média de Log UFC.g <sup>-1</sup> | Média na safra Log UFC.g <sup>-1</sup> | DP  | IC  | Teor de aflatoxina (µg.kg <sup>-1</sup> ) | Média na safra (µg.kg <sup>-1</sup> ) | DP  | IC   |
|--------------------|----------------------------|------------------------|-----|------|----------------------------------|--|-----|-----|---|---------------------------------------|-----|------|
| Saфра 1 - 2011/12  | Área 1                     | 16,5                   |     |      | 6,77                             |  |     |     | 4,0                                       |                                       |     |      |
|                    | Área 2                     | 15,1                   | 2,0 | 5,0  | 6,54                             | 6,59                                   | 1,1 | 0,2 | ND  | 7,33                                  | 9,4 | 23,5 |
|                    | Área 3                     | 12,5                   |     |      | 6,48                             |  |     |     | 18,0                                      |                                       |     |      |
| Saфра 2 - 2012/13  | Área 1                     | 7                      |     |      | 5,24                             |  |     |     | 2,0                                       |                                       |     |      |
|                    | Área 2                     | 17,7                   | 5,3 | 13,3 | 8,15                             | 6,12                                   | 1,7 | 2,0 | 1,0                                       | 1,0                                   | 1,0 | 2,9  |
|                    | Área 3                     | 12,3                   |     |      | 4,98                             |  |     |     | ND  |                                       |     |      |
| Saфра 3 - 2013/14  | Área 1                     | 14,7                   |     |      | 6,72                             |  |     |     | ND  |                                       |     |      |
|                    | Área 2                     | 17,5                   | 4,1 | 10,1 | 8,00                             | 7,21                                   | 0,7 | 0,8 | 10,0                                      | 3,7                                   | 5,5 | 13,7 |
|                    | Área 3                     | 9,5                    |     |      | 6,93                             |  |     |     | 1,0                                       |                                       |     |      |
| Média entre safras | 13,6                       |                        |     | 6,64 |                                  |  |     |     | 4,0                                       |                                       |     |      |
| DP                 | 3,7                        |                        |     | 1,1  |                                  |  |     |     | 6,1                                       |                                       |     |      |
| CV (%)             | 26,8                       |                        |     | 0,16 |                                  |  |     |     | 153,6                                     |                                       |     |      |
| IC                 | 2,8                        |                        |     | 0,72 |                                  |  |     |     | 4,7                                       |                                       |     |      |

(\*) ND: não detectado; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação (CV = DP/média); IC: intervalo de confiança a 95% de índice de significância.

### 1.3.4 Umidade das vagens nas etapas desde o arranque até o armazenamento

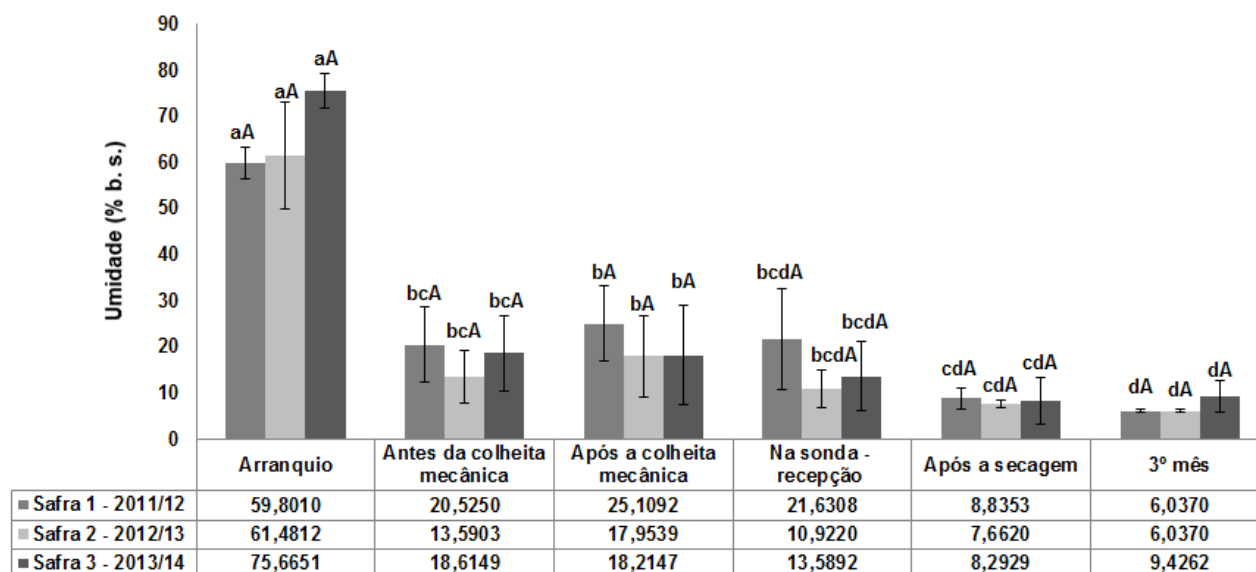
Na Figura 1.11 observa-se os dados de umidade dos grãos nas diferentes etapas da colheita e do beneficiamento para as três safras analisadas, a análise de variância (ANOVA) esta apresentada no APÊNDICE A3. Observa-se que não há diferença estatística entre as umidades nas três safras, em virtude da alta dispersão dos resultados observados nas diferentes áreas coletadas. Isto reverte-se num problema para o gerenciamento do beneficiador das vagens, uma vez que, ao final da etapa de secagem, todas as vagens a serem armazenadas devem ter o teor máximo de umidade de 11 % (BRASILa, 2003) e 10 % (C A C, 2003). Desta forma, a etapa de secagem terá tempo variável, não só devido às condições climáticas (temperatura e umidade relativa do ar), mas também pela diferença de umidade nas áreas de coleta variando em média de dois a três dias expostas ao sol.

Nota-se que no campo há diferença estatística na umidade das vagens apenas na etapa do arranquio, permanecendo constante até a recepção pelo beneficiador. Na etapa do arranquio, a umidade foi de 65,6 % b.s., resultados semelhantes foram obtidos por Araujo et al. (2014), ao analisarem as propriedades físicas de sementes de amendoim *Runner* IAC 886, no município de Dourados, MS., verificando que no arranque as sementes apresentavam umidade de 56 % b. s. e com a secagem ao sol verificou-se redução para 4 % b.s., com a redução do teor de água ocorre a redução do peso porem o valor pago é proporcional a vagens com teores dentro dos limites padrões da empresa menores que 18% b. u.

No beneficiador há uma redução progressiva da umidade, com significância estatística, havendo pouca diferença entre os valores absolutos das umidades, baixos desvios, entre as três safras, após a etapa de secagem, evidenciando que o processo está bem controlado e encontra-se dentro dos padrões impostos pelo beneficiador.

A maior dificuldade enfrentada pelos produtores é que a colheita ocorre no verão com grande probabilidade de ocorrência de chuvas na área, favorecendo a contaminação do amendoim. O beneficiador estabelece a umidade de 16 % na etapa da sonda, como limite de segurança, acima do qual o lote recebe um desconto no valor pago.

**Figura 1.11:** Média da umidade da vagens de amendoim nas etapas da colheita e pós-colheita nas safras S<sub>1</sub> - 2011/2012, S<sub>2</sub> - 2012/2013 e S<sub>3</sub> - 2013/2014



Médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas etapas não diferem a 5% de índice de significância, pelo teste de Tukey. Medidas seguidas de letras maiúsculas iguais não apresentaram diferenças significativas nas safras pelo teste de Tukey.

Com relação ao teor de água das vagens no momento do arranquio, Jorge (2008) encontrou teores de água para vagens um pouco menores que os encontrados neste trabalho, com índices de 42,2; 41,6 e 48,0% em propriedades no noroeste do Paraná.

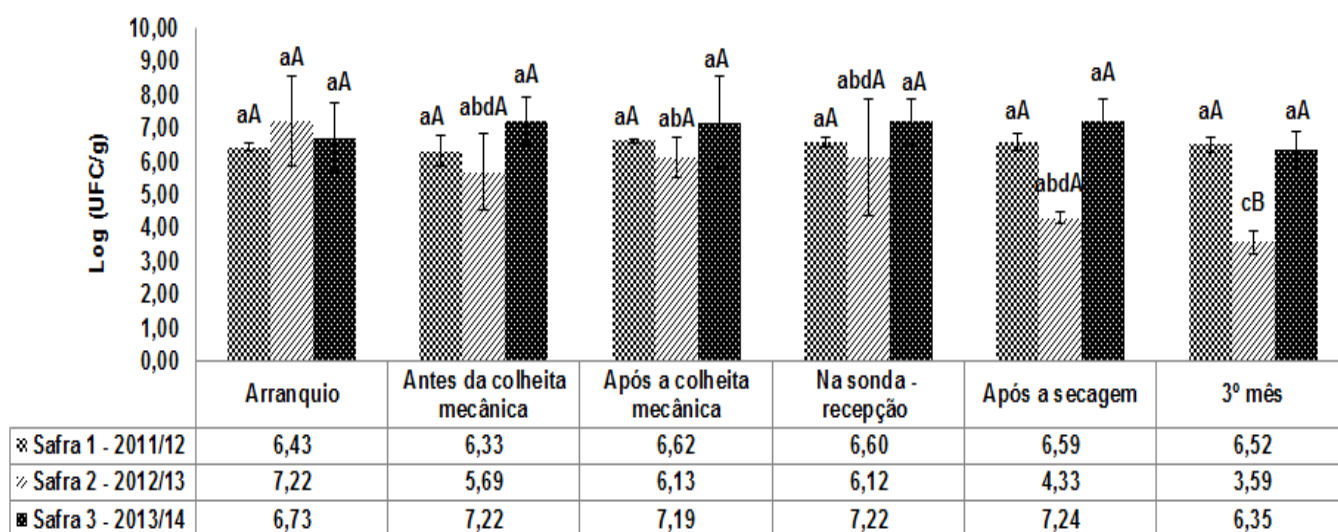
Após a recepção das vagens, a umidade foi monitorada e o amendoim foi descarregado na moega e encaminhado para a carreta secadora. A secagem foi realizada em secador de leito fixo com temperatura que não ultrapassaram 38° C, e com a umidade inicial dos grãos inferiores a 22 % b. s. até atingir a umidade final de no máximo 8 % como segurança e pela lei se estiver na vagem até 11% (BRASIL a, 2003).

Na recepção nem todos os produtores entregaram os lotes com umidade abaixo de 16% de umidade, o ideal. Assim, os descontos foram aplicados, pois foram necessários mais tempo de secagem para atingir os teores ideais para o armazenamento.

### 1.3.5 Infestação fúngica das vagens de amendoim nas etapas desde o arranque até o armazenamento

Na Figura 1.12 observa-se os resultados da análise de infestação fúngica nas várias etapas da colheita e da pós-colheita nas três safras analisadas. A análise de variância dos resultados esta apresentada no APÊNDICE A4, nota-se que não há diferença significativas nas médias do Log UFC/g entre as diferentes safras, à exceção da etapa de armazenamento. Entre as diferentes etapas, observa-se que não há diferenças significativas nas safras Safra 1 e Safra 3, porem só há diferença significativa para a etapa na Safra 2.

**Figura 1.12:** Índices de unidades formadoras de colônias de fungos nas etapas da colheita e pós-colheita nas safras S<sub>1</sub> - 2011/2012, S<sub>2</sub> - 2012/2013 e S<sub>3</sub> - 2013/2014



Médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas etapas não diferem entre si a 5% de índice de significância, pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas iguais denotam que as médias das UFC nas safras não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5 %.

A alta frequência de *A. flavus* e a presença de aflatoxinas foram verificadas em campos de amendoim de diferentes regiões do estado São Paulo (ATAYDE et al., 2012). Zorzete et al. (2011, 2013) relataram a presença de *A. flavus* em grãos e cascas de amendoim das variedades Runner IAC 886 e Caiapó em diferentes estágios de maturação, e também durante o armazenamento, assim como a presença de

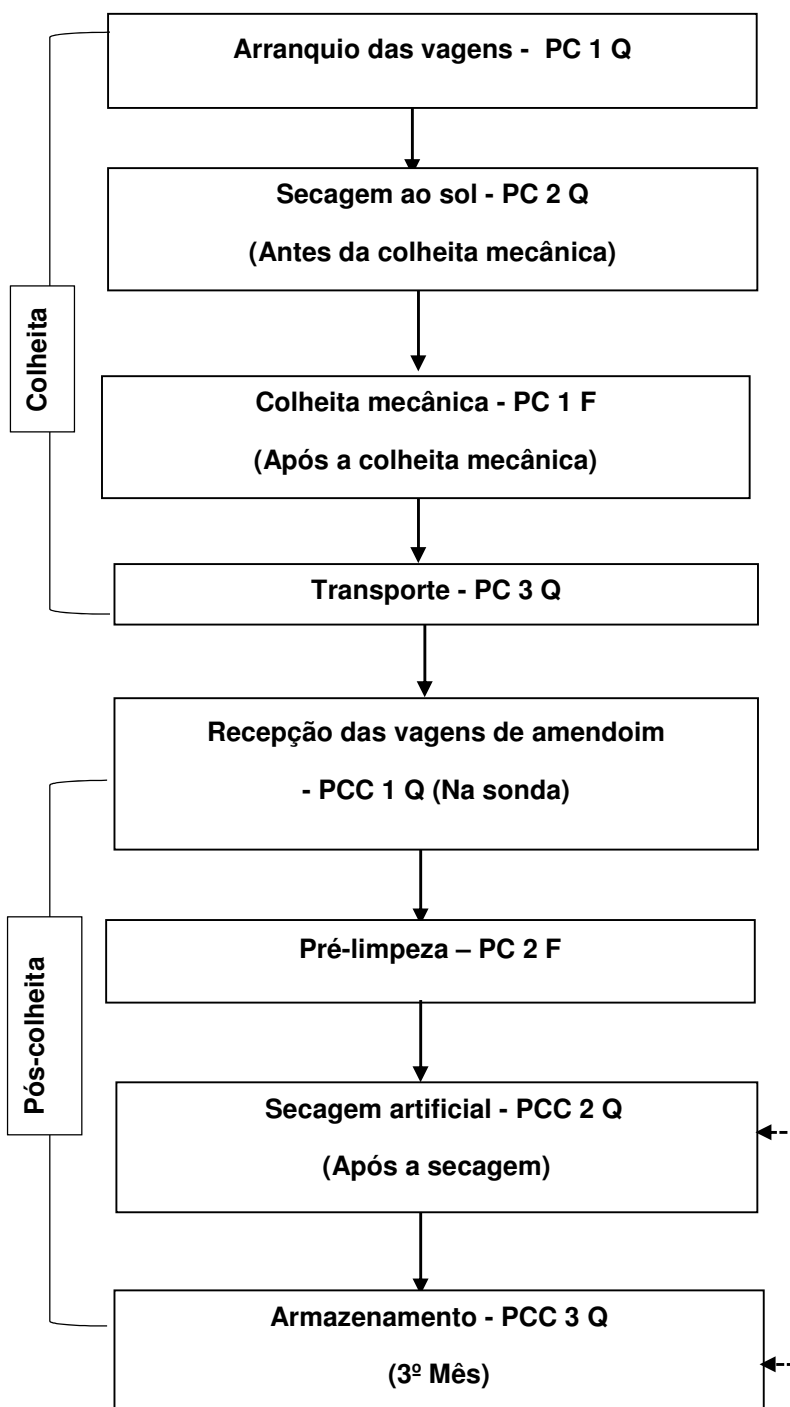
aflatoxinas e ácido ciclopiazônico (ACP). Gonzalez, et al. (2013) isolaram 47 cepas de *A. flavus*, em média. As isoladas no campo produziram maior quantidade de aflatoxinas ( $AFB_1 = 5.309,88 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) em relação às isoladas no armazenamento ( $AFB_1 = 1.182,91 \text{ mg}/\text{kg}$ ), confirmando o decréscimo de contaminação no armazenamento quando este é realizado em condições adequadas.

O estudo realizado por Souza, et al., (2014), no município de Maringá - PR, demonstrou que *Aspergillus* spp. foi detectado desde o plantio até a colheita, com uma frequência de 5,3 a 36,4% do total das amostras analisadas. Nos oito meses de armazenamento, foi observada a frequência de 96 % do *Aspergillus* spp. de 25 amostras de amendoim da safra 2008/2009 e as amostras armazenadas apresentaram um potencial toxigênico, mostrando que as condições de produção contribuem para a suscetibilidade de colonização com fungos aflatoxigênicos durante diferentes estágios.

### **1.3.6 Plano APPCC nas etapas da colheita até o armazenamento das vagens de amendoim**

#### **1.3.6.1 Fluxograma e descrição dos processos**

Na elaboração do plano APPCC das etapas da colheita até o armazenamento das vagens de amendoim, foi definido primeiramente o fluxograma do processo e as etapas que foram amostradas nas análises, apresentados na Figura 1.13 Para a elaboração da descrição destas etapas, foram obtidas as informações durante a coleta das amostras nas safras. As principais máquinas e equipamentos utilizados nas etapas da colheita e pós-colheita encontram-se apresentados na Figura 1.14.

**Figura 1.13:** Fluxograma da colheita e pós-colheita

Fonte: Elaborado pela autora

**Figura 1.14:** Fotos dos equipamentos utilizados na colheita e pós-colheita, arrancador (a), colheitadeira (b), carreador (c), caminhão transportador e sonda de amostragem (d), carretas secadoras de leito fixo (e) e *big beg* no armazenamento (f).



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

**Fonte:** Foto cedida pela Cooperativa dos Plantadores da Zona de Guariba – COPLANA, de Jaboticabal, São Paulo.

Nas vistas técnicas realizadas às áreas de colheita e na COPLANA, foram entrevistados os produtores, agrônomos e coordenadores, com as informações foram descritos a seguir as etapas da colheita e pós-colheita.

## **COLHEITA**

### **✓ Arranquio das vagens de amendoim**

Para a realização do arranquio das vagens de amendoim (frutos), os produtores analisaram o grau de maturação e identificaram do ponto ideal para arranquio das plantas, por meio de um acompanhamento frequente da maturação das vagens, pois estas não se formam ao mesmo tempo. Para esta análise do amendoim (*Runner IAC 886*) foi realizado a coleta das vagens a ser colhida, e por meio da análise de 200 vagens em cada amostra, em triplicata, avaliou-se a cor da casca das vagens que para estar maduras apresentaram manchas marron escuro na face interior. Potanto, quando 60 a 70% das vagens analisadas apresentaram a coloração ideal foi então aprovado a realização da colheita. Também foi consultado a previsão pluviométrica da região, não indicando período de chuvas ocorreram as colheitas. O arranquio foi realizado com o uso de uma arrancadora, apresentada na Figura 1.14, invertendo-se todas as plantas deixando as vagens expostas ao sol.

### **✓ Secagem ao sol – (Antes da colheita mecânica)**

A secagem das plantas foi realizada em contato com o sol, dispostas em leiras, com as vagens voltadas para cima, onde permaneceram por alguns dias para a sua secagem natural, que é chamada de “cura”, ocorrendo em poucos dias, desde que não chovesse. A umidade das vagens foi analisada com o auxílio de equipamentos portáteis com amostragem da área coletando-as em cinco pontos, debulhadas, sendo desenodoadas somente se a média das análise estivessem inferior a 16 % como segurança.

### **✓ Colheita mecânica – (Após a colheita mecânica)**

Após as análises de umidade, foi realizado o recolhimento das vagens na trilha separando as plantas das vagens (despendoamento). Foi realizado por um trator capaz de tracionar uma colheitadeira, apresentada na Figura 1.14, que separou as



vagens das ramas e conduziu as vagens ao tanque graneleiro, onde foram armazenadas até a realização do transbordo para caminhões.

#### ✓ **Transporte**

O transporte dos lotes de vagens de amendoim foi realizado em caminhões graneleiros, apresentado na Figura 1.14, que são indicados para o transporte de produtos agrícolas a granel. A carga é acondicionada e coberta para que não ocorra o aumento da umidade durante o transporte em caso de chuvas. Os modelos podem ser utilizados em multicomposições como bitrem e rodotrem, atingindo capacidade máxima de 10 a 23 toneladas para as composições sem reboques (BRASIL, 2006). Atualmente esta sendo implantado o transporte com caminhões que possuem o Tombador Lateral Hilo, muito utilizados para a cana de açúcar.

### **PÓS-COLHEITA:**

#### ✓ **Recepção das vagens (Sonda)**

Na recepção dos lotes ocorreu uma amostragem da carga de vagens, por uma sonda pneumática, sendo retirados 30 kg de vagens de cada caminhão em três pontos sorteados aleatoriamente. Da amostra, foram realizadas as análises de rendimento, umidade, impurezas e aflatoxina. O pagamento dos lotes foi determinado por essas análises, sendo descontados os valores conforme o aumento de cada um destes índices. Quanto ao índice de aflatoxina, quando o lote apresentou o teor superior a 20 µg/kg, este foi destinado para produção de óleo (BRASIL a, 2003).

#### ✓ **Pré-limpeza**

Nesta etapa, as vagens sofrem duas pré-limpezas, retirando-se as impurezas grosseiras, em uma grelha vibratória onde são retidos os galhos, pedras e sujidades, e as vagens caem na carreta de secagem. Em seguida, as vagens são encaminhadas para a secagem artificial.

#### ✓ **Secagem artificial - (Após a secagem)**

A secagem foi realizada na carreta secadora por meio de ventilação de ar aquecido. O ar é aquecido em pressurizadores que a cada 15 segundos queimam gás

liquefeito de petróleo (GLP) e injetam ar quente no interior da carreta. Esta secagem deve ser feita com temperatura não ultrapassando 38 - 40 °C, para que não haja quebra dos grãos durante o beneficiamento posterior à secagem. O ar quente é insuflado na parte lateral da carreta e, por uma canaleta e no interior, passa de maneira ascendente pela massa de vagens. Cada carreta comporta cerca de 250 sacas de 25 kg de amendoim em vagem, cuja umidade inicial nos grãos situa-se entre 18 % e 16 %. O controle desta umidade é realizado por amostragem no secador em três pontos durante o período de 20 a 24 horas de secagem, até atingir 8 % de umidade nos grãos, sendo o índice 9 % para grãos e de 11% para vagens, índice exigido para o armazenamento das vagens na legislação vigente (BRASIL a, 2003).

#### ✓ **Armazenamento**

O armazenamento foi realizado em *big bag* jumbo 250 (Figura 1.14), com capacidade de 1 m<sup>3</sup>, em galpões com temperatura inferior a 30°C e umidade relativa do ar monitoradas para obter-se índices inferiores 68%. Os galpões possuem um sistema de circulação de ar que mantém a temperatura e a umidade relativa do ar em condições para não ocorrer o aumento da umidade dos grãos. Para o controle de pragas, são realizados expurgos periodicamente, e as vagens são beneficiadas conforme os pedidos dos clientes, sendo destinados para o mercado interno e externo. As vagens são encaminhadas para o beneficiamento conforme os pedidos durante o ano.

#### **1.3.6.2 Identificação dos pontos de controle e pontos críticos de controle**

Para apresentar o resumo do plano APPCC para a avaliação do perigo Biológicos (B), Químicos (Q) e Físicos (F), das etapas de colheita e pós-colheita, foi levado em consideração os pontos de controle (PC) das etapas, que são monitorados pelos procedimentos das Boas Práticas Agrícolas e de Fabricação, e os pontos críticos de controle (PCC) com os controles a serem realizados com os limites críticos e de segurança, que estão apresentados no Quadro 2, que também apresenta os perigos, medidas preventivas, limites críticos e de segurança, e os monitoramentos.

Quadro 1.2: Resumo do Plano APPCC para a colheita e pós-colheita.

| Etapas da colheita                                  | Perigo PC ou PCC   | Medidas preventivas  | Limites críticos e de segurança  |
|---|--|--|--|
| <b>Arranquio das vagens</b>                         | <b>PC 1 Q</b> - Micotoxinas, Micro-organismos patogênicos (Fungos) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• A colheita deve ser realizada após a análise de maturação das vagens com a certeza do ponto ótimo de maturação.</li> <li>• Realizar o arranque em dias secos sem chuvas.</li> <li>• É importante que ocorra toda a inversão das plantas e que o arrancador receba toda a manutenção preventiva</li> </ul> | Limite de segurança: 60 – 70 %<br>Limite crítico: 80 a 90 % das vagens amostradas.<br>Ausência de chuvas |
| <b>Secagem ao sol</b>                               | <b>PC 2 Q</b> - Micotoxinas Micro-organismos patogênicos (Fungos)  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Secar ao sol até a umidade das vagens atingirem a umidade a nível seguro.</li> <li>• Antes do recolhimento deve-se realizar amostragem na área e fazer a análise de umidade em aparelhos portáteis.</li> <li>• Realizar em dias sem chuvas.</li> </ul>  | Limite crítico: Umidade < 18%<br>Limite de segurança: Umidade <16 %<br>Ausência de chuvas                |
| <b>Colheita mecânica e recolhimento da-s vagens</b> | <b>PC 1 F</b> - Galhos, pedras e sujidades.                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Realizar de manutenção preventiva da colheitadeira com ajustes adequados para ocorrer a separação dos galhos, folhas e pedras, pois estes comprometem a qualidade do amendoim e acarretam em descontos no lote.</li> </ul>  | Controle de evidências de sujidade em excesso.   |
| <b>Transporte</b>                                   | <b>PC 3 Q</b> - Micotoxinas Micro-organismos patogênicos (Fungos)  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• O transporte deve ser realizado em caminhões com proteção de chuvas e o mais rápido possível para que a secagem artificial possa ser realizada, para prevenir as condições de proliferação dos fungos micotoxigênicos e micro-organismos patogênicos.</li> </ul>  | Presença de proteção da carga. Tempo de transporte.  |

Quadro 1.3: Resumo do Plano APPCC para a colheita e pós-colheita.

| Etapas da pós-colheita                     | Perigo PC ou PCC   | Medidas preventivas   | Limites críticos e de segurança   |
|--|--|---|---|
| <b>Recepção das vagens (Sonda)</b>         | <b>PCC 1 Q</b> –Micotoxinas, Micro-organismos patogênicos (Fungos)       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Amostrar a carga no caminhão e analisar a umidade, impurezas, renda, aflatoxinas.</li> <li>• Deve ser enviados para a produção de óleo os lotes que apresentarem os limites acima de aflatoxinas e terão diminuição do seu valor.</li> <li>• Após as análises são encaminhados para a secagem artificial o mais rápido possível para prevenção da multiplicação dos fungos micotoxigênicos.</li> </ul> | Limite crítico: Umidade < 18 % b. u.<br>Limite de segurança: Umidade < 10 % b. u.<br>Limite crítico Aflatoxinas totais: <20 µg.kg <sup>-1</sup> (Brasil), < 15 µg.kg <sup>-1</sup> (EUA)<br>< 4 µg.kg <sup>-1</sup> (CE). |
| <b>Pré-limpeza</b>                         | <b>PC 2 F:</b><br>Galhos, pedras e sujidades.                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Os lotes devem ser encaminhados para as peneiras para a retirada das sujidades como galhos, pedras, insetos e materiais que possam dificultar a secagem e armazenamento e contribuir para aumentar a contaminação das vagens.</li> </ul>   | Limites de segurança: Ausência de sujidades<br>Limite crítico: nível de sujidades máximo de 1 %   |
| <b>Secagem artificial (Após a secagem)</b> | <b>PCC 2 Q</b> –Micotoxinas, Micro-organismos patogênicos (Fungos)       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Controle de umidade das vagens de amendoim durante a secagem;</li> <li>• A temperatura de secagem não pode ultrapassar 40 °C.</li> <li>• Manutenção preventiva dos equipamentos.</li> </ul>  | Limite crítico: Umidade dos grãos < ou = a 8 % b. u. e Umidade das vagens < 11% (BRASIL, 2003).<br>Limite de segurança: Umidade < 8 % b. u.<br>Limite crítico: T < 40 °C  |
| <b>Armazenamento</b>                       | <b>PCC 3 Q</b> –<br>Micotoxinas<br>Micro-organismos patogênicos (Fungos) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Realizar o monitoramento da umidade relativa e o controle da temperatura do armazém.</li> <li>• Realização de controle integrado de pragas e cuidados com a prevenção de goteiras e infiltrações no armazém.</li> <li>• Realizar as Boas Práticas de Fabricação (BPF), com e manutenção preventiva dos equipamentos.</li> </ul>  | Limites críticos: Umidade relativa < 70 %, Temperatura < 30º C. (BRASIL, 2009)<br>Limite de segurança: Umidade relativa < 68 %<br>Temperatura < 25º C.  |

## 1.4 CONSIDERAÇÕES

As infestações de vagens de amendoim ocorrem desde as etapas de pré-colheita, devido à infestação do solo, e prossegue até a etapa final do beneficiamento, no armazenamento e só recebe o tratamento térmico, na indústria de derivados com a torra. Em todas as etapas, caso haja condições favoráveis à proliferação de fungos, aumentará a probabilidade de haver contaminação do perigo químico aflatoxinas. Somente com a aplicação de Boas Práticas Agrícolas, de Fabricação e da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle esse perigo pode ser reduzido e até eliminado.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

- ✓ Na análise da umidade e infestação por fungos do solo foi possível concluir que a umidade apresentou-se em média baixa devido à colheita ser realizada sem presença de chuvas e a infestação fúngica apresentou maiores índice na Safra 2013/2014, ano com um menor índice pluviométrico.
- ✓ Nas análises das vagens em todas as etapas notou-se a importância da secagem ao sol e artificial para ocorrer a redução da umidade e obter-se o controle da infestação fúngica durante todo o processo, e conseqüentemente prevenir a o perigo químico aflatoxinas nos grãos.
- ✓ O plano APPCC propôs as medidas preventivas na colheita com controle do perigo químico aflatoxina com a aplicação dos pontos de controle (PC) nas etapas de arranquio, secagem ao sol e transportes, e do perigo físico na etapa de colheita mecânica para o controle da colheitadeira em separar as vagens dos galhos e suguidade, todos realizados pelas Boas Práticas Agrícolas em cada etapa. E com a aplicação dos pontos críticos de controle (PCCs) que devem ser realizados nas etapas de recepção, secagem artificial e no armazenamento para o perigo químico aflatoxinas e na pré-limpeza para o perigo físico, ambos previndo o aumento da contaminação fúngica.
- ✓ Ao avaliar as condições necessárias em todas as etapas é possível sugerir a aplicação do biofungicida na etapa anterior a secagem artificial para a redução e/ou eliminação dos fungos.

## ***CAPÍTULO 2***

### ***Ação fungitóxica de extratos e óleos essenciais de plantas sobre *Aspergillus flavus* L.***

---

*Teresa Cristina Castilho Gorayeb*

## 2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1.1 Biofungicidas extraídos de plantas

A utilização das plantas como os primeiros recursos terapêuticos é conduzida pelo homem no mundo na busca por compostos capazes de erradicar ou prevenir doenças. No Brasil, esse conhecimento tem primórdios com os índios e os escravos nas senzalas. Atualmente, por meio da ciência, chegou-se aos fitoterápicos, que são medicamentos, pesticidas, herbicidas e fungicidas obtidos a partir de plantas medicinais com o emprego de matérias-primas ativas dos vegetais, animais e micro-organismos.

O controle químico continua a ser a principal medida para reduzir a incidência de doenças de pós-colheita em vários alimentos. Produtos químicos antimicrobianos pertencentes ao grupo dos benzimidazóis, hidrocarbonetos aromáticos e inibidores da biossíntese de esterol são frequentemente usados como tratamentos de colheita. A aplicação de altas concentrações desses químicos sintéticos, em uma tentativa de controlar a deterioração pós-colheita de produtos alimentares, aumenta o risco de resíduos tóxicos nos produtos. Devido à crescente sensibilização dos efeitos poluentes, residuais, cancerígenos e fitotóxicos de muitos fungicidas sintéticos, a importância dos produtos alternativos para controlar fungos fitopatógenos é significativa (BANKOLE, 1997; SIMKO, 2005; CHILVERS et al., 2006, CHAGAS et al., 2014).

Diferentes métodos de extração de substâncias vegetais disponibilizam uma grande variedade de compostos ativos com conhecida ação antimicrobiana. A água é um dos solventes mais utilizados para a extração de compostos tais como taninos, saponinas, terpenóides, polipeptídeos e lectinas (COWAN, 1999).

A hidrodestilação, com o uso da água, é o método mais utilizado para a extração de óleos essenciais dos materiais vegetais. Essa extração, utilizada em bancada de laboratório, é realizada por meio de aparelho tipo *Clevenger* devido ao fácil manejo, a suspensão de água e plantas são fervidas até a ebulição, resultando na formação de vapores que arrastam os compostos voláteis, os quais, após condensação, separam-se da fase aquosa por decantação. A composição dos óleos

essenciais pode ser influenciada, no processo, pelo contato com a água, tempo de extração e velocidade de aquecimento (PRINS et al., 2008).

Os óleos essenciais são caracterizados como metabólitos secundários de plantas e de baixa toxicidade a mamíferos. O uso dos extratos de vegetais e óleos essenciais tem sido relatado como potente fungicida e inseticida natural, apresentando resultados promissores para uma utilização prática no controle de diversos fitopatógenos. No entanto, a toxicidade desses óleos e extratos tem de estar dentro de limites de segurança para os consumidores (FRANCO; BETTIOL, 2000; SANTOS, SOUZA; REZENDE, 2007; MITCHELL et al., 2010, LIMA et al., 2012).

Os óleos essenciais são constituídos por substâncias de baixa massa molecular, geralmente lipofílicas, características que permitem uma penetração eficiente na membrana celular. Estudos comprovaram que os óleos essenciais penetram nos tecidos cerca de 100 vezes mais rapidamente que a água, uma característica que confere aos compostos fenólicos, como o eugenol, atividade antimicrobiana (AFFONSO et al., 2012 apud PAWAR; THAKER, 2006). A vantagem dos óleos essenciais é sua bioatividade na fase vapor, uma característica que os torna atraentes como fumigantes viáveis para proteção de produtos armazenados.

### 2.1.2 As plantas e suas ações antifúngicas

Nesta pesquisa as plantas utilizadas para avaliar sua ação fungicida contra o *Aspergillus flavus* L. foram: **canela** (*Cinnamomum zeylanicum*), **cravo da índia** (*Syzygium aromaticum*), **capim-limão ou cidreira** (*Cymbopogon citratus*), **orégano** (*Origanum vulgare*) e **manjerição ou alfavaca** (*Ocimum basilicum*).

#### 2.1.2.1 Canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

A canela é obtida da parte interna da casca do tronco e é muito utilizada na culinária como condimento e aromatizante, bem como na preparação de certos tipos de chocolates e licores. Na medicina é empregada como os óleos destilados e é conhecida por “curar” resfriados. O sabor e aroma intensos vêm do aldeído cinâmico ou cinamaldeído.



A *Cinnamomum zeylanicum* Blume, da família Lauraceae, mostrou muitas propriedades biológicas como analgésico, anti-séptico, antiespasmódico, afrodisíaco, adstringente, carminativo, inseticida e parasiticida. *C. zeylanicum* é nativa da Indonésia, sendo amplamente cultivada em muitas regiões brasileiras (ALMEIDA, 1993).

Hoffmann et al. (1998) verificaram a inibição de leveduras e bactérias com a aplicação de três diferentes concentrações (10,0; 1,0 e 0,1%) de quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias (canela, cravo, gengibre e menta) e a inibição foi positiva para os óleos essenciais de canela e menta, nas concentrações de 10,0 e 1,0%, assim como para o óleo essencial de cravo, na concentração de 10,0%.

Há dois tipos de canela, ambos cultivados no Brasil. A canela-verdadeira (*Cinnamomum zeylanicum*), também conhecida como canela-do-ceilão, é natural do Sri Lanka (o antigo Ceilão) e é mais adocicada e suave. Ao passo que a canela-de-cássia (*Cinnamomum cassia*), ou canela-da-china, possui sabor mais picante. Originária da antiga Birmânia, é utilizada na China desde 2500 a.C. A canela *Cinnamomum zeylanicum* Blume tem suas folhas utilizadas para extração de óleos essenciais, sendo a parte mais valorizada a casca dos ramos. No comércio encontra-se a canela em pó, rasurada e em cascas enroladas em si mesmas (MORSBACH, 1997).

Viegas et al. (2005) após avaliarem a inibição de 32 isolados de *Aspergillus flavus* obtidos de amendoim do cultivo da safra das águas e safrinha de 2001, pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, concluíram que a maior inibição relativa *in vitro* do desenvolvimento micelial de *A. flavus* foi obtida com o emprego dos óleos essenciais de bulbilho de alho e principalmente, de folhas de canela resultando em cerca de 86% de inibição.

#### **2.1.2.2 Cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.)**

O nome cravo, em português, deriva da palavra latina *clavus*, que significa “prego”, devido a sua aparência física. No inglês, o nome *clove* derivou do francês *old clou*, que está relacionado ao verbo unir (KIPLE; ORNELAS, 1999).

A árvore produtora do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) é característica nas Molucas do Norte (Arquipélago de Molucas - Indonésia), tendo sido disseminada pelos alemães durante a colonização em outras ilhas do arquipélago, assim como em outros países. Atualmente, Zanzibar e Madagascar são os principais produtores de cravo-da-índia, seguidos pela Indonésia (MAZZAFERA, 2003). Nas folhas ele chega a representar aproximadamente 95% do óleo extraído (RAINA et al., 2001) e na flor do cravo o eugenol é também o principal componente do óleo, variando de 70 a 85% (BROWN; MORRA, 1995). No Brasil, praticamente apenas a Bahia cultiva a planta e os cultivares localizam-se na região do Baixo Sul (Valença, Ituberá, Taperoá, Camamu e Nilo Peçanha) (SACRAMENTO; CASALI; PEREIRA et al., 2001; FRAILE – FILHO; CESAR; RAMOS, 2005).

O eugenol ( $C_{10}H_{12}O_2$ ) é um líquido claro, amarelo pálido, oleoso, extraído de brotos e folhas de cravo (*Eugenia caryophyllata* polegar) e de imbuia. Eugenol constitui o mais significativo componente ativo do óleo de cravo da Índia (85 a 95%), além do iso-eugenol e metileugenol. Ele é amplamente usado em perfumes e enxaguantes bucais e como analgésico dental. Esse monoterpene é bastante estudado por suas propriedades antimicrobianas na indústria de alimentos (OUATTARA et al., 1997; VAZQUEZ et al., 2001).

O mecanismo primário de ação do eugenol, em concentração bactericida e fúngica, promove a ruptura da membrana citoplasmática, aumentando a sua permeabilidade não específica. Essa hiperpermeabilidade promove o extravasamento de íons e a perda excessiva de outros componentes celulares, incluindo as proteínas intracelulares resultando, finalmente, em morte celular (DEVI et al. 2010).

Pesquisas mostram que o óleo essencial do cravo-da-índia pode ser usado como agente fungicida no combate de doenças no cultivo da banana, milho e como alternativa em seu tratamento pós-colheita (CRUZ et al., 2009, TATSADJIEU et al., 2010,).

Passone et al. (2012) avaliaram o potencial antifúngico de óleos essenciais de cinco plantas: boldo (*Pëumus boldus* Astyanax), poleo (*Lippia turbinata*), cravo (*Syzygium aromaticum* L.), anis (*Pimpinella anisum*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) contra estirpes de *Aspergillus flavus* e *parasiticus*, inoculando em amendoim com diferentes (0,95; 0,98 e 0,93) níveis de atividade de água (aw). A aplicação de altas concentrações desses óleos essenciais (2500 mL.L<sup>-1</sup> de boldo e poleo e 1500 mL.L<sup>-1</sup>

para cravo) inibiram completamente espécies de *Aspergillus*, independentemente da disponibilidade de meio aquosa.

Rana; Rana e Rajak (2011) obtiveram, com o óleo essencial de cravo-da-índia (*S. aromaticum*), atividade excelente contra todas as cepas fúngicas de *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus sp.* e *Mucor sp.*, na concentração de 10  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  a inibição foi total. O mesmo ocorreu com o eugenol em, sua quantificação no óleo de cravo por análise em Cromatografia - High Performance/Pressure Lique Chromatography (HPLC) foi observado 68,73% de presença.

O óleo essencial do cravo da Índia pode ser extraído em laboratório hidrodestilador do tipo Clevenger, mas para a produção em larga escala o processo de extração mais utilizado atualmente é a hidrodestilação por arraste a vapor (RADÜNZ et al., 2001). No entanto, para a obtenção dos extratos aquosos e alcoólicos é realizado o método de infusão da planta em água ou álcool, e posterior concentração em rotoevaporador (PRISTA; ALVES, 1996).

### 2.1.2.3 Capim-cidreira ou Capim-limão (*Cymbopogon citratus*)

O capim-limão ou cidreira (*Cymbopogon citratus*), pertencente à família das Poaceae, é uma planta aromática cultivada para produção comercial de óleo essencial, o qual geralmente apresenta como constituintes majoritários os monoterpenos citral (mistura isomérica de neral e geranial) e o mirceno. É largamente empregado como aromatizante em perfumaria e cosmética, na preparação de colônias, sabonetes e desodorantes (PRINS et al., 2008).

O capim-cidreira também é conhecido como capim-cidrô, capim-limão, capim-cidreira, capim-cidrão, chá de estrada, erva-cidreira. É uma erva perene, cespitosa, formando touceiras compactas e robustas de até 1,2 m de altura, com rizoma semi-subterrâneo; é usado em perfumaria para a produção de  $\beta$ -ionona (aroma de violetas), na síntese da vitamina A, como bactericida, além de possuir ação fungistática; sua procura ocorre no mercado nacional e internacional, com preços considerados compensadores (CASTRO; RAMOS, 2003; RAUBER et al., 1999).

Originário da Ásia e subspontânea nos países tropicais, as folhas do capim-limão são aromáticas, pontudas, ásperas e estreitas. A planta é usada como

antiespasmódico, calmante, analgésico e contra dores estomacais. Seu óleo essencial contém citral (47% a 85%), geraniol, mircenol, dentre outros (MARTINS et al., 2002).

Segundo Bankole e Joda (2004), o óleo essencial e o pó das folhas de capim limão reduzem a extensão da deterioração em sementes de melão inoculadas anteriormente com *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. tamarii* e *Penicillium citrinum*. Os autores verificaram, também, que o óleo essencial de capim-limão nas concentrações de 0,1 e 0,25% (v/m) proporcionou significativa redução da produção de aflatoxina em sementes descascadas e inoculadas com *A. flavus*. Altas concentrações do óleo essencial (0,5 e 1,0 v/m) preveniram completamente a produção de aflatoxina nas sementes.

Viegas et al. (2005) estudaram sobre a toxicidade de óleos essenciais contra grupo do fungo *Aspergillus*. Eles observaram que a maior inibição relativa, *in vitro*, do desenvolvimento micelial de *A. flavus* foi obtida com o emprego dos óleos essenciais de bulbilho de alho e principalmente, de casca de canela, mas a de capim-limão foi baixa. Existe variabilidade na população do fungo quanto à sensibilidade aos óleos. Novos estudos são necessários a fim de comprovar a eficiência dessas substâncias no controle de *A. flavus* em sementes destinadas ao consumo ou à semeadura.

#### **2.1.2.4 Orégano (*Origanum vulgare*)**

O interesse do mercado em plantas aromáticas tem vindo a crescer, especialmente no caso do orégano (*Origanum vulgare* L.). Orégano é uma pequena planta da família Lamiaceae, muito comum nas regiões do Mediterrâneo. Devido ao seu elevado teor de óleo essencial, o orégano é muitas vezes usado como tempero na preparação de alimentos. Como planta medicinal é usado para tratar dores de estômago e como diurético.

O orégano é uma erva perene que pode variar entre 25 a 80 cm de altura; herbácea, com raízes em forma de caules subterrâneos; bastante ramificada, com folhas pequenas, ovais e pecioladas, as quais podem variar da cor púrpura ao branco. O óleo essencial dessa planta possui cervacol, cimeno, linanol e tonino (substâncias que garantem as propriedades digestivas (COCO, 2011).

Pereira et al. (2006) aplicaram os óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), cebola (*Allium cepa* L.), manjericão (*Ocimum basilicum* L.), menta (*Mentha*

*piperita* L.) e orégano (*Origanum vulgari* L.) sobre os fungos *Fusarium sp.*, *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* e *A. flavus*. Eles observaram um ótimo desempenho do óleo essencial de orégano sobre os fungos testados em concentração de 1000 µg/mL, confirmando a sua eficiência como fungicida. Os óleos essenciais de cebola, menta, manjeriço e alecrim obtiveram resultados de inibição inferiores sobre alguns dos fungos testados, o que pode ser atribuído a uma possível inadequação das doses empregadas.

MITCHELL et al. (2010) avaliaram o efeito do óleo essencial de *O. vulgare* sobre o crescimento de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. terreus* e *A. ochraceus*. Foi observado significativo efeito inibitório sobre todos os fungos ensaiados, sendo que a concentração inibitória mínima (CIM) foi 0,6 µL.mL<sup>-1</sup> para todos os fungos, enquanto a contagem de unidade formadora de colônias (UFC) variou entre as concentrações de 1,25 a 2,5 µL.mL<sup>-1</sup>. O crescimento micelial radial de *A. flavus* e *A. parasiticus* foi fortemente inibido ao longo de 14 dias pelo óleo essencial nas concentrações de 0,6; 1,25; e 2,5 µL.mL<sup>-1</sup> em meio sólido. As principais alterações morfológicas provocadas pelo óleo essencial em *A. parasiticus*, observadas sob microscopia óptica, foram ausência de conidiação, perda de citoplasma, perda de pigmentação e ruptura de estrutura celular.

#### **2.1.2.5 Manjeriço ou alfavaca (*Ocimum basilicum*)**

*Ocimum basilicum* é uma espécie aromática, herbácea, cactos que podem ser anuais ou perenes. As plantas de manjeriço crescem até 1 m de altura e têm caules bastantes ramificados, ramos peludos e uma forma de coroa triangular, arredondadas ou irregulares. O óleo essencial de manjeriço, com alta concentração de linalol, é valorizado no mercado internacional e amplamente usado nas indústrias de condimentos e cosméticos (CARVALHO FILHO et al., 2006).

Pereira e colaboradores (2006) aplicaram os óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), cebola (*Allium cepa* L.), manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), menta (*Mentha piperita* L.) e orégano (*Origanum vulgari* L.) sobre os fungos *Fusarium sp.*, *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* e *A. flavus* e observaram um ótimo desempenho do óleo essencial de orégano sobre os fungos testados em concentração de 2000 µg.mL<sup>-1</sup> confirmando a sua eficiência como fungicida. Os óleos essenciais de cebola,

menta, manjeriço e alecrim, obtiveram resultados de inibição inferiores sobre alguns dos fungos testados, o que pode ser atribuído a uma possível inadequação das doses empregadas.

O manjeriço, também conhecido como alfavaca, basilicão, é uma planta originária da Ásia tropical e tem preferência por climas quentes a amenos (LORENZI; MATOS, 2002). Entre as ervas aromáticas, o manjeriço possui importância econômica no Brasil, sendo seu consumo tanto *in natura* quanto para processamento industrial. Seu óleo é muito apreciado na culinária, na aromatização de alimentos, bebidas e nas indústrias de cosméticos e perfumarias. Apresenta propriedades inseticidas, repelentes, antimicrobianas, sendo também utilizado na conservação de grãos (FERNANDES et al., 2004).

As folhas do manjeriço apresentam sabor e aroma doces e picante característico. Elas são utilizadas secas ou frescas na preparação de diversos pratos quentes ou frios, e estão intimamente relacionadas à gastronomia italiana, em que são matéria prima principal de molhos. O manjeriço combina-se perfeitamente com pratos que levam tomate, azeite, limão, carnes vermelhas, massas e queijos. Ele também é produzido em larga escala para a extração de óleo essencial, que é utilizado na indústria de alimentos, bebidas, perfumaria e outros produtos (COCO, 2011).

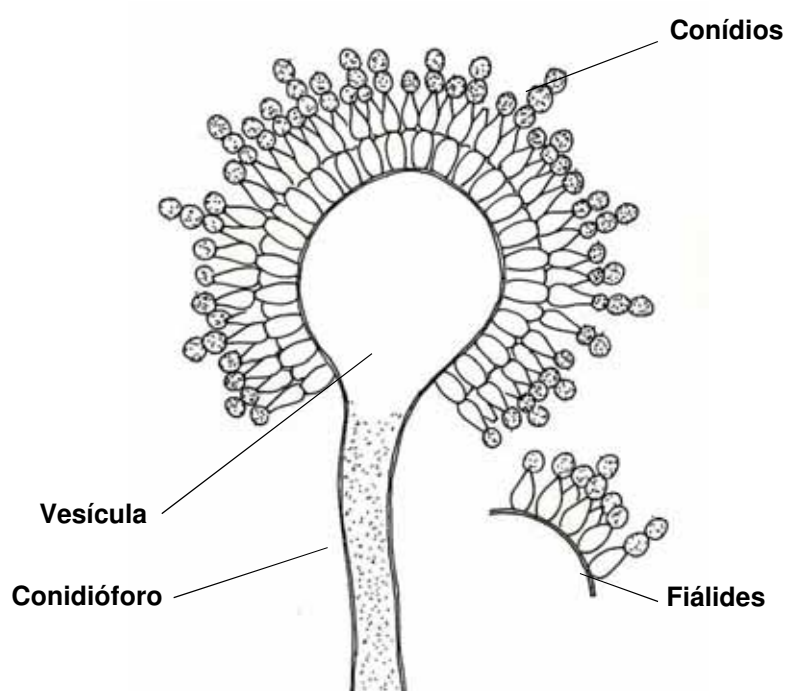
Pereira et al. (2006) observaram que o óleo essencial de manjeriço apresentou controle do fungo *Aspergillus ochraceus* a partir da concentração 1000 mg/mL. Em relação aos fungos *A. niger* e *A. flavus* a redução do desenvolvimento micelial foi obtida também na concentração de 1000 mg/mL. Nas concentrações maiores o desenvolvimento desses fungos foi estimulado, isso se justifica à alta quantidade de vitaminas A, ferro e potássio presentes nas folhas que atuam como nutrientes para os micro-organismos. Resultados semelhantes foram observados por Chalfoun et al. (2004) e Pereira (2001), os quais relatam que esse tipo de comportamento requer um estudo específico por envolver vários fatores tais como: tipo de substrato, reação do fungo ao substrato e diferentes tipos de compostos que podem interferir sobre o comportamento do fungo.

### **2.1.3 O fungo *Aspergillus* sua sintetização da aflatoxina e a ação dos biofungicidas**

O gênero *Aspergillus* foi catalogado pelo padre italiano e biólogo Pier Antônio Micheli, quem o observou dentro de um borrifador de água benta (por isso o nome *Aspergillum*). Existem mais de 200 espécies na natureza, sendo todas aeróbicas, pois crescem em ambientes ricos em oxigênio (HUBKA et al., 2013).

Os *Aspergillus* são constituídos basicamente por filamentos denominados hifas que podem se ramificar dando origem aos conidióforos. Os conidióforos são estruturas que sustentam as fiálides que possuem forma de garrafa e são responsáveis pela produção de conídios (Figura 2.1). Os conídios, por sua vez são as estruturas responsáveis pela reprodução assexuada tanto em *Aspergillus flavus* quanto em *Aspergillus parasiticus* (PELCZAR JUNIOR, 1996; PAYNE; MARROM, 1998; PEREIRA; CARVALHO; PRADO, 2002).

**Figura 2.1.** Representação esquemática da estrutura reprodutiva dos fungos *Aspergillus*



**Fonte:** Foto adaptada de Morphological description (COLOSS, 2015).

O *Aspergillus flavus* pertence ao Reino Fungi, divisão *Ascomycota*, classe *Ascomycetes*, ordem *Eurotiales* e família *Trichomaceae* (KIRK et al., 2008). Esse micro-organismo possui como característica o desenvolvimento de colônias esverdeadas quando na fase inicial e acinzentadas com a idade (PITT; HOCKINF, 1997).

As aflatoxinas foram detectadas em 1960 na Inglaterra, após a morte de 100.000 perus que ingeriram farelo de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) proveniente do Brasil. Nesse episódio, o fungo *Aspergillus flavus* foi confirmado como responsável pela produção dessa toxina (REIS, 2009).

Na Tabela 2.1 são descritas as condições de umidade dos grãos e umidade relativa ideal para o crescimento de alguns fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*.

**Tabela 2.1:** Condições de umidade para o crescimento de fungos em grãos para temperaturas de 25 a 27°C

| Teor de umidade dos grãos - % (b.u.) | Espécie                                 | Umidade relativa do ar (intergranular) - % |
|--------------------------------------|---|--|
| 12-14                                | <i>Aspergillus halophilieus</i>         | 68   |
| 13-15                                | <i>Aspergillus restrictus</i>           | 70   |
| 13-15                                | <i>Aspergillus glaucus</i>              | 73   |
| 14-16                                | <i>A. candidus</i> , <i>A. ochraeus</i> | 80   |
| 15-18                                | <i>A. flavus</i> , <i>parasiticus</i>   | 82   |
| 15-18                                | <i>Penicillium spp.</i>                 | 80-90                                      |

**Fonte:** Extraído de BAKKER-ARKEMA (1999).

A toxina produzida afeta diretamente a qualidade do amendoim e dos derivados para o consumo alimentar animal e humano. Por conta da prevalência do fungo *Aspergillus sp.* é a micotoxina mais disseminada no Brasil. O fungo *Aspergillus flavus* produz aflatoxina B e as outras espécies produzem aflatoxina B e G (PRADO et al., 2008). As mais importantes são as aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub>, sendo que a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) é conhecida como o agente natural mais carcinogênico devido a sua elevada hepatotoxicidade e sua maior concentração nos substratos (CAST, 2003). Além disso, a Aflatoxina B<sub>1</sub> tem estrutura química que lhe permite sofrer bioativação através das enzimas do citocromo p 450, o que forma metabólitos com maior potencial carcinogênico (PEREIRA; SANTOS, 2009).

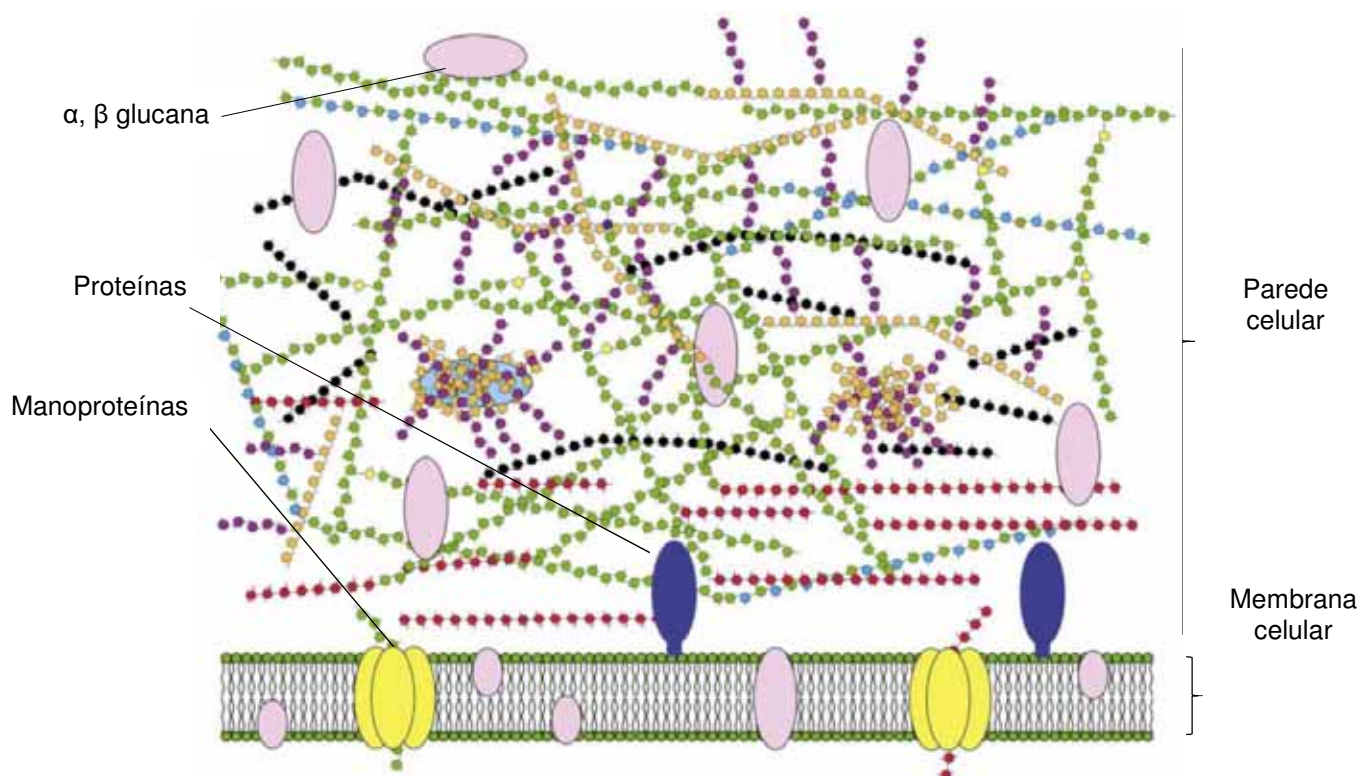
As aflatoxinas não são essenciais no crescimento dos fungos, mas substâncias secundárias, no entanto, elas provavelmente são produzidas para remover o excesso de carbono presente no meio onde o fungo está crescendo e agir



como sinal químico entre espécies, além de proteger o fungo contra hostilidades do meio em que se encontra (BU'LOCK, 1965; EHRLICH et al., (2005).

Na aplicação de biofungicidas contra qualquer fungo é importante que haja um estudo de suas características. A parede celular é o principal mecanismo de defesa e sobrevivência de alguns fungos. No caso dos fungos *Aspergillus*, 90% dela é constituída por polissacarídeos e proteínas, formando uma estrutura tridimensional que mantém sua integridade estrutural (Figura 2.2), proporcionando uma defesa física à célula e protegendo-a de qualquer hostilidade do meio (ABAD et. al., 2010). Foi detectado, também, uma camada adicional hidrofóbica na parte externa da parede celular de hifas e conídios. Essa camada hidrofóbica ajuda na dispersão dos conídios, na fixação do fungo ao solo, na adesão do conídio ao hospedeiro alvo (alvéolos do pulmão, por exemplo) e na defesa de ataques de outras células (LINDER et al., 2005; COSTA, et al. 2012).

**Figura 2.2:** Esquema da parede celular de um fungo do gênero *Aspergillus*. Na parte superior o emaranhado tridimensional de polissacarídeos e proteínas; abaixo a membrana celular.



**Fonte:** Adaptado da figura extraída da Revista Iberoamericana de Micologia (Abad et al., 2010)

Assim, a ação dos óleos essenciais pode se dar por vários mecanismos, mas o mais aceito para explicar sua ação biofungicida, baseia-se na desestruturação da parede celular causada pela ação conjunta das interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre o polímero, positivamente carregado, e macromoléculas com resíduos de carga negativa como os lipossacarídeos e proteínas (GOY et al., 2009; MARTINEZ-CAMACHO et al., 2010). A partir desse momento pode ocorrer o rompimento da parede celular, levando ao vazamento de proteínas e outros constituintes celulares ou à formação de uma barreira externa a qual resultará na redução de nutrientes essenciais para o desenvolvimento do fungo (ROLLER e COVILL, 1999).

Os componentes dos óleos podem ligar-se a íons de moléculas de outras células. É relatado também por Silva et al. (2003) que os antifúngicos naturais provocam danos à membrana celular das células expostas a eles, deixando-as extremamente solúveis e com fraturas grosseiras que acabam por expor o conteúdo celular, inclusive o núcleo.

De acordo com Ootani, et al., (2013), as pesquisas à procura de plantas com novas moléculas metabólicas como os terpenos, compostos fenólicos e alcalóides com efeito bioinseticida, biofungicida e bioherbicida em plantas que podem substituir os produtos químicos ou com baixo ou nulo poder residual e diminuir o impacto ao ambiente melhorando as condições ambientais.

## **2.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

Os ensaios experimentais foram realizados no Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos (DETA), do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP/São José do Rio Preto.

As amostras de amendoim foram gentilmente cedidas pela Cooperativa dos Plantadores da Zona de Guariba – COPLANA, de Jaboticabal, São Paulo.

As plantas utilizadas para as extrações dos extratos aquosos e alcoólicos, bem como dos óleos essenciais foram cortesmente fornecidas pela empresa SIAMAR INDÚSTRIA ALIMENTICIA LTDA., da cidade de Neves Paulista, SP.

As análises de aflatoxinas foram realizadas pela empresa “JLA Brasil Laboratório de Análises de Alimentos S.A.”, devidamente credenciada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) – (BRASIL, 2014).

## 2.2.1 Materiais

As amostras utilizadas neste trabalho foram as plantas, as vagens de amendoim, o isolado de *Aspergillus flavus* e os óleos essenciais que foram adquiridas conforme descrito a seguir:

### 2.2.1.1 Obtenção das amostras de plantas para as extrações

Para as cinco plantas estudadas, apresentadas na Tabela 2.2, foram descritos os valores utilizados na comercialização em atacado, assim como as densidades dos óleos essenciais dessas matérias primas, também encontrada no comércio local. As dimensões das partículas possuem o mesmo padrão quando são vendidas no mercado para uso na alimentação em forma de chá ou condimentos. Tais dimensões foram fornecidas pela empresa, conforme apresentado na Figura 2.3.

**Tabela 2.2:** Preços das plantas secas no atacado (R\$.kg<sup>-1</sup>) e densidade dos óleos (g.mL<sup>-1</sup>).

| Planta seca  | Preço a granel (R\$/kg) * | Densidade (g/mL) à 20° C** |
|--|---------------------------|----------------------------|
| <b>Canela</b><br>( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )                | 18,70                     | 1,030 – 1,050              |
| <b>Cravo da índia</b><br>( <i>Syzygium aromaticum</i> )          | 38,00                     | 1,038 – 1,060              |
| <b>Capim-limão ou cidreira</b><br>( <i>Cymbopogon citratus</i> ) | 26,00                     | 0,876 – 0,898              |
| <b>Orégano</b><br>( <i>Origanum vulgare</i> )                    | 6,60                      | 0,940 – 0,960              |
| <b>Manjeriço ou alfavaca</b><br>( <i>Ocimum basilicum</i> )      | 9,60                      | 0,880 - 0,910              |

**Fonte:** \*GMS Comércio de Especiarias e Condimentos Ltda., (2015); \*\* FERQUIMICA, (2015).

**Figura 2.3:** Plantas utilizadas nas extrações canela – caule em pó e Cravo da Índia - em pó



**Canela - caule**  
(*Cinnamomum zeylanicum*)



**Cravo da Índia – caule e flor**  
(*Syzygium aromaticum*)



**Capim-limão ou cidreira - folhas**  
(*Cymbopogon citratus*)



**Orégano - folhas**  
(*Origanum vulgare*)



**Manjericão ou alfavaca - folhas**  
(*Ocimum basilicum*)

Fonte: Elaborado pela autora

### **2.2.1.2 Amostras de vagens de amendoim para os ensaios de inibição do *Aspergillus flavus***

Amostras de vagens de amendoim *Runner* IAC 886 e graneleiro, sem contaminação de aflatoxina, foram transportadas em sacos de ráfia de 50 e 25 kg, respectivamente. Foram armazenadas sob refrigeração em câmara fria ( $4 \pm 1$  °C).

Posteriormente, foram preparadas as amostras para os ensaios de inibição somente com a aplicação de suspensão do *Aspergillus flavus* nas vagens irradiadas e na amostra com a contaminação de origem do campo. A irradiação foi realizada pela Companhia Brasileira de Esterilização de Jarinu – SP., onde receberam radiação ionizante proveniente de fontes de Cobalto-60 e Césio-137, com intensidade de 10 kGy. Foram pesadas 100 sub amostras de vagens de 25 e 50 g cada, e colocadas em sacos plásticos de alta espessura, os quais, após fechados por seladora, foram acondicionados em caixa com isolamento térmico e encaminhadas para a companhia. Após a irradiação as subamostras foram mantidas em refrigeração até a realização dos ensaios no DETA.

### **2.2.1.3 Isolado de *Aspergillus flavus***

O isolado do fungo *Aspergillus flavus* L. utilizado nos ensaios foi obtido a partir da cepa isolada e cultivada conforme Gorayeb, (2007), e armazenada em refrigeração no Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos (DETA) e na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria – CBMAI, em Campinas – SP. A cepa foi analisada por Gorayeb, (2007), e se mostrou produtora de aflatoxinas.

### **2.2.1.4 Óleos essenciais comerciais e princípios ativos para os ensaios**

Os óleos essenciais extraídos foram suficientes apenas para a realização dos ensaios em meio BDA. Para os ensaios de aplicação nas vagens foram adquiridos os óleos essenciais de empresas do mercado, com laudos, e nas análises cromatográficas foram confirmados o real teor dos componentes principais.

Os óleos essenciais para os ensaios de inibição micelial, concentração mínima inibitória (CIM) foram adquiridos na empresa Novo Mundo - Bioessência -

Florananda Indústria e Comércio de Cosmético e Produtos Naturais Ltda Me. Os óleos utilizados na inibição (*in situ*) nas aplicações nas vagens foram adquiridos na empresa FERQUIMICA Indústria e Comércio Ltda., cuja engenheira química responsável foi Alice Lasthaus, CRQ: IV 04330754. Todos os laudos são apresentados no Anexo I.

Os padrões dos princípios ativos Eugenol e Citral foram adquiridos na empresa Sigma-Aldrich. O Cinamaldeido foi adquirido na empresa Merck Sharp & Dohme Corporation.

## **2.2.2 Métodos**

### **2.2.2.1 Obtenção dos extratos e óleos essenciais das plantas**

#### **a) Obtenção dos extrato aquosos (EA)**

Para obtenção do extrato aquoso (EA) empregou-se método descrito por Stangarlin et al., (1999). Uma amostra de 70 g de folhas ou pó de cada planta foi suspenso em 700 mL de água destilada estéril, ficando sob maceração por 15 dias à temperatura ambiente. Após esse período, retirou-se o sobrenadante por filtração à vácuo com gaze e papel de filtro Whatman nº 41. O filtrado foi concentrado em rotoevaporador, até o volume final ser correspondente a 30% do inicial, com temperatura de aquecimento de 65º C e de resfriamento 42º C. A Figura 2.4 ilustra esse procedimento. Para a aplicação, o extrato foi autoclavado a 120º C durante 20 minutos.

#### **b) Obtenção dos extratos alcoólicos (EO)**

Para obtenção do extrato alcoólico (EO) empregou-se a metodologia descrita por Prista e Alves (1996). Amostras de 70 g de folhas ou pó de cada planta foram suspensas em 700 mL de álcool etílico com concentração 70% (v/v), ficando sob maceração por 14 dias em temperatura ambiente. Após esse período, retirou-se todo o sobrenadante por filtração à vácuo com gaze e papel de filtro qualitativo Whatman nº 1. O líquido foi concentrado, em rotoevaporador, Figura 2.4, até o volume ser reduzido a 30% do seu volume inicial, com temperatura de aquecimento de 42º C e

de resfriamento 22 ° C. Para a aplicação, o EO foi autoclavado a 120° C durante 20 minutos.

**Figura 2.4:** Filtro a vácuo e rotoevaporador nas extrações aquosa e alcoólica



Fonte: Elaborado pela autora

### c) Obtenção dos óleos essenciais (OE)

Uma amostra de 150 g de cada planta, foi submetida à hidrodestilação por 4 h em 1500 mL de água, utilizando um extrator de óleos essenciais do tipo Clevenger, apresentado na Figura 2.5, conforme descrito por Craveiro et al. (1981). Após 4 horas foi separado o óleo da água e armazenado em refrigeração por  $4 \pm 1^\circ$  C até a sua aplicação, sob proteção de luz.

**Figura 2.5:** Destilador de óleos essenciais (hidrodestilador Clevenger)



Fonte: Elaborado pela autora

### 2.2.2.2 Caracterização dos extratos aquosos e alcoólicos, e dos óleos essenciais

#### a) Quantificação da massa seca dos extratos aquosos e alcoólicos

A análise da massa seca dos extratos foi obtida por secagem à vácuo (AOAC, 1996). Para a análise foram pipetados em triplicata 5 mL de cada extrato aquoso ou alcoólico, os quais foram colocados em placa de petri contendo areia previamente seca e pesada. Em seguida, as placas foram colocadas na estufa à vácuo a 70° C por 24 h, posteriormente retiradas e colocadas em dessecador para esfriar. Após 2 h as amostras foram pesadas em balança analítica.

#### b) Rendimento dos extratos e óleos essenciais

De acordo com Sousa et al. (2007), para o cálculo do rendimento dos extratos aplica-se a Equação (2.1):

$$\text{Rendimento} = (\text{massa seca do extrato/massa do material vegetal}) \times 100 \quad (2.1)$$

O rendimento da extração de óleo essencial ( $T_o$ ) foi calculado pela relação massa do óleo, medida por sua densidade, a partir do volume do óleo obtido no sistema de extração, dividido pela massa seca da amostra (GIRARD; KOEHLER; NETTO, 2007). O rendimento de óleo obtido de cada amostra foi então calculado pela Equação (2.2):

$$R\% = \frac{V_o \times \text{densidade}}{M_a} \times 100 \quad (2.2)$$

Onde:

R% = rendimento de extração (%);

$V_o$  = volume de óleo extraído (mL);

Densidade = massa de um mL de óleo em g;

$M_a$  = massa seca da amostra de folhas em g.



### c) Determinação da concentração do composto fitoquímico majoritário dos óleos essenciais

As análises cromatográficas dos três óleos essenciais com maior capacidade de inibição ao *Aspergillus flavus* L foram realizadas no Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica do IBILCE-UNESP. A análise constituiu na quantificação do componente principal de cada planta original.

Para avaliação dos teores dos constituintes e dos óleos essenciais foi utilizado o cromatógrafo gasoso Perkin Elmer Clarus® 480 GC Capillary Column; com detector por ionização de chamas (FID), nas condições operacionais: coluna capilar Elite 5, 30 m X 0,25 mm X 0,25 µm; programação da coluna: temperatura inicial de 50 °C; temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do detector: 230 °C/5 minutos; gás de arraste: nitrogênio (2,2 mL min<sup>-1</sup>), gás de "make up" ar sintético e hidrogênio; taxa de split 1:10; volume injetado: 1 µL (das soluções em diclorometano), e pressão na coluna de 115 KPa, sendo a quantificação de cada constituinte obtida por meio de normalização de áreas (%).

Para a calibração do sistema de cromatografia gasosa foram empregados os padrões Eugenol, Citral (neral + geranial) (Sigma Aldrich), e Cinamaldeído (Merck Sharp & Dohme), com concentrações variando entre 200 e 1000 ppm. A resposta do equipamento foi, em área, correspondente a cada concentração utilizada. Foi realizada uma regressão linear de área em função da concentração, que foi utilizada como curva de calibração.

#### 2.2.2.3 Inibição do crescimento micelial (ICM) do *Aspergillus flavus* L

Para a avaliação da capacidade inibitória dos extratos aquosos e alcoólicos extraídos das plantas, foram realizados os testes de inibição do crescimento micelial (ICM), de acordo com Billerbeck et al., (2001), sobre o fungo *Aspergillus flavus* L., preparando-se as diluições dos extratos e óleos originais nas concentrações de 0, 50, 500, 5000 µg.mL<sup>-1</sup> em Tween 80® 0,1% (v/v). Em seguida, essas soluções foram incorporadas ao meio Batata – Dextrose - Agar (BDA), fundente a 45° C em "banho-maria", vertidas em placas de petri de 65 cm<sup>2</sup>. Após a solidificação do meio foram feitas perfurações de 3 mm de diâmetro no centro das placas e colocadas 10 µL de uma suspensão de esporos de *A. flavus* na concentração de 10<sup>6</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>

preparada em Tween 80® 0,1% (v/v). Para a testemunha, foram usadas placas contendo apenas BDA e a suspensão sem a adição de biofungicida. As culturas foram incubadas em câmara a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . As avaliações do diâmetro das colônias foram feitas após 7 dias de incubação efetuando-se medições ortogonais do diâmetro das colônias com o auxílio de um paquímetro. Para o cálculo da inibição do crescimento fúngico utilizou-se a Equação (2.3):

$$\% \text{ Inibição do Crescimento Micelial (ICM)} = [1 - (Da/ Db)] \times 100 \quad (2.3)$$

Onde Da e Db são, respectivamente, o diâmetro médio das colônias sob a ação dos biofungicidas e diâmetro médio das colônias controle.

Para a avaliação da capacidade inibitória dos óleos essenciais com os óleos extraídos em laboratório, foram realizados os testes de inibição do crescimento micelial, sobre o fungo *Aspergillus flavus* L. preparando-se as diluições nas concentrações de 0, 50, 100, 250, 500, 1000 e 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em Tween 80® 0,1% (v/v).

Após 7 dias foi realizada a medição do crescimento micelial por imagens em máquina fotográfica digital, no formato BMP. Estas foram analisadas com a técnica de análise de imagens para a determinação da área do micélio fungicos, adaptando a metodologia desenvolvida por Grajales (2014). As análises foram realizadas com o auxílio do *software LensEye (Engineering & Cyber Solutions, Gainesville, FL)*, em que a área de coloração reconhecida pelo programa correspondia, diretamente, à área da colônia em cada amostra.

Para o cálculo da inibição do crescimento fúngico, com a análise do programa, utilizou-se a Equação 2.4:

$$\% \text{ de inibição do fungo} = [1 - (Aa/Bb)] \times 100 \quad (2.4)$$

Onde Aa é a área da colônia interpretada pelo *software* com a ação dos óleos e Bb é a área da colônia do controle lida pelo *software*.

#### **2.2.2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais**

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizada a técnica de microdiluição em meio Batata – Dextrose - Agar (BDA), fundente a 45° C em “banho-maria”, adaptada das metodologias descritas por Daouk; Dagher; Sattout (1995), Hanel e Raether (1998) e Shukla et al. (2009). As diluições foram realizadas com os óleos essenciais extraídos.

Foram preparadas as diluições nas concentrações de 0, 50, 100, 250, 500, 1000 e 2000 µg.mL<sup>-1</sup> em Tween 80® 0,1% (v/v). Em seguida, em cada poço da placa, com 96 cavidades para cultura de células, foram colocados 100 µL do meio de cultura BDA, seguindo-se da adição de 100 µL de solução antifúngica nas concentrações e, por último, adicionando-se 5 µL da suspensão de *A. flavus* a 10<sup>6</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>. Para definir a CIM foi adotada como a menor concentração aquela na qual não ocorreu crescimento visível do micro-organismo em 72 horas sob incubação em câmara DBO a 25 ± 1°C. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

#### **2.2.2.5 Inibição do crescimento fúngico em vagens de amendoim com aplicação do óleo de canela**

##### **a) Avaliação da retenção de água nas vagens de amendoim**

Nessa etapa colocou-se aproximadamente 25 g de vagens de amendoim em sacos plásticos e em seguida foi borrifado manualmente água, nos volumes de 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 mL. Fechou-se o saco plástico e agitou-o até a total absorção da água deixando-o por 15 minutos. Após esse período foi realizada a análise de umidade das vagens pelo método de estufa a 105 ± 1 °C, durante 24 horas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

##### **b) Inibição do crescimento fúngico nas vagens irradiadas, com aplicação de suspensão de esporos de *Aspergillus flavus***

Inicialmente foi preparada a suspensão de esporos de *Aspergillus flavus* 10<sup>6</sup> esporos.mL<sup>-1</sup> em Tween 80® 0,1% (v/v). Foram pesadas amostras com 25 g de vagens, colocadas em erlenmeyers, devidamente esterilizados. Em seguida foram

aspergidos 4 mL com a solução de óleo de canela preparada nas concentrações de 0, 5000, 50000 e 250000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , diluindo em Tween 80<sup>®</sup> 0,1% (v/v). Logo após foi colocado 1 mL da solução de esporos, misturado, e os erlenmeyers foram colocados na DBO a 25 °C, durante 7 dias.

As análises da inibição da contaminação fúngica das vagens de amendoim foram realizadas por meio do método descrito por Swanson et al. (1984), em que, após o período de 7 dias de armazenamento, as 25 gramas de amostra de vagens (duplicata) foram colocadas, com o auxílio de uma pinça flambada, em 225 mL de solução Tween 0,1%. Procedeu-se a agitação e em seguida às diluições, pipetou-se 1 mL da solução das vagens em 9 mL da solução de Tween 0,1%, realizou-se as diluições seriadas até  $10^{-8}$ . Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram colocadas em placas de petri e misturadas em 20 mL de meio de cultura de BDA acidificado (pH 5,6) fundido a 45 °C, seguido de homogeneização. Após a solidificação do agar, as placas foram incubadas na DBO a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 7 dias. Após esse período foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia com o auxílio de um contador de colônias com lupa.

Para quantidades elevadas de Unidade Formadora de Colônia - UFC (acima de 100 UFC/cm<sup>2</sup>), considerou-se como valor estimado de UFC  $6,5 \times 10^{11}$  UFC (Est), sendo a maior diluição, uma vez que as placas de vidro empregadas na incubação possuem área de 65 cm<sup>2</sup> (PELCZAR JUNIOR, 1996; ALVES; MORAES, 1998).

### **c) Inibição do crescimento fúngico nas vagens com a contaminação de origem**

Os ensaios de inibição do crescimento fúngico em vagens de amendoim com contaminação de origem, foram feitos pelo método estático de umidade relativa controlada do ambiente e temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , na câmara de DBO. Amostras com aproximadamente 25 g de vagens de amendoim, depois de aspergidas com 5 mL da solução de óleo de canela, nas concentrações de 0 (Testemunha - sem o óleo), 200, 500, 1000, 2500, 5000, 50000 e 250000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , foram colocadas em cestos perfurados de polietileno, os quais foram apoiados no suporte de plástico (Figura 2.6). Essa estrutura foi colocada em frascos, juntamente com a solução salina saturada preparada com água destilada estéril e o sal de cloreto de sódio (NaCl) que, na temperatura de 25 °C, resultam em uma umidade relativa de 75,32 %, RESNIK;

CHERIFE (1988), que corresponde à umidade média do município de Jaboticabal. Após 15 dias foram realizadas as análises de Unidades Formadoras de Colônias de fungos por gramas (UFC.g<sup>-1</sup>) conforme descritos acima além da análise de aflatoxinas.

Após esse ensaio foram realizadas as análises das vagens de amendoim com a aplicação de óleo de canela com as concentrações de 0 (sem o óleo), 50 e 250 mg.mL<sup>-1</sup>. As vagens foram colocadas em frascos, juntamente com as soluções salinas saturadas que proporcionaram umidades relativas controladas. Os sais empregados foram cloreto de sódio (NaCl - 75,32 %), cloreto de potássio (KCl - 84,34 %) e cloreto de bário (BaCl<sub>2</sub> - 90,30 %) (RESNIK; CHERIFE,1988). Os frascos foram armazenados por 15 dias na DBO a 25 ± 1°C, sendo monitorada a umidade relativa e temperatura dos frascos por meio de um termo-higrômetro digital Modelo HT – 600 (INSTRUTHERM), apresentado na Figura 2.6. Após esse período foram realizadas as análises de Unidades Formadoras de Colônias de fungos por gramas, conforme descrição previamente apresentada e análise de aflatoxinas a ser descrita no próximo item.

**Figura 2.6:** Frasco juntamente contendo as peneiras com as vagens e o suporte; medidor de umidade relativa (Termo-higrômetro digital Modelo HT – 600)



**Fonte:** Elaborado pela autora

#### d) Análise de aflatoxina dos amendoins

**Preparo das amostras:** Amostras de vagens foram debulhadas manualmente no total de 50 g de grãos de amendoim *Runner* IAC 886, em triplicata, coletadas de cada saco de ráfia, das caixas do armazenamento, naturalmente contaminadas e colocadas nas condições de umidade controlada, sem e com a aplicação de óleo essencial de canela na concentração de 0 e 50 mg.mL<sup>-1</sup>, colocadas nas condições de armazenamento com a umidade no ambiente de U1- NaCl (75,32 %) e U2 – BaCl<sub>2</sub> (90,3 %). Essas amostras foram coletadas, embaladas em sacos plásticos de alta resistência, lacradas a cada período (0, 30, 60 e 90 dias) e encaminhadas para o laboratório da empresa J.L.A. do Brasil – Ltda., Marília – São Paulo, onde foram analisadas as aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.

**Extração e purificação:** Para extração e purificação das aflatoxinas presentes nos grãos de amendoim, foi utilizado o método AOAC Official Method 991.31 (AOAC, 2000), modificado pela empresa Vicam Somerville, MA, USA (VICAM, 1993). Foram utilizadas 50 g de grãos de amendoim, triturados com 10 g de NaCl e adicionados 250 mL de metanol: água (60:40 v/v). Após agitação por 30 minutos em shaker Marconi®, o conteúdo foi filtrado em papel de filtro e 20 mL do extrato foram diluídos com 20 mL de água destilada. Após nova filtração, 4,0 mL do extrato (4,0 mL = 0,2 g da amostra) foram transferidos para uma coluna de imunoafinidade (Aflatest, Vicam Somerville, MA, USA) a um fluxo de cerca de 1-2 gotas/segundo até que o ar passasse pela coluna. Em seguida, a coluna foi lavada com 5,0 mL de água destilada a um fluxo de cerca de 2 gotas/segundo e eluída com 1,0 mL de metanol grau CLAE a um fluxo de cerca de 1-2 gotas/segundo.

**Condições Cromatográficas:** As aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> presentes no extrato metanólico foram quantificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou em inglês *High Performance/Pressure Liquid Chromatography*, HPLC). Uma coluna C18 de fase reversa (Thermo) com uma dimensão de 25 cm, 4,6 mm e o tamanho de partícula 4,6 µm, rodando em uma HPLC (modelo 2695, Waters) equipado com um detector de fluorescência (modelo 2475, Waters), operado em um comprimento de onda de excitação de 365 nm e um comprimento de onda de emissão

de 460 nm. O volume de injeção foi de 20 µL. A fase móvel foi uma mistura de água: metanol: acetonitrila (60:30:10) com uma taxa de fluxo de 0,9 mL min<sup>-1</sup>.

**Confirmação da presença de aflatoxinas:** Determinaram-se a linearidade, precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), a equação linear e coeficiente de regressão ( $R^2$ ). A linearidade foi estimada através da injeção de aflatoxina triplicata dos padrões, em 5 concentrações diferentes, a linearidade mínima encontrada para cada uma das quatro Aflatoxinas foi de 0,9. Para determinar a precisão, estudos de recuperação foram determinados por fortificação das aflatoxinas em 3 concentrações diferentes:  $B_1 = 0,996, 1,992 \text{ e } 3,984 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ,  $G_1 = 1,027, 2,054 \text{ e } 4,108 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ,  $B_2 = 0,296, 0,592 \text{ e } 1,184 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ,  $G_2 = 0,296, 0,592 \text{ e } 1,184 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . Os resultados de recuperação ficaram entre 70 e 90% de recuperação para as 4 aflatoxinas. O Limite de Detecção (LD) foi realizado segundo DOQ-CGCRE-008 – Orientações sobre Validações de Métodos Analíticos, de acordo com o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2011).  $LD = 3,14 \times SD$  e o Limite de Quantificação (LQ) foi calculado levando-se em consideração o LD, sendo Aflatoxina B1  $LQ = 10 \times LD$ , B2  $LQ = 2 \times LD$ , G1  $LQ = 12,5 \times LD$  e G2  $LQ = 2,9 \times LD$ . Isso foi determinado experimentalmente de acordo com a repetibilidade apresentada com fortificações no nível do LQ. Os resultados de LD e LQ em ( $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ), do método para as aflatoxinas:  $AFB_1 = LD - 0,05 \text{ e } LQ - 0,5$ ,  $AFB_2 = LD - 0,1 \text{ e } LQ - 0,2$ ,  $AFG_1 = LD - 0,04 \text{ e } LQ - 0,5$ ,  $AFG_2 = LD - 0,07 \text{ e } LQ - 0,2$

**NOTA:** Todos os resultados de Aflatoxinas estão expressos em  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) (Micrograma/Kilograma e são corrigidos por recuperação).

Valores da recuperação:  $B_1 = 96,9\%$   $B_2 = 83,0\%$   $G_1 = 96,7\%$   $G_2 = 88,1\%$  e totais =  $93,9\%$  LDM (Limite Detecção do Método)  $B_1 = 0,05 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ,  $B_2 = 0,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ,  $G_1 = 0,04 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ,  $G_2 = 0,07 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , LQM (Limite Quantificação do Método)  $B_1 = 0,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ,  $B_2 = 0,2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ,  $G_1 = 0,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ,  $G_2 = 0,2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

#### 2.2.2.6 Análises estatísticas

Os resultados das análises de inibição micelial em diâmetro da colônia, das inibições da contaminação nas vagens de amendoim irradiadas e com contaminação de origem, foram obtidos a partir de uma análise de variância (ANOVA), partindo-se

de um delineamento experimental de blocos ao acaso em parcela subdividida (*"Split-plot"*), com três repetições, usando o software Minitab 16 (Minitab Inc., Pensilvânia, EUA) (MINITAB, 2015). Os valores médios foram comparados por meio do teste de Tukey com índice de significância de 95%.

As parcelas para os experimentos miceliais foram constituídas por cinco óleos: Canela, Cravo da Índia, Capim-limão ou cidreira, Orégano e Manjerição ou alfavaca.

As subparcelas compostas das concentrações dos óleos, para as inibições miceliais dos extratos aquosos e alcoólicos foram de 0, 50, 500, 5000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e para as inibições miceliais dos óleos essenciais as concentrações foram de 0, 50, 500, 1000 e 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , nas análises de inibição do crescimento micelial (ICM) em milímetros.

As parcelas para os experimentos da inibições das vagens irradiadas e com contaminação de origem foram constituídas por três óleos: Canela, Cravo da Índia, Capim-limão ou cidreira.

As subparcelas foram compostas das concentrações dos óleos, para as vagens irradiadas de 0, 5000, 50000 e 250000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , nas vagens com contaminação de origem e com 0, 50000, 250000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , para as análises de inibição da contaminação fúngica das vagens. Para as análises estatísticas foi feita a linearidade dos valores de UFC por meio do logaritmo dos resultados encontrados.

## **2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **2.3.1 Extrações aquosa, alcoólica e de óleos essenciais**

#### **2.3.1.1 Extração aquosa**

A média dos resultados obtidos das triplicatas e o desvio padrão da massa seca, volume extraído e rendimento dos extratos aquosos, estão apresentados na Tabela 2.3. Observou-se que o maior rendimento em massa foi para o extrato de manjerição, seguido do orégano, com 13,09% e 11,87%, respectivamente, porém em volume o maior rendimento foi da cidreira com 111,33 mL.

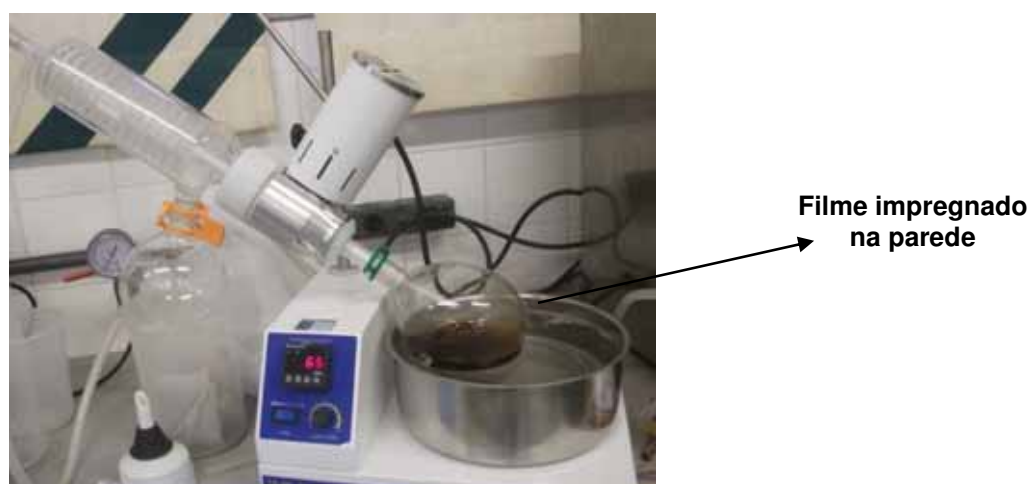


**Tabela 2.3:** Caracterizações da massa seca, volume final extraído e rendimento das extrações aquosas das plantas

| Extratos aquosos  | Massa seca (g.mL <sup>-1</sup> ) | Volume final extraído (mL) | Massa seca (g) | Rendimento em massa (%) |
|---|----------------------------------|----------------------------|----------------|-------------------------|
| <b>Canela</b> ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )                | 0,0685 ± 0,0275                  | 43,5±10,04                 | 2,97 ± 0,9506  | 4,13 ± 1,3581           |
| <b>Cravo da Índia</b> ( <i>Syzygium aromaticum</i> )          | 0,0885 ± 0,0034                  | 79,33 ± 1,15               | 7,02 ± 0,3461  | 10,03 ± 0,4945          |
| <b>Capim-limão ou cidreira</b> ( <i>Cymbopogon citratus</i> ) | 0,0408 ± 0,004                   | 111,33 ± 17,62             | 4,54± 0,0708   | 5,30± 0,1011            |
| <b>Orégano</b> ( <i>Origanum vulgare</i> )                    | 0,1999 ± 0,006                   | 41,66 ± 5,77               | 8,33 ± 0,9901  | 11,87 ± 1,4144          |
| <b>Manjeriço</b> ( <i>Ocimum basilicum</i> )                  | 0,0822 ± 0,0009                  | 91,00 ± 1,00               | 7,48 ± 1,545   | 13,09 ± 2,2073          |

Durante a extração foi observado que na parede do balão do rotoevaporador ficou aderida uma camada de sólidos, como pode ser observado na Figura 2.7, mostrando assim que os princípios ativos inibidores dos fungos não são totalmente encontrados no extrato aquoso.

**Figura 2.7:** Representação do filme de sólido impregnado na parede do balão nos ensaios de extração aquosa



Fonte: Elaborado pela autora

### 2.3.1.2 Extração alcoólica

Os resultados da massa seca, do volume final extraído e do rendimento dos extratos alcoólicos das plantas estão apresentados na Tabela 2.4. Foi possível avaliar que maior rendimento foi do extrato alcoólico de Orégano, com 18,86 %, porém o maior volume extraído foi do extrato alcoólico de canela com 119,3 mL.

**Tabela 2.4:** Caracterizações da massa seca, volume final extraído e rendimento das extrações alcoólicas das plantas

| Extratos alcoólicos  | Massa seca<br>g.mL <sup>-1</sup> | Volume final<br>(mL) | Massa seca<br>(g) | Rendimento em<br>massa (%) |
|--|----------------------------------|----------------------|-------------------|----------------------------|
| <b>Canela</b> ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )                       | 0,0491 ± 0,0002                  | 119,3 ± 13,80        | 5,85 ± 0,6585     | 8,37 ± 0,9407              |
| <b>Cravo da índia</b><br>( <i>Syzygium aromaticum</i> )              | 0,0528 ± 0,0042                  | 101,00 ± 6,56        | 5,36 ± 0,7844     | 7,65 ± 1,1206              |
| <b>Capim-limão ou<br/>cidreira</b><br>( <i>Cymbopogon citratus</i> ) | 0,0663 ± 0,0012                  | 102,67 ± 6,81        | 4,20 ± 0,2654     | 6,01 ± 0,3792              |
| <b>Orégano</b><br>( <i>Origanum vulgare</i> )                        | 0,1538 ± 0,003                   | 86,00 ± 13,08        | 13,20 ± 1,7861    | 18,86 ± 2,551              |
| <b>Manjeriço</b><br>( <i>Ocimum basilicum</i> )                      | 0,0521 ± 0,0027                  | 63,33 ± 2,89         | 5,36 ± 0,6181     | 7,66 ± 0,8829              |

### 2.3.1.3 Extração dos óleos essenciais

Na Tabela 2.5, os resultados do rendimento do óleo de cravo foi maior que dos outros óleos. Notou-se que a média do rendimento em massa para os óleos essenciais foi baixa, 1,07%, comparando-se com os extratos aquosos que foi de 8,88 %, ao passo que para os extratos alcoólicos a média foi de 9,71 %.

Na primeira hora de extração, o volume de óleo extraído foi pequeno. Resultados semelhantes foram apresentados por Leal et al., (2001), que também verificaram que nos primeiros minutos da extração do capim cidreira o volume do acumulado é relativamente limitado, e que após 20 minutos há um aumento do volume extraído não observando-se qualquer incremento no volume coletado do óleo essencial após esse período.

**Tabela 2.5:** Caracterizações da massa seca, volume extraído, densidade e rendimento das extrações dos óleos essenciais das plantas

| Óleo essencial   | Massa seca (g) | Volume de óleo V <sub>o</sub> (mL) | Densidade* g.L <sup>-1</sup> | Rendimento (%) |
|--|----------------|------------------------------------|------------------------------|----------------|
| <b>Canela</b><br>( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )                | 150            | 1,2                                | 1,04                         | 0,83           |
| <b>Cravo da índia</b> ( <i>Syzygium aromaticum</i> )             | 150            | 2,8                                | 1,049                        | 1,96           |
| <b>Capim-limão ou cidreira</b><br>( <i>Cymbopogon citratus</i> ) | 150            | 1,2                                | 0,887                        | 0,71           |
| <b>Orégano</b> ( <i>Origanum vulgare</i> )                       | 150            | 1,7                                | 0,95                         | 1,07           |
| <b>Manjerição ou alfavaca</b><br>( <i>Ocimum basilicum</i> )     | 150            | 1,3                                | 0,895                        | 0,77           |

**Fonte:** Elaborado pela autora extraído do site: <[http://www.ferquima.com.br/o\\_essenciais.html](http://www.ferquima.com.br/o_essenciais.html)>, (FERQUIMICA, 2015)

Pereira et al. (2001), estudando o rendimento de óleo essencial de capim cidreira, obtiveram o valor de 2,16% em matéria seca. No que diz respeito ao mesmo óleo essencial. Marco et al. (2007), estudando diferentes espaçamentos, alturas e épocas de cortes da cidreira, encontraram resultados variando de 3,52% a 4,18% de óleo essencial na matéria seca.

O rendimento de 5,75% do óleo essencial em casca de canela moída pode ser considerado alto, no experimento de Koketsu et al., (1997), realizado com canela cultivada em Morretes – PR. o rendimento obtido de óleo essencial foi de 0,2% nas cascas e de 2,0% nas folhas.

De acordo com Oliveira et al. (2009b), na espécie cravo-da-índia tanto as folhas, pedúnculos e os botões florais são ricos em óleos essenciais, sendo que o menor teor de óleo essencial encontrado foi nas folhas verdes num total de 2,30%. Merece destaque o teor de óleo encontrado nos pedúnculos 9,40%, pois devido ao baixo valor de mercado na forma *in natura*, geralmente esse material é descartado pelos produtores.

### 2.3.1.4 Identificação e quantificação dos componentes majoritário dos óleos essenciais extraídos e adquiridos

Nos resultados da cromatografia dos óleos essenciais observou-se que o óleo com maior concentração do componente majoritário foi o óleo de cravo-da-índia adquirido na empresa Novo mundo, com 96,71% de eugenol. Dos óleos extraídos foi o cravo da Índia com 71,53%, conforme apresentado na Tabela 2.6.

**Tabela 2.6:** Quantificação dos compostos principais dos óleos essenciais extraídos e adquiridos, identificados por CG/FID

| Óleo essenciais   | Origem          | Tempo de retenção (min)       |                           | Área ( $\mu\text{W/s}^2$ ) do pico | Total da área ( $\mu\text{W/s}^2$ ) | Teores (%) |       |
|---|-----------------|-------------------------------|---------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------|-------|
| Canela<br>( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )                | Óleo extraído   | t <sub>1</sub> - Cinamaldeido | 19,5                      | 539076,12                          | 539076,12                           | 68,74      |       |
|   | Óleo Novo Mundo |                               | 19,5                      | 280594,14                          | 280594,14                           | 35,78      |       |
|   | Óleo Ferquímica |                               | 19,5                      | 406049,96                          | 406049,96                           | 51,77      |       |
| Cravo da Índia<br>( <i>Syzygium aromaticum</i> )          | Óleo extraído   | t <sub>1</sub> - Eugenol      | 21,1                      | 287614,05                          | 287614,05                           | 71,53      |       |
|   | Óleo Novo Mundo |                               | 21,1                      | 388848,96                          | 388848,96                           | 96,71      |       |
| Capim-limão ou cidreira<br>( <i>Cymbopogon citratus</i> ) | Óleo extraído   | Citral*                       | t <sub>1</sub> - Neral    | 14,3                               | 75516,87                            | 191479,54  | 53,2  |
|   |                 |                               | t <sub>2</sub> - Geranial | 15,1                               | 115962,67                           |            |       |
|   | Óleo Novo Mundo | Citral*                       | t <sub>1</sub> - Neral    | 14,3                               | 70717,84                            | 156794,35  | 43,57 |
|   |                 |                               | t <sub>2</sub> - Geranial | 15,1                               | 86076,51                            |            |       |

\* O citral é composto por neral e geranial.

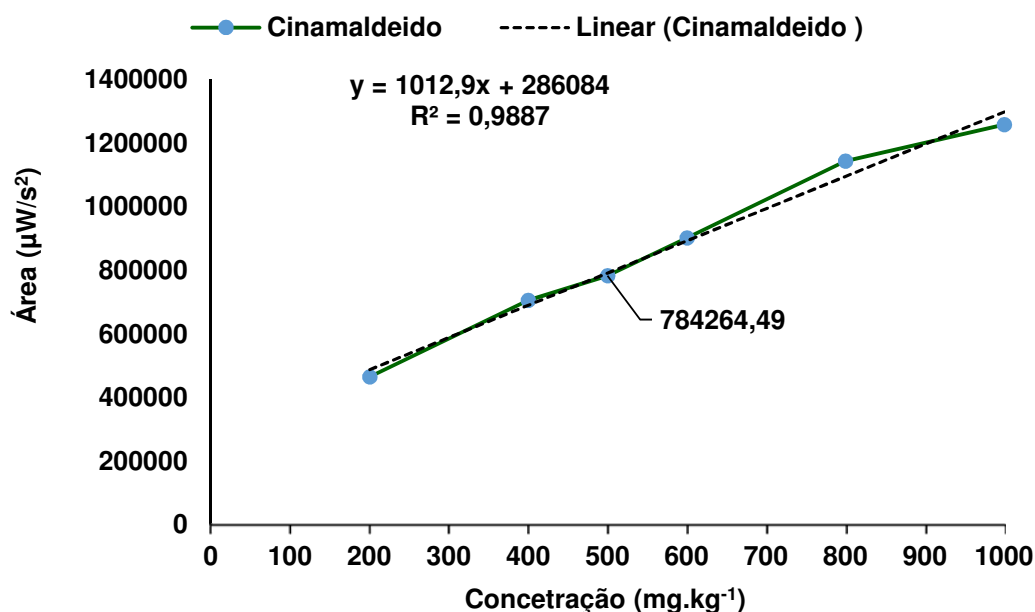
Os resultados apresentaram a real concentração dos compostos majoritários dos óleos essenciais que atua na inibição dos fungos, portanto, ao realizar a aplicação de óleos essenciais extraídos de plantas, como biofungicidas, é importante realizar a quantificação desses componentes. Pois, os óleos essenciais extraídos de diferentes partes de uma mesma planta, apesar de apresentarem cor e aspecto semelhantes, podem apresentar composição química, características físico-químicas e odores diferentes (ROBBERS *et al.*, 1997). A composição química de um óleo essencial pode variar, dependendo dos fatores como a época de coleta - as espécies apresentam épocas específicas em que contêm maior quantidade de óleos voláteis no seu tecido, podendo esta variação ocorrer tanto no período de um dia como em épocas do ano

(REIS *et al.*, 2003), estágio de desenvolvimento, condições climáticas e de solo (SIMÕES; SPITZER, 2003).

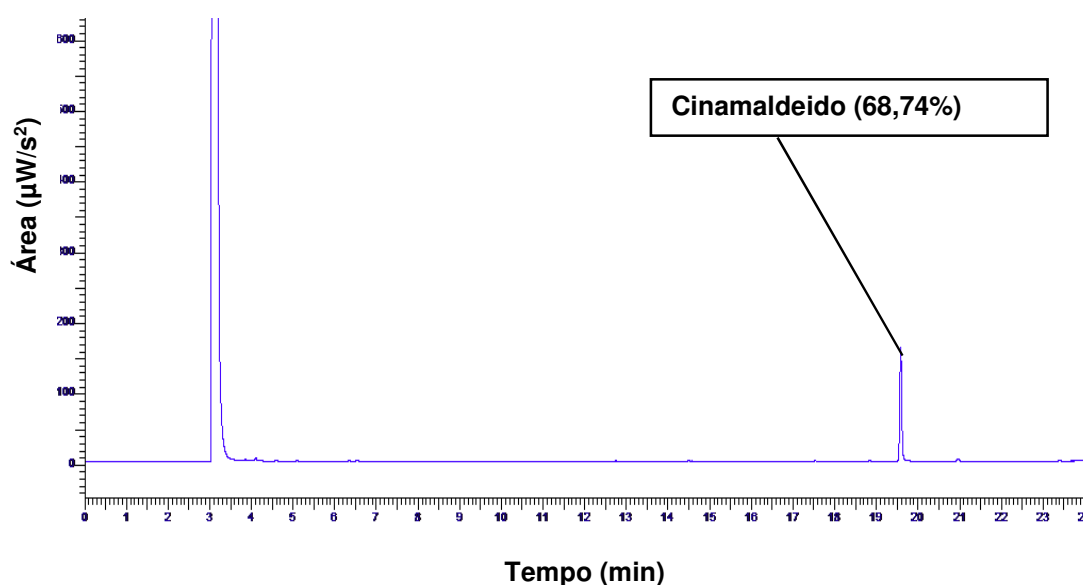
### a) Canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

Na Figura 2.8 está apresentada a curva padrão do princípio ativo principal dos óleos essenciais de canela, Cinamaldeído. Com os dados das áreas em função do tempo de retenção foi possível realizar a determinação da concentração por meio de correlação. Foi verificado, no óleo essencial de canela, extraído da planta adquirida, a concentração de cinamaldeído de 68,74%, proveniente de uma solução de 500 mg.kg<sup>-1</sup>, em que a área apresentada foi de 539076,12 μW/s<sup>2</sup>, com o pico no tempo de retenção de 19,6 minutos, que está representado no cromatograma na Figura 2.9. Para o óleo de canela adquirido da empresa Novo Mundo foi encontrado 35,78% e para o óleo da empresa Ferquímica, 51,78% de cinamaldeído.

**Figura 2.8:** Curva padrão elaborada por meio de cromatografia gasosa (FID) do cinamaldeído



**Figura 2.9:** Cromatograma do óleo essencial de canela extraído, na concentração da solução em 500  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  e a porcentagem de cinamaldeído, no tempo de 19,6 minutos



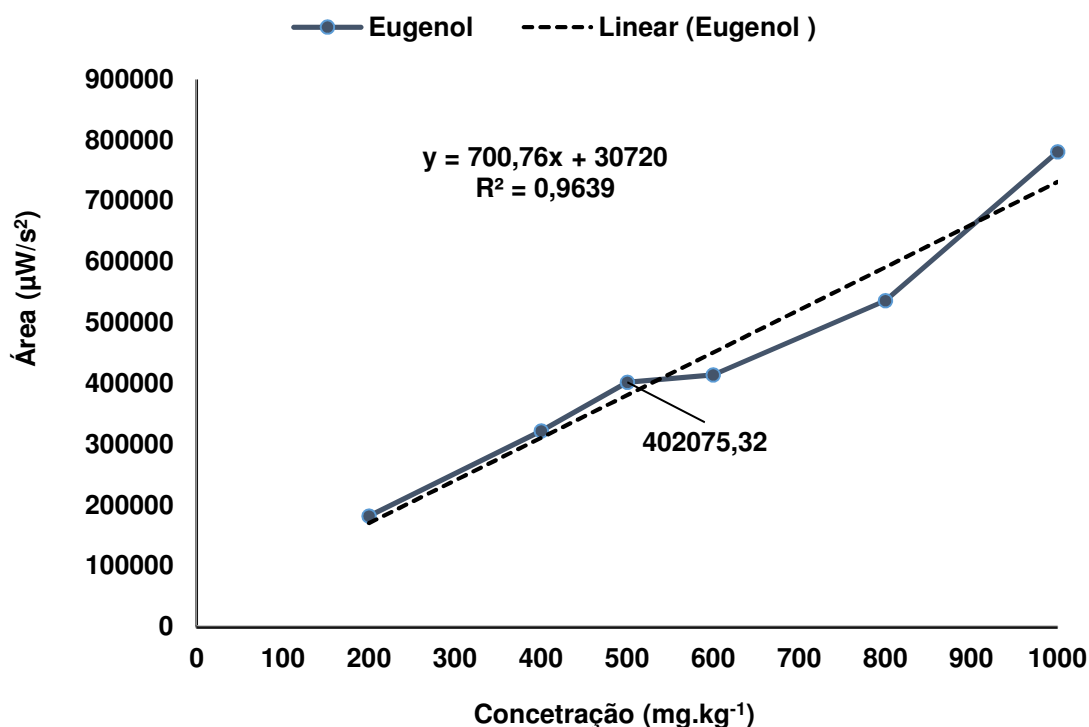
Resultado semelhante foi obtido por Jham et al. (2005), ao identificar o mais ativo componente fungitóxico de óleo de casca de canela, para utilizá-lo como marcador para padronização de um conservante natural. Os autores obtiveram o teor do componente principal por cromatografia gasosa com espectrometria de massa e revelaram que o óleo de canela extraído por hidrodestilação continha 69,1% de cinamaldeído. Beraldo et al. (2013), estudaram a eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes e observaram altas concentração do cinamaldeído (67,58%) para canela e de eugenol (77,58%), para o cravo. Freire (2008), por meio da cromatografia CG/EM, obteve a concentração de cinamaldeído da casca da canela (87,7%).

Em vários trabalhos constata-se a utilização como antisséptico bucal, do aldeído cinâmico (cinamaldeído), um fenilpropanóide de larga atividade biológica em bactérias, fungos e leveduras (FICHI et al., 2007; SENHAJI et al., 2007). Sharverdh et al. (2007), avaliando a atividade biológica do óleo essencial de canela, encontraram em sua constituição, como composto majoritário o aldeído cinâmico (64,17%), nessa concentração foi obtida inibição do *Clostridium in vitro*.

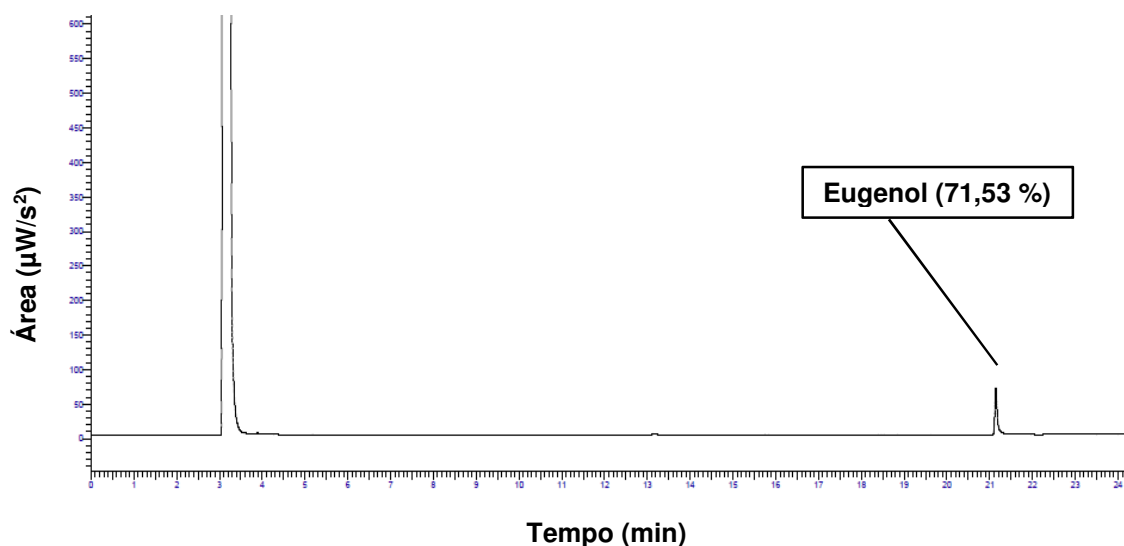
### b) Cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*)

A curva padrão do princípio ativo principal dos óleos essenciais de cravo-da-índia, eugenol, está apresentada na Figura 2.10. Verificou-se no óleo essencial de cravo extraído da planta adquirida, uma concentração de eugenol de 71,53 %, proveniente de uma solução de 500 mg.kg<sup>-1</sup> em que a área apresentada foi de 287614,05 μW/s<sup>2</sup> com o pico no tempo de retenção de 21,1 minutos, apresentado no cromatograma na Figura 2.11. Para o óleo de cravo adquirido da empresa Novo Mundo foi encontrado o teor de 96,71 %. Resultados semelhantes são apresentados por Affonso, et al., (2012), em sua revisão sobre o óleo essencial de cravo da Índia, verificando que os pesquisadores Oussalah et al. (2006) e Prashar et al., (2006) obtiveram 78,00 % de eugenol no óleo de cravo Pereira, et al., (2011), a esta diferença do componente, justifica a importância de se realizar o controle antes do uso desses óleos.

**Figura 2.10:** Curva padrão elaborada por meio de cromatografia gasosa (FID) do eugenol



**Figura 2.11:** Cromatograma do óleo essencial de cravo-da-índia extraído, na concentração da solução em  $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$  e a porcentagem de Eugenol, no tempo de 21,1 minutos



### c) Capím-cidreira (*Cymbopogon citratus*)

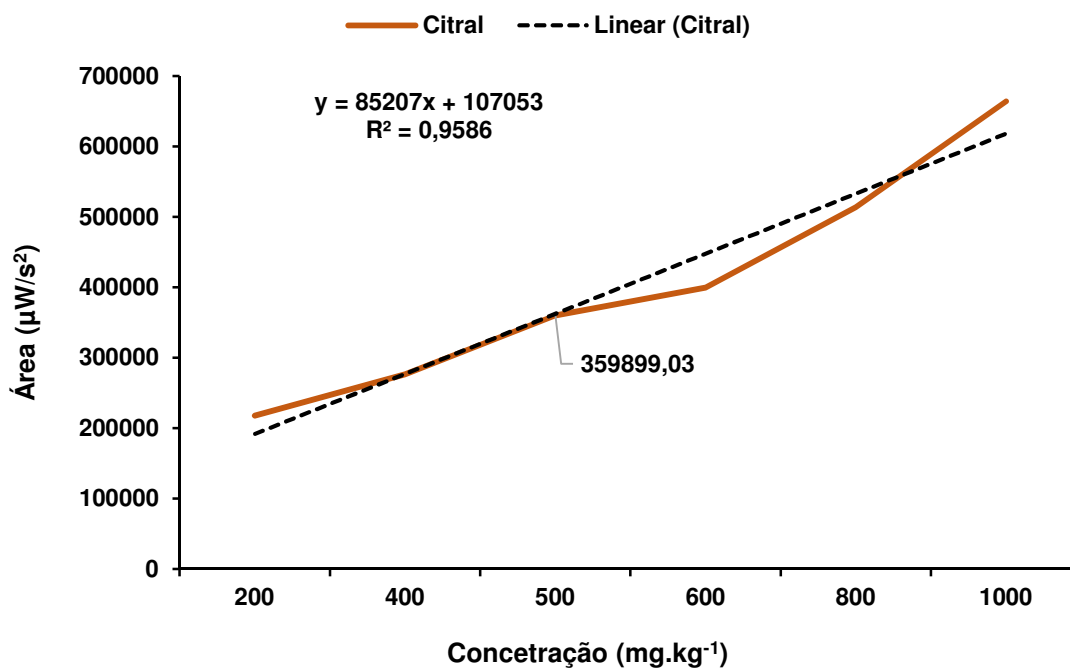
Na Figura 2.12, está apresentada a curva padrão do princípio ativo principal dos óleos essenciais de cidreira: o citral (mistura isomérica de neral e geranial). Para os dados das áreas em função do tempo de retenção, foi possível realizar a determinação da concentração por meio correlação dos dois picos respectivos ao composto e em seguida realizou-se a somatória. As retenções para o Neral e Geranial foram, respectivamente, em 14,4 e 15,1 minutos. Para o cálculo da concentração do citral dos óleos foi realizada uma solução de  $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$  do óleo extraído de cidreira e na cromatografia pôde-se observar que a área do Neral foi de  $75516,87 \mu\text{W/s}^2$  e a do geranial foi de  $177930,94 \mu\text{W/s}^2$ . A somatória das áreas para o citral foi de  $191479,54 \mu\text{W/s}^2$ , que está representada no cromatograma na Figura 2.13. Para o óleo de cidreira extraído, o teor de citral foi de 53,2% e para o óleo adquirido da empresa Novo Mundo foi encontrado 43,57 %.

Resultados semelhantes foram encontrados na extração de óleo de cidreira por Jannuzzi, et al., (2011), ao pesquisar avaliar o comportamento agrônomo, teor de citral e rendimento de óleo essencial em 17 acessos de cidreira de arbusto (*Lippia alba* da coleção da Universidade de Brasília – UnB, verificou que as médias (%)

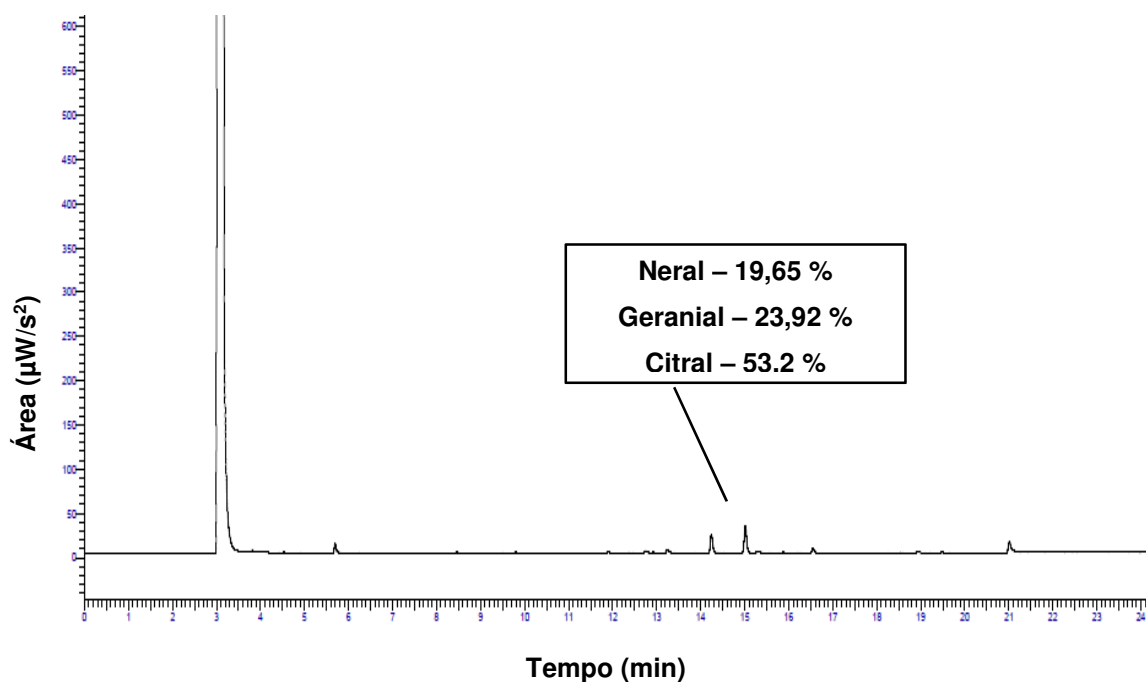


relativa) dos compostos majoritários do óleo essencial cidreira foi de 63,64 % citral, de 36,41 de geranial e 27,78 % de neral.

**Figura 2.12:** Curva padrão elaborada por meio de cromatografia gasosa (FID) do Citral (somatória dos picos de neral e geranial)



**Figura 2.13:** Cromatograma do óleo essencial de cidreira extraído, na concentração da solução em  $500 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  e a porcentagem de citral nos tempos de 14,4 minutos (Neral) e 15,1 minutos (Geranial)



## 2.3.2 Inibição do crescimento micelial (ICM) do *Aspergillus flavus*

### 2.3.2.1 Inibição do crescimento micelial com os extratos aquosos

Os resultados da inibição micelial do *Aspergillus flavus* com a aplicação dos extratos aquosos, são apresentados na Tabela 2.7. Observou-se que há pouca inibição nas concentrações utilizadas. Pôde-se observar que em concentrações pequenas os extratos aquosos de orégano e manjeriço apresentaram os menores micélios na concentração de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Quando aumentamos a concentração para 5000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , a inibição diminuiu pois os diâmetros foram altos: 61 e 58,7% para o orégano e manjeriço, respectivamente. Isso se justifica pelo aumento de nutrientes para o fungo como as proteínas, lipídeos e açúcares que estão nos extratos aquosos. A análise de variância (ANOVA) esta apresentada no APÉNDICE B1.

**Tabela 2.7:** Valores médios da Inibição do Crescimento Micelial (ICM) do *Aspergillus flavus* L. com a aplicação de extratos aquosos das plantas estudadas, medidos em (mm) (\*)

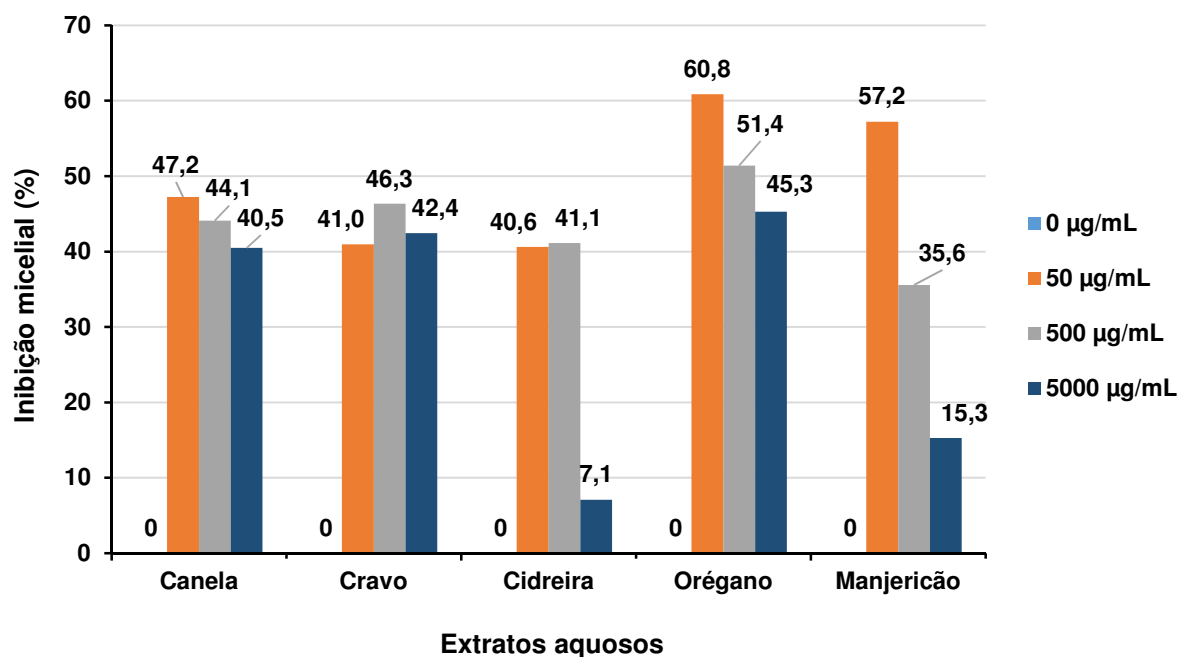
| Extratos aquosos das plantas                            | Concentração dos extratos aquosos ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) |                   |                   |                    |
|---|---|-------------------|-------------------|--------------------|
|   | 0   | 50                | 500               | 5000               |
| <b>Canela</b><br>( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )       | 65.0 $\pm$ 5,2915   | 34.3 $\pm$ 5,1316 | 36.3 $\pm$ 4,6188 | 38.7 $\pm$ 4,9329  |
| <b>Cravo da Índia</b><br>( <i>Syzygium aromaticum</i> ) | 68.3 $\pm$ 6,5064   | 40.3 $\pm$ 2,5166 | 36.7 $\pm$ 3,2145 | 39.3 $\pm$ 6,6583  |
| <b>Capim-limão</b> ( <i>Cymbopogon citratus</i> )       | 65.7 $\pm$ 0,5773   | 39.0 $\pm$ 3,0000 | 38.7 $\pm$ 5,0332 | 61.0 $\pm$ 2,0000  |
| <b>Orégano</b><br>( <i>Origanum vulgare</i> )           | 70.7 $\pm$ 6,4291   | 27.7 $\pm$ 6,8068 | 34.3 $\pm$ 5,8594 | 38.7 $\pm$ 7,5719  |
| <b>Manjeriço</b><br>( <i>Ocimum basilicum</i> )         | 69.3 $\pm$ 8,5049   | 29.7 $\pm$ 8,0208 | 44.7 $\pm$ 6,1101 | 58.7 $\pm$ 13,3166 |

(\*) Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey, para os extratos aquosos comparando com as concentrações (colunas).

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si a 5%, de significância pelo teste de Tukey, nas concentrações dos extratos aquosos comparadas com os óleos essenciais (linhas).

Na Figura 2.14 está apresentada a porcentagem de inibição dos extratos aquosos e pode-se observar que a maior inibição foi para o extrato aquoso de orégano e de manjerição com 60,85% e 57,21%, respectivamente. Nota-se que, com o aumento da concentração nos extratos de orégano e de manjerição, ocorreu a redução da porcentagem de inibição. Quando realizou-se a rotoevaporação, o biofilme que se formou reteve na parede os compostos responsáveis pela inibição e os constituintes que ficaram foram concentrados. Com isso ocorreu o aumento de nutrientes no meio, como observou-se nas inibições baixas do extrato de cidreira e manjerição na concentração de 5000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

**Figura 2.14:** Distribuição percentual da inibição micelial (%) do fungo *Aspergillus flavus* após 7 dias de cultivo com aplicação dos extratos aquosos extraídos das plantas estudadas



**Fonte:** Elaborado pela autora

Venturoso et al. (2011) verificaram que o extrato aquoso de cravo-da-índia inibiu completamente o desenvolvimento de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani*, *Cercospora kikuchii* e *Phomopsis* sp. na concentração de 20% (v/v). Uma concentração maior do que a deste trabalho, o que sugere um novo teste com concentrações maiores que 5% (v/v).

Flávio et al. (2014), estudaram a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de sorgo tratadas com extratos aquosos e verificaram a capacidade do extrato de

canela em reduzir a infestação dos fungos *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Curvularia* e *Fusarium*. Nas concentrações de 0, 10, 20 e 30 % v/v obtiveram inibições de 79,7%. Comparando com os resultados deste trabalho, pode-se verificar a necessidade de realizar novos ensaios aumentando a massa aplicada de extrato em função do volume, porém como apresentado na Figura 2.17 a seguir, ocorre uma alteração muito grande na cor do produto, já que o extrato fica marrom escuro.

### 2.3.2.2 Inibição do crescimento micelial com os extratos alcoólicos

Na Tabela 2.8, observa-se que o extrato de cravo apresentou o menor diâmetro do micélio com 15,7 mm, sendo um índice de inibição micelial importante para a sua escolha como o biofungicida a ser aplicado, uma vez que o seu rendimento na extração foi de 1,96 % em massa do cravo-da-índia moído. A análise de variância (ANOVA) esta apresentada no APÊNDICE B2. A porcentagem de inibição dos extratos alcoólicos está apresentada na Figura 2.15. Pode-se observar que a maior inibição foi para o extrato de cravo na maior concentração, com 77,1%.

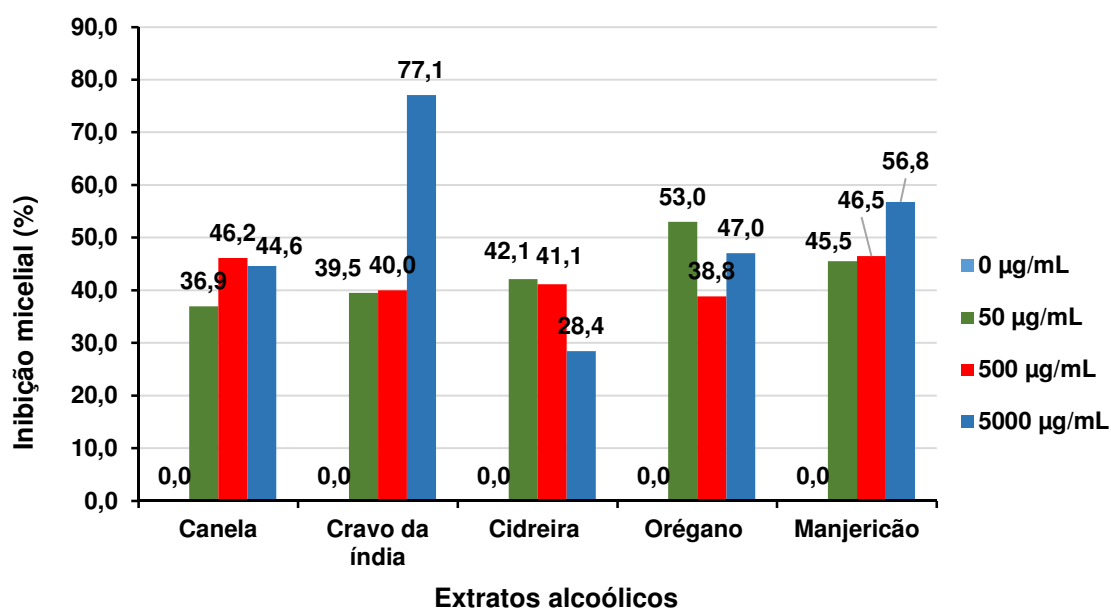
**Tabela 2.8:** Valores médios da Inibição do Crescimento Micelial (ICM) do *Aspergillus flavus* L. com a aplicação de extratos alcoólicos das plantas estudadas, medidos em (mm) (\*)

| Extratos aquosos das plantas                            | Concentração dos extratos aquosos ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) |                     |                    |                     |
|---|--|---------------------|--------------------|---------------------|
|   | 0  | 50                  | 500                | 5000                |
| <b>Canela</b><br>( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )       | 65,0 $\pm$ 5,29 aA   | 41,0 $\pm$ 2,64 bA  | 35,0 $\pm$ 3,00 bA | 35,7 $\pm$ 2,51 bA  |
| <b>Cravo da Índia</b><br>( <i>Syzygium aromaticum</i> ) | 68,3 $\pm$ 6,51 aA   | 41,3 $\pm$ 1,58 bA  | 41,0 $\pm$ 0,00 bA | 15,7 $\pm$ 2,31 cAB |
| <b>Capim-limão</b> ( <i>Cymbopogon citratus</i> )       | 65,7 $\pm$ 0,58 aA   | 38,0 $\pm$ 2,64 bAB | 38,7 $\pm$ 5,51 bA | 47,0 $\pm$ 3,60 bB  |
| <b>Orégano</b><br>( <i>Origanum vulgare</i> )           | 70,7 $\pm$ 6,43 aA   | 27,7 $\pm$ 6,81 bAB | 41,0 $\pm$ 5,19 bA | 35,5 $\pm$ 8,74 bB  |
| <b>Manjeriço</b><br>( <i>Ocimum basilicum</i> )         | 69,3 $\pm$ 8,50 aA   | 38,7 $\pm$ 0,58 bB  | 38,0 $\pm$ 5,19 bA | 30,7 $\pm$ 8,74 bC  |

(\*) Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si a 5% de significância, pelo teste de Tukey, para os extratos aquosos comparando com as concentrações (colunas).

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si a 5% de significância, pelo teste de Tukey, nas concentrações dos extratos aquosos comparadas com os óleos essenciais (linhas).

**Figura 2.15:** Distribuição percentual da inibição micelial (%) do fungo *Aspergillus flavus* após 7 dias de cultivo com aplicação dos extratos alcoólicos extraídos das plantas estudadas



**Fonte:** Elaborado pela autora

Resultados semelhantes foram obtidos por Araujo et al. (2009), os quais avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* de alho, gengibre, orégano, cravo, canela e tomilho sobre a inibição e o desenvolvimento de *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium roqueforti*, *Rhizopus stolonifer*, desenvolvidos em pães artesanais. Para cada planta foram preparados extratos alcoólicos (10%, 20% e 25% v/v), extrato aquoso (10% v/v), extrato alcoólico puro e testemunha sem extrato e álcool. Inibiram totalmente os fungos nos extratos das plantas, exceto o alho para *Penicillium roqueforti* e o gengibre para *Aspergillus ochraceus*. Hema; Kumaravel; Sivasubramanian (2010), avaliando a atividade antimicrobiana dos extratos alcoólicos de canela e cravo-da-índia, nas concentrações de 25, 50, 75 e 100% (v/v), contra estirpes bacterianas de *Pseudomonas lundensis*, *Bacillus cereus* e fúngicas, de *Aspergillus flavus*, e *Aspergillus Níger*, mostraram excelente atividade contra todos os organismos de teste na concentração de 75% (v/v).

### 2.3.2.3 Inibição do crescimento micelial com os óleos essenciais

A partir dos resultados apresentados na Tabela 2.9 foi possível avaliar a inibição do crescimento micelial, provocada pelos óleos essenciais. Ocorreu diferença significativa entre os óleos, principalmente para o de manjeriço que não inibiu nem na maior concentração. Para o óleo de canela também ocorreu diferença significativa, pois a sua inibição total ocorreu já na concentração de 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A análise de variância está apresentada no APÊNDICE B3.

**Tabela 2.9:** Valores da média da Inibição do Crescimento Micelial (ICM) do *Aspergillus flavus* L. com a aplicação dos óleos essenciais das plantas estudadas, com medição em milímetros (mm) (\*)

| Óleos essenciais | Concentrações ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) |          |         |         |          |         |         |
|------------------|--|----------|---------|---------|----------|---------|---------|
|                  | 0  | 50       | 100     | 250     | 500      | 1000    | 2000    |
| <b>Canela</b>    | 65,0 Ba  | 60,7 BCa | 17,3 Db | 0,0 Cc  | 0,0 Cc   | 0,0 Bc  | 0,0 Bc  |
| <b>Cravo</b>     | 68,3 Ba  | 62,7 BCb | 49,0 Cc | 6,0 Cd  | 0,0 Ce   | 0,0 Be  | 0,0 Be  |
| <b>Cidreira</b>  | 65,7 Ba  | 57,0 Cb  | 56,3 Bb | 48,7 Bc | 30,0 Bd  | 0,0 Be  | 0,0 Be  |
| <b>Orégano</b>   | 76,7 Aa  | 76,7 Aa  | 73,7 Aa | 49,0 Bb | 35,7 ABc | 0,0 Bd  | 0,0 Bd  |
| <b>Manjeriço</b> | 71,0 ABa   | 67,7 Ba  | 72,0 Aa | 56,7 Ab | 37,3 Ac  | 34,7 Ac | 16,7 Ad |

(\*) Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas concentrações não diferem a 5% de significância, pelo teste de Tukey.

As letras iguais em maiúsculo, denotam que as médias das inibições miceliais para os óleos não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

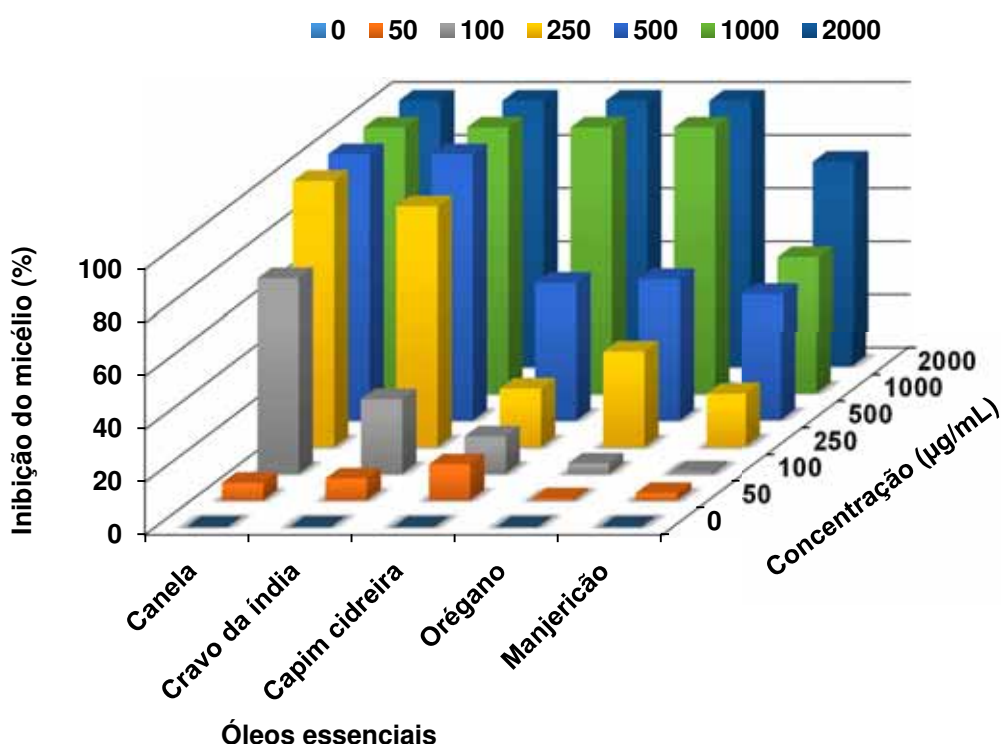
Nos resultados obtidos na aplicação dos óleos de canela e cravo-da-índia contra *Aspergillus flavus*, encontrou-se valores de inibição semelhantes aos obtidos por Souza et al. (2004), que aplicaram os óleos essenciais de canela e cravo em produtos de panificação e observaram inibição do desenvolvimento dos fungos *Rhizopus sp.*; *Penicillium spp.*; *Eurotium repens* e *Aspergillus níger*, quando adicionado óleos essenciais na massa nas concentrações de 500; 1000; 1500 e 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para canela de 600 e 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para o cravo.

Nos estudos realizados por Mitchell et al. (2010), o efeito do óleo essencial de orégano sobre espécies de *Aspergillus*, foi muito positivo contra *A. flavus* e *A. parasiticus* inibido ao longo de 14 dias, nas concentrações de 0,6; 1,25; e 2,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$

em meio sólido. Assumindo-se a densidade dos óleos essenciais aproximadamente 1 g/L, essas concentrações variaram de 0, 600, 1250 e 2500  $\mu\text{g/mL}$ . Resultados semelhantes foram encontrados por Tatsadjieu et al. (2010), ao estudarem os efeitos do óleo de manjeriço sobre a inibição do crescimento de *Aspergillus flavus*, sobre milho na concentração de 60  $\mu\text{L/mL}$ . Ao considerar-se a densidade do óleo de 1 mg/mL, essa equivale a 60000  $\mu\text{g/mL}$ , concentração muito alta.

Na Figura 2.16 esta apresentada a média da porcentagem de inibição do crescimento micelial do *A. flavus* com a aplicação dos óleos essenciais nas concentrações de 0, 50, 500, 1000 e 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , em que constata-se a eficiência do óleo de canela em comparação ao óleo de manjeriço.

**Figura 2.16:** Distribuição percentual da Inibição do Crescimento Micelial (CM) do *Aspergillus flavus* após 7 dias de cultivo com aplicação dos extratos alcoólicos extraídos das plantas estudadas



Fonte: Elaborado pela autora

Os óleos de canela, citronela, capim-limão e tomilho inibiram totalmente a germinação dos conídios do fungo *Cercospora coffeicola* a partir de 1000  $\mu\text{L.L}^{-1}$ , enquanto o óleo do cravo-da-índia inibiu totalmente a germinação dos conídios, a partir de 1500 e 2000  $\mu\text{L.L}^{-1}$ . Mesmo com a maior concentração utilizada, os óleos de

eucalipto e NIM não inibiram totalmente a germinação dos conídios desse fungo (PEREIRA et al., 2011). Viegas et al. (2005), no estudo do óleos essenciais de alho, na concentração de 2,0 mg.mL<sup>-1</sup>, reduziram significativamente o crescimento de *Aspergillus* sp., mas o óleo da casca de canela e de hortelã apresentaram atividade antifúngica intermediária.

Na Tabela 2.10, apresentam-se os resultados da inibição micelial do *Aspergillus flavus* com a aplicação dos óleos essenciais, pelos métodos de medição manual e por imagens. Observou-se que a melhor inibição foi para os óleos de canela e cravo nas concentrações de 250 e 500 µg.mL<sup>-1</sup>.

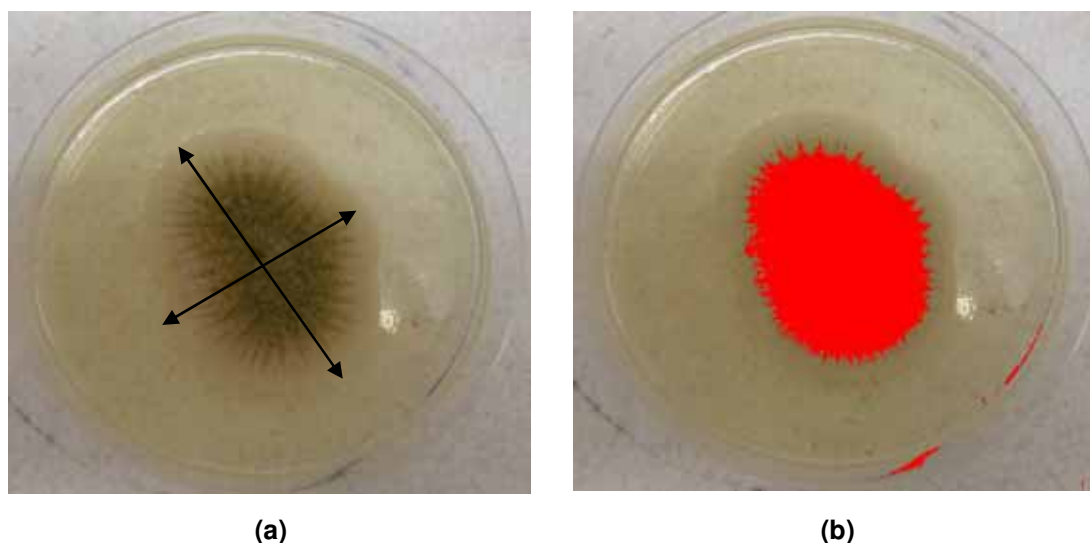
**Tabela 2.10:** Valores da média da Inibição do Crescimento Micelial (ICM) do *Aspergillus flavus* L. com a aplicação dos óleos essenciais das plantas estudadas, com medição em milímetros (mm) e por leitura da imagem realizada pelo software de análise de imagens LensEye®

| Concentração dos óleos essenciais (µg.mL <sup>-1</sup> ) | Canela |        | Cravo da Índia |        | Cidreira |        | Orégano |        | Manjeriço |        |
|--|--------|--------|----------------|--------|----------|--------|---------|--------|-----------|--------|
|  | Manual | Imagem | Manual         | Imagem | Manual   | Imagem | Manual  | Imagem | Manual    | Imagem |
| 0  | 0      | 0      | 0              | 0      | 0        | 0      | 0       | 0      | 0         | 0      |
| 50   | 12,31  | 20,51  | 8,14           | 20,77  | 13,20    | 27,84  | 13,24   | 15,43  | 19,72     | 18,86  |
| 100  | 40,52  | 52,56  | 42,92          | 36,46  | 14,22    | 27,67  | 18,56   | 29,87  | 34,56     | 26,86  |
| 250  | 100    | 100    | 91,22          | 37,79  | 25,89    | 60,34  | 25,00   | 71,70  | 48,59     | 39,46  |
| 500  | 100    | 100    | 100            | 100    | 54,32    | 89,34  | 41,18   | 80,17  | 47,89     | 68,03  |
| 1000   | 100    | 100    | 100            | 100    | 100      | 100    | 100     | 100,00 | 50,70     | 67,18  |
| 2000   | 100    | 100    | 100            | 100    | 100      | 100    | 100     | 100,00 | 76,06     | 95,97  |

Ao analisar as inibições dos micélios, observou-se que as medidas dos diâmetros eram irregulares. Propôs-se, então, a leitura da imagem por meio do software de análise de imagens *LensEye*® para a inibição micelial dos óleos nas mesmas concentrações. Assim obteve-se uma medição mais exata de cada colônia, como apresentado na Figura 2.17.



**Figura 2.17: Representação** do diâmetro da colônia do fungo *Aspergillus flavus*, após 7 dias de cultivo com aplicação do óleo essencial de orégano na concentração de  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , com medição manual (a) e por imagem no software *LensEye*® (b)

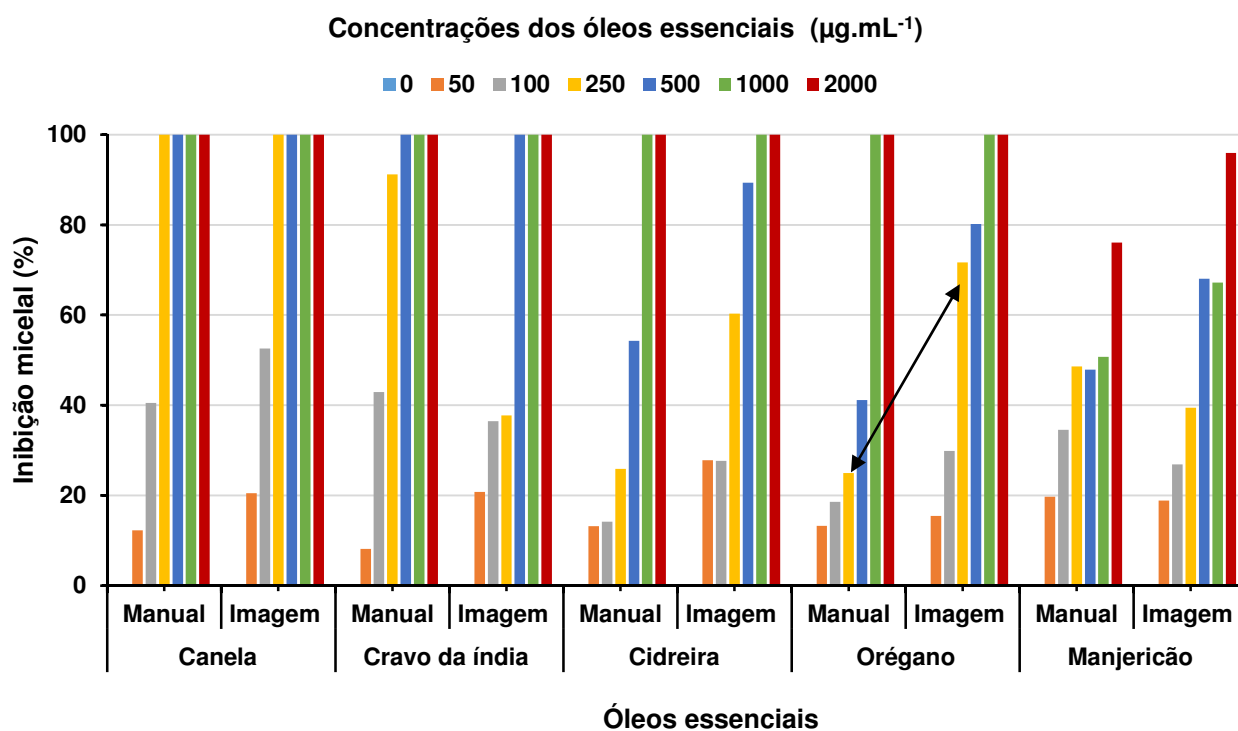


**Fonte:** Elaborado e produzido pela autora

Algumas medições apresentaram diferença muito grande dos resultados, como apresentado na Figura 2.18, como na concentração do óleo de orégano em  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , para a qual a medição manual indicou 25 % de inibição. A medição feita digitalmente foi de 71,70%. Portanto, acredita-se que estudos mais detalhados, dessa metodologia possam resolver essa deficiência durante a medição dos micélios manual realizada com o auxílio de paquímetro.

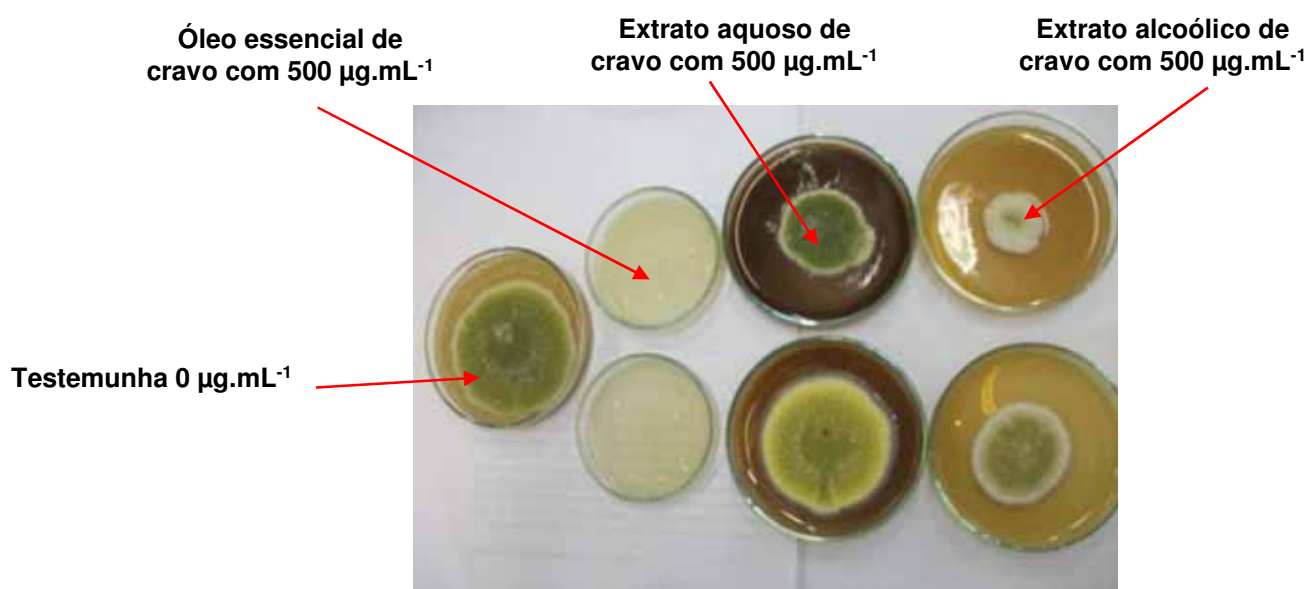
Na Figura 2.19 apresenta-se a inibição por meio da aplicação dos extratos aquosos, alcoólicos e dos óleos essenciais na concentração de 0 e  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Nota-se que só ocorre a inibição total com a aplicação do óleo essencial de cravo. Ao observar as placas verificou-se a cor do meio ao utilizar os extratos aquosos, marrom escuro, o que pode causar problemas ao aplicar em alimentos, sugerindo testes sensoriais.

**Figura 2.18:** Medição da inibição micelial (%) o do fungo *Aspergillus flavus*, após 7 dias de cultivo com aplicação dos óleos essenciais nas concentrações de 0 a 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , com medição manual (a) e por imagem no software *LensEye* (b)



Fonte: Elaborado pela autora

**Figura 2.19:** Micélio do fungo *Aspergillus flavus* após 7 dias de cultivo com aplicação dos extratos aquoso e alcoólico e óleo essencial de cravo



Fonte: Elaborado pela autora

### 2.3.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) do *A. flavus* em meio de cultura BDA

Para este estudo foram empregados os três óleos essenciais que obtiveram as melhores inibições dos micélios nas etapas anteriores. Os resultados obtidos para a CIM foram identificados como positivos (+) quando em 48 e 72 horas ocorreu esporulação do fungo, e negativos (-), quando não houve ocorrência de esporulação do fungo. No Quadro 2.1 são apresentados os resultados para óleos de cravo, canela, cidreira, orégano e manjeriçao. Observou-se que as CIM para os óleos essenciais de canela e cravo foram de 250 µg/mL, e no óleo de cidreira foi de 500 µg/mL, para todas as quadruplicatas.

**Quadro 2.1:** Concentração inibitória mínima (CIM) para os óleos de canela, cravo-da-índia, cidreira, orégano e manjeriçao, em função da presença e ausência de esporos

| Óleos essenciais   | Concentração dos óleos (µg.mL <sup>-1</sup> ) |    |     |     |     |      |      |
|--|---|----|-----|-----|-----|------|------|
|  | 0*  | 50 | 100 | 250 | 500 | 1000 | 2000 |
| <b>Canela</b><br>( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )                | 0*  | 50 | 100 | 250 | 500 | 1000 | 2000 |
|  | +   | +  | +   | -   | -   | -    | -    |
|  | +   | +  | +   | -   | -   | -    | -    |
|  | +   | +  | +   | -   | -   | -    | -    |
|  | +   | +  | +   | -   | -   | -    | -    |
| <b>Cravo da índia</b><br>( <i>Syzygium aromaticum</i> )          | 0*  | 50 | 100 | 250 | 500 | 1000 | 2000 |
|  | +   | +  | +   | -   | -   | -    | -    |
|  | +   | +  | +   | -   | -   | -    | -    |
|  | +   | +  | +   | -   | -   | -    | -    |
|  | +   | +  | +   | -   | -   | -    | -    |
| <b>Capim-limão ou cidreira</b><br>( <i>Cymbopogon citratus</i> ) | 0*  | 50 | 100 | 250 | 500 | 1000 | 2000 |
|  | +   | +  | +   | +   | +   | -    | -    |
|  | +   | +  | +   | +   | +   | -    | -    |
|  | +   | +  | +   | +   | +   | -    | -    |
|  | +   | +  | +   | +   | +   | -    | -    |
| <b>Orégano</b><br>( <i>Origanum vulgare</i> )                    | 0*  | 50 | 100 | 250 | 500 | 1000 | 2000 |
|  | +   | +  | +   | +   | +   | +    | +    |
|  | +   | +  | +   | +   | +   | +    | +    |
|  | +   | +  | +   | +   | +   | +    | +    |
|  | +   | +  | +   | +   | +   | +    | +    |
| <b>Manjeriçao ou alfavaca</b><br>( <i>Ocimum basilicum</i> )     | 0*  | 50 | 100 | 250 | 500 | 1000 | 2000 |
|  | +   | +  | +   | +   | +   | +    | +    |
|  | +   | +  | +   | +   | +   | +    | +    |
|  | +   | +  | +   | +   | +   | +    | +    |
|  | +   | +  | +   | +   | +   | +    | +    |

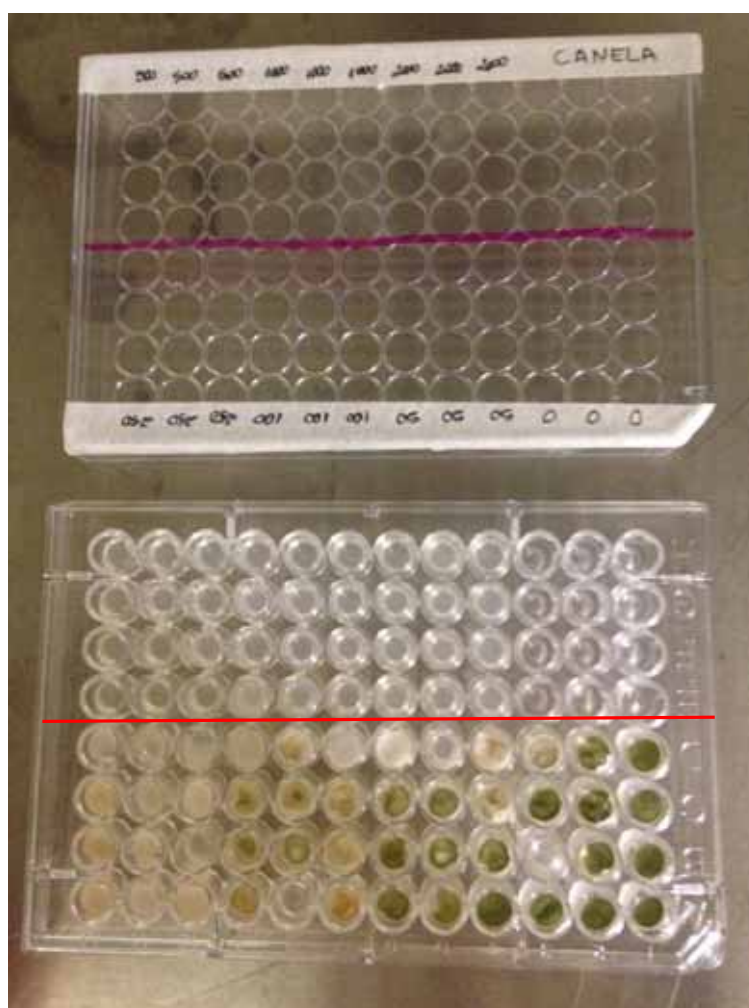
\* Testemunha (Contendo somente o BDA e a suspensão dos esporos a 10<sup>6</sup> (esporos.mL<sup>-1</sup>))

+ Presença de esporos do *Aspergillus flavus* após 72h de cultivo

- Ausência de esporos do *Aspergillus flavus* após 72h de cultivo

Pode-se verificar que o método de microdiluições é importante por ser de fácil manipulação, porém o micélio, após 72 hs de cultivo, pode ultrapassar os limites de cada recipiente individual de modo que as medidas devem ser realizadas não ultrapassando esse período. Também foi possível observar a eficiência do óleo de canela que na concentração de  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , inibiu o crescimento do fungo, conforme apresentado na Figura 2.20. Ao comparar os resultados da ICM com CIM, observou-se que nas duas técnicas as inibições foram semelhantes: a canela em  $250 (\mu\text{g.mL}^{-1})$  e para o manjeriço não ocorreu inibição. Notou-se que a CIM é uma técnica mais rápida, fácil e com um custo menor, ideal para testes rápidos, porém é importante a confirmação pelo método de ICM.

**Figura 2.20:** Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o óleo de canela em concentrações de 0 a  $2000 (\mu\text{g.mL}^{-1})$



Fonte: Elaborado pela autora

Simié et al. (2004), demonstraram a atividade antifúngica de alguns óleos essenciais, dentre eles o de canela, contra *Aspergillus flavus* em microplacas de 96 poços, a 28 °C por 72 horas. As menores concentrações para a CIM com o óleo de canela foi em 0,25  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  que corresponde a 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  sem crescimento aparente. Segundo Gasperini (2014), o óleo essencial de canela (*Cinamomum burmanii*) apresentou elevada ação contra *A. flavus*, nas análises de CIM, com inibição na concentração de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Souza (2010), ao avaliar os mecanismos de atividade antifúngica de óleos essenciais contra fungos patogênicos, constatou que a CIM para *A. flavus*, com os óleos essenciais de canela e orégano foi de 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , ao passo que para óleo de manjerição foi de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Quando comparamos com os resultados deste trabalho, observou-se que para a canela, os resultados apresentaram-se próximos, porém o orégano e manjerição mostraram-se inferior a 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Também para os fungos *A. flavus* e *A. fumigatus*, nos estudos realizados por Cleff et al. (2010), apresentaram ocorreu maior sensibilidade ao óleo de orégano cujo CIM foi entre 0,06% e 0,45%.

#### **2.3.4 Inibição do crescimento microbiano em vagens de amendoim com aplicação do óleo de canela**

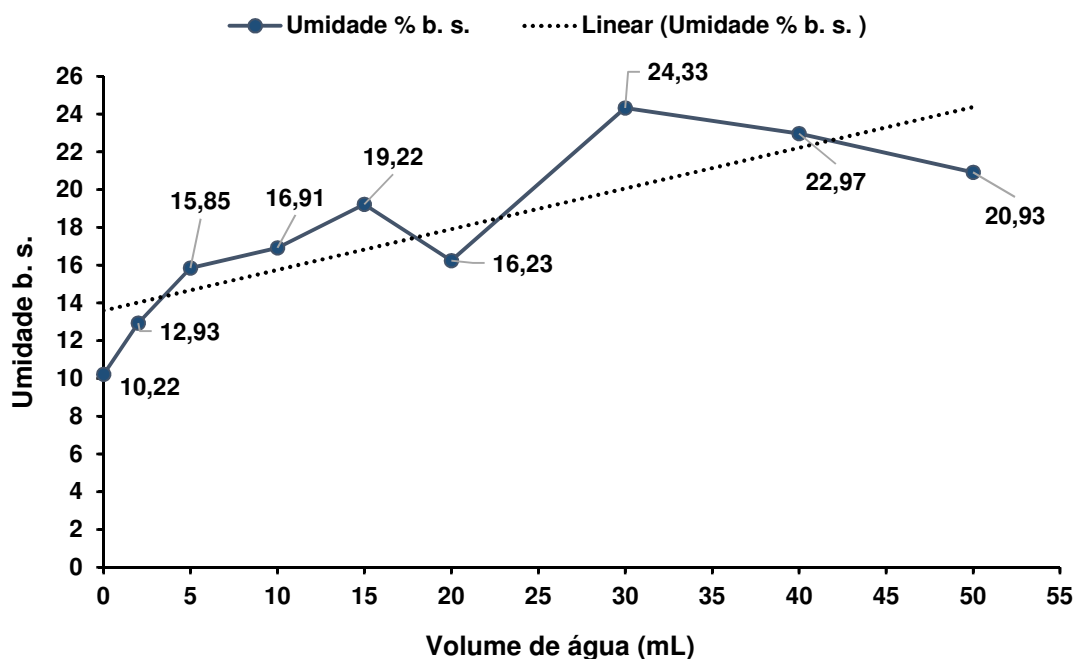
##### **2.3.4.1 Avaliação da retenção de água nas vagens de amendoim**

Para a realização das aplicações dos óleos essenciais nas vagens de amendoim é importante controlar a umidade, pois o crescimento do *A. flavus*, segundo BAKKER; ARKEMA (1999), ocorre no interior das vagens na umidade de 15 % b. u., e na Umidade Relativa (UR) de 82% do ambiente armazenado. Portanto, antes de realizar a aspersão realizou-se esse experimento.

A umidade inicial da vagens utilizadas nesse teste foi de 10,22 % b. s. Na Figura 2.21, encontram-se as umidades base seca (b. s.) das vagens de amendoim após a aspersão de água para a definição do volume a ser aplicado nos experimento de inibição da contaminação das vagens. Nota-se que para ocorrer um aumento da retenção de água em aproximadamente 2 % b. s. nas 25 g de vagens de amendoim,

o volume aplicado foi de 5 mL. Esse volume foi utilizado nos experimentos de inibição do *A. flavus* em vagens irradiadas e com contaminação de origem, a seguir.

**Figura 2.21:** Umidade (b. s.) das vagens de amendoim em função do volume de água borrifadas manualmente (mL)



#### 2.3.4.2 Inibição do crescimento fúngico das vagens irradiadas com aplicação de suspensão de esporos de *Aspergillus flavus*

Nos ensaios de inibição do crescimento fúngico em vagens de amendoim irradiadas e posteriormente contaminadas com a aplicação de com 1 mL da suspensão de  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> de *Aspergillus flavus*, observou-se que ocorreu a melhor inibição apenas na concentração de 250 mg.mL<sup>-1</sup> para o óleo de canela, como pode ser visto na Tabela 2.11. A análise de variância esta apresentada no APÊNDICE B4.

**Tabela 2.11:** Inibição de *Aspergillus flavus* em vagens de amendoim por óleos essenciais de canela, cravo e cidreira em log de Unidade Formadora de Colônia (log UFC.g<sup>-1</sup>) (\*)

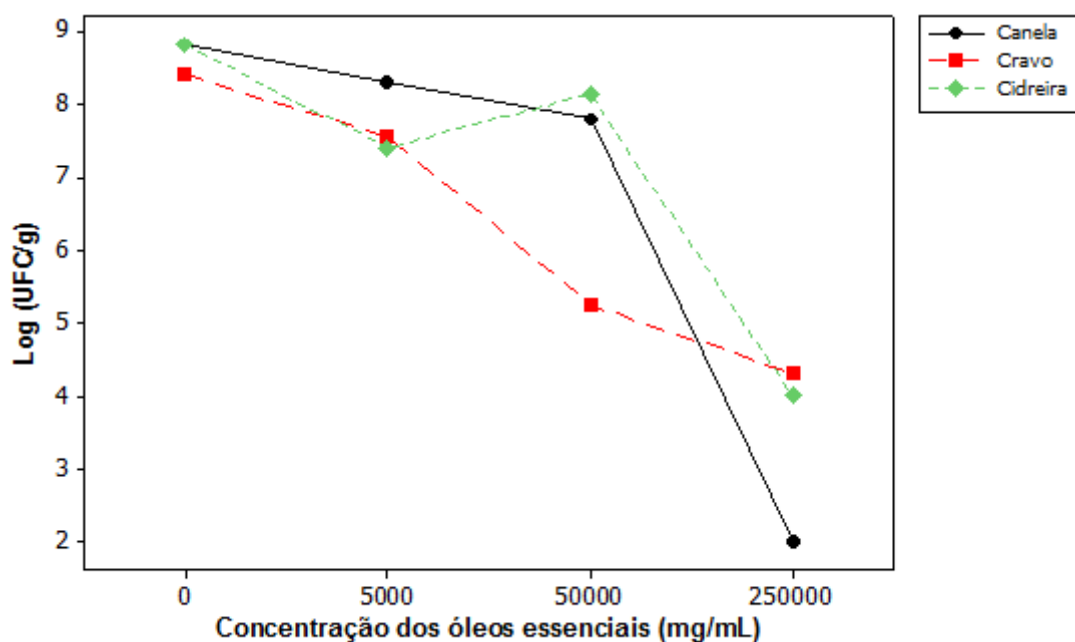
| Óleos essenciais   | Concentração dos óleos (µg.mL <sup>-1</sup> ) |                |                |                |
|--|---|----------------|----------------|----------------|
|  | 0   | 5000           | 50000          | 250000         |
| <b>Canela</b><br>( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )                | 8,81 ± 0,00 aA                                | 8,30 ± 0,00 aA | 7,78 ± 0,67 aA | 2,00 ± 0,00 bB |
| <b>Cravo da Índia</b><br>( <i>Syzygium aromaticum</i> )          | 8,41 ± 0,57 aA                                | 7,54 ± 0,09 aA | 5,24 ± 4,58 bA | 4,30 ± 3,82 bB |
| <b>Capim-limão ou cidreira</b><br>( <i>Cymbopogon citratus</i> ) | 8,81 ± 0,00 aA                                | 7,39 ± 0,12 aA | 8,15 ± 0,21 aA | 4,00 ± 2,83 bB |

(\*) Médias seguidas da mesma letra minúsculas não diferem entre si a 5% de significância, pelo teste de Tukey, para os óleos essenciais comparando com as concentração (colunas).

Médias seguidas da mesma letra maiúsculas não diferem entre si a 5% de significância, pelo teste de Tukey, nas concentrações dos óleos essenciais comparados com os óleos essenciais (linhas).

Na Figura 2.22 foi possível verificar o efeito do aumento das concentrações dos óleos de canela, cravo e cidreira sobre *A. flavus* nas vagens de amendoim, em que com o aumento da concentração resultou na diminuição da contaminação para todos os óleos.

**Figura 2.22:** Efeitos principais sobre as respostas na inibição de *Aspergillus flavus* em vagens de amendoim por óleos essenciais de canela, cravo e cidreira



Nos trabalhos sobre armazenamento de amendoim nota-se a necessidade do controle da infestação fúngica, por meio de fungicidas químicos. Nos estudos de Diniz, et al (2001) sobre a qualidade fisiológica e sanitária das sementes de amendoim armazenadas sob diferentes tratamentos (sementes tratadas com o fungicida Pentacloronitrobenzeno – PCNB e sementes não tratadas) e embalagens (papel e recipiente metálico), por três períodos de tempo (0, 6 e 12 meses), na temperatura de 20 °C e umidade relativa de 65%, verificou-se redução na incidência de *Aspergillus niger* ao longo do armazenamento em todos os tratamentos e embalagens, diminuindo também a incidência de *Aspergillus flavus* nas sementes tratadas com PCNB.

O óleo mineral (1% p/v) protegeu grãos de sorgo úmidos contra o mofamento causado pelos fungos *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. e durante o armazenamento, na espera pela secagem de grãos de milho, os tratamentos desses grãos com ácido acético ou uréia foram eficientes no controle do mofamento causado por *Aspergillus flavus* e de *Penicillium* spp. Também foi importante o sistema com aeração em que todos os tratamentos, inclusive a testemunha (1,2%), apresentaram baixo nível de mofamento dos grãos sugerindo que a temperatura intergranular e a umidade dos grãos, quando mantida entre 13,1 a 15,5% e a temperatura entre de 22,0 a 23,7 °C, foram desfavoráveis ao desenvolvimento (Pinto 2001, 2004; PINTO; PRADO; OLIVEIRA, 2005).

#### **2.3.4.3 Inibição do crescimento fúngico nas vagens de amendoim com microbiota de origem**

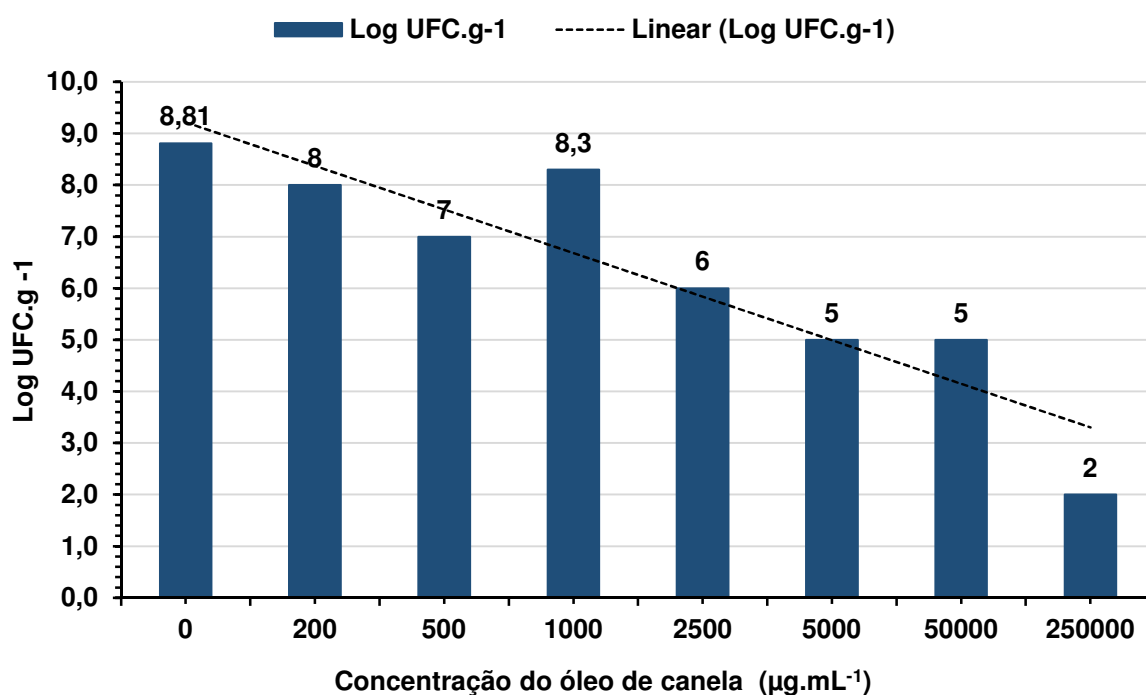
##### **a) Inibição da microbiota fúngica de origem com óleo de canela em ambiente com umidade relativa de 75.3%**

Apesar de o óleo de canela ter se mostrado o mais eficiente nas análises anteriores, as extrações realizadas em bancada resultaram em um pequeno volume, devido ao método extração por meio de um equipamento de bancada. Por essa razão as próximas análises empregou-se os óleos essenciais da empresa Novo Mundo e Ferquímica, e com as análises dos compostos majoritários realizaram-se os ajustes das concentrações para cada aplicação.



Na Figura 2.23, estão apresentados os resultados da capacidade de inibição da contaminação da microbiota fúngica de origem, com a aplicação do óleo essencial. Foram realizados ensaios com concentrações de óleo essencial de canela de 0 a 250 mg.mL<sup>-1</sup>, e pode-se observar que a concentração capaz de obter a maior inibição foi muito alta: somente a 250000 µg.mL<sup>-1</sup>, equivalente a 250 mg.mL<sup>-1</sup>. Notou-se que a maior inibição ocorreu na maior concentração do óleo, o qual considera-se muito elevado, haja visto o forte aroma de canela presente no laboratório ao longo dos ensaios nessa concentração, o que espera-se alterar as características organolépticas do amendoim.

**Figura 2.23:** Inibição da microbiota fúngica de origem das vagens de amendoim com a aplicação de óleos essencial de canela

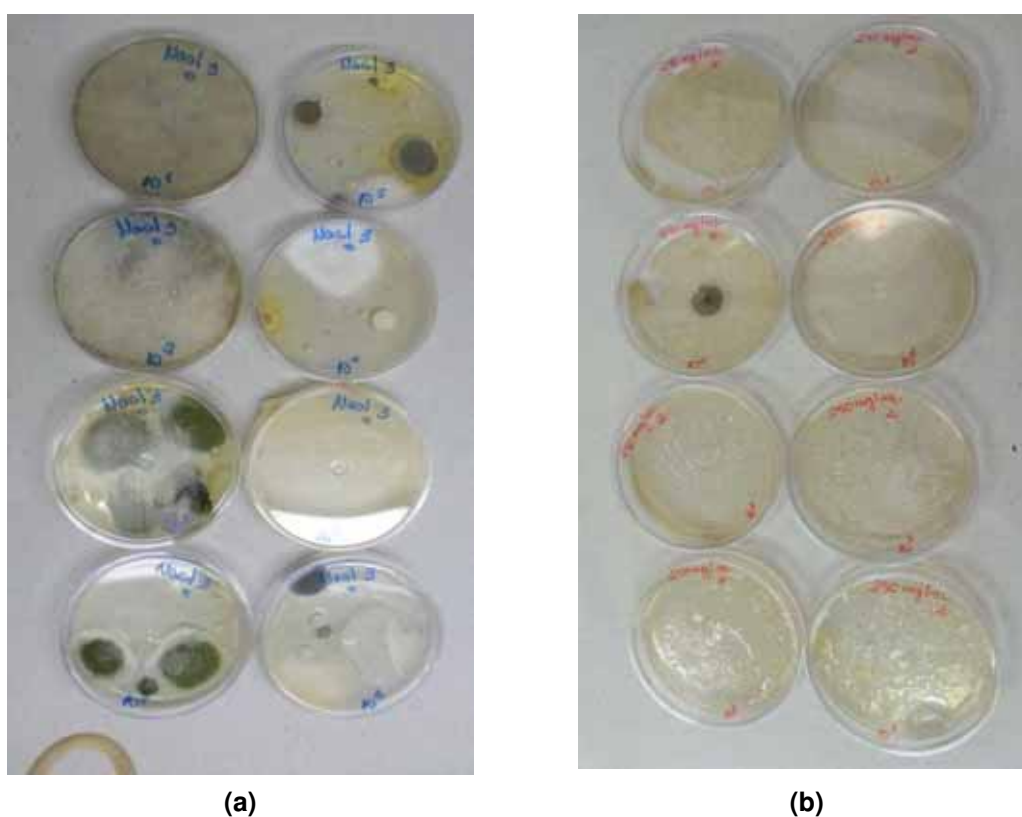


Na legislação brasileira é permitido para grãos de amendoim a contagem de mofos e bolores < 5x10<sup>3</sup> UFC.g<sup>-1</sup>, equivalente a 5,7 Log UFC.g<sup>-1</sup> (BRASIL, 2001). Nos resultados obtidos pôde-se verificar que com a aplicação de 5000 µg.mL<sup>-1</sup> a contaminação foi de 5 Log UFC.g<sup>-1</sup>, índice abaixo do exigido, portanto pode-se verificar que a aplicação do óleo de canela apresentou um grande potencial como biofungicida contra a microbiota de origem.

Observando a Figura 2.24 verifica-se a diversidade de micro-organismos presentes nas vagens de amendoim. Na amostra de vagens de amendoim, coletada aleatoriamente na recepção das vagens na COPLANA utilizadas neste experimento. Na placa sem óleo a contaminação fúngica foi de  $6,5 \times 10^{10}$  UFC.g<sup>-1</sup>.

Se avaliarmos o custo na aplicação do óleo de canela extraído, em que o custo da planta é de R\$ 18,70 por (Tabela 2.2), foram utilizada 150 g com o custo de R\$ 2,80 e com rendimento de 1,2 mL (Tabela 2.5). Sem avaliar o custo do processo da extração, o litro de óleo custa R\$ 2333,33 com esse rendimento. Esse custo é alto porque o Brasil não produz canela. O custo, no atacado, do óleo essencial de canela, é de R\$ 460,00 o litro ANEXO II (FREQUIMICA, 2015). Com esses dados, pode-se dizer que a maioria das pesquisas com óleo essencial necessitam de maior avaliação do custo em se tratando de toneladas de grãos.

**Figura 2.24:** Microbiota fúngica de origem nas vagens de amendoim (a), placa com contaminação fúngica da amostra com 250 mg.mL<sup>-1</sup> (b)



**Fonte:** Elaborado e produzido pela autora

Pode-se notar que não há presença do fungo *Aspergillus flavus* no amendoim quando tratado com óleo essencial de canela na concentração de 250000 µg.mL<sup>-1</sup>. Porém, aparentemente, há presença de bactérias, nas diluições 10<sup>-2</sup> e uma colônia *Aspergillus fumigatus*. Segundo Valle e França (2008), o *A. fumigatus* pode ser encontrado na atmosfera em todas as estações do ano, no solo, em vegetais ou na matéria orgânica em decomposição aeróbia. Além disso, as vagens de amendoim são produzidas no solo e estão diretamente expostas à sua contaminação de origem (HORN et al., 2000).

Bhattacharya e Raha (2002), observaram nos amendoins de Santiniketan, Bengala Ocidental, na Índia, a presença dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Curvularia* e *Mycelia sterilia*. Dentre as espécies mais frequentes do gênero *Aspergillus* encontram-se: *A. niger* (55%), *A. rubber* (45%) e *A. flavus* (40%). Por outro lado, Nakai et al. (2008), ao analisarem amendoins provenientes de Tupã - SP., mostraram predominância de *Fusarium* sp. (32,8%) e *A. flavus* (10,3%), além da presença de outros cinco fungos filamentosos. Dessa forma, caracteriza-se que a qualidade da infestação está intimamente ligada às características do solo e, provavelmente, de manejo da cultura.

#### **b) Inibição da microbiota fúngica de origem com os óleos essenciais em ambientes com umidades relativas e temperatura controladas**

Na Tabela 2.12 são apresentados os resultados das análises de inibição da microbiota fúngica, das vagens de amendoim em ausência do óleo e na presença do óleo de canela nas concentrações de 0, 50 e 250 mg.mL<sup>-1</sup>, armazenados durante 30 dias em umidades relativas de 75,3 %, 84,3 %, 90,3 %. Pôde-se constatar que a contaminação fúngica apresentou diminuição com o aumento da concentração de óleo de canela, e tal redução foi significativa apenas para umidade de 84,3%. Ocorreu uma diminuição significativa na contaminação de 8,81 para 2,15 Log UFC.g<sup>-1</sup>.

Para as aflatoxinas observou-se a ocorrência de um aumento muito alto da aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) para as amostras dos grãos debulhados das vagens que não foram borrifadas com o óleo de canela. A aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>) foi detectada apenas na amostra com 50 mg.mL<sup>-1</sup>, armazenada na umidade 90,3%, com o resultado entre o Limite Quantificação do Método (LQM) e o Limite Detecção do Método (LDM) que foi

< 0,2. Para as aflatoxinas G<sub>1</sub> (AF G<sub>1</sub>) e G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) não foi detectada a presença em nenhuma das amostras de grãos debulhados das vagens de amendoim em todas as condições de armazenamento.

Estes resultados confirmam a eficiência do óleo de canela como biofungicida contra o *A. flavus*, durante o armazenamento das vagens de grãos de amendoim em umidade abaixo de 75,3%. Como a média de umidade relativa anual no município de Jaboticabal é de 70,6% (JABOTICABAL, 2015), confirma-se que a aplicação do óleo a 50 mg.mL<sup>-1</sup> promoverá a inibição abaixo da legislação e não aumentará o índice de aflatoxinas.

**Tabela 2.12:** Variação da Inibição da contaminação fúngica e da aflatoxina em vagens e grãos de amendoim em função das condições de umidade relativa do armazenamento e da concentração de óleo essencial de canela aplicado

| Umidades do armazenamento   | Concentrações do óleo de canela mg.mL <sup>-1</sup> | Média Log UFC*. g <sup>-1</sup> | AFB <sub>1</sub> | AFB <sub>2</sub> | AFG <sub>2</sub> | AFG <sub>1</sub> | Aflatoxina Total µg.kg <sup>-1</sup> |
|-----------------------------|---|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------------------------|
| NaCl (75,32 %)              | 0   | 8,30                            | 3,32             | ND               | ND               | ND               | 3,32                                 |
|                             | 50  | 7,27                            | ND               | ND               | ND               | ND               | 0,00                                 |
|                             | 250   | 4,15                            | ND               | ND               | ND               | ND               | 0,00                                 |
| KCl (84,34 %)               | 0   | 8,81                            | 898,76           | 86,78            | 0,84             | ND               | 986,38                               |
|                             | 50  | 8,53                            | ND               | ND               | ND               | ND               | 0,00                                 |
|                             | 250   | 8,24                            | ND               | ND               | ND               | ND               | 0,00                                 |
| BaCl <sub>2</sub> (90,30 %) | 0   | 8,81                            | 1163,07          | 110,62           | ND               | ND               | 1273,69                              |
|                             | 50  | 4,45                            | 14,78            | <0,2             | ND               | ND               | 14,78                                |
|                             | 250   | 2,15                            | ND               | ND               | ND               | ND               | 0,00                                 |

\* Unidade Formadora de Colônias – UFC

ND – Não detectável pelo método.

Resultados semelhantes foram encontrados por Nakai et al. (2008), os quais observaram que o crescimento de *Aspergillus flavus* foi influenciado principalmente pela temperatura e umidade relativa. Nas análises das cascas, os autores observaram que 6,7% das amostras estavam contaminadas com AFB<sub>1</sub> (níveis de 15 – 23,9 µg.kg<sup>-1</sup>) e AFB<sub>2</sub> (níveis de 3,3 – 5,6 µg.kg<sup>-1</sup>); nos grãos de amendoim, 33,3% das amostras estavam contaminadas com AFB<sub>1</sub> (níveis de 7,0 – 116 µg.kg<sup>-1</sup>) e 28,3% estavam contaminadas com AFB<sub>2</sub> (níveis de 3,3 – 45,5 µg.kg<sup>-1</sup>). Para Zordete et al. (2011), as aflatoxinas foram detectadas em 20% e 10% das amostras do amendoim *Runner IAC*

886 e Caiapó, respectivamente. Quanto a detecção de aflatoxinas, para a AFB<sub>1</sub> foi detectada em 20% das 20 amostras de grãos de amendoim, obtidas a partir da variedade *Runner* IAC 886 com níveis médios variando de 0,2 a 1,0 µg.kg<sup>-1</sup>. Para a variedade de Caiapó, a AFB<sub>1</sub> foi detectada em 10% das 20 amostras, com níveis médios variando de 0,2 a 0,6 µg.kg<sup>-1</sup>. Gonzalez et al (2008), analisando amostras de amendoim *Runner* IAC 886, coletadas durante o crescimento no campo em Junqueirópolis (SP), verificaram que foi detectado AFB<sub>1</sub> em 32% das amostras de grãos de amendoim. Os níveis de aflatoxina observados não ultrapassaram o nível máximo de 20 µg.kg<sup>-1</sup>, permitido pelo Ministério da Saúde (MS) e pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA). Nenhuma associação foi observada entre produção de aflatoxinas e fatores climáticos ou a frequência de isolamento de fungo.

## 2.4 CONSIDERAÇÕES

Essa etapa do trabalho propôs as extrações de extratos aquosos e alcoólicos e de óleos essenciais de plantas, comumente utilizadas como chás e condimentos; quantificar o princípio ativo majoritário para os biofungicidas de maior eficiência; avaliar a ação inibitória desses extratos e óleos essenciais contra *Aspergillus flavus* L por meio das várias técnicas de inibição da contaminação fúngica, *in vitro* e *in situ*. Ao final conclui-se que:

O rendimento dos extratos, em volume, são maiores do que os dos óleos essenciais, porém a média do rendimento em massa para os extratos aquosos, extratos alcoólicos e óleos essenciais não apresentaram em média uma diferença significativa.

Os resultados indicam claramente que os extratos aquosos e alcoólicos não apresentaram bons indicadores de inibição fúngica para *Aspergillus flavus* L., *in vitro*. Ao passo que para os óleos essenciais a inibição *in vitro* foi efetiva. As maiores foram observadas para o óleo essenciais de canela, seguida pelo cravo-da-índia e capim cidreira.

Na inibição *in situ* em aplicação do óleo de canela nas vagens de amendoim estéril com o *A. Flavus* inoculado, pôde-se concluir que as concentrações necessárias para a total inibição foram muito altas, podendo comprometer as características

organolépticas do amendoim. Porém, para as vagens com a contaminação de origem foi possível a inibição de *A. Flavus* na concentração de 50 mg.mL<sup>-1</sup> nas vagens.

Para a inibição da aflatoxina, o experimento realizado demonstrou que ocorreu a interferência da umidade de armazenamento e houve produção de aflatoxinas apenas na concentração de 50 mg.mL<sup>-1</sup> para a maior umidade, próximo a saturação do ar, mas em níveis abaixo dos exigidos pela legislação.

A aplicação do óleo essencial de canela como biofungicida contra a contaminação fúngica do amendoim promoverá a inibição da microbiota de origem, e não aumentará o índice de aflatoxinas, obtendo-se índices abaixo da legislação. Nesse sentido essa técnica é promissora para o armazenamento de grãos.

### ***CAPÍTULO 3***

***Estudo da aplicação do óleo essencial de Canela (Cinnamomum zeylanicum) em vagens de amendoim (Arachis hypogaea L.) com secagem e armazenamento***

---

*Teresa Cristina Castilho Gorayeb*

### 3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1.1 A aplicação do óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

A utilização de fungicidas para o controle das doenças no amendoim é uma ferramenta fundamental, que faz parte do manejo integrado de pragas (fungos, bactérias, vírus, insetos). O produtor protege a lavoura desde o princípio, por meio da aplicação nas sementes, via irrigação, pulverizações durante toda a safra e até após a colheita nas fumigações, nos armazéns e nos expurgos. O mercado disponibiliza vários compostos químicos que, dentro do manejo correto, proporcionam resultados satisfatórios, porém o seu residual tóxico é preocupante e a alternativa de controlá-los propõem-se o uso dos biofungicidas (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004; MORAES, 2006).

Com a necessidade de se obter maior produtividade e uma agrivultura mais sustentável, as pesquisas têm como foco a identificação de novos e práticos métodos de controle de pragas que não dependam de pesticidas químicos. Novas abordagens têm incluído a introdução de pesticidas químicos com um perfil ambiental mais benigno e de maior seletividade, a adoção de culturas resistentes à pragas ou tolerantes à pragas, além do uso de agentes mais eficazes para um biocontrole da contaminação microbiana de origem. Entre os diversos métodos para o controle de aflatoxina, a aplicação do controle biológico para reduzir essa contaminação em amendoim, algodão e milho vem aumentando, o que certamente se configura como um exemplo de estratégia bem sucedida (AMAIKE; KELLER, 2011).

A infecção por *Aspergillus flavus* e a contaminação por aflatoxina pode ocorrer no campo ou durante o armazenamento. Na pós colheita, durante os processos de manipulação, tais como arranquio, colheita, secagem, debulha, bem como métodos e condições de armazenamento, ocorrem variações da umidade que provocam a alteração na qualidade das sementes do amendoim (GINTING; RAHMIANNA, 2015). É importante que em toda cadeia produtiva, os agricultores, processadores, distribuidores e comerciantes, que são responsáveis por todos os elos, realizem um papel importante no controle da contaminação por aflatoxinas, pois eles são capazes



de afirmar em quais pontos da produção de amendoim as ações para o seu controle são importantes.

O uso dos óleos essenciais tem se tornado uma alternativa para controle de agentes fitopatogênicos, das pragas agrícolas e plantas infestantes, como substituição dos agrotóxicos na agricultura; eles são ferramentas importantes no controle dos micro-organismos patogênicos proporcionando o aumento da produção e não afetando negativamente o ambiente e a saúde humana (BETTIOL, 2009).

A canela (*Cinnamomum zeylanicum*) tem muitas propriedades biológicas, sendo uma delas a sua capacidade antifúngica, inseticida, bactericida e parasiticida (CARMO, 2008). Diante dessas propriedades inibitórias sobre o desenvolvimento micelial de fungos e da importância das espécies do grupo *Aspergillus flavus*, que apresentam potencial para síntese de aflatoxina em cultura do amendoim, é necessário que estudos sejam realizados para avaliar a sua eficiência na eliminação desta contaminação (VIEGAS et al., 2005)

Souza et al. (2004), avaliaram o efeito “in vitro” de óleos essenciais dos condimentos alho (*Allium sativum* L.), canela (*Cinnamomum burnanil* Meissn), cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra os fungos associados a produtos de panificação: *Rhizopus* sp., *Penicillium* spp., *Eurotium repens* e *Aspergillus niger*, isolados de pães envelhecidos. O óleo essencial da canela inibiu completamente o desenvolvimento de todos os fungos testados na concentração de 500 µg.mL<sup>-1</sup>.

Nos estudos realizados por Pinto et al. (2005) em grãos de milho do cultivar HD 9486, que foram colhidos com 19,7% de umidade, imediatamente tratados, em tratados, mecânico de grãos/sementes e armazenados em tambores metálicos com presença e ausência de aeração por 17 dias com os produtos químicos de mercado e com os produtos biofungicos: extrato bruto de *Eucalyptus citriodora*; essência de *Eucalyptus citriodora*; óleo de girassol; óleo mineral e com a suspensão de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> de *Sacharomyces cerevisiae*. Os resultados de inibição para os dois óleos aplicados foi de 0,7 e 0,9% dos grãos, respectivamente, comparados com a testemunha com 49,6% de grãos contaminados. A inibição da aflatoxina por meio do óleo de girassol com a aeração foi de 174, 8 µg.kg<sup>-1</sup>. Para a testemunha foi de 36,5 µg.kg<sup>-1</sup>, porém o óleo mineral no sistema com presença de aeração fez com que a aflatoxina apresentasse o teor de 38,4 µg.kg<sup>-1</sup> se mantivesse, mostrando-se que no

sistema com aeração todos os tratamentos, inclusive a testemunha (1,2%), apresentaram baixo nível de mofamento dos grãos, sendo desfavoráveis ao desenvolvimento de *Aspergillus flavus* e de *Penicillium* spp.

O óleo essencial de canela foi aplicado por Manso et al. (2013), em materiais de embalagem de alimentos para a inibição do *Aspergillus flavus* em embalagens de filmes de Polietileno tereftalato, sendo testado em fase de vapor, sem contato direto com o molde PET, obtendo uma ação antifúngica em dois tipos de produtos na concentração de 2% (v/v) e 4% (v/v), o que mostra ser possível escolher entre diferentes substratos e desenvolver soluções adaptadas à situação específica do produto de alimento sem comprometer a eficácia do óleo essencial como agente antimicrobiano.

### **3.1.2 A aplicação de biofungicidas e suas secagens**

A quimigação consiste em aplicar uma solução, ou calda, de agroquímicos (fertilizante, inseticida, fungicida, herbicida ou nematicida) por meio do sistema de irrigação. Quando se trata de produtos que atuam no solo, a aplicação, em princípio, pode ser feita por meio de qualquer método de irrigação: gravitacional, aspersão ou localizado. Porém, a aplicação de produtos com atividade foliar somente é viável nos sistemas de irrigação por aspersão: laterais portáteis (convencional), pivô central, rolão e outros (FAZOLIN et al., 2010).

Como as vagens de amendoim possuem sua superfície e formas diferentes, algumas são parecidas com cilindros enquanto outras se aproximam de esferas. Esse fato proporciona uma não uniformidade da sua retenção de água. Observa-se a importância do estudo das propriedades físicas dos líquidos, da capacidade de retenção do líquido no sólido, das dimensões geométricas dos sólidos e da fração volumétrica dos líquidos que se aplica. A concavidade ou convexidade da interface depende, principalmente, da relação entre as propriedades de retenção dos líquidos com a superfície sólida, e apresenta ângulos diferentes conforme o tipo de líquido aspergido (BRAUNER; ULLMANN, 2002).

De acordo com Ludwig et al. (2011) os equipamentos de aspersão dos fungicidas têm como finalidade agir como uma película sobre as sementes e plantas,

ou seja, são capazes de construir uma camada de filme constituída de polímeros e outras substâncias de recobrimento.

Atualmente, trabalhos são realizados a fim de avaliar a retenção de água pelas vagens e grão de amendoim para avaliar o efeito das alterações, durante o processo, do conteúdo de umidade e de algumas características morfológicas e mecânicas das vagens e grãos de amendoim. Nos estudos realizados por Elmasry et al. (2009), o teor de umidade das vagens e sementes mostraram, em todas as características dimensionais analisadas, pelo programa, um aumento do teor de umidade dentro do intervalo testado. Isso indicou que a técnica de imagem utilizando o programa foi uma ferramenta confiável e eficiente para a detecção de alterações nas principais dimensões de amendoim sob umidade de movimento, e poderia ser considerada uma candidata razoável para aplicação industrial. As avaliações de imagens foram medidas por um paquímetro digital Mitutoyo DAG-500 e a calibração do programa foi realizado com a ajuda de discos circulares com diâmetro na faixa próxima ao de amendoim sementes e vagens, determinando o seu diâmetro, o perímetro e a área projetada independentemente, a fim de comparar o aumento da retenção de água.

É importante minimizar os efeitos dos fatores responsáveis pela redução da uniformidade de aplicação do biofungicida. O principal deles parece ser o tamanho das gotas (óleo + fungicida) carregadas pela água dentro da tubulação de irrigação: gotas grandes são mais sujeitas a flutuar na água e, conseqüentemente, têm mais chances de serem liberadas em maior proporção nas proximidades do centro do pivô. Para contornar esse problema, recomenda-se injetar o defensivo, somente em pivô cuja velocidade do fluxo dentro da tubulação, no ponto de injeção, é superior a  $1,5 \text{ m.s}^{-1}$ . A injeção do defensivo-óleo no centro do fluxo de água (no interior da tubulação) por onde ela flui com maior velocidade também favorece a quebra das gotas (VIEIRA; SILVA; RAMOS, 2003).

Após a aplicação dos fungicidas ou biofungicidas é importante que a secagem do amendoim ocorra até atingir a umidade obrigatória pela legislação que é de 11% para vagens e 8% para grãos (BRASIL a, 2003). A secagem de produtos agrícolas pode ser definida como um processo simultâneo de transferência de calor e massa entre o produto e o ar de secagem, que consiste na remoção da umidade excessiva contida no interior do grão por meio de evaporação, geralmente causada por convecção forçada de ar aquecido, de modo a permitir a manutenção de sua qualidade

durante o armazenamento por longos períodos de tempo (AFONSO JUNIOR; CORRÊA, 1999; RESENDE et al., 2008).

De acordo com Queiroz; Pereira e Melo (1985), ao estudarem a secagem, experimentalmente, são dois os métodos comumente utilizados para analisar a secagem de produtos biológicos no período de taxa decrescente: o empírico e o teórico. O método empírico consiste em formar grupos físicos adimensionais que podem ser facilmente investigados por experimentos de laboratório e baseia-se nas condições externas, como temperatura, umidade e velocidade do ar de secagem, ao passo que o método teórico constitui-se na avaliação desses efeitos com o auxílio de modelos matemáticos.

A secagem é um processo que demanda intensa quantidade de energia o que implica em um grande impacto comercial no custo do produto final. Os secadores geralmente são classificados de acordo com a forma de transmissão de calor, sendo que a escolha do equipamento depende de especificações de uso e operação, ou seja, dependem da finalidade a qual se destinam. Eles também podem ser classificados como secadores de contato direto, em que o gás de secagem está em contato íntimo com o produto e indireto quando o contato de ambos ocorre por meio de uma superfície aquecida indiretamente (PARK et al., 2007; ARRUDA, 2008).

A secagem em monocamada refere-se ao processo no qual o material a ser seco está inteiramente exposto ao ar que se move através dele. Para estudo de secagem é utilizada a camada fina do produto, a fim de compreender o que ocorre em cada camada dos grãos a serem secos. A equação que representa o movimento de vapor em uma camada fina do produto durante o período de secagem a uma taxa decrescente é obtida utilizando-se a Lei de Newton para o aquecimento e o resfriamento, ou seja, a taxa de variação da temperatura de um corpo circundado por um fluido à temperatura constante é proporcional à diferença de temperatura entre eles, desde que essa diferença seja pequena (HALL, 1980; KRZYZANOWSKI; WEST; FRANÇA NETO, 2006).

Os modelos que empregam a teoria da difusão, podem descrever de forma aceitável o perfil da distribuição de água no interior de determinado produto agrícola desde que seja possível correlacionar sua forma à geometria de um sólido perfeito, além da exigência do estabelecimento de uma relação funcional entre o coeficiente de difusão, o teor de água e a temperatura (CARLESSO, et al., 2005). De acordo com

Page (1949), ao avaliar os fatores com influência significativa sobre a taxa máxima de secagem convectiva de sementes de milho, em camada delgada, e ao comparar os resultados obtidos experimentalmente com aqueles obtidos com o modelo exponencial, propôs um modelo com base na equação de Fick, apresentado na Equação 3.1, tomando-se, apenas o primeiro termo da série. Outros modelos semiteóricos que também se baseiam na Lei de Newton para resfriamento aplicado à transferência de massa, os quais possuem dois termos são o de Henderson e Pabis (1961) e o de Lewis (1921), se assemelhando ao de Page.

$$RX = \frac{X - X_e}{X_0 - X_e} = \exp(-k t^n) \quad (3.1)$$

Em que:

RX= razão de umidade (adimensional)

k = constante de secagem;

n = constante que depende da umidade relativa e temperatura do ar de secagem;

t = tempo em segundos

X = conteúdo de água, decimal base seca;

X<sub>e</sub> = conteúdo de água de equilíbrio, decimal em base seca;

X<sub>0</sub> = teor de água inicial, decimal b.s.

Após definir as curvas de secagem até o equilíbrio com a utilização de equações semi-empíricas para representar a cinética de secagem de grãos, pretende-se buscar uma forma de representar o comportamento da secagem que se ajuste melhor aos dados experimentais (Barrozo et al., 1998; PARK et al., 2007).

Os tipos de secadores mais utilizados nas indústrias são de leito fixo, em que a massa de grãos é sujeita ao processo de secagem de carga estática enquanto o ar aquecido os atravessa realizando as transferências de energia e massa. Esse sistema é muito utilizado por cooperativas de secagem de amendoim, e opera com o produto estático, sem movimento como apresentado na Figura 3.1; carro para Secador de Amendoim desenvolvido para atender cooperativas e agricultores com maior movimentação, garantindo, assim, a qualidade do seu amendoim e o seu lucro (AGROMÉRICA AGROMETALURGICA AMÉRICA LTDA, 2012).

**Figura 3.1:** Foto do secador de carros acoplados Dragon



**Fonte:** Extraído do site da Agromérica Agrometalurgica América LTDA. Disponível em: [http://www.agromerica.com.br/produto/6-carros-secador-acoplados-dragon/dados\\_do\\_produto.html](http://www.agromerica.com.br/produto/6-carros-secador-acoplados-dragon/dados_do_produto.html) (2012)

Em camada espessa, o movimento de água do interior dos grãos até a superfície é analisado pelos mecanismos de transferência de massa, que indicarão a dificuldade de secagem dos materiais. Durante a secagem, para que haja a evaporação de água da superfície do material ao ambiente a água deve ser transportada do interior do sólido até a superfície (HALL, 1980; BIAGI; VALENTINI; QUEIROZ, 1993).

Secagem estacionária ou leito fixo-consiste, basicamente, em se forçar um fluxo de ar através da massa de grãos que permanece em repouso. Essa secagem ocorre da base para o topo da camada de grãos, em um secador de fundo falso perfurado, e do centro para a periferia, em secador de tubo central perfurado (sementes). Ocorre por camadas, em virtude da formação da zona de secagem, correspondente à região onde se efetiva o intercâmbio de água do grão para o ar. Anteriormente, a zona de secagem tem grãos secos e alta temperatura e, posteriormente, grãos úmidos e baixa temperatura (BIAGI; BERTOL; CARNEIRO, 2002, PARK et al., 2007).

Araujo, et al., (2014), descrevem que muitos produtos agrícolas, como os grãos de amendoim, são normalmente colhidos com um teor de água inadequado para uma correta e eficiente conservação. Com isso, a redução da quantidade de água do material deve ser conduzida com a finalidade de se reduzir a atividade biológica e as mudanças químicas e físicas que ocorrem no produto durante o armazenamento.

Nesse contexto, a secagem é o processo mais utilizado para assegurar a qualidade e estabilidade após a colheita, e seu principal objetivo é a redução do conteúdo de água até níveis seguros, permitindo, assim, longos períodos de armazenamento sem que ocorram perdas significativas durante o processo (MARTINAZZO et al., 2010).

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram realizados no Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos (DETA), do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP/São José do Rio Preto. As amostras de amendoim foram gentilmente cedidas pela Cooperativa dos Plantadores da Zona de Guariba – COPLANA, de Jaboticabal, São Paulo.

As análises de aflatoxinas foram realizadas pela empresa “JLA Brasil Laboratório de Análises de Alimentos S.A.”, devidamente credenciada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) – (BRASIL, 2014).

### 3.2.1 Materiais

Amostras de grãos e vagens de amendoim *Runner* IAC 886, sem contaminação de aflatoxina foram coletadas na recepção da COPLANA, transportadas em sacos de ráfia, armazenadas sob refrigeração em câmara fria ( $4 \pm 1$  °C).

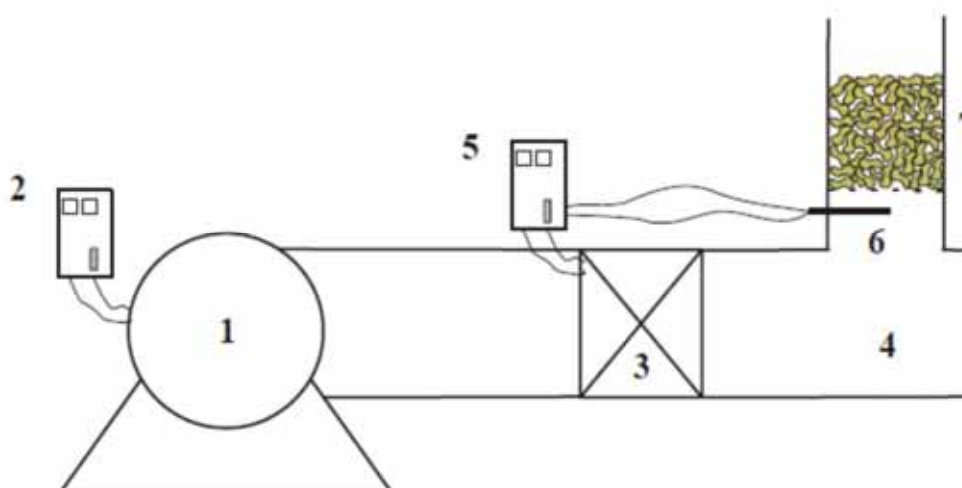
O óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), utilizado na inibição (*in situ*), foi adquirido na empresa, FERQUIMICA Indústria e Comércio Ltda., cujo laudo é apresentado no ANEXO I.

### 3.2.2 Equipamento

Para as secagens foi construído o secador de leito fixo e fluxo cruzado, em escala de bancada, chapa de ferro galvanizado e revestido com isopor nas regiões após o aquecimento, com a plataforma de secagem em monocamada e a câmara de

secagem em camada espessa. Ele possui um ventilador axial da marca TRON, com Potência: 120W, Rotação: 1750 rpm, Tensão: 127V / 220V / bivolt; um variador de frequência; um banco de resistências elétricas de 1000 W da marca - COLLER INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE MATERIAIS ELÉTRICOS Ltda., com voltagem de 220 volts, densidade de 9,0 w/cm<sup>2</sup>, temperatura máxima de 400°C; Plenum; Controlador de temperaturas; Termopares; Câmara de secagem (leito de vagens de amendoim para monocamada e camada espessa), como apresentado no diagrama Figura 3.2. e 3.3 (a).

**Figura 3.2:** Diagrama esquemático do secador de leito fixo com os constituintes: 1. Ventilador axial; 2. Variador de frequência; 3. Banco de resistências elétricas; 4. Plenum; 5. Controlador de temperaturas; 6. Termopares; 7. Câmara de secagem

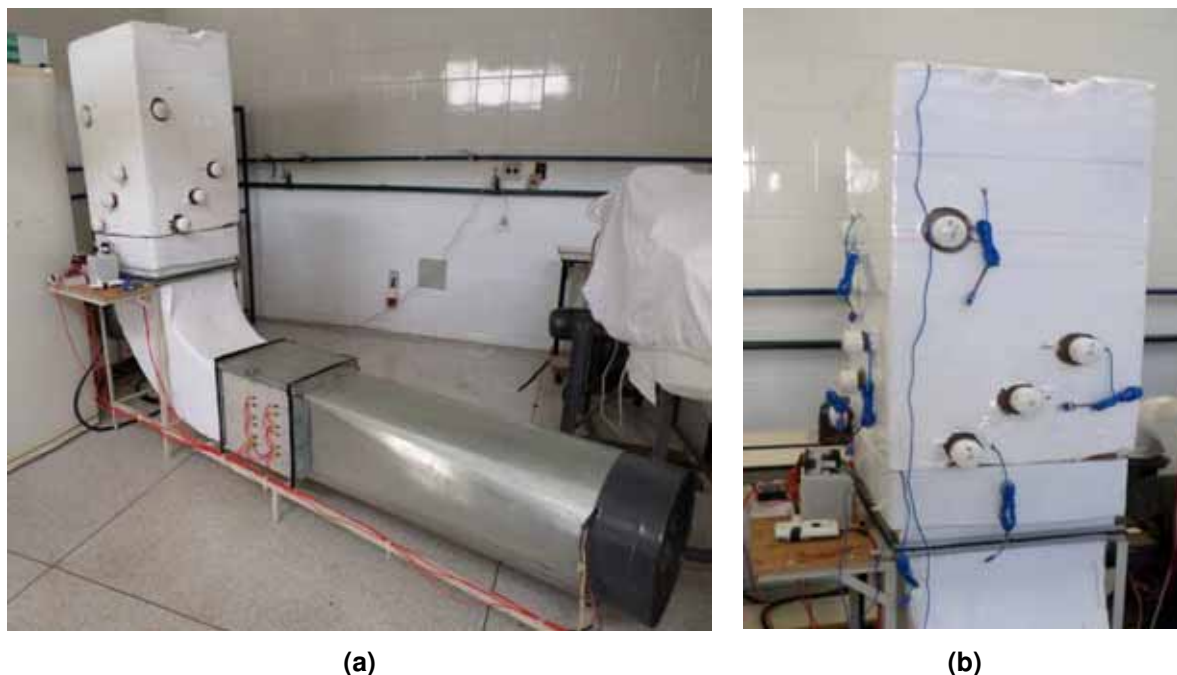


**Fonte:** Elaborado e produzido pela autora

Por meio da técnica de *scale-down*, baseada no volume total de vagens secas no secador industrial, apresentado na Figura 3.1, foi determinada a altura de leito em escala de laboratório. O secador de leito fixo industrial possui 6 m de comprimento, 2,4 m de largura e 3 m de altura, com um volume de 43,2 m<sup>3</sup>, com capacidade de receber 23000 litros, aproximadamente 6000 kg de vagens de amendoim. A câmara de secagem em escala de laboratório foi construída com 0,75 m de altura, 0,41 m nos lados, totalizando um volume de 0,126 m<sup>3</sup>, sendo 342 vezes proporcionalmente menor, com a capacidade de aproximadamente 46 kg de vagens, conforme apresentado da Figura 3.3 (b).



**Figura 3.3:** Secador de leito fixo(a) e Câmara de secagem (b)



**Fonte:** Elaborado e produzido pela autora

### 3.2.3 Métodos

#### 3.2.3.1 Secagem em monocamada

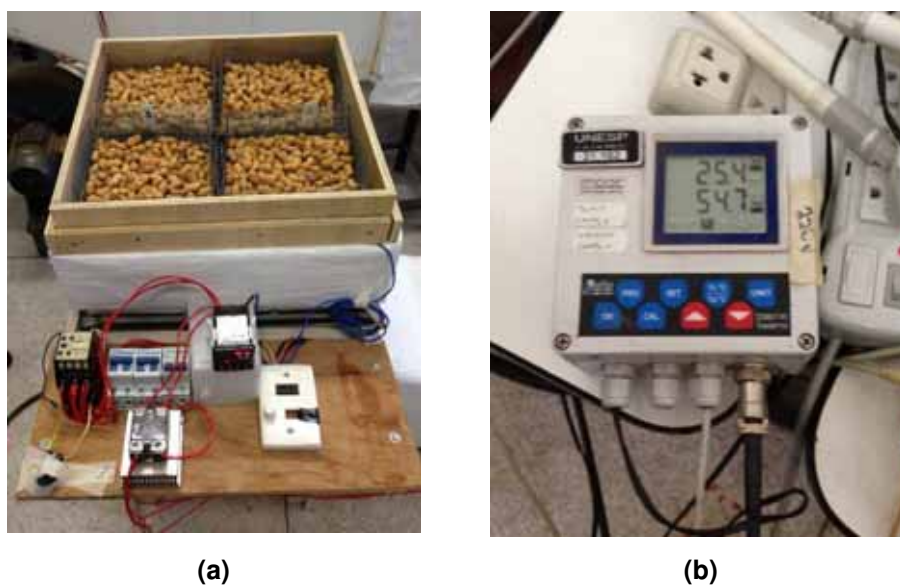
##### a) Obtenção dos parâmetros de secagem em monocamada

Antes de iniciar os experimentos de secagem das vagens de amendoim, impregnadas com óleo essencial, foi realizado um experimento de secagem em monocamada a fim de determinar os parâmetros de secagem. Inicialmente, a velocidade do ar de secagem foi fixada em  $1,5 \text{ m.s}^{-1}$  com o auxílio de um anemômetro digital de modelo MDA – II (Minipa do Brasil Ltda.), com medições em 5 pontos da tela. Antes de colocar as peneiras com as vagens, as temperaturas empregadas foram  $40$ ,  $45$  e  $50$  ° C com o tempo de secagem até atingir o equilíbrio.

No início e término das secagens foi realizada, em triplicata a análise de umidade das vagens de amendoim pelo método padrão da estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  por 24 horas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). As amostras de 100 g, aproximadamente, foram uniformemente distribuídas nas cestas de inox de  $14 \times 14 \times 2,5$  cm, formando uma monocamada. Em seguida, as quatro cestas foram pesadas e colocadas no

secador convectivo, com fluxo vertical de ar. Foram feitas pesagens em intervalos de tempos regulares em uma balança semi analítica, acompanhando-se a perda de massa ao longo do tempo até atingir massa constante. Foram realizadas as medições da umidade relativa do ar e temperatura do ambiente, durante a secagem, com o uso de um termohigrômetro digital. A Figuras 3.4 (a) e (b) ilustram este experimento.

**Figura 3.4:** Peneiras com as vagens na base do secador durante a secagem em monocamada (a), medida da umidade relativa do ambiente e temperatura com o termohigrômetro (b)



**Fonte:** Elaborado pela autora

Para o ajuste das curvas de cinética de secagem das vagens de amendoim, utilizou-se os modelos matemáticos de Henderson e Pabis, Lewis e Page, apresentados na Tabela 3.1, por meio do programa computacional Microcal Origin, versão 6.0.

**Tabela 3.1:** Modelos matemáticos para ajuste aos dados de secagens

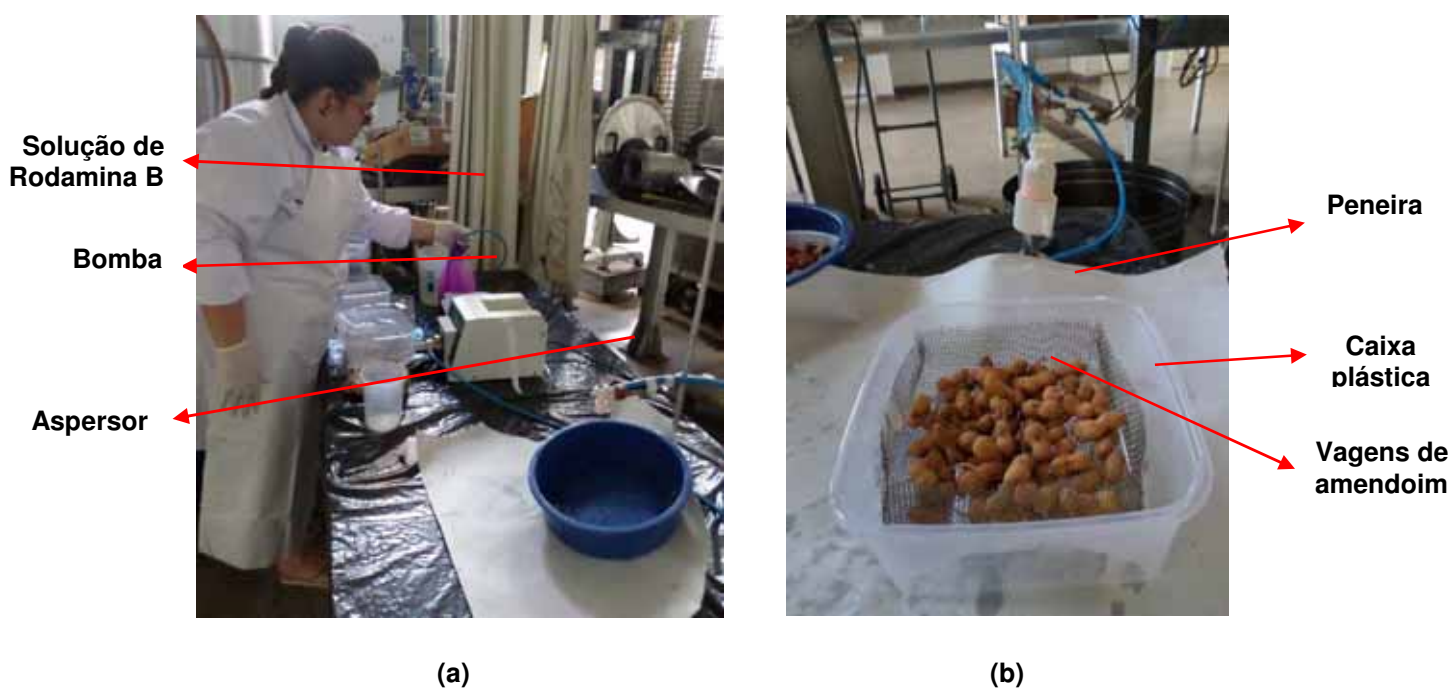
| Designação do modelo  | Modelo               | Equação |
|-----------------------|----------------------|---------|
| Henderson e Pabis (*) | $RU = a \exp (-K t)$ | ( 1 )   |
| Lewis (**)            | $RU = \exp (-K t)$   | ( 2 )   |
| Page (***)            | $RU = \exp (-Kt^n)$  | ( 3 )   |

**Fonte:** Extraído de: \* Henderson e Pabis (1961); \*\* Lewis (1921); \*\*\* Page (1949)

## b) Aspersão do óleo essencial de canela nas vagens de amendoim para a secagem em monocamada

Inicialmente foi feita a pesagem das bandejas de telas vazias em seguida foram acrescentadas cerca de 200 g de vagens de amendoim e o conjunto foi novamente pesado. As bandejas foram colocadas abaixo do jato de aspersão, realizado pelo auxílio de uma bomba de engrenagens MICROPUMP COLE-PARMER, com vazão de 600 e 1000 mL.min<sup>-1</sup>, por meio de aspersores agrícola de cone cheio, como mostrado no sistema da Figura 3.5 (a), de modo que o jato aspergido cobria toda a área da peneira. As peneiras foram colocadas dentro de uma caixa plástica, conforme mostra a Figura 3.5 (b). Sobre elas, os volumes 20, 30, 40 e 60 mL, da solução de Rodamina B a 0,02% (v/v), foi aspergido. Abaixo da peneira foi colocado papel absorvente, devidamente pesado, e, após a aplicação da solução de Rodamina B, foi pesado novamente para verificação do volume não aderido às vagens, de modo a determinar o volume real aderido às vagens.

**Figura 3.5:** Sistema de aspersão da Rodamina B (a), vagens de amendoim na caixa plástica (b)



**Fonte:** Elaborado pela autora

Ao final do processo com câmera digital da marca SMASUNG HD, tirou-se as fotos conforme apresentada na Figura 3.6. Essas fotografias foram digitalizadas e através do *software LensEye®* foi determinada a área de superfície tingida e não tingida, de modo a avaliar a uniformidade de corante sobre as vagens (GRAJALES, 2014). Após a aspersão, de cada peneira, foram retiradas três amostras de 10 g, para a análise de umidade.

**Figura 3.6:** Imagens de vagens aspergidas com solução aquosa de Rodamina B



Fonte: Elaborado pela autora

### **c) Secagem em monocamada com a aplicação do óleo essencial de canela**

Foram pesados cerca de 200 g das amostras de vagens de amendoim *Runner* IAC 886, com ausência de aflatoxina. Em seguida as amostras foram colocadas nas peneiras, seguido de aspersão de 20 mL da emulsão de óleo de canela diluído em Tween 80®, a 0,01% (v/v), na concentração de 0, 50 e 250 mg.mL<sup>-1</sup>. Foram retiradas três amostras de 5 g de vagens para a realização da umidade inicial e, em seguida, as peneiras foram inseridas no secador. A secagem foi realizada a 40° C. Foram feitas pesagens em intervalos regulares, em uma balança semi analítica, acompanhando-se a perda de massa até atingir massa constante. Realizou-se as medições da umidade relativa do ar e temperatura do ambiente, durante a secagem.

Após a secagem, foram pesadas duas amostras de 25 gramas de vagens de amendoim e colocadas em duas cestas de nylon, as quais foram inseridas em potes com soluções salinas de cloreto de sódio (NaCl – Umidade ambiente de 75,3%, simulando condições similares a umidade média do município de Jaboticabal que é de 70,6% (JABOTICABAL, 2015).

Os potes foram armazenados durante 30 dias em câmara DBO a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , sendo periodicamente monitorada a umidade relativa interna e a temperatura por meio do termo-higrômetro. Após esse período foram realizadas as análises de Unidades Formadoras de Colônias de Fungos e de aflatoxinas, conforme descrito no Capítulo 2.

### 3.2.3.2 Secagem em camada espessa

#### a) Aspersão do óleo essencial de canela nas vagens de amendoim para a secagem em camada espessa

Para a aspersão da emulsão de água-óleo-Twenn 80<sup>®</sup>, as vagens foram pesadas, distribuídas na peneira com área de  $0,26 \text{ m}^2$  e acondicionadas na caixa plástica, como mostra a Figura 3.7, com área da seção de  $0,68 \text{ m}$  de comprimento, por  $0,38 \text{ m}$  de largura e altura de  $0,38 \text{ m}$ , de modo a simular uma esteira transportadora de vagens de amendoim. Sobre as vagens, a emulsão foi aspergida por meio de bomba de engrenagens e dois aspersores agrícolas de cones cheios por 15 segundos.

**Figura 3.7:** Imagem das caixas do experimento calibração do volume aspergidos (a), aspersores sobre as vagens de amendoim.



**Fonte:** Elaborado pela autora

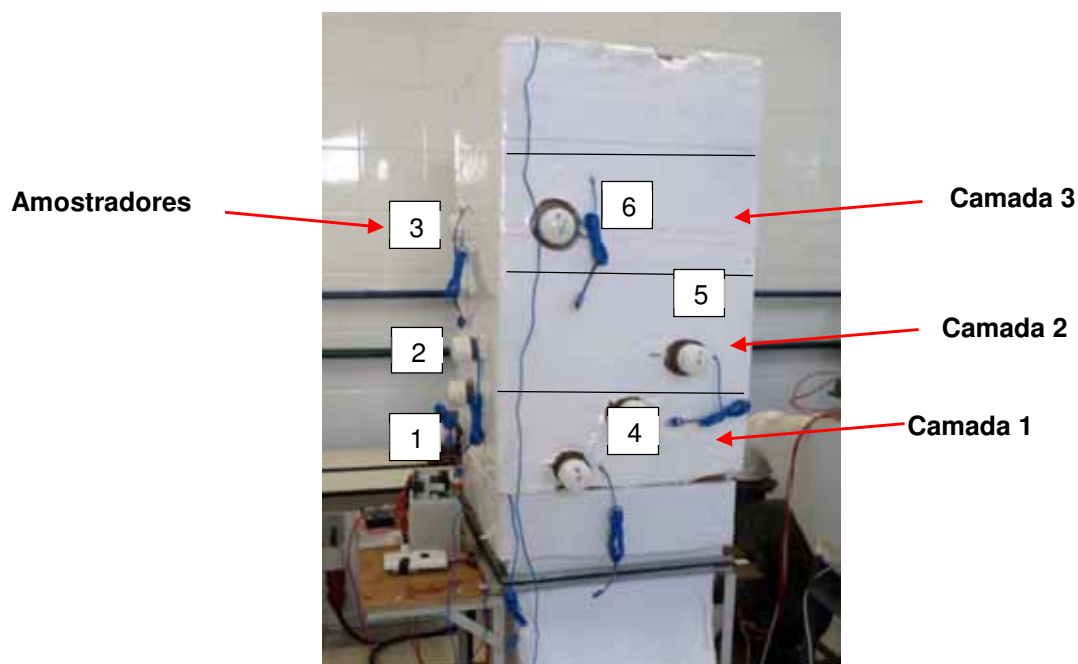
Foram utilizadas as vagens de amendoim isentas de aflatoxinas, com a microbiota de origem, e com umidade inicial de  $10,5 \%$  (b.s). Foram pesados  $2 \text{ kg}$  para cada aspersão de água até completar  $46 \text{ kg}$ , os quais foram colocados na câmara de

secagem. Em seguida, as vagens foram secas até atingirem a umidade constante. As amostras de vagens, foram colocadas na peneira e essa dentro da caixa, a qual foi, em seguida, borrifada pela emulsão por 15 segundos, totalizando, aproximadamente, 150 mL, emulsão de 50 mg.mL<sup>-1</sup>, preparadas com Tween 80® 0,1% (v/v) com solvente. A caixa foi agitada manualmente ao longo de todo o período da aspersão, simulando uma esteira. Após esse processo, as vagens foram despejadas em caixas plásticas, levadas para câmara fria a 4 ± 1°C, por 12 horas. Antes das vagens de amendoim serem colocadas na câmara de secagem em leito fixo foram retiradas triplicatas de 10 g de vagens da caixa de vagens para análise de umidade base seca (b. s.), conforme método de estufa a 105 ± 1 °C, durante 24 horas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

#### **b) Secagem em camada espessa das vagens de amendoim com aplicação do óleo essencial de canela e armazenamento em condições controladas**

A câmara de secagem foi dividida em três regiões, conforme mostra a Figura 3.8, sendo colocados amostradores, apresentados na Figura 3.9. De cada região foram obtidas duas amostras para o acompanhamento da perda de umidade das vagens. A secagem em camada espessa foi realizada na temperatura de 40° C, temperatura próxima a utilizada na indústria (38 °C). Os amostradores foram colocados na camada 1 (1 e 4), camada 2 (2 e 5) e camada 3 (3 e 6) em transversal. As pesagens foram feitas em intervalos regulares de tempo, em uma balança semi analítica, até atingirem massa constante. Foram realizadas as medições da umidade relativa do ar e temperatura do ambiente, durante a secagem, com o uso de um termohigrômetro digital.

**Figura 3.8:** Imagem da câmara de secagem com os seis locais de amostragem das vagens de amendoim, dois em cada camada.



Fonte: Elaborado pela autora

**Figura 3.9:** Amostradores das vagens de amendoim.



Fonte: Elaborado pela autora

Após a secagem, foram pesadas quatro amostras de 2,3 kg de vagens de amendoim, colocadas em sacos de ráfias e acondicionados em quatro caixas plásticas contendo solução salina em duas, de cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$  – Umidade ambiente de 75,32 %) e nas outras duas ( $\text{BaCl}_2$  – umidade de 90,3%), segundo RESNIK; CHERIFE (1988), na temperatura de 25 °C. As caixas abrigaram as vagens com as concentrações aplicadas como 0 (ausência de óleo) e 50 (presença de óleo de canela em  $50 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), conforme apresentado na Figura 3.10.

As caixas foram armazenados durante 90 dias na DBO a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , sendo monitorada a temperatura e a umidade relativa interna das caixas periodicamente, por meio de um termo-higrômetro digital. Após cada período foram realizadas as análises

de Unidades Formadoras de Colônias de fungos por gramas (UFC.g<sup>-1</sup>) e de aflatoxinas conforme descrito no Capítulo 2.

**Figura 3.10:** Caixas plásticas de armazenamento das vagens de amendoim em umidade e temperatura do ambiente controlada com NaCl e BaCl<sub>2</sub>



Fonte: Elaborado pela autora

### 3.2.4 Análises estatísticas

Nas secagens em monocamadas os modelos matemáticos foram ajustados por meio de análise de regressão não linear pelo método Gauss-Newton, utilizando o programa estatístico Microcal Origin, versão 6.0. Os modelos foram selecionados considerando a magnitude do coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

No experimento de armazenamento das vagens secas em monocamada, com a inibição da microbiota origem por óleo essencial de canela, os resultados foram analisados utilizando ANOVA para o delineamento experimental adotando blocos ao acaso em parcela subdividida (*“Split-plot”*) realizados com três repetições para a análise de Unidade Formadora de Colônias com o *software* Minitab 16 (Minitab Inc., Pensilvânia, EUA). Os valores médios foram comparados por meio do teste de Tukey em  $p \leq 0,05$ . As parcelas foram constituídas por três concentrações: 0, 50 e 250 mg.mL<sup>-1</sup>. As subparcelas foram compostas por períodos de armazenamento: 0, 30



dias para as análises de inibição da contaminação fúngica das vagens. Antes dessas análises estatísticas foi feita a linearidade dos valores de UFC através do logaritmo das concentrações originais.

O experimento de armazenamento das vagens secas em camada espessa, para avaliação da inibição da microbiota origem por óleo essencial de canela, foi realizado por delineamento experimental inteiramente casualizado com três fatores: umidade relativa de armazenamento com dois níveis  $U_1 = 75,32\%$  e  $U_2 = 90,3\%$ ; concentração de óleo de canela com dois níveis  $C_1 = 0 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $C_2 = 50 \text{ mg.mL}^{-1}$  e período com quatro níveis  $P_1 = 0$ ,  $P_2 = 30$ ,  $P_3 = 60$  e  $P_4 = 90$  dias, sendo realizadas as análises de umidade das vagens e de unidade formadora de colônias em triplicata, bem como as análises de aflatoxinas em duplicata. Antes das análises estatísticas dos valores de UFC foi realizada a linearidade através do logaritmo das concentrações originais.

Os resultados da umidade e unidade formadora de colônias foram analisados utilizando ANOVA com o auxílio do *software* Minitab 16 (Minitab Inc., Pensilvânia, EUA). Os valores médios foram comparados por meio do teste de Tukey em  $p \leq 0,05$ .

Os resultados das médias para as análises de aflatoxinas foram analisados por meio de um delineamento fatorial  $2 \times 2 \times 3$ . Apesar de existirem quatro períodos de armazenamento, os resultados de  $P_1$  para aflatoxinas foram desconsiderados da análise estatística, pois foram condicionados em apresentarem amostras com aflatoxinas não detectada (ND).

### **3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.3.1 Secagem em monocamada das vagens de amendoim**

##### **3.3.1.1 Parâmetros de secagem de vagens de amendoim em monocamada**

A Tabela 3.2 apresenta as médias das umidades de equilíbrio das quatro amostras estudadas nas temperaturas de 40, 45 e 50 °C, em que observa a tendência esperada de redução da umidade de equilíbrio com o aumento da temperatura do ar

de secagem, sendo utilizado o tempo de 2500 minutos nas curvas de 40 e 50 °C e 3000 minutos na curva com a temperatura de 45°C.

**Tabela 3.2:** Média da umidade relativa (%), umidade inicial e umidade final de equilíbrio (g/100g b.s.), das amostras de vagens, durante as secagens em monocamadas a temperatura de 40, 45 e 50°C

| Temperatura<br>(° C) | Umidade Relativa<br>(%) | Umidade inicial<br>(% b. s.) | Umidade de equilíbrio<br>(% b. s.) |
|----------------------|-------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| 40                   | 33,9                    | 17,1 ± 0,16                  | 4,2 ± 0,19                         |
| 45                   | 51,6                    | 17,1 ± 0,16                  | 3,6 ± 0,13                         |
| 50                   | 33,0                    | 17,1 ± 0,16                  | 3,1 ± 0,28                         |

Na Tabela 3.3 encontram-se os valores dos parâmetros dos modelos de Henderson e Pabis, Lewis e Page, ajustados aos dados experimentais das cinéticas de secagem das vagens de amendoim nas temperaturas de 40, 45 e 50°C e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ). Pode-se observar que a equação de Page proporciona o melhor ajuste em relação às outras equações analisadas, pois apresentou os valores mais altos para  $R^2$ , 0,99. O modelo de Page também foi o que melhor representou os dados experimentais da cinética de secagem de sementes de feijão quando comparado com os modelos de Thompson, Exponencial e de Difusão (AFONSO JÚNIOR e CORRÊA, 1999). Também Kester et al. (2012) realizaram a secagem de grão de soja em diferente temperaturas e umidades relativas, e aplicaram cinco modelos aos dados experimentais verificando que o modelo de Page foi o que melhor se adequou aos dados da cinética de secagem.

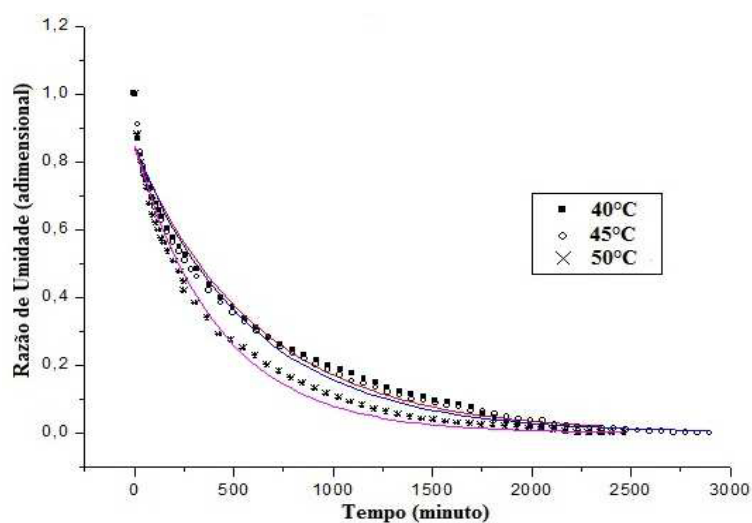
Resultados semelhantes foram obtidos para o modelo de secagem em camadas finas proposto por Page, que se ajustou às curvas de secagem obtidas experimentalmente para o milho de pipoca do cultivar *Zélia* na descrição do processo de secagem em camada fina do milho-pipoca em todas as faixas avaliadas, apresentando coeficientes de determinação superiores a 99%, realizado com as temperatura de 40, 50 e 60 °C (CORRÊA; MACHADO; ANDRADE, 2001).

**Tabela 3.3:** Parâmetros (K, a, n) de ajuste dos modelos da cinética de secagem das vagens de amendoim da variedade Runner IAC 886 e coeficientes de determinação R<sup>2</sup>

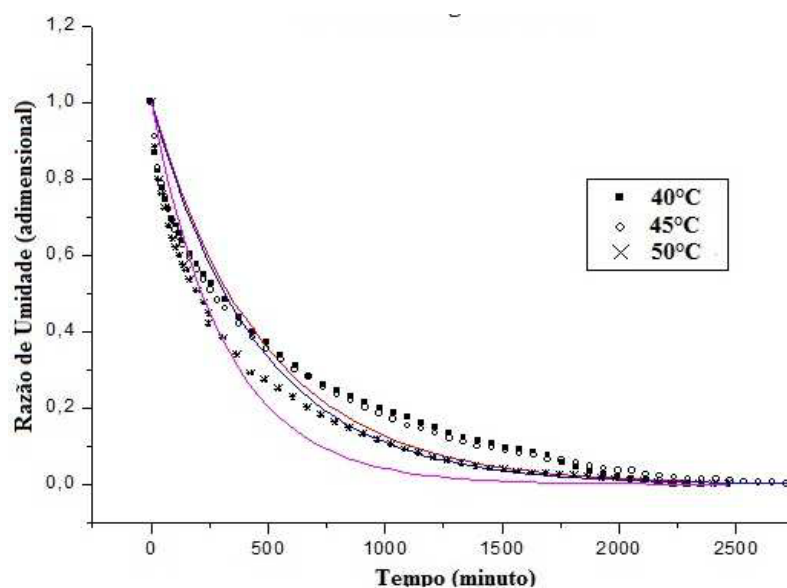
| Modelo de secagem | Temperatura de secagem (°C) | Constantes      |                 |                 |                |
|-------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
|                   |                             | K               | a               | n               | R <sup>2</sup> |
| Henderson e Pabis | 40                          | 0,0016 ± 0,0001 | 0,8356 ± 0,0120 | -               | 0,9861         |
|                   | 45                          | 0,0017 ± 0,0001 | 0,8408 ± 0,0118 | -               | 0,9867         |
|                   | 50                          | 0,0024 ± 0,0001 | 0,8443 ± 0,0134 | -               | 0,9864         |
| Lewis             | 40                          | 0,0021 ± 0,0051 | -               | -               | 0,6758         |
|                   | 45                          | 0,0022 ± 0,0009 | -               | -               | 0,8336         |
|                   | 50                          | 0,0032 ± 0,0007 | -               | -               | 0,8144         |
| Page              | 40                          | 0,0152 ± 0,0015 | -               | 0,6857 ± 0,0153 | 0,9915         |
|                   | 45                          | 0,0148 ± 0,0009 | -               | 0,6945 ± 0,0103 | 0,9959         |
|                   | 50                          | 0,0178 ± 0,0008 | -               | 0,6997 ± 0,0082 | 0,9998         |

Nas Figuras 3.11, 3.12 e 3.13 são apresentadas as curvas de secagem das vagens de amendoim, ajustadas pelos modelos de Henderson & Pabis, Lewis e Page. Nota-se que, de fato o modelo de Page foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais. Nota-se, também, que o tempo necessário para atingir a umidade de equilíbrio foi longo, acima de 2250 minutos. Para os ensaios em camada espessa, foi selecionada a temperatura de 40 °C, próxima a usada na COPLANA.

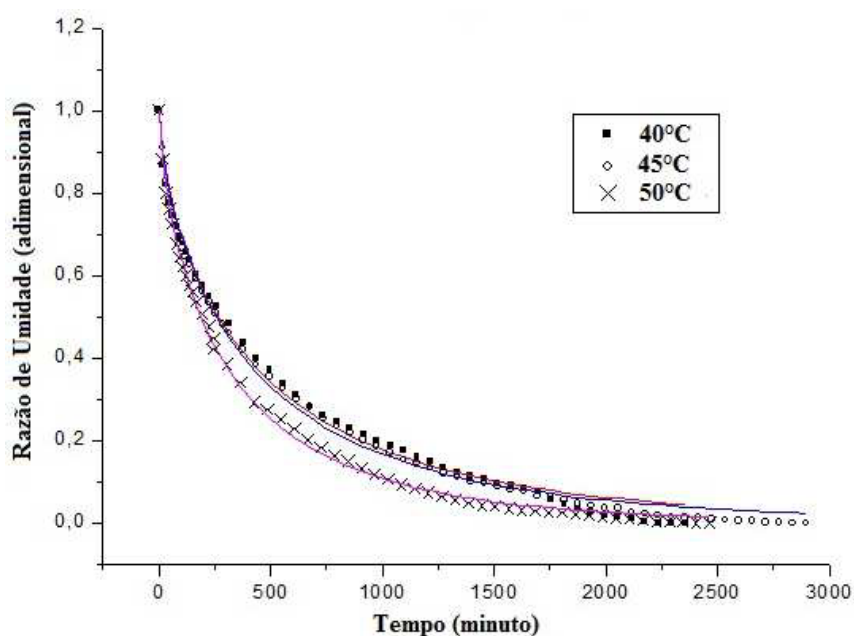
**Figura 3.11:** Curvas de secagem nas temperaturas de 40, 45 e 50°C para o modelo de Henderson e Pabis.



**Figura 3.12:** Curvas de secagem nas temperaturas de 40, 45 e 50°C para o modelo de Lewis.



**Figura 3.13:** Curvas de secagem nas temperaturas de 40, 45 e 50°C para o modelo de Page.



### 3.3.1.2 Aspersão do óleo essencial de canela nas vagens de amendoim para secagem em monocamada

Nos experimentos de aspersão foi possível estabelecer que a melhor vazão, foi de  $1000 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , em que o aumento da umidade foi o menor no volume real aspergido de  $8,31 \text{ mL}$ , com uma área atingida pela solução maior que na vazão de  $600 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , conforme apresentado na Tabela 3.4. Nota-se que, na vazão de  $1000$

mL.min<sup>-1</sup>, a área atingida pela solução foi uniforme e com agitação ela atinge todas as superfícies das vagens, porém trata-se de uma camada de vagens delgada. Em esteiras industriais a camada é mais espessa, assim o volume será menor.

Nesse experimento, as imagens auxiliaram na determinação da área atingida pela aspersão da solução apresentando-se como ocorreu a retenção da solução em uma camada fina de vagens. Com os resultados definiu-se o volume a ser aplicado na camada espessa (aproximadamente 150 mL), e o tempo de bombeamento (15 segundos).

**Tabela 3.4:** Resultados da análise de imagem fornecidos pelo *software Lenseye* utilizando a aspersão das vagens de amendoim com solução de traçador tingido com Rodamina B, nas vasões de 600 e 1000 mL.min<sup>-1</sup>

| Experimento com vasão de 600 mL.min <sup>-1</sup>  |                            |                             |                    |  |
|--|----------------------------|-----------------------------|--------------------|--|
| Volume aplicado (mL)                               | Volume não impregnado (mL) | Volume real impregnado (mL) | Umidade (% b. s.)* | Área reconhecida pelo <i>software</i> (%). |
| 20   | 5,74                       | 14,26                       | 13,38              | 25,27                                      |
| 30   | 15,29                      | 14,71                       | 17,38              | 27,06                                      |
| 40   | 13,59                      | 26,41                       | 12,96              | 23,52                                      |
| 50   | 11,55                      | 38,45                       | 13,66              | 26,49                                      |
| 60   | 16,63                      | 43,37                       | 13,49              | 27,69                                      |
| Experimento com vasão de 1000 mL.min <sup>-1</sup> |                            |                             |                    |  |
| 20   | 11,69                      | 8,31                        | 11,69              | 32,93                                      |
| 30   | 13,58                      | 16,42                       | 13,58              | 32,71                                      |
| 40   | 14,65                      | 25,35                       | 14,65              | 34,64                                      |
| 50   | 20,38                      | 29,62                       | 20,38              | 32,26                                      |
| 60   | 21,66                      | 38,34                       | 21,66              | 35,13                                      |

\* b. s. – Umidade base seca

### 3.3.1.3 Secagem em monocamada com a aplicação do óleo essencial de canela e armazenamento

Em todos os ensaios, a umidade inicial das amostras de vagens de amendoim com a ausência da aplicação das emulsões de óleo estavam com 12,59 % (b. s.). Após a aplicação dos 20 mL das solução de óleo de canela nas concentrações de 0, 50 e 250 mg.mL<sup>-1</sup>, as vagens iniciaram a secagem em monocamada com uma média

de 16,44 % (b. s.) e terminaram com umidade de equilíbrio média de 3,70 % (b. s.), como pode ser visto na Tabela 3.5.

**Tabela 3.5:** Variação da umidade das vagens de amendoim, com ausência e presença da emulsão de óleo essencial de canela, nas secagens em monocamadas a 40 ° C

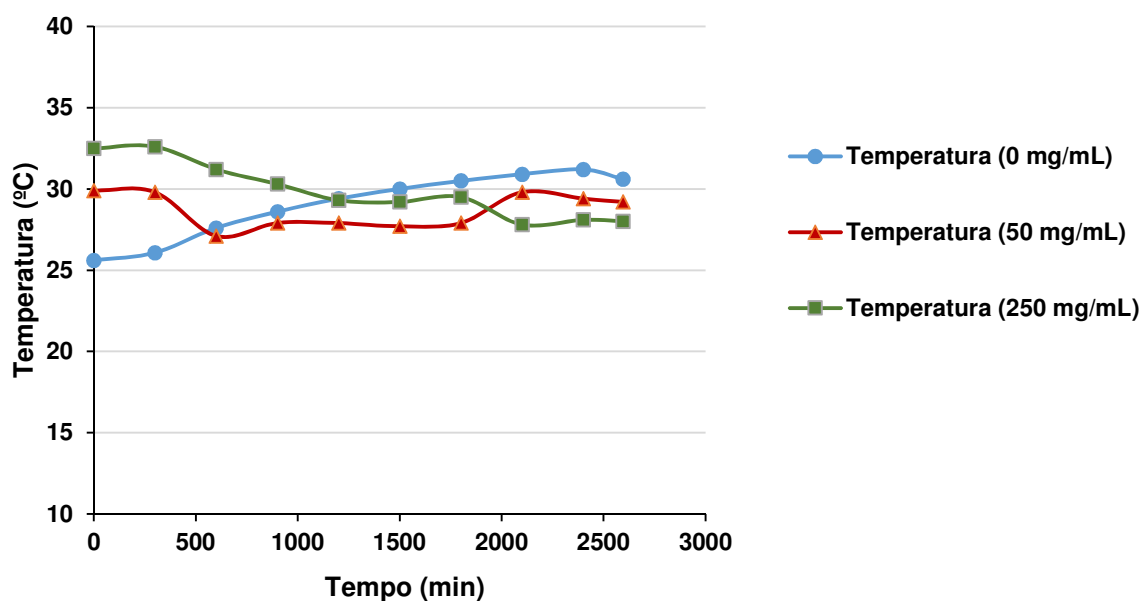
| Umidades (%b. s.)               | Concentração da emulsão de óleo aplicada (mg.mL <sup>-1</sup> ) |              |              | Média das umidades (% b. s.* ) |
|---------------------------------|---|--------------|--------------|--------------------------------|
|                                 | 0   | 50           | 250          |                                |
| <b>Umidade inicial</b>          | 12,59 ± 1,95  | 12,59 ± 0,55 | 12,59 ± 0,62 | 12,59                          |
| <b>Umidade após a aplicação</b> | 19,63 ± 0,19  | 14,34 ± 0,08 | 15,34 ± 0,16 | 16,44                          |
| <b>Umidade Final</b>            | 3,61 ± 0,13   | 4,06 ± 0,19  | 3,69 ± 0,28  | 3,79                           |

\* b. s. – Umidade base seca

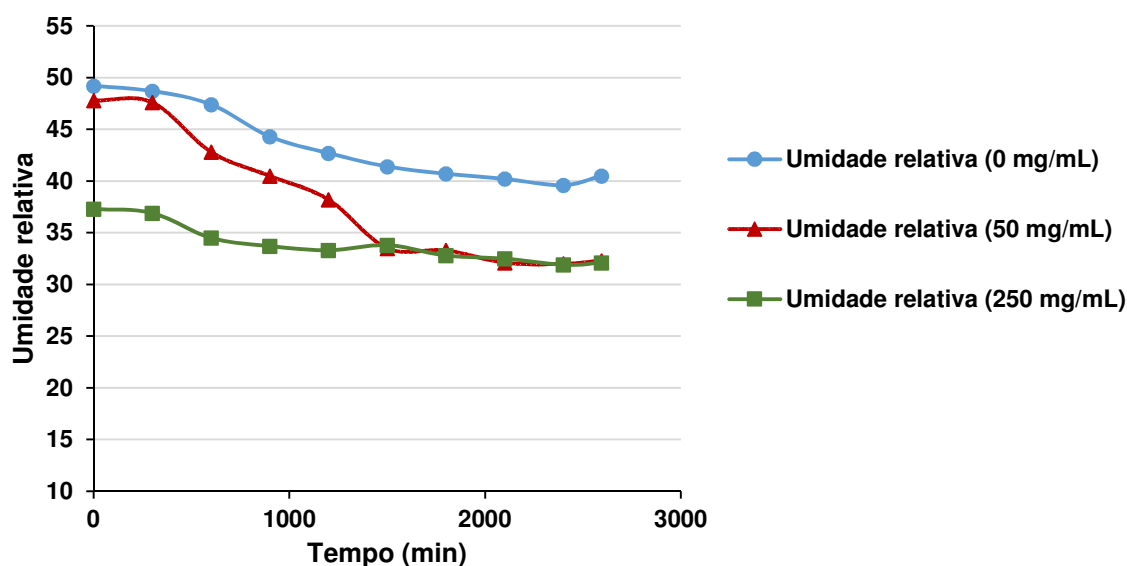
A temperatura do ambiente de secagem, apresentada na Figura 3.14, nas secagens em monocamada com a aspersão das emulsões de óleo de canela nas concentrações de 0, 50 e 250 mg.mL<sup>-1</sup>, foram monitoradas durante as secagens. Na secagem com 0 mg.mL<sup>-1</sup> ocorreu um aumento de 25,6 à 30,6 °C na temperatura ambiente. Na curva de secagem com a concentração da emulsão em 50 mg.mL<sup>-1</sup> ocorreu uma oscilação da temperatura, a secagem iniciou-se às 11:00 horas da manhã, momento em que a temperatura foi de 29,8 °C. Durante a noite a temperatura diminuiu e no dia seguinte ocorreu um aumento, e voltou a atingir 29,2 °C. Na secagem com a concentração de 250 mg.mL<sup>-1</sup>, os resultados apresentaram uma diminuição da temperatura de 32,5 para 28 °C.

Na Figura 3.15, apresentaram-se os resultados da umidade relativa do ambiente durante as secagens em monocamadas com a ausência da emulsão de óleo de canela (0 mg.mL<sup>-1</sup>), e com a presença da emulsão do óleo de canela nas concentrações de 50 e 250 mg.mL<sup>-1</sup>, a 40 ° C. Observou-se que a umidade relativa do ambiente na secagem sem o óleo apresentou uma diminuição importante, com o seu índice inicial no valor de 49,2 % e o final 40,5 %. Notou-se que em todas as secagens não ocorreu aumento da umidade relativa, mas sim diminuição durante os ensaios, com os valores próximos a 40 %, ideais para a realização de secagem de vagens de amendoim, segundo o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC, 2001, SUASSUNA et al., 2005).

**Figura 3.14:** Temperatura do ambiente durante a secagem em monocamada das vagens de amendoim com a aplicação da emulsão de óleo de canela nas concentrações de 0, 50 e 250 mg.mL<sup>-1</sup>, na temperatura de 40 °C



**Figura 3.15:** Umidade relativa do ambiente durante a secagem em monocamada das vagens de amendoim com a aplicação da emulsão do óleo de canela nas concentrações de 0, 50 e 250 mg/mL, na temperatura de 40 °C



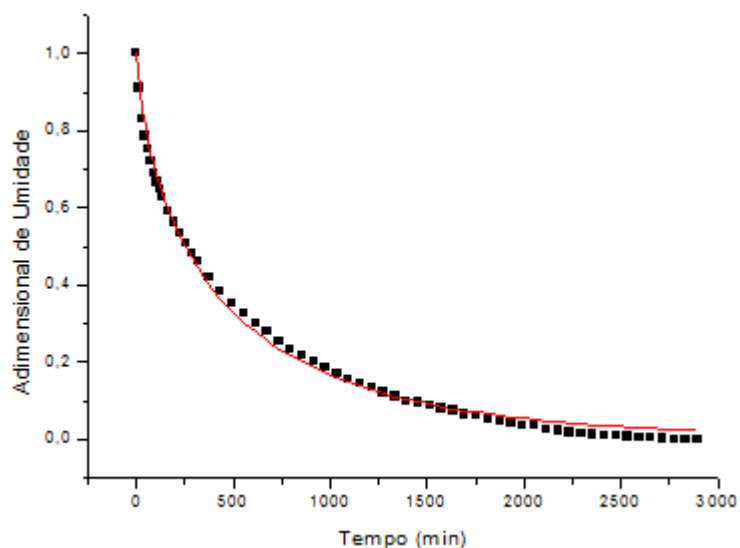
Observa-se, na Tabela 3.6, que os parâmetros do modelo de Page sofreram pouca variação devido à aplicação da emulsão de óleo essencial, o que se podia esperar devido à baixa concentração de óleo na emulsão. De modo geral o resultado foi satisfatório, uma vez que o coeficiente de determinação foi superior a 0,98.

**Tabela 3.6:** Parâmetros (K e n) de ajuste pelo modelo de Page da cinética de secagem das vagens de amendoim da variedade *Runner* IAC 886, com óleo essencial de canela nas concentrações de 0, 50 e 250 mg.mL<sup>-1</sup> e coeficientes de determinação R<sup>2</sup>, realizadas a 40° C

| Concentração do óleo essencial de canela mg/mL | Parâmetros       |                  |                |
|--|------------------|------------------|----------------|
|  | K                | n                | R <sup>2</sup> |
| 0  | 0,0148 ± 0,00097 | 0,0945 ± 0,01039 | 0,9959         |
| 50   | 0,0153 ± 0,00149 | 0,0845 ± 0,01535 | 0,99153        |
| 250  | 0,0109 ± 0,00224 | 0,0705 ± 0,02073 | 0,98318        |

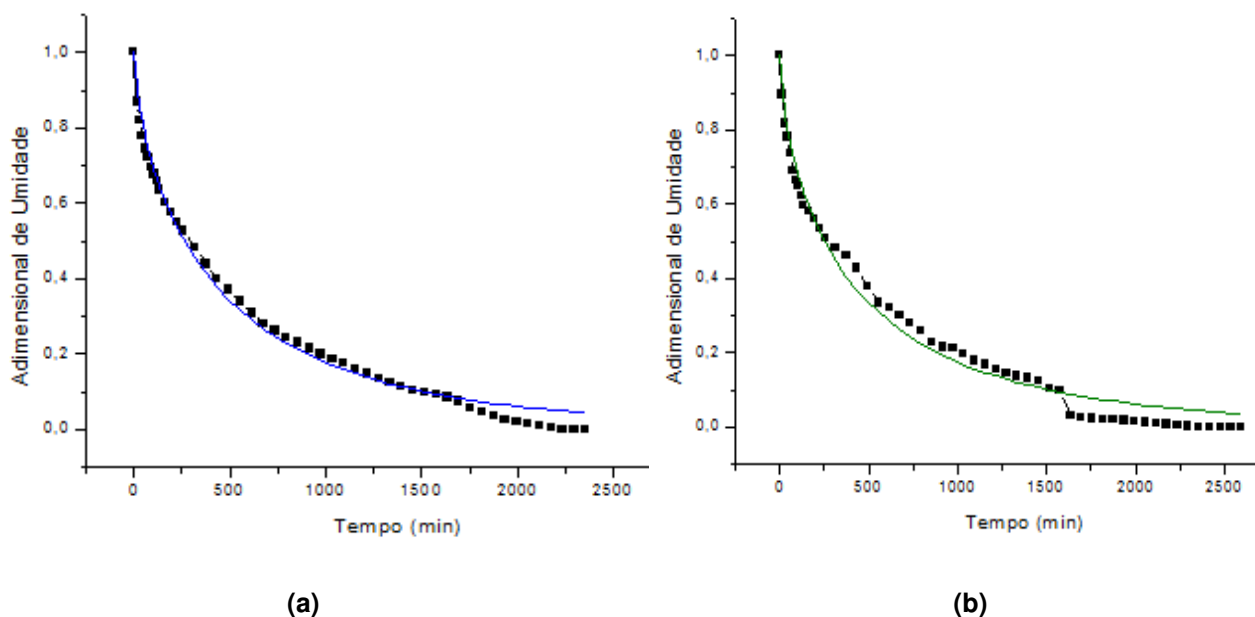
Tem-se, na Figuras 3.16 a curvas de secagem ajustadas pela equação de Page para as vagens de amendoim com ausência do óleo essencial de canela (0 mg.mL<sup>-1</sup>). Na Figura 3.17, tem-se as curvas de secagem das vagens de amendoim aspergidas com as concentrações de óleo essencial de canela de 50 (a) e 250 (b) mg.mL<sup>-1</sup>, na temperatura de 40 °C, no programa Oringi 6.

**Figura 3.16:** Curva de secagem das vagens de amendoim sem a aplicação da emulsão do óleo de canela na temperatura 40 °C





**Figura 3.17:** Curvas de secagem das vagens de amendoim com a aplicação da emulsão de óleo essencial de canela nas concentrações de 50 (a) e 250 (b) mg.mL<sup>-1</sup> para a secagem em monocamada a 40 °C



As curvas de secagem mostraram que após 24 horas, a umidade diminuiu moderadamente, já apresentando o equilíbrio, e atingindo a umidade abaixo do limite exigido pela legislação vigente para vagens <11% e para os grãos, <8% (BRASIL a, 2003).

Verificou-se que as curvas de secagem se apresentaram bem definidas, sem grandes flutuações nos pontos indicados, para o modelo matemático, mostrando boa condição durante a secagem em monocamada. Resultados semelhantes foram encontrados por Sousa et al., (2006) na secagem de mamona. O modelo de Page também foi o que melhor representou os dados experimentais da cinética de secagem, em camada delgada, de sementes de feijão quando comparado aos modelos de Thompson e Exponencial e de Difusão (AFONSO JÚNIOR e CORRÊA, 1999). Também Kester et al. (2012) realizaram a secagem de grão de soja em diferentes temperaturas e umidades relativas. Eles ajustaram os dados para cinco modelos matemáticos sugeridos na literatura e verificaram que o modelo de Page foi o que melhor se adequou aos dados da cinética de secagem. Portanto o uso do modelo de Page, no ajuste dos dados experimentais da secagem de vagens de amendoim, apresentou um alto coeficiente de determinação.

Após a secagem das amostras de vagens de amendoim, realizou-se a análise de UFC.g<sup>-1</sup> para a avaliação da contaminação no tempo zero, e após 30 dias de

exposição a ambiente com umidade relativa e temperatura controlada a 75,3% e  $25 \pm 1$  °C, respectivamente, sendo os resultados apresentados na Tabela 3.7. Foram realizados a análise de variância das médias dos resultados, conforme apresentado no APÊNDICE C1, em que foi possível verificar uma inibição de 58,3 % para a concentração de  $50 \text{ mg.mL}^{-1}$  e de 76,71% na concentração de  $250 \text{ mg.mL}^{-1}$  após 30 dias do armazenamento, não ocorrendo a produção de aflatoxina e mostrando-se, conseqüentemente, limites inferiores aos exigidos pela legislação vigente (BRASIL a, 2011; BRASIL b, 2011).

Prado et al. (1991) realizaram ensaios de isoterma de crescimento e produção de aflatoxina para grãos da variedade Tatu Vermelho de amendoim com contaminação de origem a 25° C no período de 120 dias e UR variando de 75 a 97 %. Eles concluíram que o crescimento foi lento em até 60 dias de armazenamento, mas a contagem de fungos e leveduras em 15 dias foi de  $3,0 \text{ log UFC.g}^{-1}$ , para fungos e  $5,0 \text{ log UFC.g}^{-1}$  para leveduras, na UR de 97 %, entretanto, em 90 dias, em todas as umidades o crescimento foi na faixa de  $\pm 6,0 \text{ log UFC/g}$ . Resultados semelhantes foram determinados por Gorayeb, (2007), no armazenamento de vagens por 30 dias com ausência de óleo essencial de canela, em que a contaminação fúngica do *Aspergillus flavus*, foi de  $8,23 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ . Nota-se que, com a aplicação da emulsão com óleo de canela, a contaminação e a aflatoxina mostraram-se bem inferiores, na umidade relativa de 75,3 %.

**Tabela 3.7:** Inibição da contaminação fúngica de origem ( $\text{log de UFC.g}^{-1}$ ) das vagens de amendoim por óleo essencial de canela armazenadas em umidade controlada por 30 dias

| Concentração do óleo de canela<br>( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) | Período de armazenamento (dias) |                            |
|---|---------------------------------|----------------------------|
|   | 0                               | 30                         |
| 0   | $8,47 \pm 0,21 \text{ aA}$      | $8,67 \pm 0,24 \text{ aA}$ |
| 50  | $7,98 \pm 1,37 \text{ aA}$      | $4,31 \pm 1,84 \text{ bB}$ |
| 250   | $6,71 \pm 1,41 \text{ aB}$      | $2,02 \pm 0,98 \text{ bB}$ |

Médias seguidas da mesma letra minúscula, nas concentrações, não diferem entre si a 5% de significância, pelo teste de Tukey.

Médias seguidas da mesma letra maiúscula, nos períodos, não diferem entre si a 5% de significância, pelo teste de Tukey.

### 3.3.2 Secagem em camada espessa de vagens de amendoim

#### 3.3.2.1 Parâmetros da aspersão sobre as vagens de amendoim para a secagem em camada espessa

Nos resultados da aspersão nas vagens, Tabela 3.8, para a secagem em camada espessa, foi realizada a calibração da aspersão com sistema de mangueira e os dois aspersores (A e B) onde aspergiu-se água nos tempos cronometrados para definir o volume a ser aplicado em 2 kg de amostras, sendo o total de massa de vagens necessário para obter-se uma camada uniforme sobre a peneira, a cada aspersão.

**Tabela 3.8:** Volume (mL) da aspersão nas vagens de amendoim para a secagem em camada espessa, com vazão da bomba de 1000 mL.min<sup>-1</sup>

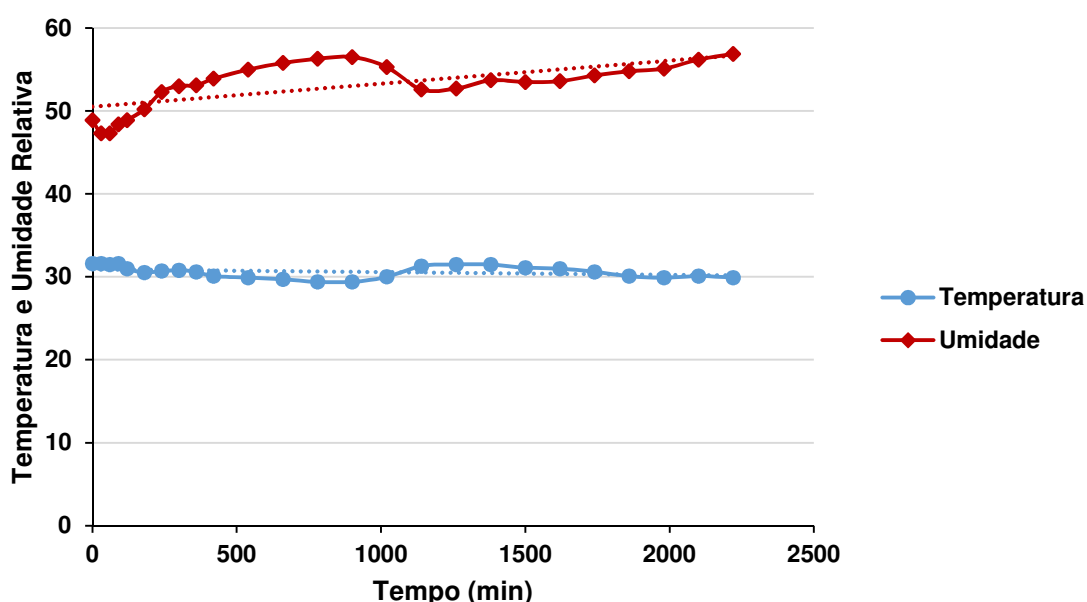
| Béquer (aspersor)        | Tempo de aspersão (segundos) |     |     |     |
|--------------------------|------------------------------|-----|-----|-----|
|                          | 15                           | 20  | 25  | 30  |
| A (primeiro)             | 60                           | 150 | 180 | 220 |
| B (segundo)              | 100                          | 100 | 115 | 140 |
| <b>Volume Total (mL)</b> | 160                          | 250 | 295 | 360 |

Com esses valores definiu-se que os aspersores seriam mantidos por 15 segundos em cima da peneira que continha as vagens para a umidade aumentar aproximadamente 2% b.s., pois se o aumento for muito grande o custo aumentará tornando essa aplicação inviável. Para preparar 1 litro da emulsão foram colocados 48,52 mL de óleo essencial de canela com densidade de 1,03 g.mL<sup>-1</sup>. Na aspersão dos 46 kg de vagens de amendoim foram utilizados 3680 mL dessa emulsão, portanto foram necessários 178,5 mL de óleo cujo custo no mercado atual é de R\$ 460,00 o litro, conforme apresentado no ANEXO II. O total gasto para a asperção das vagens de amendoim para encher a câmara de secagem foi de R\$ 82,11 com o óleo essencial de canela nesse ensaio. Para a aplicação industrial, nos 6000 kg de capacidade da carreta de secagem, serão gastos R\$ 10.710,00 com a aplicação da emulsão do óleo de canela, portanto o valor é muito alto para a aplicação nas vagens.

### 3.3.2.2 Umidade relativa e temperatura do ambiente durante a secagem em camada espessa

Foram realizadas as medições da umidade relativa do ambiente durante a secagem e observou-se que durante esse período ocorreram alterações com um aumento significativo, saindo de 47,3% no início para 56,4% no final, como apresentado na Figura 3.18. A temperatura do ambiente, durante a secagem em camada espessa, manteve-se estável em média  $30 \pm 1$  °C.

**Figura 3.18.** Umidade relativa e temperatura do ambiente durante a secagem em camada espessa das vagens de amendoim com a aplicação da emulsão de óleo de canela à 40 °C



### 3.3.2.3 Umidade e temperatura das vagens de amendoim com a aplicação do óleo essencial de canela durante a secagem em camada espessa

Os resultados da média de umidade das vagens antes e após a aplicação do óleo de canela foi de  $10,50 \pm 0,5$  % (b. s), e  $11,35 \pm 0,4$  % (b. s.), respectivamente. Na Tabela 3.9 pode-se observar que a temperatura média das camadas foi de 37,2, 36,7 e 35,7 °C nas camadas 1, 2 e 3, respectivamente. Uma redução pequena, mas esperada para esse tipo de ensaio. No entanto, o comportamento da umidade das vagens em relação às camadas foi atípico, diminuindo da base para o topo, quando

se deveria esperar o oposto. Possivelmente, a pequena altura do leito, as variações ambientais das condições termodinâmicas do ar e a pequena amostragem devem ter ocasionado esse comportamento. De todo modo, as variações foram pequenas e pode-se considerar a umidade final uniforme em toda a camada espessa.

**Tabela 3.9:** Média das Temperaturas e umidades das camadas de vagens de amendoim durante a secagem em camada espessa

| UMIDADE FINAL DAS VAGENS NAS CAMADAS (% b.s.) |             |  |               |  |             |  |             |  |  |
|---|-------------|--|---------------|--|-------------|--|-------------|--|--|
| Camadas                                       | Camada 1    |  | Camada 2      |  | Camada 3    |  | Média       |  |  |
| Umidade                                       | 7,49 ± 0,74 |  | 6,5304 ± 0,53 |  | 6,37 ± 0,84 |  | 6,80 ± 0,70 |  |  |

| TEMPERATURA NAS CAMADAS |            |      |          |      |          |      |         |       |       |
|-------------------------|------------|------|----------|------|----------|------|---------|-------|-------|
| Camadas                 | Camada 1   |      | Camada 2 |      | Camada 3 |      | Entrada | Saída | Média |
|                         | Termopares | 1    | 4        | 2    | 5        | 3    |         |       |       |
| Temperatura (°C)        | 37,2       | 37,1 | 36,7     | 36,7 | 34,9     | 35,2 | 38,0    | 35,0  | 36,4  |
| Média nas camadas       | 37,2       |      | 36,7     |      | 35,1     |      | 36,3    |       |       |

No secador industrial, a umidade das vagens é monitorada com amostragem em três pontos da carga, com o auxílio do amostrador de fases. A secagem é encerrada quando a umidade média das vagens de grãos de amendoim alcançam o teor máximo < 8% de umidade recomendado para ser armazenado com segurança e < 11% para as vagens (IAC, 2001, BRASIL a, 2003). No capítulo 1 observou-se que a umidade média das três safras, no 3º mês de armazenamento, foi de 7,17 (% b.s.), o ideal para prevenir a infestação fúngica. Se esse limite de umidade for superior ao de segurança o lote é amostrado para análises de aflatoxina e se não for detectada esse é encaminhado para a secagem novamente e enviado para o beneficiamento. Quando o teor de aflatoxinas totais for superior à 20 µg.kg<sup>-1</sup> o lote é encaminhado para a produção de óleo.

### 3.3.2.4 Umidade relativa e temperatura nas caixas durante o armazenamento das vagens de amendoim

Durante o armazenamento foram realizadas as medições de umidade no interior das caixas a cada 15 dias. Verificou-se que as umidades do ambiente de armazenamento não atingiram o valor previsto para o equilíbrio termodinâmico com as soluções salinas saturadas e cloreto de sódio (umidade prevista de 75,3 %) e cloreto de bário (umidade prevista de 90,3%), pois, para NaCl, a umidade foi em média de 70,7 %, enquanto para o BaCl<sub>2</sub> apresentaram média de 80,0 %, como pode ser visto na Tabela 3.10. Essa diminuição ocorreu porque as caixas não são hermeticamente fechadas. Para a temperatura, a média em todas as caixas foi de 25,4 °C, mostrando que as condições da câmara climática foram mantidas ao longo do ensaio.

**Tabela 3.10:** Umidade relativa e temperatura interna das caixas de armazenamento durante 90 dias

| Período (dias)       | Caixas plásticas            |             |                              |             |  |             |   |             |
|----------------------|-----------------------------|-------------|------------------------------|-------------|--|-------------|---|-------------|
|                      | U1 - NaCl<br>(C1 – 0 mg/kg) |             | U1 - NaCl<br>(C2 – 50 mg/mL) |             | U2 - BaCl <sub>2</sub><br>(C1 – 0 mg/kg) |             | U2 - BaCl <sub>2</sub><br>(C2 – 50 mg/mL) |             |
|                      | Umidade<br>(%)              | T<br>(°C)   | Umidade<br>(%)               | T<br>(°C)   | Umidade<br>(%)                           | T<br>(°C)   | Umidade<br>(%)                            | T<br>(°C)   |
| 0                    | 69,1                        | 24,8        | 68,9                         | 25,0        | 69,3                                     | 25,1        | 69,2                                      | 25          |
| 15                   | 67,8                        | 25,2        | 70,1                         | 25,3        | 79,3                                     | 26,0        | 80,3                                      | 25,4        |
| 30                   | 70,0                        | 25,6        | 69,4                         | 26,1        | 78,1                                     | 25,1        | 82,2                                      | 25,1        |
| 45                   | 70,3                        | 25,1        | 70,2                         | 25,4        | 78,2                                     | 25,3        | 80,8                                      | 25,3        |
| 60                   | 71,1                        | 26,1        | 75,0                         | 26,8        | 85,0                                     | 26,8        | 83,02                                     | 26,5        |
| 75                   | 71,0                        | 25,0        | 72,4                         | 24,8        | 84,1                                     | 25,1        | 82,3                                      | 25,1        |
| 90                   | 71,5                        | 25,4        | 73,4                         | 25,1        | 84,1                                     | 25,3        | 84,2                                      | 25,3        |
| <b>Média</b>         | <b>70,1</b>                 | <b>25,3</b> | <b>71,3</b>                  | <b>25,5</b> | <b>79,7</b>                              | <b>25,5</b> | <b>80,3</b>                               | <b>25,4</b> |
| <b>Desvio padrão</b> | <b>1,3</b>                  | <b>0,4</b>  | <b>2,3</b>                   | <b>0,7</b>  | <b>5,5</b>                               | <b>0,6</b>  | <b>5,1</b>                                | <b>0,5</b>  |

Com essas condições no armazenamento, a caixa com NaCl apresentou a umidade ambiente mais baixa, aproximadamente 70,7%, semelhante a do município de Jaboticabal, e excelente como comparativo das condições de armazenamento das indústrias. No entanto, porém na solução de BaCl<sub>2</sub> a umidade não foi alta ao índice ideal para ocorrer a produção de aflatoxinas. Desse modo ocorreram a interferência nos resultados das análises.

### 3.3.2.5 Umidade das vagens de amendoim durante o armazenamento

Nos resultados da umidade das vagens de amendoim armazenadas, apresentados na Tabela 3.11, foi realizada a análise de variância (ANOVA) a qual encontra-se no APENDICE C2. Nas vagens armazenadas na caixa com umidade U1 – NaCl sem a aplicação da emulsão do óleo de canela (0 mg/mL), observou-se que a umidade das vagens apresentaram um aumento de 0,87 % b. s. Para as vagens armazenadas na caixa com a mesma umidade, mas com a aplicação da emulsão do óleo de canela na concentração de 50 mg.mL<sup>-1</sup>, o aumento foi em média de 2,46 % b. s. As amostras armazenadas na caixa com umidade U2 – BaCl<sub>2</sub>, sem a aplicação da emulsão do óleo de canela, C1 - 0 mg/mL, apresentaram um aumento em média de 3,45 % b. s., com o valor em média de 13,75 % b. s., e na U2 - BaCl<sub>2</sub>, C2 - 50 mg/mL, com o aumento de 5,47 % b. s., atingindo a umidade média de 12,27 % b. s. Em ambos os armazenamentos as umidades ultrapassaram o limite permitido pela legislação, que é superior a 11 % b. s. (BRASIL 2003). Os resultados demonstraram a importância da implantação do sistema de ventilação dos ambientes nas unidades armazenadoras para os produtos a granel e em sacos, de acordo com a legislação exigida pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), (2011).

No trabalho de Azeredo, et al., (2005), ao avaliarem as sementes de amendoim armazenadas dentro e fora das vagens, em duas embalagens (papel e metálica), por quatro períodos (3, 6, 9 e 12 meses) e duas condições de armazenamento (ambiente não controlado e câmara seca, a 65% de UR e 20°C, revelaram que as umidades das sementes, mantidas nos dois tipos de embalagens, oscilaram em torno de 5,7 % b. s. a 7,4 % b. s. Em embalagem metálica, sob condições de ambiente não controlado, o efeito significativo só foi verificado para as sementes conservadas fora das vagens, com pequenas variações ao longo do

armazenamento. O teor de umidade manteve-se constante a partir do sexto mês de armazenamento, enquanto as sementes conservadas dentro dos frutos apresentaram uma pequena oscilação; porém, atingindo no final do período uma umidade de 7%, idêntica a do tratamento testemunha. Esses resultados foram diferentes dos obtidos neste trabalho, em que em todas as condições ocorreram aumentos da umidade das vagens. Contudo deve-se levar em consideração que a umidade relativa foi de 65 %.

**Tabela 3.11:** Umidade das vagens de amendoim com ausência e presença de óleo essencial de canela, armazenadas durante 90 dias

| Umidade relativa do armazenamento das vagens | Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> ) | Período (dias) |               |               |               | Média e desvio padrão |
|--|-------------------------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------|
|  |                                     | 0              | 30            | 60            | 90            |                       |
| U1 – NaCl<br>(75,3 %)                        | C1 - 0                              | 10,5 ± 0,5 cd  | 11,5 ± 0,1 cd | 11,7 ± 0,4 cd | 11,1 ± 0,1 cd | 11,1 ± 0,53           |
|  | C2- 50                              | 6,8 ± 0,7 cd   | 10,3 ± 0,2 d  | 10,7 ± 1,1 cd | 11,0 ± 0,3 cd | 11,0 ± 1,95           |
| U2 - BaCl <sub>2</sub><br>(90,3%)            | C1 - 0                              | 10,5 ± 0,5 cd  | 13,9 ± 0,2 b  | 17,1 ± 0,8 a  | 16,6 ± 0,7 a  | 16,6 ± 3,03           |
|  | C2- 50                              | 6,8 ± 0,7 cd   | 12,3 ± 0,1 bc | 17,7 ± 1,0 a  | 16,8 ± 0,8 a  | 16,8 ± 4,99           |

Médias seguidas da mesma letra minúsculas, não diferem entre si a 5% de significância, pelo teste de Tukey.

### 3.3.2.6 Inibição da contaminação fúngica de origem do óleo de canela durante o armazenamento em umidade e temperatura do ambiente controladas.

Na Tabela 3.12 são apresentados os resultados da inibição da contaminação fúngica de origem para as amostras na ausência do óleo essencial de canela e com a aplicação da emulsão do óleo com 50 mg.mL<sup>-1</sup>, armazenadas em ambiente com a umidade 75,32 % e 90,3%, foi realizada a análise de variância das médias (ANOVA) que esta apresentada no APÊNDICE C3. Observou-se que os resultados da contaminação fúngica não apresentaram diferenças significativas nos diferentes períodos e nas diferentes concentrações de aplicação do óleo essencial de canela com os valores de 8,01 a 8,48 em Log UFC/g para a testemunha. As amostras



armazenadas com a aplicação de óleo essencial de canela na concentração C2 (50 mg.mL<sup>-1</sup> do óleo), apresentaram valores inferiores, mas não expressivos.

**Tabela 3.12:** Unidade formadora de colônia (UFC/g) das vagens de amendoim com ausência e presença de óleo essencial de canela, armazenadas durante 90 dias

| Umidade relativa do armazenamento das vagens | Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> ) | Período (dias) |              |              |              | Média Log UFC.g <sup>-1</sup> |
|--|-------------------------------------|----------------|--------------|--------------|--------------|-------------------------------|
|  |                                     | 0              | 30           | 60           | 90           |                               |
| U1 – NaCl<br>(75,3 %)                        | C1 - 0                              | 8,01 ± 0,7 a   | 8,25 ± 0,5 a | 8,25 ± 0,5 a | 8,50 ± 0,2 a | 8,25 ± 0,2                    |
|  | C2- 50                              | 7,52 ± 2,1 a   | 8,17 ± 0,7 a | 8,17 ± 0,7 a | 6,20 ± 0,2 a | 7,51 ± 0,93                   |
| U2 - BaCl <sub>2</sub><br>(90,3%)            | C1 - 0                              | 8,01 ± 0,7 a   | 8,48 ± 0,4 a | 8,48 ± 0,4 a | 8,26 ± 0,2 a | 8,31 ± 0,22                   |
|  | C2- 50                              | 7,52 ± 2,1 a   | 8,37 ± 0,1 a | 8,37 ± 0,1 a | 8,35 ± 0,9 a | 8,15 ± 0,42                   |

Médias seguidas da mesma letra minúsculas, não diferem entre si a 5% de significância, pelo teste de Tukey.

Os pesquisadores, Tripathi e Kumar, (2014), isolaram os fungos de sementes de amendoim armazenadas em lojas no município de Uttar Pradesh, Índia Oriental. Eles identificaram quinze espécies de fungos e um inseto, extraíram óleos essenciais de 32 espécies de plantas, que foram avaliadas contra os quinze fungos, entre eles os mais frequentes: *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. O óleo de canela (*Cinnamomum tamala* Nees and Eberm) foi aplicado nas 200 g de sementes, nos volumes de 250 e 380 µL/mL, sendo armazenadas as sementes por 6 meses em recipientes de capacidade 250 mL. O óleo de canela apresentou uma inibição de 30.0 % contra o *Aspergillus flavus* e de 23,0 % para o *A. Niger* na concentração de 250 µL/mL. Resultados superiores aos desse ensaio, porém inferiores aos ensaios de monocamada, em que não foi realizada a secagem do milho em estufa.

No trabalho semelhante a esse, Mengal, (2010) aplicou os óleos essenciais de *Eucalyptus* spp., extraído de nove espécies de plantas, nas concentrações de 30, 60, 240, 480, 1260 µL/100 g, em grãos de milho, contaminados por *A. flavus* e armazenado em caixas plásticas por 27 dias, sob a umidade controlada de solução salina de NaCl sem a presença de luz. Após esse período, as amostras foram analisadas quanto à presença de colônias de fungos nos grãos e para os óleos de *E.*

*staigeriana*, *E. grandis*, o híbrido *E. grandis* X *E. urophylla* foram obtidas as maiores inibições.

Atualmente são realizados muitos trabalhos de inibição dos fungos *in vitro*, com o uso de óleos essenciais, porém, no momento de analisar as aplicações *in situ*, as dificuldades quanto à metodologia são grandes, principalmente quanto a métodos acerca de como realizar a aplicação das vagens e como armazená-las, o que sugere mais trabalhos de aplicação.

### **3.3.2.7 Inibição da contaminação das Aflatoxinas pelo óleo de canela durante o armazenamento em umidade e temperatura do ambiente controladas.**

A Tabela 3.13 apresenta os resultados da produção de aflatoxina pelos fungos de contaminação de origem das vagens de amendoim, na ausência da aplicação do óleo essencial de canela (testemunha) e com a aplicação da emulsão do óleo na concentração 50 mg/mL. A média dos resultados obtidos foram submetida à análise fatorial, que apontou somente o fator “Concentração de óleo essencial de canela” como significativo a 5% ( $p = 0,036$ ).

Quanto aos teores iniciais das testemunhas com a ausência e presença do óleo essencial de canela na concentração de 50 mg/mL, a produção de aflatoxina não foi detectada (ND). Após 30 dias ocorreu um aumento significativo na produção de aflatoxina nas amostras armazenada em ambas as umidades relativas com a ausência da aplicação do óleo essencial de canela, não sendo detectada nas amostras com a aplicação de óleo. No armazenamento de 90 dias, a produção de aflatoxina nas duas amostras com a ausência da aplicação do óleo essencial de canela, apresentaram um aumento significativo de 2338,9 e 1071,17  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , nas umidades U1 e U2, respectivamente. Os resultados com a aplicação do óleo essencial de canela apresentaram teores de aflatoxina inferiores aos limites exigidos pela legislação vigente (BRASILa, 2011), na condição de armazenamento até 90 dias só para a umidade relativa de 75,3% (U1), ocorrendo a presença nas condições de umidade relativa de 90,3% (U2) em níveis elevados. A análise de variância (ANOVA) dos resultados da aflatoxinas total (somatória de B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>) são apresentados no Apêndice C4.

Resultados semelhantes foram obtidos por Gorayeb, (2007), ao analisar aflatoxina nas vagens de amendoim contaminadas por *A. Flavus*, por cromatografia em camada delgada (CCD). Observou-se que após 15 dias de armazenamento as vagens apresentaram o teor de 4182,62 µg/kg, e aos 30 dias de armazenamentos, o teor aumentou para 5155,73 µg/kg, quando a umidade relativa foi de 90,3%.

**Tabela 3.13:** Média dos níveis de aflatoxina total das amostra de grãos de amendoim armazenadas nas vagens durante 90 dias, com a presença e ausência de óleo essencial de canela

| Umidade do ambiente (%)           | Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> ) | Período (dias) |           |           |           | Média da Aflatoxina total (µg.kg <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------------------|-------------------------------------|----------------|-----------|-----------|-----------|--|
|                                   |                                     | 0              | 30        | 60        | 90        |  |
| U1 – NaCl<br>(75,3%)              | C1 - 0                              | ND             | 468,4 d   | 2338,9 b  | 1350,83 c | 1039,53  |
|                                   | C2- 50                              | ND             | ND        | ND        | ND        | ND   |
| U2 - BaCl <sub>2</sub><br>(90,3%) | C1 - 0                              | ND             | 1196,43 c | 1071,17 c | 3312,71 a | 1395,08  |
|                                   | C2- 50                              | ND             | ND        | 8,11 e    | 1350,86 c | 339,74   |

ND - Os resultados menores que o Limite de Detecção do Método (LDM)

Médias seguidas da mesma letra minúsculas, não diferem entre si a 5% de significância, pelo teste de Tukey.

Passone et al., (2010), ao analisarem o armazenamento de amendoim com contaminação de origem, durante cinco meses, em Cordoba na Argentina, prepararam quatro *big begs* com vagens de amendoim secas até atingirem a atividade de água de  $0.92 \pm 0.01$ ,  $0.88 \pm 0.01$ ,  $0.84 \pm 0.01$  e  $0.76 \pm 0.02$ , sendo as sacas colocadas em um armazém com ventiladores de ar a fim de renovar o ar durante o período de armazenamento, e termopares para monitorar a temperatura das vagens de amendoim. Verificaram que as amostras apresentaram um aumento de 86,8 para 204,0 µg.kg<sup>-1</sup>. O segundo iniciou com 3,9 e terminou com 140,9 µg.kg<sup>-1</sup>, e o terceiro iniciou com 1,1 µg.kg<sup>-1</sup> e terminou com 12,5 µg.kg<sup>-1</sup>. O big beg que iniciou com a menor Aw não apresentou teores de aflatoxinas durante os cinco meses.

Zordete et al., (2013), mostraram a contaminação de origem de sementes e vagens de cultivares de amendoim *Runner IAC 886* com umidade inicial de 11%, armazenados no período de abril a setembro de 2006, na Cooperativa Agrícola Mista da Alta Paulista (CAMAP) – SP. Os teores de aflatoxinas iniciaram em 0.3 µg.kg<sup>-1</sup> e

não detectado ND, para os grãos e para as vagens, respectivamente, terminaram com ND, para os grãos e para as vagens  $1,3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , no período de abril a setembro. Os resultados indicam um baixo risco de produção de aflatoxina, já que a cooperativa possui a implantação das boas práticas de fabricação (BPF) durante o armazenamento. Os resultados obtidos discordam deste trabalho para as vagens com a contaminação de origem, pois elas foram condicionadas em ambientes com umidades relativas altas.

### 3.4 CONSIDERAÇÕES

Na avaliação da eficiência do biofungicida óleo essencial de canela na infestação fúngica e de aflatoxinas contra a microbiota de origem nas vagens de amendoim, quando na aplicação da emulsão seguida da secagem em monocamada, pode-se concluir que o modelo de Page apresentou o melhor ajuste dos dados experimentais com o coeficiente de determinação de 0,99. Ocorreram inibições satisfatórias nas concentrações aplicadas com níveis abaixo dos exigidos pela legislação vigente, durante o período de armazenamento em ambiente com a umidade relativa e temperatura controladas próximas às condições do município de Jaboticabal – SP.

No entanto, na avaliação da eficiência do óleo essencial de canela, aplicado nas vagens de amendoim com a microbiota de origem armazenadas com duas condições de umidade e temperatura controladas, em que a primeira é semelhante a do município de Jaboticabal e a segunda assemelha-se às condições de umidade mais altas, as quais, após a aplicação da emulsão foram secas em camada espessa, concluiu-se que a inibição da microbiota não foi satisfatória nas duas condições em todos os períodos e que a aflatoxina apresentou altos teores nas amostras em ausência da aplicação do óleo de canela. Nas vagens com a aplicação da emulsão de óleo, não apresentou eficiência nos dois períodos do armazenamento para a infestação fúngica com índices superiores aos limites da legislação, porém, quanto à inibição da aflatoxina no primeiro período não foram detectadas nas duas condições de armazenamento, mas no segundo período, as amostras apresentaram o teor de aflatoxina baixo, inferior ao exigido por lei.

Nas aplicações das emulsões do óleo de canela, nas concentrações aplicadas nos dois ensaios de inibição apresentaram um odor forte de canela que interfere nas características sensoriais, proporcionando um odor característico nos grãos, além do custo do óleo ser alto.

## **CAPÍTULO 4**

### **CONCLUSÃO**

Ao final deste trabalho pode-se concluir que:

- ✓ Na análise da infestação fúngica das vagens de amendoim *Runner* IAC 886, coletadas na região próximas ao município de Jaboticabal – SP, foi observado que a umidade, a contagem de unidade formadoras de colônias de fungos e os teores de aflatoxina das vagens de amendoim, durante a colheita e pós-colheita, necessitam estar dentro dos padrões decrescentes a serem atingidos, em função das condições preventivas para o não crescimento dos fungos micotoxigênicos, e atingindo no armazenamento os limites exigidos pela legislação vigente. Para a conquista dos padrões ideais em cada etapa da colheita e pós colheita a implantação das Boas Práticas Agrícolas, de Fabricação e com do plano APPCC, é comprometimento do trabalho conjunto entre os produtores, cooperativas e órgãos governamentais, para a preservação da qualidade do amendoim e a conquista dos mercados internos e externos cada vez mais exigentes.
  
- ✓ A avaliação da atividade antifúngica dos extratos das plantas apresentaram um potencial baixo na inibição do crescimento micelial (ICM) do *Aspergillus flavus*, porém os óleos essenciais apresentaram uma inibição alta em concentrações baixas para os óleos de canela, cravo da Índia e cidreira, ao passo que para os óleos de orégano e manjerição as inibições foram baixas. As mesmas inibições contra o *A. flavus* foram confirmadas na aplicação da metodologia de concentração inibitória mínima (CIM) apresentando o óleo de canela como o ideal para as aplicações de contato com as vagens. Na aplicação de contato contra o *A. flavus* e microbiota de origem, as inibições das contaminações fúngicas foi reduzida significativamente, atendendo os limites exigidos. No entanto, quando em concentrações altas, o óleo de canela, cravo e cidreira, causaram a presença de odor forte; na aplicação do óleo de canela contra a microbiota de origem, os teores de aflatoxinas foram inferiores ao exigido pela legislação vigente. Podendo-se,

também, determinar que os princípios ativos dos óleos essenciais são substâncias capazes de inibirem os *Aspergillus flavus* reduzindo a produção de aflatoxinas em condições de umidade e temperatura controladas.

- ✓ A eficiência do óleo essencial de canela contra a microbiota de origem com a secagem em monocamada, após a aspersão, mostrou-se eficiente reduzindo a infestação fúngica, após o período de armazenamento em condições de temperatura e umidades relativas controladas. Os índices foram inferiores aos exigidos por lei, não permitindo a presença de aflatoxina na umidade similar a do município de Jaboticabal – SP. Quanto ao ensaio com secagem em camada espessa ocorreu a produção de aflatoxinas nas condições de umidade mais alta, porém os teores estão abaixo dos exigidos no período de sessenta dias, ocorrendo a presença só no período de armazenamento.
- ✓ A aplicação dos óleos essenciais mostrou-se promissora para o uso antes da etapa de secagem em amendoim, principalmente por prevenir o uso de agrotóxicos.





## REFERÊNCIAS

- ABAD, A.; FERNÁNDEZ-MOLINA, J. V.; BIKANDI, J.; RAMÍREZ, A., MARGARETO, J.; SENDINO, J.; HERNANDO, F. L.; PONTÓN, J.; GARAIZAR, J.; REMENTERIA, A. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Barcelona, v. 27, n. 4, p.155–182, 2010.
- A CHUVA veio em março, mas em janeiro e fevereiro, a seca esteve acima da média histórica. **REVISTA COPLANA DO PRODUTOR, Jaboticabal, ano 11, n. 84, jan/fev. 2014.** Disponível em: <[http://www.coplana.com/gxpfiles/ws001/design/RevistaCoplana/2014/Revista\\_84.pdf](http://www.coplana.com/gxpfiles/ws001/design/RevistaCoplana/2014/Revista_84.pdf)>. Acesso em: 12 mar. 2015.
- AFONSO JÚNIOR, P.C.; CORRÊA, P.C. Comparação de modelos matemáticos para descrição da cinética de secagem. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, Campina Grande, v.3, n.3, p.349-353, 1999.
- AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual Química**, Rio de Janeiro, v.4 (2), p. 146-161, 2012. Disponível em: <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewArticle/254> Acesso em: 14 set. 2012.
- AGROMÉRICA AGROMETALURGICA AMÉRICA LTDA. **Secador de carros acoplados Dragon.** Disponível em: <[http://www.agromerica.com.br/produto/6-carros-secador-acoplados-dragon/dados\\_do\\_produto.html](http://www.agromerica.com.br/produto/6-carros-secador-acoplados-dragon/dados_do_produto.html)>. Acesso em: 4 nov.2012.
- ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras.** São Paulo: Hemus Editora, 1993.
- ALVES, S.B.; MORAES S. A. Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. **Controle microbiano de insetos**, p. 765-777. In: Piracicaba: FEALQ, S. B. Alves (Ed.), 1998.
- AMAIKE S.; KELLER N. P. *Aspergillus flavus*. **Annual Review of Phytopathology.** Paulo Alto, v. 49, p. 107–33, 2011.
- ARAÚJO, W. D. et al. Difusividade efetiva de grãos de amendoim durante a secagem. In: **XLIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA (CONBEA)**, 43, 2014, Campo Grande. Anais...: Associação Brasileira de Engenharia Agrícola - SBEA, 2014.
- ARAÚJO, W. D.; GONELI A. L. D.; SOUZA C. M. A.; GONÇALVES A. A.; VILHASANTI H. C. B. Propriedades físicas dos grãos de amendoim durante a secagem. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, Campina Grande, v.18, n.3, p.279–286, 2014.

ARRUDA, E.B. **Comparação do Desempenho do Secador Roto-fluidizado com o Secador Rotatório Convencional: Secagem de Fertilizantes**. 2008. f. 176. Tese de doutorado em engenharia química – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (UFU), Uberlândia–MG, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CHOCOLATES, CACAU, AMENDOIM, BALAS E DERIVADOS (ABICAB) – **Programa Pró-Amendoim. 2001**. Disponível em: <[www.abicab.org.br/amendoim/pro-amendoim/selo-de-qualidade](http://www.abicab.org.br/amendoim/pro-amendoim/selo-de-qualidade)> Acesso em: 13 ago. 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CHOCOLATE, CACAU, AMENDOIM, BALAS E DERIVADOS (ABICAB). **Consumo per capita brasileiro**. Planejamento Estratégico Setor Amendoim da ABICAB, elaborado por N & P Consultores Satra Export & Inport. 2015. Disponível em: <<http://www.abicab.org.br/amendoim/pro-amendoim/consumo-per-capita>> Acesso em: 17 jan. 2015.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.) - **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 926.12). Arlington: chapter v. 33, p. 5, 1996.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS INTERNATIONAL (AOAC). **AOAC official method 991.31: aflatoxins in corn, raw peanuts and peanut butter: immunoaffinity column (aflatest) method**. Washington, DC, 2000a.p. 49.2.18

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS INTERNATIONAL (AOAC). **Official Method 994.08. Aflatoxins in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts, multifunctional column (Mycosep) method. Natural toxins-chapter 49 Official Methods of Analysis of AOAC International**, 17th ed. Gaithersburg, 2000b. v. 2, p. 26-27. AOAC International, Maryland, USA.

ATAYDE, D.D.; REIS, T.A.; GODOY, I.J.; ZORZETE, P.; REIS, G.M.; CORREA, B. Mycobiota and aflatoxins in a peanut variety grown in different regions in the state of São Paulo, Brazil. **Crop Protection**, London, v.33, p.7-12, 2012.

AZEREDO, G. A.; BRUNO R. L. A.; LOPES, K. P.; SILVA, A.; DINIZ, E.; LIMA, A. A. Conservação de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) em função do beneficiamento, embalagem e ambiente de armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n.1, p. 37- 44, 2005.

BAKKER ARKEMA, F. W. (Ed.). Agro-processing engineering. In: INTERNATIONAL COMMISSION OF AGRICULTURAL ENGINEERING (Ed.). **CIGR Handbook of agricultural engineering**. St. Joseph: American Society of Agricultural Engineers, v. 4. p. 527, 1999.

BANKOLE, S. A. Effect of essential oils from two nigerian medicinal plants (*Azadirachta indica* and *Morinda lucida*) on growth and aflatoxin B1 production in maize grain by a toxigenic *Aspergillus flavus*. **Letters in Applied Microbiology**. Oxford, v. 24, p. 190–192, 1997.

\_\_\_\_\_ ; JODA, A.O. Effect of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) powder and essential oil on mould deterioration and aflatoxin contamination of melons seeds (*Colocynthis citrullus* L.). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 3, n. 1, p.52-59, 2004.

BARROZO, M. A. de S.; SARTORI, D. J. M.; FREIRE, J. T. Transferência de calor e massa em leito deslizante e escoamentos cruzados: secagem de sementes de soja. In: FREIRE, J. T.; SILVEIRA, A. M. **Tópicos especiais em sistemas particulados**. São Carlos: UFSCAR, 1998. cap. 4, p. 119-159.

BASTOS, C.N.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 555-557, 2004.

BATALHA, M. O. (Coord.). **Gestão agroindustrial**: GEPAl: Grupo de Estudos e Pesquisas Agroindustriais. 3. ed. São Paulo. Atlas, 2008. v. 1, p. 770.

BERALDO, C.; DANELUZZI, N. S.; SCANAVACCA, J.; DOYAMA, J. T.; FERNANDES JÚNIOR, ARY; MORITZ, C. M. F. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 436-440, out./dez. 2013.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.(Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas**: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 341.

BHAT, R.; RAI, R.; KARIM, A. A. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 9, p. 57 - 81, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x/pdf>>. Acesso em: 11 jan. 2015.

BHATTACHARYA, K.; RAHA, S. Deteriorative changes of maize, groundnut and soybean seeds by fungi in storage. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 155, n. 3, p.135-141, 2002

BIAGI, J.D.; BERTOL, R.; CARNEIRO, M.C. Secagem de grãos para unidades centrais de armazenamento. In: LORINI, I.; MIKE, L.H.; SCUSSEL, V.M. **Armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Bio Geneziz, 2002. cap.5.2, p.289-308.

BILLERBECK, V. G.; ROQUES, C. G.; BESSIÈRE, J. M.; FONVIEILLE, J. L.; DARGENT, R. Effect of *Cymbopogon nardus* (L) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 9–17, (2001).

BOLONHEZI, D.; MUTTON, M.A.; MARTINS, A. L. M. Sistemas conservacionistas de manejo de solo para amendoim cultivado em sucessão à cana crua. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.42, n.7, p.939-947, jul. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 183, de 21 de março de 1996**. Aflatoxinas B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub> = 20 ppb. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 mar. 1996. Seção 1, p. 4929.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 3, de 28 de janeiro de 2009**. Critérios e procedimentos para o controle higiênico-sanitário do amendoim e seus subprodutos na cadeia produtiva. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acesso em: 13 ago.2012.

BRASIL b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 29, de 8 de junho de 2011**. Requisitos técnicos obrigatórios ou recomendados para certificação de unidades armazenadoras em ambiente natural e o regulamento de avaliação da conformidade das unidades armazenadoras. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 jun. 2011. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de coleta de amostras do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem vegetal**. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. p. 37, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - **Portaria nº 143, de 14 de julho de 2014**. Laboratório de Ensaio acreditado pela CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob o número CRL 0312. Laboratório de cromatografia. J.L.A.: Brasil Luís H. Rodrigues, Responsável Técnico CRQ IV nº04.100.220, 2014.

BRASIL. Ministério das Cidades. Conselho Nacional de Trânsito. **Resolução nº 210 de 13 de novembro de 2006**. Estabelece os limites de peso e dimensões para veículos que transitem por vias terrestres e dá outras providências. Disponível em: <[www.denatran.gov.br/download/.../resolucao\\_210.rtf](http://www.denatran.gov.br/download/.../resolucao_210.rtf)>. Acesso em: 17 abr. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1.428/MS, de 26 de novembro de 1993. Regulamento técnico para inspeção sanitária de alimentos, as Diretrizes para o estabelecimento de boas práticas de produção e de prestação de serviços na área de alimentos e o Regulamento técnico para o estabelecimento de padrão de identidade e qualidade (PIQ's) para serviços e produtos na área de alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 dez. 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002. Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, Brasília, DF, 16 out. 2002b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 172, de 04 de julho de 2003. Regulamento técnico de boas práticas de fabricação para estabelecimentos industrializadores de amendoins processados e derivados e a lista de verificação das boas práticas de fabricação para estabelecimentos industrializadores de amendoins processados e derivados. Poder Executivo, de 07 de julho de 2003a. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 7 jul. 2003. Seção 1. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 11 set. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas práticas de fabricação em estabelecimentos produtores e industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 out. 2003a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 mar. 2011a. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007\\_18\\_02\\_2011\\_rep.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html)>. Acesso em: 11 set. 2012.

BRASIL. **Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003.** Dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 6. ago. 2003c. Seção 1.

BRASIL. **Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. LEI Nº 8.078, DE 11 DE SETEMBRO DE 1990** Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências dos Direitos do Consumidor. **Diário Oficial da União** - 12/9/1990. Seção 1 – Suplemento.

BRASIL. **Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003.** Dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 6. ago. 2003b. Seção 1.

BRAUNER N.; ULLMANN A. Modeling of phase inversion phenomenon in two-phase pipe flows. **International Journal of Multiphase Flow**, Elmsford, v. 28, n. 7, p. 1177-1204, July 2002.

BROWN, P. D.; MORRA, M. J. Glucosinolate containing plant tissues as bioherbicides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, p. 3070-3074, 1995.

BU'LOCK, J. D. **The biosynthesis of natural products**. New York: McGraw-Hill, 1965.

CARLESSO, V. O.; BERBERT, P. A.; SILVA, R. F.; VIANNA, A. P.; DETMANN E.; DIONELLO, R. G. Secagem de sementes de maracujá em camada delgada. **Rev.**

**Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 444-448, dez. 2005.

CARMO, E. S.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; SOUSA, F. B. Effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oil on the growth and Morphogenesis of some potentially pathogenic *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 91-97, 2008.

CARVALHO FILHO, J. L. S.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; EHLERT, P. A. D.; MELO, A. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA-MANN, R. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, p. 24-30, 2006.

CASTRO, L. O.; RAMOS, R. L. D. Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais. **Boletim Técnico da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária**, n. 11, 2003.

CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS (CIIAGRO). **Chuvas mensal por período**: resenha agrometeorológica. Campinas. 2015. Disponível em: <<http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/Quadros/QchuvaPeriodo.asp>>. Acesso em: 20 jan. 2015.

CHAGAS, H. A.; BASSETO, M. A.; ROSA, D. D.; TOPPA, E. V. B.; FURTADO, E. L.; ZANOTTO, M. D. Avaliação de fungicidas, óleos essenciais e agentes biológicos no controle de *Amphobotrys ricini* em mamoneira (*Ricinus communis* L.). **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 40, n. 1, p. 42-48, 2014.

CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C.; RESENDE, M. L. V.; ANGÉLICO, C. L.; SILVA, R. A. Effect of powdered spice treatments growth, sporulation and production of aflatoxin by toxigenic fungi. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 28, n. 4, p. 856-862, jul./ago. 2004.

CHANG, A. S.; SREEDHARAN A.; SCHNEIDER K. R. Peanut and peanut products: a food safety perspective. **Food Control**, Guildford, v. 32, p. 296-303, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.007>>. Acesso em: 2 jan. 2015.

CLEFF, M. B.; MEINERZ A.R.; FARIA, R.O.; XAVIER, M.O.; SANTIN, R.; NASCENTE, P.S.; RODRIGUES, M.R.; MEIRELES, M.C.A. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.62, n.5, p.1291-1294, 2010.

CHILVERS, M.I.; HAY, F.S.; HILLS, J.; DENNIS, J.J.C.; WILSON, C.R. Influence of benzimidazole fungicides on incidence of *Botrytis allii* infection of onion leaves and subsequent incidence of onion neck rot in storage in Tasmania, Australia. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 46, p. 1661-1664, 2006.

COCO, V. L. Manjerição. **Temperaria**: criando na cozinha. [s. l.], 4 ago. 2011.: Série temperos: . Disponível em: <<http://temperaria.com.br/serie-temperos-manjericao>>. Acesso em: 4 nov. 2012.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC). **Hazard analysis critical control points: system guidelines for its application**. Rome, 1997. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/005/y1579e/y1579e03.htm>>. Acesso em: 15 fev. 2015.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC). **Code of practice for the prevention and reduction of mycotoxin contamination in cereals, including annexes on ochratoxin a, zearalenone, fumonisins and tricothecenes**. Adopted 2003; rev. 2014. Rome, 2003. (CAC/RCP 51-2003). Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.org>>. Acesso em: 2 mar. 2015.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Prevention and reduction of food and feed contamination**. 5th ed. p. 178, Rome, 2012. Disponível em: <[www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/](http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/)>. Acesso em: 22 maio 2015.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Code of practice for the prevention and reduction of aflatoxin contamination in peanuts**. Rome, 2004. (CAC/RCP 55-2004). Disponível em:< <http://www.codexalimentarius.org>>. Acesso em: 3 jan. 2015.

COLOSS morphological description. Bern: Institute of Bee Health University of Bern Schwarzenburgstrasse, 2015. Disponível em: <<http://www.coloss.org/beebook/II/fungal>>. Acesso em: 28 jan. 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Proposta de preços mínimos: safra 2013/14: produtos da safra de verão**. Brasília, 2013a. v. 2. p. 161 Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 21 abr. 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2014/15: terceiro levantamento**. Brasília, dez. 2014. v. 2, n. 3, p. 1-100. Disponível em:< <http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 29 dez. 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo primeiro levantamento, setembro 2013** / Companhia Nacional de Abastecimento. p. 30, Brasília: Conab, 2013b. Disponível em: <http://www.conab.gov.br> Acesso em: 29 setembro 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2014/15: sexto Levantamento**, Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, mar. 2015. v. 2, n. 6, p. 1-106. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 21 abr. 2015.

COTTY, P. J.; JAIME-GARCIA, R. Influence of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, p. 109 -115, 2007.

- CORRÊA, P. C.; MACHADO, P. F.; ANDRADE, E. T. Cinética de secagem e qualidade de grãos de milho-pipoca. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 134-142, 2001.
- COSTA, A.R.T.; AMARAL, M.F.Z.J.; MARTINS, P.M.; PAULA, J.A.M.; IUZA, T.S.; TRESVENZOL, L.M.F; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.2, p.240-245, 2012.
- COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST).  
**Mycotoxin**: Risk in plant, animal, and human system. Ames, (Task force report,139) 2003.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.** Washington, DC, v. 12, p. 564-582,1999.
- CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; CARVALHO, J. L. S.; PEITZ, C.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Estudo da atividade antifúngica de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae: um teste in vivo. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 77-82, jul./dez., 2003.
- CRUZ, M. E.S.; SCHWANESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. J. S., RUPP, M. M. M.; FIORE, B. V. Controle natural de patógenos em grãos de amendoim e café. **Rev. Bras. de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 4.n. 2, p 3137- 3142, nov. 2009.
- CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H.S.; MATOS, F. J. de A.; ALENCAR, J. W. de. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. Fortaleza: UFC- Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, 1981, p. 210.
- DAOUK, K. D; DAGHER, M. S; SATTOUT, J. E. Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. **J Food Protect**, Des Moines, v. 58, p. 1147–1149, 1995.
- DEVI, K. P; NISHA, S. A; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S.K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 107- 115, 2010.
- DIENER, U. H.; DAVIS, N. D. Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 56, p. 1390-1393, 1966.
- DINIZ, E.; SILVA, C. L.; MUNIZ, M. B.; QUEIROGA, V. P.; BRUNO, R. L. A. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* l.) armazenadas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.3, n.1, p. 61-72, 2001.
- DORNER, J. W. Management and prevention of mycotoxins in peanuts. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 25, p. 203–208, 2008.
- EHLICH, K. C.; YU, J.; COTTY, P. J. Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking region. **J. Appl. Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 518-527, 2005.



ELMASRY, G.; RADWAN, S.; ELAMIR, M.; ELGAMAL, R. Investigating the effect of moisture content on some properties of peanut by aid of digital image analysis. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 87, p. 273–281, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. rev. e atual. Rio de Janeiro, 1997.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - ALGODÃO (EMBRAPA - ALGODÃO). **Manual de boas práticas agrícolas para a produção do amendoim no Nordeste do Brasil**. Campina Grande, 2008. (Documentos, 207).

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Commission of the European Communities. Regulation (EC) no 2073/2005 of November 15, 2005 on the microbiological criteria applicable to foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, [s. l.], 22. Dec. 2005. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32005R2073>>. Acesso em: 6 jan. 2015.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Commission Regulation (ER) Nº 165/2010, of 26 February 2010: regulation (EC) Nº 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. **Official Journal of the European Union**, [s. l.], 27. Feb. 2010. Disponível em: <[https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg165\\_2010.pdf](https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg165_2010.pdf)>. Acesso em: 6 jan. 2015.

FAZOLIN, M.; COSTA, C. R.; DAMACENO, J. E. O.; ALBUQUERQUE, E. S.; CAVALCANTE, A. S. S.; ESTRELA, J. L. V. Fumigação de milho para o controle do gorgulho utilizando caule de *Tanaecium nocturnum* (Bignoniaceae). **Pesquisa Agropecuárias Brasileira**, Brasília, v.45, n.1, p.1-6, jan. 2010.

FERNANDES, P. C.; FACANALI, R; TEIXEIRA, J. P. F; FURLANI, P. R; MARQUES, M. O. M. Cultivo de manjeriço em hidroponia e em diferentes substratos sob ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 260-264, 2004.

FERQUÍMICA. **Produtos: óleos essenciais**. Vargem Grande Paulista, 2015. Disponível em: <[http://www.ferquima.com.br/o\\_essenciais.html](http://www.ferquima.com.br/o_essenciais.html)>. Acesso em: 2 mar. 2015.

FICHI, G.; FLAMINI, G.; ZARALLI, L. J.; PERRUCCI, S. Efficacy of an essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* against *Psoroptes cuniculi*. **Phytomedicine**, Jena, v. 14, p. 227-231, 2007.

FLÁVIO, N. S. D. S.; SALES, N. L. P.; AQUINO, C. F.; SOARES, E. P. S.; AQUINO, L. F. S.; CATÃO, H. C. R. M. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de sorgo tratadas com extratos aquosos e óleos essenciais. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 7-20, jan./fev. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO). **Worldwide regulations for micotoxins in food and in feed in 2003**. (Food and Nutrition, Paper-81). Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e07.htm>>. Acesso em: 5 jan. 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO) **FAO Stat.** Rome, 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/statistics/en>>. Acesso em: 27 dez. 2014.

FONSECA H. **Prevenção e controle de micotoxinas em produtos agrícolas.** Boletim Técnico, Piracicaba, n. 7. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br>>. Acesso em: 27 jan. 2015.

FONSECA, C. F.; STAMFORD, T. L. M.; ANDRADE, S. A. C.; SOUZA, E. L.; SILVA, C. G. M. Hygienic-sanitary working practices and implementation of a Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) plan in lobster processing industries. **Food Sci. Technol**, Campinas, v. 33, n. 1, p. 127-136, 2013.

FRAIFE-FILHO, G. A.; CÉSAR, J. O.; RAMOS, J. V. B. **Cravo-da-índia.** Ilhéus: CEPLAC, 2005. (Radar Técnico). Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar.htm>>. Acesso em: 14 set. 2012.

FRANCO, D.A.; BETTIOL, W. Controle de *Penicillium digitatum* em pós-colheita de citrus com produtos alternativos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p 602-606, 2000.

FREIRE, J. M. **Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: caracterização química e atividade biológica sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.** Dissertação Mestrado em Agroquímica – 68 f., Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, 8 março 2008.

GASPERINI, A. M. **Efeito de óleos essenciais sobre o crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*.** Tese de mestrado de Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, 24 agosto 2014.

GINTING E.; RAHMIANNA A. A. Infection of *Aspergillus flavus* and physical quality of peanuts collected from farmers, local markets, and processors. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD AND AGRO-BIODIVERSITY (ISFA 2014), 2014, Semarang, Central Java, Indonésia. **Procedia Food Science**, London, v. 3, n.1, p. 280-288, 2015.

GIRARD, E. A., KOEHLER, H. S.; PÉLLICO NETTO, S. Volume, biomassa e rendimento de óleos essenciais do craveiro *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) landrum). **Rev. Acad.**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 147-165, abr./jun. 2007.

GMS COMÉRCIO DE ESPECIARIAS E CONDIMENTOS LTDA. **Produtos:** lista de preços. Barueri, 2015. Disponível em: <<http://www.gmsalimentos.com.br>>. Acesso em: 23 mar. 2015.

GONÇALEZ, E., NOGUEIRA, J.H.C, FONSECA, H., FELICIO, J. D., PINO, F. A. C & CORRÊA, B. D. Mycobiota and mycotoxins in Brazilian peanut kernels from sowing to

harvest. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 123, p. 184–190, 2008.

GONÇALEZ, E.; SILVA, J. L.; REIS T. A. D.; NAKAI V. K.; FELICIO J. D.; CORRÊA B. Production of aflatoxin and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* strains isolate from peanuts. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.80, n.3, p. 312-317, 2013.

GORAYEB, T. C. C. **Avaliação das condições críticas para o surgimento de aflatoxina na cadeia de processamento de amendoim (*Arachis Hypogaea* L.)** 2007. 154 f. Dissertação (Mestrado Engenharia de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2007.

GORAYEB, T.C.C., CASCIATORI, F.P., DEL BIANCHI, V.L.; THOMEO, J.C. HACCP plan proposal for a typical brazilian peanut processing company. **Food Control**, Guildford, v. 20, p. 671–676, 2009.

GOULART A. M. C. **Coletar de amostras para análise de nematoides: recomendações gerais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2009.

GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 19, n 3, p. 241-247, 2009.

GRAJALES AGUDELO, L. M. **Desenvolvimento de um biorreator rotativo para produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido**. 2014. 148 f. Dissertação (Doutorado em engenharia de alimentos - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2014.

HALL, C. W. **Drying and storage of agricultural crops**. Westport: AVI Publishing Company, 1980.

HANEL, H; RAETHER, W. A more sophisticated method of determining the fungicidal effect of water-insoluble preparations with a cell harvester, using miconazole as an example. **Mycoses**, Berlin, v. 31, p.148–154, 1988.

HENDERSON, S. M.; PABIS, S. Grain drying theory: I.Temperature effect on drying coefficient. **Journal of Agricultural Engineering Research**, London, v. 6, n. 3, p.169-174, 1961.

HEMA, R.; KUMARAVEL, S.; SIVASUBRAMANIAN, C. Antimicrobial Activity of Some of the Indian Spices against Food Borne Pathogens. **New York Science Journal**, Brooklyn, v. 3, n. 11, p. 191-193, 2010.

HOFFMANN, F. L.; SOUZA, S. J. F.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VINTURIM, T. M.; DUTRA, A. L. Determinação da atividade antimicrobiana "in vitro" de quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 11-20, jan./jun.1999.

HORN, B. W.; DORNER, J. W.; GREENE, R. L.; BLANKENSHIP, P. D.; COLER, R. J.

Effect of *Aspergillus parasiticus* soil inoculum on invasion of peanuts seeds. **Mycopathol.**, Den Haag, v. 125, p. 179-191, 1994.

HORN, B. W.; GREENE, R. L.; SORENSEN, R. B.; BLANKENSHIP, P. D.; DORNER, J. W. Conidial movement of nontoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in peanut fields following application to soil. **Mycopathology**, Den Haag, v. 151, p. 81-92, 2000.

HUBKA, V.; KOLARÍK, M.; KUBÁTOVÁ, A.; PETERSON, S. W. Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*. **Mycologia**, New York, v. 105, n. 4, p. 912-37, 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo: IMESP, 2008. v. 1, p. 98-99.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS (IAC). **Prevenção da aflatoxina no amendoim**. Boletim, p. 22, 2001.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS (IAC). **Centro de grãos e fibras: cultivares – amendoim**. Campinas, 2015. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/graos/amendoim.php>>. Acesso em: 6 jan. 2015.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene In monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **IARC**, Lyon, v. 82, p. 301-366, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Estatística da produção agrícola**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/2013/estProdAgr\\_201302.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/2013/estProdAgr_201302.pdf)>. Acesso em: 2 jan. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, v. 29, n. 2, p.1-83, fev. 2015. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa>>. Acesso em: 2 abr. 2015.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA (IEA). **Análises e indicadores do agronegócio**. São Paulo, v. 6, n. 11, nov. 2011. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br>>. Acesso em: 27 dez. 2014.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA (IEA). **Análises e Indicadores do agronegócio**. São Paulo, v. 9, n. 6, jun. 2014. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br>>. Acesso em: 27 dez. 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Orientação sobre validação de métodos analíticos**: documento de caráter orientativo: DOQ – CGCRE – 008 – Revisão 04 – Jul. p. 20, (2011).

JABOTICABAL – SP. [Mountain View]: Google, c2015. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/place/Jaboticabal+-+SP>>. Acesso em: 30 mar. 2015.

JHAM, G. N.; DHINGRA, O. D.; JARDIM, C. M. ; VALENTE, V. M. Identification of the major fungitoxic component of *cinnamon* bark oil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 404-408, 2005.

JORGE, A. C. **Perdas no arranquio mecanizado do amendoim em função da velocidade, espaçamento entre hastes e profundidade de arranquio.** p.35, 2008. Monografia (Graduação em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual Maringá, 2008. Maringá.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K. A.; SILVA, D. B.; GRACINDO, L. A. M.; VIEIRA, R. F. Avaliação agrônômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown] - quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Rev. Bras. Plantas Med.**, Botucatu, v.13, n.3, p.258-264, 2011.

KESTER, A. N.; RESENDE, O.; SILVA, G. P.; OLIVEIRA, D. E .C.; BESSA, J. F. V.; ULLMANN, R. Cinética de secagem de grãos de soja. **In: I Congresso de Pesquisa e Pós-Graduação do Câmpus Rio Verde do IF Goiano**, 2012.

KIPLE, K. F.; ORNELAS, K. C. **The Cambridge world history of food.** Cambridge: Cambridge University Press, 1999. v. 2.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPES, J. A. **Dictionary of fungi.** 10th ed. United Kingdom: Cabi Europe, 771, 2008.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; GODOY, R. L. O; LOPES, D; MORSBACH, N. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* presl) cultivada no Paraná. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.17, n. 3, set./dez. 1997.

KRZYZANOWSKI, F. C.; WEST S. H.; FRANÇA NETO J. B. Drying peanut seed using air ambient temperature at low relative humidity. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 3, p.1-5, 2006.

LEAL, T. C. A. B.; FREITAS S. P.; SILVA J. F., BRAZ-FILHO R. Extração laboratorial simplificada de óleo de capim cidreira extraído por arraste de vapor. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 48, p. 717-722, 2001.

LEWIS W. K. The rate of drying of solid materials. **Ind. Eng. Chem.**, Washington, v.13, p. 423, 1921.

LEWIS, L.; ONSONGO, M.; NJAPAU, H.; SCHURZ-ROGERS, H.; LUBER, G.; KIESZAK, S.; NYAMONGO, J.; BACKER, L.; DAHIYE, A.; MISORE, A.; DECOCK, K., RUBIN, C. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in Eastern and central Kenya. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 113, p. 1762 -1767, 2005.

- LIMA, C. Q.; ALMEIDA, F. A. C.; ARAÚJO, E.; SILVA, J. F.; MORAES A. M.; MEDEIROS, D. S. Bioatividade de extratos e óleos vegetais no controle *in vitro* de *Aspergillus flavus* em sementes de amendoim. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v.6, n.1, p.13-18, mar. 2012.
- LINDER, M. B.; SZILVAY, G. R.; NAKARI-SETALA, T.; PENTTILA, M. E. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 877–96, 2005.
- LOURENZANI, W. L.; LOURENZANI, A. E. B. S. Potencialidades do agronegócio brasileiro de amendoim. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, v. 44, 2006, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Sober, 2006.
- LORENZI H; MATOS F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- LUDWIG, M. P.; LUCCA FILHO, O. A.; BAUDET, L.; DUTRA, L. M. C.; AVELAR, S. A. G.; CRIZEL, R. L.; OLIVEIRA, S. Eficiência do recobrimento de sementes de soja em equipamento com sistema de aspersão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 4, p. 557-563, abr. 2011.
- MALAGOLLI, G. A.; ASCANIO, E. A importância da armazenagem para a logística agroindustrial: o caso do amendoim brasileiro. **Interface Tecnológica**, Taquaritinga, v. 4, n.1, p. 73-83, 2007.
- MANSO, S.; CACHO-NERIN, A. F.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. **Food Control**, Guildford, v. 30, p. 370 – 378, 2013.
- MANUAL de Boas Práticas Agrícolas e Sistema APPCC. Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004. 101 p. (Série: **Qualidade e Segurança dos Alimentos**).
- MARCO, C. A. et al. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 3, p. 429- 432, 2007.
- MARTINAZZO, A. P.; MELO, E. C.; CORRÊA, P. C.; SANTOS R. H. S. Modelagem matemática e parâmetros qualitativos da secagem de folhas de capim limão *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 12, n. 4, p. 488-498, 2010.
- MARTÍNEZ-CAMACHO, A. P.; CORTEZ-ROCHA, M.O.; EZQUERRA-BRAUERA, J. M.; GRACIANO-VERDUGO, A. Z.; RODRIGUEZ-FÉLIX F.; CASTILLO-ORTEGA, M. M.; YÉPIZ-GÓMEZ, M. S.; PLASCENIA-JATOMEA M. Chitosan composite films: thermal, structural, mechanical and antifungal properties, **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 82, p. 305–315, 2010.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; EVANGELISTA, D. J. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, p. 220, 2002.

MARTINS, R.; VICENTE J. R. **Inovação: demandas na cadeia de produção do amendoim paulista**. Trabalho apresentado no 48º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural Campo Grande, 25 a 28 de julho de 2010, v. 40, n. 5, p. 12, maio 2010.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasil. Bot., São Paulo**, v. 26, n. 2, p. 231-238, jun. 2003.

MENGAL, B. **Efeito dos óleos essenciais de diferentes espécies de *Eucalyptus spp* sobre a microflora do milho em pós-colheita**. 2010. n.f.111. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Local, 2010.

MINITAB. Minitab 16 Statistical Software. **Minitab Single-User Licensing Utility**. Pensilvânia, *United States of America*. (EUA), 2015. Disponível em: <<http://minitab.en.softonic.com/relatedsearches>>. Acesso em: 15 abr. 2015.

MITCHELL, T. C.; STAMFORD, T. L. M.; SOUZA, E. L.; LIMA, E. O; CARMO, E. S. *Origanum vulgare* L. essential oil as inhibitor of potentially toxigenic *Aspergilli*. **Ciênc. Technol. Aliment.**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 755-760, jul./set. 2010.

MORAES, S. A. de. **Amendoim**: principais doenças, manejo integrado e recomendações de controle. Infobibos: [s. l.], 2006. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2006\\_2/amendoim/Index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/amendoim/Index.htm)>. Acesso em: 8 mar. 2015.

MORSBACH, N. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. **(IAPAR)**, Paraná. 1997.

MORVAN, Y. Filière de production: fondamentes d'économie industrielle. **Paris: Economica**, 1985.

MYTLE, N.; ANDERSON, G. L.; DOYLE, M. P.; SMITH, M. A. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. **Food Control**, Guildford, v. 17, p. 102-107, Feb. 2004.

NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS (NACMCF). Hazard analysis and critical control point principles and application guidelines. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, p. 762-775, 1998.

NAKAI, V. K.; ROCHA, L. O.; GONÇALEZ, E.; FONSECA, H.; ORTEGA, E. M. M.; CORRÊA, B. Distribution of fungi and aflatoxin in a stored peanut variety. **Food Chemistry**, London, v. 106, p. 285-290, 2008.

NETO J. F.; COSTA C. H. M.; CASTRO G. S. A. Ecofisiologia do amendoim. **Scientia Agraria Paranaensis.**, Marechal Cândido Rondon – Paraná- Brasil v. 11, n. 4, p.1-13, 2012.

OLIVEIRA, C. A. F; GONÇALVES, N. B.; ROSIM, R. E.; FERNANDES, A. M. Determination of aflatoxins in peanut products in the northeast region of São Paulo, Brazil. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 10, n. 1, p. 174-183, Jan. 2009 a.

OLIVEIRA, R. A.; REIS, T. V.; SACRAMENTO, C. K.; DUARTE L. P.; OLIVEIRA, F. F. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 771-775, Jul./Sept. 2009 b.

OOTANI, M. A.; AGUIAR, R. W.; RAMOS, A. C. C.; BRITO, D. R.; SILVA, J. B.; CAJAZEIRA J. P. Use of Essential Oils in Agriculture. **J. Biotec. Biodivers.**, Gurupi, v. 4, n. 2, p. 162-175, May 2013.

PAGE, C. **Factors Influencing the Maximum Rate of Drying Shelled Corn in Layers.** West Lafayette, MSc Thesis, Purdue University. 1949.

PAYNE, G. A.; BROWN, M. P. Genetics e physiology do biosynthesis da aflatoxina. **Review Annual of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 329-62, 1998.

PARK, K. J.; ANTONIO, G. C.; OLIVEIRA, R.A.; PARK, K.J.B. **Conceitos de processo e equipamentos de secagem.** p. 157 Livre Docência em Fenômenos de Transporte DEA - FEA - CT&EA – UNICAMP, Campinas, Março de 2007. Disponível em: [http://www.feagri.unicamp.br/ctea/manuais/concproceqsec\\_07.pdf](http://www.feagri.unicamp.br/ctea/manuais/concproceqsec_07.pdf) Acesso em: 26 maio 2015.

PASSONE, M. A.; ROSSO, L. C.; CIANCIO, A.; ETCHEVERRY, M. Detection and quantification of *Aspergillus* section Flavi spp. in stored peanuts by real-time PCR of nor-1 gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 138, p. 276–281, 2010.

PASSONE, M.A., GIRARDI, N. S., FERRAND C.A. , ETCHEVERRY, M. Invitro evaluation of five essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored peanuts from *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* contamination. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 70, p. 82 – 88, 2012.

PAWAR, V. C.; THAKER, V. S. **Mycoses.** Rajkot: Saurashtra University, Department of Biosciences, v. 49, p. 316, 2006.

PELCZAR JUNIOR, J. M. **Microbiologia:** conceitos e aplicações. Tradução de Sueli Fumie Yamada; Tania Ueda Nakamura; Benedito Prado Dias Filho. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

PEREIRA, K. C.; SANTOS, C. F. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas**, Agrárias e da Saúde. Valinhos, v. 15, Nº. 4, p. 147-165, 2011.

PEREIRA, M. C. **Efeito da adição de condimentos no controle de micro-**



**organismos, na conservação de produtos de panificação e na inibição de metabólitos produzidos por fungos associados ao café.** 2001. n. f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Instituto ou Faculdade... Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

PEREIRA, M. M. G; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus* Link e *Aspergillus parasiticus*. Boletim **CEPPA**, Curitiba, v. 20, n.1, p.141-156, jan./jun. 2002.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N.; PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 731-738, jul./ago. 2006.

PINTO, N. F. J. A.; PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S. Proteção química e biológica de grãos de milho úmidos contra fungos de armazenagem e produção de aflatoxinas. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.4, n.2, p.172-179, 2005.

PINTO, N. F. J. A. Tratamento químico de grãos de sorgo úmidos visando o controle de fungos de armazenagem. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 26, n. 2, p. 55-59, 2001.

PINTO, N. F. J. A. Preservação da qualidade sanitária de grãos úmidos de milho através do controle químico da atividade fúngica. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 159-164, 2004.

PINTO, N. F. J. A.; PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S. Proteção química e biológica de grãos de milho úmidos contra fungos de armazenagem e produção de aflatoxinas. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.4, n.2, p.172-179, 2005.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Aspergillus* and related teleomorphs. In: \_\_\_\_\_. **Fungi and food spoilage**. London: Chapman & Hall, 1997. p. 339-416.

PRINS, C. L.; LEMOS, C. S.; FREITAS, S. P. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 92-95, 2006.

PRADO, G.; MATTOS, S. V. M.; PEREIRA, E. C. Efeito da umidade relativa na contaminação microbiana e produção de aflatoxinas em amendoim em grão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 11, n. 2, p. 264-273, 1991.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; LIMA, A. S.; MOREIRA, A. P. A. Occurrence of aflatoxin M1 in parmesan cheese consumed in Minas Gerais, Brazil. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.6, nov./dez. 2008.

PRASHAR, A.; LOCKE, I. C.; EVANS, C. S. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. **Cell Prolif.**, Oxford, v. 39, p. 221 -229, Jun. 2006.

PRINS, C. L.; PAIVA, F. S. D.; CAMPOSTRINI, E.; AMARAL, G. G. D.; OLIVEIRA, R. F. D. Efeitos de confinamento do sistema radicular sobre capim-limão (*Cymbopogon citratus*). **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 39, n. 3, p. 416-421, 2008.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C. M. **Tecnologia farmacêutica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

QUATTARA, B.; SIMARD, R. E.; HOLLEY, R. A.; PIETTE, G. J. P.; BEGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 37, p. 155-162, 1997.

QUEIROZ, D.M.; PEREIRA, J.A.M.; MELO, E.C. **Modelos Matemáticos de Simulação de Secagem de Grãos**. Viçosa: Centro Nacional de Treinamento em Armazenagem, p. 59, 1985.

RADÜNZ, L. L.; MEL E. C.; BERBERT P. A.; GRANDI A. M.; ROCHA R.P. Efeito da temperatura de secagem na quantidade e qualidade do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA (CONBEA), 30. 2001. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2001.

RAINA, V.K., SRIVASTAVA, S.K., AGGARWAL, K.K., SYAMASUNDAR, K.V. & KUMAR, S. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. **Flavour Fragrance Journal**, v. 16, n. 5, p. 334-336, 2001.

RANA, I. S.; RANA, A. S.; RAJAK, R. C. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 1269-1277, 2011.

RAUBER, C. S.; PALMA, E. C.; LIMBERGER, R. P.; APEL, M.; HENRIQUES, A.; SCHA-POVAL, E. E. Avaliação da estabilidade do óleo volátil de *Cymbopogon citratus*. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE LATINO-AMERICANA DE FITOQUÍMICA, n.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE FARMACOBOTÂNICA, 3, 1999, Local. **Anais...** Gramado; Porto Alegre: Metrópole, 1999.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2003. p. 43-74.

REIS G. M. **Variabilidade genética de cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim**. P. 113, 2009 (Dissertação de Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

RESENDE, O.; CORRÊA, P. C.; GONELI, A. L. D.; BOTELHO, F. M.; RODRIGUES, S. Modelagem matemática do processo de secagem de duas variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 10, n. 1, p. 17-28, 2008.

- RESNIK, S. L.; CHERIFE, J. Proposed theoretical water activity values at various temperatures for selected solutions to be used as reference sources in the range of microbial growth. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 51, n. 5, p. 419-423, May 1988.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997.
- ROLLER, S; COVILL, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 47, n. 1-2, p. 67-77, 1999.
- RIBEIRO-FURTINI, L. L.; ABREU, L. R. Utilização de APPCC na indústria de alimentos. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 358-363, mar./abr. 2006.
- SABINO, M. Normas e níveis de tolerância de micotoxinas no Brasil, no MERCOSUL e no mundo. In: SIMPÓSIO SOBRE MICOTOXINAS EM GRÃOS. 1999, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Fundação Cargil, 1999. p.183-192.
- SACRAMENTO, C. K.; CASALI B. L.; PEREIRA, E. C. Growing spices in Brazil. **Pepper News**, Jakarta. P. 60-70, 2001.
- SANDERS, T. H.; BLANKENSHIP, P. D.; COLE R. J.; HILL, R. A. Effect of soil temperature and drought on peanut pod and stem temperatures relative to *Aspergillus flavus* invasion and aflatoxin contamination. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 86, p. 51-54, 1984.
- SANTOS, C.C.M. dos; LOPES, M. do R. V.; KOSSEKI, S. Y. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto/SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 153-157, 2001.
- SANTOS, F. S.; SOUZA, P. E.; REZENDE, M. L. V. Efeito de extratos no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 59-63, 2007.
- SANTOS, F.; MEDINA, P. F.; LOURENÇÃO, A. L.; PARISI, J. J. D.; GODOY, I. J. Qualidade de sementes de amendoim armazenadas no estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 3, p. 310-317, 2013.
- SCALCO, A. R.; MACHADO, J. C. F.; QUEIROZ, T. R. Diagnóstico da gestão da qualidade na cadeia produtiva do amendoim: estudo de casos. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL (SOBER), 46. 2008, Rio Branco. **Anais...** Tupã: Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental de Tupã; CEPEAGRO, 2008. p. 21.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. da S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 1/2, p. 129-137, jun./dez. 2000.

SEGATO, S. V.; PENARIOL, A. L. A cultura do amendoim em áreas de reforma de canavial. In: SEGATO, S. V.; FERNANDES, C.; SENE PINTO, A. de. **Expansão e renovação de canavial**. Piracicaba: Editora CP 2, 2007. p. 85-116.

SENHAJI, O.; FAID, M.; KALALOU, I. Inactivation of *Escherichia coli* O1557:H7 by essential oil from *Cinnamomum zeylanicum*. **Brasilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 11, n. 2, p. 234-236, 2007.

SHARVERDH, A. R.; MONSEF-ESPAHANI, H. R.; TAVASOLI, F.; ZAHERI, A.; MIRJANI, R. Trans-cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* Bark essential oil reduces the clindamycin resistance of *Clostridium difficile* in vitro. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 1, p. 55-58, 2007.

SHUKLA, R.; KUMAR, A.; SINGH, P.; DUBEY, N. K. Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 135, p. 165-170, 2009.

SILVA, S. R. S.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; ANDRADE, N. J.; NASCIMENTO, E. A.; PINHEIRO, A. L. Análise de constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n., p. 63-70, 2003.

SILVA, R. A.; FERREIRA, L. OSHI; STANCARI, R. C. A. Incidência de aflatoxinas em amendoim e derivados comercializados nas regiões de Assis, Bauru e Marília, em São Paulo, no período de 2002 a 2012. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 34-36, 2013.

SIMIÉ, A.; SOKOVIÉ, M. D.; RISTIÉ, M.; GRUJIÉ-JOVANOVIC, S.; VUKOJEVIÉ, J.; MARIN, P. D. The chemical composition of some *Lauraceae* essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research**, London, v. 18, n., p. 713-717, 2004.

SIMKO, P. Factors affecting elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked meat foods and liquid smoke flavorings. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 49, n., p. 637- 647, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2003. p. 467-495.

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO E.; NASCIMENTO L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatol. Bras.**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 465- 471, nov./dez. 2007.

SOUZA, N. A. B. **Possíveis mecanismos de atividade antifúngica de óleos essenciais contra fungos patogênicos**. 2010. 150 f. Tese (Doutorado em Produtos naturais e sintéticos bioativos) – Farmacologia, Universidade Federal da Paraíba, Cidade, 2010.

SOUZA, G. F.; MOSSINI, S. A. G.; ARROTÉIA, C. C.; KEMMELMEIER, C. E.; MACHINSKI, M. J. Evaluation of the mycoflora and aflatoxins from the pre-harvest to

storage of peanuts: a case study. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 1, p. 27-33, jan./mar. 2014.

SOUZA, R. H. F. V. **Síntese, caracterização e estudo de derivados anfílicos de quitosana: estudo *in vitro* contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*** /Ricchard Hallan Félix Viegas de Souza. Dissertação de mestrado:Química ambiental. Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho” UNESP – 18 janeiro de 2013, São José do Rio Preto, 75 f., 2013.

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. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 685-690, maio/jun. 2004.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.11, p. 16-21, 1999.

STROKA, J.; ANKLAM, E. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 83, p. 320-340, 2000.

SUASSUNA, T. M. F.; SUASSUNA, N. D.; ALMEIDA, R. P.; FONSECA, H. **Segurança e qualidade na produção primária do amendoim**. Campina Grande: Embrapa Algodão. Circular Técnica, 88, 22 p., 2005.

SWANSON, K. M.; BUSTA, F. F.; PETERSON, E. H.; JOHNSON, M. G. Colony count methods. In: VANDEZANT, C.; SPLITTOESSER, D. S. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. New York: American Public Health Association, 1992.

TATSAKJIEU, N. L.; JAZET DONGMO, P. M.; NGASSOUM, M. B.; ETOA, F. X.; MBOFUNG, C. M. F. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 2, p. 161-166, 2009.

TASSO, J. L. C.; MARQUES, M. O.; NOGUEIRA, G. A. **A cultura do amendoim**. Jaboticabal: Funep, 2004. 218 p.

TOREGEANI-MENDES, K. A.; ARROTEIA, C. C.; KEMMELMEIER, C.; DALPASQUALE, V. A.; BANDO, E.; ALVES, A. F.; MARQUES, O. J.; NISHIYAMA, P.; MOSSINI, S. A. G.; MACHINSKI, M. J. Application of hazard analysis critical control points system for the control of aflatoxins in the brazilian groundnut-based food industry. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 46, n., p. 2611–2618, 2011.

TRIPATHI, N. N.; KUMAR, N. *Putranjiva roxburghii* oil: a potential herbal preservative for peanuts during storage. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 43, n., p. 435-442, 2007.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Good manufacturing practices and industry best practices for peanut product manufacturers**. American Peanut Council. Commodity Requirements PP11 - Peanut Products for use in Domestic Programs 5/15/08. 1500 King Street, Suite 301. Alexandria, Virginia, Estados Unidos das Américas. Revised October, 2009.

VALLE, S. O. R.; FRANÇA, A. T. Aspergilose broncopulmonar alérgica: panorama atual. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 2, p. 62-71, 2008.

VAZQUEZ, B. I.; FENTE, C.; FRANCO, C. M.; VAZQUEZ, M. J.; CEPEDA, A.; Inhibitory effect of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* stains in culture media and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 67, p. 157-163, 2001.

VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; CONUS, L. A.; PONTIM, B. C. A.; BERGAMIN, A. C. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

VICAM. **Análise de micotoxina. AflaTest-WB**. Paulínia: Solcampo, [2015]. Marca registrada de VICAM LP, c1993, distribuído no Brasil por Solcampo. Disponível em: <<http://www.solcampo.com.br/Aflatest-WB.htm>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

VIEGAS, E. C.; SOARES, A.; CARMO, M. G. F.; ROSSETTO, C. A. V. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 915-919, out./dez. 2005.

VIEIRA, R.F., SILVA, A.A., RAMOS, M.M. Aplicação de herbicidas pós-emergentes via irrigação por aspersão – revisão. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.21, n.3, p.495-506, 2003.

ZORZETE, P.; REIS, T. A.; FELICIO, J. D.; BAQUIÃO, A. C.; MAKIMOTO, P.; CORREA, B. Fungi, mycotoxins and phytoalexin in peanut varieties, during plant growth in the field. **Food Chemistry**, Barking, v. 129, n., p. 957-964, 2011.

ZORZETE, P. ; BAQUIÃO, A. C.; ATAYDE, D. D.; REIS, T. A.; GONÇALEZ, E.; CORREA, B. Mycobiota, aflatoxins and cyclopiazonic acid in stored peanut cultivars. **Food Research International**, Essex, v. 52, p. 380-386, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Thematic Reference Group on Environment, Agriculture and Infectious Diseases of Poverty (TRG 4), 2008–2010**. Geneva: WHO Press, 2013. p. 125. Disponível em: <<http://www.who.int/bookorders>>. Acesso em: 17 jan. 2015.

## **APÊNDICES**

---

*Teresa Cristina Castilho Gorayeb*

**APÊNDICE DO CAPÍTULO 1:**

**APÊNDICE A1** – Análise de variância (ANOVA) das médias das umidades dos solos coletados nas etapas da colheita e pós-colheita na região de Jaboticabal – SP.

| Fonte da variação | SQ          | GL | MQ          | F          | Valor-P  | F crítico |
|-------------------|-------------|----|-------------|------------|----------|-----------|
| Entre as Safras   | 283,6058966 | 2  | 141,8029483 | 6,96708271 | 0,027268 | 5,143253  |
| Resíduo           | 122,1196483 | 6  | 20,35327471 |            |          |           |
| Total             | 405,7255449 | 8  |             |            |          |           |

**APÊNDICE A2** – Análise de variância (ANOVA) das médias das unidades formadoras de colônias de fungos nos solos coletados nas etapas da colheita e pós-colheita nas safras na região de Jaboticabal – SP.

| Fonte da variação | SQ       | GL | MQ       | F        | valor-P  | F crítico |
|-------------------|----------|----|----------|----------|----------|-----------|
| Entre as safras   | 9,480956 | 2  | 4,740478 | 7,731981 | 0,021844 | 5,143253  |
| Resíduo           | 3,6786   | 6  | 0,6131   |          |          |           |
| Total             | 13,15956 | 8  |          |          |          |           |

**APÊNDICE A3** – Análise de variância (ANOVA) das médias das umidades das vagens de amendoim coletados nas etapas da colheita e pós-colheita nas safras na região de Jaboticabal – SP.

| Fontes de variação | SQ         | GL | MQ        | F        |
|--------------------|------------|----|-----------|----------|
| Safras (S)         | 250,7872   | 2  | 125,3936  | 1,2825   |
| Resíduo (a)        | 586,6236   | 6  | 97,7706   |          |
| Parcelas           | 837,4107   | 8  |           |          |
| Etapas (E)         | 21083,1371 | 5  | 4216,6274 | 120,4713 |
| Interação S x E    | 610,1355   | 10 | 61,0135   | 1,7432   |
| Resíduo (b)        | 1050,0329  | 30 | 35,0011   |          |
| Total              | 23580,7161 | 53 |           |          |

**APÊNDICE A4** – Análise de variância (ANOVA) das médias das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g) das vagens de amendoim coletados nas etapas da colheita e pós-colheita nas safras na região de Jaboticabal – SP.



| <b>ANOVA da média das UFC/g nas etapas e safras.</b> |           |           |           |          |
|--|-----------|-----------|-----------|----------|
| <b>Fontes de variação</b>                            | <b>SQ</b> | <b>GL</b> | <b>QM</b> | <b>F</b> |
| <b>Safras (S)</b>                                    | 20,52     | 2         | 10,26     | 12,14    |
| <b>Resíduo (a)</b>                                   | 5,07      | 6         | 0,85      |          |
| <b>Parcelas</b>                                      | 25,59     | 8         |           |          |
| <b>Etapas (E)</b>                                    | 10,92     | 5         | 2,18      | 3,49     |
| <b>Interação S x E</b>                               | 17,75     | 10        | 1,78      | 2,84     |
| <b>Resíduo (b)</b>                                   | 18,78     | 30        | 0,63      |          |
| <b>Total</b>   | 73,05     | 53        |           |          |

### **APÊNDICE DO CAPÍTULO 2:**

**APÊNDICE B1** – Análise de variância (ANOVA) das médias da inibição do crescimento micelial (mm) do *Aspergillus flavus* L. com a aplicação de extratos aquosos das plantas.

| <b>Fontes de variação</b> | <b>GL</b> | <b>SQ</b> | <b>QM</b> | <b>F</b> |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| <b>Extrato Aq (EA)</b>    | 4         | 709,6     | 177,4     | 4,10     |
| <b>Resíduo (a)</b>        | 10        | 432,8     | 43,3      | -        |
| <b>Parcelas</b>           | 14        | 1142,4    | -         | -        |
| <b>Concentrações (C)</b>  | 3         | 10126,2   | 3375,4    | 91,02    |
| <b>Interação EA x C</b>   | 12        | 1508,6    | 125,7     | 3,39     |
| <b>Resíduo (b)</b>        | 30        | 1112,5    | 37,1      | -        |
| <b>Total</b>              | 59        | 13889,7   | 235,4     | -        |

**APÊNDICE B2** – Análise de variância (ANOVA) das médias da inibição do crescimento micelial (mm) do *Aspergillus flavus* L. com a aplicação de extratos alcoólicos das plantas.

| Fontes de variação | GL | SQ      | QM     | F      |
|--------------------|----|---------|--------|--------|
| Extratos Alc (EA)  | 4  | 262,4   | 65,6   | 4,06   |
| Resíduo (a)        | 10 | 161,7   | 16,2   | -      |
| Parcelas           | 14 | 424,1   | -      | -      |
| Concentrações (C)  | 3  | 11861,2 | 3953,7 | 135,66 |
| Interação EA x C   | 12 | 1764,0  | 147,0  | 5,04   |
| Resíduo (b)        | 30 | 874,3   | 29,1   | -      |
| Total              | 59 | 14923,6 | 252,9  | -      |

**APÊNDICE B3** – Análise de variância (ANOVA) das médias da inibição do crescimento micelial (mm) do *Aspergillus flavus* L. com a aplicação dos óleos essenciais das plantas.

| Fonte de variação | GL  | SQ      | QM      | F      |
|-------------------|-----|---------|---------|--------|
| Óleos (O)         | 4   | 13130,9 | 3282,7  | 249,95 |
| Resíduo (a)       | 10  | 131,3   | 13,1    | -      |
| Parcelas          | 14  | 13262,2 | -       | -      |
| Concentrações (C) | 6   | 66371,8 | 11062,0 | 847,30 |
| Interação O x C   | 24  | 10596,8 | 441,5   | 33,82  |
| Resíduo (b)       | 60  | 783,3   | 13,1    | -      |
| Total             | 104 | 91014,2 | 875,1   | -      |

**APÊNDICE B4** – Análise de variância (ANOVA) das médias da inibição do *Aspergillus flavus* em vagens de amendoim por óleos essenciais de canela, cravo e cidreira de Unidade Formadora de Colônia (log UFC/g).

| Fontes de variação | GL | SQ      | QM     | F    | valor-P |
|--------------------|----|---------|--------|------|---------|
| Óleos              | 2  | 2,024   | 1,012  | 0,27 | 0,766   |
| Concentrações      | 3  | 94,64   | 31,547 | 8,49 | 0,003   |
| O*C                | 6  | 15,417  | 2,57   | 0,69 | 0,661   |
| Resíduo            | 12 | 44,591  | 3,716  |      |         |
| Total              | 23 | 156,672 |        |      |         |

**APÊNDICE DO CAPÍTULO 3:**

**APÊNDICE C1** - Análise de variância (ANOVA) dos resultados da inibição da contaminação fúngica de origem em vagens de amendoim por óleo essencial de canela armazenados em umidade controlada por 30 dias.

| Fonte da variação | GL | SQ      | QM       | F        | valor-P  | F crítico |
|-------------------|----|---------|----------|----------|----------|-----------|
| Óleo              | 2  | 24,3440 | 12,17203 | 1,858471 | 0,268676 | 6,944272  |
| Concentrações     | 2  | 34,5614 | 17,28072 | 2,638484 | 0,185912 | 6,944272  |
| Resíduo           | 4  | 26,1979 | 6,549488 |          |          |           |
| Total             | 8  | 85,1034 |          |          |          |           |

**APÊNDICE C2** - Análise de variância (ANOVA) das médias da umidade das vagens de amendoim aspergidas por óleo essencial de canela, secas em camada espessa e armazenadas em umidade controlada por 90 dias.

| Fonte de variação                | GL | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS  | F      | P     |
|----------------------------------|----|---------|---------|---------|--------|-------|
| Umidade                          | 1  | 139,708 | 139,708 | 139,708 | 348,92 | 0,000 |
| Concentração                     | 1  | 0,809   | 0,809   | 0,809   | 0,02   | 0,165 |
| Período                          | 3  | 99,332  | 99,332  | 32,77   | 81,86  | 0,000 |
| Umidade x Concentração           | 1  | 0,163   | 0,163   | 0,169   | 0,42   | 0,52  |
| Concentração x Período           | 3  | 6,139   | 6,139   | 2,046   | 5,11   | 0,005 |
| Umidade x Período                | 3  | 84,308  | 84,308  | 28,103  | 70,19  | 0,000 |
| Umidade x Concentração x Período | 3  | 2,821   | 2,821   | 0,940   | 2,35   | 0,091 |
| Erro                             | 32 | 12,813  | 12,813  | 0,400   |        |       |
| Total                            | 47 | 345,033 |         |         |        |       |

**APÊNDICE C3** - Análise de variância (ANOVA) das médias da unidade formadoras de colônias de fungos (log UFC/g) das vagens aspergidas por óleo essencial de canela, secas em camada espessa e armazenadas por 90 dias.

| Fonte de variação            | GL | Seq SS | Adj SS | Adj MS | F    | P     |
|------------------------------|----|--------|--------|--------|------|-------|
| UFC                          | 1  | 2,215  | 2,215  | 2,215  | 1,89 | 0,178 |
| Concentração                 | 1  | 10,295 | 10,295 | 10,295 | 8,80 | 0,006 |
| Período                      | 3  | 14,393 | 14,393 | 4,799  | 4,10 | 0,014 |
| UFC x Concentração           | 1  | 1,323  | 1,323  | 1,323  | 1,13 | 0,295 |
| Concentração x Período       | 3  | 1,439  | 1,439  | 0,480  | 0,41 | 0,747 |
| UFC x Período                | 3  | 6,992  | 6,992  | 2,331  | 1,99 | 0,135 |
| UFC x Concentração x Período | 3  | 3,040  | 3,040  | 1,013  | 0,87 | 0,469 |
| Erro                         | 32 | 37,417 | 37,417 | 1,169  |      |       |
| Total                        | 47 | 77,114 |        |        |      |       |

**APÊNDICE C4** - Análise de variância (ANOVA) das médias da aflatoxina total dos amendoim debulhados das vagens aspergidas por óleo essencial de canela, secas em camada espessa e armazenadas em umidade controlada por 90 dias.

| Fonte de variação         | GL | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS  | F     | P     |
|---------------------------|----|---------|---------|---------|-------|-------|
| Aflatoxina                | 1  | 1455392 | 1455392 | 1455392 | 10,12 | 0,086 |
| Concentração              | 1  | 3767267 | 3767267 | 3767267 | 26,20 | 0,036 |
| Período                   | 2  | 420609  | 420609  | 210304  | 1,46  | 0,406 |
| Aflatoxina x Concentração | 1  | 658945  | 658945  | 658945  | 4,58  | 0,166 |
| Aflatoxina x Período      | 2  | 168221  | 168221  | 84110   | 0,58  | 0,631 |
| Concentração x Período    | 2  | 505706  | 505706  | 252853  | 1,76  | 0,363 |
| Erro                      | 2  | 287627  | 287627  | 1438913 |       |       |
| Total                     | 11 | 7263767 |         |         |       |       |

**APÊNDICE C5** - Tabela Médias da aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, dos amendoim debulhados das vagens aspergidas por óleo essencial de canela, secas em camada espessa e armazenadas em umidade controlada por 90 dias.

| Período de armazenamento (Dias) | Umidade relativa do ambiente (%) | Concentração (mg/mL) | Aflatoxinas ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) |                  |                  |                  |             |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------|--|------------------|------------------|------------------|-------------|
|                                 |                                  |                      | AFB <sub>1</sub>                                 | AFB <sub>2</sub> | AFG <sub>1</sub> | AFG <sub>2</sub> | Total       |
| 0                               | U1 - NaCl (75,32 %)              | C1 - 0               | ND   | ND               | ND               | ND               | ND          |
|                                 |                                  | C2- 50               | ND   | ND               | ND               | ND               | ND          |
|                                 | U2 - BaCl <sub>2</sub> (90,3%),  | C1 - 0               | ND   | ND               | ND               | ND               | ND          |
|                                 |                                  | C2- 50               | ND   | ND               | ND               | ND               | ND          |
| 30                              | U1 - NaCl (75,32 %)              | C1 - 0               | 370,65   | 195,06           | ND               | ND               | 468,4       |
|                                 |                                  | C2- 50               | ND   | ND               | ND               | ND               | ND          |
|                                 | U2 - BaCl <sub>2</sub> (90,3%),  | C1 - 0               | 1771,25  | 621,11           | ND               | ND               | 1196,4<br>3 |
|                                 |                                  | C2- 50               | ND   | ND               | ND               | ND               | ND          |
| 60                              | U1 - NaCl (75,32 %)              | C1 - 0               | 1845,78  | 489,35           | 3,8              | ND               | 2338,9      |
|                                 |                                  | C2- 50               | ND   | ND               | ND               | ND               | ND          |
|                                 | U2 - BaCl <sub>2</sub> (90,3%),  | C1 - 0               | 835,56   | 228,095          | 4,85             | 2,76             | 1071,1<br>7 |
|                                 |                                  | C2- 50               | 6,84   | 0,95             | 0,32             | ND               | 8,11        |
| 90                              | U1 - NaCl (75,32 %)              | C1 - 0               | 1139,55  | 211,28           | ND               | ND               | 1350,8<br>3 |
|                                 |                                  | C2- 50               | ND   | ND               | ND               | ND               | ND          |
|                                 | U2 - BaCl <sub>2</sub> (90,3%),  | C1 - 0               | 2641,19  | 335,76           | ND               | ND               | 3312,7<br>1 |
|                                 |                                  | C2- 50               | 1139,57  | 211,29           | ND               | ND               | 1350,8<br>6 |

**ANEXOS**

---

*Teresa Cristina Castilho Gorayeb*

**ANEXO 1 - Capítulo 2: Laudos dos óleos adquiridos:****EMPRESA NOVO MUNDO:**

Florananda Ind e Com de Cosm e Prod Nat Ltda Me  
 Av. Nenê Galvão,331 – Jd. Jorge Atalla  
 Jaú – SP Cep 17.211-477

**CERTIFICADO DE ANÁLISE**

**PRODUTO: ÓLEO DE CANELA,**  
**LOTE: 131260**  
**VALIDADE: 03/2016**  
**DATA 21/03/2014**

| <b>Ítems Controlados</b>  | <b>Resultados</b> | <b>Especificações</b>  |
|---------------------------|-------------------|------------------------|
| Aspecto/cor               | OK                | De acordo com o padrão |
| Cor                       | OK                | De acordo com o padrão |
| Densidade (25°C)          | 1.030             | 1.030 – 1.060          |
| Índice de refração (20°C) | 1.538             | 1.529 – 1.540          |
| Rotação óptica            | 0°                | (-2°) A ( 0°)          |

**CERTIFICADO DE ANÁLISE**

**PRODUTO: ÓLEO DE CRAVO**  
**LOTE: 131223**  
**VALIDADE: 10/2015**  
**DATA: 21/03/2014**

| <b>Ítems Controlados</b> | <b>Resultados</b> | <b>Especificações</b>  |
|--------------------------|-------------------|------------------------|
| Aspecto/cor              | OK                | Líquido amarelo pálido |
| Odor                     | OK                | De acordo com o padrão |
| Densidade 20° C          | 1,0450            | 1,0390 – 1,0490        |
| Índice de refração 25°C  | 1,5350            | 1,5310 – 1,5410        |
| Conteúdo Eugenol GC      | 85,74%            |                        |

**CERTIFICADO DE ANÁLISE****PRODUTO: ÓLEO DE CAPIM LIMÃO****LOTE: 131026****VALIDADE: 06/2015****DATA 04/11/2013**

| <b>Ítems Controlados</b>       | <b>Resultados</b>                             | <b>Especificações</b>    |
|--------------------------------|---|--------------------------|
| Aparência                      | Líquido Límpido                               | Líquido Límpido          |
| Cor                            | Amarelo a Alaranjado                          | Amarelo a Alaranjado     |
| Impurezas                      | Isento  | Isento                   |
| Odor                           | Fresco, encorpado, limão                      | Fresco, encorpado, limão |
| Densidade(20°)                 | 0,895   | 0,875 – 0,905            |
| Índice de refração (20°)       | 1,483   | 1,475 – 1,495            |
| Rotação ótica                  |   | [ -4° ; +1°]             |
| Data da análise                | 01/10/2013                                    |                          |
| Resultado                      | Aprovado                                      |                          |
| Origem                         | Índia   |                          |
| Principais componentes(aprox.) | Citral = 72 %<br>(geranial =40%; neral = 32%) |                          |

ESTOCAGEM: DEVE SER ESTOCADO EM LUGAR FRESCO, MAIS PRÓXIMO POSSÍVEL À 20°C, SECO, PROTEGIDO DA LUZ, EM RECIPIENTE ORIGINAL BEM VEDADO.

PRODUTO CONCENTRADO PARA USO RIGOROSO. CORRE RISCOS, NÃO USADO ADEQUADAMENTE.

LAUDO EMITIDO ELETRÔNICAMENTE, DISPENSA ASSINATURA

---

*Teresa Cristina Castilho Gorayeb*

## Laudos dos óleos adquiridos: EMPRESA FERQUIMICA



**LAUDO TÉCNICO**  
*Óleo Essencial de Canela Cássia*  
 (Cinnamomum cassia)

|                           |                        |
|---------------------------|------------------------|
| Lote: 217                 | CAS Number: 84961-46-6 |
| Fabricação: Dezembro/2014 | Validade:Dezembro/2017 |

| Itens Controlados               | Resultados  | Especificações |
|---------------------------------|---|----------------|
| Aparência                       | Líquido   | Líquido        |
| Cor                             | Amarelo a Marrom  | Amarelo        |
| Impurezas                       | Isento  | Isento         |
| Odor                            | Característico  | Característico |
| Densidade (20°C)                | 1,053   | 1,045 – 1,065  |
| Índice de Refração (20°C)       | 1,610   | 1,595 – 1,615  |
| Rotação Ótica                   |   | [-1°; +1°]     |
| Data da Análise                 | 03/02/2015  |                |
| Origem                          | China   |                |
| Resultado                       | <b>Aprovado</b>   |                |
| Principais Componentes (aprox.) | Aldeído cinâmico – 81% Cumarina – 3%<br>Benzaldeído – 3% Alcool cinâmico– 3 % Estireno – 3% |                |

| Recomendações Especiais |  |
|-------------------------|--|
| Manuseio                | Perigos mínimos, máscaras e luvas recomendável.<br>Não ingerir. Não colocar o produto em contato com a pele, olhos e mucosas. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água limpa em abundância. <b>Pode causar irritação à pele sensível.</b><br>Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra). |
| Incêndio                | Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto.   |
| Explosividade           | Nenhum perigo em condições normais.  |
| Uso                     | Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.   |
| Armazenamento           | Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.   |
| Transporte              | Produto não enquadrado na portaria 264/97 em vigor sobre transporte de produtos perigosos.   |

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus      CRQ: IV 04330754



**Fonte:** Extraído do site da empresa FERQUIMICA, (FERQUIMICA, 2015).

<[http://www.ferquima.com.br/o\\_essenciais.html](http://www.ferquima.com.br/o_essenciais.html)>.



## ANEXO 2 - Capítulo 4:

## Tabela de preços dos óleos essenciais no atacado.

| Tabela Janeiro / 2015  |         |           |            |            |            |            |
|--|---------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| Ferquima Indústria e Comércio Ltda.  |         |           |            |            |            |            |
| Prazos e descontos especiais - vendas@ferquima.com.br - (11) 4158-3544 / 4159-1784 / 9 8346-0743   |         |           |            |            |            |            |
| Pedidos on line - <a href="http://vendas.ferquima.com.br/">http://vendas.ferquima.com.br/</a> - Site: <a href="http://www.ferquima.com.br">www.ferquima.com.br</a> |         |           |            |            |            |            |
| Óleos essenciais   | 10 ml   | 100 ml    | 500 ml     | 1 litro    | 5 litros   | 20 litros  |
| Alecrim (Rosmarinus Officinalis)   | x       | R\$ 70    | R\$ 210    | R\$ 310    | R\$ 1.395  | R\$ 4.960  |
| Anis Estrelado   | x       | R\$ 85    | R\$ 310    | R\$ 460    | R\$ 2.070  | R\$ 7.360  |
| Artemisia Marrocos   | x       | R\$ 120   | R\$ 480    | R\$ 780    | R\$ 3.510  | R\$ 12.480 |
| Basilicão (Majorana)   | x       | R\$ 120   | R\$ 480    | R\$ 780    | R\$ 3.510  | R\$ 12.480 |
| Bergamota  | R\$ 30  | R\$ 140   | R\$ 570    | R\$ 940    | R\$ 4.230  | R\$ 15.040 |
| Bétula doce (Betula lenta)   | R\$ 30  | R\$ 140   | R\$ 570    | R\$ 940    | R\$ 4.230  | R\$ 15.040 |
| Cálamo   | R\$ 60  | R\$ 360   | R\$ 1.600  | R\$ 2.700  | R\$ 12.150 | x          |
| Camomila Azul  | R\$ 120 | R\$ 1.100 | R\$ 5.000  | R\$ 8.500  | R\$ 38.250 | x          |
| Camomila Romana  | R\$ 65  | R\$ 470   | R\$ 2.100  | R\$ 3.800  | R\$ 17.100 | x          |
| Cananga  | x       | R\$ 120   | R\$ 480    | R\$ 780    | R\$ 3.510  | R\$ 12.480 |
| Canela Cássia  | x       | R\$ 85    | R\$ 310    | R\$ 460    | R\$ 2.070  | R\$ 7.360  |
| Cânfora Branca   | x       | R\$ 60    | R\$ 170    | R\$ 250    | R\$ 1.125  | R\$ 4.000  |
| Cardamomo  | R\$ 50  | R\$ 280   | R\$ 1.220  | R\$ 2.100  | R\$ 9.450  | x          |
| Cedro Atlas  | x       | R\$ 60    | R\$ 170    | R\$ 250    | R\$ 1.125  | R\$ 4.000  |
| Cedro Virginia   | x       | R\$ 60    | R\$ 170    | R\$ 250    | R\$ 1.125  | R\$ 4.000  |
| Cenoura (Sempre-viva)  | R\$ 45  | R\$ 250   | R\$ 1.060  | R\$ 1.800  | R\$ 8.100  | x          |
| Cipreste   | x       | R\$ 80    | R\$ 270    | R\$ 400    | R\$ 1.800  | R\$ 6.400  |
| Citronela  | x       | R\$ 45    | R\$ 95     | R\$ 140    | R\$ 630    | R\$ 2.240  |
| Cravo Botão  | x       | R\$ 90    | R\$ 330    | R\$ 490    | R\$ 2.205  | R\$ 7.840  |
| Cravo Folha  | x       | R\$ 55    | R\$ 160    | R\$ 240    | R\$ 1.080  | R\$ 3.840  |
| Eucalipto Citriodora   | x       | R\$ 50    | R\$ 110    | R\$ 160    | R\$ 720    | R\$ 2.560  |
| Eucalipto Globulus   | x       | R\$ 50    | R\$ 110    | R\$ 160    | R\$ 720    | R\$ 2.560  |
| Eucalipto Staigeriana  | x       | R\$ 50    | R\$ 110    | R\$ 160    | R\$ 720    | R\$ 2.560  |
| Funcho Doce  | R\$ 30  | R\$ 140   | R\$ 570    | R\$ 940    | R\$ 4.230  | R\$ 15.040 |
| Gengibre   | x       | R\$ 120   | R\$ 480    | R\$ 780    | R\$ 3.510  | R\$ 12.480 |
| Gerânio África (Pelargonium graveolens)  | R\$ 40  | R\$ 230   | R\$ 950    | R\$ 1.600  | R\$ 7.200  | x          |
| Grapefruit   | x       | R\$ 80    | R\$ 270    | R\$ 400    | R\$ 1.800  | R\$ 6.400  |
| Ho Leaf (Substituto do Pau Rose)   | x       | R\$ 85    | R\$ 310    | R\$ 460    | R\$ 2.070  | R\$ 7.360  |
| Ho Wood (Substituto do Pau Rose)   | x       | R\$ 90    | R\$ 330    | R\$ 490    | R\$ 2.205  | R\$ 7.840  |
| Jasmim   | R\$ 350 | R\$ 3.150 | R\$ 15.000 | R\$ 30.000 | x          | x          |
| Laranja Amarga   | x       | R\$ 65    | R\$ 180    | R\$ 270    | R\$ 1.215  | R\$ 4.320  |
| Laranja Doce   | x       | R\$ 35    | R\$ 50     | R\$ 70     | R\$ 315    | R\$ 1.120  |
| Lavanda Francesa   | x       | R\$ 95    | R\$ 330    | R\$ 520    | R\$ 2.340  | R\$ 8.320  |
| Lavanda Maillete   | R\$ 40  | R\$ 230   | R\$ 950    | R\$ 1.600  | R\$ 7.200  | x          |
| Lavanda Russa  | R\$ 40  | R\$ 230   | R\$ 950    | R\$ 1.600  | R\$ 7.200  | x          |
| Lavandim   | x       | R\$ 80    | R\$ 270    | R\$ 400    | R\$ 1.800  | R\$ 6.400  |
| Lemongrass   | x       | R\$ 55    | R\$ 120    | R\$ 180    | R\$ 810    | R\$ 2.880  |
| Lima Destilada   | x       | R\$ 80    | R\$ 270    | R\$ 400    | R\$ 1.800  | R\$ 6.400  |
| Limão Siciliano  | x       | R\$ 75    | R\$ 230    | R\$ 350    | R\$ 1.575  | R\$ 5.600  |
| Limão Tahiti   | x       | R\$ 75    | R\$ 230    | R\$ 350    | R\$ 1.575  | R\$ 5.600  |
| Litsea Cubeba (May Chang)  | x       | R\$ 60    | R\$ 170    | R\$ 250    | R\$ 1.125  | R\$ 4.000  |
| Mandarina  | x       | R\$ 85    | R\$ 310    | R\$ 460    | R\$ 2.070  | R\$ 7.360  |

Fonte: Extraído do site da empresa FERQUIMICA, (FERQUIMICA, 2015).

<[http://www.ferquima.com.br/o\\_essenciais.html](http://www.ferquima.com.br/o_essenciais.html)>.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 10/06/2015

---

Assinatura

---

*Teresa Cristina Castilho Gorayeb*