

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO NETRIX SOBRE
CINCO ESPÉCIES FÚNGICAS E SUPERFÍCIE INTERNA DE UM SILO**

SILVANA MARIA BASTOS BATISTA

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO NETRIX SOBRE CINCO ESPÉCIES
FÚNGICAS E SUPERFÍCIE INTERNA DE UM SILO**

SILVANA MARIA BASTOS BATISTA

Sob a orientação do Professor
Dr. Luís Otávio Nunes da Silva

E Co-orientação do Professor
Dr. Marcelo Elias Fraga

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica – RJ

Março de 2010

589.2

B333e Batista, Silvana Maria Bastos, 1959-

T Estudo da atividade antifúngica do Netrix sobre cinco espécies fúngicas e superfície interna de um silo / Silvana Maria Bastos Batista - 2010.

55 f.: il.

Orientador: Luís Otávio Nunes da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Bibliografia: f. 36-43.

1. Fungos - Teses. 2. Fungicidas - Teses. 3. Silos - Teses. 4. Micotoxinas - Teses. I. Silva, Luís Otávio Nunes da, 1954-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

SILVANA MARIA BASTOS BATISTA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos** ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 12 /03/ 2010

Luís Otávio Nunes da Silva, Dr. – UFRRJ
(Orientador)

João Domingos Biagi, Dr.- UNICAMP

Helio Fernandes Machado Júnior, Dr. - UFRRJ

Dedico este trabalho a Deus pelo seu infinito amor, por ter me conduzido, guardado e ajudado nesta cidade para que eu pudesse ter a oportunidade de realizar este Mestrado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter guiado os meus passos até aqui e me concedido esta vitória.

Ao Magnífico Reitor do Instituto Federal de Educação Tecnológica do Maranhão, Professor Msc José Ferreira Costa, pelo apoio, compreensão e por ter me concedido a oportunidade de crescer como pesquisadora, representando o nosso estado em uma Universidade de excelência, reconhecida em nosso país, como é a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Outrossim, deixo registrada a expressão da minha admiração pelo seu caráter e brilhantismo refletido no trabalho que vem desempenhando em suas gestões.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão e aos professores do Departamento Acadêmico de Química pela liberação concedida.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade de realizar este sonho de Mestrado.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao meu orientador Professor Dr. Luís Otávio Nunes da Silva pela assistência em relação ao experimento *in locus* e ao trabalho de Dissertação.

Ao meu co-orientador Professor Dr. Marcelo Elias Fraga pelo apoio e assistência nos experimentos e trabalho de Dissertação.

Aos membros da banca Professor Dr. João Domingos Biagi e Professor Dr. Helio Fernandes Machado Júnior pelas sugestões.

Ao Professor Celso Guimarães Barbosa pelo auxílio na estatística.

Aos meus pais José Luís de Carvalho Bastos e Celeste dos Santos Bastos pela dedicação desde o meu nascimento e pelo incentivo que sempre me proporcionaram nos estudos.

Aos meus irmãos, Luís José dos Santos Bastos, Luís Américo dos Santos Bastos, Diógenes dos Santos Bastos e Nilson dos Santos Bastos pelo apoio concedido durante a minha ausência da terra natal.

Aos meus filhos, Bráulio Bastos Batista, Vanessa Bastos Batista e Suzana Bastos Batista, pela força e compreensão durante esta jornada da minha vida. Em especial a Vanessa pelo apoio que me deu por ocasião de suas férias escolares.

Ao meu tio Othon de Carvalho Bastos pelo incentivo para a realização deste Mestrado.

Ao meu primo Vadson Bastos do Carmo pela colaboração no desenvolvimento da Dissertação.

A todos os meus colegas da turma do Mestrado de 2008 da UFRRJ, pela união, pelo apoio, pela amizade e pelo compartilhamento de informações.

Aos meus irmãos em Cristo pela ajuda em orações nos momentos difíceis, Pr. Paulo Camillo, Pr. Clodoaldo Silva de Souza e Meriane Nunes Leandro.

Às amigas Mariella Camargo Rocha, Nídia Alves de Barros, Tatiane Gonçalves do Amaral, Silvia Teresa Melônio Alves e Silvana Duarte, sempre dispostas a me ajudar todas as vezes que precisei.

E em especial a Anderson Vieira por ter me incentivado a fazer este Mestrado e pelo apoio em todos os momentos em que necessitei.

RESUMO

BASTOS, Silvana Maria Batista. **Estudo da atividade antifúngica do Netrix sobre cinco espécies fúngicas e superfície interna de um silo.** 2010. 46p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

O desenvolvimento de fungos em países situados em regiões tropicais é propiciado pelas condições psicométricas do ar ambiente, portanto é importante dispensar atenção ao estudo do controle desses microrganismos tanto em alimentos como nas instalações de processamento e armazenamento dos mesmos, tendo em vista que a ingestão de produtos contaminados por fungos pode estar associada à presença de micotoxinas, substâncias tóxicas que podem causar danos à saúde de humanos e animais, podendo vir a ser letal dependendo da quantidade ingerida. Considerando a grande importância deste controle, este trabalho investigou, *in vitro* e *in locus*, a ação antifúngica de um produto à base de compostos químicos orgânicos, presente na maioria dos óleos essenciais, o qual recebeu a denominação de Netrix. O teste *in vitro* foi realizado em cinco espécies de *Aspergillus*, *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. parasiticus*, através do método de plaqueamento em superfície, em meio Ágar Extrato de Malte, onde se observou o efeito inibitório do produto sobre o desenvolvimento dos fungos e o teste *in locus* foi feito por contagem de unidades formadoras de colônias em amostras coletadas da superfície interna do protótipo de um silo, antes e após tratamento com o produto, pelo método de Plaqueamento em Superfície, em meio Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol. Em ambos os testes submeteu-se as placas à incubação de 25°C. As colônias detectadas antes do tratamento, não foram encontradas após aplicação do produto. Os resultados dos ensaios realizados demonstraram a eficiência do produto, tanto *in vitro*, como *in locus*.

Palavras chave: fungos, *Aspergillus*, armazenamento.

ABSTRACT

BASTOS, Silvana Maria Batista. **Study of the antifungal activity of Netrix on five fungal species and the inner surface of a silo**. 2010. 46p. Dissertation (Master of Science and Food Technology). Institute of Technology, Department of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

The development of fungi in countries located in tropical regions is made possible by the psychometric conditions of ambient air, so it is important to give special attention to study the control of microorganisms both in the food as food processing and storage, the ingestion of products contaminated by fungi may be associated with the presence of mycotoxins, toxic substances that can damage the health of humans and animals and could be lethal depending on the amount ingested. Considering the great importance of controlling fungi in food, this study investigated, *in vitro* and *in locus*, the antifungal effect of a product based on organic chemical compounds called Netrix. The test *in vitro* carried out in five species of *Aspergillus*, *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus* and *A. parasiticus*, through the method of plating surface in culture Medium Malt Extract Ágar, where we observed the inhibitory effect of the product on development of fungi and the test *in locus* by counting of colony forming units in samples collected from the inner surface of the prototype of a silo, before and after treatment with the product, through the method surface plating in culture medium Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Ágar. In both tests the plates were incubated at 25 ° C. The colonies detected before treatment, after application of the product were not found. Test results have shown the efficiency of the product, both *in vitro* and *in locus*.

Key words: fungi, *Aspergillus*, storage.

LISTA DE FIGURAS

Figura.1 - Forma do fungo que mostra a vesícula com os esporos e o ciclo evolutivo do <i>Aspergillus</i> spp (Segundo Herrera Campi)	09
Figura 2 - Forma do <i>Penicillium</i> spp, mostrando as células em forma de garrafa com os esporos, cujo conjunto se assemelha a um pequeno pincel. (Segundo Herrera Campi)	09
Figura 3 Fórmula estrutural do timol (a). Fórmula estrutural do Carvacrol (b)	12
Figura 4 - Fórmulas estruturais do Geraniol, Geranial, e Nerol	13
Figura 5 - Fórmula estrutural do Linalol	14
Figura 6 Fórmula estrutural do α -cadinol (1) e T-muurolol (2)	16
Figura 7 Fórmulas estruturais de polifenólicos	16
Figura 8 Fórmulas estruturais do p-cimeno e γ -terpineno	17
Figura 9 Amostras do milho para contagem das UFC.g ⁻¹	21
Figura 10 -Protótipo do Silo com três anéis	22
Figura 11 -Foto das placas contendo meio MEA, mostrando a inibição do crescimento de espécies de <i>Aspergillus</i> , causada pelo Netrix, com os devidos controles	25
Figura 12 - Foto das placas contendo meio DRBC mostrando as colônias coletadas dos anéis do silo. Anel do ápice amostra; anel mediano amostra e anel da base amostra	27
Figura 13 - Redução de colônias de fungos nos três anéis do silo, após tratamento com o Netrix	28
Figura 14 -Redução do resíduo de Netrix na superfície do silo, após tratamento	29

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Níveis de toxinas em alimentos e grãos permitidos em diferentes países	7
Tabela 2 - Condições para o crescimento de fungos em grãos para temperaturas de 25 a 7 °C.	10
Tabela 3 - Temperaturas mínimas, ótimas e máximas e umidades relativas mínimas para o desenvolvimento dos fungos de armazenamento	10
Tabela 4 - Nomenclatura, Fórmula Molecular e Estrutural do Eugenol	15
Tabela 5 - Espécies fúngicas a serem utilizadas no estudo e suas respectivas referências	19
Tabela 6 - Quantidade de conídios distribuídos em placas contendo Ágar Extrato de Malte	24
Tabela 7 - Avaliação da ação do Netrix em espécies de <i>Aspergillus</i> a 25 °C em placas contendo meio de cultura Ágar Extrato de Malte	25
Tabela 8 - Contagem das U F C coletadas das amostras de milho	26
Tabela 9 - Contagem das UFC coletadas das superfícies dos anéis do silo	27
Tabela 10 - Redução das colônias de fungo nos três anéis do silo, após tratamento	28
Tabela 11 - Médias de períodos de amostragem com letras diferentes diferem significativamente entre si ($P < 0,05$)	28
Tabela 12 - Redução do resíduo do Netrix na superfície do silo, após tratamento	29

ABREVIATURAS

MEA	Ágar Extrato de Malte
DRBC	Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
ATCC	American Type Culture Collection
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Produção de Grãos	3
2.2 Importância do Armazenamento de Alimentos	3
2.3 Rede Armazenadora Brasileira	4
2.3.1 Unidades de armazenagens a granel	4
2.3.2 Unidades de armazenagens convencionais	5
2.4 Micotoxinas e Fungos Toxigênicos	5
2.5 Legislação	6
2.6 Principais Fungos Presentes em Armazenamento	7
2.6.1 Fungos de campo	8
2.6.2 Fungos de armazenamento	8
2.7 Agentes Antifúngicos	11
2.7.1 Substâncias químicas sintéticas	11
2.7.2 Substâncias biológicas	12
2.7.2.1 Ação de alguns óleos essenciais sobre espécies do gênero <i>Aspergillus</i>	12
2.7.2.2 Composição química de alguns óleos essenciais e ação sobre microorganismos	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Teste do Netrix sobre o Desenvolvimento de Cinco Espécies de <i>Aspergillus</i>	19
3.1.1 Local	19
3.1.2 Espécies fúngicas	19
3.1.3 Antifúngico	19
3.1.4 Ensaios da atividade antifúngica	20
3.1.4.1 Preparo dos inóculos	20
3.1.4.2 Contagem de conídios	20
3.1.4.3 Inoculação, incubação e leitura	20
3.2 Teste do Netrix sobre a Superfície Contaminada do Silo	20
3.2.1 Tomada de amostras do milho	20
3.2.2 Inoculação e incubação	21
3.2.3 Tomada de amostras do silo	21
3.2.4 Inoculação, incubação e leitura	22
3.2.5 Tratamento do silo com o produto	22
3.2.6 Tomada de amostras após pulverização para avaliação do produto	22
3.3 Análises de Resíduo do Produto na Superfície do Silo	23
3.3.1 Tomada de amostras	23
3.3.2 Análise cromatográfica	23
3.4 Análises Estatísticas	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Efeito do Netrix sobre as Espécies Fúngicas	24
4.2 Efeito do Netrix sobre a Superfície Contaminada do Silo	26
4.2.1 Tratamento do silo	27
4.3 Análises de Resíduo do Produto na Superfície Interna do Silo	29

4.4 Ações de Antifúngicos sobre Microrganismos	30
4.4.1 Algumas substâncias químicas sintéticas testadas em microrganismos	30
4.4.2 Ação de alguns óleos essenciais sobre espécies do gênero <i>Aspergillus</i>	30
4.4.3 Composição química de alguns óleos essenciais e ação sobre microrganismos	31
5 CONCLUSÕES	34
6 SUGESTÕES	35
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS	44
A - Composição dos meios de cultivo utilizados nos ensaios	45
B - Quadro de análise de variância	46

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, por se situar em uma área tropical apresenta clima e condições psicrométricas do ar que favorecem o desenvolvimento de fungos. Estes seres estão amplamente distribuídos no meio ambiente. Na agricultura em condições propícias para sua multiplicação podem contaminar desde a semente até os grãos, inclusive equipamentos e instalações de armazenagem, podendo causar problemas à saúde pública, portanto torna-se importante a atenção dispensada ao estudo do combate destes organismos.

Os fungos são os principais microorganismos presentes em armazenamento, seus esporos podem ser disseminados de diversas maneiras: pelo vento, pela chuva, por insetos, ferramentas, utensílios agrícolas, colhedoras, entre outros. Pela grande dispersão natural dos esporos, pode-se dizer que os fungos estão presentes praticamente em qualquer local e em condições favoráveis do meio, estes esporos podem germinar e se multiplicar.

Em uma condição ideal de armazenagem, o ambiente abiótico é alterável, ainda que lentamente, os níveis de temperatura, umidade relativa, CO₂ e O₂ sobem e descem, qualquer variação anormal em qualquer um dos fatores pode originar condições favoráveis ao crescimento desses microorganismos.

O Brasil é considerado o celeiro do mundo devido à grande quantidade de grãos que produz, sendo os principais em ordem decrescente de produção soja, milho, arroz, trigo, feijão, sorgo e amendoim.

Existe todo um processo de beneficiamento, o qual engloba desde o recebimento até o armazenamento dos grãos, esse sistema deve ser realizado de modo que não ocorra contaminação do produto, visando assegurar a qualidade final do mesmo, porém esta condição só será garantida se houver um cuidado no controle da contaminação, não somente dos grãos como também dos equipamentos e instalações de armazenagem.

A presença de fungos potencialmente toxigênicos em armazenamento pode contaminar os grãos, que dão origem às rações, as quais ao serem ingeridas por animais podem ser veículos para levar as toxinas aos seus produtos alimentícios, como carnes, ovos, leite e vir a chegar até a mesa do consumidor.

A natureza nos fornece a maioria das substâncias orgânicas conhecidas, principalmente por meio dos vegetais, os quais têm contribuído de maneira significativa para o fornecimento de substâncias úteis à humanidade, entre elas encontram-se os monoterpenos e sesquiterpenos, presentes nos óleos essenciais, os quais possuem ação antifúngica.

A procura de agentes antifúngicos tem sido extensiva, tanto de substâncias químicas, como biológicas, entre estas as mais estudadas nas últimas décadas são os óleos essenciais, por serem substâncias naturais, constituídas de compostos químicos orgânicos, portanto mais adequados para serem utilizados na área de alimentos do que certas substâncias químicas inorgânicas, pois estas podem apresentar efeitos tóxicos e deixarem resíduos nos produtos alimentícios.

O grande desafio da pesquisa nesta linha, consiste em estudar produtos que além de possuírem poder antifúngico, não causem danos à saúde humana e de animais e ainda possam ser viáveis sob o ponto de vista econômico e ambiental.

Levando em consideração o exposto anteriormente a presente dissertação apresenta como objetivo geral investigar a atividade antifúngica e a volatilidade de um produto à base de compostos químicos orgânicos sintéticos, similares aos presentes na maioria dos óleos essenciais, que recebeu o nome de Netrix. Para tanto, ao longo do trabalho foram realizados ensaios e análises com os seguintes objetivos específicos:

1. Testar o produto *in vitro* cinco espécies fúngicas do gênero *Aspergillus*;

2. Testar *in locus* na superfície interna de um protótipo de silo;
3. Verificar a volatilidade do produto através de análises cromatográficas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de Grãos

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a safra atual brasileira de grãos (cereais, leguminosas e oleaginosas), correspondente a 2008/2009 foi de 136,7 milhões de toneladas, comparando à safra de 2007/2008, que foi de 144,1 milhões de toneladas, houve uma redução de 7,52 milhões de toneladas. Esta redução é explicada pela quebra de produção do milho 1ª safra (6,0 milhões de toneladas) e da soja (2,4 milhão de toneladas) decorrente de clima adverso, sobretudo da estiagem ocorrida nos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul e de Mato Grosso do Sul. Vale lembrar que o início das chuvas, nesta safra, foi retardado em toda a região Centro-Sul do País, situação esta, que retardou o plantio do milho 2ª safra, sobretudo nos Estados do Paraná e de Mato Grosso, respectivamente o primeiro e o segundo maior produtor da cultura (CONAB, 2009).

Apesar da expressiva produção brasileira de grãos e do aumento da capacidade estática averiguada nos últimos anos, a rede armazenadora brasileira, continua ainda deficiente tanto em relação à sua distribuição espacial quanto à modalidade de manuseio da produção agrícola, com capacidade de armazenar cerca de 22 milhões de toneladas de grãos, convencional. (SILVA *et al.*, 2008a).

2.2 Importância do Armazenamento de Alimentos

Em países com grandes extensões territoriais deve-se priorizar a regularidade do abastecimento de alimentos e matérias-primas agrícolas que fazem parte do consumo diário da população (SILVA *et al.*, 2008a). As redes armazenadoras ao receber a produção que não encontra consumo imediato, formam os estoques que permitem a distribuição cronológica dos produtos e impedem as flutuações dos preços, que resultam das safras e entressafras. Estas redes de armazenamento ao receberem a produção devem conservá-la em perfeitas condições. Para a agricultura a rede armazenadora é indispensável para o incentivo da produção, para o consumidor é um dos principais fatores para a estabilização dos preços, além de garantir o abastecimento normal (PUZZI, 2000).

O objetivo da armazenagem é preservar as qualidades físicas, sanitárias e nutricionais dos produtos agrícolas, pós-colheita. Os fatores que influenciam a boa conservação desses produtos são a temperatura versus umidade relativa do ar e temperatura versus umidade do produto. Além desses as características estruturais e de higiene das instalações são fatores indispensáveis para atingir as boas práticas de armazenagem (SILVA *et al.*, 2008a).

Diversos fungos de armazenagem são encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, moegas, elevadores, equipamentos e lugares onde os produtos agrícolas são armazenados, manuseados e processados. Podendo causar danos ao produto se as condições de armazenagem forem impróprias à manutenção da qualidade do produto (MALMANN *et al.*, 1994).

Em relação aos grãos, no momento em que a célula de armazenagem estiver sendo carregada, estes poderão variar em temperatura e conteúdo de umidade, devido a variações de maturidade, condições climáticas e variação de secagem. Porções de grãos quentes e deterioradas podem ser criadas dentro do silo, mesmo que a condição média da massa de grãos possa ser considerada adequada (SILVA *et al.*, 2008b). Esta situação comentada por este autor pode levar a uma contaminação do silo por fungos, portanto a assepsia do silo entre um carregamento e outro é muito importante.

O controle químico das pragas nos produtos armazenados é feito com fumigantes liquefeitos (bissulfeto de carbono, entre outros) ou solidificados, a exemplo da fosfina.

Entretanto, a utilização indevida da fosfina levou ao surgimento de populações de insetos resistentes e à detecção de resíduos em grãos e sementes expurgados com alto teor de umidade (FARONI, 1997). Os inseticidas químicos geraram efeitos negativos aos seres humanos, devido à sua alta capacidade de bioacumulação e seu poder residual prolongado (IANNACONE *et al.*, 2005).

2.3 Rede Armazenadora Brasileira

Segundo Silva *et al.* (2008a) a rede armazenadora brasileira, do seu surgimento até a década de 70, concentrou-se no litoral e só avançou para o interior em condições muito especiais, conforme a cultura. Sua modalidade voltou-se para conservação em sacaria, somente a partir dos anos 70 que foi adotado o sistema de armazenagem a granel. Em 2005 correspondia a 51% do total e em 2006 segundo a CONAB já representava 78%.

2.3.1 Unidades de armazenagens a granel

Silos são células individuais que podem ser construídas de chapas metálicas, de concreto ou de alvenaria, geralmente em forma cilíndrica, possuindo ou não sistema de aeração. Quando são agrupados em uma única unidade de recebimento e processamento, são denominados “bateria”. Dependendo da relação que apresentam entre a altura e o diâmetro podem classificar-se em verticais e horizontais. Os verticais se forem cilíndricos podem possuir o fundo em forma de cone, para facilitar a descarga (SILVA *et al.*, 2008c).

Em uma bateria o produto entregue em caminhões, inicialmente é pesado e em seguida é procedida a descarga da massa na moega de recepção onde é transportada por sistemas de elevadores que podem ser de canecas ou pneumáticos e transportadores horizontais, para as células de estocagem, a saída é realizada por um transportador horizontal inferior, a descarga do produto a partir das células de estocagem é feita por gravidade, também por gravidade é despejado nos caminhões ou vagões, que ao deixarem o silo são novamente submetidos à pesagem.

Os silos metálicos são de média e pequena capacidade, construídos de chapas lisas ou corrugadas, de ferro galvanizado ou alumínio, os de ferro galvanizado são pintados de branco para evitar a intensa radiação solar. Para carregamento e descarga são usados equipamentos metálicos que podem ser portáteis, empregando-se elevadores de caçamba, helicoidais ou pneumáticos. Nos silos de fundo chato o equipamento pneumático facilita a operação de descarga (PUZZI, 2000).

A movimentação interna em uma unidade armazenadora pode ser classificada em três grupos, transportes verticais, horizontais ou inclinado, com o emprego de diversos equipamentos assim designados: elevador de caneca ou caçamba; transportador por gravidade; correia transportadora; rosca sem fim ou helicoidal; transportador de corrente ou REDLER; transportador pneumático (PUZZI, 2000).

Elevador de caneca ou caçamba é um equipamento utilizado para transportar material granular ou pulverulento em posição vertical ou com pequena inclinação, constituído das seguintes partes: cabeça; módulos do corpo; pé ou base; correia ou corrente; canecas ou caçambas. O transporte do produto é efetuado pelo acondicionamento em caçambas ou canecas fixadas em correias ou correntes. As caçambas podem ser constituídas de metal, plástico ou fibra de vidro. A principal característica operacional deste tipo de transportador é a elevação do produto a uma altura que possibilite a distribuição por gravidade, por meio de condutos especiais, a carga do elevador é feita na sua base ou pé (SILVA *et al.*, 2008d).

Os transportadores por gravidade não utilizam uma fonte motora, o fluxo é realizado através de queda livre, planos inclinados, calhas ou tubulações fechadas (PUZZI, 2000).

A correia transportadora é composta por uma correia sem fim de lona ou borracha operando entre duas polias, é empregada para o transporte horizontal. Para o transporte de cargas pesadas, ou a grandes distâncias a correia deve ser apoiada em rolos, os quais têm uma grande vantagem de impedir atrito (PUZZI, 2000).

Transportador helicoidal consiste de um helicóide montado em um eixo que, ao girar transporta o produto, pode ser fixo ou portátil. Na maioria das vezes opera dentro de condutores, calhas em forma de U ou tubos metálicos. As roscas sem fim que operam livre são chamadas de roscas varredoras e são empregadas em silos de fundo plano, fazendo chegar os grãos até o canal coletor, moega (PUZZI, 2000).

Os transportadores de corrente ou “Redler” consistem em uma corrente que se move sobre uma superfície metálica, arrastando os grãos, a corrente também é sem fim, como nos transportadores de correia. O transportador de corrente opera no interior de caixas fechadas, impedindo a saída de pó para a parte externa, eliminando assim a possibilidade de poluir o ambiente (PUZZI, 2000).

Os pneumáticos são utilizados para transportar diferentes tipos de materiais em dutos fechados por meio de fluxo de ar em alta velocidade, como vantagens apresentam baixo custo inicial, simplicidade mecânica, percurso de transporte único ou ramificado, facilidade na variação da trajetória e seu sistema é auto limpante. De acordo com as características de funcionamento pode ser classificado em três sistemas: sistema por sucção; sistema por pressão e sistema combinado de sucção e pressão. O Sistema por Sucção opera com pressão abaixo da pressão atmosférica, muito utilizado na descarga de caminhões, vagões e barcos e no transporte de materiais cuja textura dificulta a fluidez através de outros tipos de transportadores. O sistema por pressão trabalha com pressão acima da pressão atmosférica e o sistema combinado de sucção e pressão é o sistema mais comum no qual o transporte é realizado parte por sucção e parte por pressão (SILVA *et al.*, 2008d).

Armazéns graneleiros são unidades armazenadoras horizontais, de metal, alvenaria ou concreto, podem apresentar fundo chato, em V ou W, construídos no nível do solo ou semi-enterrados e tem o objetivo de armazenar o produto por mais tempo e na maioria dos casos representam menor investimento que o silo, para uma mesma tonelagem estocada (SILVA *et al.*, 2008c). Apresentam ainda outras vantagens, como, manipulação de quantidades e tipo de produtos variáveis, simultaneamente; individualização de produtos dentro de um mesmo lote; e em caso de deterioração, pode-se removê-la sem a deterioração de todo o lote.

2.3.2 Unidades de armazenagens convencionais

Os armazéns convencionais são de um único compartimento, apresentam fundo chato, os produtos são armazenados em blocos individualizados de acordo com a sua origem e características. Podem ser construídos em alvenaria, estruturas metálicas ou mistas e devem apresentar as características técnicas necessárias à boa armazenagem, como ventilação, impermeabilização do piso, iluminação e pé direito adequado (SILVA *et al.*, 2008c).

2.4 Micotoxinas e Fungos Toxigênicos

Alguns fungos podem produzir metabólitos secundários, esses fungos são denominados fungos toxigênicos e os metabólitos, micotoxinas (SABINO *et al.*, 1982). A presença de fungos nos alimentos pode diminuir o valor nutritivo das proteínas, por hidrólise das mesmas, além de prejudicar o seu aspecto externo (FONSECA, 2003).

As micotoxinas de interesse em saúde pública e agricultura são aflatoxinas, ochratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas e os alcalóides de ergots, as quais são

responsáveis por prejuízos de milhões de dólares anuais tanto em saúde humana e animal, como na produção agrícola (HUSSEL; BRASEL, 2001).

No grupo das micotoxinas as mais encontradas em grãos são as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (HILL *et al.*, 1983; KUMEDA; ASAO, 2001), essas micotoxinas têm sido frequentemente encontradas em milho amendoim, feijão, arroz, trigo, sementes de algodão, sorgo, especiarias e frutas (CORRÊA, 2000), as quais são produzidas principalmente por cepas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (ANGLE *et al.*, 1982). Segundo Scussel (1994) as aflatoxinas têm ponto de fusão alto, são estáveis ao calor sendo decompostas à temperatura de cerca de 220 °C.

O gênero *Aspergillus* consta de fungos toxigênicos, causadores de deterioração em grãos e sementes, são saprófitos cosmopolitas de disseminação fácil por seus esporos leves e secos. São xerofílicos ou xerotolerantes, ou seja, podem crescer em baixo potencial de água, sendo os primeiros a se desenvolverem nas condições de baixa umidade dos grãos e sementes assim facilitando o desenvolvimento de outros gêneros que necessitam de mais umidade (PUZZI, 2000).

As micotoxicoses foram responsáveis por importantes epidemias em homens e animais, o “ergotismo” matou dezenas de milhares de pessoas na Europa nos últimos 1000 anos; a aleucia tóxica alimentar (ATA) foi responsável pela morte de milhares de indivíduos na antiga União Soviética na década de 30 e a aflatoxicose matou 100.000 perus na Inglaterra em 1960 e tem causado doenças e mortes em outros animais e também no homem (ANDRADE, 2004).

Segundo Forsythe (2002) as micotoxinas podem provocar quatro tipos de toxicidade: aguda, provocando danos nos rins ou fígado; crônica, resultando em câncer de fígado; mutagênica, causando danos no DNA; teratogênica originando câncer em embriões. De acordo com Corrêa (2000) os microfungos podem causar três tipos de manifestações clínicas no homem e animais, infecções ou doenças decorrentes da invasão de um tecido vivo; alergias ou reações de hipersensibilidade e toxicoses: intoxicações resultantes da ingestão de alimentos ou rações contendo metabólitos tóxicos.

Hussel e Brasel (2001) constataram através de estudos em animais que as aflatoxinas se ligam ao DNA e induzem efeitos mutagênicos, carcinogênicos, diminuição da função das células T e da imunidade celular.

2.5 Legislação

Diversos países adotaram limites de tolerância para toxinas em produtos destinados ao consumo humano a partir da descoberta das aflatoxinas em 1960. O Brasil em 1977 estabeleceu o limite de 30µg.Kg⁻¹ para o somatório das frações B₁ e G₁ abrangendo qualquer tipo de alimento, todavia a Portaria nº 183 de 1996 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento estabelece um limite de 20µg.Kg⁻¹ para Aflatoxinas B₁ + B₂ + G₁ + G₂ e um limite máximo de 50µg.Kg⁻¹ para ração animal (BRASIL, 1977, 1996).

São apresentados na Tabela 1 os níveis de toxinas permitidos em alimentos e rações em diversos países conforme legislações específicas.

Tabela 1 - Níveis de toxinas em alimentos e grãos permitidos em diferentes países

Produto	Micotoxina	Limite - ppb
Argentina		
Alimentos infantis	B1	0
Amendoim, milho e derivados	B1 B1B2G1G2	5 20
Farelo de soja	B1	30
Leite <i>in natura</i> e em pó	M1	0,05
Produtos lácteos	M1	0,5
Uruguai-		
Alimentos infantis	B1B2G1G2	3
Leite e derivados	M1	0,5
Amendoim, soja e frutas secas	B1B2G1G2	30
Milho e cevada	zearalenona	200
Arroz, cevada, café e milho	ochratoxina	50
Brasil		
Alimentos para consumo humano	B1B2G1G2	20
Matérias primas e rações	B1B2G1G2	50
Estados Unidos		
Rações de crescimento - aves e suínos	B1B2G1G2 zearalenona	20 2
Ração final – suínos	B1B2G1G2	200
Produtos lácteos	M1	0,5
MERCOSUL		
Milho	B1B2G1G2	20
Farelo de milho	B1B2G1G2	20
Amendoim e subprodutos	B1B2G1G2	20

Fonte: BAKKER-ARKEMA (1999).

O controle de micotoxinas nos alimentos é importante para o comércio internacional, pois a maioria dos países desenvolvidos não permite importações de produtos com quantidades acima dos limites estabelecidos.

O Ministério da Saúde, pela resolução RDC n. 274 da Agência Nacional de vigilância Sanitária (ANVISA) de 15 de outubro de 2002 estabelece o limite de $20\mu\text{g.Kg}^{-1}$ para aflatoxinas totais em amendoim, pasta de amendoim e milho, e $0,5 - 5,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ para aflatoxinas M_1 no leite líquido e em pó respectivamente (BRASIL, 2002). Este limite é compatível com o de outros países e é recomendado pela Organização Mundial da Saúde e pela Organização para Alimentação e Agricultura (FONSECA, 2004).

2.6 Principais Grupos de Fungos Presentes em Armazenamento

Os fungos presentes nas sementes e grãos armazenados são tradicionalmente divididos em fungos de campo e de armazenamento. Os fungos de campo invadem as sementes ainda no campo, requerendo para o seu crescimento, umidade relativa em torno de 90-95%. Estes fungos podem ser encontrados em grãos armazenados. O tempo de sobrevivência desses

fungos nas sementes está diretamente relacionado com as condições de ambiente do armazenamento. Esta divisão não é taxonômica, baseia-se no teor de umidade dos grãos (PUZZI, 2000; LAL; KAPOOL, 1979; BERJAK, 1987; MERONUK, 1987).

2.6.1 Fungos de campo

Dentre os fungos de campo veiculados pelas sementes de milho, no Brasil, *Fusarium moniliforme* é o mais freqüente (REIS *et al.*, 1995; PEIXOTO *et al.*, 1998). Este fungo é considerado como o principal fitopatógeno de várias gramíneas, sendo que no milho se destaca pela alta freqüência e alta porcentagem de ocorrência, tanto no Brasil como em outros países e caracteriza-se também, pela produção de fumonisinas em milho, alimentos derivados do milho pipoca e rações a base de milho (CASA *et al.*, 1998).

Matioli e Almeida (1997) verificaram em trigo e milho respectivamente aumentos significativos no teor de umidade e contaminação por fungos em grãos atacados por carunchos.

2.6.2 Fungos de armazenamento

Os fungos de armazenamento, por sua vez, estão presentes nas sementes recém-colhidas, geralmente em porcentagens muito baixas. São capazes de sobreviver em ambiente com baixa umidade, proliferando em sucessão aos fungos de campo e causando a deterioração das sementes (BERJAK, 1987; WETZEL, 1987; CARVALHO; NAKAGAWA, 1988).

Os fungos de armazenamento mais freqüentes geralmente são *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (TUIITE *et al.*, 1985).

Espécies de *Aspergillus* são iniciadoras da deterioração das sementes e grãos, causando descoloração e alterações nutricionais conforme Meronuck (1987). *Aspergillus candidos* é exclusivamente fungo de armazenamento e está associado ao primeiro estágio de deterioração do grão. *Aspergillus flavus* pode ser considerado fungo de armazenamento, podendo invadir sementes de milho no campo quando as condições forem favoráveis (LAZZARI, 1997). Esse comportamento relaciona-se com a redução da umidade do subproduto durante o processamento. De acordo com Meronuck (1987), espécies de *Aspergillus* podem crescer com menor teor de água, em seguida inicia-se a contaminação por *Penicillium*, com uma umidade mais elevada, desenvolvida em função da atividade metabólica dos primeiros invasores.

De acordo com Puzzi (2000) se o teor de umidade é aumentado a um nível que permite que outras espécies se desenvolvam, ocorre um aquecimento da massa de grãos e elevado nível de deterioração. O desenvolvimento dos fungos de armazenamento segue a seguinte seqüência: *Aspergillus candidos* – *A. ochraceus* – *A. versicolor* – *A. flavus*. Em seguida surgem os fungos do gênero *Penicillium*.

Ao microscópio o *Aspergillus* e *Penicillium* revelam formas das quais têm origem seus nomes, *Aspergillus* pela etimologia da palavra quer dizer pequeno aspersório, apresenta uma vesícula arredondada em que se fixam células em forma de garrafa, que sustentam os esporos (Figura 1). *Penicillium* significa pincel, tem o “pelo” constituído de células em forma de garrafa com gargalo alongado, o qual possui células redondas (esporos) dispostas em correntes (Figura 2) (PUZZI, 2000).

Ciclo evolutivo do *Aspergillus* spp.

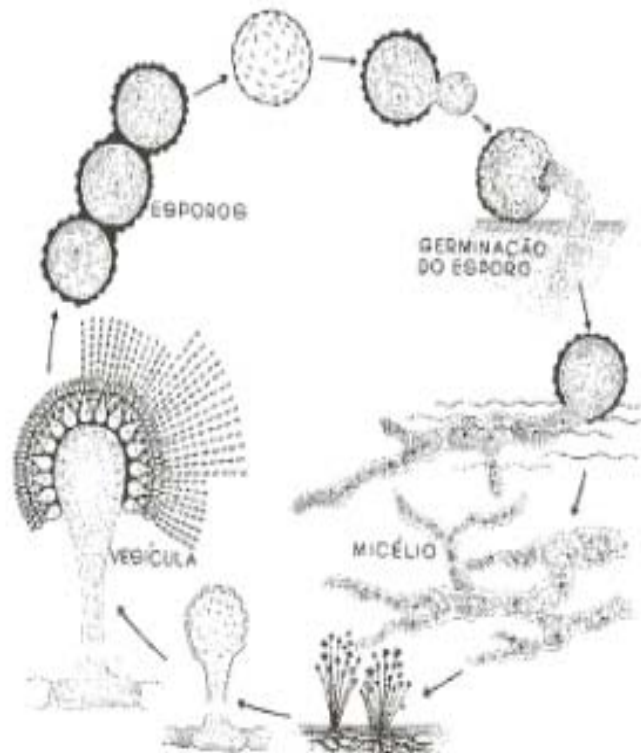


Figura 1 - Forma do fungo que mostra a vesícula com os esporos e o ciclo evolutivo do *Aspergillus* spp (Segundo Herrera Campi).

Penicillium sp.

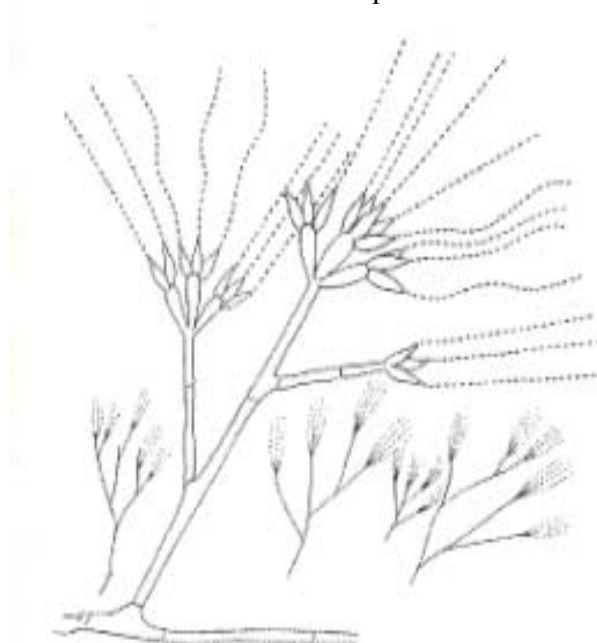


Figura 2 - Forma do *Penicillium* spp, mostrando as células em forma de garrafa com os esporos, cujo conjunto se assemelha a um pequeno pincel. (Segundo Herrera Campi).

A Tabela 2 apresenta o crescimento dos principais fungos de armazenamento no intervalo de temperatura de 25 a 27° C com respectivas percentagens de umidades, dos grãos e do ar.

Tabela 2 - Condições para o crescimento de fungos em grãos para temperaturas de 25 a 27°C

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

Fonte: BAKKER-ARKEMA (1999)

Tabela 3 - Temperaturas mínimas, ótimas e máximas e umidades relativas mínimas para o desenvolvimento dos fungos de armazenamento.

Fungos	Temperatura (°C)			Umidade relativa mínima (%)
	Mínima	Ótima	Máxima	
<i>Aspergillus restrictus</i>	5 - 10	30 – 35	40 - 45	70
<i>A. glaucus</i>	0 - 5	30 – 35	40 - 45	73
<i>A. candidus</i>	10 - 15	45 – 50	50 - 55	80
<i>A. flavus</i>	10 - 15	40 – 45	45 - 50	85
<i>Penicillium</i> spp.	-5 - 0	20 -25	35 -40	80 - 90

Fonte: BAKKER-ARKEMA (1999)

2.7 Agentes Antifúngicos

Várias substâncias já foram testadas como antimicrobianas diretamente em bactérias e fungos, como também em alimentos contaminados por esses microrganismos, tanto substâncias químicas sintéticas, como substâncias químicas obtidas a partir de óleos essenciais e óleos essenciais na forma integral.

2.7.1 Substâncias químicas sintéticas

A clorexidina teve sua descoberta em 1940 e por sua eficiente ação antimicrobiana, inicialmente foi usada na anti-sepsia da pele (HAUGEN; JOHANSEN, 1974). Esse anti-séptico pertence ao grupo das biguanidinas e, atualmente, o gluconato de clorexidina (GC), por ser mais solúvel, é a preparação mais utilizada. Sua ação é praticamente, imediata (cerca de 15 segundos após fricção), apresenta baixo potencial de toxicidade, atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos, bem como baixa irritabilidade, sendo seguro para uso inclusive em crianças recém-nascidas (CERQUEIRA, 1997). Fowler e Schuh (1992) demonstram a eficácia do gluconato de clorhexidina em estudos *in vitro* e *in vivo* em humanos e animais. Sanchez *et al* (1988) relataram que bactérias, como *Staphylococcus aureus*, são sensíveis a esse anti-séptico. No entanto, outras bactérias como *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Serratia rubidae* e *Pseudomonas cepacia* podem desenvolver resistência ao gluconato de clorhexidina. Da Silva *et al* (2000) testaram a efetividade do gluconato de clorexidina em assepsia de pele, na experiência com vinte e quatro cães, onde comparam com o efeito do iodo e observaram, através da contagem de unidades formadoras de colônias, redução bacteriana significativa nos dois anti-sépticos testados. Segundo Xavier *et al* (2008) o uso de clorexidina é recomendável em programas de desinfecção ambiental, tendo em vista a eficácia no controle de *Aspergillus*, observado em seu trabalho.

Helander *et al.* (1998) utilizaram os produtos químicos Carvacrol, trans-Cinamaldeído, Carvona e Timol, obtidos sinteticamente, os quais são similares aos existentes em óleos essenciais, com a finalidade de avaliar suas atividades inibitórias contra *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium* e *Photobacterium leiognathi*. Ainda observaram seus mecanismos de ação indutores da inibição, por ação na membrana plasmática e interferência no ATP. Carvacrol, timol, e trans-cinamaldeído inibiram *E. coli* e *S. typhimurium* enquanto que carvona foi menos inibitório. trans-Cinamaldeído foi o componente mais inibitório para *P. leiognathi*. O carvacrol e timol, com fórmulas estruturais apresentadas na Figura 3, foram responsáveis pela desintegração da membrana externa e conseqüente liberação de material intracelular para o meio externo, como também diminuição do ATP intracelular.

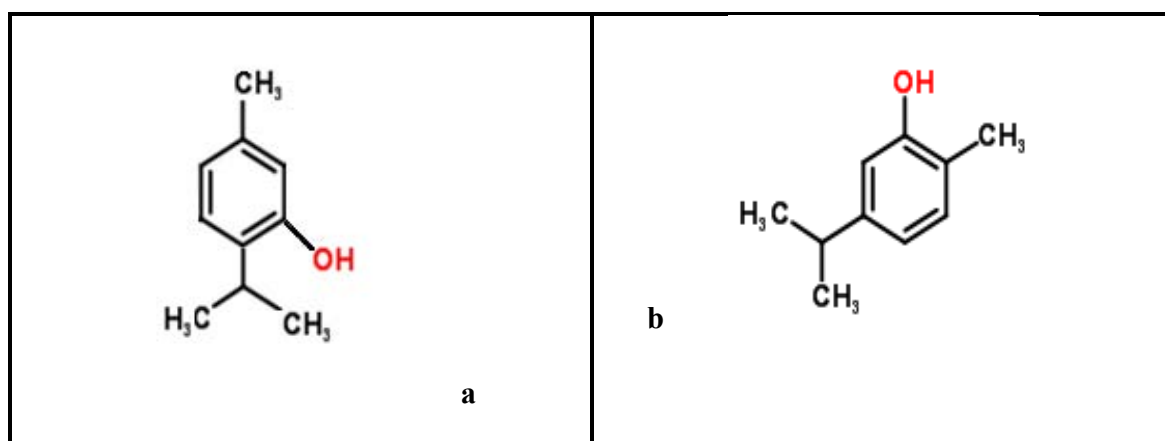


Figura 3 - Fórmula estrutural do timol (a). Fórmula estrutural do Carvacrol (b). Fonte: The Pherobase (2010).

Lee *et al.* (2008) determinaram o efeito do ácido clorogênico (CRA), um composto polifenólico, na artrite causada por *Candida albicans*, que provoca artrite fúngica, para induzir artrite em camundongos foi injetada nesses animais uma mistura de *C. albicans*, uma vez por dia durante 3 dias, 24 horas após a última injeção, afim de detectar o efeito do CRA, foi injetado peritonialmente (1 mg/dose/camundongo) todos os dias 3 vezes, o edema foi medido por 15 dias, os resultados mostraram que o tratamento com CRA reduziu aproximadamente 40% da artrite, a atividade anti-artrítica foi medida pela supressão da proliferação de células T. Além disso o CRA também inibiu o crescimento de *C. albicans*.

Grigoletti (2007) avaliou a eficácia do tratamento à base de uma associação de ácidos orgânicos (ácido propiônico, ácido benzóico, ácido acético e ácido sórbico) no controle do desenvolvimento de fungos em milho armazenado e concluiu que os ácidos orgânicos são eficientes, pois eliminaram completamente as colônias fúngicas que infectavam os grãos. De acordo com Krabbe *et al.* (1994) os ácidos inibem o crescimento dos microorganismos através de sua penetração nas células e dissociação no interior destas, acidificando o citoplasma, resultando na inibição do transporte de nutrientes, com isso o consumo de energia por parte dos fungos aumenta na tentativa de manter o pH homeostático, com esse processo o microorganismo perde a capacidade de desenvolvimento.

2.7.2 Substâncias biológicas

As substâncias biológicas que têm ações antifúngicas são encontradas nos óleos essenciais, os quais são compostos orgânicos voláteis, que podem ser encontrados em um só órgão vegetal ou em toda a planta (MARTINS *et al.*, 2000).

De acordo com a International Standar Organization (ISO), óleos essenciais são produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor de água bem como produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos.

2.7.2.1 Ação de alguns óleos essenciais sobre espécies do gênero *Aspergillus*

Diversos estudos têm comprovado o efeito de óleos essenciais de plantas inibindo a atividade fúngica do gênero *Aspergillus*.

Viegas *et al.* (2005) estudaram a toxicidade dos óleos essenciais de casca de canela (*Cinnamomum zeilanicum* Breym) e de bulbilho de alho (*Allium sativum*) sobre o desenvolvimento micelial de *Aspergillus flavus*, *in vitro* e constataram a eficácia desses óleos.

Os óleos de *thyme*, *summer savory* e *clove* (cravo) tiveram eficiência comprovada em *Aspergillus flavus* (OMIDBEYGI *et al.* 2006).

O óleo de *Thumus vulgaris* (Tomilho) foi testado *in vitro* contra *Aspergillus flavus*, inibindo totalmente seu crescimento micelial e *in locus* em outras espécies de *Aspergillus* contaminantes alimentares (*Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*), demonstrando amplo espectro fungitóxico, e mostrou significativa eficácia contra a aflatoxina B₁ (KUMAR, 2008).

Dikbas *et al.* (2008) testaram o óleo essencial de *Satureja hotensis* quanto à atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus in vitro* em meios sólidos e líquidos e *in locus* em limões sob condições de armazenamento. Os resultados obtidos nesse estudo mostraram forte atividade antifúngica contra o patógeno testado, tanto *in vitro* como *in locus*.

Segundo Tatsadjieu *et al.* (2009), o óleo essencial de *Lippia rugosa* foi testado *in vitro* para a observação de sua eficácia contra *Aspergillus flavus*. A composição química do óleo foi determinada por cromatografia em fase gasosa / espectrometria de massa (CG-SM). Os monoterpênicos, Geraniol (51,5%), nerol (18,6%) e geranial (10,4%), cujas fórmulas estruturais estão expressas na Figura 4, foram os principais componentes do óleo de *Lippia*. Após 8 dias de incubação em meio contendo óleo essencial, o crescimento micelial de *A. flavus* foi totalmente inibido. O efeito do óleo essencial na síntese de aflatoxina B₁, também foi avaliado e os resultados mostraram que a síntese desta aflatoxina foi inibida. A enzima H⁺-APTase teve sua atividade completamente inibida por ação deste óleo essencial.

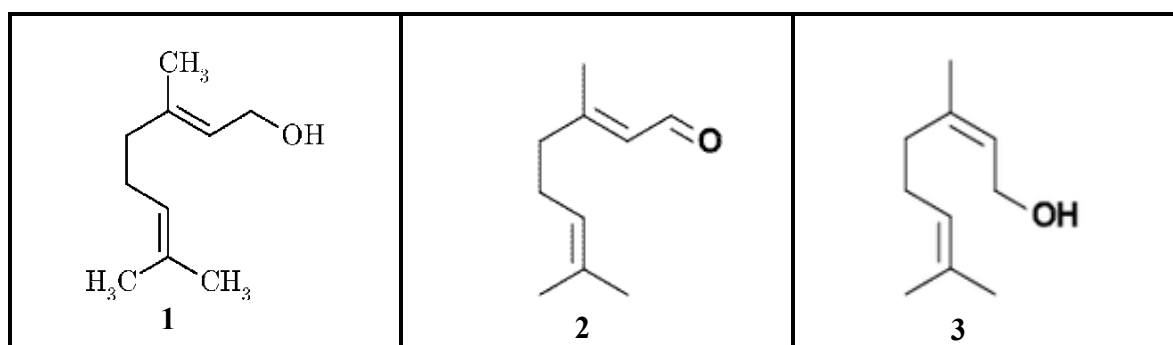


Figura 4 - Fórmulas estruturais (1) Geraniol, (2) Geranial, (3) Nerol. Fonte: Chem Bilink online Database (2010).

2.7.2.2 Composição química de alguns óleos essenciais e ação sobre microorganismos

A composição química dos óleos essenciais varia desde hidrocarbonetos terpênicos (monoterpenos e sesquiterpenos), álcoois simples e terpênicos, aldeídos, lactonas, cumarinas entre outros. Esses óleos possuem as seguintes propriedades, antiviróticos, germicidas, cicatrizantes, expectorantes e outras. (SIMÕES *et al.*, 2003).

Brooker e Kleinig (2006) estudaram a composição química do óleo essencial de eucalipto e concluíram que é uma mistura complexa de terpenos, particularmente monoterpênicos (C₁₀) e sesquiterpenos (C₁₅) e uma variedade de substâncias aromáticas tais como fenóis, óxidos, éteres, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas. A presença de monoterpênicos voláteis em óleos essenciais contidos nas plantas oferece uma importante estratégia de defesa própria, particularmente contra insetos herbívoros, pragas e fungos patogênicos (LANGENHEIM, 1994).

O óleo essencial de pau-rosa, nome popular da árvore da família das Lauraceae, *Aniba duckei*, foi testado por Teles (2003), quanto à atividade antimicrobiana frente às bactérias: *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio auginolyticus* e *Serratia spp.*, o qual

apresentou efeito bactericida sob todas as cepas patogênicas dos microorganismos citados. Segundo Chaar (2000) o constituinte majoritário do pau rosa é o linalol (Figura 5). Os outros componentes minoritários são: α -terpinol, 1,8-cineol, α -pineno, geraniol, citronelal, limoneno, pineno e acetato de linalol.

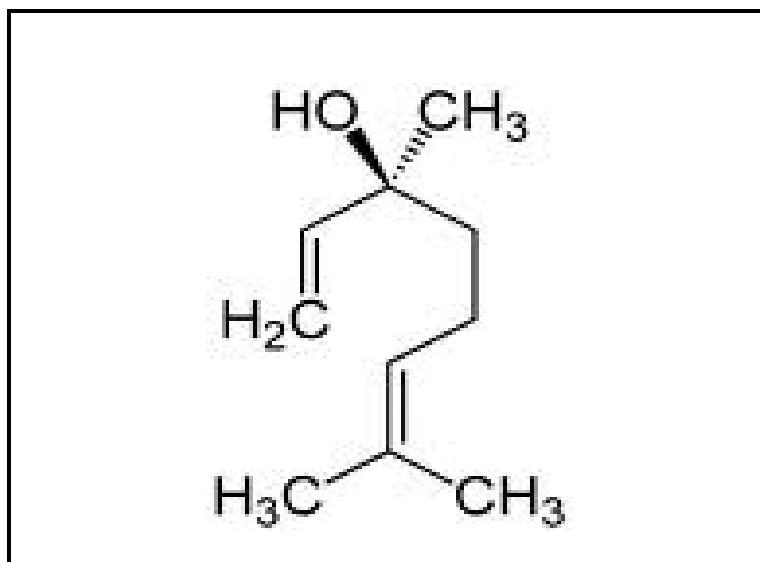
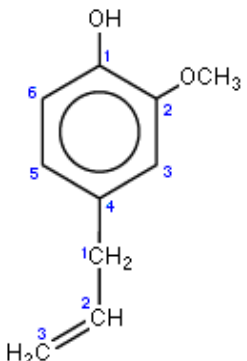


Figura 5 - Fórmula estrutural do Linalol. Fonte: Chem Bilink online Database (2010).

Silva *et al.* (2005) testaram *in vitro* o extrato da folha de *Ocimum gratissimum* e Eugenol (obtido comercialmente) contra *Microsporum canis*, *M.ypseum*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*. Ambos demonstraram atividade antifúngica contra esses fungos causadores de dermatites em humanos. O Eugenol, principal constituinte desse óleo essencial, foi capaz de inibir o crescimento de 80% dos dermatófitos isolados. A Tabela 4 expõe a nomenclatura oficial, a fórmula molecular e a fórmula estrutural do Eugenol.

Tabela 4 - Nomenclatura, Fórmula Molecular e Estrutural do Eugenol.

EUGENOL	
Nomenclatura Oficial	4-Alil-2-metoxifenol
Fórmula Molecular	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
Fórmula Estrutural	

Fonte: The Pherobase (2010).

Estudos comprovaram que o óleo essencial de *Lippia siloids* Cham, possui baixa toxicidade, é constituído por tímolo e tem atividade antifúngica contra *Candida* spp e *Microsporium canis* (FONTENELLE *et al.*, 2007).

A composição química e ação antifúngica do óleo essencial extraído a partir da folha de *Silene armeria* L., foram estudadas por (BAJPAI *et al.*, 2008), o qual apresentou uma mistura complexa de hidrocarbonetos olefínicos, mono e sesquiterpenos. Dos 28 compostos químicos identificados os que foram encontrados em maior quantidade foram: 1-buteno, metil-ciclopropano, 2-buteno e óxido de cariofileno. Os hidrocarbonetos terpenóides, característicos do azeite de *S. armeria*, porém encontrados apenas traços, foram: Cumarina (0,22%), eugenol (0,21%), a-humuleno (0,07%), farnesol (0,05%), linalol (0,12%), pentilfuran (0,09%), ácido acético benzênico (0,38%), ácido isovalérico (0,05%), b-mirceno (0,08%), 2-butanona (0,07%) e acetofenona (0,08%) Em relação ao efeito antifúngico foi comprovado contra *Fusarium osysporum*, *F. solani*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum capsici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinérea* e *Phizoctonia solani*. Constataram também um forte efeito contra a germinação de esporos.

Compostos químicos isolados a partir do óleo essencial extraído das folhas de *Calocedrus cacroleps* var. Florin Formosa, foram testados *in vitro* contra fungos patogênicos (*Rhizoctonia soloni*, *Fusarium oxysporum*, *F. solene*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Ganoderma australe* e *Penicillium solane*). A análise química permitiu a identificação dos monoterpênicos: α -pineno (44,2%), β -pineno (1,2%), limoneno (21,6%) e β -myrcene (8,9%), e dos sesquiterpenos: α -cadinol (1,6%), T-muurolol (1,1%), β -cariofileno (8,2%), óxido de cariofileno (2,4%). Os pesquisadores concluíram que os sesquiterpenos presentes foram mais eficientes do que os monoterpênicos, em particular o α -cadinol (1,6) e T-muurolol (1.1%). As fórmulas estruturais destes dois sesquiterpenos estão representadas na Figura 6. Os autores fizeram uma analogia comentando que os sesquiterpenos também fazem parte da composição química do petróleo (CHANG *et al.*, 2008).

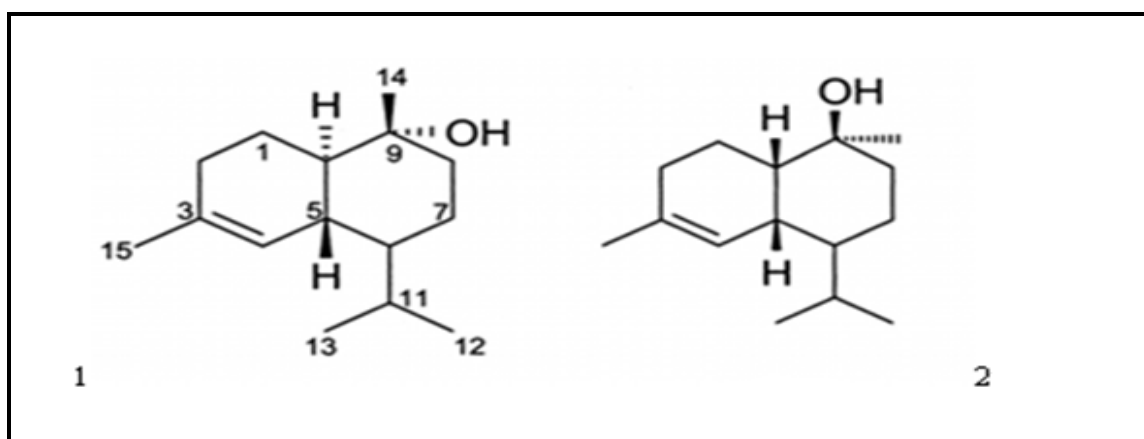


Figura 6 - Fórmula estrutural do α -cadinol (1) e T-muurolol (2). Fonte: The Pherobase (2010).

Origanum heracleoticum L (*Lamiaceae*), óleo essencial nativo da Europa mediterrânea, da Espanha a norte dos Balcãs e da Ásia, foi testado para a atividade antifúngica, cujos resultados das análise químicas revelaram 24 compostos, que representam 97% do total do óleo, os principais compostos foram: carvacrol (65%), seguido de timol (14,84%), β -felandreno (4,36%) e fenóis. O óleo apresentou características inibitórias contra as espécies fúngicas: *Cladosporium fulvum*, *C. cladosporioides*, *Penicillium girassol*, *P. magdonaldii* e *Trichophyton mentagraphytes*, as quais foram as mais suscetíveis, enquanto as mais resistentes foram *Trichophyton viride*, *Fusarium sporotrichoides*, *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp (DZAMIC *et al.*, 2008).

Extratos de *Bauhinia racemosa* Lamk. (raízes) foram obtidos para extração dos isolados polifenólicos: 1,7,8,12 b-tetra-hidro-2,2, 4-trimetil-10-metoxi-2H-benzo [6,7] ciclohepta [1,2,3] benzopirano-5, 9-diol (racemosol **1**); 1,7,8,12 b- tetra-hidro-2, 2,4-trimetil-2-benzo[6,7] ciclohepta [1,2,3] [1] benzopirano- 5,10,11- tril (**2**); 1,7,8,12 b-tetra-2, 2,4-trimetil-2H-benzo [6,7] ciclo [1,2,3] [1] benzopiran-5,9,10-triol (Di-O-metil racemol **3**), (Figura 7), foram selecionados para atividades antifúngicas (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Penicillium chrysogenu* e *Rhizopus stolonifer*) antibacterianas (*Bacillus thuringiensis*, *Enterobaccter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonie*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureos*). Todos os compostos isolados demonstraram excelente nível de atividade contra ambos, bactérias e fungos (JAIN, 2008).

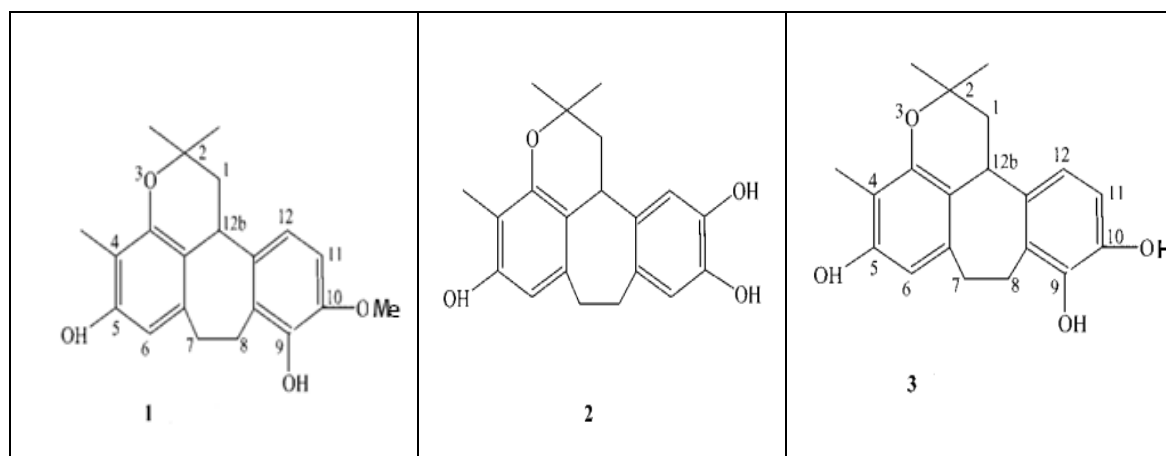


Figura 7 - Fórmulas estruturais de polifenólicos. Fonte: (JAIN, 2008).

Kordali *et al.* (2008) determinaram a composição química do óleo essencial das partes aéreas de *Origanum acutidens*, gênero botânico da família *Lamiaceae* e encontraram 27 monoterpenos, as maiores concentrações foram Carvacrol (87.0%), p-cimene (2.0%), linalol acetate (1.7%), borneol (1.6%) e b-cariofileno (1.3%). Tanto o óleo na forma integral como carvacrol puramente comercial, timol e p-cimeno, foram testados em 17 fungos fitopatogênicos (*Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Botrytis* sp., *Fusarium acuminatum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium nivale*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium solani*, *Monilinia* sp., *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia minor*, *Verticillium dahliae*), onde concluíram que o óleo essencial de *O. acutidens* e as substâncias comerciais (Carvacrol e Timol), inibiram completamente o desenvolvimento micelial de todos os fungos testados.

O óleo essencial das folhas de *Coriandro sativum* L. (Apiacea), obtido por hidrodestilação, foi analisado por cromatografia gasosa e espectrometria de massa, para avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana. Foram identificados 27 picos de 24 componentes que constituem 92,7% do óleo. Os constituintes predominantes foram aldeídos e álcoois, que representaram 56,1% e em menores quantidades os monoterpenos: linalol e α -pineno. O óleo foi testado para atividade antimicrobiana em bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus spp*), bactérias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiela pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*) e fungos (*Candida albicans*). A experiência revelou acentuada atividade antibacteriana e antifúngica contra todos os microorganismos testados, somente a espécie de bactéria *P. aeruginosa* apresentou resistência (MATOSOYOH *et al.*, 2009).

Liolios *et al.* (2009) estudaram a composição química do óleo essencial de *Origanum dictamnus* e testaram sua atividade antimicrobiana, foram identificados os seguintes componentes principais: Carvacrol, timol, p-cimeno, e γ -terpineno, os quais tiveram efeitos em três fungos patogênicos humanos: *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*. As fórmulas estruturais do p-cimeno e γ -terpineno estão apresentadas na Figura 8.

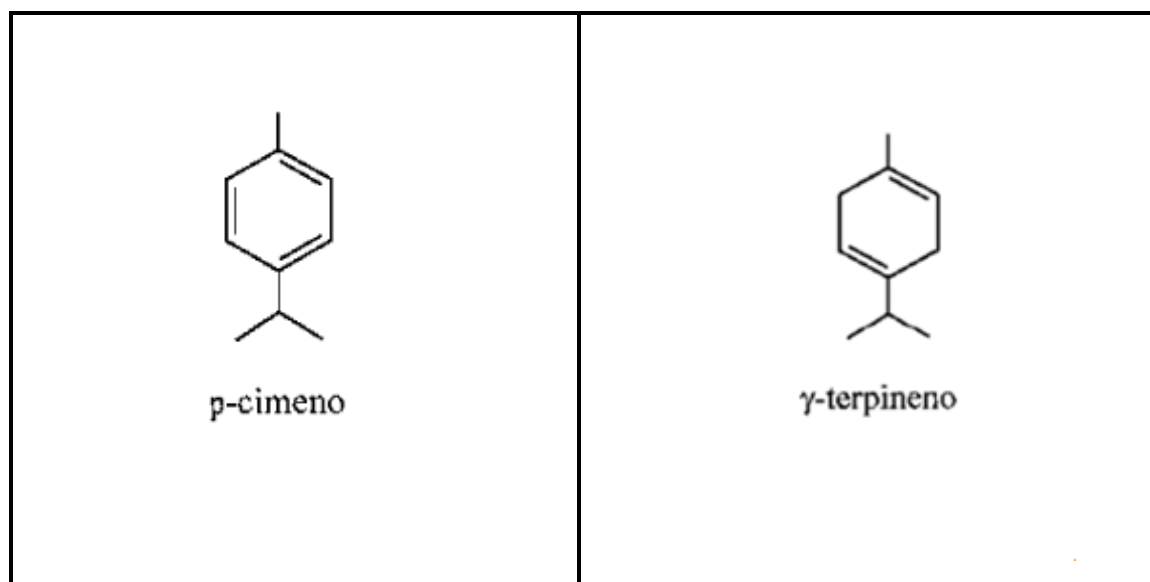


Figura 8 - Fórmulas estruturais do p-cimeno e γ -terpineno. Fonte: The Pherobase (2010).

Segundo Guerrini *et al.* (2009), os óleos essenciais das partes aéreas de *Piper aduncum* (corylinda) e *Piper obliquum* (Anis del Oriente), tiveram suas composições químicas determinadas e atividades microbiológicas comprovadas para bactérias Gram

positivas e Gram negativas e fungos dermatófitos e fitopatógenos. Em particular o óleo essencial *P. aduncum* foi ativo tanto contra dermatófitos como fitopatógenos e as análises cromatográficas revelaram 78% de sesquiterpenos aproximadamente.

Os óleos essenciais das folhas secas, pseudocaule e rizomas de *Alpinia conchigera* Griff. recolhidos da província Jeli de Kelantan, costa leste da península da Malásia, foram isolados por destilação e analisados por CGAR e GC-MS. Os compostos identificados foram: 18 monoterpenos (15,8%), 15 sesquiterpenos (36,2%), três ésteres (1,0%), dois aldeídos (1,3%), um hidrocarboneto (1,9%) e um fenol (7,5%) a partir do óleo das folhas. Os 15 monoterpenos (8,0%), 11 sesquiterpenos (51,1%), três ésteres (1,3%), dois aldeídos (0,2%), um fenol (2,4%) e um hidrocarboneto (3,0%) foram obtidos do pseudocaule. O óleo de rizoma deu 17 monoterpenos (25,7%), 15 sesquiterpenos (31,8%), três ésteres (0,8%), dois aldeídos (3,2%), um hidrocarboneto (0,6%) e um fenol (2,9%). Os óleos essenciais de todas as partes da planta estudada apresentaram inibição contra fungos dermatófitos e bactérias (IBBRAIN *et al.*, 2009).

Maxia *et al.* (2009), analisaram o óleo essencial *Daucus carota* L. oriundos de Sardenha (Itália) e de Portugal, ambos constituídos de monoterpenos e sesquiterpenos, variando apenas nas quantidades. O óleo da Sardenha apresentou como principais constituintes: β -bisaboleno (17,6-51,0%) e 11- α -(H) Himachal-4-en-1- β -ol (9,0-21,6%); o óleo de Portugal: acetato de geranyl (5,2-65,0%) e α -pineno (% 3.5-37.9). A atividade antifúngica desses óleos foi avaliada contra leveduras (*Candida krusei*, *C. guilliermondii*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*), dermatófitos (*Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *M. gypseum*) e três espécies de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*), e comprovada contra todos os fungos investigados.

A influência do aquecimento sobre a atividade antimicrobiana e composição química do óleo essencial de orégano nos seguintes microorganismos: *Candida albicans*, *C. crusei*, *C. tropicalis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella entérica* e *Serratia marcescens* foi avaliada por Souza *et al.* (2008), os quais concluíram que o aquecimento não interferiu significativamente sobre sua propriedade antimicrobiana, nem sobre a sua composição química.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser atribuída à presença de monoterpenos que, devido ao seu caráter lipofílico, agem interrompendo a membrana citoplasmática microbiana, que assim perde a impermeabilidade para prótons e íons maiores. Quando há alteração na integridade da membrana ocorre um comprometimento de todas as suas funções, não apenas a de barreira, mas também a de matriz para as enzimas e de equilíbrio energético. (CRISTIANI *et al.*, 2007)

Segundo Tsanuo *et al.* (1993) a ação germicida das substâncias presentes em óleos essenciais, é ocasionada pela interação do radical hidroxila, fortemente reativo, com os microorganismos, causando a desnaturação protéica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Teste do Netrix sobre o Desenvolvimento de Cinco Espécies de *Aspergillus*.

3.1.1 Local

As análises microbiológicas foram feitas no Laboratório de Atividades Antifúngicas (LAAF), pertencente ao Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas (NPMM), localizado no prédio do Projeto Sanidade Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, convênio UFRRJ/EMBRAPA.

3.1.2 Espécies fúngicas

Nos ensaios *in vitro*, foram utilizados fungos de interesse, disponíveis no Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRRJ. As espécies fúngicas de referência (Tabela 5) foram cedidas da coleção de Culturas Micológicas do Departamento de Biologia do Instituto Oswaldo Cruz - RJ,

Tabela 5 - Espécies fúngicas a serem utilizadas no estudo e suas respectivas referências

Espécies	Referências
<i>A. carbonarius</i>	(00437)
<i>A. flavus</i>	(00040)
<i>A. niger</i>	(00434)
<i>A. ochraceus</i>	(00145)
<i>A. parasiticus</i>	(00092)

3.1.3 Antifúngico

O antifúngico utilizado neste trabalho é constituído de compostos químicos orgânicos sintéticos, similares aos encontrados na maioria dos óleos essenciais extraídos de vegetais, os quais apresentam em suas fórmulas estruturais anéis aromáticos e radicais hidroxilas.

Segundo Tsanuo (1993), o radical hidroxila é responsável pela ação antifúngica das substâncias que o possuem, devido à sua característica altamente reativa. Este mecanismo de ação caracteriza-se pela interação entre a hidroxila do composto químico orgânico e os microorganismos, ocasionando a desnaturação protéica.

Cristiani *et al.*(2007) ao falar da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, atribui esta propriedade aos monoterpenos (substâncias que possuem anéis aromáticos). O mecanismo de ação dos monoterpenos ocorre através de seu caráter lipofílico, que age interrompendo a membrana citoplasmática, a qual perde a sua impermeabilidade para prótons e íons maiores, com esta alteração da membrana, desencadeia-se um desarranjo de todas as funções, não só a de barreira, mas a de matriz para as enzimas e a de equilíbrio energético. Em virtude desses desarranjos e desequilíbrio energético os microrganismos não conseguem se multiplicar.

3.1.4 Ensaios da atividade antifúngica

3.1.4.1 Preparo dos inóculos

Foram feitas suspensões em 2 mL de água destilada estéril das espécies cultivadas por sete dias em tubos de ensaio inclinados em meio Ágar Extrato de Malte (MEA - ANEXO A). Através destas suspensões homogeneizadas, efetuou-se a contagem de conídios e reservou-se as suspensões para as inoculações.

3.1.4.2 Contagem de conídios

As suspensões das espécies, devidamente preparadas, foram submetidas ao processo de contagem de conídios na câmara de Neubauer (hemacitômetro) 0,100 mm/ 0,0025 mm² - Hirschmann Technicolor. Uma pequena alíquota de aproximadamente 20 mm³ ou 0,02 mL foi colocada sobre a lâmina, e a seguir uma lamínula sobre esta, deixando-a em repouso por dois a três minutos, sendo em seguida levada para a leitura em microscópio óptico. Após a leitura foi feita uma média de número de conídios.mL⁻¹, a fim de proporcionar sempre uma contagem padronizada (CARVALHO, 1988), com adaptações. O número médio de conídios foi 10⁶ conídios.mL⁻¹.

3.1.4.3 Inoculação, incubação e leitura

Para as inoculações foi escolhido o método de plaqueamento em superfície (SILVA *et al.*, 1997). De cada espécie, inoculou-se nas placas contendo meio MEA, 0,1 ml da cultura em triplicata e espalhou-se com auxílio de alça de Drigalski, em seguida pulverizou-se 0,5 ml do produto, a 3% sobre a cultura, como testemunha deixou-se uma placa sem aplicação do produto, totalizando para este teste uma quantia de 4 placas para cada espécie de *Aspergillus*. As placas foram incubadas em estufa BOD, ajustada para 25° C. Para verificar o efeito do produto testado foram feitas avaliações com base nas leituras em diferentes períodos de incubação (48, 96 e 168 h). As leituras das placas foram: positiva para inibição de crescimento fúngico e negativa para crescimento fúngico.

3.2 Teste do Netrix sobre a Superfície Contaminada do Silo

O Teste do Netrix sobre a superfície contaminada do silo consistiu-se de várias etapas: Preenchimento do silo com milho previamente analisado, com contaminação comprovada; esvaziamento do mesmo para coleta das amostras (em triplicata), com a finalidade de observar se o milho contaminou a superfície interna do silo; tratamento do silo com o produto; Tomada de amostras após pulverização para avaliação do produto.

3.2.1 Tomada de amostras do milho

Inicialmente determinou-se umidade do milho (10,7 % b.u.), contido em uma saca, em seguida passou-se o milho pelo homogeneizador, coletou-se em sacos de papéis estéreis e pesou-se 100g de amostras em triplicata (A, B e C) em elermeyers estéreis (Figura 9) e em seguida levou-se ao laboratório de micologia para contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).g⁻¹.

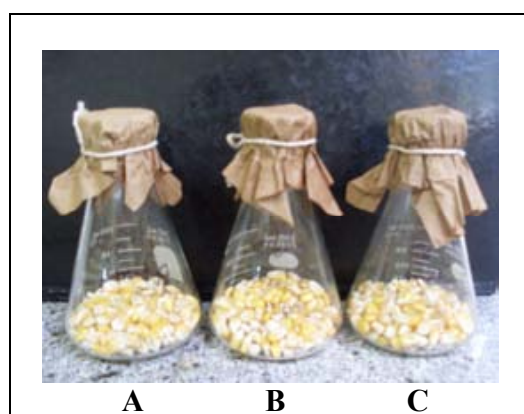


Figura 9 - Amostras do milho para contagem das UFC.g⁻¹

3.2.2 Inoculação e incubação

Foram utilizadas 25 g de cada amostra denominadas A, B e C, sendo procedida a diluição em 225 mL de água destilada esterilizada (diluição 1:10). As amostras foram diluídas até a diluição 1:1000. De cada uma das três diluições, alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para placas de Petri com o meio de cultura Agar Dichloran Rose Bengal Cloranfenicol (DRBC – ANEXO A), (KING *et al.*, 1979, HENSON 1981, TANIWAKI 1996), em duplicata para ser tirada a média da contagem das UFC.g⁻¹, segundo metodologia de diluição decimal seriada descrita por Pitt e Hoocking (1997). As placas foram incubadas em estufa BOD, ajustada para 25° C. Os meios de cultivo utilizados foram o DRBC, (KING *et al.*, 1979; HENSON 1981; TANIWAKI 1996). Todas as placas foram observadas diariamente e selecionadas para contagem dentre aquelas que apresentaram n° de colônias entre de 10 a 100 (DALCERO *et al.*, 1997).

3.2.3 Tomada de amostras do silo

O protótipo do silo de 1,5 m² de área superficial interna por 1 m de altura (Fig.10) foi preenchido com milho naturalmente contaminado, o qual permaneceu por 3 dias, em seguida foi retirado para realização das coletas para contagem das UFC.mL⁻¹. Amostras significativas foram coletadas com auxílio de swabs, de 20cm² da superfície interna de cada anel em tubos de ensaio contendo 10 ml de solução de transporte (solução salina com tween), o tween foi utilizado com a função de evitar aglomeração das colônias, e facilitar, portanto a contagem. A amostra coletada do anel do ápice denominou-se “Amostra A”, a coletada do anel do meio “Amostra M” e do anel da base “Amostra B”.



Figura 10 - Protótipo do Silo com três anéis

3.2.4 Inoculação, incubação e leitura

Para plaqueamento das amostras em superfície (SILVA *et al.*, 1997), inoculou-se 0,1 mL da amostra em meio de cultivo DRBC, (KING *et al.*, 1979; HENSON 1981; TANIWAKI 1996), em triplicata e espalhou-se com alça de Drigalsk, as placas foram levadas para estufa à 25 °C e observadas em diferentes períodos de incubação (48, 96 e 168 h) em seguida foi efetuada a contagem das UFC.mL⁻¹ e tiradas as médias.

3.2.5 Tratamento do silo com o produto

Foram pulverizados os anéis, do ápice, o mediano e o da base com o objetivo de avaliar a ação do produto sobre as colônias desenvolvidas. A pulverização foi aplicada de forma uniforme atingindo toda a superfície, com a utilização de 200 ml do produto.

3.2.6 Tomada de amostras após pulverização para avaliação do produto

Efetuada a pulverização foram coletadas amostras após 2 h, após 1 dia e após 6 dias com auxílio de swabs, introduzidas em tubos de ensaio, com 10 ml de solução transporte e levadas ao laboratório de micologia para avaliação, cuja metodologia foi a mesma do item 3.2.4.

3.3 Análises de Resíduo do Produto na Superfície do Silo

3.3.1 Tomada de amostras

As amostras para análise de resíduo do Netrix, por cromatografia líquida foram coletadas também com auxílio de swabs e introduzidas em tubos de ensaio contendo 10 mL de água destilada nos mesmos períodos que foram coletadas as amostras para a contagem de colônias.

3.3.2 Análise cromatográfica

A determinação de resíduo na superfície do silo foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR). Usando uma coluna YMC-Pack ODS-AM, 250 x 4,6 mm. A fase móvel: acetonitrila-água-ácido acético (40-60 v/v); fluxo: 1mL.min.⁻¹. O método de quantificação das amostras foi padrão externo, utilizando curva de calibração em três pontos (0,2; 0,4 e 0,6 mg.mL⁻¹).

3.4 Análises Estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com quatro épocas e três repetições (anéis do silo) e as análises realizadas em triplicata. Os dados das contagens de UFC foram previamente transformados em raiz quadrada e posteriormente analisados pela análise de variância (Teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (VIEIRA, 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito do Netrix sobre as Espécies Fúngicas

Para os testes micológicos foi escolhido o método de superfície, visto que os fungos por serem aeróbios, são inoculados preferencialmente na superfície do meio de cultura, podendo ser utilizado, em alguns casos, o método de plaqueamento em profundidade.

O Netrix foi testado sobre cinco espécies de *Aspergillus*. Avaliou-se os resultados pelo crescimento ou não dos fungos de acordo com o tempo de incubação.

A contagem de conídios através da câmara de Newbauer, foi padronizada em 10^6 conídios.mL⁻¹ para que nenhuma placa recebesse conídios a mais ou a menos em cada espécie testada. A distribuição dos conídios em cada uma das 4 placas por espécie de *Aspergillus* está representada na Tabela 6.

Tabela 6 - Quantidade de conídios distribuídos em placas contendo meio de cultura Ágar Extrato de Malte

Distribuição de Conídios	Espécies Fúngicas				
	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. parasiticus</i>
	3,1 x 10 ⁶	8,5 x 10 ⁶	9,4 x 10 ⁶	4,3 x 10 ⁶	4,7 x 10 ⁶

O meio de cultura escolhido para este teste foi o MEA por ser um meio que proporciona um bom estímulo para o desenvolvimento das colônias, bem como a produção de conídios e ainda por ter sido utilizado por Dugan *et al.* (1993) em seus testes.

A Figura 11 mostra o contraste das placas com e sem a presença do Netrix, em relação ao crescimento das colônias de fungos.

As substâncias químicas que compõe o Netrix apresentam toxicidade diretamente relacionada com a concentração a ser utilizada. A dosagem usada neste produto teve seu efeito tóxico comprovado para microrganismos, porém faz-se necessário novos estudos para averiguar os efeitos toxicológicos que o mesmo possa causar em animais.

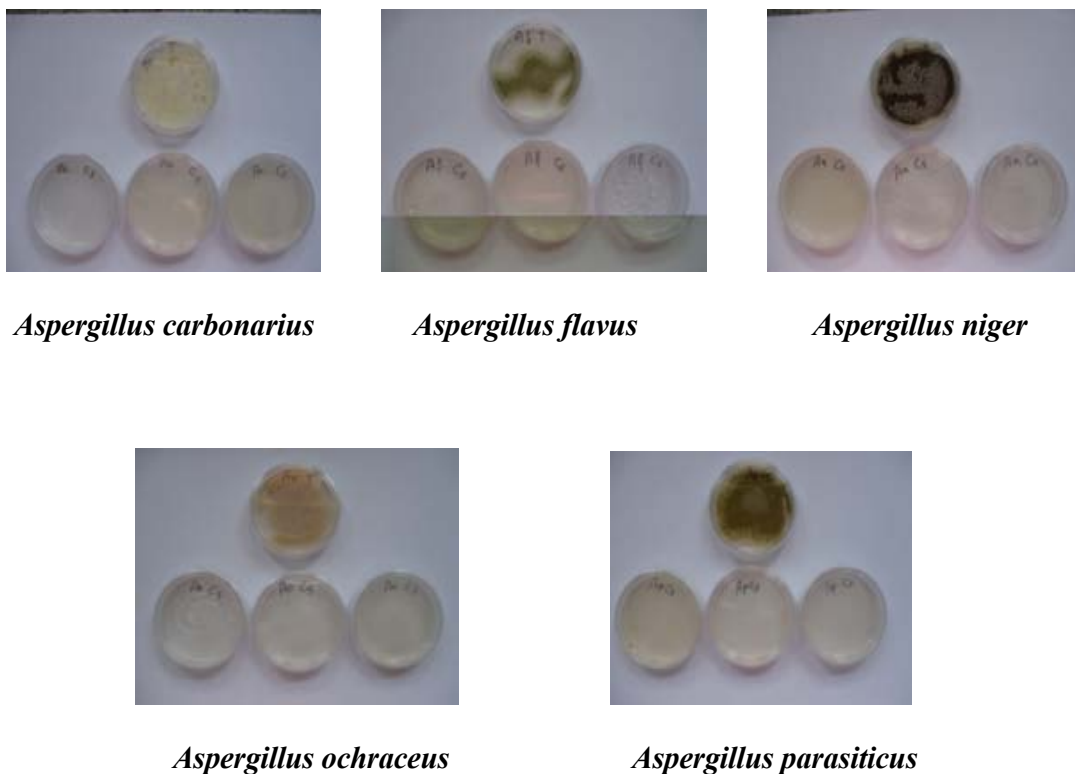


Figura 11 - Foto das placas contendo meio MEA, mostrando a inibição do crescimento de espécies de *Aspergillus*, causada pelo Netrix, com os devidos controles.

A Tabela 7 apresenta os resultados das leituras nos períodos de incubação (24, 48 e 168 h), as quais foram realizadas utilizando-se o símbolo de positivo para inibição do crescimento fúngico e negativo para o crescimento fúngico.

Tabela 7 - Avaliação da ação do netrix em espécies de *Aspergillus* a 25 °C em placas contendo Agar Extrato de Malte.

	Espécies fúngicas				
	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. parasiticus</i>
Netrix	+	+	+	+	+
Controle	-	-	-	-	-

Crescimento fúngico: (-) houve crescimento, (+) não houve crescimento.

Como pode-se observar na Figura 11 e na Tabela 7, os ensaios apresentaram os seguintes resultados: nas placas da posição superior das fotos, placas controle (meio + fungo) houve crescimento fúngico, porém nas placas da posição inferior das fotos, contendo em seu

interior (meio + fungo + Netrix) não houve crescimento, o que vem a comprovar a eficiência do produto testado contra as cinco espécies do gênero *Aspergillus*.

4.2 Efeito do Netrix sobre a Superfície Contaminada do Silo

Para avaliar o efeito do Netrix sobre a superfície do silo, inicialmente foi feita a contagem das colônias contaminantes do milho, a ser armazenado no silo, em amostras coletadas da saca, em triplicata (A, B e C), cujo resultado está apresentado na Tabela 8.

Para os testes de contagem também foi escolhido o método de plaqueamento em superfície, conforme o item (4.1), porém o meio de cultura utilizado foi o DRBC por ser um meio apropriado para contagem de colônias, pois a presença de Dicloran e Rosa de Bengala reduz o diâmetro das colônias de bolores e o cloranfenicol inibe o crescimento de bactérias presentes na amostra. Após a inoculação as placas devem ser incubadas durante cinco dias para permitir o desenvolvimento das colônias (KING *et al.*, 1979).

Tabela 8 - Contagem das U F C coletadas das amostras de milho.

	Amostra A	Amostra B	Amostra C
UFC.g ⁻¹	1,61 X 10 ⁴	7,2 X 10 ³	6,8 X 10 ⁴

A Tabela 8 expressa uma contaminação significativa das amostras do milho que foi utilizado para preenchimento do silo, o qual ficou armazenado por três dias.

As colônias contaminantes da superfície interna do silo, que foram coletadas após o mesmo ter sido esvaziado, podem ser observadas na Figura 12 e os resultados obtidos da média contagem destas colônias, como também a variância e o desvio padrão estão expressos na Tabela 9.



A



B



M

Figura 12 - Foto das placas contendo meio DRBC mostrando as colônias coletadas dos anéis do silo. Anel do ápice amostra (A); anel mediano amostra (M) e anel da base amostra (B).

Tabela 9 - Contagem das UFC coletadas das superfícies dos anéis do silo. Ápice (anel do ápice), Mediano (anel do meio) e Base (anel da base)

Anéis do Silo	Ápice	Mediano	Base
Média	365,0 UFC	730,0 UFC	213,0 UFC
Variância	31616,3	900,0	14741,3
Desvio Padrão	177,8	30,0	121,4

As amostras A, M e B, semeadas em triplicata, conforme mostra a Figura 12 têm as médias de suas contagens apresentadas na Tabela 9, a qual expõe uma contaminação significativa nas superfícies internas dos três anéis, sendo o anel mediano o mais contaminado. Estes resultados mostram a importância das análises microbiológica não só nos grãos, mas também nas superfícies dos silos que os armazenam.

4.2.1 Tratamento do silo

Observou-se efeito altamente significativo de tratamento sobre as colônias de fungos (anexo B).

O tratamento por pulverização do produto nas superfícies internas dos anéis foi avaliado através da observação das amostras coletadas após 2 h, 1 dia e 6 dias. As contagens antes e após o tratamento estão expressas nas tabelas e gráfico a seguir. A Tabela 10 expõe a contagem de colônias antes do tratamento e após tratamento em três épocas distintas. A

Tabela 11 mostra a média das contagens dos três anéis, antes e após tratamento com o produto, e se há diferença significativa entre as amostras. O gráfico da Figura 13 representa a eliminação das colônias fúngicas.

Tabela 10 - Redução das colônias de fungos nos três anéis do silo, após tratamento. Ápice (anel do ápice), Mediano (anel do meio) e Base (anel da base).

	ÁPICE UFC.mL ⁻¹	MEDIANO UFC.mL ⁻¹	BASE UFC.mL ⁻¹
Testemunha	365,0	730,0	213,0
Antifúngico 2 h	0,0	0,0	0,0
Antifúngico 1 dia	0,0	0,0	0,0
Antifúngico 6 dias	0,0	0,0	0,0

Tabela 11 - Médias de períodos de amostragem, onde letras diferentes apresentam diferença significativa (P<0,05).

Categorias	Médias UFC.mL ⁻¹	Contraste
Testemunha	436,2	a
Antifúngico 2 h	0,0	b
Antifúngico 1 dia	0,0	b
Antifúngico 6 dias	0,0	b

Como observado na Tabela 11, somente a testemunha apresentou diferença significativa em relação às demais amostragens.

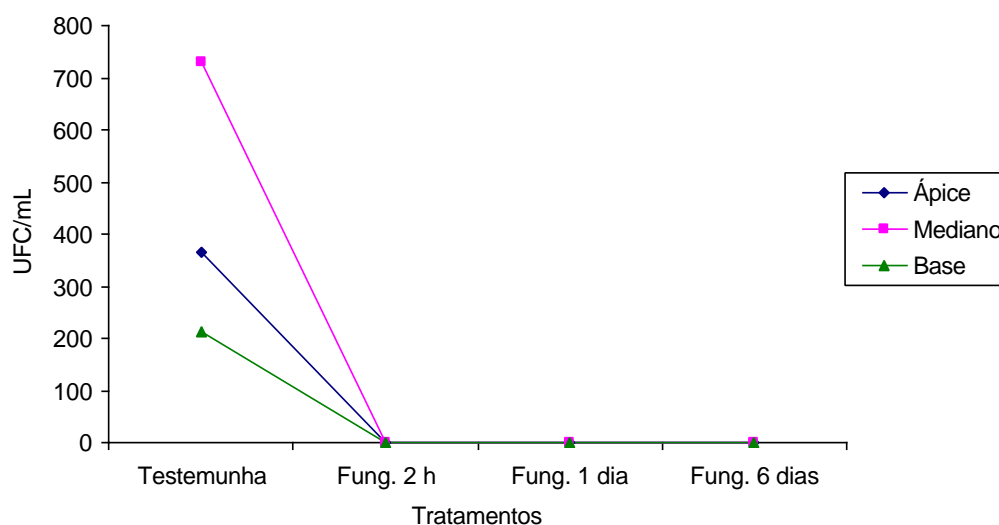


Figura 13 - Redução de colônias de fungos nos 3 anéis do silo, após tratamento com o Netrix.

Os ensaios apresentaram em seus resultados, em todas as coletas, inibição do desenvolvimento das colônias fúngicas já desenvolvidas nas superfícies internas dos anéis do

silo. Conforme os dados apresentados na Tabela 10 e no gráfico da Figura 13, houve uma redução total dos microorganismos já com 2 horas após o tratamento. Como podemos observar, esta redução total se manteve após 1 dia e após 6 dias, significando que nos três períodos observados, não houve o ressurgimento das colônias após a aplicação do produto

4.3 Análises de Resíduo do Produto na Superfície Interna do Silo

A Tabela 12 e Figura 14 expõem os valores da redução do resíduo do Netrix na superfície do silo, após a pulverização, dados obtidos através das análises cromatográficas.

Tabela 12 - Redução do resíduo do Netrix na superfície do silo, após tratamento.

Períodos	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Redução
2 h	0,3	-
1 dia	0,061	79,7%
6 dias	0,0	100,0%

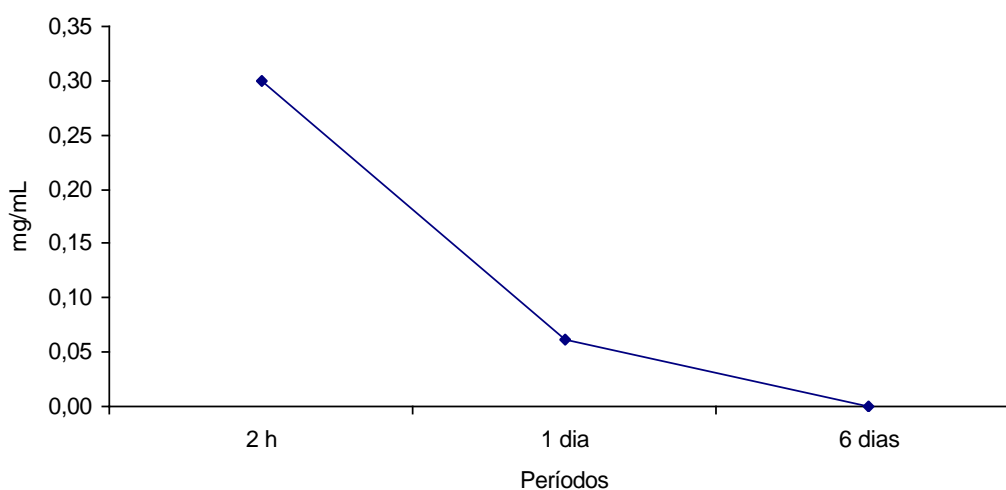


Figura 14 - Redução do resíduo de Netrix na superfície do silo, após tratamento.

Mostrado na Tabela 12 e no gráfico da Figura 14, após 2 h foi detectada através das análises a concentração de 0,3 mg.mL⁻¹, depois de 1 h houve uma redução de 79,7% atingindo a concentração de 0,061 mg.mL, após 6 dias não foi encontrado nenhum resíduo do produto na superfície do silo, o que vem a comprovar a volatilidade do mesmo.

Após a aplicação do produto até a evaporação do mesmo, observou-se que não houve corrosão na superfície interna do silo.

4.4 Ações de Antifúngicos sobre Microrganismos

4.4.1 Algumas substâncias químicas sintéticas testadas em microrganismos

Xavier *et al.* (2008) comprovaram a eficácia de uma substância química sintética denominada clorexidina, a qual possui Cloro em sua estrutura química, contra *Aspergillus*, diante dos resultados recomendaram o uso desta substância em programas de desinfecção ambiental, assim como a Clorexidina, o Netrix também pode ser usado para assepsia de ambientes, tendo em vista que foi testado em desinfecção de silo.

Foram observadas as informações do trabalho realizado por Helander *et al.* (1998), que utilizaram compostos químicos sintéticos como Carvacrol, trans-Cimaldeído, Carvona e Timol, os quais são similares aos existentes em óleos essenciais, nos tais foram avaliadas atividades inibitórias contra bactérias e os mecanismos que induzem a inibição dos microrganismos através desintegração da membrana plasmática, acarretando liberação de material intracelular para o meio externo, assim como diminuição do ATP intracelular. Neste trabalho também foi utilizado um composto químico sintético, similar a um composto químico orgânico presente em óleos essenciais.

Griogoletti (2007) avaliou em grãos armazenados, contaminados por fungos, a ação dos ácidos Propiônico, Benzóico, Acético e Sórbito, e observaram a eliminação das colônias fúngicas. Lee *et al.* (2008), no entanto avaliou o efeito do Ácido Clorogênico (CRA), um composto polifenólico, em artrite induzida em camundongos, provocada pela introdução da levedura *Candida albicans*, observaram a redução de 40% da artrite e inibição do crescimento da levedura. Segundo Krabbe *et al.* (1994) a ação antifúngica de cada uma destas substâncias, está associada ao caráter ácido, o qual reduz o pH das células fúngicas, com o pH intracelular baixo, os mesmos passam a ativar um mecanismo de controle, tentando atingir o equilíbrio, destinando toda a sua energia para este processo, ficando sem energia para a sua multiplicação. O composto químico usado na constituição do Netrix também possui caráter ácido.

4.4.2 Ação de alguns óleos essenciais sobre espécies do gênero *Aspergillus*

No estudo *in vitro* da toxicidade dos óleos essenciais de casca de canela (*Cinnamomum zeilanicum* Breyer) e de bulbilho de alho (*Allium sativum*) sobre o desenvolvimento micelial de *Aspergillus flavus*, *in vitro*, Viegas *et al.* (2005), inocularam 5×10^7 conídios.mL⁻¹ em meio Agar Dextrose Batata (BDA), pelo método da escavação (MORAES, 2000), incubaram a 20 °C, e observaram a inibição dos fungos, constatando a eficácia dos óleos essenciais. Omidbeygi *et al.* (2006), usando o mesmo meio de cultura, porém em temperatura de incubação de 25°C e concentração de conídios de 10^5 UFC.mL⁻¹, observaram que houve a inibição da mesma espécie de *Aspergillus*, usando os óleos essenciais de *Thyme*, *Summer Savory* e *Clove* (cravo). Dikbas *et al.* (2008), utilizando também o mesmo meio, só que em temperatura de 37 °C, avaliaram a ação antifúngica do óleo *Satureja hotensis* contra *Aspergillus flavus in vitro* a uma concentração de 1×10^6 conídios.mL⁻¹, avaliaram também em limões sobre condições de armazenamento e em ambas as condições o óleo foi eficaz. Kumar (2008), no entanto, usando uma temperatura de 27°C em uma experiência *in vitro* em meio BDA, testaram a ação do óleo de *Thymus vulgaris* (tomilho) contra *Aspergillus niger*, *A. fumigatus* e *A. terreus*, o percentual de inibição micelial foi calculado pelo diâmetro das colônias pelo método de Pandey *et al.* (1982), constatando que o óleo inibiu totalmente o crescimento micelial de todas as espécies e Tatisadjel *et al.* (2009) testaram a uma temperatura de 25°C em meio BDA, em concentração de $4,5 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹ de

Aspergillus flavus *in vitro* a eficácia do óleo *Lippia rugosa* e concluíram que ao crescimento micelial foi inibido. Neste estudo utilizou-se o meio MEA para avaliação *in vitro*, das cinco espécies de *Aspergillus*, a uma temperatura de 25 °C e uma quantidade média de 10⁶ conídios.mL⁻¹, observou-se que o Netrix inibiu todas as espécies.

4.4.3 Composição química de alguns óleos essenciais e ação sobre microrganismos

Bajpai *et al.* (2008) estudaram ação antifúngica do óleo essencial extraído a partir da folha de *Silene armeria* L., contra *Fusarium osyosporum*, *F. solani*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum capsici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* e *Phizoctonia solani*, *in vitro*, em meio BDA, uma temperatura de 25 °C, pelo método de difusão em disco (DURU *et al.*, 2003), o óleo foi eficaz contra todas as espécies testadas, já Chang *et al.* (2008) testaram *in vitro* contra os fungos patogênicos (*Rhizoctonia soloni*, *Fusarium oxysporum*, *F. solene*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Ganoderma australe* e *Penicillium solane*). os compostos químicos isolados a partir do óleo essencial extraído das folhas de *Calocedrus cacroleps* var. Florin Formosa, os monoterpenos testados foram: α -pineno (44,2%), β -pineno (1,2%), limoneno (21,6%) e β -myrcene (8,9%), e os sesquiterpenos: α -cadinol (1,6%), T-muurolol (1,1%), β -cariofileno (8,2%), óxido de cariofileno (2,4%) e tiveram a comprovação do efeito inibitório destes compostos em meio BDA a 26 °C. Kordali, *et al.* (2008), no entanto testaram *in vitro*, neste mesmo meio de cultivo, porém em 22 °C o óleo essencial das partes aéreas de *Origanum acutidens*, gênero botânico da família *Lamiaceae* na forma integral e as substâncias comerciais (carvacrol, timol e p-cimeno) em 17 fungos fitopatogênicos (*Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Botrytis sp.*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium nivale*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium solani*, *Monilinia sp.*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia minor*, *Verticillium dahliae*), onde concluíram que o óleo essencial integralmente, e os componentes comerciais cavacrol e timol, inibiram completamente o desenvolvimento micelial destes fungos. Ainda determinaram a composição química do óleo, dos 27 monoterpenos encontrados, as maiores concentrações foram Carvacrol (87,0%), p-cimene (2,0%), linalol acetate (1,7%), borneol (1,6%) e b-cariofileno (1,3%).

Guerrine *et al.* (2009) estudaram *in vitro* a atividade antifúngica dos óleos essenciais *P. aduncum* e *P. obliquum* contra fungos dermatófitos e fitopatogênicos, para tanto usaram a temperatura de 26 °C e método de difusão em disco, sendo o Sabourand dextrose agar (SDA) para fungos dermatófitos e BDA para fungos fitopatogênicos. Testaram também para bactérias Gram- (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* *Proteus mirabilis*) e Gram+ (*Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*), pelo método de difusão em disco. O óleo essencial testado foi eficaz tanto contra dermatófitos, fitopatogênicos, como para bactérias Gram+ e Gram-. Na determinação da composição química dos óleos encontraram os compostos (Thujene, α -pineno, β -pineno Camphene Myrcene, Phellandrene, Carene, Terpinene, p-cimeno, Cineole, Z- Ocimene, Limonene, E-Ocimene, Terpinene, Sabinene hydrate cis, Isoterpinolene, p-Cimeneno, Terpinolene Linalol, Sabinene hydrate trans, allo-Ocimene, Camphor, Terpinen-4-ol, Terpeneol cis- Piperitol, trans-Piperitol, Piperitone, Safrole, Elemene, Metil decanoate, Ylangene, Copene, Bourbonene, Cubebene, Elemene, Gurjunene, Caryophyllene, Copaene, Aromadendrene, Online, Muurolene, Bicyclogermacrene, Muurolene, Amorphene, Cubebol, Nonadecane, Myristicin, Humulene epoxyde, Dillapiol).

Ibrain *et al.* (2009), entretanto usando esse mesmo meio de cultura, conseguiram inibir fungos dermatófitos, porém a uma temperatura de 30 °C em experimento *in vitro* usando os óleos essenciais oriundos das folhas secas, pseudocaule e rizomas de *Alpinia conchigera*

Griff. Comprovaram ainda a eficiência dos mesmos óleos contra 4 espécies de bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, *in vitro* a uma temperatura de 35 °C usando caldo nutriente, segundo metodologia de Vandepitte *et al.* (1991). A composição química destes óleos também foi determinada e foram identificados os seguintes componentes (α -Pinene, Sabinene, β -Pinene, Myrcene, δ -3-Careno, p-Cymene, 1,8-Cineole, Limonene, (E)-2-octenal, γ -Terpinene, Terpinolene, linalol, α -epóxido Felandreno, cânfora, Terpinen-4-ol, mirtenal, α -terpineol, (E)-2-decenal, chavicol, acetato de bornilo, benzaldeído etílico, eugenol, δ -Elemene, Acetato de geranyl, α -Copaene, β -Elemene, (Z)-ciclododeceno, β -Caryophyllene, germacrene D, (E)- α -bergamotene, α -Humulene, (Z)- β -farneseno, zingibereno, β -Selinene, (E)- β -farnesene, acetato de Eugenil, β -bisaboleno, β -sesquifelandreno, β -Elemol, (E)-nerolidol, 3-tetradeceno-5-ino).

Maxia *et al.* (2009) estudaram a atividade antifúngica do óleo essencial *Daucus carota* L oriundo de dois lugares diferentes Sardenha e Portugal contra as seguintes cepas de fungos, *Cryptococcus neoforms*; *Candida krusei*, *C. guilliermondii*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*; *Aspergillus flavus*, *A. niger* e *A. fumigatus* e os dermatófitos: *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *T. canis*, *Microsporum canis* e *M. gypseum*. Cada isolado foi inoculado em Agar Sabouraud, os dermatófitos a 30 °C e *C. neoforms*, *Candida* spp e *Aspergillus* spp em 35 °C, numa concentração de $1-2 \times 10^3$ células para leveduras e $1-2 \times 10^4$ células para fungos filamentosos. Todas as amostras dos óleos essenciais inibiram as espécies fúngicas. Ainda estudaram as composições químicas dos óleos, os principais componentes do óleo de Sardinian são: β -bisabolene (17.6–51.0%) e 11- α -(H)-himachal-4-en-1- β -ol (9.0–21.6%) e os compostos predominantes das amostras de Portugal são acetato de geranyl (5.2–65.0%) e α -pineno (3.5–37.9%), com baixa quantidade de monoterpenos e alta quantidade de hidrocarbonetos sesquiterpênicos.

Jain (2008) partindo de extratos de *Bauhinia racemosa* Lamk. (raízes), obteve 3 isolados fenólicos: 1,7, 8, 12 b-tetra-hidro-2,2, 4-trimetil-10-metoxi-2H-benzo [6,7] ciclohepta [1,2,3] benzopirano-5, 9-diol (racemosol **1**); 1,7,8,12 b- tetra-hidro-2, 2,4-trimetil-2-benzo[6,7] ciclohepta [1,2,3] [1] benzopirano- 5,10,11- tril (**2**); 1,7,8,12 b-tetra-2, 2,4-trimetil-2H-benzo [6,7] ciclo [1,2,3] [1] benzopiran-5,9,10-triol (Di-O-metil racemol **3**) e testou a atividade antifúngica contra 5 espécies de fungos (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Penicillium chrysogenum* e *Rhizopus stolonifer*) e 6 espécies de bactérias (*Bacillus thuringiensis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*), utilizando o método de difusão em disco segundo Gould e Bowie (1952), dos microorganismos testados, os compostos isolados demonstraram atividade contra 3 espécies de *Aspergillus*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus* e 3 espécies de bactérias *Bacillus thuringiensis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.

Dzamic *et al.* (2008) testaram a atividade antifúngica do óleo de *Origanum heracleoticum* sobre as seguintes espécies fúngicas: *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium fulvum*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium sporotrichoides*, *Mucor mucedo*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochrochloron*, *Phomopsis helianthi*, *Phoma magdonaldii*, *Trichoderma viride*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*. Na determinação da composição química do óleo, encontraram os seguintes compostos: α -Thujene, Octen-3-ol, β -Mircene, α -Felandreno, α -Terpinene, p-Cymene, β -Felandreno, γ -Terpinene, α -Terpinolene, Linalol, α -Thujone, Camphor, Borneol, Terpinen-4-ol, α -Terpineol, Carvacrol metil éter, Timol, Carvacrol, Isocariofilene, α -Humulene, Germacrene D, β -Bisabolene, δ -Cadinene e Cariofilene oxide. Destes 24 compostos os principais foram: carvacrol (65%), seguido de timol, β -felandreno e fenóis. Os autores atribuíram o alto efeito antifúngico à alta quantidade de timol, carvacrol e

fenóis, as quais com suas estruturas semelhantes, são responsáveis pela atividade antifúngica do óleo.

Silva *et al.* (2005) testaram *in vitro*, com incubação a 25 °C, paralelamente extrato da folha de *Ocimum gratissimum* e o Eugenol nos dermatófitos *Microsporum canis*, *M.ypseum*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*, tanto o óleo como o Eugenol foram eficaz contra os fungos testados. O Eugenol é o principal constituinte de óleo essencial *Ocimum gratissimum* (LEMOS *et al.* 2005) e sua estrutura química é similar à do Timol, Carvacrol e Fenol, já Teles (2003) estudando o óleo essencial de pau-rosa, encontrou como constituinte majoritário o Linalol, e como constituintes minoritários α -terpinol, 1,8-cineol, α -pineno, geraniol, citronelal, limoneno, pineno e acetato de linalol. O Linalol possui estrutura química também semelhante ao Eugenol e demais substâncias citadas. O óleo de pau-rosa foi testado *in vitro* através do método de difusão em disco contra as bactérias patogênicas *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio auginolyticus* e *Serratia* spp e apresentou eficiência sobre todas estas bactérias, no entanto Fontenelle *et al* (2007) estudando a composição química do óleo essencial de *Lippia siloids* Cham, encontraram como constituintes Timol (59,65%), E-cariofilene (10,60%) e p-cimene (9,08%), testaram *in vitro* a atividade antifúngica deste óleo contra *Candida* spp e *Microsporum canis*, e comprovaram a sua eficiência tanto par o fungo dermatófito quanto para a levedura.

Os óleos essenciais testados por Bajpai *et al.* (2008), Chang *et al.* (2008), Kordali, *et al.* (2008), Guerrine *et al.*(2009), Ibrain *et al.* (2009), Maxia *et al.* (2009), Jain (2008), Dzamic *et al.* (2008), Silva *et al.*(2005), tiveram suas atividades antimicrobianas comprovadas em sua maioria contra fungos e o de *Bauhinia racemosa*, contra fungos e bactérias e ainda suas composições químicas determinadas. Esses autores encontraram uma grande variedade de compostos químicos, predominantemente monoterpenos e/ou sesquiterpenos, sendo que cada óleo essencial apresenta uma composição química peculiar, porém com características comuns em suas fórmulas estruturais, como podemos observar nas suas estruturas químicas da revisão bibliográfica deste trabalho, a presença da hidroxila e do anel benzênico ou de compostos derivados de anel benzênico é uma constante em todos os óleos estudados. O Netrix também apresenta essa característica em comum com os óleos essenciais.

5 CONCLUSÕES

O Netrix mostrou atividade antifúngica *in vitro* contra *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. parasiticus*, impedindo o desenvolvimento destes microorganismos e também *in locus*, por eliminar totalmente as colônias fúngicas encontradas infectando as superfícies internas dos anéis do silo.

A característica volátil do produto foi comprovada pela análise cromatográfica, usando o método de quantificação das amostras com padrão externo através da curva de calibração. Esta volatilidade confere ao produto uma vantagem significativa para uso em instalações, abastecimentos e processamentos de alimentos.

6 SUGESTÕES

Com o resultado deste trabalho evidencia-se a importância e a necessidade do emprego de Boas Práticas de Armazenagem, incluindo a utilização de desinfecção das superfícies internas de silos, através da pulverização com Netrix, antes do carregamento e após uma operação de descarga, a fim de evitar o desenvolvimento de fungos potencialmente toxigênicos, tendo em vista que os fungos mais frequentes em armazenamento são do gênero *Aspergillus*.

Sugere-se o uso deste produto para desinfecção de armazéns, moinhos, moegas, elevadores, transportadores de grãos, equipamentos, ambientes de manuseio e processamento de produtos agrícolas e indústrias de alimentos de um modo geral.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, A. N. Micotoxinas: importância na alimentação. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 2, p. 161- 163, 2004.
- ANGLE, J.S; DUNN, K. A; WAGNER, G. H. Effect of cultural practices on the soil populations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 46, n. 2, p. 301-303, 1982.
- BAJPAI, V. K.; SHUKA, S.; KANG, C. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. **Journal Bioresource Technology**, v. 99, p. 8903-8908, 2008.
- BAKKER-ARKEMA, F. W. **CIGR. Handbook of Agricultural Engineering**. Volume IV Agro-processing Engineering, Published of American Society of Agricultural Engineers. 1999, 527p.
- BERJAK, P. Stored seeds: the problems caused by microorganisms. In: ADVANCED INTERNATIONAL COURSE ON SEED PATHOLOGY, Passo Fundo, 1987. **Proceedings**. Passo Fundo: EMBRAPA; ABRATES, 1987. p. 93-112
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria n. 183 do Ministério da agricultura e da reforma agrária. Art I Adotar regulamento técnico do MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho, aprovado pela resolução n. 56/94 do grupo Mercado comum do Sul de 01 de janeiro de 1995. Diário Oficial da União, Brasília, 25 mar de 1996.
- BRASIL. Resolução n.34/76 da omissão Nacional de Normas e padrões para alimentos. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 19 jan.1977.Seção I, t.I, p.710
- BRASIL. Resolução RDC nº 274 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de out. de 2002.
- BROOKER, M. I. H., KLEINIG, D. A. **Field Guide to Eucalyptus**. Melbourne: Bloomings, 2006.
- CARVALHO, W. F. **Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia**, 5. ed Belo Horizonte: Coop. Ed. Cult. Médica Ltda., 1988, 270 p.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424 p.
- CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Fungos associados à semente de milho produzida nas regiões sul e sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 370-373, 1998.
- CERQUEIRA, M. C. M. Anti-sepsia princípios gerais e anti-sépticos. In: **Infecções hospitalares prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier, 1997. Cap.4, p. 426-434.

CHANG, H. T; CHANG Y. H; WU, C. L; CHANG, S. T; CHANG, T. T; SU, Y. C. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. formosana Florin leaf against plant pathogenic fungi. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6266-6270, 2008.

CHAAR, J. da S. **Estudos Analíticos e modificação por acetilação do linalol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie Aniba duckei K.** São Carlos. 2000, 125 p. Tese (Doutorado) – IQSC, USP.

CHEM Blink Online Database of Chemicals from Around the World. Disponível em: <<http://www.chemblink.com/index.htm>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2010.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira. Grãos. Safra 2008/2009-Oitavo levantamento-maio 2009. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/8graos_08.09.pdf>. Acesso em: 25 novembro 2009.

CORRÊA, B. Fungos toxigênicos: panorama nacional. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS E SIMPÓSIO DE ARMAZENAMENTO QUALITATIVAS DE GRÃOS DO MERCOSUL, 9, 1998, Florianópolis. Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos. Florianópolis: Vildes M^o. Scussel, 2000. p. 162-168.

CRISTIANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, V. M. G.; MICIELE, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 6300–6308, 2007.

CRUZ, L. C. H. **Micotoxinas: Perspectiva Latino Americana.** Ed. Universitária. Seropédica. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996, 261p.

DALCERO, A.; Magnoli, C.; Chiacchiera, S.; Palacios, G.; Reynoso, M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 137, p. 179-184, 1997.

DA SILVA, D. A. R.; DA COSTA, M. M; VARGAS, A. C.; ALIEVI, M. M.; SCHOSSLER, J. E. W; DA SILVA, T. R. O Gluconato de Clorexidina ou o álcool-iodo-álcool na anti-sepsia de campos operatórios em cães. **Ciência Rural**, v. 30, n. 3, p. 431-437, 2000.

DIKBAS, N; KOTAN, R; DADASOGLU, F; SAHIN, F. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 179-182, 2008.

DUGAN, F. M.; GROVE, G. G.; ROBERTS, J. D. Comparative studies of *Cryptosporiopsis curvispora* and *C. perennans*. I. Morphology and pathogenic behavior. **Mycologia**, v. 85, p. 551-564, 1993.

DURU, M. E.; ÇAKIR, A.; KORDALI, S.; ZENGİN, H.; HARMANDAR, M.; IZUMI, S.; HIRATA, T. Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three Pistacia species. **Fitoterapia**, v. 74, p. 170–176, 2003.

DZAMIC, A.; SOKOVIC, M.; RISTIC, M. S.; GRUJIC-JOVANOVIC, S.; VUKOJEVIC, J.; MARIN, P.D. Chemistry activity of *Origanum heracleoticum* essential oil. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 44, n. 5, 2008.

FARONI, L. R. A. Principais pragas de grãos armazenados. In: ALMEIDA, F. de A. C.; HARA, T.; CAVALCANTI MATA, M. E. R. M. **Armazenamento de grãos e sementes nas propriedades rurais**. Campina Grande: UFBP/SBEA, 1997. p. 189-291.

FOWLER, J. L., SCHUH, J. C. L. Preoperative chemical preparation of the eye a comparison of chlorhexidine diacetate, chlorhexidine gluconate, and povidone-iodine. **J. Am. Anim. Hos. Assoc.**, v. 28, p. 451-457, 1992.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Braz. J. Parm. SC**, v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; KERNTOPF, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; TOME, A. R.; QUEIROS, M. G. R.; NASCIMENTO, N. R. E.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. E. G. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 934-940, 2007.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia e Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Ed.Artmed, 2002, 424p.

GOULD, J. C; BOWIE, J. H. The determination of bacterial sensitivity to antibiotics. **Edinb. Med. J.**, v. 59, p. 178-180, 1952.

GRIGOLETTI, C. **Associação de ácidos orgânicos no controle de fungos em Grãos de milho armazenados**. Curitiba. 2007, 62p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná.

GUERRINI, A.; SACCHETTI, G.; ROSSI, D.; PAGANETTOA, G.; MUZZOLI, M.; ANDREOTTI, E.; TOGNOLINI, M.; MALDONADOD, M. E.; BRUNI, R. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, p. 39-48, 2009.

HAUGEN, E., JOHANSEN, J. R. Sensitization of guinea pigs with chlorhexidine. **Acta Odont. Scand**, v. 32, n. 3, p. 173-175, 1974.

HELANDER, M. I.; ALAKOMI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-positive bacteria. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.

HENSON, E. O.. Dicloran as an inhibitor of mold spreading in fungal plating media: effects on colony diameter and enumeration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 656-660, 1981.

HILL, R.A.; BLANKENSHIP, P. D.; COLE, R. J.; SANDERS, T. H. Effects of soil moisture and temperature on preharvest invasion of peanuts by the *Aspergillus flavus* group and subsequent aflatoxin development. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 45, n. 2, p. 628-633, 1983.

HUSSEIN, S. H., BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism and impact of micotoxins on humans e animals. **Toxicology** , v. 167, n. 2, set, p 101-134, 2001.

IANNACONE, J.; AYALA, H.; ROMÁN, A. Efectos toxicologicos de cuatro plantas sobre el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* Motschulsky 1855 (Coleoptera: Curculionidae) y sobre el gorgojo de las galletas *Stegobium paniceum* (Linnaeus 1761) (Coleoptera: Anobiidae) en Peru. *Gayana*, v. 69, n. 2, p. 234-240, 2005.

IBRAHIM, H.; AZIZ, A. N.; SYAMSIR, D. R.; ALI, N. A. M.; MOHTAR, M.; ALI, R. M.; AWANG, K. Essential oils of *Alpinia conchigera* Griff. and their antimicrobial activities. **Food Chemistry**, v. 113, p. 575–577, 2009.

JAIN, R.; SAXENA, U.; RATHORE, K.; C. JAIN, S. C. Bioactivities of Polyphenolics from the Roots of *Bauhinia racemosa*. **Archives of Farmacol Research**, v. 31, n. 12, p. 1525-1529, 2008.

KING, A. D.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 959-964, 1979.

KORDALI, S; CAKIR, A.; OZER, A. CAKMAKCI, R; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8788–8795, 2008.

KRABBE, E. L.; PENZ JR, A. M.; LAZZARI, F. A.; REGINATTO, M. F. Efeito da umidade e do ácido propiônico sobre as características bromatológicas e microbiológicas de grãos de milho. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, Santos, 1994. Anais, Campinas: Facta, 1994 p.27.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRASAD, C. S.; DUBEI, N.K. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 575–580, 2008.

KUMEDA, Y.; ASSAO, T. Heteroduplex panel analysis, a novel method for genetic identification of *Aspergillus flavi* strain. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 67, n. 9, p. 4084-4090, 2001.

LANGENHEIM, J. H., Higher plant terpenoids: a phyto-centric overview of their ecological roles. **J. Chem. Ecol**, v. 20, p. 1223–1280, 1994.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2ª ed. Curitiba: Paraset, 1997.

LEE, J. H.; PARK, J. H.; KIM, Y. S.; Yongmoon HAN, Y. Chlorogenic acid, a polyphenolic compound, treats mice with septic arthritis caused by *Candida albicans*. **Journal International Immunopharmacology**, v. 8, n. 12, p. 1681-1685, 2008.

LEMOS, J. A.; PASSOS, X.S; FERNANDES, O. F. L. Antifungal Activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 100, p. 55-58, 2005.

LIOLIOS, C. C.; GORTZI, O.; LALAS, S.; TSAKNIS, J.; CHINOU. I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. **Food Chemistry**. v. 69, n. 1, p. 77-83, 2009.

MALMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; WENTZ, I. Aflatoxinas – Aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. *Ciência Rural*, v. 24, n. 3, p. 635-643, 1994.

MARTINS, E. R. CASTRO, D. M. de; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: Editora UFV. Universidade Federal de Viçosa, 2000.

MATIOLI, J. C.; ALMEIDA, A. A. Alterações nas características químicas dos grãos de milho causados pela infestação do *Stophilus orizae*. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 4, p. 36-46, 1979.

MATOSOYOH, J. C.; MAIYO, Z. C.; NGURE, R. M.; CHEPKORIR, R. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 526-529, 2009.

MAXIA, A.; MARONGIU, B.; PIRAS, A.; PORCED, S.; TUVERI, E.; GONÇALVES, M. J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Chemical characterization and biological activity of essential oils from *Daucus carota* L. subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast. **Fitoterapia**, v. 80, p. 57–61, 2009.

MERONUCK, R. A. The significance of fungi in cereal grains. **Plant Disease**, v. 71, p. 287-291, 1987.

MONTROSS, J. E.; MONTROSS, M. D.; BAKKER-ARKEMA, F. W. Grainstorage. In: BAKKER-ARKEMA, F. W. (ed.). **CIGR handbook of agricultural engineering**. St. Joseph: ASAE, v. 4, p. 46-59, 1999.

MONGELLI, E; DESMARCHELIER, C.; COUSSIA, J.; CICCIA, G. Actividad antimicrobiana e interacción com el ADN da plantas medicinales de la amazônia Peruana. **Rev. Arg. Microbiol**, v. 27, p. 199-203, 1995.

MORAIS, L. A. S. **Atividade antimicrobiana de extratos de algumas plantas medicinais sobre fitopatógenos do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. Rio de Janeiro. 2000. 109 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

MOUCHREK FILHO, V. E. **Estudos Analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie *pimenta dióica limdl***. São Carlos. 2000, 124p. Tese (Doutorado) – IQSC, USP.

- OMIDEYGI, M.; BARZEGAR, M.; HAMID, Z.; NAGHDIBADI, H. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. **Food Control**. v. 18, p. 1518-1523, 2007.
- PANDEY, D. K.; CHANDRA, H.; TRIPATHI, N. N. Volatile fungitoxic activity in higher plants with special reference to that of *Callistemon lanceolatus* D.C. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 105, p. 175-182, 1982.
- PEIXOTO, A. R.; TORRES, S. B.; KARASAWA, N. Qualidade sanitária de sementes de milho produzidas no submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, p. 12-15, 1998.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**, second edition. London: Black Academic & Professional, 1997, 593p.
- PORTER, R. B. R.; REESE, P. B.; WILLIAMS, L. A. D.; WILLIAM, D. J.; Acaricidal and insecticidal activities of cadina-4, 10(15)-dien-3-one. **Phytochemistry**, v. 40, n. 3, p. 735-738, 1995.
- PUUZI, D. **Abastecimento e Armazenamento de grãos**. Campinas-SP: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 2ª ed., 2000. 666p.
- REIS, A. C.; REIS, E. M.; CASA, R. T.; FORCELINI, C. A. Erradicação de fungos patogênicos associados a sementes de milho e proteção contra *Pythium* sp. presente no solo pelo tratamento com fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 585-590, 1995.
- RUSSEL, G. B.; HUNT, M. B.; BOWERS, W. S.; BLUNT, J. W. A sesquiterpe-noid ant repellent from *Dysoxylum spectabile*. **Phytochemistry**, v. 35, p. 1455-1456, 1994.
- SABINO, M.; INOMATA, E. I.; LAMARDO, L. C. A. Variação dos níveis de aflatoxina B1 em pasta de amendoim e paçoca consumidas no estado de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 39-44, 1982.
- SANCHEZ, R.; SWAIM, S.; NUSBAUM, K. E. Effects of chlorhexidine diacetate and povidone-iodine on wound healing in dogs. **Vet. Surg.**, v. 17, n. 6, p. 291-295, 1998.
- SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144 p.
- SILVA, J. S.; CAMPOS, M. G.; SIVEIRA, S. F. R. Armazenagem e comercialização de grãos no Brasil In: **Secagem e Armazenagem de Produtos Agrícolas**. Pós- Colheita, 2ª ed., 2008a. Cap. 1, p.1-17.
- SILVA, J. S.; AFONSO, A. D. L. DONZELLES, S. M. L.; NOGUEIRA, R. M. Secagem e secadores In: **Secagem e Armazenagem de Produtos Agrícolas**. Pós- Colheita, 2ª ed., 2008b. Cap. 5, p.109-146.
- SILVA, J. S.; LACERDA, NOGUEIRA, R. M.; RESENDE, R. R. Estrutura para Armazenagem de Grãos In: **Secagem e Armazenagem de Produtos Agrícolas**. Pós- Colheita, 2ª ed., 2008c. Cap. 14, p. 1343-370.

SILVA, J. S.; LACERDA,; NOGUEIRA, R. M. Manuseio de Grãos In: **Secagem e Armazenagem de Produtos Agrícolas**. Pós- Colheita, 2ª ed., 2008d. Cap. 12, p. 297 -323.

SILVA, J. S. **Pré-processamento de Produtos Agrícolas**. Juiz de Fora - MG: Instituto Maria, 1995, 509 p.

SILVA, M. R. R.; OLIVEIRA JR, J. G.; FERNANDES O. F. L.; PASSOS, X. S.; COSTA, C. R.; SOUZA, L. K. H.; LEMOS, J. A.; PAULA, J. R. Antifungal activity of *Ocimum gratissimum* towards dermatophytes. **Mycoses**, v. 48, p. 172-175, 2005.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C.; SILVEIRA, N. F. A.. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.

SIMÕES, C. M. O. SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: Ed. da UFRG, 2003.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; BARBOSA FILHO, J. M.; MARQUES, M. O. M. Interferência do aquecimento sobre a atividade antimicrobiana e composição química do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 28, n. 2, 2008.

TANIWAKI, M. H. Meios de cultura para contagem de fungos em alimentos. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 30, p. 132-141, 1996.

TATSADJIEU, N. L.; DONGMO, J.; NGASSOUMB, 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**, v. 20, p. 161–166, 2009.

TELLES, R. M. **Estudo Analítico do linalol contido no óleo essencial extraído de galhos da espécie Anibal duckei K e sua aplicação como agente bactericida**. São Luís, 2003, 99p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Maranhão.

THE PHEROBASE Database of Pheromoners and Semiochemicals. Disponível em: <http://www.pherobase.com>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2010.

TSANUO, M.K.; HASSANALI, A.; JONDIKO, I.J.O.; TORTO, B. Mutangin, a dihydroagarofuranoid sesquiterpene insect antifeedant from *Elaeodendron buchananii*. **Phytochemistry**, v. 34, p. 665-667, 1993.

TUITE, J.; KOH-KNOX, C; STROSHINE, R.; CANTONE, F.A.; BAUMAN, L.F. Effect of physical damage to corn kernels on the development of *Penicillium* species and *Aspergillus glaucus* in storage. **Phytopathology**, v. 75, p. 1137-1140, 1985.

VANDEPITTE, J.; ENGBACK, K.; PIOT, P.; HEUCK, C. C. **Basic microbiology procedures in clinical bacteriology**. Geneva: World Health Organization, vol. 85, 1991.

VIEGAS, E. C., SOARES, A.; CARMO, M. G. F.; ROSSETO, C. A. V. Toxidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 915-919, out -dez 2005.

VIEIRA, S. **Análise de variância** (ANOVA). São Paulo: Atlas, 2006, 204 p.

WETZEL, M. M. V. S. Fungos de armazenamento. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. S. (Ed.) **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 260-275.

WILLIAMS, D. G. The chemistry of essential oils. England: Micelle Press, 1996, 334 p.

XAVIER, M. O.; MEINERZ, A. R. M.; CLEFF, M. B.; OSÓRIO, L. G.; SCHUCH, L. F. D.; NOBRE, M. O.; SILVA FILHO, R. P.; MEIRELES, M. C. A. Eficácia da clorexidina-cetrimida na desinfecção ambiental contra *Aspergillus* spp. **Arq. Brás. Med. Vet. Zootec.**, v. 60, n. 4, p. 873-877, 2008.

ANEXOS

Anexo A – Composição dos meios de cultivo utilizados nos ensaios

Anexo B – Quadro de Análise de Variância

ANEXO A

Composição dos meios de cultivo utilizados nos ensaios.

- **Agar Extrato de Malte (MEA)**

Extrato de malte.....	20 g
Peptona bacteriológica.....	1 g
Glicose.....	20 g
Ágar-ágar.....	20 g
Água destilada.....	1000 mL

Esterilizar por autoclavação a 121 °C por 15 min (PITT; HOCKING, 1997).

- **Agar Dichloran Rose Bengal Cloranfenicol (DRBC)**

Glicose.....	10 g
Peptona Bacteriológica.....	5 g
Hidrogenofosfato de Fosfato de Potássio Monobásico (KH ₂ PO ₄).....	1 g
Sulfato de Magnésio Pentahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O).....	0,5 g
Ágar.....	15 g
Rose Bengal ^a	25 mg
Dichloran ^b	2 mg
Cloranfenicol.....	100 mg
Água destilada.....	1 L

^a 5% m/v em água, usar 0,5 mL

^b 0,2% m/v em etanol, usar 1 mL

Após a adição e mistura de todos os ingredientes esterilizar por 121 °C por 15 minutos. O pH final deverá estar entre 5,5 e 5,8. Armazenar o meio preparado protegido da luz, pois os fotoprodutos de Rose Bengal são altamente inibidores de fungos, especialmente leveduras (PTT; HOCKING, 1997).

ANEXO B

Quadro de análise de Variância

F. V.	GL	S.Q.	Q.M.	F de Fisher	Pr > F
Tratamentos	3	2471,93	823,98	75,28	< 0,0001 ^{***}
Blocos (anéis)	2	58,16	29,08	2,66	0,087 ^{ns}
Erro experimental	30	328,36	10,95		
Total	35	2858,45			

Fonte: VIEIRA (2006).