



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

QUALIDADE SANITÁRIA DE GRÃOS DE AMENDOIM SUBMETIDOS A TRATAMENTOS COM
PRODUTOS NATURAIS

Deborah Menocci **Larios**^{1a}; Lenise **Rossetto**^{2b}; Rodrigo Fernandes **Castanha**^{2b}; Lilia Aparecida
Salgado de **Morais**^{3c}

Embrapa Meio Ambiente, Laboratório de Produtos Naturais

Nº 13403

RESUMO: Este trabalho teve por objetivo avaliar a ação do extrato de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) no controle de fungos de armazenamento de grãos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) em duas metodologias de aplicação (aplicação direta no papel germitest e imersão) e quatro tipos de tratamento (Testemunha, extrato aquoso de canela 5% no tempo zero, extrato aquoso de canela 5% preparado com 24 horas de antecedência, extrato etanólico 1%). Foi utilizada a técnica do *Blotter test*, por sete dias em fotoperíodo automático e temperatura de 25° C ± 1. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 x 2 x 4, sendo dois lotes, duas metodologias de aplicação e quatro tratamentos, com 20 repetições de 10 sementes, totalizando 200 sementes por tratamentos. Os resultados obtidos mostraram que, para *Rhizopus stolonifer*, o extrato etanólico de canela a 1% aplicado diretamente no papel Germitest apresentou o menor percentual de incidência fúngica. O tratamento de imersão não é indicado para o controle deste fungo. Para *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp, o extrato aquoso de canela a 5% com os grãos de amendoim resulta em grãos com melhor qualidade sanitária. Uma concentração superior a 5% pode vir a conferir um maior percentual de inibição, podendo chegar à totalidade.

Palavras-chave: canela, armazenamento, *Penicillium*, *Arachis hypogaea* L., *Aspergillus*.

^a Bolsista PIBIC: Graduação em Ciências Biológicas, deborahmenocci@hotmail.com, ^bColaborador, ^c Orientador.



ABSTRACT - The aim of this work was to evaluate the action of cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) in the control of fungus of stored grains of *Arachis hypogaea* L., by direct application on Germitest paper or immersion, and three natural treatments (cinnamon aqueous extract 5%, cinnamon aqueous extract 5% prepared 24 hours before its use, cinnamon ethanolic extract 1%) plus control (distilled water). Health tests were performed using Blotter test technic for seven days (automatic photoperiod, 25° C ± 1). The experimental design was a complete randomized in factorial scheme 2 x 2 x 4 (two lots, two application methods of and four treatments, with 20 replications of ten seeds (200 seeds by treatment). For *Rhizopus stolonifer*, cinnamon ethanolic extract 1% directly applied on Germitest paper showed lower percentual of fungal incidence. Immersion was not indicated to control this fungus. For *Penicillium* spp. and *Aspergillus* spp., the contact of cinnamon aqueous extract 5% with peanut grains resulted in grains with better sanity quality. Higher concentrations can bring a higher inhibition percentual, and it can give a total fungal inhibition.

Keywords: Cinnamon, storage, *Penicillium*, *Arachis hypogaea* L., *Aspergillus*

1 INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos livres de agrotóxicos ou produtos químicos é cada vez maior, e tem estimulado pesquisadores a desenvolverem métodos simples, saudáveis e eficazes contra pragas e fungos que produzem micotoxinas de alta toxicidade. Sua contaminação varia em função de fatores como: cultivo, pré ou pós-colheita, sementes ou grãos armazenados e também em fatores geográficos e sazonais. A mais importante micotoxina produzida pelo fungo *Aspergillus flavus* é a aflatoxina B1, que é uma toxina cancerígena, mutagênica, e teratogênica encontrada naturalmente em alimentos e rações (International Agency for Research on Cancer , 1993).

Diversas investigações confirmam a ação antimicrobiana de produtos naturais provenientes de plantas (Rasooli et al., 2008) por se tratarem de fontes ricas em compostos biologicamente ativos (Mitscher et al., 1987., Pereira et al., 2010) e possuírem ação antibacteriana, antifúngica, antiviral, inseticida além de propriedades antioxidantes (Burt, 2004; Kordali et al, 2005). Segundo Schwan-Estrada et al., (2005), trabalhos desenvolvidos com extratos ou óleos essenciais, obtidos a partir de plantas medicinais, tem indicado o potencial destes no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação direta sobre os mesmos, inibindo seu crescimento, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando compostos com característica de eliciadores.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Por se tratar de um produto de baixo custo econômico e de fácil acessibilidade à população, a canela em pó (*Cinnamomum zeylanicum*), uma importante especiaria, é utilizada também como importante agente antimicrobiano, contra vários microrganismos patogênicos (Food Ingredients Brasil, 2010).

Entre os principais produtos alimentícios que desenvolvem fungos de armazenamento, está o amendoim (*Arachis hypogaea L.*), considerado a quarta maior cultura oleaginosa mundial (Freitas; Badolato, 1992), que apresenta porcentagem significativa de *A. flavus*, assim como *Rhizopus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Cientificamente já foi confirmada a associação entre esses fungos e vários problemas de saúde tanto humana quanto animal. Foram diagnosticadas lesões no fígado, assim como outros órgãos, também causando reações como hemorragias e necroses (Barcelos, 2013).

Sob o ponto de vista econômico, avaliar e pesquisar tratamentos adequados para o amendoim é um grande problema, tendo em vista que sua comercialização e distribuição dificultam a vigilância sanitária adequada, embora exista uma norma estabelecida pelo Ministério da Saúde (Barcelos, 2013). Atualmente, o índice de irregularidade dos produtos vendidos no mercado é de 7%, em contraste com o percentual de 40% observado em 2001 (Eizendeher, 2005). A produção do amendoim no Brasil em 2012/2013 foi de 336,0 mil toneladas (CONAB, 2013).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da canela em pó (*Cinnamomum zeylanicum*) no controle de fungos de armazenamento de amendoim (*Arachis hypogaea L.*) em duas metodologias de aplicação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de Produtos Naturais (LPN) e Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA) da Embrapa Meio Ambiente, localizada em Jaguariúna- SP, no período de Maio à Julho de 2013.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 (lotes) x 2 (metodologias de aplicação) x 4 (tratamentos) e 20 repetições de 10 sementes cada, totalizando 16 tratamentos e 200 sementes por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Os grãos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e a canela em pó (*Cinnamomum zeylanicum*) foram obtidos no mercado local, destinados a consumo humano. Foram adquiridas duas marcas comerciais de amendoim de qualidade sanitária diferentes, sendo diferenciados por: Lote 1, Lote 2.

Para a realização dos testes foram utilizadas placas de Petri descartáveis (90 mm x 15 mm). Para cada placa foram utilizadas três folhas de papel Germitest umedecidos com água esterilizada ou com os tratamentos em volumes três vezes maior que o peso do papel (3 ml). Para todos os tratamentos realizou-se a técnica do *Blotter test* (Neergaard, 1979),

As metodologias de aplicação utilizadas foram aplicação do produto diretamente no papel germitest e imersão. Os tratamentos utilizados foram: T1: (Testemunha absoluta: água destilada esterilizada aplicada no papel germitest); T2: Extrato aquoso de canela 5% aplicado imediatamente após o preparo (Tempo zero); T3: Extrato aquoso de canela 5% aplicado 24 horas após o seu preparo (Tempo 24h); T4: Extrato etanólico de canela 1% aplicado, T5: Testemunha em imersão; T6: Extrato aquoso de canela 5% (Tempo zero) em imersão; T7: Extrato aquoso de canela 5% (Tempo 24h) em imersão, T8: Extrato etanólico de canela 1% em imersão.

Para o preparo dos extratos aquosos (5%), foram utilizados 22 g de canela-em-pó, adicionado a 440 ml de água destilada esterilizada, sendo aplicados 3 ml da suspensão diretamente no papel germitest. Já para o teste de imersão, os grãos ficaram imersos por 2 minutos na mesma suspensão. Nos tratamentos T3 e T7, o método de preparo dos extratos foi o mesmo, porém, este foi preparado com 24 horas de antecedência da montagem.

O extrato etanólico de canela foi preparado com o método de extração a frio, utilizando-se 20 g de canela em pó e adição de 68 ml de etanol PA em erlenmeyer de 1L revestido com papel alumínio, mantendo o extrato livre da incidência de luz, com renovação de solvente a cada 24h, realizado por cinco vezes até o esgotamento da amostra. Ao final de cada dia o extrato foi filtrado com o auxílio de papel de filtro qualitativo (Whatman- nº3). Os extratos provenientes da filtragem foram acondicionados em outro erlenmeyer, sendo este revestido com papel alumínio para proteção de luminosidade, e armazenados em local seco. O extrato foi concentrado em evaporador rotativo (Büchi- RE 121) e pesado em balança analítica (Mettler- AE 160), obtendo-se 7,1421 gramas de extrato. Este foi acondicionado em frasco de vidro com batoque e tampa de rosca, sendo mantido sob refrigeração até o momento do ensaio.

Do extrato, 2,48 g foram misturados a 248 ml de água esterilizada, que foi submetido tanto à aplicação no papel germitest, quanto para o tratamento de imersão. As placas foram incubadas em



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Câmara BOD (Biofoco- BF2 CGFP 275) por sete dias em fotoperíodo automático (12 horas de luz/ 12 horas com ausência total de luz) e temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados no teste de sanidade os patógenos: *Rhizopus stolonifer* (Lote 1- 40%; Lote 2- 92%), *Aspergillus* spp. (L1- 58%; L2- 51%), *Penicillium* spp. (L1- 30%; L2- 86%) e *Fusarium* spp. (L1- 16%; L2- 22%), porém os dados do último (*Fusarium* spp.) não serão apresentados, pois nenhuma das interações foi significativa.

Para *Penicillium* spp., o melhor tratamento realizado foi o T2 (3%) no L1, utilizando a metodologia de aplicação do produto diretamente no papel (Tabela 1), porém, este dado não diferiu do obtido pelo tratamento T5, que consiste na testemunha em imersão. No segundo lote, que apresentou qualidade sanitária inferior ao primeiro para este fungo, a melhor média foi apresentada pelo tratamento T3 (17%), quando comparado à testemunha (T1 – 86%), sendo o resultado de aplicação direta no papel superior ao mesmo extrato aplicado em imersão (T7 – 42%). Estes resultados sugerem que o contato direto da canela com o grão por um período maior de tempo, resulta em uma menor incidência de *Penicillium*. Uma concentração superior a 5% poderia conferir um maior percentual de inibição, podendo chegar à totalidade.

ALVES et al. (2011), em experimento realizado utilizando extratos de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) e nim (*Azadirachta indica*) nas doses de, 10 ml, 40ml, 70ml e 100ml, bem como a testemunha, no tratamento de sementes de amendoim, observaram o controle total de *Penicillium* em sementes submetidas à aplicação de 100 ml do extrato de nim, sob condições de 90 dias de armazenamento em embalagem PET.

Em relação ao fungo *Rhizopus stolonifer*, a interação dos três fatores não foi significativa. O L1 apresentou menor incidência deste fungo em todos os tratamentos (tabela 1). O tratamento T4 apresentou a menor média percentual (27,5%) de grãos naturalmente infectados quando comparado à testemunha (T1 40%). Esta não diferenciou do tratamento T2 (40%), Os demais tratamentos apresentaram médias superiores à testemunha. O tratamento de imersão não é indicado para o controle deste fungo, independentemente do tratamento utilizado. No segundo lote, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos e as duas metodologias de aplicação.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Tabela 1: Médias dos percentuais de incidência de *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e de *Rhizopus stolonifer* em grãos de amendoim submetidos aos tratamentos com canela sob dois diferentes tipos de aplicação. Jaguariúna-SP, 2013

		<i>Penicillium</i> %							
Lotes		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
L1		30 bA	3 bC	10 aBC	13 bBC	3 bC	24 bAB	17 bABC	10 bBC
L2		86 aA	50 aCD	17 aE	67 aB	48 aD	64 aBC	42 aD	45 aD
		CV% = 48,91							
		dms para colunas = 1.0106				dms para linhas = 1.5679			
		<i>Rhizopus</i> %							
Lotes		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
L 1		40 bC	40 bC	77 bAB	27 bC	71 bAB	61 bB	85 bA	76 bAB
L 2		92 aA	93 aA	99 aA	88 aA	100 aA	100 aA	100 aA	98 aA
		CV% = 24,94							
		dms para colunas = 1.2118				dms para linhas = 1.8800			
		<i>Aspergillus</i> %							
Lote		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
L 1		58 aA	29 bB	28 aB	50 bA	51 aA	56 aA	40 aAB	57 aA
L 2		58 aAB	43 aBC	16 aD	71 aA	42 aBC	66 aA	37 aC	41 bBC
		CV% = 41,62							
		dms para colunas = 1.2061				dms para linhas = 1.8711			

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

T1: Testemunha absoluta; T2: Extrato aquoso de canela 5% (Tempo zero) aplicado diretamente no papel germitest; T3: Extrato aquoso de canela 5% (Tempo 24h) aplicado diretamente no papel germitest; T4: Extrato etanólico de canela 1% aplicado diretamente no papel germitest; T5: Testemunha em imersão; T6: Extrato aquoso de canela 5% (Tempo zero) em imersão; T7: Extrato aquoso de canela 5% (Tempo 24h) em imersão; T8: Extrato etanólico de canela 1% em imersão.

Souza et al. (2004) avaliaram a ação *in vitro* dos óleos essenciais de alho (*Allium sativum* L.), canela (*Cinnamomum burnannil Meissn*) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.), extraídos pela técnica de arraste a vapor, nas concentrações de 500; 1000; 1500 e 2000 µg/ml e de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) nas concentrações de 200, 400, 600 and 800 µg/mL sobre diversos fungos associados a produtos de panificação. Os autores obtiveram 100% de inibição do crescimento micelial de *Rhizopus stolonifer* nos tratamentos com o óleo essencial de canela e de



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

tomilho na concentração de 500 µg/ml. Ainda segundo os mesmos autores, o óleo essencial de cravo conferiu inibição total do crescimento fúngico na concentração de 600 µg/ml.

Para o *Aspergillus* spp., o tratamento T3) apresentou melhor resultado nos dois lotes avaliados (L1 - 28% e L2 – 16%), porém, este não diferenciou estatisticamente do tratamento T2- (29%)- no primeiro lote. Bozza et al. (2012) obtiveram a inibição de quatro espécies diferentes de *Aspergillus*, utilizando o extrato aquoso da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Foram testadas quatro concentrações do extrato: 0,1g, 0,5g, 1,0g e 10,0g. As concentrações 0,1g, 0,5g e 1,0 g, foram inibitórias apenas para as espécies fúngicas *Aspergillus ochraceus* e *A. westerdijkiae*, porém não foram capazes de inibir os fungos *Aspergillus niger* e *A. carbonarius*.

4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir, nas condições em que foram realizados os testes, que para *Rhizopus stolonifer*, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se o extrato etanólico de canela a 1%, sendo mais indicada a metodologia de aplicação do extrato diretamente no papel germitest, O tratamento de imersão não é indicado para o controle deste fungo, independentemente do tratamento utilizado.

Para *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp, pode-se observar que o contato direto do extrato aquoso de canela a 5% com os grãos de amendoim, resulta em uma menor incidência fúngica nos mesmos. Uma concentração superior a 5% pode vir a conferir um maior percentual de inibição, podendo chegar à totalidade.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela bolsa concedida ao primeiro autor. A Dra. Lilia Aparecida Salgado de Moraes, pelas orientações e sugestões.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, N. M. C.; ALMEIDA, F. A. C; GOMES, J. P.; PESSOA, E. B.; ALBUQUERQUE, E. M. B.; SILVA, K. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de amendoim tratadas com extratos vegetais. **Caderno de agroecologia** – Vol 6, No. 2, Dez 2011.

BARCELOS, A.; **Controle Saniário de Produtos Agrícolas**. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio07/entrevista.pdf>>. Acesso em 10/07/2013.

BURT, S. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods. **International Journal of Food Microbiology**, Grugliasco, v.94, p.223-253, 2004.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

BOZZA, A.; PIMENTEL, I.C.; HELM, C. V. **Inibição do crescimento de fungos do gênero *Aspergillus* produtores de ocratoxina a por extratos aquosos de erva-mate**, EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 11., 2012, Colombo. Anais. Colombo: Embrapa Florestas, 2012.

CONAB. **Grãos.** Disponível em:
<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_07_09_09_04_53_boletim_graos_junho_2013.pdf>. Acesso em: 12/07/2013.

EIZENDEHER, L. B. **Comparação de métodos cromatográficos por camada delgada e líquida com kits imunológicos para detecção de aflatoxinas em amendoim in natura e doce de amendoim**. 2005. 88 f. (Dissertação - Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

FOODINGREDIENTS BRASIL. **Agentes Antimicrobianos Químicos e Naturais**. Disponível em:<<http://www.revista-fi.com/materias/155.pdf>>. Acesso em 01/07/2013.

FREITAS, V.P.S.; BADOLATO, M.I.C. Incidência de aflatoxinas em paçocas de amendoim consumidas na cidade de Campinas, estado de São Paulo. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.52, n.1/2, p.83-87, 1992.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon, 1993. 263p.

KORDALI, S.; KOTAN, R.; MAVI, A.; ÇAKIR, A.; ALA, A.; YILDIRIM, A. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v.53, p.9452-9458, 2005.

MITSCHER, L. A.; DRAKE, S.; GOLLAPUDI, S. R.; OKWUTE, S. K. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. **Journal of Natural Products**, v.50, p.1025-1040, 1987.

NEERGAARD, P. 1979. **Seed pathology**. 2.ed. London: MacMillan Press. 1191 p.

PEREIRA, E.L.; BARROS, C.S.; ROSSETTO, C.A.V. Contaminação de sementes de amendoim, inoculadas por *Aspergillus* seção *Flavi*, influenciada pelo genótipo, pela área de cultivo e pelos isolados. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.34, n.4, p.853-859, jul./ago.,2010.

RASOOLI, I.; FAKOOR, M. H.; YADEGARINIA, D.; GACHKAR, L.; ALLAMEH, A.; REZAEI, M. B. Antimycotoxigenic Characteristics of *Rosmarinus ofícinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, Grugliasco, v.122, p.135-139, 2008.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. F. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: Cavalcanti, L.S., Di Piero, R.M., Cia, P., Pascholati, S.F., Resende, M.L.V. & Romeiro, R.S. (Eds.) **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba SP. FEALQ. 2005.

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. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.3, p. 685-690, maio/jun., 2004.