



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

BRUNA APARECIDA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE MICROSTRUTURAS E DESCONTAMINAÇÃO  
FÚNGICA DE MILHO (*Zea Mays* L.) POR MÉTODOS BRANDOS: NATURAL -  
ANDIROBA AMAZÔNICA (*Carapa guianensis* Aubl.) E INSTRUMENTAL - PLASMA  
FRIO**

Florianópolis  
2024

BRUNA APARECIDA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE MICROSTRUTURAS E DESCONTAMINAÇÃO  
FÚNGICA DE MILHO (*Zea Mays* L.) POR MÉTODOS BRANDOS: NATURAL -  
ANDIROBA AMAZÔNICA (*Carapa guianensis* Aubl.) E INSTRUMENTAL - PLASMA  
FRIO**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, para obtenção do título de Doutora em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Giustino Tribuzi

Florianópolis  
2024

Bruna Aparecida da Silva

**Caracterização de Microestruturas e Descontaminação Fúngica de Milho (*Zea Mays* L.)  
por Métodos Brandos: Natural - Andiroba Amazônica (*Carapa guianensis* Aubl.) e  
Instrumental - Plasma Frio**

O presente trabalho em nível de **Doutorado** foi avaliado e aprovado em 01/07/2024 por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof., Dr. Pedro Luiz Manique Barreto  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof.(a), Dr.(a) Vildes Maria Scussel  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof.(a), Dr.(a) Mercedes Gabriela Ratto Reiter  
Universidade de Blumenau  
Dr.(a) Raquel da Silva Simão  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para a obtenção do título de Doutora em Ciência dos Alimentos.

Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Prof. Dr. Giustino Tribuzi  
Orientador

Florianópolis, 2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.  
Dados inseridos pelo próprio autor.

da Silva, Bruna Aparecida  
CARACTERIZAÇÃO DE MICROSTRUTURAS E DESCONTAMINAÇÃO  
FÚNGICA DE MILHO (*Zea Mays* L.) POR MÉTODOS BRANDOS: NATURAL  
ANDIROBA AMAZÔNICA (*Carapa guianensis* Aubl.) E  
INSTRUMENTAL - PLASMA FRIO / Bruna Aparecida da Silva ;  
orientador, Guistino Tribuzi, 2024.  
264 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós  
Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. descontaminação . 3.  
fungos. 4. metodos brandos. 5. milho. I. Tribuzi,  
Guistino. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III.  
Título.

## *Dedicação especial*

*Dedico este trabalho aos meus maiores incentivadores. Meus pais Luciano J. da Silva e Luciana A. da Silva, que desde muito jovem me ensinaram que o caminho da independência era o estudo. Ao meu companheiro de vida, de jornada e de sonhos, Leonardo M. Wollinger, que mesmo nos piores momentos não me deixou desistir. Vocês são a base da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida.

À Professora Dra. Vildes M. Scussel, por acreditar em mim desde a época da graduação, dando-me a honra e oportunidade de partilhar inúmeros momentos de troca durante essa jornada.

Ao Professor Dr. Giustino Tribuzi, minha gratidão por aceitar o desafio de orientar esta pesquisa já em andamento. Sua experiência e conhecimento foram de suma importância para a finalização desse trabalho.

Ao Laboratório de Propriedades Físicas – PROFI, por dar todo o suporte e estrutura para a realização dos experimentos do Plasma. E aos colegas que se propuseram a me ajudar, em especial a Amanda G. Maciel, que dedicou parte do seu tempo a me acompanhar nas análises iniciais.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME, por ceder sua estrutura e material para a realização das análises microscópicas.

Ao Laboratório de Plasma da Unisul, pela assistência e disponibilidade para a realização das análises preliminares de Plasma.

A Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina – CIDASC, por gentilmente ceder, sempre que pedido, amostras de grãos de milho para as análises.

Ao meu irmão, Mateus J. da Silva, pelo seu tempo e disponibilidade, desde muito jovem, em me ouvir em inúmeras apresentações de treinamento em casa, desde a época da graduação.

À amada amiga Danielle P. da Silva, pela amizade de anos, trocas de experiências e apoio emocional diário.

À grande amiga que o Laboratório de Micotoxinas – LABMICO me deu, Neyeli C. da Silva, por todos os momentos que compartilhamos juntas naquela salinha. Você fez essa jornada ser mais leve, especial e divertida.

À companheira de Laboratório Clarissa M. de Aquino, pelos momentos compartilhados dentro e fora do LABMICO.

Aos demais amigos de vida e familiares, que compartilharam momentos de felicidade e descontração, sendo de grande importância para os dias difíceis.

*“Mesmo que a vida pareça difícil, há sempre algo  
que você pode fazer para ter sucesso nela.”  
(Stephen Hawking).*

## RESUMO

O milho é uma planta monocotiledônea, pertencente ao gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L. Produzido em quase todos os continentes, é de extrema importância econômica, caracterizada pelas variadas formas de sua utilização. No entanto, os grãos de milho têm a sua qualidade alterada direta ou indiretamente quando são infectados por fungos (deteriorantes e/ou toxigênicos), e expostos a temperaturas e umidades adversas. Portanto, necessitando de estratégias para prevenção e controle em toda sua cadeia produtiva, com destaque, na armazenagem. A aplicação de agrotóxicos sintéticos (fungicidas), por exemplo, podem deixar resíduos danosos no alimento. Portanto, há necessidade de estudos no desenvolvimento de métodos brandos (*GRAS - Generally Recognized as Safe*), que sejam eficientes como fungicidas e que não interfiram nas características dos grãos. Em vista disso, esse trabalho objetivou a realização de investigação de métodos antifúngicos brandos, focando em produtos naturais (andiroba amazônica - *Carapa guianensis* Aubl.), bem como na avaliação de instrumentos menos invasivos (Plasma Frio – PF). Diante desse contexto, a presente pesquisa iniciou por realizar: a **(a) CARACTERIZAÇÃO** de microestruturas por microscopias estereoscópica (ME) e eletrônica de varredura (MEV), através da desidratação, desengorduramento, cobertura com camada de ouro e fixação em stubs da **(a.1) SEMENTE** de andiroba amazônica, origem do extrato oleoso de andiroba - produto pouco conhecido no país e exterior, porém seu óleo é muito utilizado por nativos da região; quanto do **(a.2) GRÃO** de milho, objeto do presente estudo, assim, investigando e avaliando locais susceptíveis a agressões por fungos e outros organismos vivos; bem como avaliar a eficácia de **(b) PROCEDIMENTOS** antifúngicos desenvolvidos por métodos brandos: **(b.1) NATURAL** - tratamento utilizando o óleo de andiroba (OA), onde foi analisado o crescimento micelial dos gêneros fúngicos *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, isolados do grão, em meio de cultura contendo diferentes níveis de OA (Grupo Controle - GC) - sem OA; Grupo Tratado (GT) – com OA 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 2; 3; 5; 10; 20; 30 e 40%, seguindo para a semeadura direta de grãos de milho tratados com OA (13,87 de óleo / 100g de grão), e avaliados para parâmetros como susceptibilidades / resistência de gênero, sua capacidade germinativa (pós-tratamento) e armazenagem e, **(b.2) INSTRUMENTAL** - através da aplicação de Plasma Frio (PF) com reator de barreira de descarga dielétrica (frequência 130 Hz, tensão 30 kV, energia  $100 \pm 5$  mJ) sobre grãos de milho naturalmente contaminados, com diferentes teores de umidade (11,42, 12,72 e 17,96%) submetidos a tratamento em diferentes tempos de exposição (2; 5; 7; 10; 15 e 20 min). Inclusive observar possíveis efeitos dos tratamentos na estrutura do grão e sua capacidade germinativa. Dos dados obtidos em **(a)** através de observações microscópicas (ME e MEV) da **(a.1) semente de andiroba** (partes interna e externa) foi possível verificar que a sua casca apresenta as principais estruturas e características morfo-histológicas celulares suscetíveis à deterioração por fungos e outros organismos vivos (resíduos placentários, anatomia irregular com microfissuras, tecidos e camadas celulares próximos do micrópilo e a presença de danos causados por insetos). Considerados os principais locais responsáveis pela absorção de umidade e acesso de microrganismos para o interior da semente, comprometendo a qualidade do óleo. Já na caracterização do **(a.2) grão de milho**, através de investigação por MEV, foi possível observar, além das características celulares intrínsecas do endosperma (farináceo e vítreo) e pericarpo (camadas histológicas), foram registradas estruturas celulares que propiciam / viabilizam a invasão e proliferação de organismos vivos, especialmente esporos de fungos e hifas através do pedúnculo (ligação do grão à espiga - canal e germen). Dados esses, que auxiliarão na observação do efeito do OA e do PF nessas estruturas e inativação fúngica. Quanto aos **(b)** métodos antifúngicos desenvolvidos e seu poder de ação: **(b.1) NATURAL - OA**, os gêneros fúngicos isolados do grão de milho foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Mucor*, sendo

os mais frequentes encontrados. No que tange aos diferentes meios de cultura e comportamento dos fungos isolados, todos cresceram em BDA, MEA, G<sub>25</sub>N e CAM, exceto *Penicillium* e *Mucor*. Com relação à inibição do AO e diâmetro ( $\varnothing$ ) das colônias, foi observada diferença estatística de crescimento nos fungos de campo *Fusarium* e armazenagem *Aspergillus* e *Penicillium* quando comparados ao GC a partir de 5, 2 e 40% de OA, respectivamente. Acerca do crescimento micelial total os resultados mais efetivos de controle com OA se deram nas porcentagens de 3 a 40%; 2 a 40% e 10 a 40% ( $\varnothing$ : 2,56-0,30; 0,26-0,30 e 0,50-0,23 cm), para *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, respectivamente. Para todos os gêneros, como esperado, foi observado redução de IVCm (índice de velocidade de crescimento micelial) mais acentuada nas maiores concentrações de OA. Quando o OA foi aplicado nos grãos em semeadura direta, o comportamento inibitório, foi observado em 30% das amostras (com redução fúngica variando entre 6,7-46,7%). Já ao efeito do agente antifúngico na germinação, o OA interferiu na qualidade fisiológica enquanto SEMENTES, retardando e / ou impedindo a germinação - o que é esperado / positivo para o GRÃO na armazenagem tradicional, e sua utilização como alimentos. Quanto aos atributos sensoriais, estes indicaram que o tratamento com OA influenciou as percepções dos painelistas, onde ocorreu uma intensificação da cor, um leve desvio no aroma e uma preferência sutil na aparência em comparação com o grupo controle. A adição de óleo de andiroba aos grãos armazenados comercialmente manteve a umidade e preservou a qualidade durante 30 dias, devido à microcamada de óleo presente no GT. Quando utilizado o método **(b.2) INSTRUMENTAL - PF**, foi observada uma redução significativa na contaminação fúngica. Isso ocorreu nos tratamentos com tempos de exposição acima de 5 min. O maior efeito antifúngico foi de 0,75-1,4 log, nos tratamentos de 10, 15 e 20 min. Importante enfatizar que os diferentes teores de umidade do grão não influenciaram significativamente na eficácia do tratamento. Em comparação com GC, a superfície do milho (pericarpo) desenvolveu uma textura enrugada, aumentando sua intensidade com tempos de exposição mais longos. Com cerca de 10 min, o tratamento com PF teve potencial para reduzir a contaminação fúngica nos grãos sem comprometer a capacidade germinativa. Os resultados indicam que ambos tratamentos com métodos brandos podem ser alternativas no controle da contaminação fúngica em grãos de milho de maneira que não interfiram nas propriedades intrínsecas e externas do grão. A aplicação em esteiras na movimentação dos grãos (no carregamento dos silos), tanto através de *spray* para aplicação de OA, quanto através de instalação de equipamento de PF poderão ser testados em trabalhos futuros. Detalhes no aprimoramento de condições de larga escala e logística de aplicação deverão ser desenvolvidos em escala piloto e aplicação em Armazéns ou Entrepostos de comercialização de grãos.

**Palavras-chave:** descontaminação branda; Amazônia; fungo; armazenagem

## ABSTRACT

Maize is a monocotyledonous plant, belonging to the genus *Zea* and species *Zea mays* L. Produced on almost all continents, it is of extreme economic importance, characterized by the varied ways of its use. However, maize kernels have their quality altered directly or indirectly when they are infected by fungi (deteriorating and/or toxigenic), and exposed to adverse temperatures and humidity. Therefore, it requires strategies for prevention and control throughout its production chain, particularly in storage. The application of synthetic pesticides (fungicides), for example, can leave harmful residues on food. Therefore, there is a need for studies on the development of mild methods (GRAS - Generally Recognized as Safe), which are efficient as fungicides and do not interfere with the characteristics of the kernels. In view of this, this work aimed to investigate mild antifungal methods, focusing on natural products (Amazonian andiroba - *Carapa guianensis* Aubl.), as well as the evaluation of less invasive instruments (Cold Plasma - CP). Given this context, the present research began by carrying out: (a) **CHARACTERIZATION** of microstructures by stereoscopic microscopy (ME) and scanning electron microscopy (SEM), through dehydration, degreasing, coverage with a layer of gold and fixation in stubs of (the .1) Amazonian andiroba **SEED**, origin of andiroba oily extract - a product little known in the country and abroad, but its oil is widely used by natives of the region; as for (a.2) maize **KERNEL**, the object of the present study, thus investigating and evaluating places susceptible to attacks by fungi and other living organisms; as well as evaluating the effectiveness of (b) antifungal **PROCEDURES** developed by mild methods: (b.1) **NATURAL** - treatment using andiroba oil (AO), where the mycelial growth of the fungal genera *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*, isolated from kernel, in culture medium containing different levels of OA (Control Group - GC) - without AO; Treated Group (GT) - with AO 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1; two; 3; 5; 10; 20; 30 and 40%, followed by direct sowing of maize kernels treated with AO (13.87 oil / 100g of kernel), and evaluated for parameters such as germination susceptibilities / resistance, germination capacity (post-treatment) and storage and, (b.2) **INSTRUMENTAL** - through the application of Cold Plasma with a dielectric discharge barrier reactor (frequency 130 Hz, voltage 30 kV, energy  $100 \pm 5$  mJ) on naturally contaminated maize kernels, with different levels of humidity (11.42, 12.72 and 17.96%) subjected to treatment at different exposure times (2; 5; 7; 10; 15 and 20 min). Including observing possible effects of treatments on the kernel structure and its germination capacity. From the data obtained in (a) through microscopic observations (ME and SEM) of (a.1) andiroba seed (internal and external parts) it was possible to verify that its shell presents the main structures and cellular morpho-histological characteristics susceptible to deterioration by fungi and other living organisms (placental residues, irregular anatomy with microcracks, tissues and cell layers close to the micropyle and the presence of damage caused by insects). Considered the main places responsible for moisture absorption and access of microorganisms into the seed, compromising the quality of the oil. In the characterization of (a.2) maize kernel, through SEM investigation, it was possible to observe, in addition to the intrinsic cellular characteristics of the endosperm (flourish and vitreous) and pericarp (histological layers), cellular structures were recorded that provide/enable the invasion and proliferation of living organisms, especially fungal spores and hyphae through the peduncle (connection of the kernel to the cob - channel and germ). These data will help in observing the effect of OA and PF on these structures and fungal inactivation. Regarding (b) antifungal methods developed and their power of action: (b.1) **NATURAL - AO**, the fungal genera isolated from maize kernel were *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Mucor*, being the most frequent found. Regarding the different culture media and behavior of the isolated fungi, they all grew in PDA, MEA, G<sub>25</sub>N and CAM, except *Penicillium* and *Mucor*. Regarding the inhibition of AO and diameter ( $\emptyset$ ) of colonies, a statistical difference in growth

was observed in the field fungi *Fusarium* and storage *Aspergillus* and *Penicillium* when compared to GC from 5, 2 and 40% AO, respectively. Regarding total mycelial growth, the most effective results of control with AO occurred in percentages of 3 to 40%; 2 to 40% and 10 to 40% ( $\varnothing$ : 2.56-0.30; 0.26-0.30 and 0.50-0.23 cm), for *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*, respectively. For all genera, as expected, a more pronounced reduction in IVC (mycelial growth rate index) was observed at the highest concentrations of OA. When AO was applied to kernels in direct seeding, inhibitory behavior was observed in 30% of the samples (with fungal reduction varying between 6.7-46.7%). As for the effect of the antifungal agent on germination, AO interfered with the physiological quality as **SEEDS**, delaying and/or preventing germination - which is expected/positive for **KERNEL** in traditional storage, and its use as food. As for sensory attributes, these indicated that the treatment with AO influenced the panelists' perceptions, where there was an intensification of color, a slight deviation in aroma and a subtle preference in appearance compared to the control group. The addition of andiroba oil to commercially stored kernels-maintained moisture and preserved quality for 30 days, due to the microlayer of oil present in the GT. When using method (b.2) **INSTRUMENTAL** - CP, a significant reduction in fungal contamination was observed. This occurred in treatments with exposure times above 5 min. The greatest antifungal effect was 0.75-1.4 log, in treatments of 10, 15 and 20 min. It is important to emphasize that the different moisture contents of the kernel did not significantly influence the effectiveness of the treatment. Compared to GC, the maize surface (pericarp) developed a wrinkled texture, increasing in intensity with longer exposure times. After approximately 10 min, the CP treatment had the potential to reduce fungal contamination in kernels without compromising germination capacity. The results indicate that both treatments with mild methods can be alternatives for controlling fungal contamination in maize kernels in a way that does not interfere with the intrinsic and external properties of the kernel. The application on conveyors in the movement of kernels (when loading silos), both through sprays to apply AO and through the installation of PF equipment, could be tested in future work. Details on improving large-scale conditions and application logistics should be developed on a pilot scale and applied in warehouses or kernel marketing warehouses.

**Key words:** green decontamination; Amazon; fungus; storage

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1 - Espiga de milho ( <i>Zea mays</i> L.).....	29
Figura 2 - Corte transversal do grão de milho ( <i>Zea mays</i> L.).....	29
Figura 3 - Participação dos países na produção de milho ( <i>Zea mays</i> L.) na safra de 2018/19.	31
Figura 4 - Mapa de produção agrícola de milho ( <i>Zea mays</i> L.) no Brasil.....	33
Figura 5 - Dano causado na espiga de milho ( <i>Zea mays</i> L.) devido a contaminação fúngica..	34
Figura 6 - Características macroscópicas e microscópicas do gênero <i>Fusarium</i> .....	38
Figura 7 - Características macroscópicas e microscópicas do gênero <i>Aspergillus</i> .....	39
Figura 8 - Características macroscópicas e microscópicas do gênero <i>Penicillium</i> .....	40
Figura 9 - Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.): (a) partes de germinação das sementes e (b) árvore adulta .....	48
Figura 10 - Detalhes da flor da Andirobeira ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.).....	48
Figura 11 - Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl) características dos: frutos e sementes (sua distribuição na ouriço).....	49
Figura 12 - Fluxograma dos processos de extração (a) Tradicional e (b) Comercial do Óleo de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) .....	51
Figura 13 - Óleo de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) extraído de sementes .....	51
Figura 14 - Características dos quatro estados da matéria: sólido, líquido, gasoso e plasma ..	69
Figura 15 - Reator de Plasma Frio descarga jato de plasma.....	72
Figura 16 - Reator de Plasma Frio descarga de barreira dielétrica (DBD).....	72
Figura 17 - Reator de Plasma Frio descarga corona.....	73

### CAPÍTULO 2

Figura 1 - Sementes de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) para observação por microscopia estereoscópica (ME) e microscopia eletrônica de varredura (MEV): (a) diagramas para o procedimento de seccionamento das partes (seções longitudinal e transversal - Planos 1 e 2, respectivamente); (a.1) vista da Face Curva (A) - face da semente em contato com a ouriço e (a.2) vista das Faces Retas (B, C, D) - faces da semente em contato umas com as outras, na ouriço, e (b) bandeja com suportes contendo cubos de partes da semente, revestidos com uma camada de ouro para análise por MEV.....	111
Figura 2 - Amostras de sementes de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) apresentando detalhes sobre a distribuição de suas principais Faces e Pontas: nas vistas (a) frontal e (b) traseira, através da microscopia estereoscópica de faces [x0,67].....	112
Figura 3 - Seção transversal da casca da semente de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.): visão geral das camadas de tecido [x100].....	114
Figura 4 - Fotografias de microscopia estereoscópica das características da semente de andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.): (A) casca (a.1) superfície - (externa) região central da face (células em forma de polígonos/hexágonos); posicionamento dos tecidos da casca e das Pontas, com tecidos nas junções (reentrâncias e protuberâncias (em forma de lóbulo) e (a.2) superfície (externa) com tecido placentário aderido à casca e (interna) superfície com feixes vasculares por toda a superfície. (B) semente inteira (b.1) camadas de tecido da semente - (seção	

transversal) semelhante a uma esponja, (b.2) seção longitudinal - camadas da casca, pele marrom e ligação com o cotilédone, canal do micrópilo [7,1 a 115 X].....	115
Figura 5 - Microscopia Eletrônica de Varredura da casca da Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> L.) - superfícies: (externa) (A) Área principal das Faces com tecido (formas celulares poligonais/hexagonais), (B) Cantos e tecido das Pontas - (b.1) Irregular/áspero formando como lóbulos com vales profundos, (b.2) Resíduos placentários depositados entre e nos vales/dentro da superfície áspera da casca, (C) no tecido do tegumento - entrada do micrópilo [100-500X].....	118
Figura 6 - Microscopia Eletrônica de Varredura da casa da Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> L.) - Canto de ligação entre as faces e micrópilo: (A) Ligação (a.1) do Canto entre duas faces, (a.2) múltiplos tipos de células próximas às Pontas, (B) Tecido da superfície da ligação (b.2) células longas porosas em forma de longo; (C) Múltiplos tecidos nos Cantos (c.1) tecido de células poligonais e longas com resíduos placentários aderidos à superfície [150-900X].....	119
Figura 7 - Microscopia Eletrônica de Varredura da casca da Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> L.) - conexão semente/pinha (seção transversal): (A) Micrópilo (a.1), micrópilo completo - vista interna, (a.2) feixes vasculares, (B) Tecido interno da casca, (b.1) células poligonais e longas, paredes espessas, (b.2) massa de células poligonais, (C) Sistema vascular (c.1) Sistema de vasos, (c.2) canal com tubos helicoidais e traqueídeos [150-900X].....	120
Figura 8 - Microscopia Eletrônica de Varredura da casca da Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> L.) - (seção transversal): (A) Camadas (a.1) das superfícies externa para interna, (a.2) principais camadas da superfície, (B) células das camadas de tecido (b.1) com formas de células globulares e longas, paredes espessas (b.2) região com feixes vasculares ricos em tubos helicoidais, (C) plasmodesmos (c.1) tecido celular apresentando células globulares com poros e cicatrizes, (c.2) detalhes das camadas da parede celular [300-3000X].....	121
Figura 9 - Microscopia Eletrônica de Varredura da casca da Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> L.) - características dos tecidos (forma/parede e plasmodesmo): (A) Tecido primário - tecido com formato de células globulares porosas, (B) Tecido secundário - tecido com formato de células longas porosas, (C) camadas de parede espessa com distribuição de poros [1000-4000 X].....	122
Figura 1 - Microscopia Eletrônica de Varredura do cotilédone da Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> L.) - superfície e seção transversal: (A) cotilédone (a.1/a.2) tecido do cotilédone com cavidades (epiderme), (B) cotilédone e tecidos parenquimatosos, (b.1/b.2) formas de células poligonais/arredondadas, (C) Camadas de tecido do cotilédone - parede fina [150-900X].....	123

### CAPÍTULO 3

Figura 1 - Amostras de sementes de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.): (a) sementes saudáveis (com casca), (b) sementes deterioradas (com casca) e (c) sementes atacadas por inseto/broca para análise ME e MEV.....	130
Figura 2 - Preparação de sementes (com casca) de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) para observação em Microscopia Estereoscópica e Eletrônica de Varredura: (a) inteira - diagrama do procedimento de seccionamento das partes (seções longitudinais e transversais, Planos 1 e 2, respectivamente) e (b) meia semente seccionada no Plano 1 evidenciando canal de intercomunicação e fungos cotiledonares deteriorados.....	132
Figura 3 - Microscopia Estereoscópica da semente de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) - locais suscetíveis versus contaminação por fungos: (A) casca - (a.1) resíduos placentários com colônias de fungos aderidas e relevo da superfície; (a.2) camadas, rachaduras e superfície mofada; (a.3) micrópilo com local do hilo; (a.4) infestação e danos causados por insetos com infecção por fungos; (a.5) camada placentária espessa. (B) semente inteira (corte transversal) -	

(b.1) tecido mole rico em nutrientes nos Cantos; (b.2) infecção por fungos no tecido mole e região do micrópilo (deterioração da semente); (b.3) danos na casca causados por brocas de insetos e infecção por fungos [7,1 a 110X].....	134
Figura 4 - Microscopia Eletrônica de Varredura de sementes de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) saudáveis - locais suscetíveis: (a) resíduos placentários e superfície da casca, (b) diferentes formas celulares, porosidade das paredes celulares - plasmodesmo, (c) entrada (micrópilo)/ casca interna e áreas dos Cantos [50 a 2500X].....	135
Figura 5 - Microscopia Eletrônicas de Varredura de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) semente deteriorada por fungos: micélio em locais de tecido: superfícies/cavidades e camadas de casca e semente [500 – 2500x].....	137
Figura 6 - Microscopia Eletrônicas de Varredura de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) semente deteriorada - estruturas reprodutivas de fungos: (a) diferentes tipos/formas, tamanhos/locais; (b) tamanhos menores e características de superfície [3000 a 7000x].....	137
Figura 7 - Microscopia Eletrônicas de Varredura de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) semente deteriorada – outros organismos vivos: fragmentos de insetos, ácaros e pelos [100-2500X].....	138

## CAPÍTULO 4

Figura 1 - Grão de milho ( <i>Zea mays</i> L.): (a) inteiro, sinalizando as direções dos cortes.....	146
Figura 2 - Grãos de milho ( <i>Zea mays</i> L.) inteiros e seccionados, preparados para análise estereoscópica (a) grão saudável e (b) grãos deteriorados.....	147
Figura 3 - Microscopia estereoscópica de grão de milho ( <i>Zea mays</i> L.) apresentando características de sua anatomia (pericarpo, distribuição interna dos endospermas farináceo e vítreo, bem como posição do gérmen e pedúnculo em grão (a) saudável e (b) danificado. Seccionados no Plano 1 (longitudinal frontal), Plano 2 (longitudinal lateral); Plano 3 (transversal) [7,1 a 15 X].....	150
Figura 4.a - Micrografias do grão de milho ( <i>Zea mays</i> L.): PERICARPO (casca) por Microscopia Eletrônica de Varredura - TRANSVERSAL [100-1000X].....	151
Figura 4.b - Micrografias do grão de milho ( <i>Zea mays</i> L.): PERICARPO (casca) por Microscopia Eletrônica de Varredura - CORTE TRANSVERSAL [100-500X].....	152
Figura 5 - Micrografias do grão de milho ( <i>Zea mays</i> L.): (a) PERICARPO (b) ENDOSPERMA por Microscopia Eletrônica de Varredura - FISSURAS, VALES E REENTRANCIAS (pontos de deposição de esporos/ colônias/ absorção umidade) – (a) SUPERFÍCIE [150-500X].....	152
Figura 6.a - Micrografias do grão de milho ( <i>Zea mays</i> L.): ENDOSPERMA: por Microscopia Eletrônica de Varredura – corte TRANSVERSAL [100-7.600X].....	153
Figura 6.b - Micrografias do grão de milho ( <i>Zea mays</i> L.): ENDOSPERMA (a) Vítreo e (b) Farináceo por Microscopia Eletrônica de Varredura: GRÂNULOS DE AMIDO - <i>poliedricos e esféricos</i> [500-1.000X].....	153
Figura 7 - Micrografias do grão de milho ( <i>Zea mays</i> L.): PEDÚNCULO e GÉRMEN por Microscopia Eletrônica de Varredura - CORTE LONGITUDINAL [27-500X].....	154
Figura 8 - Micrografias de resíduos de organismos vivos em tecidos do grão de milho ( <i>Zea mays</i> L.) por Microscopia Eletrônica de Varredura [1000X].....	155

## CAPÍTULO 5

Figura 1 - Principais genótipos de fungos isolados de grãos de milho ( <i>Zea mays</i> L.) naturalmente contaminados e suas características: (a) <i>Fusarium</i> , (b) <i>Aspergillus</i> , (c) <i>Penicillium</i> e (d) <i>Mucor</i> .....	169
Figura 2 – Variação no teor de <b>UMIDADE</b> de grãos de milho ( <i>Zea mays</i> L.) seco, sob condições de armazenagem comercial tratados com o antifúngico Óleo de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.). GC: Grupo Controle, GT: Grupo Tratado.....	177
Figura 3 - Avaliação da <b>QUALIDADE</b> de grãos de milho ( <i>Zea mays</i> L.) seco, sob condições de armazenagem comercial tratados com o antifúngico Óleo de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.). GC: Grupo Controle, GT: Grupo Tratado.....	177
Figura 4 - Efeito do Óleo de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) na capacidade germinativa de grãos de milho ( <i>Zea mays</i> L.).....	178
Figura 5 - Avaliação <b>SENSORIAL</b> dos atributos (a) cor, (b) aroma e (c) aparência de grãos de milho ( <i>Zea mays</i> L.) seco, tratados com antifúngico Óleo de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.). GC: Grupo Controle e GT: Grupo Tratado.....	180

## CAPÍTULO 6

Figura 1 - Reator de Plasma (DBD), com dois eletrodos, conectado a uma fonte de descarga elétrica pulsada de alta tensão.....	193
Figura 2 - Gêneros de fungos isolados de grãos de milho ( <i>Zea mays</i> L.) naturalmente contaminados em amostras tratadas com controle e plasma frio: (a) <i>Aspergillus</i> , (b) <i>Penicillium</i> e (c) <i>Fusarium</i> por microscópio óptico [X40 e 100].....	198
Figura 3 - Redução visível de fungos através da contagem total de fungos em grãos de milho ( <i>Zea mays</i> L.) em diferentes umidades (11,42; 12,72 e 17,96%) na diluição $10^{-1}$ após exposição ao tratamento com Plasma Frio (frequência - 130 H) durante os períodos de 0, 2, 5, 7, 10, 15 e 20 minutos.....	201
Figura 4 - Microscopia Estereoscópica [X0,67] da superfície dos grãos de milho ( <i>Zea mays</i> L.), umidade (11,42; 12,72 e 17,96%), após exposição ao tratamento com Plasma Frio (frequência - 130 Hz) durante tempos de 0, 2, 5, 7, 10, 15 e 20 min.....	202
Figura 5 - Microscopia Eletrônica de Varredura [X1.000] da superfície de grãos de milho ( <i>Zea mays</i> L.) em diferentes umidades (11,42; 12,72 e 17,96%), após exposição ao tratamento com Plasma Frio (frequência - 130 H) durante os tempos de 0, 2, 7, 10 e 20 min.....	203
Figura 6 - Média e desvio padrão (cm) do crescimento radicular de grãos de milho ( <i>Zea mays</i> L.) tratados com Plasma Frio durante 0, 2, 5, 7, 10, 15 e 20 min.....	206

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Produção mundial de milho ( <i>Zea mays</i> L.), safra 2019/20 - milhões de toneladas.	31
Tabela 2 - Exportações mundiais de milho ( <i>Zea mays</i> L.) - milhões de toneladas .....	32
Tabela 3 - Principais fungos produtores de micotoxinas e seus efeitos tóxicos.....	35
Tabela 4 - Principais gêneros fúngicos isolados dos maiores produtores e exportadores de grãos de milho ( <i>Zea mays</i> L.).....	42
Tabela 5 - Propriedades físico-químicas do Óleo de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.)....	52
Tabela 6 - Óleo de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl) composição relativa aos derivados de andirobina e gedunina e outros componentes.....	53
Tabela 7 - Óleo de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) composição de ácidos graxos.....	54
Tabela 8 - Óleo de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) composição de ácidos graxos.....	55
Tabela 9 - Aplicações da Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) na cura da saúde.....	55
Tabela 10 - Aplicações do Óleo de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) na cura da saúde...	58
Tabela 11 - Características das aplicações do Óleo de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) contra microrganismos relatadas na literatura .....	61
Tabela 12 - Características das aplicações do Óleo de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) contra insetos, parasitas e protozoários relatadas na literatura .....	68
Tabela 13 - Inativação de microrganismos em alimentos usando Plasma Frio.....	76
Tabela 14 - Degradação de micotoxinas e pesticidas em alimentos usando Plasma Frio .....	82

### CAPÍTULO 5

Tabela 1 - Avaliação da carga de esporos de fungos dos grãos de milho ( <i>Zea mays</i> L.) e Óleo de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) a serem utilizados no estudo de descontaminação....	168
Tabela 2 - Comportamento de gêneros fúngicos de campo e armazenamento isolados de amostras de milho ( <i>Zea mays</i> L.) em diferentes meios de cultura.....	170
Tabela 3 - Crescimento micelial* e Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos fungos <i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> tratados com diferentes concentrações de Óleo de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.).....	172
Tabela 4 - Efeito do Óleo de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) sobre o crescimento fúngico em grãos de milho ( <i>Zea mays</i> L.) naturalmente contaminados, sua redução fúngica e gêneros fúngicos resistentes / susceptíveis ao tratamento.....	174
Tabela 5 - Avaliação SENSORIAL dos atributos (a) cor, (b) aroma e (c) aparência de grãos de milho ( <i>Zea mays</i> L.) seco, tratados com antifúngico Óleo de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.).....	181

### CAPÍTULO 6

Tabela 1 - Contagem total de fungos após tratamentos de grãos de milho ( <i>Zea mays</i> L.) por Plasma Frio.....	196
Tabela 2 - Porcentagem, índice de velocidade, tempo e velocidade média de germinação de grãos de milho ( <i>Zea mays</i> L.) com 12,72% de umidade tratados com Plasma Frio (frequência - 130 Hz, tensão - 30 kV e energia - 100 ± 5 mJ) nos tempos de 0, 2, 5, 7, 10, 15 e 20 minutos.....	205

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABIMILHO** - Associação Brasileiras das Indústrias do Milho
- ABRAMILHO** - Associação Brasileiro de Produtores de Milho
- AOAC** - Metodologia Analítica Oficial
- BCBA** - Bolsa de Cereais de Buenos Aires
- CIDASC** - Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina
- EPAGRI** - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
- CG** - Grupo Controle
- CT** - Grupo Tratado
- GRAS** - *Generally Recognized As Safe*
- LABMICO** - Laboratório de Análise de Micotoxinas e Contaminantes Alimentares
- LCME** - Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
- MAPA** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MEV** - Microscópico Eletrônico de Varredura
- ME** - Microscópico Estereoscópico
- OA** - Óleo de Andiroba
- OE** - Óleo Essencial
- PF** - Plasma Frio
- PROFI** - Laboratório de Propriedades Físicas
- USDA** - *United States Department of Agriculture*
- UV** - Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
2.1 GERAL .....	26
2.2 ESPECÍFICOS .....	26
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>27</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>27</b>
1.1 O MILHO ( <i>Zea mays</i> L.).....	28
1.1.1 Anatomia e Composição Nutricional do Grão .....	28
1.1.2 Produção .....	30
<b>1.2 FUNGOS CONTAMINANTES DE MILHO .....</b>	<b>33</b>
1.2.1 FUNGOS DE CAMPO.....	37
1.2.2 FUNGOS DE ARMAZENAGEM.....	38
1.2.3 FATORES QUE FAVORECEM O DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS E FORMAÇÃO DE MICOTOXINAS .....	40
1.2.4 CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS <i>versus</i> FUNGOS .....	41
<b>1.4. MÉTODOS DE INATIVAÇÃO FÚNGICA .....</b>	<b>43</b>
1.4.1 MÉTODOS FÍSICOS.....	43
1.4.1.1 Secagem .....	44
1.4.1.2 Processamento de Alta Pressão.....	44
1.4.1.3 Radiação Ultravioleta .....	44
1.4.2 MÉTODOS QUÍMICOS .....	44
1.4.2.1 Ozônio.....	45
1.4.3 MÉTODOS BIOLÓGICOS .....	45
1.4.3.1 Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> L.) .....	46
1.4.3.2 Piperina ( <i>Piper nigrum</i> ) .....	46
1.4.3.3 Jucá ( <i>Libidibia ferrea</i> Mart) .....	46
1.4.3.4 Guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> Kunth).....	47
<b>1.5 ANDIROBA (<i>Carapa guianensis</i> Aubl.) - A ÁRVORE.....</b>	<b>47</b>
1.5.1 ÓLEO DE ANDIROBA .....	49
1.5.2 APLICAÇÕES DO ÓLEO DE ANDIROBA .....	55
1.5.3 EFEITO DO ÓLEO DE ANDIROBA NOS ORGANISMOS VIVOS .....	58
<b>1.6 PLASMA FRIO .....</b>	<b>68</b>
1.6.1 FUNÇÕES E UTILIZAÇÕES GERAIS .....	68
1.6.2 PRINCÍPIOS DE FUNCIONAMENTO .....	70
1.6.3 REATORES DE PLASMA FRIO .....	71
1.6.4 APLICABILIDADE .....	73

1.6.5 EFEITO NOS ALIMENTOS .....	74
1.6.6 VANTAGENS E DESVANTAGENS DO PLASMA FRIO .....	83
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>84</b>
<b>FLUXOGRAMA CONCEITURAL DA TESE.....</b>	<b>104</b>
<b>CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DA SEMENTE DE ANDIROBA (<i>Carapa Guianensis</i> Aubl.) AMAZÔNICA POR MICROSCOPIAS ESTEREOSCÓPICA E ELETRÔNICA DE VARREDURA - SAUDÁVEL.....</b>	<b>106</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>107</b>
<b>2.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>107</b>
<b>2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>109</b>
2.2.1 MATERIAL .....	109
2.2.1.1 Amostra.....	109
2.2.1.2 Equipamentos .....	109
2.2.1.3 Outros Materiais.....	109
2.2.2 MÉTODOS .....	109
2.2.2.1 Preparo da Amostra .....	109
2.2.2.1 Microscopia Estereoscópica - ME.....	110
2.2.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV.....	110
<b>2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>111</b>
2.3.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA SEMENTE DE ANDIROBA – ME .....	111
2.3.2 DISTRIBUIÇÃO DAS CAMADAS TECIDUAIS DA SEMENTE DE ANDIROBA E CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS – MEV .....	116
<b>2.4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>123</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>124</b>
<b>CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO DA SEMENTE DE ANDIROBA (<i>Carapa guianensis</i> Aubl.) AMAZÔNICA POR MICROSCOPIAS ESTEREOSCÓPICA E ELETRÔNICA DE VARREDURA: LOCAIS DE SUSCETIBILIDADE À DETERIORAÇÃO POR FUNGOS.....</b>	<b>127</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>128</b>
<b>3.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>128</b>
<b>3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>129</b>
3.2.1 MATERIAL .....	129
3.2.1.1 Amostra.....	130
3.2.1.2 Equipamentos .....	130
3.2.1.3 Outros materiais .....	130
3.2.2 MÉTODOS .....	130
3.2.2.1 Preparo da Amostra .....	130
3.2.2.2 Microscopia Estereoscópica - ME.....	131
3.2.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV.....	131

<b>3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>132</b>
3.3.1 MEV SEMENTES DE ANDIROBA: LOCAIS SUSCETÍVEIS À DETERIORAÇÃO .....	132
3.3.2 INFECÇÃO POR FUNGOS EM SEMENTES DE ANDIROBA DETERIORADAS.....	136
3.3.3 MÉTODOS DE PREVENÇÃO E CONTROLE .....	138
<b>3.4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>139</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>139</b>

**CAPÍTULO 4 - CARACTERIZAÇÃO DE GRÃOS DE MILHO (*Zea mays* L.) E POSSÍVEIS LOCAIS SUSCEPTÍVEIS A INFESTAÇÃO POR FUNGOS E ORGANISMOS VIVOS POR MICROSCOPIAS ESTEREOSCÓPICA E ELETRÔNICA DE VARREDURA .....**

<b>RESUMO.....</b>	<b>142</b>
<b>4.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>143</b>
<b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>145</b>
4.2.1 MATERIAL .....	145
4.2.1.1 Amostra.....	145
4.2.1.2 Equipamentos .....	145
4.2.1.3 Outros Materiais.....	145
4.2.2 MÉTODOS .....	146
4.2.2.1 Preparo Das Amostras .....	146
4.2.2.2 Microscopia Estereoscópica - ME.....	147
4.2.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV.....	147
<b>4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>148</b>
4.3.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO GRÃO DE MILHO – ME .....	148
4.3.1.1 Pericarpo .....	148
4.3.1.2 Endosperma .....	148
4.3.1.3 Pedúnculo e Gémen.....	149
4.3.2 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E DISTRIBUIÇÃO DAS CAMADAS TECIDUAIS DO GRÃO DE MILHO – MEV .....	149
4.3.2.1 Pericarpo .....	151
4.3.2.2 Endosperma .....	152
4.3.2.3 Pedúnculo e Gémen.....	153
4.3.3 Susceptibilidades a Danos e Contaminação.....	154
<b>4.4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>155</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>155</b>

**CAPÍTULO 5 - EFEITO DO ÓLEO DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl.) NO CONTROLE DE FUNGOS EM GRÃOS DE MILHO (*Zea mays* L.) E CAPACIDADE GERMINATIVA .....**

<b>RESUMO.....</b>	<b>159</b>
<b>5.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>160</b>
<b>5.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>161</b>

5.2.1 MATERIAL .....	161
5.2.1.1 Amostra.....	161
5.2.1.2 Óleo de Andiroba .....	162
5.2.1.3 Meio de Cultura, Químicos e Outros.....	162
5.2.1.4 Equipamentos .....	162
5.2.2 MÉTODOS .....	162
5.2.2.1 Contagem Total de Fungos.....	162
5.2.2.2 Gêneros Fúngicos Isolados de Grãos de Milho e Expostos a OA.....	163
5.2.2.3 Efeito Antifúngico do OA no Grão de Milho – Semeadura Direta.....	164
5.2.2.3.1 Preparo das Amostras .....	164
5.2.2.3.2 Tratamento dos Grãos de Milho com OA .....	164
5.2.2.3.3 Avaliação do Efeito Antifúngico e Identificação de Gêneros - Grupos GC & GT.....	164
5.2.2.4 Efeito Antifúngico do OA no Grão - em Condições de Armazenagem Comercial .....	165
5.2.2.5 Efeito na Capacidade Germinativa.....	166
5.2.2.6 Efeito Antifúngico do OA no Grão - Análise Sensorial .....	166
5.2.2.7 Análise Estatística .....	167
<b>5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>167</b>
5.3.1 CARGA FÚNGICA .....	167
5.3.2 PRINCIPAIS GÊNEROS FÚNGICOS ISOLADOS DE MILHO <i>versus</i> MEIO DE CULTURA .....	168
5.3.3 CONTROLE DO OA NO CRESCIMENTO FÚNGICO (DIÂMETRO) .....	170
5.3.4 EFEITO OA EM FUNGOS DO GRÃO DE MILHO .....	173
5.3.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM OA NO GRÃO – CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM COMERCIAL.....	175
5.3.6 EFEITO DO TRATAMENTO COM OA NO GRÃO - CAPACIDADE GERMINATIVA..	177
5.3.7 EFEITO DO TRATAMENTO COM OA NO GRÃO - ATRIBUTOS SENSORIAIS .....	179
<b>5.4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>181</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>182</b>
<b>CAPÍTULO 6 - EFEITO DO PLASMA FRIO SOBRE GRÃOS DE MILHO (<i>Zea mays</i> L.): INATIVAÇÃO DE FUNGOS, ESTABILIDADE DA MICROESTRUTURA E CAPACIDADE GERMINATIVA.....</b>	<b>188</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>188</b>
<b>6.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>189</b>
<b>6.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>191</b>
6.2.1 MATERIAL .....	191
6.2.1.1 Amostra.....	191
6.2.1.2 Meio de Cultura e Outros.....	191
6.2.1.5 Equipamentos .....	192
6.2.2 MÉTODOS .....	192
6.2.2.1 Preparo da Amostra .....	192
6.2.2.2 Tratamento com Plasma Frio.....	193
6.2.2.1 Contagem Total de Fungos.....	193
6.2.2.2 Isolamento e Identificação.....	194
6.2.2.3 Capacidade Germinativa .....	194

6.2.2.4 Microscopia Estereoscópica - ME.....	195
6.2.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV.....	195
6.2.2.6 Análise Estatística .....	195
<b>6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>195</b>
6.3.1 EFEITO ANTIFÚNGICO DO PF .....	195
6.3.2 EFEITO DO PF NAS CARACTERÍSTICAS MICROESTRUTURAIS DA SUPERFÍCIE DO GRÃO.....	198
6.3.3 CAPACIDADE GERMINATIVA.....	204
<b>6.4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>207</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>207</b>
<b>ÓLEO DE ANDIROBA versus PLASMA FRIO.....</b>	<b>213</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>214</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>217</b>
<b>[A] Artigos Publicados</b>	
1. Characteristics and Effects of the Amazonian Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) Oil Against Living Organisms – A Review .....	217
2. Characteristics of Maize ( <i>Zea mays</i> L.) Grains and Their Living Organisms Entrance Sites by Scanning Electron Microscopy .....	217
3. Effect of Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aubl.) Oil for Fungi Control in Maize ( <i>Zea mays</i> L.) Grains.....	217
4. Effect of Cold Plasma Treatment on Fungi Inactivation and Germination of Maize ( <i>Zea mays</i> L.) Grains .....	217
<b>[B] Artigos Submetidos</b>	
1. Stereo and Scanning Electron Microscopy of the Amazonian Andiroba ( <i>Carapa Guianensis</i> Aubl.).....	217
2. Stereo and Scanning Electron Microscopy of the Amazonian Andiroba ( <i>Carapa Guianensis</i> Aubl.) Seed: Fungi Spoilage Susceptibility Sites.....	217
3. Effect of Cold Plasma on Maize ( <i>Zea Mays</i> L.) Grains: Inactivation of Fungi, Microstructure Stability and Germination Capacity .....	217

## 1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais cereais cultivados globalmente, destacando-se como o de maior volume de produção no mundo (Nascimento et al. 2015). No Brasil, ocupa uma posição proeminente, sendo o terceiro maior produtor mundial, com cultivo em todas as regiões do país, especialmente no Centro-Oeste, Sul e Sudeste, onde as condições socioeconômicas e edafoclimáticas variam amplamente (USDA, 2020). Sua importância econômica é inquestionável, sendo amplamente utilizado desde a alimentação animal (que absorve a maior parte da safra), até aplicações industriais de alta tecnologia para alimentação humana (EMBRAPA, 2021).

Dada a relevância dos produtos agrícolas na dieta global, a preocupação com o controle da umidade do milho pós-colheita é crucial para evitar a contaminação fúngica, que pode ocorrer durante diversas etapas, desde o cultivo até o armazenamento (Santurio, 2000). Os fungos que atacam grãos e sementes podem ser classificados em dois grupos: os fungos de campo - que afetam o produto no campo e os fungos de armazenagem - que surgem pós-colheita, ou seja, antes (durante o transporte) e no armazenamento, ambos capazes de comprometer a qualidade do milho (deterioração) e, segurança (indiretamente gerar micotoxinas prejudiciais a saúde humana e animal), se toxigênicos (Scussel; Savi; Kluczkovski, 2018).

Os principais fungos encontrados em grãos de milho são o *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* spp. diversas espécies de *Fusarium* (como *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. graminearum*), podem contaminar grãos de milho e produzir várias micotoxinas (fumonisinas, zearalenona e tricotecenos) (Mills, 1989). Espécies como *Aspergillus* (*A. flavus* e *A. parasiticus*) são comuns em milho e podem produzir aflatoxinas, que são algumas das micotoxinas mais tóxicas e carcinogênicas conhecidas. Por outro lado, certas espécies de *Penicillium*, que podem ser encontradas em grãos de milho, e produzem micotoxinas como ocratoxina A, que tem sido associada a danos renais e desenvolvimento de tumores (Scussel; Savi; Kluczkovski, 2018).

Para seu controle em lavouras de milho, se faz necessário uso de fungicidas, principalmente os sintéticos. Dentre os grupos de fungicidas, estão os QUÍMICOS (compostos sintéticos projetados para destruir ou inibir o crescimento de fungos – triazóis, estrobilurinas, carbamatos e benzimidazóis), os quais, podem ter ação SISTÊMICA (absorvidos pela planta e

distribuídos por toda a sua estrutura, oferecendo proteção interna contra os fungos) ou de CONTATO (permanecem na superfície da planta e protegem apenas as partes onde são aplicados) e BIOLÓGICOS (baseados em microrganismos vivos, como bactérias, fungos ou vírus, que tem a capacidade de controlar patógenos fúngicos – *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* spp.) (Timmermann; Zaccaron; Forcelini, 2022). Já os NATURAIS (derivados de substâncias naturais, como óleos essenciais (OE) ou extratos de plantas, ou compostos isolados de organismos vivos – óleo de nem (*Azadirachta indica* A.), extrato de alho (*Allium sativum*) e compostos fenólicos de plantas) (Santos; Silva; Oliveira, 2021).

Com o objetivo de encontrar soluções eficazes e seguras, há uma crescente busca por métodos de inativações mais brandos (*green*), reconhecidos como seguros (GRAS – *Generally Recognized as Safe*), visando reduzir o uso de agrotóxicos (sintéticos) e promover práticas mais sustentáveis. Entre esses métodos, destacam-se estudos de fungicidas NATURAIS – extratos de plantas, tais como o guaraná (*Paullinia cupana* L.), jucá (*Libidibia férrea* L.) dentre outros, além de métodos INSTRUMENTAIS – através da aplicação de atmosferas modificadas, como dióxido de carbono e ozônio, e a tecnologia de plasma frio (PF) (Martins et al. 2014, Savi et al. 2014; Scussel et al. 2018, Runtzel et al. 2020).

O óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) - OA, extraído das sementes da árvore de mesmo nome, é reconhecido por suas propriedades medicinais pelos nativos da região amazônica, sendo rico em ácidos graxos essenciais e compostos não graxos. Sua utilização tem sido estudada como método natural medicinal de inativação fúngica, destacando-se por suas propriedades antissépticas, anti-inflamatórias, cicatrizantes, insetífugas e emolientes (Mendonça, Ferraz, 2007; Nayak et al. 2011). Já o PF, uma nova tecnologia não térmica de processamento de alimentos, que utiliza eletricidade e um gás transportador tem sido reportado na literatura para inativar microrganismos e alguns fungos (Devi et al. 2017; Patange et al. 2017).

Embora sejam considerados métodos promissores, pouco tem sido estudado para grãos bem como avaliação de diferentes gêneros fúngicos e efeitos no alimento (atributos químicos e físicos, incluindo textura, mudanças nas taxas de germinação, inativação enzimática, entre outros). Mudanças e alterações essas, que podem ser indesejadas, e outras benéficas para a indústria de alimentos.

Dada a magnitude dos prejuízos na agricultura e os riscos associados a fungos deteriorantes, é fundamental a realização de estudos para avaliar a eficácia de métodos brandos de inativação fúngica que mantenham a segurança dos alimentos e preservem suas

características naturais pós-tratamento, minimizando o acúmulo de resíduos e promovendo práticas mais sustentáveis.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Investigar susceptibilidades através do conhecimento de microestruturas da semente de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e grãos de milho (*Zea mays* L.), bem como desenvolver procedimentos para inativação fúngica por métodos brandos – NATURAL (Óleo de Andiroba - OA) e INSTRUMENTAL (Plasma Frio - PF) – como estratégia (*green*) de prevenção e controle da deterioração por fungos nos grãos.

### 2.2 ESPECÍFICOS

1. Caracterizar microestruturas da semente de ANDIROBA (casca e amêndoa, distribuição do óleo) - semente saudável e deteriorada (danificada por organismos vivos);
2. Caracterizar microestruturas do MILHO em grão (externas e internas) e seus locais susceptíveis ao acesso/proliferação de fungos, bem como de outros organismos vivos, por microscopias estereoscópica (ME) e eletrônica de varredura (MEV);
3. Desenvolver metodologia com efeito antifúngico, utilizando produto natural da floresta amazônica, o ÓLEO DE ANDIROBA (OA) – concentração, gêneros fúngicos susceptíveis / resistentes (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*), bem como efeito nos grãos;
4. Investigar o efeito do tratamento antifúngico pelo MÉTODO NATURAL - OA sobre a carga fúngica contaminante em grãos de milho naturalmente contaminados e durante a armazenagem, e sua influencia sobre o poder germinativo e seu efeito nos atributos sensoriais dos grãos de milho;
5. Aplicar MÉTODO INSTRUMENTAL – PF com efeito antifúngico em grãos de milho naturalmente contaminados submetidos a diferentes níveis de umidades;
6. Observar possíveis efeitos do tratamento por PF na estrutura externa do milho por microscopias (ME e MEV) e averiguar o efeito do tratamento com PF nos grãos de milho quanto a capacidade germinativa nas condições utilizadas (intensidade, potência e tempo de exposição);
7. Comparar os dados obtidos e eficácia dos diferentes métodos estudados (OA e PF), bem como seus efeitos nas características do grão.

**CAPÍTULO 1**  
**REVISÃO DE LITERATURA**

## 1.1 O MILHO (*Zea mays* L.)

Em pequenas ilhas, próximas ao litoral mexicano, foram registradas as primeiras práticas do cultivo de milho, cerca de 7.300 anos atrás. Aproximadamente 4.000 anos este cereal já se cultivava na América do Sul, de origem caribenha, tem como significado de seu nome “o sustento da vida” (Araujo, 2008).

Os povos Maias, Astecas e Incas reverenciavam o cereal na arte e religião, grande parte de suas atividades diárias eram ligadas ao seu cultivo. Com a descoberta da América e as grandes navegações do século XVI, a sua cultura se expandiu para outras partes do mundo. Hoje é cultivado e consumido em todos os continentes (Abimilho, 2015).

O cultivo do milho no Brasil vem desde antes do seu descobrimento. Os índios tupi-guaranis tinham o cereal como o principal ingrediente de sua dieta. Com a chegada dos portugueses, o seu consumo cresceu e novos alimentos derivados de milho foram tornando-se parte dos hábitos alimentares dos brasileiros (Abimilho, 2015).

### 1.1.1 ANATOMIA E COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO GRÃO

O milho (Figura 1) é uma monocotiledônea, pertencente à família *Poaceae*, Subfamília *Panicoidae*, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L. (Siloto, 2002). Produzido em quase todos os continentes, é de extrema importância econômica caracterizada pelas variadas formas de sua utilização, que vão desde a alimentação animal até a industrial de alta tecnologia (Paes, 2006). É o alimento ou a cultura favorita para 900 milhões de consumidores e agricultores dos países de média-baixa e baixa renda (Naylor et al. 2005).

É uma planta herbácea, monóica, ou seja, possui os dois sexos na mesma planta em inflorescências diferentes, se caracterizando em uma planta anual por ter seu ciclo completo de quatro a cinco meses (Pons; Bresolin, 1981). O caráter monóico e a sua morfologia característica são resultados da supressão, condensação e multiplicação de várias partes da anatomia básica das gramíneas (Mackinnon et al. 2002).

O grão de milho é o fruto de uma semente, ou cariopse característico das gramíneas (Mackinnon et al. 2002). São, geralmente, amarelos ou brancos, podendo apresentar colorações variadas, do preto até o vermelho. Sua composição média em base seca é 72 de amido, 9,5 proteínas, 9 de fibra e 4% de óleo (Paes, 2006).

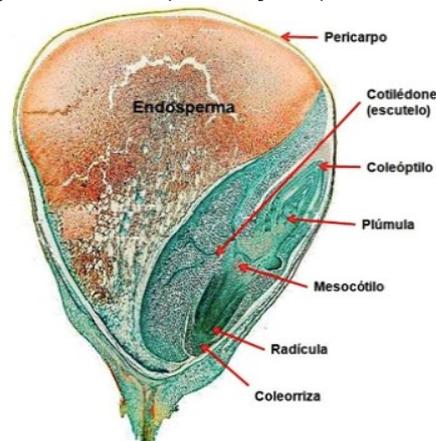
Figura 1 - Espiga de milho (*Zea mays* L.)



Fonte: EMBRAPA (2014).

O grão de milho (Figura 2) é composto pelo pericarpo (camada de fibra envolvendo a semente), endosperma, gérmen – embrião (rico em proteína e óleo), coleóptilo, mesocótilo, radícula e coleorriza (Mahanna et al. 2014). A ponta do grão é a parte remanescente do tecido (pedicelo), que conecta o grão ao sabugo.

Figura 2 - Corte transversal do grão de milho (*Zea mays* L.)



Fonte: Peske; Rosenthal; Rota (2012).

(a) Pericarpo (camada externa) - derivado da parede do ovário, pode ser incolor, vermelho, marrom ou variegado (Mackinnon et al. 2002).

(b) Endosperma - triploide, originário da fusão de dois núcleos femininos e um núcleo masculino (Mackinnon et al. 2002). É composto de uma camada externa de amido rígido ao redor de um núcleo de amido interno maleável (Mahanna et al. 2014). Representa aproximadamente 83% do peso seco do grão (Paes, 2006).

(c) Gérmen - compõe 11% do peso total da semente e consiste de uma plúmula (planta embrionária) e o escutelo (cotilédone ou folha de sementes) (Mahanna et al. 2014).

(d) Coleótilo - bainha de proteção que envolve o ponto de crescimento da plântula (Mahanna et al. 2014).

(e) Mesocótilo - primeiro internódio ou parte do colmo entre o cotilédone e o primeiro nó (Mahanna et al. 2014).

(f) Radícula: raiz primária (Mahanna et al. 2014).

(g) Coleorriza: bainha de proteção que envolve a radícula (Mahanna et al. 2014).

Este alimento abrange quase todos os aminoácidos conhecidos, sendo exceções a lisina e o triptofano (Matos, 2007), devido à sua alta composição de carboidratos (amido) e lipídeos (óleo) é considerado um alimento energético para as dietas humana e animal. O óleo de milho possui em sua composição ácidos graxos, de grande importância para a dieta humana, principalmente para a prevenção de doenças cardiovasculares e o combate ao colesterol sérico elevado.

Outro importante aspecto dos lipídeos no milho está relacionado ao conteúdo dos carotenoides e dos tocoferóis (vitamina E) (Paes, 2006). Devido ao conteúdo lignocelulósico do grão de milho verde e nos derivados integrais do grão seco, esses produtos são considerados indispensáveis fontes de fibras, especialmente do tipo insolúvel (hemicelulose, celulose e lignina) (Oliveira et al. 2004; Paes, 2006). Essas características fazem com que seja recomendado na dieta humana para o controle de colesterol, melhora da constipação intestinal, prevenção do câncer de intestino e da diverticulite, possuindo, portanto, valor funcional importante (Paes, 2006).

Em geral, o mercado de milho verde brasileiro é formado pela indústria, que o vende como milho em conserva ou milho verde enlatado, e as centrais de abastecimento dos grandes centros urbanos (Ceasa, Ceagesp, etc.), distribuem o milho verde em espiga para consumo "*in natura*" e/ou elaboração de pratos típicos, como canjica e pamonha (Matos, 2007).

### 1.1.2 PRODUÇÃO

O milho é um dos principais cereais cultivados no mundo (Abramillho, 2010; Nascimento et al. 2011). Segunda a USDA (adaptador por FIESP, 2022), é o cereal de maior volume de produção mundial, com aproximadamente 1,19 bilhões de toneladas (Tabela 1).

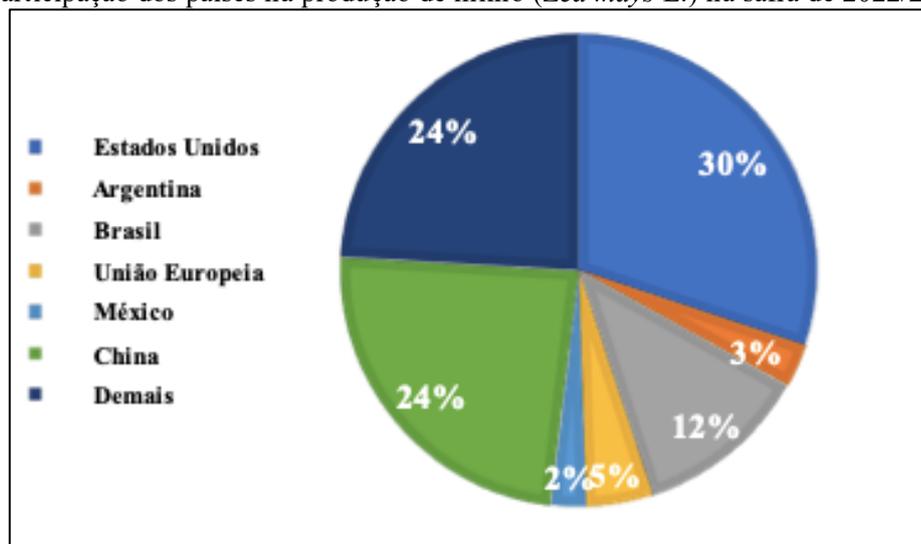
Tabela 1 - Produção mundial de milho (*Zea mays* L.), safra 2022/23 - milhões de toneladas

Países	Safras		Variação	
	18/19	19/20	Abs.	(%)
EUA	383,9	347,0	-15,5	-4,0%
China	272,6	260,8	-1,6	-0,6%
<b>Brasil</b>	<b>116,0</b>	<b>101,0</b>	<b>10,0</b>	<b>8,6%</b>
U.E.28	42,1	64,6	-17,1	-40,7%
<i>Demais</i>	403,2	335,3	-7,8	-1,9%
<b>Mundo</b>	<b>1.217,9</b>	<b>1.185,9</b>	<b>-32,0</b>	<b>-2,6%</b>

Fonte: USDA, adaptado por Fiesp (2022).

Os Estados Unidos, China, Brasil, União Europeia, Argentina e México são os maiores produtores (Figura 4), representando 74% da produção mundial (FAMASUL, 2023). A maior parte do milho cultivado para grão está nos EUA e China, que produzem 30 e 24% do total mundial, respectivamente (USDA, 2020).

Figura 3 - Participação dos países na produção de milho (*Zea mays* L.) na safra de 2022/23



Fonte: USDA, adaptado por FAMASUL (2023).

O consumo global do milho foi projetado em 1,19 bilhão de toneladas, e os estoques mundiais do grão foram projetados em 312,9 milhões de toneladas para a temporada 2022/22 (USDA, 2022).

Os três países líderes na exportação de milho são EUA, Brasil e Argentina (Tabela 2). As exportações globais de milho, de acordo com estimativas do USDA (2022), devem passar de 182,6 milhões de toneladas na safra 2022/23.

Tabela 2 - Exportações mundiais de milho (*Zea mays* L.) - milhões de toneladas

Países	Safras		Variação	
	21/22	22/23 <sup>1</sup>	Abs.	(%)
EUA	62,2	61,0	-1,3	-2,0%
<b>Brasil</b>	<b>44,5</b>	<b>47,0</b>	<b>2,5</b>	<b>5,6%</b>
Argentina	39,0	41,00	2,0	5,1%
Ucrânia	24,0	9,0	-15,0	-62,5%
<i>Demais</i>	29,5	24,6	-4,9	-16,6%
<b>Mundo</b>	<b>199,2</b>	<b>182,6</b>	<b>-16,7</b>	<b>-8,4%</b>

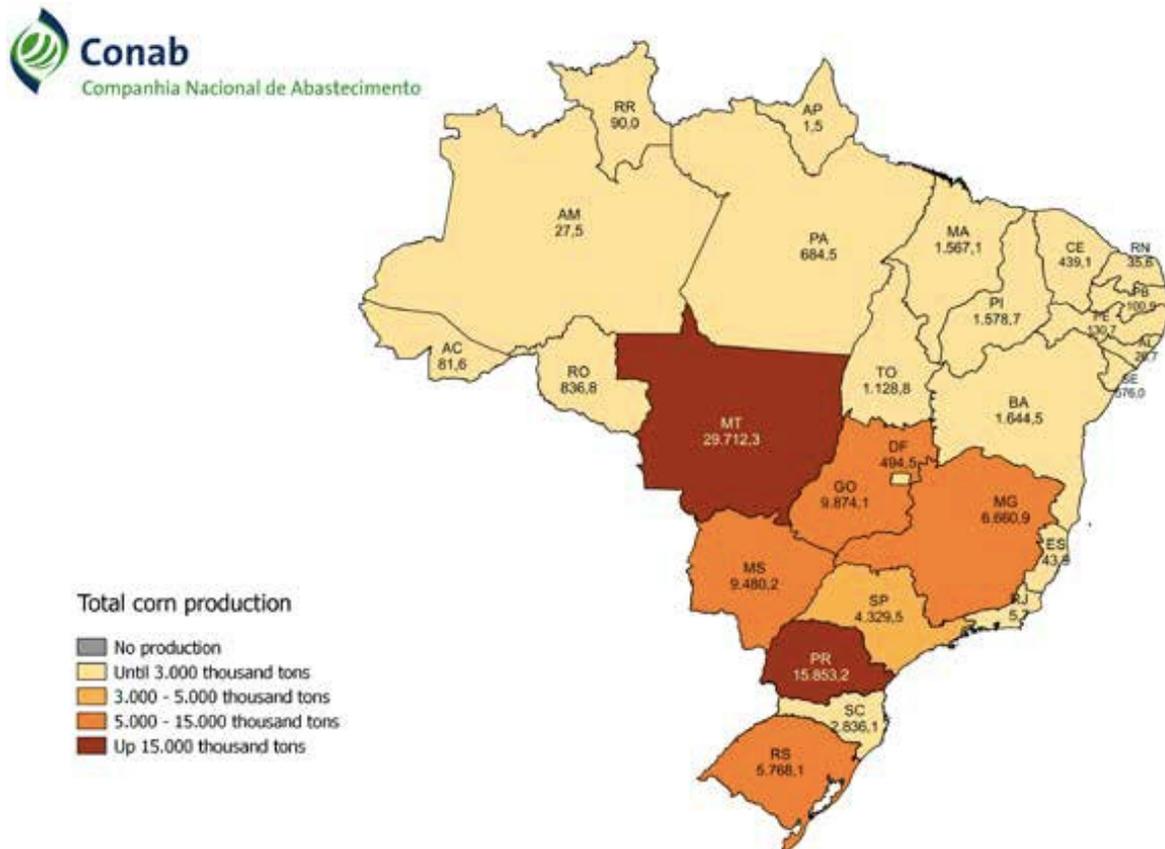
Fonte: USDA, adaptado por Fiesp (2022).

Segundo USDA (2020) o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, sendo este cultivado em diversas regiões do país, em diferentes condições socioeconômicas e edafoclimáticas, em variados sistemas de produção, cultivando em média 101,0 milhões de toneladas anuais. É considerado o cereal mais cultivado mundialmente, anualmente exporta mais de 41 milhões de toneladas de grãos (USDA, 2020).

O milho é cultivado em todas as regiões do Brasil, principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste. Sua produção ocorre em diferentes épocas, face às condições climáticas das regiões. O cultivo de verão, também denominado primeira safra, é o semeio concentrado na primavera/verão e predomina na maioria das regiões produtoras, com exceção das regiões Norte e Nordeste, em que, pela época de maior concentração de chuvas ser a partir do mês de janeiro, o período de semeadura é denominado segunda safra. O cultivo do milho semeado na região Centro-Sul do Brasil, realizado após a colheita da soja, com semeio concentrado no verão/outono, convencionalmente é denominado de safrinha (Contini et al. 2019).

Segundo Contini et al. (2019), o principal produtor nacional é o Estado do Mato Grosso, juntamente com Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (Figura 4), totalizando 74,2% da safra nacional de milho em 2017/18.

Figura 4 - Mapa de produção agrícola de milho (*Zea mays* L.) no Brasil



Fonte: CONAB (2019).

O grão é de extrema versatilidade, sendo transformado em óleo, farinha, amido, margarina, xarope de glicose, flocos para cereais matinais e pamonha, porém o principal destino da safra são as indústrias de rações para animais. O aumento da necessidade mundial de milho como ingrediente para indústria de ração animal amplia a demanda de exportações brasileiras do produto (MAPA, 2011).

## 1.2 FUNGOS CONTAMINANTES DE MILHO

Os fungos que invadem grãos e sementes são geralmente divididos em dois grupos: fungos do campo, que atacam o produto ainda no campo e fungos de armazenagem, que invadem o milho pouco antes e durante o armazenamento (Marcia; Lazzari, 1998; Jouany, 2001; Scussel; Savi; Kluczkovski, 2018).

A razão do grande sucesso dos fungos é sua reprodução através de esporos, que podem ser transportados pela água, vento, plantas, produtos e subprodutos, sendo resistentes às oscilações de temperatura e podendo permanecer dormentes no solo por vários anos (Banwart, 1981; Christensen; Meronuck, 1989; Sinha; Sinha, 1991).

A contaminação pode ocorrer devido as condições ambientais, métodos de produção ou processamento e armazenagem, e também dependerá do tipo de alimento, visto que alguns grãos são substratos mais aptos que outros para o desenvolvimento e crescimento de determinados fungos (Santurio, 2000).

Além desses dois grupos, podemos destacar também os fungos endofíticos, fungos estes que passam parte ou todo o seu ciclo de vida colonizando os espaços inter ou intracelulares de tecidos vivos de uma planta hospedeira, onde desempenham diferentes interações sem causar efeitos negativos na planta (Schulz; Boyle, 2005; Strobel; Daisy, 2003).

Os grãos de milho têm a sua qualidade alterada direta ou indiretamente quando estes são infectados por fungos (Figura 5), possíveis produtores de micotoxinas, gerando danos à saúde humana e animal em razão da sua atividade tóxica sobre o organismo (Scussel, 1998; Farias et al. 2000; Kumar; Basu; Rajendran, 2008). O termo conhecido como micotoxina tem sua origem de uma palavra grega “mykes” (fungo) e de uma palavra do latim “toxicum” (toxina). Essa expressão greco-latina “mykestoxicum” tem como significado toxina fúngica, ou micotoxina (Lazzari, 1997).

Figura 5 - Dano causado na espiga de milho (*Zea mays* L.) devido a contaminação fúngica



Fonte: EMBRAPA (2014).

Micotoxina é um grupo de compostos, altamente tóxicos, produzidos por certas leveduras ou fungos (organismos aeróbios) que se desenvolvem em lugares que apresentam baixa presença de água, o qual é inapropriado para o crescimento bacteriano (Newman, 2000). As micotoxinas possuem alta estabilidade química, o que permite a sua permanência no alimento mesmo após a retirada dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem (Chu, 1991).

Os fungos filamentosos produzem uma grande quantidade de metabólitos secundários (Tabela 3), como antibióticos, fitotoxinas, pigmentos, além de micotoxinas, que são compostos tóxicos. Quando produzidos em associação com ração animal, alimentos e forragens, os metabólitos tóxicos podem ser ingeridos pelo homem e animais, provocando as micotoxicoses (Coulombe, 1991; Moss, 1991).

Tabela 3 - Principais fungos produtores de micotoxinas e seus efeitos tóxicos

<b>Micotoxinas</b>	<b>Fungos Produtores</b>	<b>Alguns efeitos observados em animais</b>
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Problemas hepáticos, carcinogênicos e teratogênicos
Tricotecenos	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium sporotrichoides</i> <i>Fusarium poae</i> <i>Fusarium equiseti</i>	Efeitos imunológicos, distúrbios digestivos/sangue, dermatite, lesões bucais, hemorragias de tecidos intestinais
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i>	Efeitos estrogênicos, atrofia dos ovários e testículos, aborto
Ocratoxina A	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium vermicosum</i> <i>Penicillium veridicatum</i>	Alterações nos rins e fígado, supressão imunológica
Fumonisinias	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Edema pulmonar, leucoencefalomalácia, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade

**Fonte:** Scussel; Savi; Kluczkovki (2018).

As doenças causadas por micotoxinas são denominadas micotoxicoses, as quais se caracterizam por síndromes difusas, com predomínio de lesões em determinados órgãos, como rins, fígado, tecido epitelial e sistema nervoso central, dependendo da micotoxina. Pode acontecer simultaneamente a ocorrência de duas ou mais micotoxinas, potencializando os seus efeitos tóxicos sobre o organismo em questão (Fernandes, 2004). Os sinais e sintomas vão desde lesões de pele, sintomas de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, hematotoxicidade ou genotoxicidade, podendo chegar à morte. Podem apresentar efeitos mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos ou imunossupressores (Cole; Cox, 1981).

Segundo Jobim, Gonçalves e Santos (2001), as micotoxicoses podem resultar da ingestão de toxinas produzidas por três tipos de fungos:

1. Macroscópicos – (cogumelos) 243 espécies são tóxicas para o homem e para os animais;
2. Parasitas – infestam e causam doenças nas plantas durante o seu desenvolvimento no campo;
3. De armazenamento – infestam e crescem nas plantas durante o seu desenvolvimento no campo, colheita, secagem, armazenamento e transporte. Em forragens, grãos e sementes, com teores de umidade relativamente baixos e em condições favoráveis podem produzir micotoxinas.
4. O efeito mais comum de envenenamento leve ou crônico por micotoxinas é o mau desenvolvimento dos animais domésticos – aves, suínos e bovinos. A contaminação de alguns ingredientes da dieta pode levar a ingestão de níveis de micotoxinas potenciais para reduzir o desempenho animal (Lazzari, 1997).

As pesquisas têm demonstrado que a incidência de micotoxinas e a ocorrência de micotoxicoses não estão restritas a um determinado clima, região geográfica ou país. É difícil de estimar a extensão dos problemas causados pelas micotoxinas por várias razões, dentre as quais podemos destacar:

1. As toxinas podem ocorrer em baixas concentrações dificultando sua detecção;
2. Frequentemente o produto contaminado já foi totalmente consumido quando os sinais de micotoxicoses são aparentes;
3. Os sinais de micotoxinas podem ser confundidos com outras doenças dificultando a sua caracterização;
4. Médicos e técnicos não são treinados ou não estão familiarizados com os sinais de micotoxicose.

Em geral, as micotoxinas são classificadas baseando-se na espécie fúngica produtora, estrutura química e/ou modo de ação. Porém, é válido ressaltar que uma única espécie de fungo pode produzir uma ou mais micotoxinas, e uma micotoxina pode ser produzida por diferentes espécies fúngicas (Hussein; Brassel, 2001). As principais micotoxinas encontradas nas forragens e grãos, estão geralmente associadas com um grupo de espécies de fungos, tal como, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Bruerton, 2001; Dawson; Evans; Kudupoje, 2001, Scussel; Savi; Kluczkovski, 2018).

### 1.2.1 FUNGOS DE CAMPO

Geralmente, a deterioração dos grãos começa no campo, onde o produto é mantido na planta até a secagem, prática está muito utilizada pelos agricultores, visto que requer pouco investimento. Porém, esta prática pode causar elevadas infestações de fungos e de pragas de grãos armazenados (Miller, 1995; Resnik et al. 1996; Reid et al. 1999; Nesci; Rodriguez; Etcheverry, 2003).

Os fungos do campo exigem que o cereal apresente umidade alta para se desenvolverem (em equilíbrio com umidade relativa de 90 a 100%) de 22/23% em peso úmido ou 30 a 33% em peso seco, tendo como exceção do milho armazenado na espiga onde pode ser atacado por fungos de campo, mesmo após a sua colheita (Scussel; Savi; Kluczkovski, 2018). Os principais gêneros são *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Alternaria* e *Cladosporium* que invadem grãos e sementes durante o amadurecimento, onde o dano é causado antes da colheita, porém quando armazenados com alto teor de umidade poderão também se desenvolver durante a estocagem (Sinha; Sinha, 1991; Miller, 1995; Marcia; Lazzari, 1998).

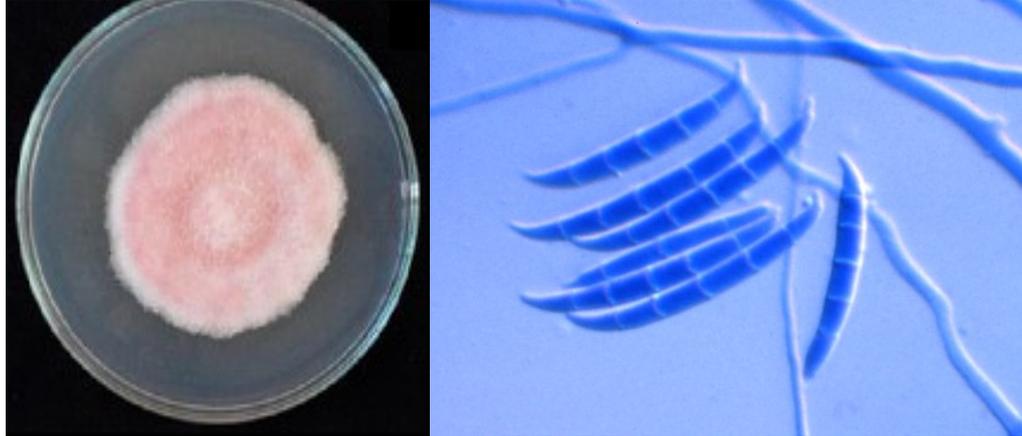
Dentre os fungos de campo, o *Fusarium* é o de maior importância, tendo em vista que algumas espécies quando desenvolvidas em sementes podem causar a podridão da espiga de milho (Mills, 1989) e dependendo da espécie / condições em que invadiu o grão, pode inclusive produzir toxinas (Scussel; Savi; Kluczkovski, 2018). É um gênero fúngico amplamente disseminado em plantas nativas e cultivadas, mas a importância primordial se deve à atuação como patógeno primário de milho a nível cosmopolita, sendo responsável pela perda econômica de centenas de milhões de dólares anuais (Frisvad; Samson, 2004).

Esses fungos possuem ampla distribuição mundial e são encontrados tanto no solo quanto na superfície de plantas. A contaminação de grãos e cereais pode ocorrer no campo, ou durante o armazenamento. O fungo desenvolve-se no milho em condições naturais, onde, devido à dificuldade da colheita no estágio correto de maturação da planta e ao alto teor de umidade de armazenamento, encontra condições ótimas para a produção das toxinas (Leeson; Diaz; Summers, 1995).

As características das suas colônias (Figura 5) são micélio bastante desenvolvido, com aparência cotonosa, normalmente com coloração róse-violeta ou amarela, tanto no micélio como no meio em que se desenvolve. Conídios variáveis, finos e simples ou curto, ramificados irregularmente. Conídios hialinos, multicelular, ligeiramente curvo, ou inclinado nas extremidades afiladas, tendo tipicamente forma de canoa/fuso; o microconídio é unicelular,

ovoide ou oblongo, isolado ou em cadeia. Muitas espécies desse gênero produzem toxinas (Scussel; Savi; Kluczkovski, 2018).

Figura 6 - Características macroscópicas e microscópicas do gênero *Fusarium*



Fonte: Teixeira; Coelho; Tebaldi (2017); Agro Online (2017).

### 1.2.2 FUNGOS DE ARMAZENAGEM

Os fungos de armazenagem *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* são encontrados em silos, armazéns, moinhos, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados os grãos. Os fungos do gênero *Aspergillus* e os do gênero *Penicillium* são os principais indicadores de deterioração em sementes e grãos causando danos no gérmen, descoloração, alterações nutricionais, perda da matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica (Sinha; Sinha, 1991; Miller, 1995; Marcia; Lazzari, 1998). Estão presentes na película do grão e semente sob forma de esporos, e se desenvolvem tão logo encontram condições adequadas de umidade e temperatura, inclusive no gérmen. Todos os fungos de armazenagem têm habilidade de crescer em materiais onde a umidade esteja em equilíbrio com UR de 70 a 90% (Scussel; Savi; Kluczkovski, 2018).

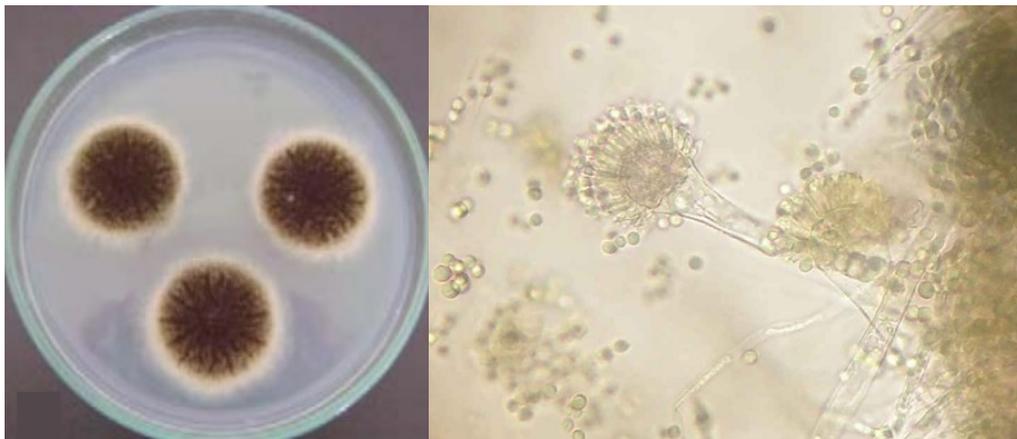
As espécies do gênero *Aspergillus* são, provavelmente, as mais implicadas na deterioração de alimentos. Morfologicamente, caracterizam-se pelo desenvolvimento de colônias coloridas e brilhantes e produção de conídios com cabeças do tipo escovão (Geisen, 2000). O fungo apresenta afinidade particular por determinados substratos, tais como amêndoas e sementes oleaginosas, sendo o amendoim, o milho e o algodão culturas mais atingidas e economicamente mais importantes (Pitt; Hocking, 1985).

Por ser um gênero indicador de qualidade, alguns dos seus efeitos são a descoloração e morte do gérmen, blue eyes em grãos de milho armazenados com umidade de 14,5 a 15,0%,

variando a espécie pode chegar 18,5% de umidade a baixa temperatura. Pode levar a formação de torrões em cereais. Algumas espécies podem ou não produzir toxinas, tais como ocratoxina A e aflatoxinas (Scussel; Savi; Kluczkovski, 2018).

As características das suas colônias (Figura 6) são micélio septado, ramificado, normalmente incolor. Conidióforos erguidos simples, terminando em uma dilatação globosa ou elíptica (vesícula), frequentemente originando-se de uma célula basal. A partir da vesícula podem originar-se métulas e fiálides, das quais se agrupam os conídios. Conídios são unicelulares, esféricos, de coloração variada (Scussel; Savi; Kluczkovski, 2018).

Figura 7 - Características macroscópicas e microscópicas do gênero *Aspergillus*



Fonte: Monteiro (2012); Tomé (2012).

Os fungos do gênero *Penicillium* invadem de forma intensa os grãos antes da colheita, e algumas de suas espécies também são fungos de campo. São encontrados em grande número no ar, poeira, solo e resíduos de grãos. Os principais efeitos causados por este gênero em grãos são a morte e descoloração do gérmen e de toda a semente, além de formação de torrões. Causa também, como os fungos do genero *Aspergillus*, blue eyes em milho armazenado à umidade acima de 18,5% a baixa temperatura. Algumas espécies deste gênero podem produzir toxinas (Scussel; Savi; Kluczkovski, 2018).

As características das suas colônias (Figura 7) são micélio septado, geralmente incolor. Conidióforos aéreos, septados, perpendiculares à hifa submersa da qual imergem. Podem ser ramificados ou não; no primeiro caso, formam estruturas características (arranjo em vassoura / pincel). Os conidióforos podem apresentar nas extremidades a métula e a fiálide a partir da qual se agrupam os conídios. Estes são hialinos e coloridos, unicelulares e esféricos (Scussel; Savi; Kluczkovski, 2018).

Figura 8 - Características macroscópicas e microscópicas do gênero *Penicillium*



Fonte: Frisvad; Samson (2004).

### 1.2.3 FATORES QUE FAVORECEM O DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS E FORMAÇÃO DE MICOTOXINAS

Os principais fatores que afetam o crescimento de fungos e produção de toxinas são classificados em três categorias: fatores físicos, químicos e biológicos, e podemos destacar os mesmos da seguinte forma: teor de umidade dos grãos, temperatura, tempo, condição física e sanitária do grão, nível de inoculação do fungo, luz, danos mecânicos, por insetos e ácaros, microclima (atmosfera), fungicidas, composição do substrato, competição microbiana (interação microbiana) e linhagem do fungo contaminante (Miller, 1995; Márcia e Lazzari, 1998).

O processo de limpeza e secagem dos grãos antes do armazenamento é prática agrícola recomendada para assegurar a qualidade do produto durante o armazenamento. O grão armazenado deve ser monitorado quanto a presença dos contaminantes (insetos e fungos), já que é um substrato importante para o ataque de fungos e de micotoxinas (Weber, 2000).

A umidade é um dos principais fatores que favorecem o crescimento de fungos e a formação de micotoxinas. Grãos armazenados com umidade acima do nível crítico (cerca de 13-14%) são altamente suscetíveis à infestação fúngica. A umidade relativa (UR) do ar também desempenha um papel importante (Magan; Aldred, 2020; Silva, 2020). Portanto, para que os grãos tenham estocagem segura, algumas práticas são necessárias: (a) realizar uma secagem homogênea, (b) evitar quebra dos grãos durante a colheita, secagem e estocagem, (c) manter o ambiente de estoque sem roedores, (d) manter os grãos em ambiente bem ventilado e (e) secar abaixo da umidade crítica (Silva, 2020a).

A temperatura ideal para o crescimento dos fungos está em torno de 25°C, geralmente entre 22°C a 30°C para a grande maioria das espécies. Porém, existem espécies que possuem adaptações para se desenvolver em temperaturas mais baixas, como 10°C, e outros que suportam temperaturas altas, chegando até a 40°C (Smith, 2019).

Danos mecânicos favorecem a absorção de umidade e facilitam a invasão e a penetração de fungos no interior altamente nutritivo deste grão, levando ao desenvolvimento rápido dos fungos e conseqüentemente aumento de toxinas (Reis, 2018).

Certos grãos e sementes têm composições nutricionais que são mais favoráveis ao crescimento de fungos. A presença de açúcares, aminoácidos e outras substâncias pode estimular a proliferação fúngica (Weaver; Abbas, 2021).

O crescimento de fungos depende também de outras condições ambientais que envolvam o substrato, tais como ambiente gasoso. Ocorre pouco crescimento em ambientes com dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) ou nitrogênio (N<sub>2</sub>). Ambientes com atmosfera controlada tem sido muito utilizado durante o transporte e armazenamento de produtos para prevenir o crescimento e formação de toxinas (Mendonça, 2021).

Fungos normalmente se desenvolvem em pH ácido (5 a 6, podendo crescer em pH 7 também). Portanto, alimentos ácidos ou que estão iniciando ou já estão fermentados, são ótimos substratos para proliferação de fungos e produção de toxinas (Scussel, 2008).

#### 1.2.4 CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS *versus* FUNGOS

O clima pode ser definido como uma generalização ou uma integração das condições do tempo para certo período, em determinada área. O clima de uma região é condicionado por fatores como precipitação, umidade relativa, radiação solar, temperatura do ar, velocidade do vento, direção do vento e pressão atmosférica. Esses fatores, por sua vez, são influenciados por altitude, latitude, topografia, características do solo e da vegetação, entre outros aspectos (Souza; Pereira; Almeida, 2020).

Parte da radiação solar dirigida a terra é absorvida pela superfície terrestre (70%); a outra parte (30%) é refletida na forma de calor (Lopes, 2019). Desta, uma parcela se dissipa e retorna ao espaço enquanto outra parcela é impedida de retornar pela barreira de gases que funcionam como uma estufa, absorvendo a radiação infravermelha e propiciando o aquecimento da terra. A ocorrência natural desse processo mantém constante a temperatura em torno de 15°C.

Sem a ocorrência natural do efeito estufa, a temperatura média do planeta seria em torno de - 18°C (Pereira, 2018).

Considerando a extensão do território brasileiro que se estende desde aproximados 32° de latitude Sul até 5° de latitude norte, é natural encontrarmos uma diversidade de tipos climáticos que variam desde climas quentes e secos / úmidos a climas frios e úmidos. Também se faz necessário considerar a variação altimétrica que varia de próximo de 0 metro em grande extensão da planície litorânea a 3.014 metros no pico da neblina (AM). Não bastasse a variação latitudinal (norte a sul) e altimétrica alia-se a esta diversidade de fatores que influenciam os climas do Brasil o efeito da maritimidade / continentalidade pela presença de extensa massa de águas a leste do continente - Oceano Atlântico (Valmorbida, 2016).

Freire e colaboradores (2007) afirmam que o nosso país possui condições ambientais excelentes para o crescimento de todos esses fungos micotoxigênicos (Tabela 5), os quais possuem efeitos deletérios sobre a saúde humana e animal (ração), sendo capazes de induzir efeitos carcinogênicos, hepatotóxicos e mutagênicos. Os países que importadores de alimentos têm se preocupado cada vez mais quanto à presença de micotoxinas nos alimentos. O que tem levado à elaboração de legislações mais rígidas, logo, o Brasil possivelmente enfrentará dificuldades para exportar seus produtos agrícolas.

Tabela 4 - Principais gêneros fúngicos isolados dos maiores produtores e exportadores de grãos de milho (*Zea mays* L.)

País	Principais gêneros fúngicos isolados Campo	Armazenagem	Fonte
<b>Estados Unidos</b>	<i>Fusarium</i> , <i>Stenocarpella</i> , <i>Trichoderma</i> ; <i>Cladosporium</i> ; <i>Helminthosporium</i> ; <i>Nigrospora</i> ; <i>Diplodia</i> ; <i>Curvularia</i> ; <i>Mucor</i> e <i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i> ; <i>Penicillium</i> , <i>Wallemia</i> e <i>Candida</i>	Lane et al. 2018 / Tuite, 1961 / Mislivec; Tuite, 1970 / Doupnik, 1972 / Hesseltine; Bothast, 1977 / Wicklow, 1983 / Leslie et al. 1990
<b>China</b>	<i>Fusarium</i> e <i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>	Xing et al. 2017
<b>Brasil</b>	<i>Fusarium</i> ; <i>Stenocarpella</i> ; <i>Macrophomina</i> ; <i>Eurothium</i> ; <i>Pythium</i> ; <i>Gibberella</i> e <i>Colletotrichum</i>	<i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>	Castro et al. 1994 / Pezzini; Valduga / Cansian, 2005 Silva; Cota; Costa, 2012
<b>União Europeia</b>	<i>Fusarium</i> ; <i>Acremonium</i> ; <i>Dendryphion</i> ; <i>Dictyosporium</i> ;	<i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>	Marasas et al. 1979 / Lew et al. 1991 / Jimines et al. 1985 / Fischl; Halasz, 1990

	<i>Gibberela;</i> <i>Helminthosporium</i> e <i>Phaeocystostroma</i>		/ Logrieco; Bottalico, 1988 / Kwasna; Chelkowski, 1991 / Winter; Menzi, 1991 / Mencarelli; Accinelli; Vicari, 2012
<b>Argentina</b>	<i>Fusarium; Alternaria;</i> <i>Nigrospora;</i> <i>Trichoderma;</i> <i>Acladium; Absidia;</i> <i>Cladosporium;</i> <i>Stigmella;</i> <i>Helminthosporium</i> e <i>Rhizopus</i>	<i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>	Banchero at al. 1982 / Etcheverry, 1982 / Mendes da Silva et al. 1985 / Bertinetti, 1988 / Neira, 1992 / Saubois; Piontelli, 1995 / Magnoli et al. 2006 e Chavarri et al. 2012;

#### 1.4. MÉTODOS DE INATIVAÇÃO FÚNGICA

As novas tendências em tecnologia, além de preservar as características do alimento, devem buscar segurança ao meio ambiente, revelando preocupação com o equilíbrio entre a produção e o consumo de alimentos. Uma das consequências desta demanda é o crescente interesse por tecnologias de processamento/conservação que não provoquem alterações indesejáveis no alimento e também não agridam o meio ambiente, sendo denominadas de “tecnologias não convencionais”, “tecnologias emergentes”, “tecnologias limpas” ou “tecnologias de baixo impacto ambiental” (Costa; Deliza; Rosenthal, 1999).

O processo ideal de descontaminação deve ser de fácil utilização, não deve gerar compostos que apresentem toxicidade, ou que modifiquem as propriedades nutricionais e a palatabilidade do grão e respectivos derivados, além de ser econômico (Silva; Alves, 2020b). O grau da descontaminação irá depender principalmente do método empregado e do fungo / toxicidade presente na amostra (Soriano; Dragacci, 2004).

##### 1.4.1 MÉTODOS FÍSICOS

A indústria de alimentos se encontra com um grande desafio de oferecer aos seus consumidores produtos alimentícios nutritivos, seguros e com estabilidade no armazenamento, evitando a contaminação por microrganismos (Silva, 2019). Durante as operações de processamento ou pós-colheita, a contaminação microbiana pode ocorrer em qualquer etapa de fabricação. Geralmente, o processamento térmico é usado para produzir produtos alimentares

estáveis e microbiologicamente seguros, no entanto, não é o método preferido devido à perda das qualidades nutricionais e sensoriais. Esses fatos levaram ao surgimento de tecnologias de descontaminação alternativas, como secagem, processamento de alta pressão, radiação ultravioleta (UV), Plasma Frio, entre outros (Ekezie; Sun; Cheng, 2017).

#### **1.4.1.1 Secagem**

A redução da umidade nos grãos é um método eficaz para controlar o crescimento fúngico. A secagem dos grãos de milho a um nível de umidade adequado pode inibir o crescimento de fungos e evitar a produção de toxinas. A secagem pode ser realizada através de métodos naturais, como a exposição ao sol, ou utilizando equipamentos de secagem, como secadores de ar quente (Chandra et al. 2009).

#### **1.4.1.2 Processamento de Alta Pressão**

A tecnologia de alta pressão, como a aplicação de ultrassom de alta intensidade, pode ser utilizada para descontaminar alimentos, incluindo grãos de milho. A aplicação de pressão ultrassônica pode danificar as células fúngicas e inativar as toxinas, reduzindo assim a contaminação fúngica nos grãos (Eskandari et al. 2020).

#### **1.4.1.3 Radiação Ultravioleta**

A exposição aos raios ultravioleta pode ser usada para descontaminar grãos de milho. A radiação UV pode danificar o DNA dos fungos e inibir seu crescimento, reduzindo assim a contaminação fúngica. A aplicação de luz UV em grãos de milho durante o armazenamento pode ajudar a manter a qualidade e a segurança dos grãos (Brancalion et al. 2020).

### **1.4.2 MÉTODOS QUÍMICOS**

Os métodos químicos de descontaminação fúngica de grãos de milho envolvem o uso de substâncias químicas para reduzir ou eliminar a presença de fungos e suas toxinas nos grãos. O exemplo mais clássico de método químico considerado método brando de inativação fúngica é o gás ozônio.

### 1.4.2.1 Ozônio

Dentre os métodos químicos, a aplicação do gás ozônio (O<sub>3</sub>), tem sido muito utilizada na indústria de processamento de alimentos na forma de ozônio gasoso ou água ozonizada. Ambos tem sido utilizado como bactericida em uma vasta gama de produtos alimentares, incluindo peixes, carne, aves, ovos, frutas e vegetais crus, frutos e sumos de frutos, bem como o saneamento de superfícies de contato com o produto (Scussel et al. 2018, Runtzel et al. 2020).

No Brasil, não há uma legislação específica para o seu uso em alimentos e sua aplicação com essa finalidade ainda é limitada, apesar de a ozonização estar entre as mais recentes tecnologias sanitizantes que não geram resíduos e ser uma técnica segura e microbicida. O O<sub>3</sub> é o segundo mais poderoso agente oxidante perdendo apenas para o flúor (Lapolli et al. 2003). Deste modo, o alto poder de oxidação do O<sub>3</sub> lhe imprime elevada capacidade de desinfecção e esterilização permitindo que a ação sanitizante ocorra em menor tempo de contato e concentração (Santos; Oliveira, 2019).

### 1.4.3 MÉTODOS BIOLÓGICOS

O intenso uso de agrotóxicos no Brasil tem sido uma pauta amplamente discutida nos últimos anos. Apesar de ser um recurso contra pragas que causam prejuízos na agricultura, sua utilização está intimamente ligada a inúmeras mortes humanas, além de provocar graves danos ambientais. Os defensivos agrícolas naturais surgem como uma alternativa para o controle de pragas sem representar ameaças à saúde humana e ao meio ambiente (Oliveira et al. 2020).

A aplicação dos Óleos Essenciais (OE) como opção de conservação se tornou muito empregada nesses últimos anos, visto que a crescente procura por parte dos consumidores e o interesse das indústrias em buscar a possibilidade de consumir / reduzir o uso de aditivos químicos aos alimentos, favorecendo o aumento da ingestão dos aditivos químicos de forma mais saudável (Garcia; Santos, 2021). Alguns OE têm demonstrado importante potencial antioxidante e antimicrobiano para alimentos, atuando no controle do crescimento microbiano, dentre eles, o OE de orégano (*Origanum vulgare* L.) (Roshandel-Hesari et al. 2022), capim-limão (*Cymbopogon citratus* Stapf) (Boeira et al. 2020), manjericão (*Ocimum basilicum*) (Mendonça, 2018), Piperina (*Piper nigrum*) (Ferreira et al. 2012), Jucá (*Libidibia ferrea* Mart), Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth ) (Martins, 2014) e Andiroba (*Carapa guianensis*) (Silva et al. 2020c).

#### 1.4.3.1 Orégano (*Origanum vulgare* L.)

O Óleo essencial de Orégano, tem sido estudado por suas propriedades antimicrobianas, incluindo sua capacidade de inativar fungos (Silva; Pereira, 2020). Vários estudos demonstraram que o óleo essencial de orégano possui atividade antifúngica contra uma variedade de fungos, incluindo aqueles que podem contaminar grãos de milho (Gonçalves; Almeida, 2019).

Os compostos ativos no Óleo de Orégano, como o carvacrol e o timol, são responsáveis por suas propriedades antimicrobianas. Esses compostos podem interferir nas membranas celulares dos fungos, perturbando sua integridade e função e levando à inativação (Silva; Pereira, 2020).

#### 1.4.3.2 Piperina (*Piper nigrum*)

A piperina é um alcaloide encontrado na pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), esse composto vem demonstrando características benéficas de interesse agrônomo. Dentre elas, podemos destacar a sua ação amebicida, antifúngica, inseticida e inibição da resistência bacteriana (Ferreira et al. 2012). O uso desse alcaloide pode ser uma alternativa aos fungicidas convencionais por ser atóxica e ter ação efetiva contra fungos mesmo em baixas concentrações (Silva; Gonçalves, 2021).

#### 1.4.3.3 Jucá (*Libidibia ferrea* Mart)

As plantas medicinais constituem a base dos sistemas de saúde em muitas comunidades amazônicas no Brasil. Estudos etnofarmacológicos nesta região apontam o jucá (*Libidibia ferrea* Mart) como planta cicatrizante, antifúngica, antimicrobiana e anti-inflamatória da floresta amazônica. Os moradores locais a utilizam na forma de chá (folhas, frutas ou casca), xarope (casca) e como enxaguante bucal, mergulhando as frutas em álcool por dias (Silva; Santos, 2020).

Apesar de suas propriedades antimicrobianas, a maioria dos estudos com o extrato bruto de jucá concentrou-se no seu alto teor de polifenóis e nas propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antiulcerosas e quimio preventivas do câncer (Silva; Santos, 2020). O extrato bruto de jucá contém antraquinonas, alcalóides, depsídeos, depsídonas, flavonóides, lactonas,

saponinas, açúcares, taninos, sesquiterpenos e triterpenos. Os taninos são considerados o componente principal (Souza et al. 2006).

As propriedades terapêuticas dos frutos do jucá têm sido descritas e estudadas ao longo dos anos e incluem o tratamento de feridas e hematomas e o alívio da tosse crônica e da asma (Souza; Pereira, 2019). Os frutos do Jucá apresentam propriedades antiulcerogênicas (Silva; Almeida, 2021), anti-inflamatórias e analgésicas (Gonçalves; Santos, 2020).

#### **1.4.3.4 Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth)**

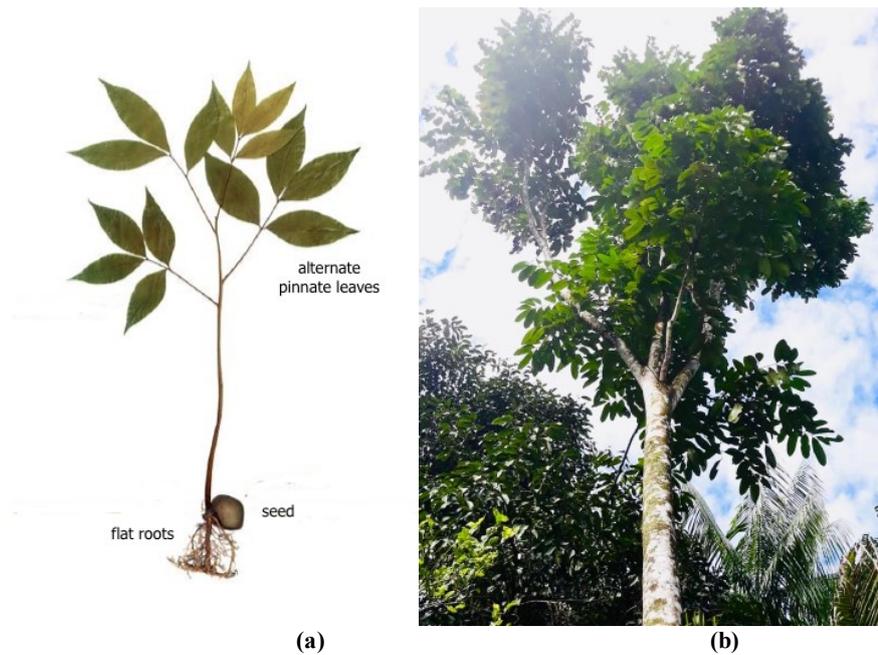
O guaraná, é uma planta arbustiva de baixo crescimento, rico em cafeína (Souza; Pereira, 2020). As sementes desta planta também contêm teofilina, teobromina, derivados de xantina e taninos e também catequina, epicatequina e proantocianidinas (Santos; Almeida, 2021). Devido ao seu alto teor de cafeína, sugere-se que sua semente tenha proteção natural contra micotoxinas de fungos toxigênicos. As substâncias catéquicas presentes no guaraná demonstram atividade antioxidante, antiviral, bactericida, moluscicida e de inibição de algumas enzimas extracelulares (Silva; Gonçalves, 2022).

### **1.5 ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl.) - A ÁRVORE**

A espécie *Carapa guianensis* Aubl., ordem Sapindales (Angiosperma), gênero *Carapa*, pertence à família *Meliaceae* (folhas pinadas alternadas, sem estípulas, com flores em panículas, cimeiras, espigas ou cachos) (Barros et al. 2012). É uma árvore monóica de médio a grande porte com tronco cilíndrico e reto. Pode atingir até 55 m de altura, (geralmente atingindo 25-35 m). Possui tronco cilíndrico e reto de 20-30 m, podendo apresentar sapopemas (raízes planas). Sua copa é de tamanho médio, densa e composta por ramos eretos ou com leve curvatura. Sua casca é espessa e amarga e possui coloração avermelhada, mas também pode ser acinzentada (Ferraz; Camargo, 2003). A Figura 9 mostra as características da Andiroba.

Os ramos (30-90 cm de comprimento) tendem a ficar eretos, com folhas grandes (compostas, alternadas e paripinadas), com traço de folíolo terminal, tomentoso e glandular (Ferraz; Camargo; Sampaio, 2002). Folhetos opostos ou subopostos de 3 a 10 pares, com 10 a 50 cm de comprimento e 4 a 18 cm de largura. Apresentam margens cheias e cor verde escuro brilhante na face superior e glabra na face inferior com tricomas simples e esparsos na nervura central. Apresenta também nectários extraflorais nas pontas das folhas (Lorenzi, 1992; Ferraz et al. 2003).

Figura 9 - Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.): (a) partes de germinação das sementes e (b) árvore adulta



**Fonte:** Ferraz et al. 2003 e autora, respectivamente.

Suas flores são pequenas (Figura 10), com pétalas de no máximo 8 mm de comprimento, unissexuais, sésseis ou subsésseis, glabras, levemente perfumadas de cor branca a creme e são predominantemente quádruplas, com 4 sépalas, 8 pétalas e 16 estames (Rizzini; Mors, 1976; Pennington, 1981). A floração da Andiroba ocorre durante o período chuvoso (de janeiro-fevereiro a agosto-setembro) e período seco com frutificação entre o outono (de junho-julho a fevereiro-março). Sua frutificação inicia-se 10 anos após o plantio (Ferraz et al. 2003).

Figura 10 - Detalhes da flor da Andirobeira (*Carapa guianensis* Aubl.)



**Fonte:** Embrapa-modificado (2021).

O fruto (Figura 11) é uma cápsula, formada por 4 válvulas, globosa ou subglobosa (5-11 cm de diâmetro), quando madura abre e libera de 4 a 12 sementes (Loureiro et al. 1979;

Pennington et al. 1981; Cavalcante, 1991; Lorenzi, 1992, Prophiro et al. 2012). Apresenta coloração amarelo escuro, pesando respectivamente 90 e 540 g de casca e sementes (correspondendo a 24 e 66% do total do fruto) (Alessandro, 2008).

A semente da Andiroba, que fornece grande quantidade de óleo, apresenta coloração marrom, com grande variação de formato e tamanho. Seu peso pode variar de 1 a 70 g (média de 21 g) e comprimento de 10 a 60 mm (Ferraz et al. 2003). Suas laterais são anguladas devido à compressão mútua das sementes (no ouriço). Sua árvore pode produzir de 180 a 200 kg/ano de sementes contendo aproximadamente 60% de OA (Lorenzi, 1992).

Figura 11 - Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) características dos: frutos e sementes (sua distribuição na ouriço)



Fonte: Autora (2019).

Distribuição e clima: As espécies nativas estão distribuídas desde a América Central até a região Norte da América do Sul (Guiana Britânica e Francesa, Trinidad, ao longo da costa do Caribe, Venezuela, Equador, Colômbia, Peru e Brasil). Além desses países, a Andiroba também é encontrada na Índia Ocidental e na África do Sul (Ferraz, Camargo, 2003, Qi et al. 2003, Qi et al. 2004, Ambrozin et al. 2006, Duminil et al. 2006, Farias et al. 2007, Ferrari et al. 2007).

No Brasil ocorre nas regiões Norte (Acre, Amazonas, Amapá e Pará) e Nordeste (Maranhão) (Santos; Pereira, 2021). É encontrada principalmente em várzeas e pântanos ao longo dos cursos de água. Porém, também cresce em encostas em solos bem drenados e é amplamente cultivada em terra, onde atinge menor porte (Lima; Azevedo, 2005).

Em relação ao clima, a Andiroba ocorre em regiões de clima tropical úmido (precipitações entre 1.800 e 3.500 mm anuais). As temperaturas podem variar de 17 a 30°C e a umidade relativa de 70 a 90%. A espécie se desenvolve melhor em solos argilosos e lamacentos (não encharcados) e com abundante matéria orgânica (Revilla, 2001).

### 1.5.1 ÓLEO DE ANDIROBA

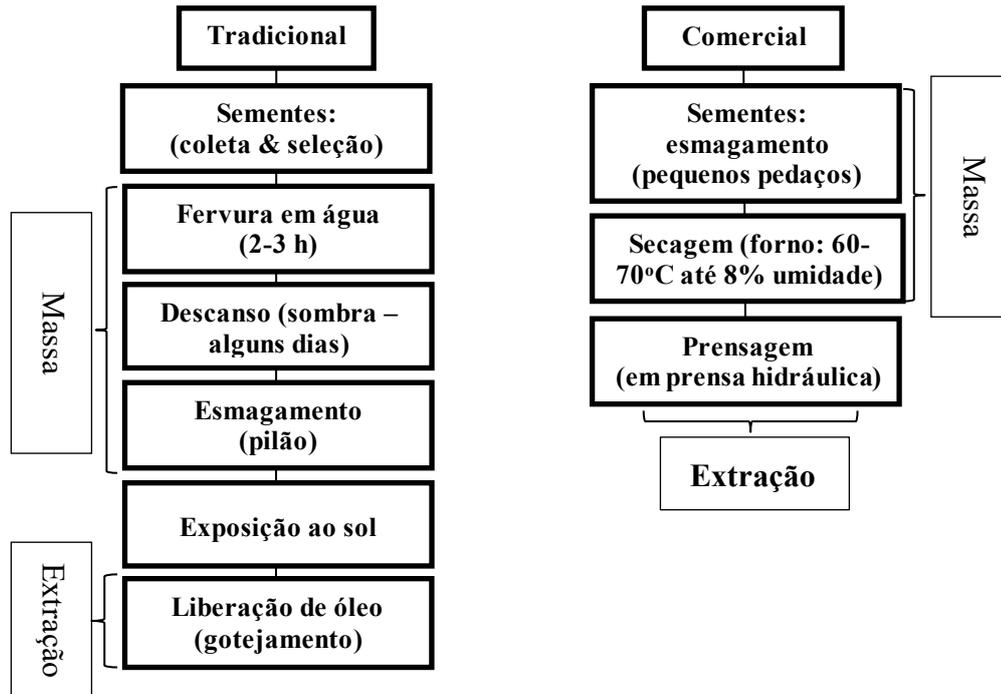
Ao longo da história da Amazônia, o OA desempenhou um papel importante na economia regional e continua sendo muito apreciada, principalmente na medicina popular. Em comparação com a exploração madeireira, a recolha de sementes requer pouco investimento e não é destrutiva para as árvores. A produção de OA pode garantir um retorno económico anual para a população local. O petróleo e seus subprodutos, como sabonetes e velas, são geralmente encontrados nos mercados de rua.

Extração de óleo: O OA pode ser extraído tanto por procedimentos/processos tradicionais (pequenas porções) quanto comerciais (grande escala). A Figura 12 resume as etapas de extração do método tradicional e comercial.

Tradicional: esse método de extração é bastante utilizado pelos indígenas (comunidades indígenas e caboclas da Região Norte), onde é dividido em: coleta e seleção de sementes, preparo de massa e extração de óleo (Mendonça, Ferraz, 2007). Consiste em ferver as sementes em água (2-3 h), deixando-as repousar (à sombra/alguns dias) (Figura 4.a). Após esse período, as sementes são descascadas e esmagadas no pilão. Quando esse material é totalmente triturado, fica exposto ao sol que libera gradativamente o óleo por gotejamento. O rendimento do processo tradicional é estimado em 4% do total de sementes (40 g de óleo/kg). Da extração do óleo, o restante da farinha da semente pode ser aproveitado como repelente de insetos (velas) (Ferraz, Carmargo, 2003; Embrapa-Acre, 2002).

Comercial/industrial: o processo começa com a quebra das sementes em pequenos pedaços, seguida de secagem em estufa a 60-70°C até atingir 8% de umidade seguida de prensagem (a 90°C) em prensas hidráulicas. O rendimento industrial da dupla prensagem raramente ultrapassa 30% do peso das sementes (Ferraz, Camargo, 2003; EMBRAPA-ACRE, 2002).

Figura 12 - Fluxograma dos processos de extração (a) Tradicional e (b) Comercial do Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.)



Propriedades físico-químicas e características sensoriais: O OA extraído da semente de Andiroba é amarelo claro e possui sabor bastante amargo (Figura 13). Quando submetida a temperaturas inferiores a 25°C, solidifica, adquirindo consistência semelhante à da vaselina (Farias, 2007). Após a extração, rapidamente se torna rentável (Andrade, 2008; Gomes, 2010).

Figura 13 - Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) extraído de sementes



Fonte: Autora (2019).

O óleo também pode ser escuro e de fluxo rápido, quando extraído de espécies que ocorrem em terra firme, ou leve e viscoso, quando extraído de espécies que ocorrem em áreas de várzea (Gonçalves; Almeida, 2021).

A Tabela 5 apresenta as propriedades físico-químicas do óleo. Quanto às características físicas, o OA apresenta viscosidade de  $46,6 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$  e densidade de  $0,92 \text{ g L}^{-1}$ . Com relação aos parâmetros químicos, o óleo possui índice de iodo variando de 65 a  $75 \text{ g de I}_2\text{g}^{-1}$ , nível de acidez de  $2,3 \text{ mg KOH g}^{-1}$ , índice de refração de 1.459, além de 7,13 h de estabilidade oxidativa, PetroOxy, saponificação índice entre 190 a  $210 \text{ mg KOH g}^{-1}$ , ponto de fusão de  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  e matéria insaponificável de 3 a 5%. As sementes contêm lipídios, fibras, minerais e ácidos graxos. De acordo com a seguinte composição no óleo: Umidade, Proteína, Lipídio, Fibra Bruta, Cinzas e Carboidratos de 40,2, 6,2, 33,9, 12,0, 1,8 e 6,1% (Silva; Gonçalves, 2022).

Tabela 5 - Propriedades físico-químicas do Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.)

<b>Parâmetro</b>		
<b>Físico</b>	<b>Valores</b>	<b>Unidade</b>
Viscosidade	46,6	$\text{mm}^2 \text{ s}^{-1}$
Densidade 15 °C	0,92	$\text{g L}^{-1}$
<b>Químico</b>		
Índice de iodo	65 - 75	$\text{g / I}_2\text{g}^{-1}$
Nível de acidez	2,30	$\text{mg KOH g}^{-1}$
Índice de refração	1.459	$\text{meq / 100 g}^{-1}$
Estabilidade oxidativa, PetroOxy	7,13	h
Índice de saponificação	190 - 210	$\text{mg KOH g}^{-1}$
Ponto de fusão	22,0	$^\circ\text{C}$
Matéria insaponificável	3 - 5	%
<b>Composição</b>		
Umidade	40,2	%
Proteína	6,2	%
Lipídio	33,9	%
Fibra bruta	12,0	%
Cinzas	1,8	%
Carboidratos	6,1	%

**Fonte:** Melo et al. (2008), Pinto (2007).

Composição Química: Em relação à composição do OA (Tabela 6), são relatados vários compostos presentes nesta espécie. Entre eles, andirobina, gedunina e seus derivados conhecidos como 7-desacetoxi-7-oxogedunina,  $6\alpha$ -acetoxigedunina,  $11\beta$ -acetoxigedunina,  $6\alpha$ ,  $11\beta$ -acetoxigedunina,  $6\alpha$ -hidroxigedunina,  $6\beta$ ,  $11\beta$ diacetoxigedunina, 1,2-di-hidro-3 $\beta$ -hidroxi-7-desacetoxi-7-oxo-gedunina,  $\alpha$ -acetoxigedunina,  $\beta$ -acetoxigedunina e dihidrogedunina

(Marcelle; Mootoo, 1975; Hammer; Johns, 1993; Andrade; Zoghbi; Maia, 2001; Sarria et al. 2011; Tanaka et al. 2011; Tanaka et al. 2012; Arrebola et al. 2012; Inoue et al. 2012).

Outros componentes também estão presentes como 6 $\alpha$ -acetoxi-epoxiazadiradiona, 1,3-di-benzeno carbo amino-2-octadecil acil-glicerídeo, ácido triacontanóico, 2,6-di-hidroxi-metil-benzoato, 3,4-di-hidroxi-metil-benzoato, ácido tetratriacontanóico, naringenina, escopoletina, ácido 2,3-di-hidroxi-glicerídeo hexacosanóico, epóxi-azadiradiona, metil angolensato, 4-epoxiazadiradiona, metil angolensatedina, 4,4,8-trimetil-17-furanilesteróide, carapanolidas limonóides A e B, 3 $\beta$ -desacetilfissinolideo, ocotilloneo,  $\beta$ -fotogedunina, cabraleadiol,  $\alpha$ -diidroxiterpeno,  $\alpha$ -11- $\beta$ -triidroxiterpeno e 6 $\beta$ -acetoxigedunina (Andrade et al. 2001; Sarria et al. 2011; Tanaka et al. 2011; Arrebola et al. 2012; Inoue et al. 2012).

Tabela 6 - Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) composição relativa aos derivados de andirobina e gedunina e outros componentes

Composição de andirobina e gedunina	Outros
Andirobina	$\alpha$ -diidroxiterpeno
Gedunina	$\alpha$ -11- $\beta$ -triidroxiterpeno
7-desacetoxi-7-oxogedunina	6 $\alpha$ -acetoxi-epoxiazadiradiona
6 $\alpha$ -acetoxigedunina	ácido triacontanóico
11 $\beta$ -acetoxigedunina	2,6-dihidroxi-metil-benzoato
6 $\alpha$ , 11 $\beta$ -acetoxigedunina	3,4-dihidroxi-metil-benzoato
6 $\alpha$ -hidroxigedunina	ácido tetratriacontanóico
6 $\beta$ , 11 $\beta$ -diacetoxigedunina	cabraleadiol
1,2-di-hidro-3 $\beta$ -hidroxi-7-desacetoxi-7-oxo-gedunina	Ácido 2,3-di-hidroxi-glicerídeo hexacosanóico
$\beta$ -acetoxigedunina	escopoletina
diidrogedunina	3 $\beta$ -desacetilfissinolideo
6 $\beta$ -acetoxigedunina	epóxi-azadiradiona
$\alpha$ -acetoxigedunina	angolensato de metila
$\beta$ -fotogedunina	4-epoxiazadiradiona
	metil angolensatedina
	4,4,8-trimetil-17-furanilesteróide
	carapanolides limonóides A e B
	naringenina
	ocotillone
	1,3-di-benzeno carbo amino-2-octadecil acil-glicerídeo

O OA é composto por ácidos graxos e uma fração insaponificável (2 a 5%). Este é composto por substâncias amargas, chamadas meliacinas ou limonóides (Ambrozi et al. 2006).

Foi relatada a presença dos ácidos oleico, palmítico, esteárico, araquídico, mirístico e linoléico, além de  $\alpha$ -cubeleno,  $\alpha$ -copaeno, palmitato de etila, cariofileno,  $\alpha$ -cariofileno, oleína, palmitina e glicerina (Diniz et al. 2005; Penido et al. 2005; Penido et al. 2006; Costa-Silva et al. 2007; Costa-Silva et al. 2008; Carvalho et al. 2012; Souza et al. 2012).

Dentre os ácidos graxos presentes no OA (Tabela 7), o ácido oleico (46,8-52%) e o ácido palmítico (28-39%) são os compostos majoritários. Outros ácidos graxos também foram quantificados, como ácido esteárico (1,7-7,8%),  $\alpha$ -cubeleno (0,5%),  $\alpha$ -copaeno (2,3%), ácido araquídico (1,2%) e palmitato de etila 0,9% em percentual pequeno/menor (Penido et al. 2005; Penido et al. 2006; Costa-Silva et al. 2007; Costa-Silva et al. 2008; Souza et al. 2012).

Tabela 7 - Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) composição de ácidos graxos

<b>Composição de ácidos graxos</b>	
<b>Ácidos graxos</b>	<b>Composição (%)</b>
<b>Saturado</b>	
Mirístico	0.33
Palmítico	28 – 39
Esteárico	1.7 – 7.8
Palmitato de etila	0.9
<b>Insaturado</b>	
Oleico	46.8 – 52
Linoleico	11.03
Linolênico	1.35
Arcaico	1.2
$\alpha$ -cubeleno	0.5
$\alpha$ -copaeno	2.3
Behênico	0.34

O amargor do OA é atribuído a um grupo de terpenos chamados meliacinas, que são muito semelhantes aos produtos químicos antimaláricos amargos. Recentemente, uma dessas meliacinas, chamada gedunina, foi documentada com propriedades antiparasitárias e antimaláricas com efeito semelhante ao quinino (Mackinnon et al. 2002). A análise química do OA identificou as propriedades antiinflamatórias, cicatrizantes e repelentes de insetos que são atribuídas à presença dos limonóides, denominados andirobina (Roy; Saraf, 2006). Os limonóides são os compostos responsáveis pela atividade antisséptica, anti-inflamatória, cicatrizante e inseticida do óleo e da casca da Andiroba (Barros, 2011).

Na fração insaponificável (Tabela 8) glicerídeo ácido 1,3-di-benzeno carbonamina-2-octadecílico, 2,6-dihidroximetilbenzoato, 3,4-dihidroximetilbenzoato, naringenina, ácido tetratriacontanóico, ácido triacontanóico, ácido ursólico, escopoletina, 2, Ácido 3-dihidroxiglicerídeo hexacosanóico, 6 $\alpha$ -acetoxiepoxiazadiradiona, 6 $\alpha$ -hidroxigedunina, epoxiazadiradiona, 7-desacetoxi-7-oxogedunina, andirobina, gedunina. angolensato de metila, 6 $\alpha$ -acetoxigedunina. 6 $\beta$ -acetoxigedunina, 6 $\alpha$ , 11 $\beta$ -diacetoxigedunina, 6 $\beta$ , 11 $\beta$ -diacetoxigedunina, 11 $\beta$ acetoxigedunina, 1,2-dihidro-3 $\beta$ -hidroxi-7-desacetoxi-7-oxogedunina, 17 $\beta$ hidroxiazadiradiona, xilocensina k, deacetilgedunina e 7-desacetilgedunina (Ambrozin et al. 2006; Costa-Silva et al. 2007; Costa-Silva et al. 2008; Ferrari et al. 2011; Miranda Júnior et al. 2012).

A fração insaponificável do OA (2% a 5%) apresenta como compostos majoritários tetranortriterpenóides (ou limonóides), dos quais 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (7%), 7-desacetoxi-7-oxo-gedunina (7%), andirobina (4 %), gedunina (3%) e angolensato de metila (6%) (Ferrari et al. 2011).

Tabela 8 - Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) composição de ácidos graxos

Fração insaponificável	
ácido glicérido 1,3-di-benzeno carbonamina-2-octadecílico	6β-acetoxigedunina
1,2-di-hidro-3β-hidroxi-7-desacetoxi-7-oxogedunina	6α-acetoxigedunina
2,6-dihidroximetilbenzoato	6β, 11β-diacetotigedunina
3,4-dihidroximetilbenzoato	11β-acetoxigedunina
naringenina	6α, 11β-diacetoxigedunina
ácido tetratriacontanóico	17βhidroxiazadiradiona
ácido triacontanóico	xilocensina k
ácido ursólico	desacetilgedunina
escopoletina	7- desacetilgedunina
Ácido 2,3-di-hidroxiglicérido hexacosanóico	andirobina
6α-acetoxiepoxiazadiradiona	gedunina
6α-hidroxigedunina	angolensato de metila
7-desacetoxi-7-oxogedunina	epoxiazadiradiona

### 1.5.2 APLICAÇÕES DO ÓLEO DE ANDIROBA

Partes de plantas: As partes de plantas da espécie *Carapa guianensis* Aubl., bem como seus derivados, têm sido utilizadas pelos habitantes tradicionais da floresta amazônica há muitos anos para diversos fins, sendo utilizadas isoladamente ou associadas a outras plantas/derivados para fins medicinais. a prevenção e o tratamento de doenças. A casca da andirobeira é utilizada como cicatrizante e vermífugo (Mendonça; Ferraz; 2007).

Embora o OA (extraído de sementes) desta espécie seja o que apresenta maior número de citações quanto ao seu uso popular na literatura, destaca-se o uso de chá ou decocção da casca do caule, folhas, flores e óleo de flores extraído, sendo a indicação medicinal popular semelhante à atribuída ao óleo extraído da semente, conforme mostra (Tabela 9).

Na literatura pesquisada foram encontrados relatos de que os caboclos, habitantes tradicionais da floresta amazônica que vivem às margens do rio, fabricam um sabonete medicinal contendo óleo bruto de Andiroba, cinza de madeira e resíduos de casca de cacau. Este sabonete é especialmente recomendado para o tratamento de doenças de pele. Além disso, o OA pode ser aplicado diretamente nas articulações para aliviar a dor da artrite e, quando misturado com água quente e leite humano, é usado em gotas para infecções de ouvido (Hammer, Johns, 1993; Nayak et al. 2010; Nayak et al. 2011).

Tabela 9 - Aplicações da Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) na cura da saúde

Parte usada	Indicação médica popular
Casca	Analgésico: alívio da dor em casos de artrite cancerosa uterina e reumatismo
	Antiinflamatório: inflamação da garganta, contusões, inflamações da pele e esplenite
	Antipirético
	Cura: usado em feridas gerais em picadas de insetos

	Antisséptico
	Contra infecções: infecções do trato respiratório, infecções de pele, infecções de ouvido, infecções bacterianas e hepatite
	Repelente de insetos e inseticida
	Anti-helmíntico/antiparasitário: vermes e sarna (canino)
	Antianêmico
	Antidiarreico
	Reduz o nível de glicose no sangue (diabetes)
	Estimulante digestivo
<b>Folha</b>	Analgésico: alívio da dor em casos de reumatismo
	Problemas de pele
	Contusões
	Antipirético
	Cura
	Faringite
	Contra vermes intestinais
	Repelente de insetos
<b>Semente</b>	Analgésico: alívio da dor em casos de artrite
	Antiinflamatório: contusões
	Antipirético
	Curativo: usado em cortes e picadas de insetos
	Emoliente
	Contra infecções bacterianas
	Repelente de insetos
	Vermífugo
<b>Flor</b>	Analgésico
	Bronquite
	Antipirético
	Contra infecções: infecções do trato respiratório e infecções bacterianas
	Anti-helmíntico: vermes
	Antidiarreico
	Antianêmico
	Contra tumores
<b>Óleo de flor</b>	Cura: usado em feridas em geral
	Prevenção de doenças de pele
	Repelente de insetos

**Fonte:** Ministério da Saúde e ANVISA (2015).

Óleo de Andiroba: Na região amazônica, esse óleo tem importante valor comercial. Utilizado pela indústria farmacêutica e cosmética, traz inúmeros benefícios à saúde. No processo de extração restam dois resíduos: a casca da semente e a massa. Por ter propriedades inseticidas, as cascas são queimadas para afastar os mosquitos. O resíduo da massa é utilizado na alimentação do gado e na fabricação caseira de sabão de Andiroba (Mendonça, Ferraz, 2007).

Produtos farmacêuticos: Na medicina popular (Tabela 10), o OA é amplamente utilizado para tratamentos de tosse e dor de garganta, também para contusões musculares, lesões de pele (Penido et al, 2006; Nayak et al. 2011). Utilizado no alívio de hematomas, edemas e cicatrização devido à sua excelente penetração na pele (Penido et al. 2006). Alguns estudos sugerem que outras atividades farmacológicas, como antitumoral, inseticida e microbiana, também são exploradas pela indústria. Como repelente, para afastar os mosquitos, queimam-se sobras da extração do óleo, bolas de bagaço de Andiroba ou também podem ser aplicadas em mistura com

urucum (*Bixaorellana*) para formar uma pasta que protege o corpo contra picadas de mosquitos. A vela de Andiroba é usada como repelente eficaz contra o mosquito *Aedes aegypti*, vetor da febre amarela e da dengue. Ao ser queimado, exala um ativo que inibe a fome do mosquito e, conseqüentemente, reduz sua necessidade de ferir as pessoas. Pesquisas mostraram 100% de eficiência em repelir mosquitos, resultado nunca encontrado em nenhum outro produto do mercado para controle de mosquitos. Além dessa característica, a vela é totalmente atóxica, não produz fumaça e não contém perfume. O uso externo OA é indicado como repelente, contra parasitas e coceiras em geral, como cicatrizante de feridas e para retirar carne esponjosa dos olhos. Devido à sua boa penetração na pele, é muito utilizado em massagens para aliviar inchaços, luxações, artrites e reumatismos, atuando também como calmante da pele e clareamento de manchas superficiais. O uso interno é recomendado principalmente para combater gripe, febre, asma, dor de garganta e até mesmo para diminuir o nível de glicose no sangue (diabetes). Uma mistura de OA e sal é amplamente utilizada para prevenir carrapatos em bovinos (Mendonça, Ferraz, 2007).

Cosméticos: muito utilizados na fabricação de xampus, pois fortalecem e embelezam os cabelos e sabonetes para combater espinhas e acne. Estas propriedades farmacológicas são atribuídas à presença de tetranortriterpenóides conhecidos como limonóides (Penido et al. 2006). O óleo amazônico de Andiroba é aplicado com sucesso em massagens e costuma ser usado para muitas doenças e problemas de pele, incluindo a psoríase. Os cremes de proteção solar com Andiroba possuem excelentes propriedades emolientes e, devido à alta concentração de substâncias insaponificáveis, agregam ao protetor solar a capacidade de repelir insetos. Fortalece e embeleza os cabelos e em forma de sabonete é uma cura milagrosa no combate à acne e espinhas. Esse óleo combinado com outro óleo chamado copaíba, forma um ingrediente natural extremamente eficaz no controle da caspa, além de proporcionar brilho aos cabelos. Também possui propriedade antiinflamatória que reduz a coceira e trata o couro cabeludo.

De modo geral, é um óleo com propriedades repelentes de insetos e utilizado no tratamento de doenças como artrite, distensões musculares, distúrbios dos tecidos da pele, reumatismo, malária, infecção renal, hepatite, tosse, gripe, pneumonia, bronquite, úlceras graves, micose, protozoários. e picadas de cobra, escorpião e abelha (Ferraz, 2003). Muito procurado pelas indústrias cosmética e farmacêutica devido às suas propriedades antissépticas, anti-inflamatórias, curativas e emolientes (Revilla, 2001; Lorenzi, 2002; Ferraz, Camargo, 2003).

Tabela 10 - Aplicações do Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) na cura da saúde

<b>Óleo da semente</b>	Analgésico: alívio da dor no câncer uterino, reumatismo, artrite e torcicolo
	Antiinflamatório: inflamação da garganta, contusões e inflamação da pele, incluindo psoríase
	Antitérmico
	Cura: usado em feridas em geral, picadas de insetos e úlceras
	Bactericida e fungicida
	Contra infecções: infecções do trato respiratório, infecções de pele, infecções de ouvido e infecções bacterianas
	Repelente de insetos e inseticida
	Anti-helmíntico/antiparasitário: piolhos e carrapatos
	Antidiarreico
	Reduz o nível de glicose no sangue (diabetes)

**Fonte:** Ministério da Saúde e ANVISA (2015).

### 1.5.3 EFEITO DO ÓLEO DE ANDIROBA NOS ORGANISMOS VIVOS

Os efeitos da OA no controle/inativação de organismos vivos especialmente contra microrganismos e outros (insetos/parasitas/protozoários) são mostrados nas Tabelas 11 e 12, respectivamente.

Contra microrganismos: Os organismos vivos em relação ao efeito do OA relatados na literatura são principalmente para bactérias, fungos e, em menor extensão, para leveduras (Tabela 11).

#### **BACTÉRIAS**

(a) *Xanthomonas axonopodis* - Pires et al. (2015) realizaram um estudo para verificar a capacidade da OA em inibir a bactéria *X. axonopodis* pv. Flor da Paixão. Os autores utilizaram OA puro em três concentrações (1, 2 e 3% para as bactérias). OA teve efeito significativo na inibição do crescimento bacteriano em todas as concentrações utilizadas, sendo a maior concentração mais eficiente na inibição do crescimento bacteriano do que o Controle.

(b) *Klebsiella pneumoniae* - Dois estudos relataram na literatura o efeito da OA sobre *K. pneumoniae*. Meccia et al. (2013) aplicaram óleo extraído da folha de Andiroba. A atividade antimicrobiana do óleo foi testada utilizando o método de difusão descrito por Velasco et al. Discos de papel filtro impregnados com 10 µL de óleo foram colocados na superfície do ágar. Foram adicionados discos de papel impregnados com soluções antimicrobianas. Halos de inibição foram medidos. Para realizar a determinação da CIM, foram preparadas soluções oleosas variando de 10 a 450 µg/mL utilizando DMSO (dimetilsulfóxido) como solvente. A atividade antimicrobiana do óleo foi determinada utilizando o ensaio de difusão em disco. Nenhuma atividade antimicrobiana foi encontrada para esta bactéria. Já Silva et al. (2015)

utilizaram o método Kirby-Bauer modificado, utilizando o teste de difusão em disco com cepas de *K. pneumoniae* e antibióticos padronizados, foi utilizado extrato bruto etanólico de casca de Andiroba nas concentrações 25, 50 e 100 mg/mL. Mesmo a sua concentração mais elevada apresentou baixa atividade antimicrobiana contra cepas de *K. pneumoniae*.

(c) *Staphylococcus aureus* - Foram encontrados na literatura dois estudos para *S. aureus*. As metodologias utilizadas foram as mesmas realizadas em (b), variando apenas os resultados. Meccia et al. (2013) observaram atividade contra *S. aureus* apenas para óleo na concentração inibitória mínima de 400 µg/mL. Já Silva et al. (2015) não encontraram atividade antimicrobiana contra a cepa desta cepa.

(d) *Escherichia coli* - Foram encontrados dois estudos na literatura para *E. coli*. As metodologias utilizadas foram as mesmas realizadas em (b), variando apenas os resultados. Meccia et al. (2013) observaram atividade contra *E. coli* apenas para óleo em concentração inibitória mínima de 400 µg/mL. Já Silva et al. (2015) não encontraram atividade antimicrobiana contra a cepa desta cepa.

(e) *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhi* - A metodologia utilizada foi a mesma realizada por Meccia et al. (2013) em (b), variando apenas o resultado. Nenhuma atividade antimicrobiana foi encontrada para essas bactérias.

## LEVEDURAS

(a) *Candida albicans* e *Candida krusei* - Meccia et al. (2013) utilizaram óleo extraído da folha de Andiroba. A atividade antimicrobiana do óleo foi testada. Discos de papel filtro impregnados com 10 µL de óleo foram colocados na superfície do ágar. Foram adicionados discos de papel impregnados com soluções antimicrobianas. Halos de inibição foram medidos. Para realizar a determinação da CIM, foram preparadas soluções oleosas variando de 10 a 450 µg/mL utilizando DMSO (dimetilsulfóxido) como solvente. A atividade antimicrobiana do óleo foi determinada utilizando o ensaio de difusão em disco. Nenhuma atividade antimicrobiana foi encontrada para essas leveduras.

(b) *Pseudomonas aeruginosa* - A metodologia utilizada foi a mesma realizada por Meccia et al. (2013) em (a), variando apenas o resultado. Nenhuma atividade antimicrobiana foi encontrada para a bactéria *P. aeruginosa*.

## FUNGOS

(a) *Colletotrichum gloeosporioides* - Dois estudos sobre o efeito do OA em fungos (*C. gloeosporioides*) foram encontrados na literatura. Souza et al. (2012) realizaram dois testes, o primeiro foi um teste in vitro para inibir o crescimento de *C. gloeosporioides* e o segundo foi a antracnose. Controle em pós-colheita de frutos de pimenta com OA. No primeiro ensaio foram adicionadas ao meio de cultura BDA as seguintes concentrações de óleo 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0%. O Controle consistiu de um disco do fungo cultivado em meio BDA sem óleo. Para avaliar as diferentes concentrações do óleo no crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, um disco de meio de cultura (5 mm de diâmetro) foi transferido para o centro de cada placa de Petri. A avaliação do crescimento micelial consistiu na medição diária do diâmetro das colônias. Para o controle da antracnose em frutos de pimenta pós-colheita, frutos de pimentão vermelho foram imersos por 5 min em solução oleosa preparada na maior concentração, utilizada no experimento in vitro, e a estes adicionado Tween 20 (0,02% v/v). O inóculo consistiu em discos de micélio com 5 mm de diâmetro retirados de colônias. A inoculação foi realizada pelo método de ferida e depositando o inóculo na superfície do fruto.

Os frutos foram então acondicionados em bandejas plásticas forradas com papel filtro e mantidos em câmara úmida em temperatura ambiente. Para análise do desenvolvimento da lesão foram feitas quatro medidas com intervalo de 48 horas, mensurando o tamanho da lesão. OA foi capaz de inibir o crescimento fúngico à medida que sua concentração foi aumentada, diferindo do controle de 1,0%. Este facto sugere que o aumento da concentração de óleo pode ter um efeito inibitório no crescimento de fungos. Os resultados observados para o Controle pós-colheita, na concentração de 1%, mostraram eficiência do óleo em inibir o desenvolvimento da lesão de antracnose. Machado et al. (2013) realizaram um estudo para verificar a capacidade do OA na inibição de fungos. Para estudar o efeito do OA sobre o fungo, foram previstos dois testes diferentes. Na primeira, o óleo foi previamente testado para pré-seleção para a próxima etapa. Para tanto, foram utilizadas placas de petri de 9 cm de diâmetro e adicionados cerca de 15 mL de meio BDA contendo 200 µL do óleo (adaptado de Oliveira et al, 2008), além do tratamento controle. Após a solidificação do BDA, um disco de 1 cm de diâmetro da borda da cultura de *C. gloeosporioides* com 7 dias de idade foi traçado até o centro de cada placa. A avaliação do crescimento micelial foi verificada diariamente por meio de medições. O óleo não foi eficiente nesta cepa, portanto não passou no segundo teste.

(b) *Sclerotium rolfsii* – Sousa et al. (2018) conduziram um experimento utilizando OA e copaíba, que foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 7 x 5, sendo o primeiro fator os dois óleos individuais e cinco combinações diferentes. E a segunda

concentração 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{L}$ , para o patógeno *S. rolfsii*, e um controle. As concentrações de óleo foram diluídas em (BDA), colocadas em placas de Petri. Discos de micélio com 0,5 cm de diâmetro foram transferidos para as placas. Os OA e copaíba apresentaram significativo potencial de controle do fungo *S. rolfsii*.

(c) *Postia placenta*, *Trametes versicolor* - Sousa et al. (2018) realizaram ensaio de toxicidade em meio de cultura com fungos de podridão parda e branca. Para este ensaio utilizou-se o método descrito por Medeiros et al. (2016). Este método consiste em colocar o óleo em um poço de 0,6 cm de diâmetro, perfurado no centro da placa de Petri, contendo meio de cultura, para o desenvolvimento do fungo. Para tanto, foram adicionados 20 mL de meio em cada placa preparada dissolvendo 15 g de ágar e 20 g de maltose em 1 L de água destilada conforme metodologia descrita na American Society for Testing and Materials - ASTM D - 1413 (2018) foi adicionado 0,5% do óleo em cada placa. O óleo foi incorporado puro ou enriquecido com  $\text{I}_2$  nas proporções de 1, 3 e 5% em volume de óleo. Os inóculos de 1 x 1 cm foram dispostos em duas extremidades opostas da placa de Petri. Para o fungo *T. versicolor* a maior inibição foi do OA com 1% de  $\text{I}_2$ . Para *Postia placenta*, a maior inibição foi do OA com 5% de  $\text{I}_2$ .

Tabela 11 - Características das aplicações do Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) contra microrganismos relatadas na literatura

Microrganismo		Condições de aplicação do Óleo de Andiroba		
Nome do grupo/científico				
Bactéria	Substrato	Concentração	Efeito (inibição)	Referencias
<i>Xanthomonas axonopodis</i> *	Raiz de maracujá	1, 2, 3%	Alta	Pires et al. 2015
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BDA	10 - 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 25, 50, 100 $\text{mg}/\text{mL}$	Não Baixa	Meccia et al. 2013 Silva, Almeida, 2014
<i>Staphylococcus aureus</i>	Biofilme	10 - 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 25, 50, 100 $\text{mg}/\text{mL}$	Alta Não	Meccia et al. 2013 Silva, Almeida 2014
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Biofilme	10 - 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Não	Meccia et al. 2013
<i>Escherichia coli</i>	BDA	10 a 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 25, 50, 100 $\text{mg}/\text{mL}$	Alta Não	Meccia et al. 2013 Silva, Almeida, 2014
<i>Enterococcus faecalis</i>	BDA	10 - 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Não	Meccia et al. 2013
<i>Salmonella typhi</i>	BDA	10 - 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Não	
<b>Levedura</b>				
<i>Candida albicans</i>	BDA	10 a 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Não	Meccia et al. 2013
<i>Candida krusei</i>	BDA	10 a 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Não	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BDA	10 - 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Não	
<b>Fungo</b>				
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Pimenta BDA	0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0% 200 $\mu\text{L}$	Alta Inibição do desenvolvimento de lesões	Sousa et al. 2012 Machado et al. 2013
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Tomate	25, 50, 75, 100 $\mu\text{L}$	Alta	Souza et al. 2019
<i>Postia placenta</i>	BDA	0.5, 0.5+1% I* 0.5+3% I 0.5+5% I	Alta	Sousa et al. 2018
<i>Trametes versicolor</i>	BDA	0.5 %, 0.5% + 1% I, 0.5% + 3% I, 0.5% + 5% I	Alta	Sousa et al. 2018

\*pv. *Passiflorae* \*iodo

Contra **insetos, parasitas e protozoários**: Para os organismos vivos em relação ao efeito OA relatado na literatura, eles são principalmente para insetos e parasitas (e em menor extensão, protozoários) (Tabela 12).

## INSETO

(a) *Sitophilus zeamais* Motschulsky – Coitinho et al. (2010) utilizaram duas metodologias para realizar os testes. o primeiro foi o teste sem escolha, onde o óleo foi testado na dose de 50 µL/20g de grãos de milho. Os grãos foram colocados dentro de recipientes plásticos e impregnados com cada óleo, com auxílio de pipeta automática e recipientes agitados. Cada porção de 20g de grãos foi acondicionada em recipiente plástico, com tampa perfurada, permitindo trocas gasosas com o exterior infestado por oito adultos de *S. zeamais* com idade de zero a 15 dias. Após 5 dias de confinamento, os insetos vivos e mortos foram contados e posteriormente descartados. O OA causou 90% de mortalidade. No teste sem escolha, a OA é eficaz na mortalidade e na redução da emergência de adultos de *S. zeamais* em grãos de milho.

A segunda metodologia foi o teste de livre escolha, onde o óleo foi testado em arenas constituídas por dois recipientes plásticos, conectados simetricamente a uma caixa central por dois tubos plásticos. Em uma das caixas foram colocados 20 g de grãos de milho não tratados e na outra a mesma quantidade de grãos tratados com cada óleo. Na caixa central foram liberados 16 adultos de *S. zeamais* com idade de zero a 15 dias. cada experimento foi realizado com dois tratamentos (óleo e testemunha) e 10 repetições. Após 24 h, os insetos contidos em cada recipiente foram contados, para avaliação da repelência e recolocados nas arenas, onde permaneceram por mais 4 dias. OA apresentou 68,6% de repelência. em testes de livre escolha, o óleo é eficaz na redução da emergência de adultos em *S. zeamais*.

(b) *Anastrepha fraterculus* Wiedemann – Rosa et al. (2013) os tratamentos consistiram de OA nas concentrações de 0,5, 1 e 2%, associado a 5% de proteína hidrolisada. 5% de proteína hidrolisada foi o tratamento controle. As soluções atrativas foram colocadas nas armadilhas amarelas na dose de 200 mL por armadilha. As armadilhas foram colocadas nas plantas. Os insetos capturados foram separados da solução atrativa através de uma peneira plástica de malha fina e em seguida lavados em água pura e colocados em potes de 80 mL contendo álcool 70%, onde as espécies foram peneiradas, contadas, sexadas e identificadas. As diferentes doses de OA misturadas com proteína hidrolisada reduziram significativamente o potencial de captura de *A. fraterculus*. Os tratamentos contendo mistura com 0,5, 1,0 e 2,0% de OA capturaram 32,8, 9,1 e 6,8% do total de moscas coletadas, respectivamente.

(c) *Pseudohyocera kerteszi* – Freire et al. (2006) coletaram indivíduos adultos de forídeos presentes em colmeias de *M. compressipes* manausensis naturalmente infestadas. Os insetos foram acondicionados em caixa de madeira forrada com papel sulfite branco e coberta com filme plástico PVC com orifícios pequenos o suficiente para permitir a ventilação. A caixa foi mantida em temperatura ambiente, onde foram monitorados até a morte dos insetos. Os experimentos consistiram em monitorar a postura dos forídeos fêmeas em potes plásticos cobertos com cera de abelha. Foram utilizadas seis caixas (repetições). Em cada caixa foram oferecidos três substratos: a) pote contendo pólen (diluído em água 3:1), b) pote contendo mel e c) pote contendo pólen misturado com OA (60 mL). Observou-se que as fêmeas dos forídeos realizaram postura em todos os tipos de substratos, indicando que o substrato polínico foi preferencialmente utilizado para oviposição. As fêmeas não utilizaram o pote de pólen misturado com Andiroba para postura (inibição de até 100% da postura). A partir desses resultados, o OA foi testado em 25 colônias de abelhas *M. compressipes* manausensis naturalmente infestadas por forídeos. Com o auxílio de papel absorvente, uma fina camada de óleos foi passada nas paredes internas da lixeira e na tampa dessas colmeias, bem como ao redor do orifício de entrada. Após 3 dias, presença de forídeos adultos e larvas indicando ação repelente ao óleo. Não foram observadas alterações no desenvolvimento das abelhas das colônias tratadas neste experimento.

(d) *Chrysomya megacephala*, *Haematobia irritans* – Klauck et al. (2015) realizaram os testes de repelência *in vitro* utilizando um dispositivo com diferentes compartimentos. Nos compartimentos 1 e 2 foi utilizado algodão embebido em 2 mL de óleo ou citronela (repelente positivo Controle); nos compartimentos 3 e 4 havia algodão embebido em água destilada e triton (2 mL). Havia interligações entre compartimentos com tubos transparentes de 1,8 cm de diâmetro, o que permitia a livre movimentação da mosca. As moscas selecionadas para o teste (90 amostras cada) foram separadas em 18 grupos de 10 insetos cada. Posteriormente, as moscas foram expostas à Andiroba e a 5,0% de óleos de melaleuca e óleo de citronela (controle repelente positivo). O teste teve início quando as moscas foram colocadas no compartimento 1, juntamente com o algodão que continha a solução teste. Em seguida, os compartimentos 2, 3 e 4 foram abertos para permitir a livre movimentação da mosca. Para avaliar o efeito repelente, após o tratamento, todas as moscas foram contadas em cada compartimento em intervalos pré-determinados. O efeito da OA foi de 75% para *Chrysomya megacephala*. Um resultado importante a ser relatado foi a morte das moscas que permaneceram nos compartimentos com OA. OA também teve efeito repelente para *Haematobia irritans*.

(f) *Tenébrio molitor* – Lima et al. (2015) utilizaram larvas de 4º instar de *T. molitor* como inseto modelo. As formulações à base de OA e extrato alcoólico do tegumento foram constituídas por 50 ml do produto e 20 ml de sabonete líquido. Para cada extrato vegetal foram realizados bioensaios nas concentrações de 1 e 10%, considerando a menor e a maior dose limite de resposta biológica para cada formulação, além de um tratamento controle com água destilada. A exposição aos tratamentos foi através de aplicação tópica no inseto. Após a aplicação dos tratamentos, os insetos foram mantidos em câmaras climatizadas. A mortalidade dos insetos estudados foi avaliada ao longo de 5 dias após a exposição aos inseticidas testados. A formulação à base de OA, na concentração de 1%, apresentou taxas de mortalidade crescentes de 67,5% (1º dia), 77,5% (2º dia), 82,5% (3º dia), 85% (4º dia) e 90% (5º dia). Na concentração de 10%, as taxas de mortalidade foram de 97,5% (1º dia) e de 100% nos demais dias. O tratamento com formulação à base de OA apresentou maiores taxas de mortalidade nas concentrações de 1% e 10%, comparado ao tratamento à base de extrato alcoólico do tegumento. Além disso, o tempo de ação no caso da formulação do óleo foi menor para concentrações de 1% e 10%, com taxas de mortalidade de 67,5% e 97,5% no primeiro dia de avaliação.

## PARASITA

(a) *Aedes aegypti* – Dois estudos sobre o efeito do OA sobre o parasita *Aedes aegypti* foram encontrados na literatura. Silva e outros (2005) avaliaram o efeito larvicida da OA, contra duas cepas de *A. aegypti*. Após 8 horas após a exposição ao óleo. Os valores das concentrações letais (CL) 90 e LC95 para as larvas da cepa GCZ (resistentes ao temefós) foram 80 e 86 ppm (1º instar), 98 e 106 (2º instar), 166 e 182 (3º instar) e 192. e 202 ppm (4 instares), respectivamente. Os valores de CL90 e LC95 para larvas da linhagem Rockefeller foram 164 e 182 ppm (1º instar), 212 e 224 (2º instar), 210 e 226 (3º instar) e 450 e 490 ppm (4º instar), respectivamente. Para avaliar o efeito subletal do óleo de *C. guianensis* no desenvolvimento de *A. aegypti* foram utilizadas concentrações correspondentes a CL50, CL20 e CL10. Para OA, as concentrações foram CL50, 140 mg/L; CL20, 60 mg/L; e CL10, 40 mg/L. Foram preparadas três réplicas, cada uma contendo 500 mL de solução em recipientes plásticos com capacidade para 1.000 mL. Para alimentação das larvas, a ração dos filhotes foi triturada (0,36 g) em cada réplica. Trezentas larvas do final do terceiro e início do quarto instar foram colocadas em cada réplica, totalizando 900 larvas por bioensaio. O comportamento larval, como alimentação, mudanças de fase, alteração na mobilidade, fraqueza e mortalidade, bem como emergência de adultos foram

verificados diariamente. A cada 96 horas, foi adicionado alimento ao grupo tratado e controle. Para avaliar o efeito subletal da OA no desenvolvimento de concentrações de *A. aegypti* correspondentes a CL50, CL20 e CL10, Prophiro et al. (2012) utilizaram concentrações de CL50, 140 mg/L; CL20, 60mg/L; e CL10, 40 mg/L de OA. Foram preparadas três réplicas, cada uma contendo 500 mL de solução em recipientes plásticos com capacidade para 1.000 mL. Em cada réplica foram colocadas trezentas larvas ao final da terceira e início da quarta etapa inicial, totalizando 900 larvas por bioensaio. O efeito letal iniciou 1 hora após a exposição, mas entre as primeiras 2 e 3 horas a mortalidade das larvas foi mais expressiva. Quando foram utilizadas concentrações de 1.400 mg/L de *C. guianensis*, todas as larvas estavam ativas com movimentos normais de zigue-zague nos primeiros 5 min de exposição. Após esse período, foram observados comportamentos como movimentos lentos, tremores, convulsões seguidas de paralisia e morte na maioria das larvas expostas às soluções. O efeito larvicida das soluções contendo OA manteve-se com eficiência total (100% de mortalidade) até o 12º dia. Depois diminuiu de 97 para 92% no 13º e 14º dias, respectivamente. Não foi observada mais mortalidade larval após o 32º dia. Ao utilizar CL50, 140 mg/L de *C. guianensis*, observou-se 100% de mortalidade em 72 h. Da mesma forma, CL20,60 mg/L, foi observada 100% de mortalidade em 96 horas. Observou-se que em ambas as concentrações (CL50 e CL20) a mortalidade continuou após a muda larval. Não foram observadas pupas e emergência de adultos neste tratamento. CL10,40 mg/L induziu mortalidade de 99,7% após 1 semana de tratamento. Com essa concentração, das 900 larvas expostas, apenas três emergiram e se tornaram adultas após 10 dias, aparentemente sem alterações. Nos grupos controle, não foi observada mortalidade dentro de 24 horas de exposição.

(b) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Anocentor nitens* – Farias et al. (2012) testaram OA em fêmeas ingurgitadas de *R. (Boophilus) microplus*, *R. sanguineus* e *A. nitens*. As fêmeas ingurgitadas foram limpas com papel absorvente e separadas com base em aspectos de aparência e motilidade normais, corpo intacto e ingurgitamento máximo, distribuídos em placa de Petri em grupo de dez, pesados em balança analítica e submetidos ao teste de imersão. Foram utilizadas cinco diluições de Óleo de semente de Andiroba (20, 10, 5, 2,5 e 1,25%) utilizando água destilada e tween 80 como dispersante, com três repetições por tratamento, formando, ainda, um grupo controle, um controle negativo apenas com água destilada, e outro controle positivo com o acaricida químico à base de cipermetrina. Para avaliar a eficácia do OA sobre larvas não alimentadas foi utilizada a técnica de “sanduíche”. Dez dias após o início da postura, os ovos foram separados em lotes de um grama e acondicionados em

seringas plásticas adaptadas de 20ml, lacradas com algodão e incubadas em câmara climatizada para B.O.D. eclosão das larvas destinadas ao teste. Foram preparadas seis diluições de óleo de semente de Andiroba (20, 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,75%) utilizando água destilada e tween 80 como dispersante, e um grupo controle com água destilada e outro com tween 80 e água destilada. Aproximadamente 100 larvas dos 14 aos 21 dias de idade foram colocados entre dois pedaços de papel filtro impregnados com diluições de óleo de semente de Andiroba. Em seguida, esse conjunto foi colocado em um envelope de papel filtro e lacrado com fita adesiva e mantido em câmara climatizada para B.O.D. até ler sua viabilidade. O registro das larvas vivas e mortas foi realizado 24h após o teste. Nos testes realizados na oviposição de fêmeas ingurgitadas obteve-se IC50 de 4,332; 4.850 e 4.903 para *R. (B.) microplus*, *A. nitens* e *R. sanguineus* respectivamente. O óleo de semente OA, na diluição de 1,25%, inibiu a oviposição em 10% para *R. (B.) microplus*, 6,67% para *A. nitens* e 10% para *R. sanguineus*, atingindo efetividade contra carrapatos de 27,82%, 20,01% e 18,01%, respectivamente, com melhor eficácia demonstrada em concentrações superiores a 5%. A mortalidade de fêmeas ingurgitadas variou de 10 a 100% para *R. (B.) microplus* e *R. sanguineus* e de 6,67 a 100% para *A. nitens*.

(c) *Trichostrongylus* sp., *Haemonchus* sp., *Oesophagostomum* sp., *Strongyloides* sp. – Moraes et al. (2010) aplicaram extrato hexânico da semente de *C. guianensis*. Foram utilizadas amostras fecais de caprinos e ovinos, coletadas diretamente da ampola retal de animais naturalmente infectados por helmintos, onde foram processadas para determinação do número de ovos por grama de fezes, interpretando-os o grau de infecção. De cada espécie animal foram selecionadas amostras fecais, formando um homogeneizado para cultivo de larvas. Cada cultivo foi submetido a 5 concentrações de OA (100, 50, 30, 25 e 10%), utilizando tween 80 como dispersante. O cultivo de larvas de nematóides gastrointestinais da espécie caprina nos grupos Controle (C1 e C2) revelou larvas infecciosas dos gêneros *Haemonchus*, *Oesophagostomum* e *Trichostrongylus*, com predomínio do gênero *Haemonchus*.

Analisando o percentual de redução na espécie caprina, considerando o Controle negativo C1, foi demonstrada uma redução altamente eficaz para os tratamentos de 100, 50 e 30% e Controle positivo para os gêneros *Haemonchus* e *Oesophagostomum*, e no número total de larvas e moderadamente eficaz para o gênero *Trichostrongylus* em todos os tratamentos. A atividade ovicida contra nematóides gastrointestinais de caprinos e ovinos in vitro, demonstrada pela OA mostra a atividade anti-helmíntica deste fitoterápico e a possibilidade como alternativa para o controle de nematóides gastrointestinais de caprinos e ovinos.

## PROTOZOÁRIO

(a) *Trypanosoma evansi* – Baldissera et al. (2013) utilizaram óleo puro na concentração de 0,5, 1,0 e 2,0% contra *T. evansi*. Posteriormente, foram realizados os mesmos testes, utilizando óleos nanoemulsionados nas concentrações de 0,5 e 1,0%. o número de parasitas foi quantificado 1, 3 e 6 horas após o início do estudo. Uma redução dependente da dose no número de parasitas foi observada nas formas dos dois óleos testados após 1 h. A concentração de parasitas foi significativamente reduzida em baixas concentrações após 3 h, e às 6 h, nenhum parasita vivo foi observado para os óleos testados. OA (nas formas convencional e nanoemulsão) apresenta alta atividade contra *T. evansi* in vitro, sugerindo que este óleo pode ser aplicado como alternativa de tratamento para esta doença.

(b) *Plasmodium falciparum* – Junior et al. (2012) realizaram a atividade antiplasmodial da OA e sua fração rica em limonóides em placas de cultura de tecidos de 96 poços. Duplas diluições em série da fração rica em limonóides dissolvida em metanol estéril e OA dissolvido em solução de DMSO foram colocadas em placas de microtitulação e diluídas com o meio de cultura. Uma suspensão de eritrócitos parasitados (0,5-1% parasitemia, 2,5% hematócrito) contendo principalmente trofozoítos foi adicionada aos poços para atingir um volume final de 100 mL. Para OA foram utilizadas as concentrações 820, 82, 8,2, 0,82 e 0,082 mg/mL, enquanto para a fração rica em limonóides as concentrações foram 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 mg/mL. O OA e sua fração rica em limonóides inibiram o crescimento do clone W2 em 100%, entre 24 e 72 horas, nas concentrações de 8,2 e 3,1 mg/mL, respectivamente. Para a fração rica em limonóides a inibição do clone Dd2 foi de 56% (IC<sub>50</sub> 2,8 mg/mL) às 24 h, 64% (IC<sub>50</sub> 2,4 mg/mL) às 48 h e 82% (IC<sub>50</sub> 0,4 mg/mL) após 72 h. Para o clone Dd2, em ambos os experimentos com OA e fração rica em limonóides, a resposta final em 72 h (IC<sub>50</sub> 8,4 mg/mL e IC<sub>50</sub> 0,4 mg/mL) foi mais positiva que a resposta inicial de 24 h (IC<sub>50</sub> 4 82 mg/mL) mL e IC<sub>50</sub> 2,8 mg/mL). Pereira et al. (2014) utilizaram os seguintes compostos isolados de OA: 6 $\alpha$ -acetoxiepoxiazadiradiona (1), andirobina (2), 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (3) e 7-desacetoxi-7-oxogedunina (4) (todos isolados de material de semente prensado residual usando extração e técnicas de cromatografia). Eles também estudaram: 6 $\alpha$ -hidroxi-desacetilgedunina (5) (preparada a partir de 3) foi avaliada usando o microteste na cepa *P. falciparum* K1 multirresistente. A eficácia dos limonóides 3 e 4 foi então avaliada por via oral e subcutânea em camundongos BALB/c infectados com cepa NK65 de *P. berghei* sensível à cloroquina no teste supressivo de 4 dias. In vitro, os limonóides 1-5 exibiram concentrações medianas de inibição (IC<sub>50</sub>) de 20,7-5,0  $\mu$ M, respectivamente. A 6 $\alpha$ -acetoxigedunina é um produto natural

abundante presente em sementes residuais de OA que exibe propriedades antimaláricas in vivo significativas.

Tabela 12 - Características das aplicações do Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) contra insetos, parasitas e protozoários relatadas na literatura

Organismo vivo		Condições de aplicação do Óleo de Andiroba		Referências
Grupo/Nome científico				
Inseto	Nome comum	Concentração	Efeito	
<i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky	Gorgulho do milho	50 µL/ 20 g maize	Inseticida	Coitinho et al. 2006
<i>Anastrepha fraterculus</i> Wiedemann	Mosca da fruta	0,5, 1, 2%	Repelência	Rosa et al. 2013
<i>Pseudohyocera kerteszi</i>	Colmeia	60mL	Repelência	Freire et al. 2006
<i>Chrysomya megacephala</i>	Mosca de latrina oriental	5%	Repelência	Klauck et al. 2014
<i>Haematobia irritans</i>	Mosca de chifre	5%	Repelência	Klauck et al. 2014
<i>Tenebrio molitor</i>	Larva de farinha	1, 10%	Inseticida	Lima et al. 2015
Parasita				
<i>Aedes aegypti</i>	Mosquito da dengue	40, 60, 140 mg / L	Acaricida / larvicida	Silva et al. 2006; Prophiro et al. 2012
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Carrapato (boi)	1,25, 2,5, 5, 10, 20%	Acaricida	Farias, et al. 2012
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Carrapato (cães e cavalos)	1,25, 2,5, 5, 10, 20%	Acaricida	Farias, et al. 2012
<i>Anocentor nitens</i>	Carrapato (cães e cavalos)	1,25, 2,5, 5, 10, 20%	Acaricida	Farias, et al. 2012
<i>Trichostrongylus sp.</i>	Cabras e ovelhas	10, 25, 30, 50, 100%	Anti-helmíntico	Moraes et al. 2010
<i>Haemonchus sp.</i>	Cabras e ovelhas	10, 25, 30, 50, 100%	Anti-helmíntico	Moraes et al. 2010
<i>Oesophagostomum sp.</i>	Cabras e ovelhas	10, 25, 30, 50, 100%	Anti-helmíntico	Moraes et al. 2010
<i>Strongyloides sp.</i>	Cabras	10, 25, 30, 50, 100%	Anti-helmíntico	Moraes et al. 2010
Protozoário				
<i>Trypanosoma evansi</i>	Mal das cadeiras	05, 1, 2%, 820, 82, 8.2, 0.82,	Antiparasitário	Baldissera, 2013
<i>Plasmodium falciparum</i>	Malária	0.082 mg / mL	Antiplasmodial	Junior et al. 2012; Pereira et al. 2014

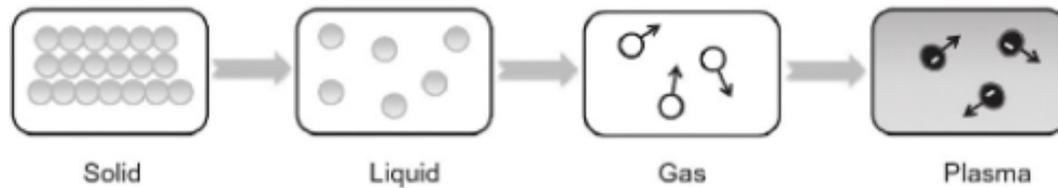
## 1.6 PLASMA FRIO

### 1.6.1 FUNÇÕES E UTILIZAÇÕES GERAIS

O plasma é um gás ionizado ou neutro, também conhecido como quarto estado da matéria (Figura 14) (Fridman, 2008; D'agostino et al. 2008) e constitui 99% do universo visível, além disso, o mesmo pode ocorrer natural ou artificialmente (Fridman, 2008; Eliezer, Eliezer, 2001). À medida que os materiais adquirem energia, mudam de estado, ou seja, de sólido (menos energético) para líquido e posteriormente, gás. Em cada transição de fase, as interações e as estruturas entre as moléculas ficam mais frouxas até degradar-se completamente, fato que explica o quarto estado da matéria (Fridman, 2008).

Portanto, o plasma frio (PF), também chamado de plasma não-térmico ou de baixa temperatura, é definido como um gás formado por multicomponentes como elétrons, átomos, moléculas neutras e altamente excitadas, íons, radicais, fótons e partículas neutras (Heinlin et al. 2011).

Figura 14 - Características dos quatro estados da matéria: sólido, líquido, gasoso e plasma



Fonte: Misra; Schlüter; Cullen (2016).

Plasmas são geralmente classificados conforme seu nível de energia, densidade iônica e temperatura, em plasmas de alta temperatura, plasmas térmicos e plasmas frios (Liu; Xu; Wang, 1999). O plasma térmico é caracterizado pelo equilíbrio termodinâmico entre os elétrons e as partículas pesadas do gás, havendo uma quase singular temperatura em cada ponto do espaço. Este tipo de plasma requer pressões mais altas ( $\geq 105$  Pa) e uma quantidade maior de energia para ser formado quando comparado ao não-térmico (Fridman et al. 2007).

Já para os plasmas não-térmicos, somente os elétrons são aquecidos, assim, estão em um nível de temperatura mais alto do que os íons e as partículas pesadas sem carga. A diferença de massa é tão grande que os elétrons podem estar a altas temperaturas, ao mesmo tempo que o plasma inteiro mantém-se próximo da temperatura ambiente. Devido a esse aspecto, os plasmas não-térmicos são usados para tratar objetos sensíveis ao calor ou matéria biológica (Laroussi, 2009). Estes plasmas operam sob moderadas temperaturas e utilizam gases atóxicos, logo, danos químicos e térmicos ao substrato são restritos (Philip et al. 2002; Sladek; Stoffels, 2005), além de fornecer esterilização e assepsia eficientes em poucos segundos/minutos (Heinlin et al. 2011).

Os plasmas produzidos pelo homem se encontram presentes em uma série de produtos e processos do cotidiano, como nas lâmpadas fluorescentes, televisores, cortes e soldas. Pode ser encontrado também em uma série de outras aplicações em produtos ou serviços, como no setor ambiental em tratamentos de efluentes líquidos e gasosos; na eletrônica, na esterilização e refrigeração de componentes; na modificação química de superfícies de polímeros e pré-tratamento de pinturas (Silva et al. 2012); na medicina, na esterilização e no tratamento de melanomas e úlceras dérmicas (Heinlin et al. 2011); entre outros.

O PF foi originalmente empregado para melhorar as propriedades de impressão e adesão de polímeros, aumentando a energia de superfície dos materiais e uma variedade de domínios de uso em eletrônica. Geralmente é utilizado para tratar tecidos, vidros, papel e outros produtos. Uma nova tendência de pesquisa sugere que a tecnologia PF é uma tecnologia poderosa e lucrativa para a indústria de alimentos (Devi et al. 2017; Patange et al. 2017).

A tecnologia de plasma, perante a indústria alimentícia, é considerada uma técnica moderna não convencional e bastante vantajosa quando se trata de descontaminação microbiana em diferentes substratos (frutas, vegetais, aves, produtos cárneos, queijo, etc), desde a esporulação e deterioração de organismos patogênicos, até a degradação de resíduos de agrotóxicos. Também é utilizada na preparação de amidos modificados, alterando suas propriedades físicas e químicas, e tem sido empregada para alterar a taxa de germinação de sementes e processamento de materiais de embalagem a fim de melhorar as propriedades de barreira e conferir atividade antimicrobiana (Devi et al. 2017; Patange et al. 2017). É um processo ecológico que é usado na preservação de alimentos e outras aplicações potenciais como uma alternativa às técnicas comuns (Thirumdas et al. 2015).

### 1.6.2 PRINCÍPIOS DE FUNCIONAMENTO

O PF pode ser definido como um meio altamente reativo e energético, formado por espécies químicas radicalares, iônicas, excitadas com elétrons de alta energia, em que o gás plasmogênico encontra-se em temperatura ambiente (Fridman, 2008; D'agostino et. al. 2008; Eliezer; Eliezer, 2001; Roth, 1995; Kieft, 2005). Trata-se de um meio em constante atividade física e química, cujas reações químicas resultantes são direcionadas e influenciadas principalmente pela excitação do elétron (Fridman, 2008; D'agostino et. al. 2008; Eliezer; Eliezer, 2001).

Inúmeras são as formas de gerar PF e, portanto, variados são os tipos gerados (luminoso, faísca, corona, entre outros). Apesar do princípio básico e comum da ausência do equilíbrio termodinâmico local, cada forma conduzirá a um subtipo distinto de plasma, cujas características peculiares permitem que sejam destinados às diferentes aplicações. Quantidade e tipo de energia utilizada, pressão de trabalho, identidade química do gás, corrente e tensão elétrica, tipo de reator, são alguns dos preceitos que induzem o tipo de PF produzido (Locke et al. 2006). PF pode ser formado a partir de micro-ondas, radiofrequência e descargas elétricas

de alta tensão, sendo esta última a mais utilizada forma para se gerar e manter PF (Eliezer; Eliezer, 2001; Kieft, 2005; Locke et al. 2006; D'agostino et al. 2008; Fridman, 2008).

O fundamento principal das fontes de plasma é fornecer meios eficazes para a aplicação de um intenso campo elétrico a um gás (Misra et al. 2018). Com a diferença de potencial empregue entre dois eletrodos, acontece um aumento do campo elétrico local, no qual sucede a ionização do gás, conhecida como primeira ionização de Townsend. Isto é, os elétrons primários são acelerados, chocando-se com átomos e/ou moléculas do gás em seu caminho, formando espécies iônicas. Contudo, em virtude da colisão entre elétrons primários e partículas pesadas do gás, geram-se cátions na mesma proporção que percorrem o caminho contrário aos elétrons e ao chegar ao cátodo ocorrerá uma segunda avalanche de elétrons, ou seja, resultando em uma segunda ionização de Townsend, gerando um efeito cascata de multiplicação de elétrons (Fridman; Chirokov; Gutsol, 2005). Assim sendo, os elétrons também são considerados como os principais responsáveis pelo processo de colisão e excitação, devido a energia cinética elevada gerada pelo campo elétrico, fazendo com que eles se movam com velocidade alta em relação às partículas pesadas presentes no meio (Tendero, et al. 2006).

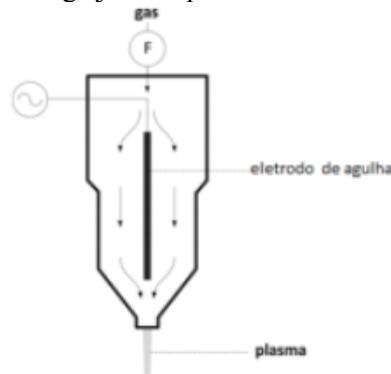
### 1.6.3 REATORES DE PLASMA FRIO

Nos recipientes chamados reatores ocorrem os fenômenos físico-químicos. No contexto do PF de descargas elétricas de alta tensão, esses reatores representam as estruturas que possuem como característica básica a presença de no mínimo um eletrodo metálico por onde é aplicada a diferença de potencial necessária para produzir a descarga elétrica formadora do plasma (D'Agostino et al. 2008). A forma como os eletrodos estão arrançados define o reator de plasma frio, sua funcionalidade e correspondente aplicação. O meio onde a descarga elétrica é formada confere a classificação em três tipos de reatores: reator de descarga em fase gasosa, reator de descarga em fase líquida (chamada de descarga eletro-hidráulica) e reator de descarga híbrida (Locke et al. 2006; Bruggeman; Leys, 2009). É possível observar distintos tipos de descargas elétricas, dentre elas destacam-se: jato de plasma, descarga corona, barreira dielétrica (DBD), descarga de arco, descarga brilhante (glow), e descarga do tipo faísca (Spark) (Jiang et al. 2012). As mais usuais são:

*Jato de plasma:* composto por no mínimo dois eletrodos com distância de alguns milímetros (Figura 15) dependendo da tensão do reator (Weltmann et al. 2008). As principais vantagens

são suas pequenas dimensões, aplicabilidade e capacidade para penetrar em espaços estreitos (Weltmann et al. 2008).

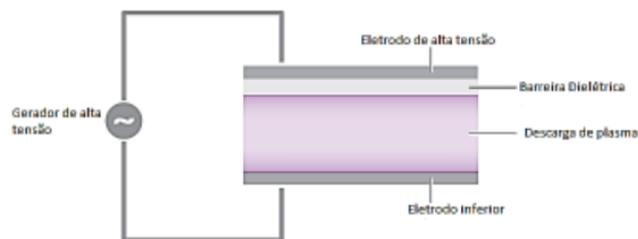
Figura 15 - Reator de Plasma Frio descarga jato de plasma



Fonte: Surowsky; Schluüter; Knorr (2014).

*Descarga em barreira dielétrica (DBD):* o plasma é gerado entre dois eletrodos que estão separados por uma barreira dielétrica (Figura 16) (Misra et al. 2011). As vantagens deste reator são a variedade de gases que podem ser usados, o baixo fluxo de gás necessário em comparação a outras configurações, a possibilidade de inflamar descargas homogêneas até vários metros, bem como, a boa adaptação devido às diferentes geometrias dos eletrodos. No entanto, são necessárias tensões relativamente altas ( $> 10$  kV), dependendo da distância entre os eletrodos, o que faz com que seja essencial precaução e isolamento (Misra et al. 2015).

Figura 16 - Reator de Plasma Frio descarga de barreira dielétrica (DBD)

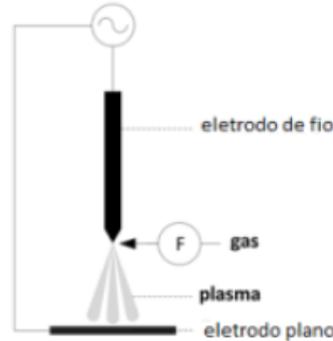


Fonte: Niemira (2012).

*Descarga corona:* produzidas por eletrodos afiados como pontas ou fios finos impostos a alta tensão. Pelo menos um desses eletrodos precisa apresentar um pequeno diâmetro de curvatura, o eletrodo coronário (Figura 17) (Scholtz et al. 2015). As geometrias típicas são as ponta-plano e configurações cilíndricas, que podem ser operadas em corrente contínua alternada, e o eletrodo pode ter potencial negativo ou positivo. A descarga corona normalmente pode ser gerada por dispositivos simples e de baixo custo de produção e operação. Sua aplicação produz

tratamentos pouco uniformes, o que confere a esse tipo de reator um modelo destinado à pesquisa experimental.

Figura 17 - Reator de Plasma Frio descarga corona



Fonte: Surowsky; Schluüter; Knorr (2014).

#### 1.6.4 APLICABILIDADE

O PF possui aplicação em diversas áreas como a ambiental, biomédica e industrial (Machala et al. 2007). Além das aplicações citadas, vários estudos têm mostrado que essa tecnologia é eficaz no tratamento de alimentos, principalmente na descontaminação de produtos, uma vez que apresenta alto potencial antimicrobiano proveniente de espécies reativas geradas durante o tratamento (Los et al. 2018).

O PF tem uma variedade de aplicações para a indústria alimentar, principalmente a descontaminação de alimentos como carnes, produtos lácteos, frutas e vegetais, granulares / particulados (grãos, ervas e especiarias) e sementes germinadas. Esta tecnologia também tem sido aplicada com sucesso para a esterilização superficial em materiais de embalagem (Mir; Shah; Mir, 2016; Misra et al. 2015, Scholtz et al. 2015). Essa capacidade do PF em trabalhar a baixas temperaturas tem aberto a possibilidade de usar a tecnologia para o tratamento de alimentos sensíveis ao calor (Korachi et al. 2015; Cullen et al. 2017).

Os agentes do plasma contribuem para a ação letal, interagindo com o material biológico. O tratamento com plasma de fato inativa uma extensa gama de microrganismos, incluindo vírus e esporos (Dhayal et al. 2006). Segundo Moisan et al. (2002) existem três mecanismos principais pelos quais o PF inativa os microrganismos:

- a. interação química de radicais, espécies reativas ou partículas carregadas com membranas celulares;
- b. danos nas membranas e componentes celulares internos pela radiação UV;
- c. quebra das cadeias de DNA por UV gerada durante a recombinação das espécies de plasma.

Enquanto em um determinado produto, um modo de ação pode ser mais significativo do que outro, a maior efetividade saneante resulta do plasma com múltiplos mecanismos antimicrobianos (Moisan et al. 2002; Laroussi, 2009). Porém, podem existir algumas limitações no processamento do plasma, como aumento na oxidação de lipídios e diminuição da firmeza dos frutos (Thirumdas; Sarangapani; Annapure, 2014), além de poder afetar também as propriedades de cor dos frutos (Misra et al. 2014). O uso desse tratamento em alimentos resulta em maior vida útil, segurança e redução do uso de conservantes. Sua aplicabilidade pode ser observada tanto em alimentos sólidos quanto em líquidos, devido às infinidades de configurações (Misra et al. 2011).

Vale salientar que a eficiência do PF utilizado depende de uma série de fatores como o tipo e a carga inicial de microrganismo, a composição da amostra, o fluxo do gás para a geração do plasma e o estado fisiológico das células (Song et al. 2009; Phan et al. 2017). Portanto, os parâmetros de tempo, composição gasosa e características dos reatores de PF (potência, geometria, corrente alternada) contribuem no resultado final (Runtzel et al. 2019).

#### 1.6.5 EFEITO NOS ALIMENTOS

O PF tem mostrado bom potencial para descontaminação de alimentos. No entanto, a maior parte da pesquisa é amplamente focada em estudos de inativação microbiana, com ênfase limitada na qualidade dos alimentos. Foi demonstrado que o processamento de PF afeta os atributos de qualidade dos produtos alimentícios durante o tratamento e no armazenamento (Pankaj; Wan; Keener, 2018). Embora haja grande promessa para a aplicação industrial de PF como um novo método de sanitização, a presença de espécies reativas, bem como os resíduos de processos de oxidação, pode promover a modificação de características físico-químicas e sensoriais do produto tratado (Pasquali et al. 2016).

##### ***(a) Microbiológico:***

A eficácia frente aos microrganismos tratados com PF foi comprovada por um número significativo de estudos, como segue na Tabela 13 (Wang et al. 2016; Dasan et al. 2017; Mcclurkin-Moore et al. 2017; Xu et al. 2017).

**Cereais e grãos:** Envolve uma vasta diversidade de culturas e suprimentos, onde mais de 50% é para consumo (Poutanen; Sozer; Della Valle, 2014). A tecnologia de PF é uma das promissoras técnicas não térmicas utilizadas nas variadas indústrias de cereais. Esta tecnologia oferece inúmeros benefícios nas indústrias cerealistas, principalmente quanto a descontaminação dos grãos (Mir; Shah; Mir, 2016). Subem et al. (2013) realizam tratamento com PF em barras de cereais contaminadas com *A. flavus*, já Selcuk et al. (2008) que analisaram o comportamento dos fungos *A. parasiticus* e *Penicillium* em grãos e cereais frente ao efeito do plasma. Ambos obtiveram redução logarítmica.

**Carnes:** Através de estudos preliminares, foi provado que o tratamento com PF foi eficaz na remoção de microrganismos presentes na carne de frango (Noriega et al. 2011), além de também ser capaz de matar a bactéria *Listeria innocua* em carne pronta para consumo (Rod et al. 2012). Kim et al. (2011) obteve resultados satisfatórios quanto a descontaminação de bacon contaminado com *E. coli* e *S. typhimurium* tratado com PF.

**Pescados:** Choi et al. (2017) relatou a descontaminação de lulas secas tratadas com PF. Após o tratamento uma redução logarítmica foi observada para bactérias aeróbias, marinhas e *Staphylococcus aureus*.

**Frutas e hortaliças:** Kim et al. (2017) tratou cebola em pó com PF e obteve resultados favoráveis quanto a inibição de *B. cereus*, *A. brasiliensis* e *E. coli*. Também foi observada eficiência na inativação de *E. coli* em alfaces tratados com PF (Song et al, 2015). Niemira e Sites (2008) estudaram o efeito do plasma na redução logarítmica de maçãs contaminadas com as bactérias *E. coli* e *S. stanley*. Perni et al. (2008) trabalharam com manga e melão contaminados com *E. coli* e *S. aureus*. Shi et al. (2011) por sua vez, utilizou suco de laranja contaminado por *Candida albicans*. Todas as matrizes alimentares tiveram redução microbiana.

**Embutidos:** Song et al. (2009) e Ling et al. (2011) trataram queijo e presunto fatiados contaminados com *L. monocytogenes* e apresentaram resultados favoráveis quando a redução logarítmica dessa bactéria.

Tabela 13 - Inativação de microrganismos em alimentos usando Plasma Frio

Microorganismo	Amostra	Reator	Tempo de exposição (min)	Redução (log)	Referência
<b>Bactérias</b>					
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ovo	DBD	90	4-5	Rowan et al. 2007
<i>L. monocytogenes</i>	Queijo fatiado	APP	2	1-5	Song et al. 2009
<i>L. monocytogenes</i>	Presunto fatiado			1,73	Lee et al. 2011
<i>Escherichia coli</i>					
<i>Salmonella typhimurium</i>	Bacon	APP	1,5	2-3	Kim et al. 2011
<i>E. coli</i>					
<i>S. Stanley</i>	Maçã	ARC	3	3,7	Niemira & Sites, 2008
<i>E. coli</i>	Amendoas	DBD	0,50	1,8-5	Misra et al. 2014
<i>E. coli</i>	Manga Melão	APJ	0,08	3	Deng et al. 2007
<i>E. coli</i>					
<i>Staphylococcus aureus</i>	Suco de laranja	DBD	0,41	5	Shi et al. 2011
<i>Candida albicans</i>					
<b>Fungos</b>					
<i>Aspergillus flavus</i>	Pimenta em pó	DM	20	2,5	Kim et al. 2014
<i>A. flavus</i>		APF			
<i>A. parasiticus</i>	Avelãs	BP	5	4,5	Dasan et al. 2016
<i>A. flavus</i>	Barra de cereais	APJ	20	4	Suhem et al. 2013
<i>A. parasiticus</i>					
<i>Penicillium</i>	Grãos de cereais	SD	15	3	Selcuk et al. 2008

DBD: descarga de barreira dielétrica; APP: plasma a pressão atmosférica; APJ: jato de plasma a pressão atmosférica; DM: descarga micro-ondas; SD: selfie design; APFBP: plasma em pressão atmosférica em leite fluidizado; ARC: descarga em arco / Fonte: Silva, 2019.

No tratamento com PF, a temperatura varia na maioria das vezes de 30 a 60 °C, sendo essa, preferida pela indústria de alimentos por causa da baixa energia requerida para sua geração (Misra et al. 2011; Bermúdez-Aguirre et al. 2013). Esse tratamento tem apresentado resultados positivos na descontaminação de bolores, leveduras, bactérias, esporos e vírus empregando temperaturas menores de 30°C em um pequeno intervalo de tempo (Shülter et al. 2013).

### (b) Cor:

Os pigmentos podem ser afetados pelo tratamento e dependem do tempo e das condições de exposição ao PF. As mudanças na cor podem ter se dado devido à degradação parcial de pigmentos como clorofila e antocianina (Lacombe et al. 2015; Ramazzina et al. 2015).

**Frutas e hortaliças:** Foram observadas alterações no processo de fotossíntese e parâmetros de cor de folhas milho (Baier et al. 2015), bem como perdas não significativas da cor de pimentões (Vleugels et al. 2005), mirtilos (Lacombe et al. 2015), pepino, cenoura, fatias de pêra, tomate cereja, kiwi, maçã e alface. Da mesma forma, a diferença total de cor após o tratamento com PF de sucos de frutas também foi considerada mínima e não perceptível a olho nu (Xu et al. 2017; Kovačević et al. 2016).

**Cereais:** O processamento de PF também causa efeitos desejáveis na cor de alguns alimentos. Foi observado um aumento no índice de brancura e brilho de arroz integral após o tratamento com plasma (Thirumdas et al. 2016; Lee et al. 2016).

**Carnes:** O PF foi utilizado na fabricação de charque de porco sem adição de nitrito de sódio, onde foi usado apenas parâmetros de processamento de plasma específicos para atingir vermelhidão / cor semelhante no charque de porco, descartando a necessidade de adição de aditivo químico (Yong et al. 2017).

Esses resultados demonstram que o processamento com PF tem um efeito mínimo na cor dos produtos alimentícios em menores tempos de tratamento. O tipo de produto, sendo ele sólido ou líquido, inteiro ou cortado, parâmetros de tratamento de plasma como a tensão de entrada, tempo, potência, gás de trabalho e as condições de armazenamento são alguns dos fatores críticos que podem afetar a cor do produto em questão (Panjak; Wan; Keener, 2018).

**(c) Textura:**

**Frutas:** Quanto aos valores de firmeza de tomate, manga e kiwi minimamente processados tratados com PF, houve uma diferença não significativa nos valores quando comparados com a amostra não tratada com plasma (Misra et al. 2014; Ramazzina et al. 2015; Phan et al. 2017). Com relação a firmeza de maçãs minimamente processadas e mirtilos, estudos mostraram diminuição após o tratamento. Uma exposição prolongada na superfície da maçã com plasma gasoso pode ter sido uma das possíveis causas do vazamento de células (Tappi et al. 2014). Já o amolecimento dos mirtilos, a diminuição da firmeza foi atribuída ao dano mecânico devido ao aumento da temperatura durante o tratamento e as altas taxas de fluxo de ar do jato de plasma (Lacombe et al. 2015; Sarangapani et al. 2017).

**Grãos e leguminosas:** Estudos mostraram diminuição na dureza e mastigabilidade em grãos e leguminosas tratados com PF, além de diminuição no tempo de cozimento / imersão, o que foi considerado desejável para as indústrias (Lee et al. 2016; Thirumdas et al. 2016; Sarangapani et al. 2017).

**(d) pH e acidez:**

O pH e a acidez são atributos de qualidade rigorosamente regulamentados na maioria dos produtos alimentícios processados. Qualquer mudança drástica pode levar a um impacto indesejável no sabor, textura e prazo de validade dos alimentos. No entanto, no caso de frutas e vegetais frescos, existem variações significativas devido às diferenças nas práticas de cultivo, diferenças de variedades, parâmetros ambientais, entre outros (Panjak; Wan; Keener, 2018).

Existem vários estudos relatados em que o tratamento com PF demonstrou alterar o pH de produtos alimentícios. As mudanças de pH e acidez após o tratamento com plasma foram atribuídas principalmente à interação dos gases reativos do plasma com a umidade presente nos produtos alimentícios. Em produtos alimentícios sólidos, as espécies de plasma reagem com a água superficial, formando compostos ácidos apenas na superfície, enquanto, em produtos líquidos, os efeitos são mais pronunciados (Lee et al. 2016).

***(e) Proteínas e enzimas:***

Os efeitos do PF foram estudados na farinha de trigo, onde foi observada mudanças na estrutura da proteína devido à oxidação de grupos sulfidril e formação de ligações dissulfeto, afetando suas propriedades estruturais e funcionais. Os mecanismos de desnaturação de proteínas por PF podem se dar devido à interação de espécies reativas de plasma com aminoácidos (Li et al. 2014) e estrutura secundária, devido à perda da  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha (Segat et al. 2016). Fatores como o tipo de proteína / enzima, tipo de plasma, gás reativo, parâmetros de processamento, volume de amostra e meio enzimático desempenham um papel importante na desnaturação de proteínas e na inativação de enzimas pelo PF.

Embora a inativação da enzima possa servir como uma ferramenta importante para as indústrias de alimentos, alguns desafios, como parâmetros de processamento otimizados, melhor compreensão dos mecanismos de inativação e efeitos protetores de diferentes componentes alimentares precisam ser estudados (Attri et al. 2015).

***(f) Carboidratos:***

Os carboidratos desempenham um papel importante na definição e manutenção da qualidade dos diferentes produtos alimentícios.

**Frutas:** Um estudo em suco de caju tratado com PF resultou na degradação de todos os açúcares redutores (frutose, glicose e a sacarose não redutora), além de relatarem um aumento no conteúdo de sacarose após longa exposição ao PF, atribuído à degradação dos oligossacarídeos com alto grau de polimerização (Rodriguez et al. 2017). Uma diminuição semelhante na frutose, aumento na sacarose e degradação de oligossacarídeos com alto grau de polimerização também foi relatada após o tratamento com PF em suco de laranja prebiótico (Almeida et al. 2015).

**Grãos e leguminosas:** O efeito do PF nos polissacarídeos tem se concentrado principalmente no amido de leguminosas e grãos. Uma diminuição no tempo de cozimento do arroz integral, indicando a incorporação de grupos polares entre as moléculas de amido foi relatada por Sarangapani et al. (2017), além de um aumento no grau de gelatinização após o tratamento com plasma. Um outro estudo utilizando amido de arroz, foi observado a diminuição no teor de amilose, temperatura de gelatinização, temperatura de pasta, tendência à retrogradação e grau de hidrólise. Desta forma, foi concluído que o tratamento com PF leva à despolimerização e reticulação do amido, afetando suas propriedades estruturais, funcionais e reológicas (Thirumdas et al. 2017).

**(g) Vitaminas:**

A maioria dos estudos relatados sobre o tratamento de produtos alimentícios com PF focalizou apenas na estabilidade da vitamina C (ácido ascórbico). A grande parte dos estudos sobre o tratamento com PF de frutas e vegetais inteiros não relatou redução significativa no conteúdo de ácido ascórbico após o tratamento com plasma.

Pesquisadores não relataram nenhum efeito significativo sobre o ácido ascórbico em kiwis, broto de rabanete e alface após tratamento com PF (Ramazzina et al. 2015; Song et al. 2015; Oh; Song; Min, 2017). Entretanto, foi observada redução no conteúdo de ácido ascórbico após o tratamento de frutas e vegetais cortados (Wang et al. 2012). Também foi observada redução de ácido ascórbico após o tratamento em suco de laranja (Xu et al. 2017) e suco de caju (Pankaj et al. 2017), a degradação desse ácido pode ser atribuída à reação com ozônio e outras espécies de plasma oxidante durante o processamento.

O tipo de amostra (inteira / corte), tempo de processamento e gás de plasma foram fatores críticos para a degradação do ácido ascórbico (Pankaj; Wan; Keener, 2018).

***(h) Lipídios:***

A oxidação de lipídios é uma grande preocupação para alimentos musculares, o que pode levar a mudanças indesejáveis na cor, sabor, odor e prazo de validade (Ladikos e Lougovois, 1990). Visto que o PF é frequentemente considerado um processo de oxidação avançado, é essencial analisar sua influência sobre os lipídios presentes nos alimentos musculares (Pankaj; Wan; Keener, 2018).

***Carnes:*** Nenhum efeito significativo na oxidação de lipídios foi observado após o tratamento com PF em carne de porco fresca e congelada (Choi et al. 2016), charque (Kim et al. 2014) e carne de porco crua (Ulbin-Figlewicz e Jarmoluk, 2016). No entanto, Jayasena et al. (2015) relataram um aumento na oxidação de lipídios em carne de porco e boi frescas após tratamento por um longo período. Um aumento na oxidação lipídica também foi relatado no lombo de porco, quando este foi tratado com um gás de plasma contendo oxigênio.

***Pescados:*** Albertos et al. (2017) relataram que o tratamento com PF levou a uma oxidação lipídica significativa e diminuição no ácido oleico e eicosapentaenóico em filetes de cavala frescos.

***Óleo de soja:*** Yopez e Keener (2016), utilizaram plasma de hidrogênio na fabricação de óleo de soja parcialmente hidrogenado sem adição de qualquer ácido graxo trans como alternativa à hidrogenação catalítica tradicional. A tecnologia PF vem apresentando vantagens únicas em relação aos atuais processos de hidrogenação, pois pode ser realizada em temperatura ambiente, sob pressão atmosférica, sem qualquer catalisador (Pankaj; Wan; Keener, 2018).

Os estudos disponíveis na literatura sobre os efeitos do PF sobre os lipídios em diferentes produtos alimentícios são muito limitados. No entanto, com base nos estudos relatados, o tempo de tratamento e o gás plasmático podem ser considerados fatores críticos que afetam a oxidação lipídica (Pankaj; Wan; Keener, 2018).

***(h) Atividade antioxidante:***

Os resultados relatados sobre os efeitos do tratamento com PF nos conteúdos fenólicos dos produtos alimentícios têm um amplo grau de variação.

Uma diminuição nos fenóis totais foi relatada em alface (Grzegorzewski et al. 2017), suco de uva branca (Pankaj et al. 2017) e suco de laranja (Almeida et al. 2015). Nenhum efeito significativo em maçãs (Ramazzina et al. 2016), mas um aumento significativo no suco de caju (Rodriguez et al. 2017) e mirtilos (Sarangapani et al. 2017) também foi relatado.

Nenhuma mudança significativa na capacidade antioxidante após o tratamento com PF foi relatada em kiwis, chicória vermelha, brotos de rabanete e cebola em pó (Oh et al. 2017; Ramazzina et al. 2015; Pasquali et al. 2016; Kim et al. 2017). Alguns estudos têm mostrado uma redução na atividade antioxidante após tratamentos com PF em maçãs, suco de uva branca e suco de caju em uma exposição prolongada (Ramazzina et al. 2016; Rodriguez et al. 2017; Pankaj et al. 2017).

Almeida et al. (2015) relataram uma redução na capacidade antioxidante do suco de laranja prebiótico após o modo direto de tratamento com plasma, enquanto efeitos insignificantes foram relatados quando tratados no modo indireto.

Esses estudos mostram que o tipo de produtos alimentícios, a fonte de geração de plasma, o modo de exposição e os parâmetros de tratamento são críticos no controle dos efeitos do PF na atividade antioxidante dos produtos alimentícios (Pankaj; Wan; Keener, 2018).

#### ***(i) Degradação de micotoxinas:***

Microtoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos toxigênicos, que podem causar doenças em humanos e animais (propriedades alergênicas, teratogênicas, carcinogênicas e mutagênicas). A produção intensiva de alimentos está contribuindo para manuseio, transporte e armazenamento incorretos dos alimentos, resultando em níveis maiores de contaminação por fungos produtores de toxinas (Hojnik et al. 2017; Scussel, 2002; Pitt, 2003).

Processos para descontaminação de desses metabolitos em alimentos são bastante estudadas e vão desde tratamento térmico até irradiação. No entanto, a tecnologia do PF, também está sendo utilizada para este fim.

Siciliano et al. (2016) avaliaram a redução de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) em avelãs, obtendo uma redução na concentração de aflatoxinas totais e AFB1 superior a 70%. As aflatoxinas B1 e G1 foram mais sensíveis aos tratamentos plasmáticos em comparação com

as aflatoxinas B2 e G2, respectivamente. Wang et al. (2015) testaram a utilização de PF direto na aflatoxina B1. Foi revelado que a AFB1 poderia ser efetivamente degradada pelo resultando em uma taxa de degradação de até 88,3%. Devi et al. (2017), utilizou amostras de amendoim cru contendo AFB1 tratadas com plasma, foram observadas mais de 70% e 90% de redução desse composto tóxico, respectivamente. Em tâmaras, Ouf et al. (2015) avaliaram a descontaminação de fumonisinas B2 (FB2) e Ocratoxina (OTA). A micotoxina FB2 não foi detectada após 6 min de tratamento com PF, enquanto a OTA não foi detectada após 7,5 min. Provando que a tecnologia tem potencial para ser um método promissor para a descontaminação de micotoxinas em alimentos.

### **(j) Degradação de pesticidas:**

Em busca de novas medidas preventivas, o PF vem sendo estudado como técnica para a degradação de resíduos de pesticidas em produtos alimentícios (Tabela 14).

Através de um estudo, foi observada degradação significativa de imidaclopride e boscalid em mirtilos (Sarangapino et al. 2017), fludioxonil, azoxistrobina, piriproxifeno e ciprodinil em morangos (Misra et al. 2014) e uma redução total de diclorvós em milho (Bai et al. 2009) tratados com PF. Em contrapartida, nenhum efeito foi observado quando morangos contendo boscalid, pirimetanil e iprodiona foram expostos ao tratamento de plasma (Misra et al. 2013).

Embora o PF possa eliminar uma vasta variedade de agrotóxicos, sua eficácia depende em grande parte da composição do gás de plasma e da natureza / estrutura do agrotóxico alvo (Ekezie, Sun, Cheng, 2017).

Tabela 14 - Degradação de micotoxinas e pesticidas em alimentos usando Plasma Frio

Contaminantes	Amostra	Reator	Tempo de exposição (min)	Redução (%)	Referência
<b>Micotoxinas</b>					
Aflatoxina	Avelã	DBD	12	70	Siciliano et al. 2016
Fumonixina*	Tamaras	DAPACP	6-7,5	100	Ouf et al. 2015
Ocratoxina A					
Aflatoxina**	Amendoim	SD	12	90	Devi et al. 2017
<b>Pesticidas</b>					
Paration	Maçã	DBD	2	95,9	Heo et al. 2014
Azoxistrobina				69	
Ciprodinil				45	
Fludioxonil	Morango	DBD	1-5	71	Misra et al. 2014
Piriproxifeno				46	
Diclorvós	Milho	RF	2	100	Bai et al. 2009

DBD: descarga de barreira dielétrica; DAPACP: plasma frio de dupla pressão atmosférica; SD: selfie design; RF: plasma de radiofrequência \*FB2 \*\*AFB1 / Fonte: Silva, 2019.

**(k) Capacidade germinativa:**

Alguns cientistas sugerem que o PF pode influenciar positivamente a viabilidade das sementes com vantagens peculiares, como tratamento uniforme, não destruição de sementes e benignidade ambiental (Park et al. 2016; Su et al. 2016; Puligundla et al. 2017). Estudos mostram que o plasma pode aumentar a capacidade de embebição de água de algumas sementes, levando a um processo de germinação aprimorado, inibição do crescimento microbiano e melhoria em outros parâmetros de crescimento (Randeniyva e Groot, 2015).

O tratamento com plasma de argônio teve resultados satisfatórios quanto a melhoria do crescimento de brotos de soja (Zhang et al. 2017), assim como para tomates e pimenta, com a finalidade de alongar os seus caules e para rabanete e feijão, onde obtiveram aumento das suas taxas de germinação (Sadhu et al. 2017; Sivachandiran e Khacef, 2017).

#### 1.6.6 VANTAGENS E DESVANTAGENS DO PLASMA FRIO

O uso de altas temperaturas leva a efeitos indesejáveis, como mudança na cor, textura e perda de nutrientes, motivando os pesquisadores a explorar alternativas não térmicas para o processamento de alimentos. O PF é uma das tecnologias não térmicas que apresenta um potencial significativo neste sentido. A inativação por PF de microrganismos patogênicos e deteriorantes pode resultar em produtos alimentícios seguros e minimamente processados com vida útil prolongada. No entanto, a maioria das pesquisas publicadas tem se concentrado na descontaminação microbiana, com estudos limitados sobre o impacto do processamento de PF nos atributos de qualidade (Pankaj; Wan; Keener, 2018).

Na última década, o PF ganhou um interesse significativo para uso como tecnologia não térmica para processamento de alimentos. A novidade dessa tecnologia está na sua natureza atérmica, destruição mínima de nutrientes e perda de propriedades sensoriais, ausência de subprodutos tóxicos, econômica, versátil, e ecologicamente correta (Pankaj; Wan; Keener, 2018). As aplicações de PF para indústrias de alimentos foram demonstradas para descontaminação de alimentos (Misra et al. 2011), inativação de enzimas (Misra et al. 2016), remoção de toxinas (Misra et al. 2015), modificações de embalagens de alimentos (Pankaj et al. 2014) e tratamento de águas residuais (Sarangapani et al. 2016). Particularmente para o processamento de alimentos, o PF demonstrou ser eficaz contra os principais microrganismos patogênicos de origem alimentar, como *E. coli* (Bermúdez-Aguirre et al. 2013), *S.*

*typhimurium* (Fernández; Noriega; Thompson, 2013), *S. aureus* (Kim et al. 2014) e *L. monocytogenes* (Ziuzina et al. 2014).

As principais limitações do plasma frio são o estado relativamente inicial de desenvolvimento de tecnologia, a variedade e complexidade do equipamento necessário e os impactos amplamente inexplorados do tratamento com plasma frio nas qualidades sensoriais e nutricionais dos alimentos tratados. Além disso, os modos de ação antimicrobianos para vários sistemas de plasma frio variam dependendo do tipo de plasma frio gerado (Niemira, 2012).

## REFERÊNCIAS

- ABIMILHO, 2015. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/milho/cereal>>. Acesso: Janeiro 2018.
- ALBERTOS, I., PÉREZ-MATEOS, M., FERNÁNDEZ, J. A., LÓPEZ-CABALLERO, M. E., & MONTERO, P. Effect of cold atmospheric plasma treatment on the quality of mackerel fillets. *Food Chemistry*, 218, 406-414, 2017.
- ALESSANDRO, W. B. Avaliação da atividade de acaricidas químicos sintéticos, extrato botânico sobre *Rhipicephalus sanguineus* e ação dos óleos essenciais sobre *Amblyomma cajennens*. 2008.
- AMBROZIN, A. R. P et al. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 17, p. 542-547, 2006.
- ANDRADE, E. H.; ZOGHBI, M. G.; MAIA, J. G. Volatiles from the Leaves and Flowers of *Carapa guianensis* Aubl. *Journal of Essential Oil Research*, v. 13, n. 6, p. 436-438, 2001.
- ANDRADE, F. F. **Desenvolvimento e avaliação de cristais líquidos obtidos em emulsões O/A à base de óleo de andiroba e éster fosfórico**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- ARAUJO, C. Milho: história e arte. *Jornal Eletrônico da Embrapa Milho e Sorgo*. Minas Gerais, maio. 2008. Disponível em: <[http://www.cnpms.embrapa.br/grao/7\\_edicao/grao\\_em\\_grao\\_materia\\_03.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/grao/7_edicao/grao_em_grao_materia_03.htm)>. Acesso em: 23 abr. 2018.
- ARAÚJO, L. A. Estudo das propriedades físicas, químicas e termofísicas de óleos regionais e suas misturas. 2008.
- ARREBOLA, D. F. A. et al. Genotoxic assessment of the *Carapa guianensis* Aublet seed oil extract in the chromosomal aberrations assay performed in Balb/c mice. *Revista Cubana de Farmacia*, v. 47, n. 3, p. 363-367, 2013.

ATTRI, P., KIM, Y. H., & PARK, J. H. Application of Atmospheric Pressure Plasma for Enzyme Inactivation in Food Industry: A Review. **Food Engineering Reviews**, 7(3), 337-347, 2015.

BAI, J., TICHACZEK, P. S., KOČOVÁ, V., & HENSELOVÁ, M. Degradation of dichlorvos by non-thermal atmospheric pressure plasma: Influence of gas phase and gas-liquid interface. *Journal of Hazardous Materials*, 163(2-3), 1284-1288, 2009.

BAIER, M. et al. Effects of cold plasma treatment on maize seeds. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 48, n. 23, p. 1-9, 2015.

BALDISSERA, M. D. et al. Avaliação da atividade de três compostos do óleo de melaleuca sobre o *Trypanosoma evansi*. 2016.

BANWART, G.J. **Basic food microbiology**. Westport, CT: The AVI Publishing Company, Inc., p.51-62, 1981.

BARROS, F. N. de et al. In vitro efficacy of oil from the seed of *Carapa guianensis* (andiroba) in the control of *Felicola subrostratus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 1130-1133, 2012.

BARROS, F. N. de et al. Avaliação da atividade do óleo da semente de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) contra ectoparasitos de felinos domésticos. 2011.

BERMÚDEZ-AGUIRRE, D. et al. Inactivation of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Geobacillus stearothermophilus* in a sealed plastic pouch by atmospheric pressure cold plasma. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 3, p. 402-409, 2013.

BERMÚDEZ-AGUIRRE, D., WEMLINGER, E., PEDROW, P., BARBOSA-CÁNOVAS, G., & GARCIA-PEREZ, M. Effect of atmospheric pressure cold plasma (APCP) on the inactivation of *Escherichia coli* in fresh produce. *Food Control*, 34(2), 609-619, 2013.

BOEIRA, C. P. et al. Phytochemical characterization and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* extract for application as natural antioxidant in fresh sausage. **Food chemistry**, v. 319, p. 126553, 2020.

BRANCALION, L.CMASSAGLIA, G.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; CORASSIN, R.; LEMES-MARQUES, M.I.; PRADO, L.G.; FERNANDES JÚNIOR, A.; PINTO, R.A. Effect of UV-C radiation on the reduction of aflatoxin B1 and fungal load in corn. **Food Control**, Volume 111, 2020.

BRUERTON, K. Finding practical solutions to mycotoxins in commercial production: a nutritionist's perspective. 2001.

BRUGGEMAN, P.; LEYS, C. Non-thermal plasmas in and in contact with liquids. **J. Phys. D: Appl. Phys.**, v. 42, p.053001- 053029, 2009.

- CARVALHO, Camila O. et al. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. **Veterinary parasitology**, v. 183, n. 3-4, p. 260-268, 2012.
- CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Edicoes Cejup, 1991.
- CHANDRA NAYAKA, Siddaiah et al. Control of *Fusarium verticillioides*, cause of ear rot of maize, by *Pseudomonas fluorescens*. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 65, n. 7, p. 769-775, 2009.
- CHOI, J. Y. et al. Decontamination of dried squid using atmospheric pressure plasma jet. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 1, p. 147-152, 2017.
- CHRISTENSEN, C.M.; MERONUCK, R.A. Dry matter loss in yellow dent corn resulting from invasion by storage fungi. **Plant Dis.**, **73** (6): 501-503, 1989.
- CHU, F. S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 259, n. 3-4, p. 291-306, 1991.
- COITINHO, R. L. B. C. et al. Persistência de óleos essenciais em milho armazenado, submetido à infestação de gorgulho do milho. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1492-1496, 2010.
- CONTINI, E., MOTA, M. M., MARRA, R., BORGHI, E., MIRANDA, R. A., SILVA, A. F., & MENDES, S. M. Milho: caracterização e desafios tecnológicos. **Brasília: Embrapa**. (Desafios do Agronegócio Brasileiro, 2), 2019.
- COSTA-SILVA, J. H. et al. A toxicological evaluation of the effect of *Carapa guianensis* Aublet on pregnancy in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 1, p. 122-126, 2007.
- COSTA-SILVA, J. H. et al. Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, p. 495-500, 2008.
- COSTA, M. C.; DELIZA, R.; ROSENTHAL, A. Revisão: tecnologias não convencionais e o impacto no comportamento do consumidor. 1999.
- COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: SHARMA, R.P. & SALUNKHE, D.K. (Eds.) **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton: CRC Press, p.103-143, 1991.
- CULLEN, P. J. et al. Atmospheric pressure cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce. **Food Microbiology**, v. 74, p. 1-5, 2017.
- D'AGOSTINO, R.; FAVIA, P.; KAWAI, Y.; IKEGAMI, H.; SATO, N.; AREFI-KHONSARI, F. **Advanced plasma technology**. John Wiley & Sons, 2008.
- DAWSON, K.A.; EVANS, J.E.F.F.; KUDUPOJE, M. Understand ingtheadorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding. **Science and technology in the feed industry**. Nottingham University Press, Nottingham, UK, p. 169-181, 2001.

- DEVI, R. R., REDDY, G. N., REDDY, K. R., & REDDY, C. V. Cold plasma treated peanut samples revealed enhanced degradation of aflatoxin B1. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 42, 49-55, 2017.
- DEVI, Y. et al. Influence of cold plasma on fungal growth and aflatoxins production on groundnuts. **Food Control**, v. 77, p. 187-191, 2017.
- DHAYAL, M. et al. Cold atmospheric pressure air plasma jet for medical applications. **Applied Physics Letters**, v. 88, n. 25, p. 251107, 2006.
- DINIZ, S. P. S. S. et al. Bioatividade de plantas medicinais no controle de *Sclerotinia* isolado de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Revista Brasileira de Plantas Medicinales**, v. 7, p. 22-25, 2005.
- DUMINIL, J. et al. Blind population genetics survey of tropical rainforest trees. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 12, p. 3505-3513, 2006.
- EKEZIE, F. G. C., SUN, D. W., & CHENG, J. H. A review on recent advances in cold plasma technology for the food industry: Current applications and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 46-58, 2017.
- EKEZIE, F. C.; SUN, D.; CHENG, J. A review on recent advances in cold plasma technology for the food industry: Current applications and future trends. **Trends in food science & technology**, v. 69, p. 46-58, 2017.
- ELIEZER, S.; ELIEZER, Y. **The Fourth State of Matter: An Introduction to Plasma Science**. Bristol: Institute of Physics Publishing Bristol and Philadelphia, 2001.
- EMBRAPA-ACRE. Relatório de pesquisa e desenvolvimento-1999 a 2001. 2002.
- EMBRAPA. **Banco de Imagens**, 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/1235002/milho>>. Acesso em: junho, 2022.
- EMBRAPA. **Milho: Importância Socioeconômica**, 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/milho/pre-producao/socioeconomia/importancia-socioeconomica>>. Acesso em: junho, 2024.
- ESKANDARI, A.; KOOCHEKI, A.; MORTAZAVI, S.A. Effect of ultrasound on microbial load and quality of fresh-cut tomato during storage. **Food Processing and Preservation**, Volume 44, Issue 3, 2020.
- FAMASUL. Release USDA Setembro 23 - Sistema Famasul, 2023. Disponível em: <<https://portal.sistemafamasul.com.br/sites/default/files/boletimcasapdf/8%20-%20Release%20USDA%20setembro%202023.pdf>>. Acesso em: junho, 2024.
- FARIAS, A.X.; ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A.M.; ANDERSEN, P.M.; CORRÊA, T.B.S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no Estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n. p. 617-621, 2000.

FARIAS, M. P. O. et al. Avaliação "in vitro" da atividade ectoparasiticida e anti-helmíntica da andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). 2007.

FARIAS, M. P. O. et al. Cálculo da CI50 (concentração inibitória média) e CL50 (concentração letal média) do óleo da semente de andiroba (*Carapa guianensis*, Aubl.) sobre *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1887), *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) e *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, p. 255-261, 2012.

FARIAS, M. P. O. et al. Eficácia in vitro do óleo da *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba) no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 68-71, 2007.

FERNANDES, N.G. **Combate ao greening em citros necessita de legislação específica.** Visão Agrícola v.1, n.2, p. 40-42, 2004.

FERNÁNDEZ, A., NORIEGA, E., & THOMPSON, A. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on fresh produce by cold atmospheric gas plasma technology. *Food Microbiology*, 33(1), 24-29, 2013.

FERNANDEZ, A.; NORIEGA, E.; THOMPSON, A. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on fresh produce by cold atmospheric gas plasma technology. **Food Microbiology**, 33, 24–29, 2013.

FERRARI, F. K. et al. Modulation of T lymphocyte and eosinophil functions in vitro by natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2011.

FERRARI, M. et al. Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro e in vivo de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 626-630, 2007.

FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J. L. C.; SAMPAIO, P. T. B. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* DC): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta amazônica**, v. 32, p. 647-647, 2002.

FERRAZ, I.D.K.; CAMARGO, J.L.C. (Ed.). Andiroba, *Carapa guianensis* Aubl., *Carapa procera* D.C., Meliaceae. Manaus: INPA, 6 p. (**Manual de sementes da Amazônia**, 1), 2003.

FERREIRA, W. S. et al. Piperina, seus análogos e derivados: potencial como antiparasitários. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 208-224, 2012.

FIESP. Safra Mundial de Milho 2022/23 - 3o Levantamento do USDA, 2022. Disponível em: <<https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.fiesp.com.br/arquivo-download/%3Fid%3D284042%23::~:~:text%3Dprevista%2520em%2520368%2520C4%2520milh%25C3%25B5es,de%2520185%2520sacas%2520por%2520hectare.&ved=2ahUKEwit0bHmzb->>

GAxWwqZUCHY7ADHUQFnoECA8QAw&usg=AOvVaw0126AjI6KAwYRvwRz4rYSG>  
 . Acesso em: junho, 2024.

FISCH, S. T. V.; FERRAZ, I. D. K.; RODRIGUES, W. A. Distinguishing *Campa Guianensis* Aubl. From *Campa Procera* DC (Meliaceae) By Morphology Of Young Seedlings. **Acta Amazonica**, v. 25, p. 193-200, 1995.

FREIRE, Delci da Costa Brito; BRITO-FILHA, Carmina Rodrigues da Costa; CARVALHO-ZILSE, Gislene Almeida. Efeito dos óleos vegetais de andiroba (*Carapa* sp.) e Copaíba (*Copaifera* sp.) sobre forídeo, pragas de colméias, (Diptera: Phoridae) na Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 36, p. 365-368, 2006.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MANDES, F. N. P.. **Micotoxinas: importância na alimentação e na Saúde Humana e animal**. Documentos 110, ISSN 1677 – 1915, outubro, 2007.

FRIDMAN, A. **Plasma Chemistry**. New York: Cambridge University Press, 2008.

FRIDMAN, A.; CHIROKOV, A.; GUTSOL, A. Non-thermal atmospheric pressure discharges. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 38, n. 2, p. R1, 2005.

FRIDMAN, G.; BROOKS, A.; BALASUBRAMANIA, N.; FRIDMAN, A.; GUTSOL, A. Comparison of Direct and Indirect Effects of Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma on Bacteria. **Plasma Processes and Polymers** v.4, p.370–375, 2007.

FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in mycology**, v. 49, n. 1, p. 1-174, 2004.

GARCIA, F. M.; SANTOS, A. B. Óleos essenciais na conservação de alimentos: aspectos nutricionais e tecnológicos. **Revista de Nutrição e Saúde Alimentar**, v. 10, n. 2, p. 87-98, 2021.

GEISEN, R. PCR Methods for the Detection of Mycotoxin – producing Fungi. In: BRIDGE, P. D.; ARORA, D. K.; REDDY, C. A. ; ELANDER, R. P. (Ed.). **Applications of PCR in Mycology**. UK, University Press, Cambridge, 2. ed., p.242-263, 2000.

GOMES, H. S. R. et al. Estrutura populacional e produção de andiroba em terra firme e várzea no sul do Amapá. 2010.

GONÇALVES, L. M.; ALMEIDA, C. F. Atividade antifúngica do óleo essencial de orégano: uma revisão da literatura. **Revista de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 6, n. 2, p. 112-120, 2019.

GONÇALVES, L. M.; ALMEIDA, C. F. Características físico-químicas do óleo de andiroba (*Carapa guianensis*): uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Química Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 135-148, 2021.

GONÇALVES, L. M.; SANTOS, A. B. Propriedades anti-inflamatórias e analgésicas dos frutos do Jucá (*Libidibia ferrea* Mart): uma revisão da literatura. **Revista de Farmacologia e Terapêutica**, v. 7, n. 2, p. 89-97, 2020.

HAMMER, Matthias LA; JOHNS, Emily A. Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajo Island, Para (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 40, n. 1, p. 53-75, 1993.

HEINLIN, J.; ISBARY, G.; STOLZ, W.; MORFILL, G.; LANDTHALER, M.; SHIMIZU, T.; E KARRER, S. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, n. 1, p. 1-11, 2011.

HOJNIK, N., CVELBAR, U., TAVČAR-KALCHER, G., & WALSH, J. L. Review of cold atmospheric plasma and its potential applications in the food industry. *Foods*, 6(6), 47, 2017.

HUSSEIN, H.S.; BRASSEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology, Limerick**, v.167, p.101-134, 2001.

INOUE, Takanobu et al. Carapanolides A and B: unusual 9, 10-seco-mexicanolides having a 2R, 9S-oxygen bridge from the seeds of *Carapa guianensis*. **Tetrahedron Letters**, v. 53, n. 49, p. 6685-6688, 2012.

JAYASENA, D. D., KIM, H. J., YONG, H. I., PARK, S., KIM, K. J., & JO, C. Effect of atmospheric pressure plasma on the lipid oxidation and fatty acid profiles of pork during refrigerated storage. *Meat Science*, 100, 41-45, 2015.

JIANG, B.; ZHENG, J. LIU, Q.; WU, M. Degradation of azo dye using non-thermal plasma advanced oxidation process in a circulatory airtight reactor system. **Chemical Engineering Journal**, v. 204, p. 32-39, 2012.

JOBIM, C.C.; GONÇALVES, G.D.; SANTOS, G.T. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas versus desempenho animal e qualidade de seus produtos. **Simpósio Sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas. Anais... UEM/CCA/DZO. Maringá**, p. 242-261, 2001.

JOUANY, J.P. The impact of mycotoxins on performance and health of dairy cattle. In: **Science and Technology in the Feed Industry, Proceedings of Alltech's 17th Annual Symposium. Nottingham University Press** (Ed. TP Lyons and KA Jacques), UK. p. 191-224, 2001.

KENFACK, D. Resurrection in *Carapa* (Meliaceae): a reassessment of morphological variation and species boundaries using multivariate methods in a phylogenetic context. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 165, n. 2, p. 186-221, 2011.

KIEFT, I. E. **Plasma needle: exploring biomedical applications of non-thermal plasmas**. Technische Universiteit Eindhoven, 2005.

- KIM, H. J. et al. Bactericidal effect of atmospheric pressure non-thermal plasma jet on periodontopathogenic and cariogenic bacteria in planktonic phase and in human dental plaque. **Clinical Plasma Medicine**, v. 1, n. 2, p. 37-46, 2013.
- KIM, J. E., LEE, D. U., & MIN, S. C. Microbial decontamination of red pepper powder by cold plasma. *Food Microbiology*, 38, 128-136, 2014.
- KLAUCK, V. et al. In vitro repellent effect of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and andiroba (*Carapa guianensis*) oils on *Haemotobia irritans* and *Chrysomya megacephala* flies. 2015.
- KORACHI, M. et al. Cold plasma for food packaging applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 1, p. 151-157, 2015.
- KOVAČEVIĆ, D. B. et al. Influence of cold atmospheric plasma treatment on juice quality of red and white grapes. **Journal of Food Engineering**, v. 189, p. 9-17, 2016.
- KUMAR, V.; BASU, M.S.; RAJENDRAN, T.P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, v. 27, n. 6, p. 891-905, 2008.
- LACOMBE, A. et al. Inactivation of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in liquid whole egg using radio-frequency atmospheric cold plasma. **International Journal of Food Microbiology**, v. 207, p. 57-64, 2015.
- LADIKOS, D., & LOUGOVOIS, V. Lipid oxidation in muscle foods: a review. **Food Chemistry**, 35(4), 295-314, 1990.
- LAPOLLI, F. R.; SANTOS, L. F.; HÁSSEMER, M. E. N.; AISSE, M. M.; PIVELI, R. P. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In: GONÇALVES, R. F. (Coord.). Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, aqüicultura e hidropônica. Vitória: **PROSAB**, p. 169-208, 2003.
- LAROUSSE, M. Low-temperature plasmas for medicine? **IEEE Trans. Plasma Sci.** 37:714–25, 2009.
- LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Curitiba 2a ed., Parana set. 134p., 1997.
- LEE, S. et al. Effect of atmospheric pressure plasma jet treatment on storage stability of brown rice. **Food Control**, v. 68, p. 224-229, 2016.
- LEESON, S., DIAZ, G.; SUMMERS, J.D. Aflatoxins In: “**Poultry metabolic disorders and mycotoxins**”. JD (Eds.). pp: 248-279. 1995.
- LI, Y., ZHU, W., SHEN, T., & WANG, H. Impact of Atmospheric Cold Plasma Treatment on Wheat Flour: The Evaluation of Physicochemical and Rheological Properties. **Food Chemistry**, 159, 453-459, 2014.

LIMA, R. K. et al. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae). **Acta amazônica**, v. 39, p. 377-382, 2009.

LIMA, R.M.B. de; AZEVEDO, C.P. Desenvolvimento inicial de espécies florestais estabelecidas em consórcio com aplicações de fungos micorrízicos e adubação. In: discharges. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 38, n.2, p. R1-R24, 2005.

LING, L. et al. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on deli-style turkey breast using cold plasma. **Food Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1468-1472, 2011.

LIU, C.J.; XU, G.H.; WANG, T.; Non-thermal Plasma Approaches in CO<sub>2</sub> Utilization. **Fuel Processing Technology**. v.58, p.119 – 134, 1999.

LOCKE, B.R.; SATO, M.; SUNKA, P.; HOFFMANN, M.R.; CHANG, J.S. Electrohydraulic discharge and nonthermal plasma for water treatment. **Industrial & engineering chemistry research**, v. 45, n. 3, p. 882-905, 2006.

LOPES, F. R. Energia Solar e Meio Ambiente: Fundamentos e Aplicações. **Editores Técnicos**, 2019.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 384 p.,2002.

LORENZI, Harri et al. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 1992.

LOS, A. et al. Cold Atmospheric Plasma: Methods of Production and Application in Dentistry and Oncology. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 51, n. 23, p. 233001, 2018.

LOUREIRO, A. A.; SILVA, M. F.; ALENCAR, J. C. Essências madeireiras da Amazônia. 1979.

MACHADO, R. M. A. et al. Avaliação de óleos essenciais sobre o crescimento in vitro do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **Biológicas & Saúde**, v. 3, n. 8, 2013.

MACHALA, Z. et al. Plasma for bio-decontamination, medicine and food security. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 40, n. 19, p. R319-R336, 2007.

MACKINNON, S.; DURST, T.; ARNASON, J.T.; ANGERHOFER, C.; PEZZUTO, J.; MAGALHAES, P.C. Fisiologia do milho. CEP, v. 35701, p. 970, 2002.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 131-139, 2020.

MAHANNA, Bill et al. Silage zone manual. **Du Pont Pioneer. Johnston, IA**, 2014.

- MAPA. Milho, 2011. Disponível em <  
<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/927312/1/Milhonutricao.pdf> >  
Acesso: maio, 2018.
- MARCELLE, Guido B.; MOOTOO, Baldwin S. Tetranotriterpenoids from the heartwood of *Carapa guianensis*. 1975.
- MÁRCIA, B.A.; LAZZARI, F.A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 363-367, 1998.
- MARTINS, Maristela et al. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) and jucá (*Libidibia ferrea* Mart) extracts. **Afr. J. Biotechnol**, v. 13, n. 1, p. 131-137, 2014.
- MATOS, E. H. S. F. Cultivo do milho verde. **Dossiê técnico. Serviço brasileiro de respostas técnicas**, 2007.
- MECCIA, Gina et al. Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Carapa guianensis* collected from Venezuelan Guayana and the antimicrobial activity of the oil and crude extracts. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 11, p. 1934578X1300801135, 2013.
- MENDONÇA, A. P.; FERRAZ, I. D. K. Óleo de andiroba: processo tradicional da extração, uso e aspectos sociais no estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 37, p. 353-364, 2007.
- MENDONÇA, F. P. T. Atividade antimicrobiana de óleo essencial de manjerição (*ocimum basilicum* L.) contra bactérias patogênicas e deterioradoras relacionadas a alimentos. 2018.
- MENDONÇA, M. A. Armazenamento e Conservação de Grãos: Teoria e Prática. **Editora Agrícola**, 2021.
- MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal Stored Products Research**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 1-16, 1995.
- MILLS, J.T. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* Species on cereal seeds. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 10, p. 737-742, 1989.
- MIR, S.A.; SHAH, M.A.; MIR, M.M. Understanding the role of plasma technology in food industry. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 5, p. 734-750, 2016.
- MIRANDA JÚNIOR, R. N. C. et al. Antiplasmodial activity of the andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) oil and its limonoid-rich fraction. **J Ethnopharmacol**, p. 679-683, 2012.
- MIRANDA JUNIOR, R. N. C. et al. Avaliação da atividade antiplasmódica in vitro dos óleos de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L). 2010.

MISRA, N. N. et al. Cold plasma for effective fungal and mycotoxin control in foods: mechanisms, inactivation effects, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 17-30, 2011.

MISRA, N. N., PATIL, S., MOISEEV, T., & CULLEN, P. J. Cold plasma inactivation of bacterial biofilms and reduction of quorum sensing regulated virulence factors. *PLoS One*, 9(9), e107036, 2014.

MISRA, N. N.; SCHLÜTER, O.; CULLEN, P.J. (Ed.). **Cold plasma in food and agriculture: Fundamentals and applications**. Academic Press, 2016.

MISRA, N.N.; KAUR, S.; TIWARI, B.K.; KAUR, A.; SINGH, N.; CULLEN, P.J. Atmospheric pressure cold plasma (ACP) treatment of wheat flour. **Food Hydrocolloids**, 44, 115–121, 2018.

MOISAN, M.; BARBEAU, J.; CREVIER, M.C.; PELLETIER, J.; PHILIP, N.; SAOUDI, B. Plasma sterilization. Methods and mechanisms. **Pure and applied chemistry**, v. 74, n. 3, p. 349-358, 2002.

MONTEIRO, M. C. P. Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado. **Lavras, 76 p. Dissertação**, 2012.

MORAES, E. A., BIANCHIN, I., SILVA, K. F. D., CATTO, J. B., HONER, M. R.; PAIVA, F. Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(3), 229-236, 2010.

MOSS, M.O. Economic importance of mycotoxins-recent incidence in the United States. **Anim Sci**, v.27, p. 3941-3949, 1991.

NACHTIGAL, Gilca Costa et al. Avaliação in vitro da atividade antiproliferativa de extratos das plantas *Jodina rhombifolia* Hook et Arn. e *Carapa guianensis* Aubl sobre células HL-60, Linfoma Daudi e Fibroblastos NIH-3T3. **Pelotas: Universidade Católica de Pelotas**, 2011.

NASCIMENTO, F.M.; BICUDO, S.J.; RODRIGUES, J.G.L.; FURTADO, M.B.; CAMPOS, S. Produtividade de genótipos de milho em resposta à época de semeadura. **Ceres**, v. 58, n. 2, 2015.

NAYAK, B. Shivananda et al. Experimental evaluation of ethanolic extract of *Carapa guianensis* L. leaf for its wound healing activity using three wound models. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

NAYAK, B. Shivananda et al. Investigation of the wound healing activity of *Carapa guianensis* L.(Meliaceae) bark extract in rats using excision, incision, and dead space wound models. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 5, p. 1141-1146, 2010.

NAYLOR, R.; STEINFELD, H.; FALCON, W.; GALLOWAY, J.; SMIL, V.; BRADFORD, E., e MOONEY, H. Losing the links between livestock and land. **Science**, v. 310, n. 5754, p. 1621-1622, 2005.

NESCI, A.; RODRIGUEZ, M.; ETCHEVERRY, M. Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using antioxidants at different conditions of water activity and pH. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 279-287, 2003.

NEWMAN, K.E.; RAYMOND, S.L. Effects of mycotoxins in horses. **The mycotoxin blue book**, p. 57-76, 2000.

NIEMIRA, B. A.; SITES, J. E. Cold plasma rapid decontamination of food contact surfaces contaminated with Salmonella biofilms. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 9, p. 1904-1908, 2008.

NORIEGA, E. et al. Inactivation of Salmonella enterica Serovar Typhimurium on fresh fruits by cold atmospheric gas plasma technology. **Food Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1293-1300, 2011.

OH, Y. J., SONG, H. P., & MIN, S. C. Microbiological Safety and Quality of Commercially Produced Moringa Leaves (*Moringa oleifera* Lam.) in South Korea. **Food Control**, 73, 1105-1110, 2017.

OLIVEIRA, J. D., DA SILVA, J. B., DAPONT, E. C., DE SOUZA, L.M.S., RIBEIRO, S.A.L. Métodos para detecção de fungos e assepsia de sementes de *Schizolobium amazonicum* (*Caesalpinioideae*). **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, 2012.

OLIVEIRA, J.P.; CHAVES, L.J., DUARTE, J.B., BRASIL, E.M., FERREIRA JUNIOR, L.T., RIBEIRO, K.D.O. **Teor de proteína no grão em populações de milho de alta qualidade protéica e seus cruzamentos**. 2004.

OLIVEIRA, Kaique Grabauskas et al. Desenvolvimento de um fungicida natural à partir de piperina. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 46433-46447, 2020.

OUF, S. A., BASHER, A. H., & MOHAMED, A. A. Inactivation of ochratoxin A and fumonisin B2 in dates by cold atmospheric pressure plasma. **LWT-Food Science and Technology**, 62(1), 694-700, 2015.

PAES, M.C.D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Embrapa Milho e Sorgo, 2006.

PANJAK, R., WAN, J., & KEENER, K. M. Cold Plasma in Food Safety. In M. M. Rahman, M. S. Rahman, & D. Liu (Eds.), **Handbook of Food Bioengineering: Food Bioconversion** (pp. 477-496). Academic Press, 2018.

PANKAJ, S. K.; WAN, Z.; KEENER, K. M. Effects of cold plasma on food quality: a review. **Foods**, v. 7, n. 4, p. 4-10, 2018.

PARK, S. Y., KIM, K. M., YOO, S. J., CHOI, J. W., LEE, D. K., JEON, J. H., & JUNG, H. W. Effect of seed treatment using atmospheric pressure plasma on paprika seedling growth. **Journal of Electrostatics**, 79, 65-70, 2016.

PASQUALI, F. et al. Atmospheric cold plasma process-induced starch modifications for improved nutritional, sensorial and rheological properties. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 140-148, 2016.

PATANGE, Apurva et al. Controlling *Brochothrix thermosphacta* as a spoilage risk using in-package atmospheric cold plasma. **Food microbiology**, v. 66, p. 48-54, 2017.

PENIDO, C. et al. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. **Inflammation Research**, v. 54, p. 295-303, 2005.

PENIDO, C. et al. Anti-inflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. **Inflammation Research**, v. 55, p. 457-464, 2006.

PENIDO, C. et al. Inhibition of allergen-induced eosinophil recruitment by natural tetranortriterpenoids is mediated by the suppression of IL-5, CCL11/eotaxin and NF $\kappa$ B activation. **International immunopharmacology**, v. 6, n. 2, p. 109-121, 2006.

PENNINGTON, T. D. **Flora neotropica: monograph. 28. Meliaceae: with accounts of Swietenioideae... and Chemotaxonomy**. New York Botanical Garden, 1981.

PEREIRA, A. B. **Climatologia: Princípios e Aplicações**. Editora Ambiental, 2018.

PEREIRA, T.B. et al. In vitro and in vivo anti-malarial activity of limonoids isolated from the residual seed biomass from *Carapa guianensis* (andiroba) oil production. **Malaria Journal**, v. 13, p. 1-8, 2014.

PERNI, S. et al. Effectiveness of low temperature radio-frequency gas plasma on pathogenic and spoilage microorganisms in fresh and minimally processed fruits and vegetables. **Food Microbiology**, v. 25, n. 8, p. 809-815, 2008.

PESKE, S.T.; ROSENTHAL, M.D.; ROTA, G.R.M. **Sementes: Fundamentos científicos e tecnológicos**. 3ª edição. Pelotas: Editora rua Pelotas, 2012. 573p.

PHAN, C. M. et al. The effect of plasma treatment on surface hydrophobicity and wettability of dental ceramics. **Materials Science and Engineering: C**, v. 78, p. 1072-1077, 2017.

PHAN, H. T., VU, T. M., & KIM, S. Cold Plasma Treatment in Food Preservation. In A. K. Hagi & G. T. Pegg (Eds.), **Handbook of Food Processing: Food Preservation** (pp. 439-468). Apple Academic Press, 2017.

PHILIP N, S.B.; CREVIER, M.C.; MOISAN, M.; BARBEAU, J.; PELLETIER, J. The respective roles of UV photons and oxygen atoms in plasma sterilization at reduced gas pressure: the case of N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> mixtures. **IEEE Trans. Plasma Sci.** 30:1429–36 19, 2002.

PIRES, H. C. G. et al. Efeito de diferentes concentrações de andiroba na inibição do crescimento in vitro da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. **Cadernos de Agroecologia [Volumes 1 (2006) a 12 (2017)]**, v. 10, n. 3, 2015.

- PITT, J. I. Toxigenic fungi: Which are important? *Medical Mycology*, 41(Supplement\_1), 93-96, 2003.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. Sydney: Academic Press, 1985.
- PONS, A.; BRESOLIN, M. **A cultura do milho**. Trigo e Soja. Porto Alegre, n. 57, p. 6- 31, 1981.
- POUTANEN, K.; SOZER, N.; DELLA VALLE, G. How can technology help to deliver more of grain in cereal foods for a healthy diet? *Journal of Cereal Science*, 59, 327–336, 2014.
- PROPHIRO, J. S. et al. Evaluation of time toxicity, residual effect, and growth-inhibiting property of *Carapa guianensis* and *Copaifera* sp. in *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, v. 110, p. 713-719, 2012.
- PROPHIRO, J. S. et al. First report on susceptibility of wild *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) using *Carapa guianensis* (Meliaceae) and *Copaifera* sp.(Leguminosae). **Parasitology research**, v. 110, p. 699-705, 2012.
- QI, S. et al. A novel flavane from *Carapa guianensis*. **ACTA BOTANICA SINICA-CHINESE EDITION-**, v. 45, n. 9, p. 1129-1132, 2003.
- QI, S. et al. Constituents of *Carapa guianensis* Aubl.(Meliaceae). **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 59, n. 6, p. 488-490, 2004.
- RAMAZZINA, I. et al. Cold plasma treatment for fresh-cut fruit and vegetable preservation. In: 5th IET International Conference on Advances in Medical, Signal and Information Processing. IET, 2015.
- RAMAZZINA, I., BERARDINELLI, A., & LANCIOTTI, R. Cold Plasma Treatments in Food Processing. In N. K. Niranjana (Ed.), **Handbook of Food Processing** (pp. 115-131). CRC Press, 2015.
- REID, L.M.; NICOL, R.W.; OUELLET, T.; SAVARD, M.; MILLER, J.D.; YOUNG, J.C. e SCHAAFSMA, A.W. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. **Phytopathology**, v. 89, n. 11, p. 1028-1037, 1999.
- REIS, C. A. Controle de Qualidade em Grãos Armazenados. **Editora Agropecuária**, 2018.
- RESNIK, S.; NEIRA, S.; PACIN, A.; MARTINEZ, E.; APRO, N.; E LATREITE, S. A survey of the natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in Argentine field maize: 1983–1994. **Food Additives & Contaminants**, v. 13, n. 1, p. 115-120, 1996.
- REVILLA, J. Plantas da Amazônia: Plantas da Amazônia: Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis. **Manaus: SEBRAE/AM**, 2001.
- RIZZINI, C. T. MORS, WB Botânica econômica brasileira. 1976.

ROD, I. et al. Cold atmospheric gas plasma disinfection of chicken meat and chicken skin contaminated with *Listeria innocua*. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 11, p. 1932-1939, 2012.

ROSA, JM da et al. Andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl) in the capture of the fruit fly (*Anastrepha fraterculus* Wiedemann) in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Idesia**, v. 31, n. 3, p. 97-102, 2013.

ROSHANDEL-HESARI, N. et al. Investigation of physicochemical properties, antimicrobial and antioxidant activity of edible films based on chitosan/casein containing *Origanum vulgare* L. essential oil and its effect on quality maintenance of cherry tomato. **Food Chemistry**, v. 396, p. 133650, 2022.

ROTH, J. R. Industrial Plasma Engineering, Bristol: **Institute of Physics Publishing**, 1995.

ROY, A.; SARAF, S. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.2, p.191-201, 2006.

RÜNTZEL, C. L. et al. Effect of cold plasma on black beans (*Phaseolus vulgaris* L.), fungi inactivation and micro-structures stability. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, p. 864-873, 2019.

SANTOS, A. B.; ALMEIDA, C. F. Composição química das sementes de guaraná (*Paullinia cupana*): uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 589-605, 2021.

SANTOS, A. B.; OLIVEIRA, C. D. Desinfecção com ozônio: princípios e aplicações. **Revista Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 25, n. 3, p. 452-460, 2019.

SANTOS, A. B.; PEREIRA, R. F. Ocorrência e distribuição da andiroba (*Carapa guianensis*) no Brasil: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Biologia Vegetal**, v. 19, n. 3, p. 231-245, 2021.

SANTOS, L. M.; SILVA, R. A.; OLIVEIRA, A. M. Uso de fungicidas naturais na agricultura: uma revisão. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 16, n. 3, p. 112-126, 2021.

SANTURIO, V.M. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem de Grãos**. Cap. II – Micotoxinas emergentes, p. 2-24, 2000.

SARANGAPANI, C., MISRA, N. N., HERTWIG, C., & EHLBECK, J. Impact of cold atmospheric pressure plasma treatment on pesticide removal and selected properties of strawberries. *Food Control*, 71, 9-17, 2017.

SARANGAPANI, C., SHARMA, C., & MISRA, N. N. Cold Plasma: A Novel Technology for Food Processing. In A. K. Haghi & G. T. Pegg (Eds.), **Handbook of Food Processing: Food Preservation** (pp. 409-438). Apple Academic Press, 2017.

SARRIA, André L. F. et al. Effect of triterpenoids and limonoids isolated from *Cabralea canjerana* and *Carapa guianensis* (Meliaceae) against *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). **Zeitschrift Für Naturforschung C**, v. 66, n. 5-6, p. 245-250, 2011.

SCHOLTZ, V. et al. Principles and Applications of Atmospheric Pressure Corona Discharges. **Plasma Sources Science and Technology**, v. 24, n. 1, p. 015017, 2015.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. *Mycological Research, Germany*, v.6, n. 109, p.661-686, 2005.

SCUSSEL, V.M. Micotoxinas em Alimentos, Ed. **Insular, Florianópolis, SC, 144p**, 1998

SCUSSEL, VILDES MARIA SCUSSEL (Ed.). **Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos II**. UFSC, 2008.

SCUSSEL, VM; SAVI, GD; KLUCZKOVSKI, AM. Fungi and Mycotoxins associated with stored grains. **Armazenagem de grãos**, Cap. V, 735-758, 2018.

SEGAT, A., MISRA, N. N., INNOCENTE, N., & GÓMEZ-LÓPEZ, V. M. Effect of Cold Plasma Treatment on Wheat Flour Dough Rheology and Bread Quality. **LWT - Food Science and Technology**, 69, 316-322, 2016.

SELCUK, M. et al. Cold atmospheric plasma treatment of cereals. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 364-368, 2008.

SHI, Z. et al. Inactivation of *Candida albicans* biofilms by nonthermal plasma and its enhancement for fungistatic effect of antifungal drugs. **Plasma Processes and Polymers**, v. 8, n. 11, p. 1093-1101, 2011.

SHÜLTER, M. et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma can influence the pH in phosphate buffered saline. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, e74282, 2013.

SICILIANO, T., DE MARCO, A., MUSUMECI, R., ROSSINI, C., SCIUBBA, L., GHERARDI, M., ... & COLOMBO, V. Decontamination of aflatoxin M1 in milk by cold atmospheric pressure plasma jet. *Journal of Food Protection*, 79(3), 376-382, 2016.

SILOTO, R.C. **Danos e biologia de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2002.

SILVA, A. B.; ALMEIDA, C. F. Propriedades antiulcerogênicas dos frutos do Jucá (*Libidibia ferrea* Mart): uma revisão da literatura. **Revista de Ciências Farmacêuticas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 45-52, 2021.

SILVA, B. A.; SCUSSEL, V. M. Characteristics and Effects of the Amazonian Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) Oil Against Living Organisms—A Review. **IOSR J. Biotechnol. Biochem.(IOSR-JBB)**, v. 6, p. 31-47, 2020c.

- SILVA, F. R. P. et al. Análise fitoquímica e microbiológica da atividade do extrato bruto etanólico da Andiroba, *Carapa guianensis* Aubl. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 4, n. 4, 2015.
- SILVA, J. A. Secagem e armazenagem de grãos: técnicas e práticas. **Editora Agronômica**, 2020a.
- SILVA, J.B. P. **Desenvolvimento de queijo minas frescal elaborado a partir de leite de búfala acrescido de manjeriço e orégano**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso.
- SILVA, K.F.S.; SANTOS, K.K.; RIBEIRO JÚNIOR, K.A.L.; SANT'ANA, A.E.G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 76, Issues 7-8, December, Pages 629-636, 2005.
- SILVA, M. A.; GONÇALVES, L. C. Propriedades terapêuticas e mecanismos de ação das substâncias presentes no guaraná (*Paullinia cupana*): uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Farmacologia Aplicada**, v. 25, n. 1, p. 78-92, 2022.
- SILVA, M. A.; SANTOS, J. F. Etnofarmacologia e uso terapêutico do jucá (*Libidibia ferrea* Mart) na Amazônia brasileira. **Revista Brasileira de Etnobiologia e Etnoecologia**, v. 12, n. 3, p. 112-125, 2020.
- SILVA, P. R.; ALVES, M. M. Descontaminação de grãos: Aspectos nutricionais e tecnológicos. **Revista de Tecnologia e Inovação Alimentar**, v. 8, n. 2, p. 45-58, 2020b.
- SILVA, R. A.; PEREIRA, M. B. Compostos ativos e mecanismos de ação do óleo essencial de orégano como agente antifúngico: uma revisão. *Revista de Biologia e Farmácia*, v. 8, n. 3, p. 87-95, 2020.
- SILVA, R. A.; PEREIRA, M. B. Propriedades antimicrobianas do óleo essencial de Orégano: uma revisão. **Revista de Ciências Naturais e Aplicadas**, v. 5, n. 2, p. 35-42, 2020.
- SINHA, K.K.; SINHA, A.K. Effect of *Sitophilus oryzae* infestation on *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination in stored wheat. **Journal of Stored Products Research**, v. 27, n. 1, p. 65-68, 1991.
- SLADEK, R.E.J.; STOFFELS, E. Deactivation of *Escherichia coli* by the plasma needle. **J. Phys. D** 38:1716–21, 2005.
- SMITH, R. L. Microbiologia de Alimentos: Fundamentos e Aplicações. **Editora Científica**, 2019.
- SONG, H. P. et al. Inactivation of *Escherichia coli* on lettuce using atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma. **Food Microbiology**, v. 46, p. 306-310, 2015.
- SONG, H. P. et al. Sterilization effects of microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. **Applied Physics Letters**, v. 95, n. 15, p. 154101, 2009.
- SORIANO, J.M; DRAGACCI, S. Intake, descontamination and legislation of fumonisins in foods. **Food Research International**, v. 37, p. 367-374, 2004.

SOUSA, R. M. S.; SERRA, I. M. R. S.; MELO, T. A. Effect of essential oils as an alternative in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* in pepper. **Summa Phytopathologica**, v. 38, p. 42-47, 2012.

SOUSA, S. F. et al. Análise física e avaliação do efeito antifúngico dos óleos de andiroba, copaíba e pinhão-manso. **Floresta**, v. 48, n. 2, p. 153-162, 2018.

SOUZA CHAGAS, A. C. et al. In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 110, p. 295-303, 2012.

SOUZA, C.R.; de AZEVEDO, C.P.; ROSSI, L. Andiroba (*Carapa guianenses* Aubl.). **Embrapa Amazônia Ocidental-Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.

SOUZA, L. C.; PEREIRA, R. F. Potencial do guaraná (*Paullinia cupana*) como fonte de cafeína: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 2, p. 135-148, 2020.

SOUZA, L. C.; PEREIRA, R. F. Propriedades terapêuticas dos frutos do jucá (*Libidibia ferrea* Mart): uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 123-135, 2019.

SOUZA, M. T.; PEREIRA, G. T.; ALMEIDA, W. S. Climatologia e Dinâmica Climática: Teoria e Aplicações. **Editora Acadêmica**, 2020.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Montana, v.67, n.4, p.491-502, 2003.

SU, Y., TAN, F., & ZHU, W. Application of atmospheric pressure plasma in seed germination and plant growth at low temperature. *Journal of Electrostatics*, 84, 99-104, 2016.

SUBEM, A. et al. Cold plasma treatment of cereal bars for decontamination of *Aspergillus flavus*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 18, p. 196-201, 2013.

TANAKA, Y. et al. Absolute stereostructure of Andirolides A–G from the flower of *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Tetrahedron**, v. 67, n. 4, p. 782-792, 2011.

TANAKA, Y. et al. Andirolides H–P from the flower of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae). **Tetrahedron**, v. 68, n. 18, p. 3669-3677, 2012.

TAPPI, S., POLAK, J., & SCHOLTZ, V. Plasma in Food Industry - Challenges and Possibilities. **Czech Journal of Food Sciences**, 32(2), 101-110, 2014

TENDERO, C.; TIXIER, C.; TRISTANT, P.; DESMAISON, J.; LEPRINCE, P. Atmospheric pressure plasmas: A review. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 61. p 2 – 30, 2006.

THIRUMDAS, R. et al. Comparison of different dielectric barrier discharge (DBD) electrode configurations for the surface treatment of brown rice grains. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 33, p. 1-10, 2016.

THIRUMDAS, R.; SARANGAPANI, C.; ANNAPURE, U.S. Cold plasma: a novel non-thermal technology for food processing. **Food Biophysics**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2015.  
TIMMERMANN, C.; ZACCARON, A. Z.; FORCELINI, C. A. Fungicide management in maize: Efficacy, resistance, and environmental impact. **Crop Protection Journal**, 138, 2022.

ULBIN-FIGLEWICZ, N., & JARMOLUK, A. Quality changes in raw pork after treatment with atmospheric pressure plasma. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(3), 219-224, 2016.

USDA. Corn and soybean production down in 2022, USDA reports Corn stocks down, soybean stocks down from year earlier Winter Wheat Seedings up for 2023, 2022. Disponível em: <<https://www.nass.usda.gov/Newsroom/archive/2023/01-12-2023.php>>. Acesso em junho, 2024.

USDA. Corn and soybean production up in 2020, USDA Reports: Corn stocks down fractionally, soybean stocks down sharply from year earlier Winter Wheat Seedings up for 2021, 2020. Disponível em: <<https://www.nass.usda.gov/Newsroom/archive/2021/01-12-2021a.php>>. Acesso em: junho, 2024.

VALMORBIDA, Roberta et al. Fungos e micotoxinas em grãos de milho (*Zea mays* L.) e seus derivados produzidos no estado de Rondônia, Região Norte do Brasil. 2016.

VLEUGELS, M. et al. Comparison of nonthermal plasma technologies in fresh foods: plasma in food science: **Food Bioprocess Technology**, v. 87, n. 4, p. 1471-1480, 2005.

WANG, B., XU, H., LU, X., & ZHANG, J. Degradation of aflatoxin B1 in peanuts by atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma. *Food Control*, 54, 347-352, 2015.

WANG, Y., & MIN, S. C. Decontamination of Fresh Produce by Atmospheric Pressure Cold Plasma. **Food Microbiology**, 30(1), 13-17, 2012.

WEAVER, M. A.; ABBAS, H. K. Field conditions, fungal biology, and mycotoxin contamination. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 622113, 2021.

WEBER, R.W.S; PITT, D. Teaching techniques for mycology: 11. Riddell's slide cultures. **Mycologist**, v. 14, n. 3, p. 118-120, 2000.

WELTMANN, K. D. et al. Atmospheric Pressure Plasma Jet for Medical Therapy: Plasma Parameters and Risk Estimation. **Contributions to Plasma Physics**, v. 48, n. 7-9, p. 633-640, 2008.

XU, L., TIAN, Y., JIANG, J., LU, B., SUN, Q., CAO, W., & DING, T. Effect of Atmospheric Pressure Plasma Jet on Quality and Nutritional Parameters of Fresh Orange Juice. **Food Chemistry**, 215, 366-372, 2017.

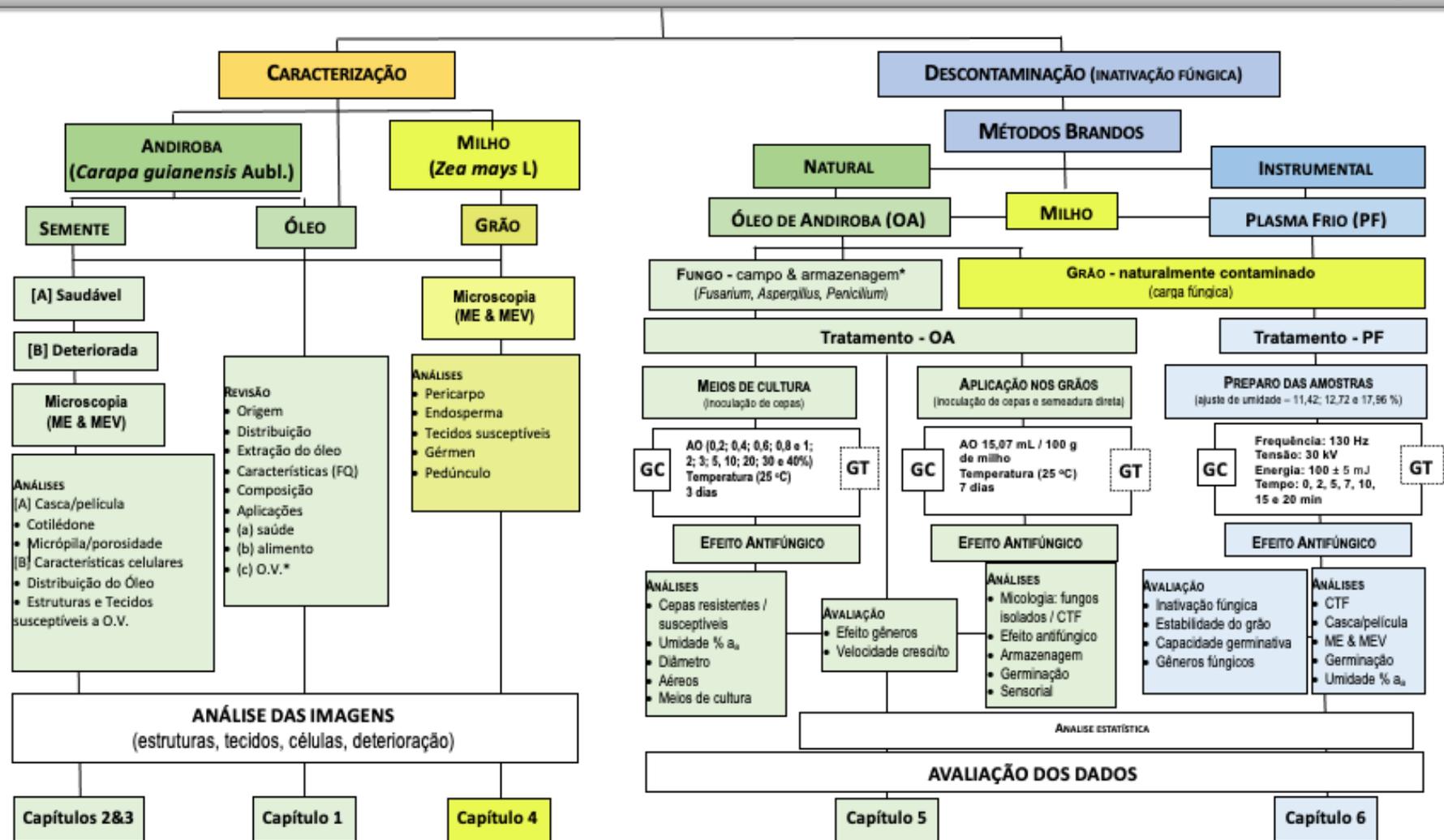
XU, W. et al. Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* on the surface of fresh fruits by plasma-activated water. **Food Microbiology**, v. 64, p. 195-200, 2017.

YEPEZ, X.; KEENER, K. M. Hydrogen plasma treatment of soybean oil for partial hydrogenation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 38(Part B), 291-298, 2016.

YONG, H. I. et al. Cold plasma treatment for various applications in food safety. **Journal of Food Safety**, v. 37, n. 3, p. e12343, 2017.

ZIUZINA, D., PATIL, S., CULLEN, P. J., KEENER, K. M., & BOURKE, P. Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli* in liquid media inside a sealed package. *Journal of Applied Microbiology*, 116(2), 150-162, 2014.

**FLUXOGRAMA CONCEITURAL DA TESE**

**CARACTERIZAÇÃO DE MICROESTRUTURAS SUSCEPTÍVEIS A FUNGOS E SUA DESCONTAMINAÇÃO POR MÉTODOS BRANDOS EM GRÃOS DE MILHO (*Zea mays* L.)**


Fluxograma do estudo da caracterização de microestruturas susceptíveis a deterioração fúngica e descontaminação de milho (*Zea mays* L.) envolvendo (a) aplicação de microscopias estereoscópica (ME) e eletrônica de varredura (MEV) de microestruturas da Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) amazônica, características de seu óleo, e características do grão de milho e (b) aplicação de métodos antifúngicos brandos (b.1) Óleo de Andiroba e (b.2) Plasma Frio. OA: Óleo de Andiroba, PF: Plasma Frio, GC: Grupo Controle, GT: Grupo Tratado, CTF: Contagem Total de Fungos, O.V: organismos vivos, aa atividade de água, *Fusarium verticillioides*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus*, \*(bactéria, levedura, fungo, parasitas, protozoários).

## CAPÍTULO 2

### **CARACTERIZAÇÃO DA SEMENTE DE ANDIROBA (*Carapa Guianensis* Aubl.) AMAZÔNICA POR MICROSCOPIAS ESTEREOSCÓPICA E ELETRÔNICA DE VARREDURA - SAUDÁVEL**

Parte das informações fornecidas no 2º Capítulo da Tese foram submetidas em:

Silva, B. A.; Scussel, V. M.; Tribuzi, G. Stereo and scanning electron microscopy of the Amazonian Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). Acta Amazonica, maio 2023 – em Anexo.

## RESUMO

O conhecimento das características morfo-histológicas da semente de andiroba é importante para entender suas suscetibilidades à deterioração para futuras aplicações em procedimentos de prevenção e controle para melhorar a qualidade e a segurança da matéria-prima e do Óleo de Andiroba. As características morfo-histológicas da semente inteira de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) foram obtidas por microscopia estereoscópica (ME) e eletrônica de varredura (MEV). A casca (tegumento), uma estrutura de parede espessa rica em lignina e protetora, varia em camadas de tecido (tipo e número), com células (poligonais e longas) apresentando poros - os plasmodesmos. Suas diferentes três faces na junção superior formam Pontas (Pontas 1-4), sendo a Ponta 4 (Fases B, C e D de ligação) o local localizado em uma cavidade pequena relativamente apertada, o micrópilo, rico em feixes vasculares de vasos em forma helicoidal e traqueídeos. Um canal de intercâmbio (do ouriço - através do micrópilo - para a parte interna da semente) é formado entre a casca e uma fina pele marrom em direção aos cotilédones. Em sua superfície, resíduos de tecidos placentários secos podem ser detectados aderidos em toda a casca. Os cotilédones da semente de Andiroba (cortes transversais e longitudinais), apresentam diferentes camadas celulares (contendo gotículas de lipídios) distribuídas aleatoriamente. Cabe salientar, algumas características das superfícies da casca (externa e interna) altamente onduladas e irregulares, que produzem reentrâncias e podem permitir a deposição de conídios de fungos e/ou absorção de umidade, o que leva à deterioração por formação de colônias.

**Palavras-Chave:** Andiroba; roba-mohogany; *cedro-bateo*; morfologia; MEV

## 2.1 INTRODUÇÃO

A floresta amazônica é abundante e diversificada, representando a maior cobertura vegetal do mundo (Cardoso et al. 2017), com plantas ricas em compostos bioativos, cuja exploração racional contribui para o desenvolvimento sustentável da região (Cabral et al. 2013). Dentre muitas outras espécies vegetais, a Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) se destaca pela versatilidade e finalidades variadas (Dias et al. 2023). Seu elevado valor econômico é atribuído aos seus múltiplos usos, a partir do aproveitamento de sua madeira, que possui alto valor para produtos sólidos, incluindo fabricação de móveis, construção civil, chapas de madeira e compensados (Firmino et al. 2019).

O óleo extraído de suas sementes é conhecido por seus benefícios fitoterápicos. É de grande importância para a economia local e é considerado um importante produto florestal não madeireiro para o estado. Produzido principalmente por comunidades tradicionais amazônicas, o Óleo de Andiroba representa um caminho sustentável para o desenvolvimento econômico. Também é muito procurado para uso medicinal e cosmético, e para produção de biodiesel (Mendonça e Ferraz 2007; Kenfack, 2011; Correa et al. 2020). Devido ao grande interesse do mercado, a cadeia produtiva do óleo é cada vez mais obrigada a apresentar a quantidade e a qualidade exigidas pelos consumidores (Correa et al. 2020).

Produz frutos arredondados (vagens) com sementes marrons (Tsukamoto et al. 2019). Essas sementes possuem formato angular (poligonal a irregular) (com diversas faces) devido à compressão mútua, podendo variar em tamanho, mesmo sendo do mesmo fruto (Silva e Scussel 2020). Pode conter de 4 a 6 válvulas, medindo em torno de 4,7, 3,9 e 3,1 cm de comprimento, largura e espessura, respectivamente, com sementes pesando em torno de 21 g (Lorenzi et al. 2002).

O Óleo de Andiroba é extraído e solidifica em temperaturas abaixo de 25 °C (Tsukamoto et al. 2019). Possui diversas propriedades e aplicações (Silva e Scussel 2020), desde a cura da saúde até a inativação e controle de organismos vivos como insetos (Klauk et al. 2015), ácaros, parasitas (Moraes et al. 2010), protozoários (Pereira et al. 2010). 2014), fungos (Sousa et al. 2018; Silva et al. 2019), entre outros.

Foram publicados relatórios sobre a deterioração das sementes (matéria-prima) e a redução da qualidade do óleo, que levam a perdas econômicas para a indústria do Óleo de Andiroba (Crawley e Gillman 1989; Pinto 2007). Em relação às informações morfo-histológicas através da aplicação de microscopias, alguns estudos têm sido realizados. Porém, apenas nas folhas e na anatomia foliar das mudas, por meio de microscopias de luz, eletrônica de varredura e de força (Aragão et al. 2014; Matos et al. 2021). Apesar disso, faltam estudos sobre as características morfo-histológicas da semente inteira e de suas partes, incluindo a descoberta e compreensão de sua suscetibilidade à deterioração biológica.

Considerando a falta de informações sobre as características da semente inteira de Andiroba (tecidos, camadas, células e detalhes de características especiais), o presente estudo investigou as características morfo-histológicas de estruturas (casca/cotilédones - superfícies externa/interna) e tecidos, por microscopia estereoscópica (ME) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Conhecendo as características morfo-histológicas da semente de Andiroba é possível compreender suas suscetibilidades para prevenir e controlar tanto a deterioração da

matéria-prima quanto a qualidade da extração do óleo. Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho relatando a morfo-histologia de sementes de *Carapa guinensis* Aubl.

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1 MATERIAL**

#### **2.2.1.1 Amostra**

As sementes de Andiroba (350 g) foram doadas por produtor artesanal de Ramal do Branco (2°46'46,5"S 59°22'01,9" W), Rio Preto da Eva - Estado do Amazonas, Região Norte do Brasil.

#### **3.2.1.2 Equipamentos**

Máquina de folheamento de ouro, modelo EM-Scd500, Leica (Leider, III., EUA), estéreo microscópio, modelo OPTZTS, Opticam (Tóquio, Kt., Japão) [180x] e microscópio eletrônico de varredura, modelo JSM-6390LV, Jeol (Peabody, Mass., EUA) [7000x].

#### **3.2.1.3 Outros Materiais**

Formaldeído e etanol, grau analar, Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil); stubs (pequenos blocos metálicos, 9 diâmetro e 10 mm de altura), Leica (Leider, III., EUA); bisturi de aço inoxidável, GS Mtronix (SP, Brasil); Captura de imagem SM software, modelo OPTHD 14000, Opticam Microscopy Technology (Doral, Fl., EUA); fita de carbono dupla face, Electron Microscopy Sciences (Leider, Illinois, EUA), serra, Ticotico (São Paulo, SP, Brasil); pinças, aço inoxidável.

### **2.2.2 MÉTODOS**

#### **2.2.2.1 Preparo da Amostra**

As sementes de andiroba (inteiras), previamente preparadas (desidratadas e desengorduradas), foram seccionadas - inteiras e suas partes destacadas (tegumento-casca e

parte extratora de óleo - o cotilédone) para análise por ME e MEV (identificação das principais estruturas, tecidos e células - conforme relatado por Scussel et al. (2014a)).

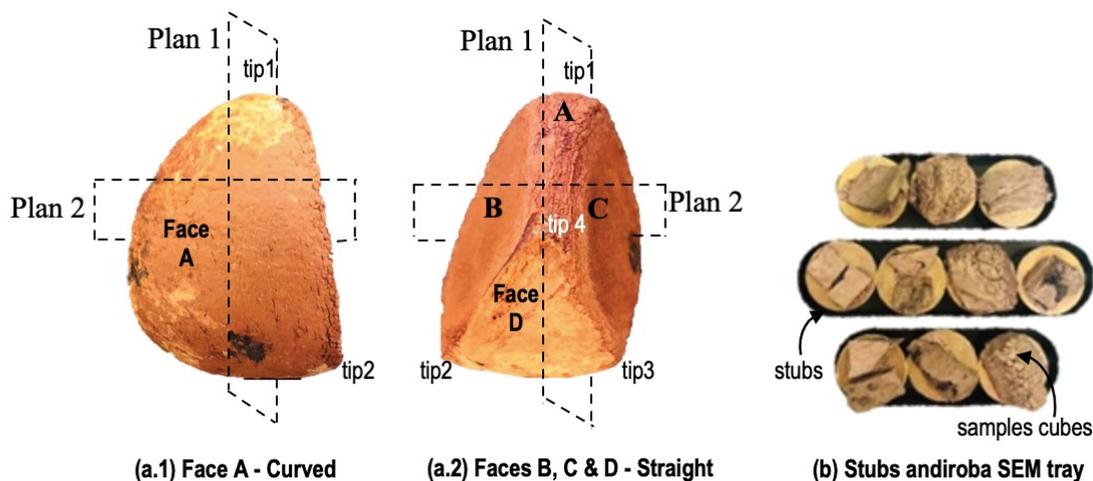
### **2.2.2.1 Microscopia Estereoscópica - ME**

A semente foi seccionada ao meio nos planos 1 e 2 (longitudinal e transversal, respectivamente - Figura 1.a) por meio de uma serra fina e também teve a casca (incluindo a fina pele marrom) e o cotilédone destacados e seccionados usando um bisturi de aço inoxidável para posterior observação individual de superfície/transversal por ME. Cada superfície (externa/interna) e metades (seções longitudinal e transversal) da casca e do cotilédone de cada semente de andiroba foram observadas por meio de um microscópio estereoscópico para determinar cada estrutura e sua morfologia em diferentes ampliações [7,1-115X]. Micrografias foram registradas usando software de captura de imagem do ME. Os detalhes morfo-histológicos observados por ME foram posteriormente elucidados por MEV (Scussel et al. 2014a).

### **2.2.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV**

A casca foi cortada em pequenos cubos (aproximadamente 3,0x3,0x2,0 mm de largura/comprimento/espessura, respectivamente), incluindo características especiais - como a Ponta 4 da semente no tegumento. Os cotilédones foram fatiados (espessura de 3,0 a 4,0 mm) em diferentes pontos (incluindo a área próxima à junção dos dois cotilédones - o embrião). Os cubos de andiroba foram fixados em suportes contendo fita adesiva de carbono dupla face e revestidos com uma camada (40 nm) de ouro (Au) sob vácuo em uma base planetária. Isso foi realizado no Centro de Microscopia Eletrônica da UFSC, para análise por MEV (Kreibich et al. 2017a). Cada área de interesse da amostra de Andiroba, previamente revestida com ouro, foi escaneada e suas características observadas em diferentes ampliações [até 3.000X] (Scussel et al. 2014a; Kreibich et al. 2017a).

Figura 1 - Sementes de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) para observação por microscopia estereoscópica (ME) e microscopia eletrônica de varredura (MEV): (a) diagramas para o procedimento de seccionamento das partes (seções longitudinal e transversal - Planos 1 e 2, respectivamente); (a.1) vista da Face Curva (A) - face da semente em contato com a ouriço e (a.2) vista das Faces Retas (B, C, D) - faces da semente em contato umas com as outras, na ouriço, e (b) bandeja com suportes contendo cubos de partes da semente, revestidos com uma camada de ouro para análise por MEV.



## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

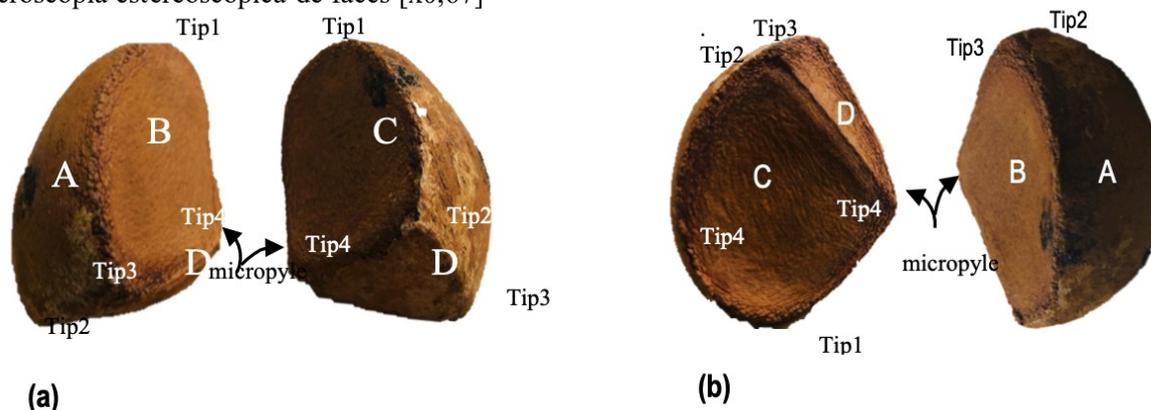
A partir das metades da semente de andiroba inteira seccionada e das fatias/cubos de cada parte da semente (casca e cotilédones), bem como das superfícies (interna e externa), suas camadas de tecido e principais características foram identificadas por ME e MEV. Como esperado, cada parte da semente de andiroba apresentava diferentes camadas de tecido, era composta por diferentes formas e tamanhos de células, incluindo feixes vasculares. As Figuras 2-4 mostram as Faces/Pontas/micrópilos da semente e a localização das camadas de tecido, e as Figuras 5-10 mostram as características da semente inteira e seccionada (através da distribuição das camadas de tecido e das diferenciações de suas células) por ME e MEV, respectivamente.

### 2.3.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA SEMENTE DE ANDIROBA – ME

Devido à forma irregular das sementes de andiroba, elas apresentam múltiplas Faces variando em tamanho (formando em cada 2 delas uma ligação - os Cantos) e Pontas (ligações entre cada 3 Faces na parte superior). Portanto, foram estabelecidas as posições das Faces e Pontas para permitir uma melhor discussão das descobertas das características histológicas por ME e MEV. A Figura 2 mostra um diagrama com as Faces (Faces: A a D) e Pontas (Pontas: 1 a 4) posicionadas na semente (seu formato mais regular). A Face A é a face principal que apresenta uma forma curva. É a face que entra em contato direto com o ouriço. As Faces B e C têm formato reto/plano (contato das sementes umas com as outras). O micrópilo, uma característica de abertura bastante apertada, está localizado no topo da junção das Faces B, C e

D - na Ponta 4. Através das micrografias de ME das características da semente de andiroba, foram identificadas a cor/camadas/posicionamento de feixes vasculares/seqüência de tecidos. Eles são mostrados nas Figuras 2-4 (superfícies - interna/externa - seções transversais e longitudinais).

Figura 2 - Amostras de sementes de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) apresentando detalhes sobre a distribuição de suas principais Faces e Pontas: nas vistas (a) frontal e (b) traseira, através da microscopia estereoscópica de faces [x0,67]



(a) Casca (tegumento): A semente de andiroba não apresenta uma forma homogênea (devido à pressão dentro do ouriço/válvulas) - a estrutura de casca protetora altamente lignificada compreende principalmente 4 faces (A, B, C e D) ligadas umas às outras [o que confere à semente uma forma angular]; formando assim os Cantos das Faces [cada 2 faces da casca com ligação mais espessa]; as 4 Pontas da semente [onde 3 faces da casca se conectam umas às outras]; e o lóculo [o umbigo da semente - que conecta a semente ao centro do ouriço/válvulas e está localizado na junção superior das Faces B, C e D], também chamado de micrópilo (Figuras 2, 4). Todos apresentam diferenças histológicas com uma série de números de camadas de tecido, cores e tipos dependendo de qual parte da estrutura da casca da semente estão localizados (Face / Cantos das Faces / Pontas das Faces / micrópilo) (Figura 4a, b).

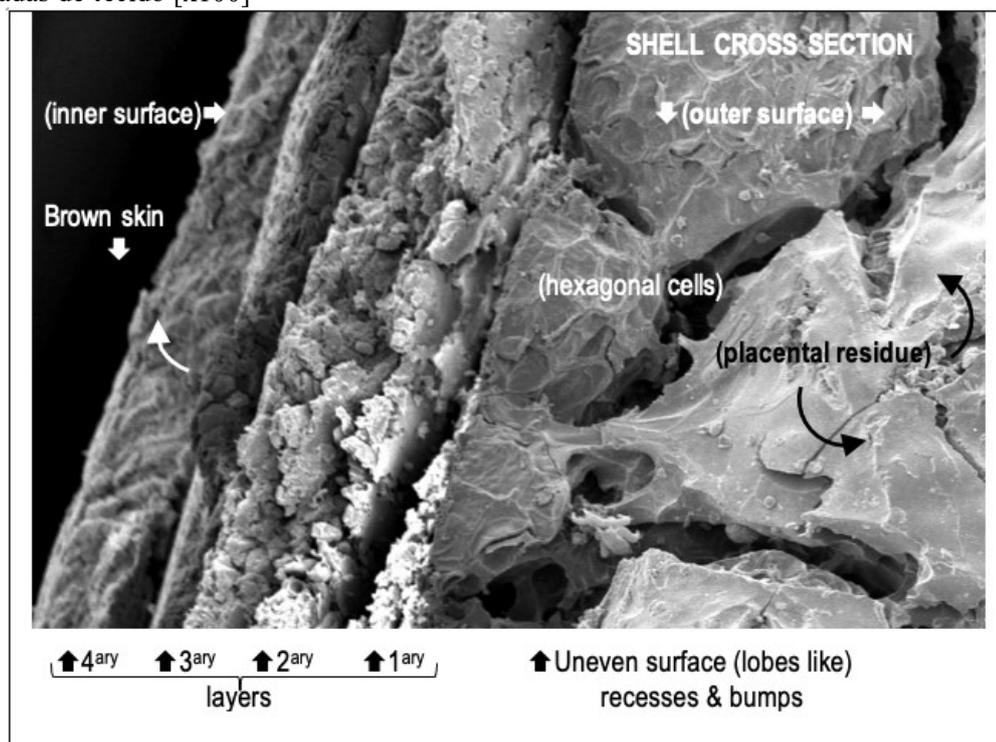
Em relação às características morfológicas em (a.1) Superfície: a casca (externa/interna) apresenta de uma superfície áspera a lisa e cerosa em toda a maior parte da semente. Isso depende do tipo de faces, ou seja, a Face A tem uma superfície áspera, semelhante a veludo (com algumas vezes uma camada de resíduos placentários) anexada à superfície. Por outro lado, as Faces B, C e D são relativamente lisas, no entanto, apresentam em suas bordas uma impressão mais consistente e corrugada (em forma de lobos/reentrâncias), uma diferenciação de impressão mais irregular (região de ligação das 2 Faces, tanto Cantos quanto Pontas) (Figura 4a.1). Isso ocorre especialmente na formação da Ponta 4 (Face D com Faces B,

C). Isso indica o local de conexão da semente ao centro do ouriço - o micrópilo. Além disso, um canal localizado entre a casca e a fina pele marrom alcança o cotilédone, por onde a água e os nutrientes fluem (do micrópilo em direção à semente interna) (Figura 4a.1).

Com relação à região de entrada da semente (onde está localizado o lóculo), suas características estruturais, o hilo da semente é uma área maior e não tem uma protrusão delimitadora e também possui resíduos de tecidos placentários anexados (Kenfack, 2011). O micrópilo, por definição, é a área de abertura da semente onde o tegumento não se fecha completamente e é caracterizado como uma cavidade mais próxima à região do hilo (Camargo et al. 2008). (a.2) Seções transversais e longitudinais: no que diz respeito ao número de camadas de tecido da casca da semente, espessuras e cores das metades da semente seccionadas transversalmente (Figuras 4b), elas variam no número de camadas (2 a 4) - de acordo com a característica e localização da casca, ou seja, em Cantos/Pontas das faces ou ao longo da área do plano das faces), como segue: Faces (área do plano): 3-4 camadas (Figura 3); Cantos das faces: 5 camadas (4 delas que se misturam com uma quinta camada macia e esponjosa que preenche o centro do Canto) (Figura 4b). Essa observação é corroborada pelos resultados de Scussel et al. (2014a) em castanha-do-Brasil. Em relação às espessuras das camadas ao longo da casca, como esperado, as faces (B, C e D) são mais finas do que a Face A e as Pontas 1-3 são mais finas do que a Ponta 4 (onde o micrópilo está localizado). A maioria das camadas da casca é marrom, apenas uma camada difere dessa cor (branco a creme claro), semelhante à castanha-do-Brasil com casca (Scussel et al. 2014a, b). Essa é a camada dos Cantos das faces, que é preenchida com estruturas espirais/tubulares e tem textura macia - localizada nos 3 Cantos das faces - a ser demonstrada a seguir por MEV (Seção 3.2).

Por outro lado, da metade da semente inteira (seção longitudinal), além de características de semente semelhantes (distribuição de camadas, espessuras e cores) observadas na seção transversal, também foi possível visualizar detalhes do canal abaixo do Canto das faces (ligação B, C e D) a partir da Ponta 4 dessas faces retas da semente, o local do lóculo (Figuras 4d). Essa cavidade se estende como um canal tubular dentro das 3 faces e junta, permitindo uma comunicação entre o ambiente externo da semente e o cotilédone interno da andiroba. Essa é a principal via para a umidade, insetos, ácaros, bactérias, fungos e/ou parasitas alcançarem e estragarem a parte interna da semente. Isso ocorre nos outros Cantos, porém, com um canal muito mais compacto.

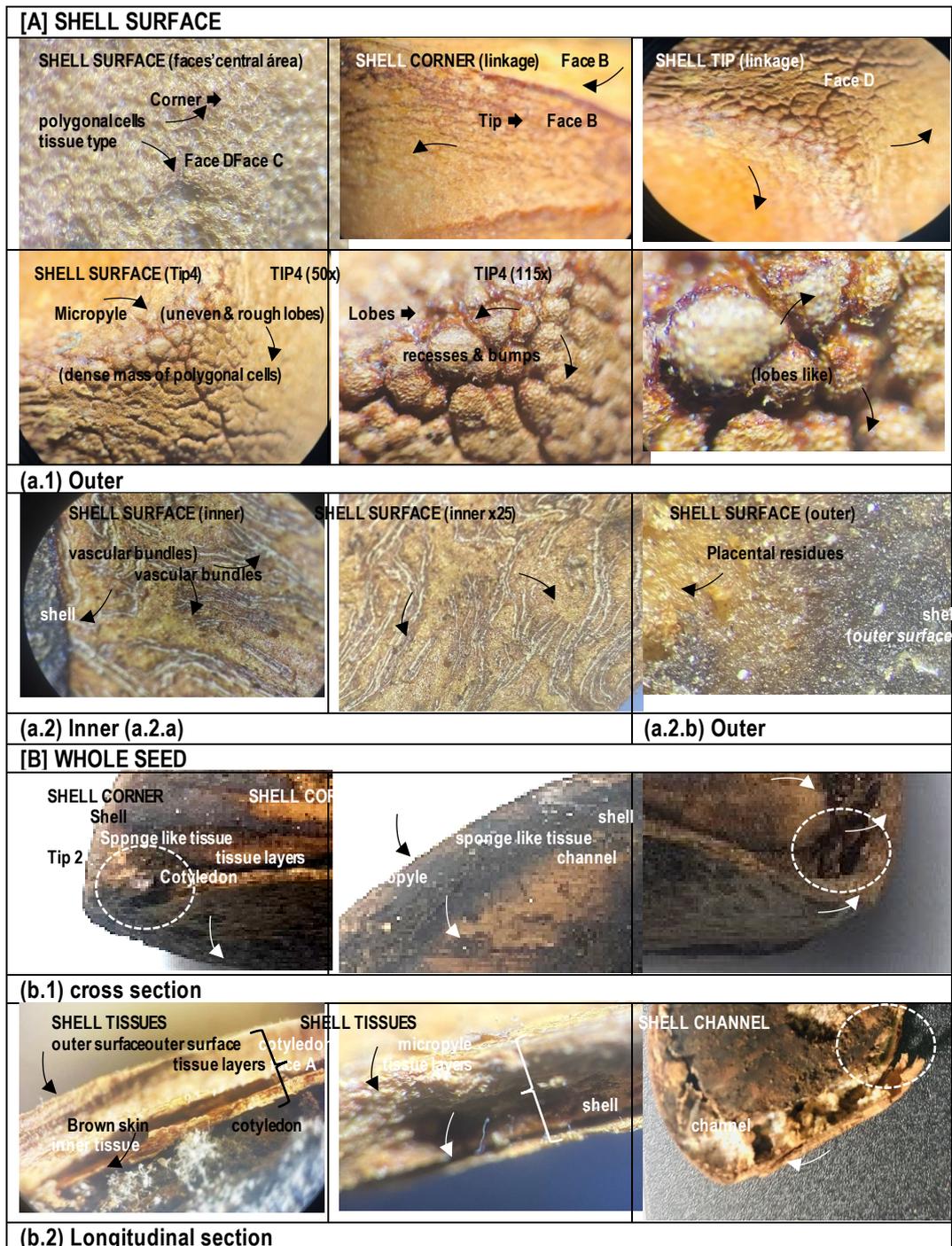
Figura 3 - Seção transversal da casca da semente de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.): visão geral das camadas de tecido [x100]



(b) Cotilédones: Como esperado, não foi possível detectar claramente por ME o número e os detalhes das camadas de tecido da semente, apesar das seções (transversais ou longitudinais) e da ampliação aplicada (Figuras 4b), nem os dois cotilédones ou a região do embrião, pois estão muito próximas uma da outra. Observação semelhante foi relatada também na semente de andiroba por Ferraz et al. (2002, 2003). Os cotilédones formam uma única massa de reserva, pois estão fundidos, tornando impossível perceber e separar as duas partes (Scussel et al. 2014a). O eixo embrionário é pequeno e está localizado dentro do tecido cotiledonar, próximo ao micrópilo (Ferraz et al. 2002). Embora os lipídios sejam encontrados em todo o cotilédone, estão em maior concentração próximo ao eixo embrionário e ao cotilédone (Carvalho & Nakagawa, 2000). Em relação à cor, o tecido dos cotilédones da semente apresenta uma cor branca a creme claro. Observação: apenas com a desidratação a longo prazo, os dois cotilédones podem se separar um do outro, produzindo um orifício/cavidade entre eles. Internamente, assim como a castanha-do-Brasil, a semente de andiroba possui tubos helicoidais (feixes vasculares primários de xilema e floema), que formam uma conexão de entrada entre o ambiente externo e o cotilédone, por meio de um canal cheio de feixes vasculares (sistema cambial) (Figura 4a.2.b). O canal (Figura 4b.2) que conecta o ambiente externo ao ambiente interno da semente

é preenchido com tecidos condutores / vasculares, cuja função é o transporte e distribuição de nutrientes e água para a semente, quando ainda está na árvore (Scussel et al. 2014a).

Figura 4 - Fotografias de microscopia estereoscópica das características da semente de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.): (A) casca (a.1) superfície - (externa) região central da face (células em forma de polígonos/hexágonos); posicionamento dos tecidos da casca e das Pontas, com tecidos nas junções (reentrâncias e protuberâncias (em forma de lóbulo) e (a.2) superfície (externa) com tecido placentário aderido à casca e (interna) superfície com feixes vasculares por toda a superfície. (B) semente inteira (b.1) camadas de tecido da semente - (seção transversal) semelhante a uma esponja, (b.2) seção longitudinal - camadas da casca, pele marrom e ligação com o cotilédone, canal do micrópilo [7,1 a 115 X]



### 2.3.2 DISTRIBUIÇÃO DAS CAMADAS TECIDUAIS DA SEMENTE DE ANDIROBA E CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS – MEV

(a) Casca: As características dos tecidos e células observadas tanto nas superfícies da casca (externa / interna e micrópilo) quanto através das seções transversais da casca (FACES, Cantos das Faces / Pontas / micrópilo) são mostradas nas Figuras 5-9. A maioria dos tecidos da casca é composta por células protetoras com parede espessa (esclerênquima e colênquima). Eles fornecem propriedades de suporte rígido e flexível às camadas da casca com um mecanismo de filtragem (células especiais). Eles atuam como um vaso de pressão, evitando a super expansão quando a água entra nas células porosas (Scussel et al. 2014a; Kreibish et al. 2017a). De fato, a morfologia externa da casca da semente fornece e regula a troca de gases e água entre a semente e o ambiente, servindo como proteção. (a.1) Superfícies da casca: a superfície externa ao longo de todas as Faces da semente (A/B/C/D) e o micrópilo (nas Pontas das Faces B,C & D) são mostrados como uma massa amorfa, cerosa (tecido fino) com células de forma poligonal, parede espessa, sem distinção clara/visível entre elas - a cutícula (Figuras 5a). Apesar disso, o relevo da superfície varia, ou seja, no centro das Faces é liso, e nos Cantos, as Pontas são onduladas e salientes (com saliências e reentrâncias) (Figuras 5b,c). Em relação à cavidade - um tegumento (o micrópilo), apresenta células de tecido de superfície semelhantes cobrindo a camada inferior (a ser vista na seção transversal). À medida que as Faces se ligam, formam um pequeno relevo (com várias saliências, semelhantes a lobos), terminando em um espaço de cavidade bastante fechado que mostra tubos helicoidais (feixes vasculares de xilema e floema) preenchendo parte dele (Seção 3.2.b) (Figuras 5c). Esta é a conexão de entrada entre o ambiente externo e o cotilédone através do canal preenchido de câmbio vascular. Por outro lado, à medida que a espessura das Faces (nos Cantos / Pontas) a superfície se torna altamente ondulada/irregular, apresentando protuberâncias semelhantes a lobos que produzem reentrâncias/vales profundos (onde conídios de fungos podem ficar presos) (Figura 7). No que diz respeito à superfície interna, as células têm forma mais delimitada com forma poligonal e uma fina camada de pele marrom aderida a ela. Feixes vasculares estão distribuídos por toda a superfície interna (Figura 7b). (a.2) Seção transversal da casca: conforme registrado com ME, a casca compreende principalmente quatro camadas de tecido nas Faces da semente, e o número aumenta à medida que se ligam umas às outras e formam os Cantos das Faces. Semelhante ao registrado para a castanha-do-Brasil (Scussel et al. 2014a,b). As camadas de células têm formas diferentes (Figura 5c). Os tecidos das Faces apresentam a 1ª camada (células longas com parede porosa espessa, a 2ª camada com células de forma globosa/hexagonal, também apresentando

poros - os plasmodesmos (Figura 8). Eles são especializados na comunicação célula a célula (através de canais microscópicos que atravessam as paredes celulares - possibilitando o transporte entre elas). A Figura 9 mostra cicatrizes de parede celular produzidas pelo descolamento das células uma das outras e/ou cavidades (depressões / áreas finas formadas quando a parede não se espessa mais). Por outro lado, nos Cantos das Faces - à medida que as camadas se espessam (para conferir alta resistência à casca para proteção do cotilédone), é possível ver a camada adicional de um tecido diferente (semelhante a uma esponja). É uma área com uma mistura de células de formas irregulares / disposição livre (principalmente de forma poligonal e longa) junto com feixes vasculares (estruturas em forma de hélice). É importante enfatizar que na junção das Faces B, C & D (o Canto mais largo que contém o lóculo), é possível visualizar o micrópilo e o canal com tecidos condutores / vasculares (transporte de água e nutrientes). Eles formam os feixes vasculares de protoxilema e floema (Figuras 7a.c).

(b) Cotilédones: como observado na Seção 3.1, não foi possível detectar claramente por ME o número e os detalhes das camadas de tecido da semente apesar das seções (transversais ou longitudinais) e da ampliação aplicada (Figuras 4b), nem dos dois cotilédones ou região do embrião, pois estão muito próximos um do outro. Os tecidos e células da parte do cotilédone da semente de andiroba, sob a testa marrom em secção transversal por ME, são mostrados na Figura 10. (b.1) Tecido do cotilédone: o tecido protetor é composto por uma camada de epiderme de uma série de células paliçádicas com parede espessa bi e tri arrançados com o diâmetro longo perpendicular a um plano mediano (Figura 10.a). (b.2) Tecido parenquimatoso: ao lado da epiderme, há duas grandes camadas de tecido com paredes finas, forma e tamanho irregulares, com células relativamente não especializadas (com corpos proteicos e de óleo) - os tecidos parenquimatosos de armazenamento. Eles compõem a maior parte do tecido de extração de óleo. As primeiras células parenquimatosas podem ter um potencial de atividades funcionais maior do que o armazenamento, pois são mais curtas e variam em largura com células de tamanho pequeno e parede um pouco mais espessa do que a segunda - o tecido parenquimatoso principal. Esse possui células maiores e mais globoides/poligonais, com paredes mais finas (que preenchem a maior parte dos cotilédones em direção ao centro da semente) (Figura 10.c). Os tecidos corticais e medulares, respectivamente. Entre as duas camadas parenquimatosas, há o pequeno anel de (b.3) tecido meristemático: camadas de células pequenas, uniformes em tamanho e longas em forma de chapéu - o tecido provascular (Figura 10.c). Ao longo deste, feixes vasculares rudimentares estão dispostos nos intervalos do tecido.

Figura 5 - Microscopia Eletrônica de Varredura da casca da Andiroba (*Carapa guianensis* L.) - superfícies: (externa) (A) Área principal das Faces com tecido (formas celulares poligonais/hexagonais), (B) Cantos e tecido das Pontas - (b.1) Irregular/áspero formando como lóbulos com vales profundos, (b.2) Resíduos placentários depositados entre e nos vales/dentro da superfície áspera da casca, (C) no tecido do tegumento - entrada do micrópilo [100-500X]

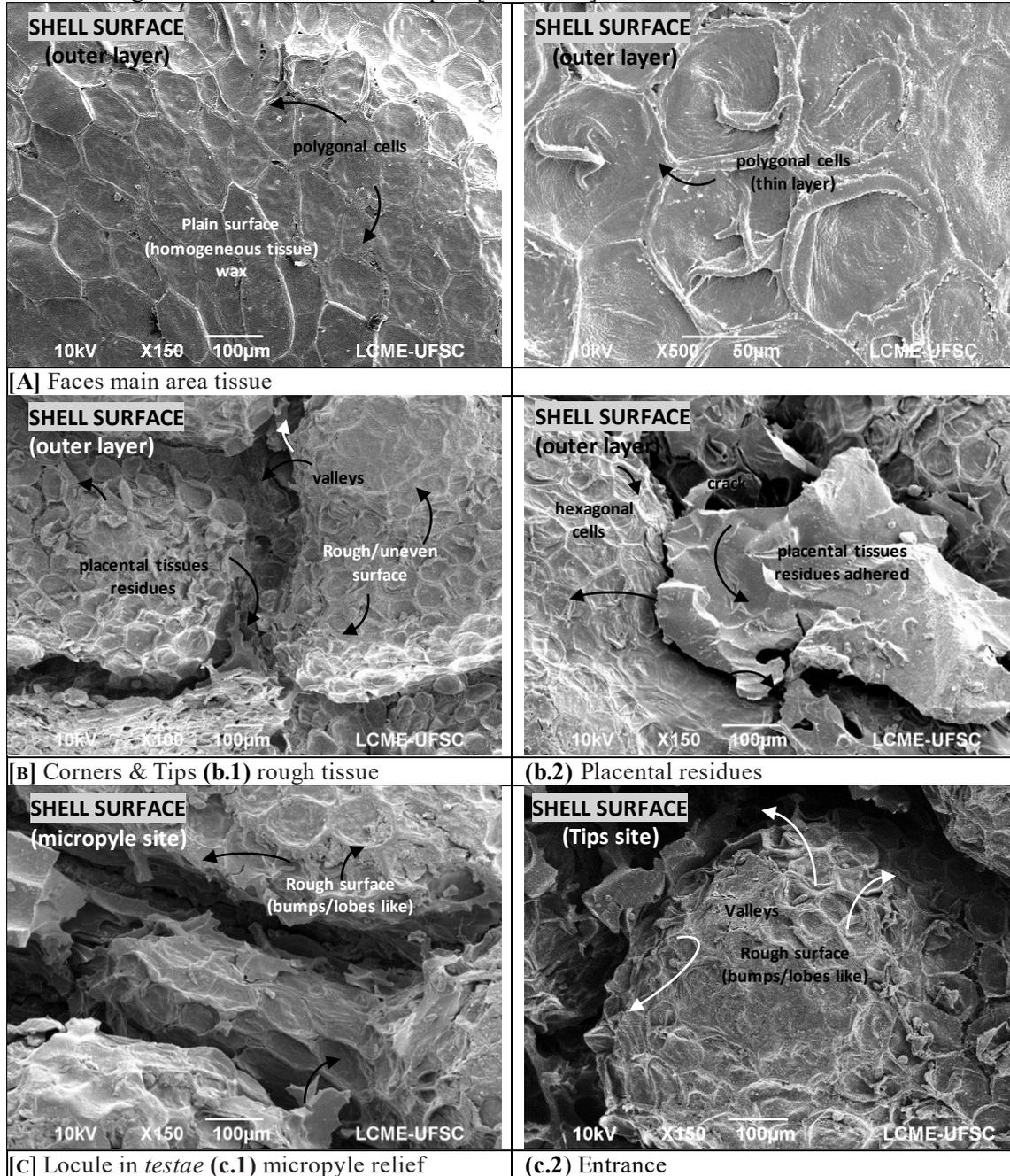


Figura 6 - Microscopia Eletrônica de Varredura da casa da Andiroba (*Carapa guianensis* L.) - Canto de ligação entre as Faces e micrópilo: (A) Ligação (a.1) do Canto entre duas Faces, (a.2) múltiplos tipos de células próximas às Pontas, (B) Tecido da superfície da ligação (b.2) células longas porosas em forma de longo; (C) Múltiplos tecidos nos Cantos (c.1) tecido de células poligonais e longas com resíduos placentários aderidos à superfície [150-900X]

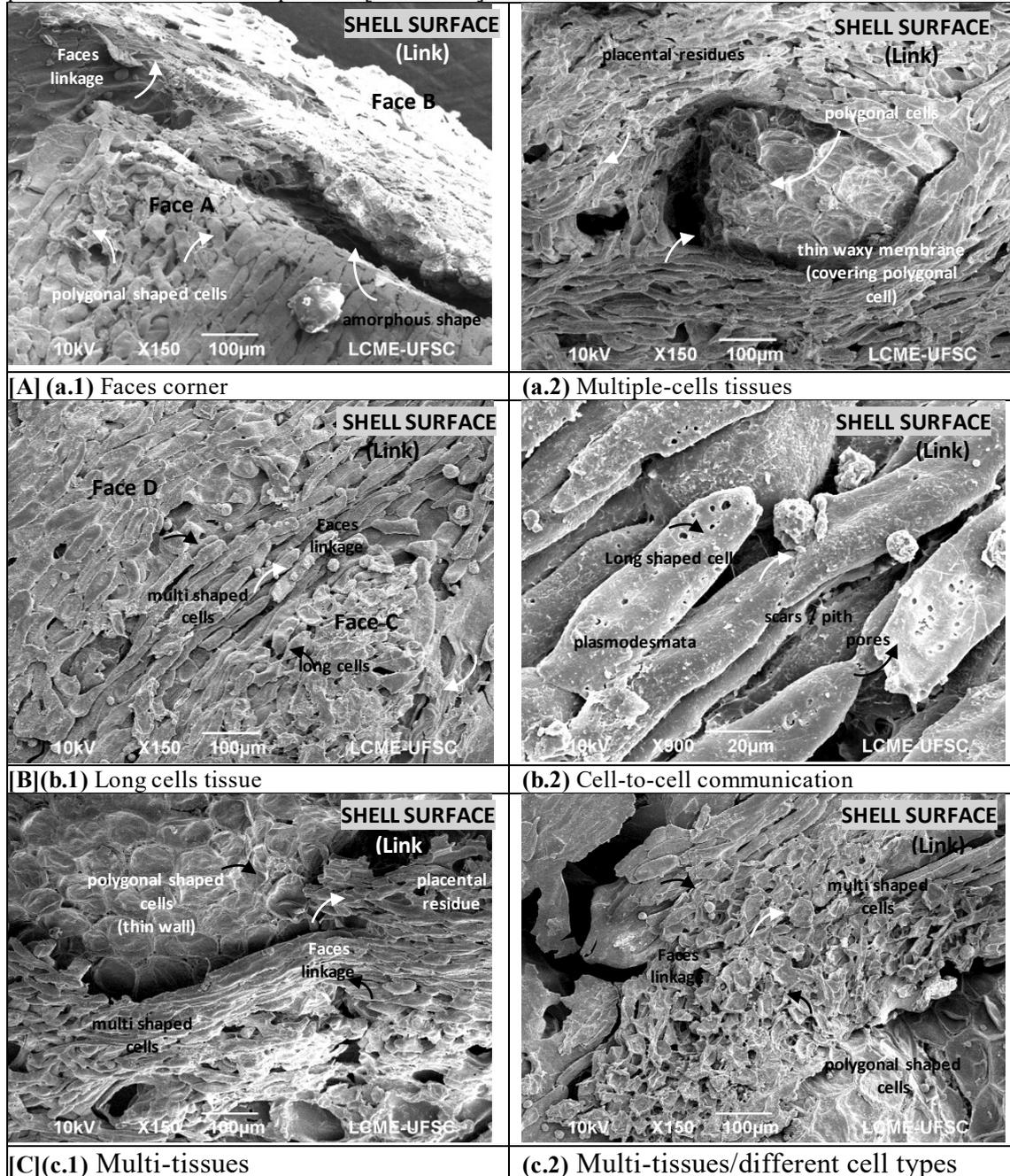


Figura 7 - Microscopia Eletrônica de Varredura da casca da Andiroba (*Carapa guianensis* L.) - conexão semente/pinha (seção transversal): (A) Micrópilo (a.1), micrópilo completo - vista interna, (a.2) feixes vasculares, (B) Tecido interno da casca, (b.1) células poligonais e longas, paredes espessas, (b.2) massa de células poligonais, (C) Sistema vascular (c.1) Sistema de vasos, (c.2) canal com tubos helicoidais e traqueídeos [150-900X]

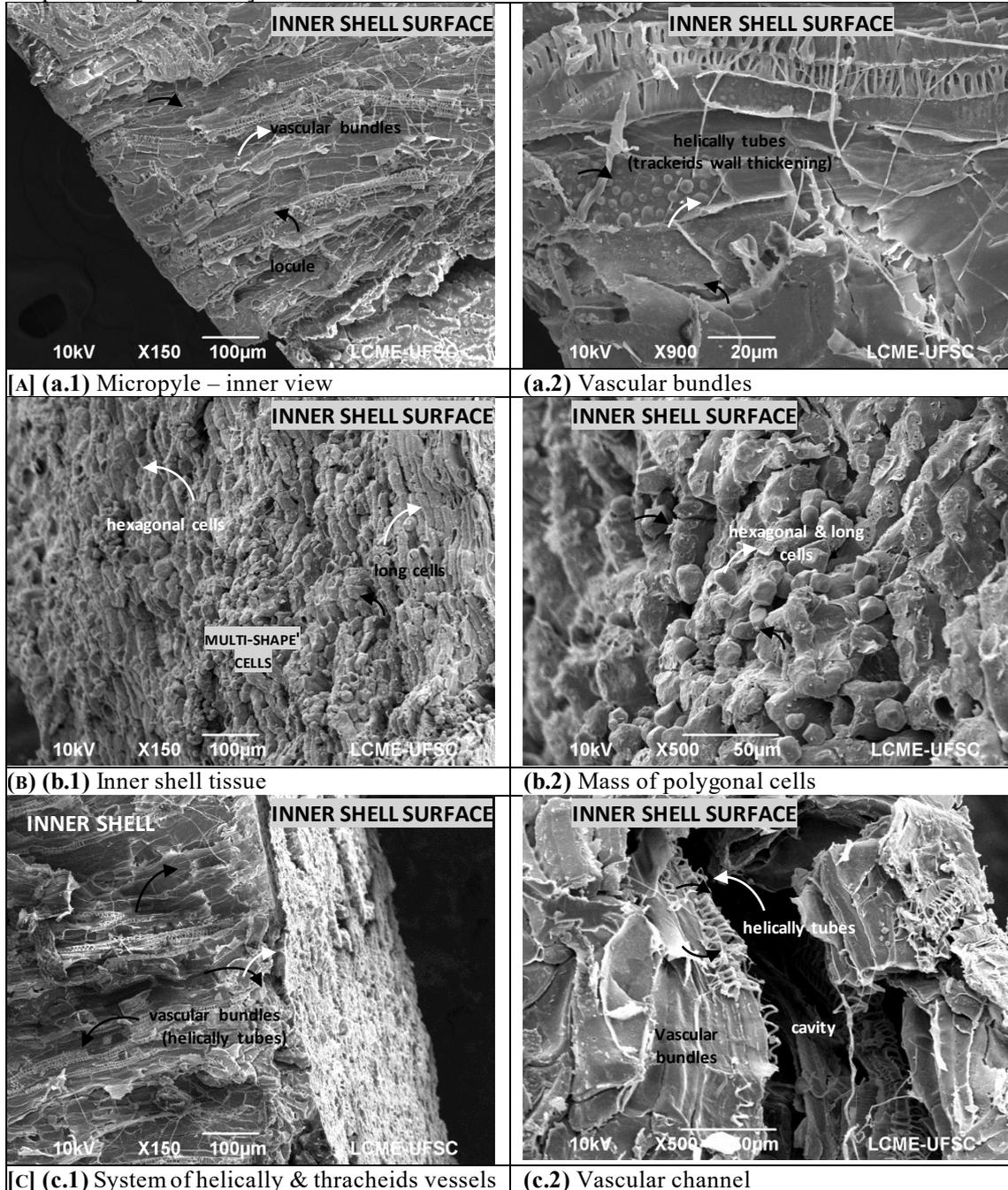


Figura 8 - Microscopia Eletrônica de Varredura da casca da Andiroba (*Carapa guianensis* L.) - (seção transversal): (A) Camadas (a.1) das superfícies externa para interna, (a.2) principais camadas da superfície, (B) células das camadas de tecido (b.1) com formas de células globulares e longas, paredes espessas (b.2) região com feixes vasculares ricos em tubos helicoidais, (C) plasmodesmos (c.1) tecido celular apresentando células globulares com poros e cicatrizes, (c.2) detalhes das camadas da parede celular [300-3000X]

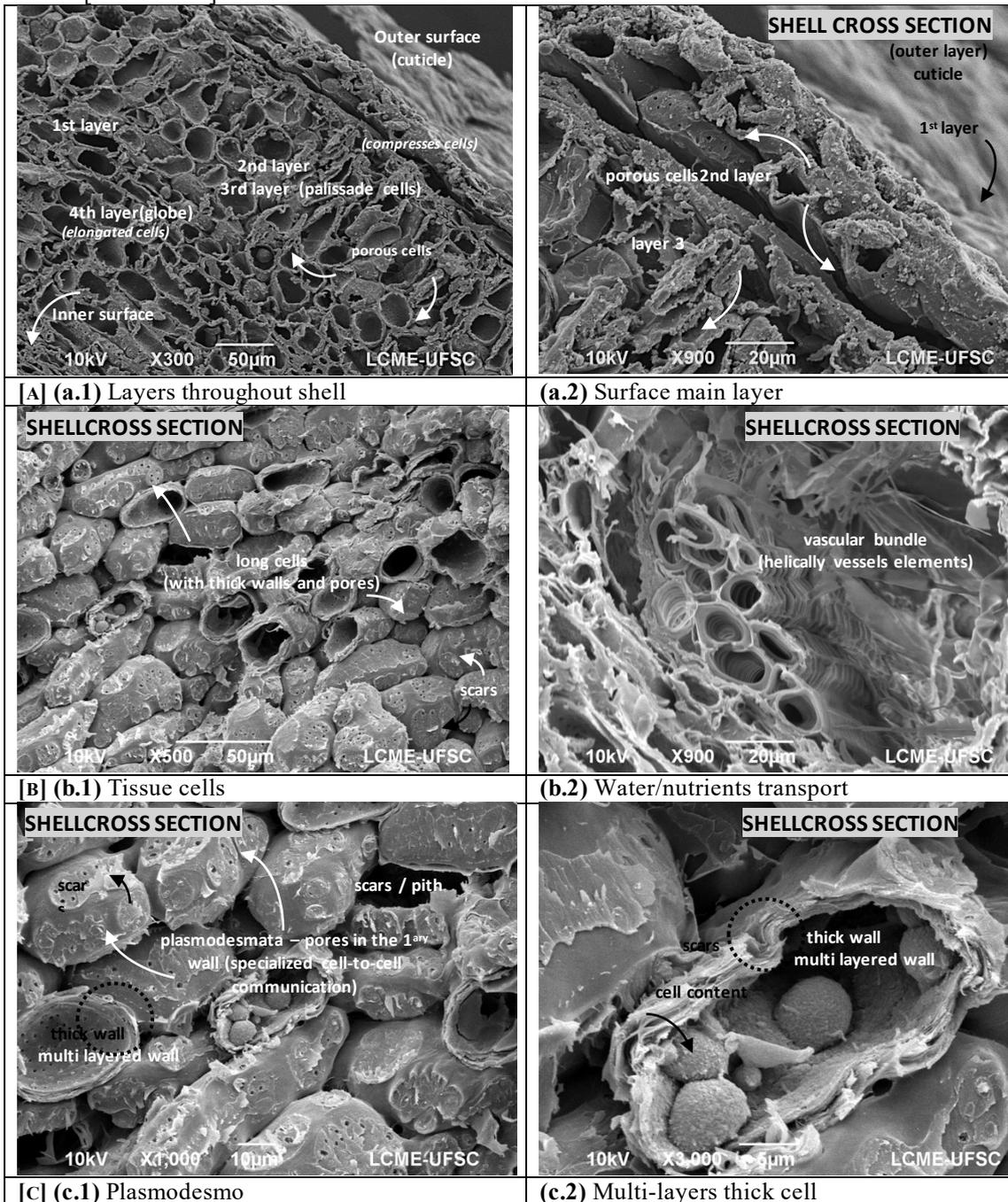


Figura 9 - Microscopia Eletrônica de Varredura da casca da Andiroba (*Carapa guianensis* L.) - características dos tecidos (forma/parede e plasmodesmo): (A) Tecido primário - tecido com formato de células globulares porosas, (B) Tecido secundário - tecido com formato de células longas porosas, (C) camadas de parede espessa com distribuição de poros [1000-4000 X]

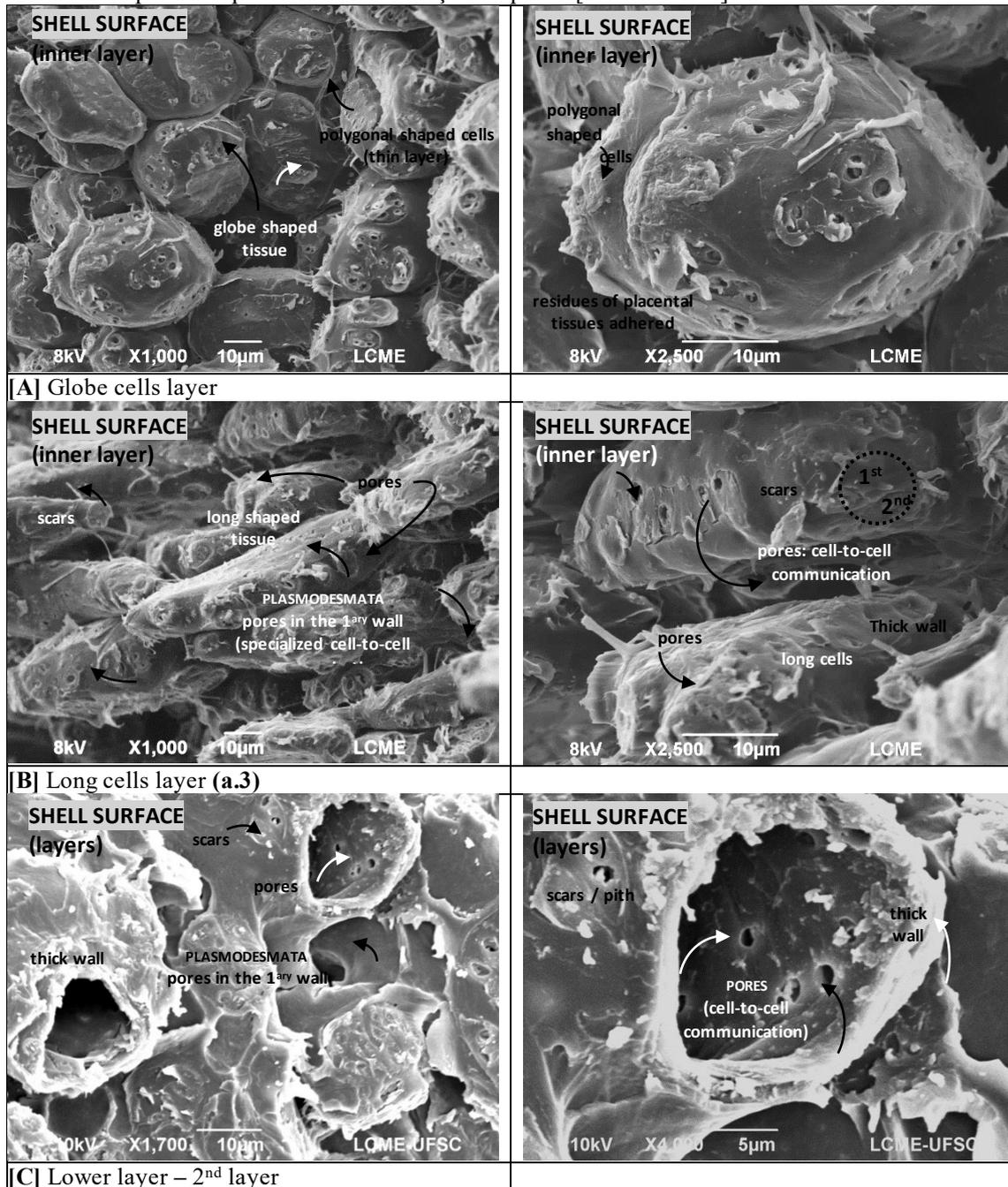
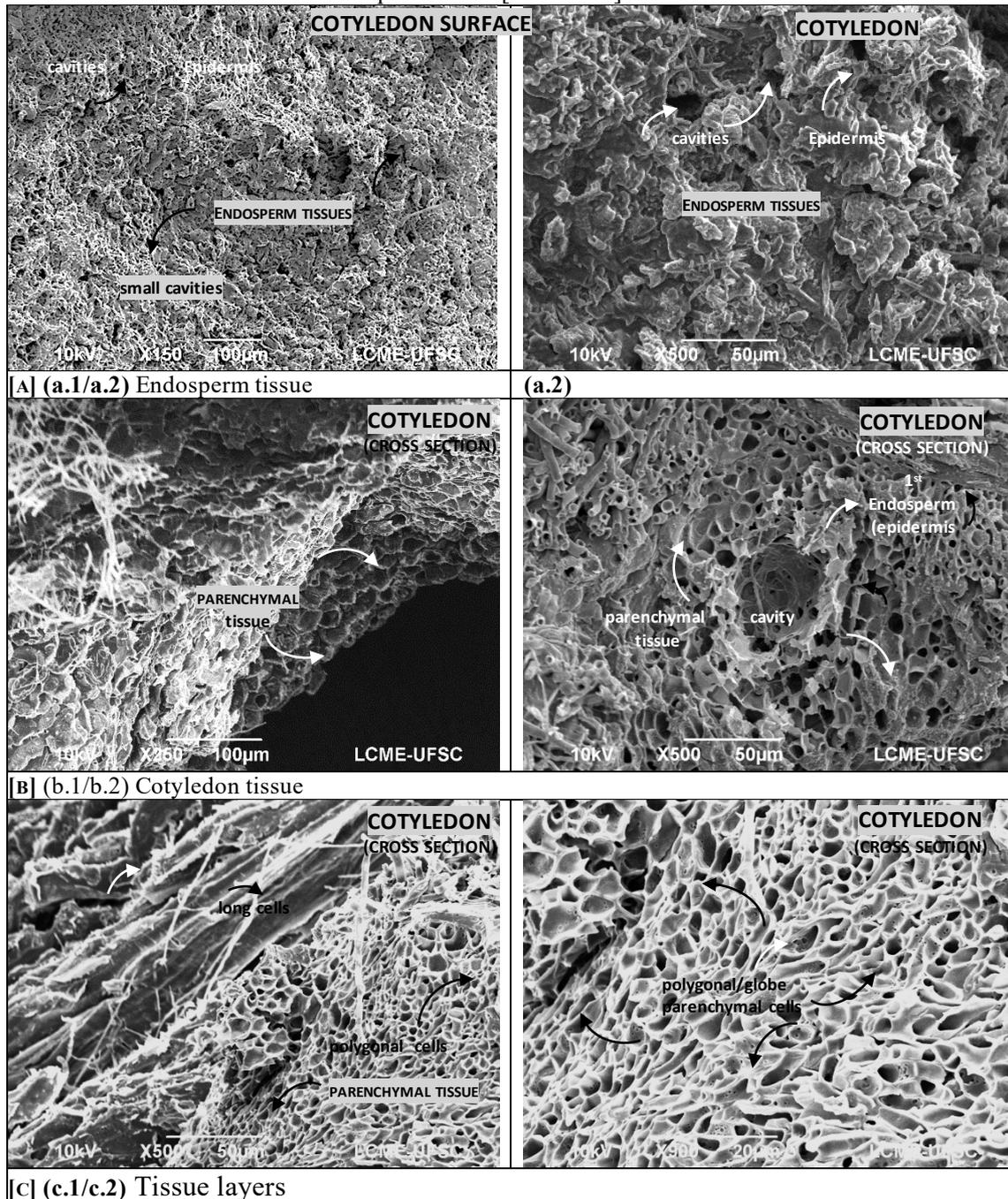


Figura 10 - Microscopia Eletrônica de Varredura do cotilédone da Andiroba (*Carapa guianensis* L.) - superfície e seção transversal: (A) cotilédone (a.1/a.2) tecido do cotilédone com cavidades (epiderme), (B) cotilédone e tecidos parenquimatosos, (b.1/b.2) formas de células poligonais/ arredondadas, (C) Camadas de tecido do cotilédone - parede fina [150-900X]



## 2.4 CONCLUSÃO

Através de MEV e MEV, este estudo forneceu informações sobre as estruturas morfo-histológicas das sementes de andiroba. As partes da semente são compostas por tecidos e células de diferentes formas e tamanhos.

A casca, uma estrutura de parede protetora espessa, rica em lignina, varia em camadas de tecido (tipo e número), com células (de forma poligonal e alongada, apresentando poros - os plasmodesmos). A junção superior das três Faces diferentes forma as Pontas (Pontas 1-4), sendo que a Ponta 4 é o local onde se encontra uma cavidade relativamente estreita - o micrópilo, rico em feixes vasculares. A partir dele, é formado um canal de intercâmbio (entre a casca e uma fina pele marrom).

O cotilédone da semente de andiroba (em cortes transversais e longitudinais) apresenta diferentes camadas de células (contendo gotículas de lipídios) distribuídas aleatoriamente. Algumas características da semente que podem permitir a deposição de conídios de fungos e/ou a entrada/absorção de umidade foram identificadas.

Ao conhecer as características morfo-histológicas da semente de andiroba, é possível descobrir suas suscetibilidades para prevenir e controlar tanto (a) a deterioração da matéria-prima quanto (b) a qualidade da extração do óleo. Assim, melhorando a vida útil a longo prazo.

Este é o primeiro estudo a mostrar as diferentes estruturas das células da semente de andiroba por MEV e MEV.

## REFERÊNCIAS

ARAGÃO, Dayse de Souza et al. Efeito do sombreamento na anatomia foliar de plantas jovens de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). **Revista Árvore**, v. 38, p. 631-639, 2014.

CAMARGO, José Luís Campana et al. Guia de Propágulos e Plântulas da Amazônia-Volume 1 (ISBN 978-85-211-0041-6). 2008.

CARVALHO, Nelson Moreira; NAKAGAWA, João. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 1983.

CORRÊA, J. F. V. et al. Boas práticas para o manejo e extração artesanal de óleo de andiroba, no Afuá, PA. 2020.

CRAWLEY, M. J.; GILLMAN, Michael P. Population dynamics of cinnabar moth and ragwort in grassland. **The Journal of Animal Ecology**, p. 1035-1050, 1989.

FERRARI, Márcio et al. Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro e in vivo de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 626-630, 2007.

FERRAZ, Isolde Dorothea Kossmann; CAMARGO, José Luís Campana; SAMPAIO, Paulo de Tarso Barbosa. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* DC): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta amazônica**, v. 32, p. 647-647, 2002.

GUARIGUATA, Manuel R.; ADAME, Jesús J. Rosales; FINEGAN, Bryan. Seed removal and fate in two selectively logged lowland forests with contrasting protection levels. **Conservation biology**, v. 14, n. 4, p. 1046-1054, 2000.

JORDÃO, Alexandre Luis. **Guia de pragas agrícolas: para manejo integrado no estado do Amapá**. Holos Editora, 2006.

KENFACK, David. A synoptic revision of Carapa (Meliaceae). **Harvard Papers in Botany**, v. 16, n. 2, p. 171-231, 2011.

KLAUCK, V. et al. In vitro repellent effect of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and andiroba (*Carapa guianensis*) oils on *Haemotobia irritans* and *Chrysomya megacephala* flies. 2015.

KREIBICH, H.H.; MOECKE, E.O.E.; SCUSSEL, V.M. Stereo and Scanning Electron Microscopy of Whole Post-Fermentation Dry Cocoa (*Theobroma cacao* L.): Part one – Healthy Beans. **Microscopy and Imaging Science: Practical Approaches to Applied Research and Education**; Microscopy Book Series, Méndez-Vilas, A., ed., Badajoz, Spain, 337-347, 2017a.

KREIBICH, H.H.; MOECKE, E.O. E.; SCUSSEL, V.M. Stereo and scanning electron microscopy of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.): Part two - fungi spoilage susceptibility. **Microscopy and Imaging Science: Practical Approaches to Applied Research and Education**; Microscopy Book Series, Méndez-Vilas, A. ed., Badajoz, Spain, (7), 329-336, 2017b.

LORENZI, Harri et al. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 1992.

MANFIO, Daniel; RODRIGUES, Manuel NF; SAVI, Geovana D. Brazil Nut (*Bertholettia excelsa* HBK) Selenium Distribution and Physical Chemical Characteristics of Shell, Brown Skin and Edible Part from Two Amazon Regions. **Asian Journal of Agriculture and Rural Development**, v. 2, n. 2, p. 287-293, 2012.

MATOS, Robert S. et al. Correlating structure and morphology of andiroba leaf (*Carapa guianensis* Aubl.) by microscopy and fractal theory analyses. **Applied Sciences**, v. 11, n. 13, p. 5848, 2021.

MCHARGUE, L. A.; HARTSHORN, G. S. Seed and seedling ecology of *Carapa guianensis*. **Turrialba**, v. 33, n. 4, p. 399-404, 1983.

MENDONÇA, Andreza P.; FERRAZ, Isolde Dorothea Kossmann. Óleo de andiroba: processo tradicional da extração, uso e aspectos sociais no estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 37, p. 353-364, 2007.

MORAES, Eurico A. et al. Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 229-236, 2010.

PEREIRA, Tiago B. et al. In vitro and in vivo anti-malarial activity of limonoids isolated from the residual seed biomass from *Carapa guianensis* (andiroba) oil production. **Malaria Journal**, v. 13, p. 1-8, 2014.

PINTO, Adriana Araujo. Avaliação de danos causados por insetos em sementes de Andiroba [(*Carapa guianensis* Aubl.) e Andirobinha (*C. procera* DC.)(Meliaceae)] na Reserva Florestal Adolpho Ducke em Manaus, AM, Brasil. 2007.

PLOWDEN, Campbell. The ecology and harvest of andiroba seeds for oil production in the Brazilian Amazon. **Conservation and Society**, v. 2, n. 2, p. 251-272, 2004.

SANTOS, Rodrigo Souza; PELLICCIOTTI, André Schatz. Ocorrência de *Hypsipyla ferrealis* Hampson (Lepidoptera: Pyralidae) em andiroba no estado do Acre. **Ciência Florestal**, v. 26, p. 995-998, 2016.

SCUSSEL, Vildes M. et al. Stereoscopy and scanning electron microscopy of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) Shell, brown skin, and edible part: part one—healthy nut. **Journal of food science**, v. 79, n. 7, p. H1443-H1453, 2014a.

SCUSSEL, Vildes M. et al. Stereo and Scanning Electron Microscopy of In-Shell Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* HBK): Part Two—Surface Sound Nut Fungi Spoilage Susceptibility. **Journal of food science**, v. 79, n. 11, p. H2392-H2403, 2014b.

SEGOVIA, J.F.O.; OLIVEIRA, V.L.; GONÇALVES, M.C.A.; RESCK, I.S.; SILVA, C.A.M.; SILVEIRA, D.; KANZAKI, L.I.B. Botanical characterisation, geographical distribution and phytochemistry analysis of *Manilkara Huberi* (Ducke) stanhl autochthonous in Amapá State, Brazil. **Embrapa Amapá-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2012.

SILVA, Bruna A. da et al. Effect of Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) oil for fungi control in maize (*Zea mays* L.) grains. **J. Agric. Vet. Sci.**, 2019.

SILVA, B. A.; SCUSSEL, V. M. Characteristics and Effects of the Amazonian Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) Oil Against Living Organisms—A Review. **IOSR J. Biotechnol. Biochem.(IOSR-JBB)**, v. 6, p. 31-47, 2020.

SOUSA, Sara Freitas et al. Análise física e avaliação do efeito antifúngico dos óleos de andiroba, copaíba e pinhão-mansão. **Floresta**, v. 48, n. 2, p. 153-162, 2018.

TSUKAMOTO, Yuuta et al. Guianofruits C-I from fruit oil of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae). **Tetrahedron**, v. 75, n. 9, p. 1149-1156, 2019.

### **CAPÍTULO 3**

#### **CARACTERIZAÇÃO DA SEMENTE DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl.) AMAZÔNICA POR MICROSCOPIAS ESTEREOSCÓPICA E ELETRÔNICA DE VARREDURA: LOCAIS DE SUSCETIBILIDADE À DETERIORAÇÃO POR FUNGOS**

Parte das informações fornecidas no 3º Capítulo da Tese foram aceitas para publicação em:  
Silva, B. A.; Scussel, V. M.; Tribuzi, G. Stereo and Scanning Electron Microscopy of the  
Amazonian *Andiroba* (*Carapa guianensis* Aubl.) seed: Fungi Spoilage Susceptibility Sites.  
Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana, janeiro 2024 – em Anexo.

## RESUMO

A andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), uma semente amazônica rica em óleo, teve seus locais morfo-histológicos suscetíveis à proliferação de organismos vivos investigados por microscopia estereoscópica (ME) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi registrado que a casca, ao longo de seus tecidos, apresenta características que proporcionam condições para a proliferação de fungos, levando à deterioração da semente (externa/interna). Foram identificados, além dos resíduos placentários (substrato altamente hidrofílico e rico em nutrientes); como sendo o relevo irregular da superfície da casca, incluindo microfissuras (levando à captura de conídios/absorção de umidade); o micrópilo e o canal interno (interconexão do ambiente externo com a semente interna); a porosidade das células (membranas porosas de várias camadas - a troca de nutrientes e água entre as células vizinhas - plasmodesmo); e os Cantos das Faces da semente (mistura de feixes vasculares e tecido mole). Em relação aos locais de suscetibilidade à deterioração da semente, eles estão principalmente na área de contato da superfície da semente com a casca (seja no micrópilo, fissuras, o canal e/ou Cantos das Faces). Todos eles levam à entrada de organismos vivos que visam os tecidos ricos em nutrientes do parênquima da semente. Uma variedade de micélios com seus conídios foram registrados e mostrados por meio de micrografias de MEV, incluindo danos à casca de insetos (vetor das estruturas reprodutivas de fungos). Para prevenir/controlar a deterioração, além da melhoria na coleta de sementes na floresta (evitando danos e contato/infecção por organismos vivos), procedimentos de controle de umidade devem ser aplicados (ao longo do transporte por barco pelos rios amazônicos e seus afluentes até a fábrica), entre outros. Assim, reduzindo as perdas de matéria-prima para extração de óleo de andiroba e melhorando a qualidade do produto final.

**Palavras-Chave:** *crabwood*; *roba-mahogany*; Andiroba; deterioração; fungo; contaminação

### 3.1 INTRODUÇÃO

A Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) é uma espécie nativa da família *Meliaceae* da região Amazônica. Também chamada de caranguejo, tem importante função socioeconômica devido às diversas aplicações (madeira/casca/folha/sementes) para a população indígena. Sua semente possui um dos óleos mais curativos conhecidos naquela região (Silva, Scussel, 2020).

As propriedades e aplicações do Óleo de Andiroba variam desde a inativação de organismos vivos até propriedades saudáveis (Moraes et al. 2010; Pereira et al. 2014; Klauk et al. 2015; Sousa et al. 2018; Tsukamoto et al. 2019).

A floresta amazônica possui clima de alta umidade (80% de umidade relativa) e temperaturas (40 °C), além de períodos chuvosos. Estas circunstâncias contribuem para a reprodução natural de fungos e outros organismos vivos, como cupins, moscas, brocas, mariposas, entre outros insetos (Segovia et al. 2011). Quando ainda estão nas árvores, os frutos da Andiroba são alvo de ataques de pássaros, insetos, macacos e roedores que podem deixar inóculo microbiano (fezes, regurgitação, saliva e até mesmo do solo) (Almeida et al. 2009).

Após o ouriço cair no solo úmido, as válvulas começam a abrir no momento da coleta das sementes. Eles estão cobertos de umidade, poeira e matéria sólida. Chegando à fábrica, as sementes são limpas, secas e armazenadas (Silva, Scussel, 2020). Durante a desidratação, a micrópila das sementes, conexão ouriço/válvulas à semente, torna-se mais oca, facilitando a interferência de contaminações externas. Ele e seu canal (micrópila para a semente interna) são a principal entrada para microrganismos e umidade nas sementes (Scussel et al. 2014b).

Foram publicados relatórios sobre a deterioração das sementes (matéria-prima) e a redução da qualidade do óleo (produto final), que levam a perdas econômicas para a indústria do Óleo de Andiroba (Crawley e Gillman, 1989; Pinto, 2013). Porém, faltam estudos sobre a morfo-histologia da semente inteira no que diz respeito às partes suscetíveis à deterioração. Apesar disso, no que diz respeito à deterioração, existem poucos estudos publicados sobre insetos (Pinto et al. 2013). Portanto, há necessidade de conhecer e compreender a suscetibilidade das sementes a infecções fúngicas que interferem diretamente na qualidade do óleo e reduzem a aceitabilidade da matéria-prima das sementes pelas fábricas e demais indústrias de derivados de petróleo.

Devido à falta de informações sobre a deterioração dos fungos na semente de Andiroba que possam ajudar a desenvolver métodos de prevenção e controle, este trabalho investigou seus locais morfo-histológicos suscetíveis e características dos tecidos através da aplicação de microscopias estereoscópicas (ME) e eletrônica de varredura (MEV). Micélios e estruturas reprodutivas em partes selecionadas de sementes deterioradas também serão relatadas.

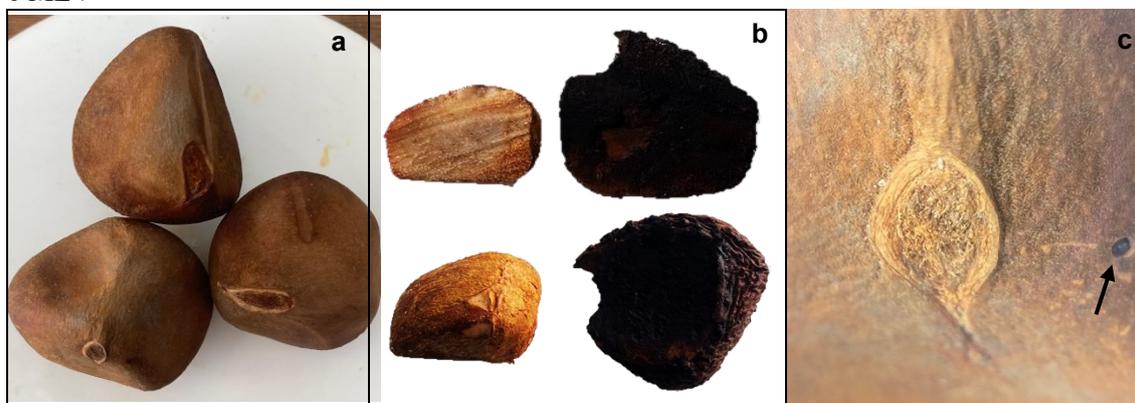
## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 MATERIAL**

### 3.2.1.1 Amostra

Sementes selecionadas de Andiroba com casca (350 g), sãs e deterioradas, obtidas na cidade de Belém, Pará, Região Norte do Brasil (Figura 1).

Figura 1 - Amostras de sementes de Andiroba (*Carapa guainensis* Aubl.): (a) sementes saudáveis (com casca), (b) sementes deterioradas (com casca) e (c) sementes atacadas por inseto/broca para análise ME e MEV



(a) Semente saudável inteira

(b) Semente deteriorada inteira

(c) Ataque de inseto no micrópilo

### 3.2.1.2 Equipamentos

Máquina de folheamento de ouro, modelo EM-Scd500, Leica (Leider, III., EUA), estéreo microscópio, modelo OPTZTS, Opticam (Tóquio, Kt., Japão) [180x] e microscópio eletrônico de varredura, modelo JSM-6390LV, Jeol (Peabody, Mass., EUA) [7000x].

### 3.2.1.3 Outros materiais

Formaldeído e etanol, grau analar, Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil); stubs (pequenos blocos metálicos, 9 mm de diâmetro e 10 mm de altura), Leica (Leider, III., EUA); bisturi de aço inoxidável, GS Mtronix (SP, Brasil); Captura de imagem SM software, modelo OPTHD 14000, Opticam Microscopy Technology (Doral, Fl., EUA); fita de carbono dupla face, Electron Microscopy Sciences (Leider, Illinois, EUA), serra, Ticotico (São Paulo, SP, Brasil); pinças, aço inoxidável.

## 3.2.2 MÉTODOS

### 3.2.2.1 Preparo da Amostra

As sementes de Andiroba com casca saudáveis selecionadas e deterioradas (após desidratadas e desengorduradas) foram seccionadas em metades (inteiras), fatias (casca/comestível) e pequenos cubos (superfície da casca, micrópila e regiões do canal) para Investigação em ME e SEM (locais de vulnerabilidade para entrada de organismos vivos, deterioração de tecidos afetados, características especiais de camadas/membranas de paredes celulares para absorção de umidade) conforme relatado por Scussel et al. (2014a).

### **3.2.2.2 Microscopia Estereoscópica - ME**

As sementes com casca foram seccionadas em metades (seções transversais e longitudinais - Plano 1 e Plano 2, respectivamente) por meio de uma serra fina - Figura 2. Além disso, a superfície das partes de Andiroba, deterioradas por fungos, foram cortados em pequenas porções (Scussel et al. 2014a).

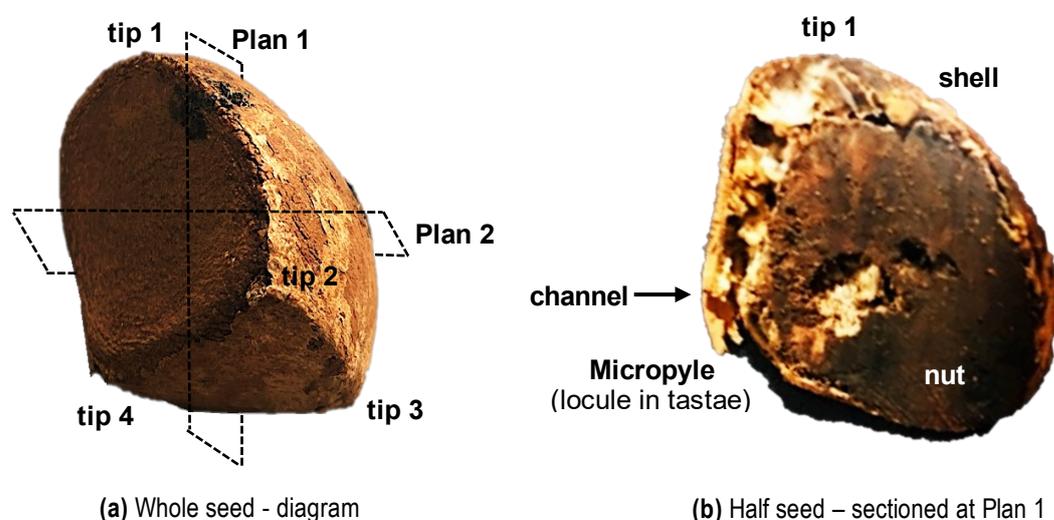
A superfície e as metades de cada semente de Andiroba (saudável e deteriorada) (seções Plano 1 e 2) foram observadas em estereoscópio [de 7,1 a 115x] para determinar a localização de cada estrutura (em casca, película interna e cotilédones) quanto à suscetibilidade a fungos (entrada/conídios). As micrografias foram salvas usando o software SM-Image-Capture. As partes selecionadas das sementes deterioradas (superfícies externa e interna) tiveram suas colônias de fungos registradas para posterior elucidação das características dos fungos (estruturas reprodutivas / micélios) (Scussel et al. 2014a).

### **3.2.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV**

Casca e cotilédones foram fatiados e cortados em pequenos cubos (em torno de 3,0 mm) com bisturi (Manfio et al. 2012a). Todo procedimento foi realizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

A montagem dos stubs das amostras foi realizada conforme relatado por Scussel et al (2012a). Resumidamente, cubos de sementes de Andiroba foram fixados nos stubs contendo fita dupla-face de carbono e revestidos com ouro a vácuo - colocando-os no porta stubs do Planetary Gold Coater, aplicados a vácuo e depois revestidos com uma camada de ouro de 40 nm. Cada área de interesse de cada amostra foi escaneada e suas características morfo-histológicas suscetíveis de colônias de fungos e suas estruturas observadas e registradas em diferentes ampliações [até 7000x].

Figura 2 - Preparação de sementes (com casca) de Andiroba (*Carapa guainensis* Aubl.) para observação em Microscopia Estereoscópica e Eletrônica de Varredura: (a) inteira - diagrama do procedimento de secção das partes (seções longitudinais e transversais, Planos 1 e 2, respectivamente) e (b) meia semente secionada no Plano 1 evidenciando canal de intercomunicação e fungos cotiledonares deteriorados



### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das superfícies e fatias das sementes inteiras de andiroba, tanto as deterioradas por fungos quanto as saudáveis, obtidas para observação morfo-histológica (ME & MEV), foi possível identificar várias características da casca que são suscetíveis à deterioração do tecido da semente (rico em óleo), o que pode afetar a disponibilidade da matéria-prima e, conseqüentemente, a qualidade do óleo produzido. Essas características incluíram principalmente os resíduos placentários remanescentes, características específicas da morfologia da casca, como uma superfície rachada, e a porosidade das células de suas camadas internas. Quanto aos cotilédones, a principal suscetibilidade foi observada em sua superfície externa, que entra em contato com o sistema de intercomunicação contaminado (do lóculo para o canal). As Figuras 3, 4 e 5 ilustram os principais locais morfo-histológicos suscetíveis de sementes de andiroba tanto saudáveis quanto deterioradas, bem como os tecidos de fungos (micélio/hifas/estruturas reprodutivas), conforme observado por meio de ambas as técnicas de microscopia.

#### 3.3.1 MEV SEMENTES DE ANDIROBA: LOCAIS SUSCETÍVEIS À DETERIORAÇÃO

As características relacionadas às estruturas da semente que permitem a proliferação de organismos vivos e a absorção de umidade nos tecidos parenquimatosos internos da semente foram identificadas da seguinte forma:

(a) Resíduos placentários: Esses tecidos altamente hidrofílicos e ricos em nutrientes permanecem na casca da semente após a sua separação/extração das válvulas do ouriço. Eles servem como substrato para a proliferação de organismos vivos, como fungos e bactérias, e podem atrair insetos. Os tecidos placentários se acumulam na superfície irregular da casca, especialmente ao redor de saliências e vales, tornando-se uma concentração ideal de alimento para os microorganismos crescerem.

(b) Casca: Além das características da superfície, a casca contém tecidos com camadas celulares que facilitam a absorção de umidade para a semente interna. A superfície da casca apresenta um relevo irregular, que varia de áreas relativamente lisas a regiões com saliências, principalmente nos Cantos e Pontas, permitindo a absorção de umidade e concentração de conídios. Rachaduras, que ocorrem durante a queda das vagens, e micro-rachaduras, que se desenvolvem durante a desidratação, também contribuem para as condições de deterioração.

(b.2) Tegumento e canal: O micrópilo, localizado na junção de três Faces no Ponto4, serve como o umbigo da semente ou cavidade formada durante a separação da semente das vagens. Permite o primeiro contato entre a semente e o ambiente externo e está conectado ao canal da semente, facilitando o transporte de água e nutrientes por toda a semente interna. (b.3) Porosidade das paredes celulares: Os tecidos da casca exibem membranas porosas de múltiplas camadas ricas em plasmodesmos, canais microscópicos que atravessam as paredes celulares e permitem a troca de água e nutrientes entre células adjacentes. (b.4) Tecido macio: Uma mistura de células redondas/poligonais macias e soltas e feixes vasculares (em forma de hélice e traqueídeos), concentrados nas ligações das Faces (Cantos), são responsáveis pela distribuição de nutrientes e água para a semente. Eles também podem facilitar a proliferação de esporos de fungos, ao aprisioná-los nos tecidos esponjosos e úmidos.

(c) Cotilédone: Os locais suscetíveis à deterioração do embrião da semente (que possui duas cotilédones) estão localizados principalmente onde a superfície interna da casca se conecta. Isso ocorre primeiro na área mais próxima ao micrópilo da casca, depois no canal e através dos tubos

helicoidais nos Cantos. Em seguida, a deterioração atinge os tecidos parenquimatosos ricos em nutrientes, transportando organismos e umidade para as estruturas internas da semente.

Figura 3 - Microscopia Estereoscópica da semente de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) - locais suscetíveis versus contaminação por fungos: (A) casca - (a.1) resíduos placentários com colônias de fungos aderidas e relevo da superfície; (a.2) camadas, rachaduras e superfície mofada; (a.3) micrópilo com local do hilo; (a.4) infestação e danos causados por insetos com infecção por fungos; (a.5) camada placentária espessa. (B) semente inteira (corte transversal) - (b.1) tecido mole rico em nutrientes nos Cantos; (b.2) infecção por fungos no tecido mole e região do micrópilo (deterioração da semente); (b.3) danos na casca causados por brocas de insetos e infecção por fungos [7,1 a 110X]

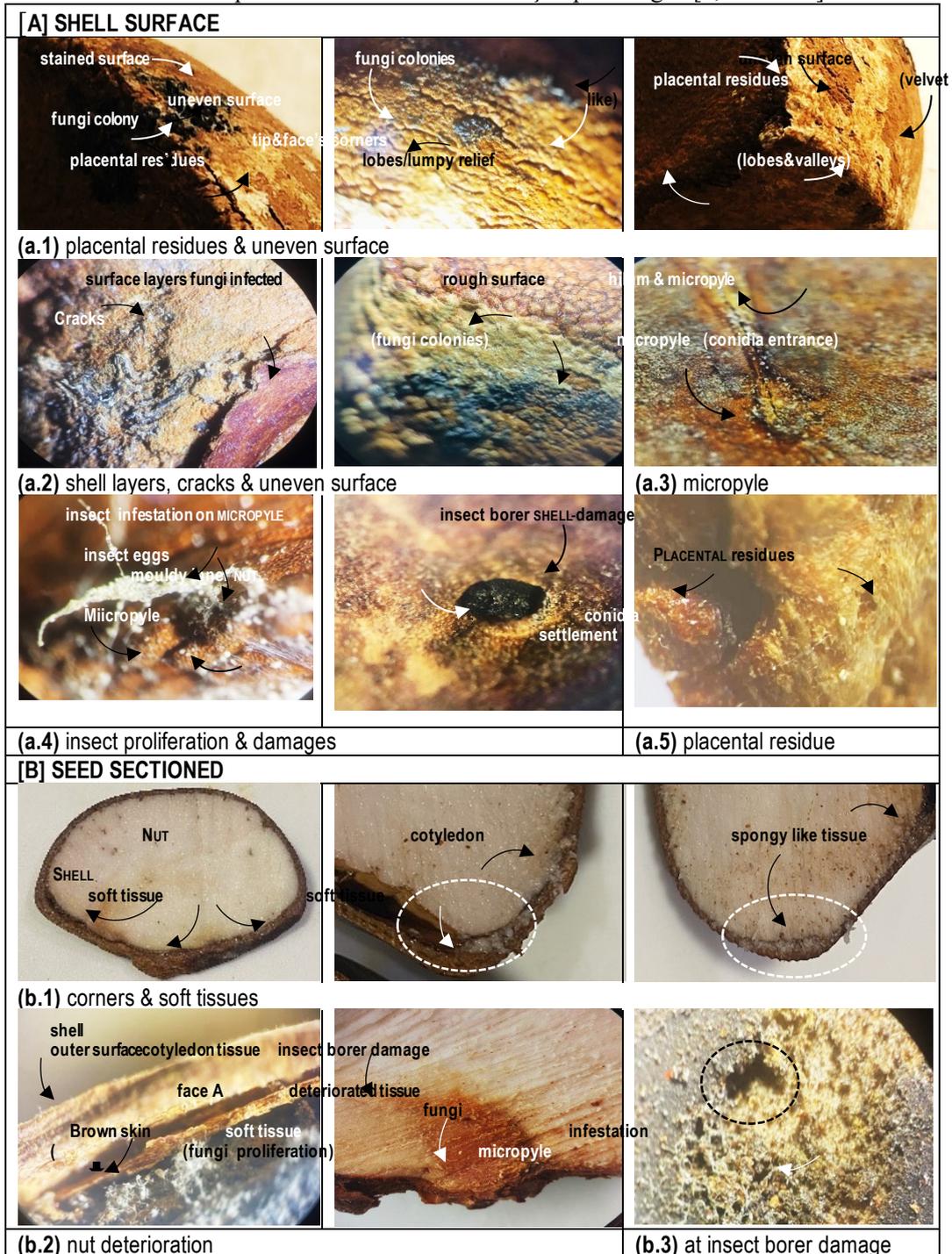
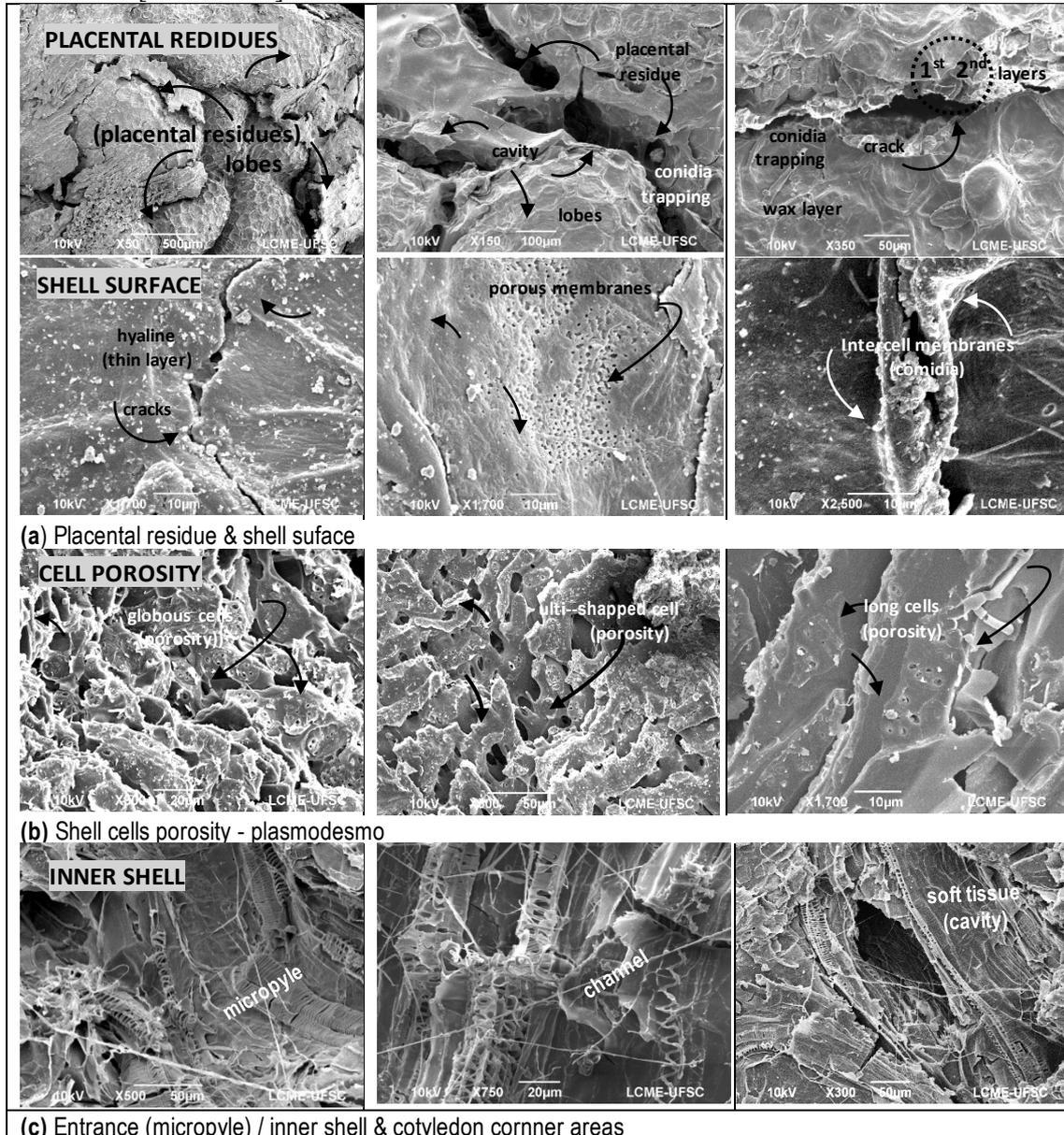


Figura 4 - Microscopia Eletrônica de Varredura de sementes de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) saudáveis - locais suscetíveis: (a) resíduos placentários e superfície da casca, (b) diferentes formas celulares, porosidade das paredes celulares - plasmodesmo, (c) entrada (micrópilo) / casca interna e áreas dos Cantos [50 a 2500X]



### 3.3.2 INFECÇÃO POR FUNGOS EM SEMENTES DE ANDIROBA DETERIORADAS

Quanto às sementes deterioradas, os principais sinais da presença de fungos (além dos tecidos visivelmente deteriorados) são a alteração na cor e na textura da superfície. Dependendo da intensidade da infecção e da extensão da área afetada, colônias de fungos com seus micélios e estruturas reprodutivas podem ser observadas, permitindo a identificação de gêneros e espécies. Isso pode ser alcançado pela visualização direta de sua morfologia por microscopia (SM / luz / SEM) e/ou por meio de testes micológicos (Scussel et al. 2014a; Savi, Scussel, 2015). Dependendo dos gêneros e espécies isolados, micotoxinas podem ser produzidas.

No estudo atual, utilizando as sementes de andiroba deterioradas selecionadas, foi possível registrar uma variedade bastante ampla de colônias de fungos formadas nos locais suscetíveis (Seção 3.1). Detalhes dos micélios de fungos na andiroba deteriorada que se espalham mais profundamente nos tecidos (da casca para a semente) são mostrados através de micrografias SEM nas Figuras 5,6, com a diversidade de infecção de micélios (hifas e estruturas reprodutivas) em todo o tecido da semente. A Figura 6(a,b) mostra uma visão mais próxima das estruturas reprodutivas, onde é possível observar diferenças nas formas, superfícies e tamanhos das conídias. Os esporângios e esporangióforos de *Rhizopus* spp. e/ou *Mucor* spp. são vistos escondidos em locais como vales de rachaduras na casca e nos resíduos placentários com suas formas características. Superfícies especiais de conídias ásperas e lisas e tamanhos relativamente pequenos (500, 7000X) são algumas das especificidades que permitem a identificação. Nenhum gênero/espécie de fungo isolado no estudo atual foi identificado como cepas toxigênicas, portanto, não há possibilidade de contaminação por micotoxinas. Se as condições ambientais ao redor das sementes de andiroba forem adequadas e os nutrientes estiverem disponíveis, a proliferação dessas conídias e sua intensidade podem aumentar consideravelmente.

Figura 5 - Microscopia Eletrônica de Varredura de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) semente deteriorada por fungos: micélio em locais de tecido: superfícies/cavidades e camadas de casca e semente [500 – 2500x]

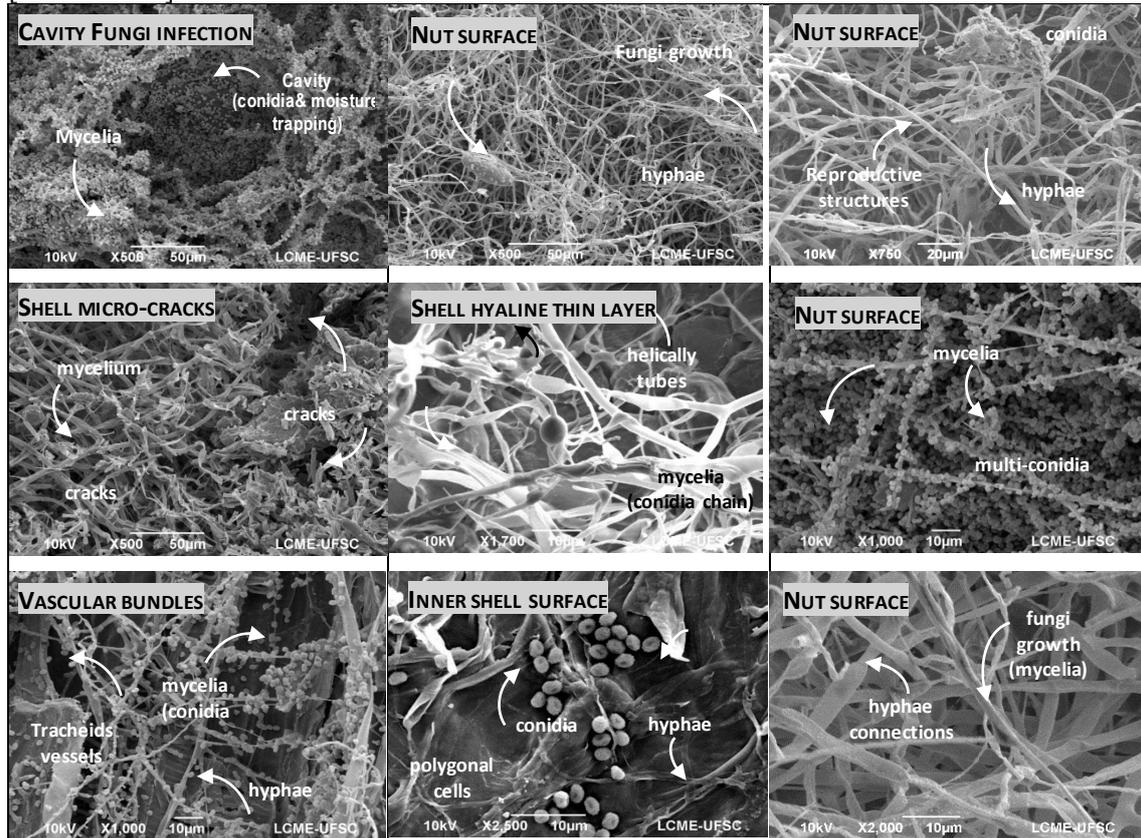
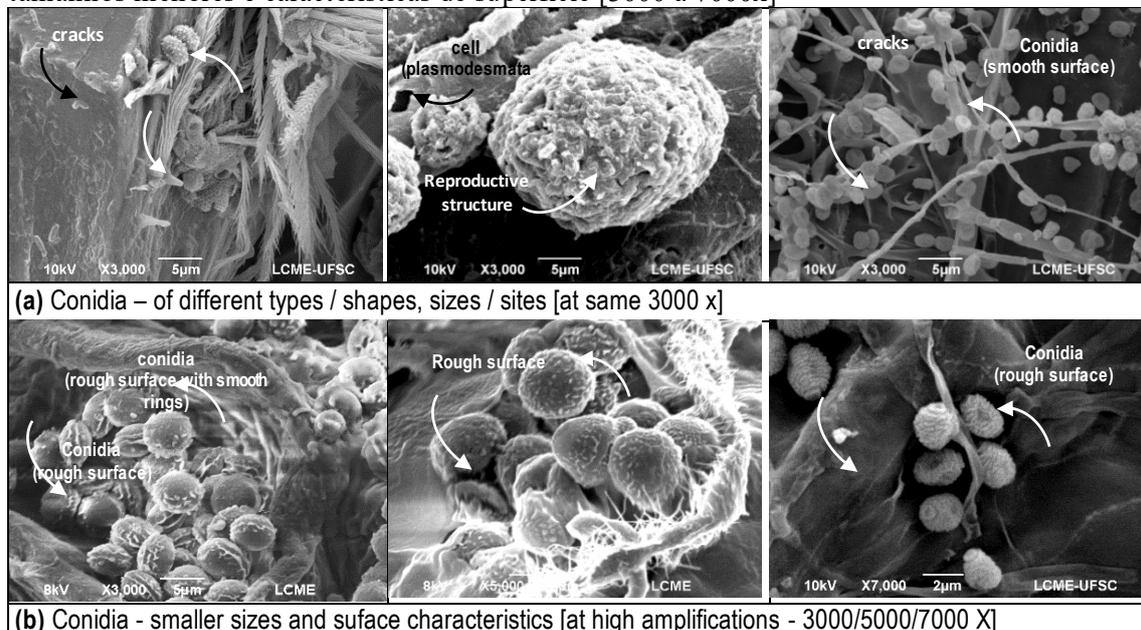
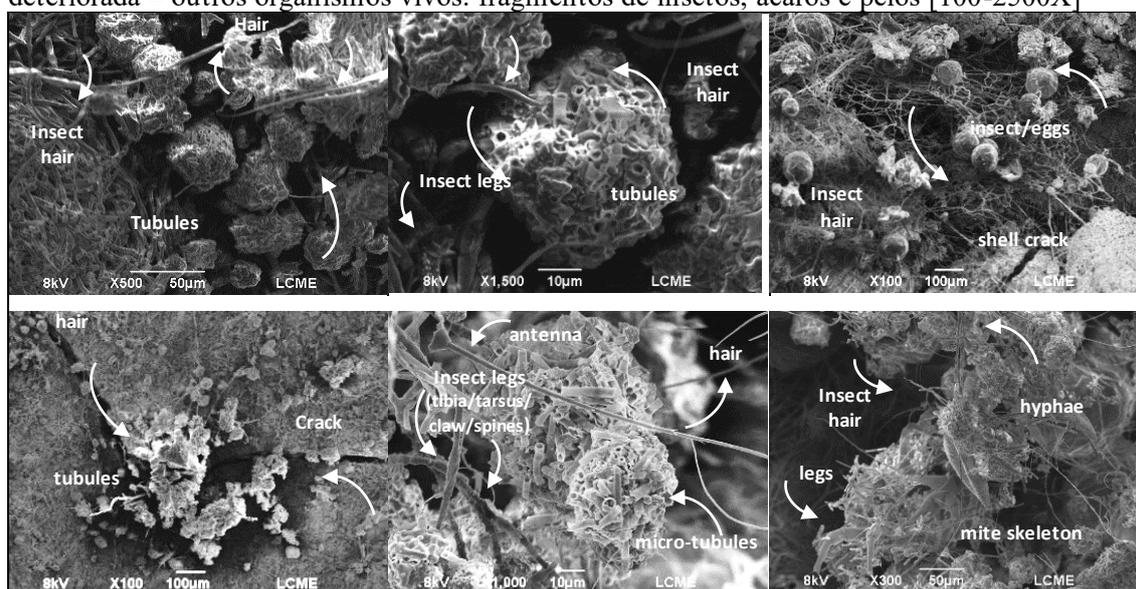


Figura 6 - Microscopia Eletrônica de Varredura de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) semente deteriorada - estruturas reprodutivas de fungos: (a) diferentes tipos/formas, tamanhos/loais; (b) tamanhos menores e características de superfície [3000 a 7000x]



Insetos: além da deterioração causada por fungos, também foram registrados danos causados por insetos e ovos depositados nas amostras de sementes deterioradas utilizadas na investigação atual. A Figura 7 mostra sua presença, entre colônias de fungos, causando danos à casca. Foi possível identificar fragmentos de suas antenas/pêlos e pernas (tarsos, garras), incluindo ovos. Eles são considerados vetores de conídias para a semente interna.

Figura 7 - Microscopia Eletrônica de Varredura de *Andiroba* (*Carapa guianensis* Aubl.) semente deteriorada – outros organismos vivos: fragmentos de insetos, ácaros e pelos [100-2500X]



### 3.3.3 MÉTODOS DE PREVENÇÃO E CONTROLE

Para controlar e/ou prevenir a proliferação de fungos, que leva à deterioração das sementes, vários procedimentos devem ser aplicados desde a queda das vagens das árvores. Alguns deles podem ser semelhantes aos recomendados para castanhas-do-brasil (Manfio et al. 2012), conforme a seguir.

Colocar uma rede suspensa (ao redor do tronco) para a coleta das vagens, evitando que caiam no chão lamacento. Isso previne a formação de rachaduras, reduz a umidade, evita a adsorção de lama/poeira e impede o ataque de insetos do solo. Portanto, reduzindo os problemas nos procedimentos de limpeza das fábricas. Embalar as vagens em sacos de juta antes de sair dos locais florestais, para embarcar nos barcos, permite ventilação e/ou exaustão adequada na sala de armazenamento dos barcos (durante o transporte fluvial) para controlar a umidade e a proliferação de organismos vivos. Imediatamente após chegar à fábrica, proceder à limpeza e secagem. Após a secagem e a despulpagem, as sementes devem ser armazenadas em local seco

e os sacos de sementes devem ser expedidos o mais rápido possível para as indústrias de óleo para a extração subsequente do óleo.

### 3.4 CONCLUSÃO

A semente de andiroba na casca, embora aparentemente em bom estado, mostrou-se altamente deteriorada por dentro. Por meio de SM e SEM, foi possível verificar que a casca apresentava as principais estruturas morfo-histológicas e características das células relacionadas à suscetibilidade à deterioração por fungos. Além dos resíduos placentários, a superfície irregular da semente de andiroba, o lóculo da casca com o canal e as células ricas em poros (com plasmodesmos) foram os principais locais responsáveis pela entrada de microrganismos e absorção de umidade para as partes internas da semente, levando a deteriorações. Dependendo da extensão da infecção, ela pode atingir o cotilédone, comprometendo assim a qualidade do óleo. Este é o primeiro estudo capaz de identificar, por meio de SM e SEM, as estruturas morfológicas suscetíveis à deterioração por fungos da andiroba, incluindo as características de micélio/conídio de infecção da semente.

### REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. S.; SOUSA, D. G.; DO VALE, N. C. História natural, ecologia e técnicas de manejo em castanhais nativos do sul do Amapá. In: Kanzaki, Luis Isamu Barros (Org.). Desenvolvimento sustentável em áreas de extrativismo da castanha-do-brasil no sul do Amapá. Belém: **Banco da Amazônia**, p. 11-48, 2009.
- CRAWLEY, M. J.; GILLMAN, Michael P. Population dynamics of cinnabar moth and ragwort in grassland. **The Journal of Animal Ecology**, p. 1035-1050, 1989.
- FERRAZ, Isolde Dorothea Kossmann; CAMARGO, José Luís Campana; SAMPAIO, Paulo de Tarso Barbosa. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* DC): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta amazônica**, v. 32, p. 647-647, 2002.
- KLAUCK, V. et al. In vitro repellent effect of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and andiroba (*Carapa guianensis*) oils on *Haemotobia irritans* and *Chrysomya megacephala* flies. 2015.
- KREIBICH, H. H., SAVI, G. D., SOARES, C. E., MOECKE, E. H. S., & SCUSSEL, V. M. Post-Fermentation Standard and Premium Types Dry Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.) Quality: living organisms and toxins. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**, p. 58-67, 2017.
- KREIBICH, H., MOECKE, E. O. E., & SCUSSEL, V. Stereo and Scanning Electron Microscopy of Whole Post-Fermentation Dry Cocoa (*Theobroma cacao* L.): Part one – Healthy

Beans. **Microscopy and Imaging Science: Practical Approaches to Applied Research and Education**; Méndez-Vilas, A., Ed, 337-347, 2017a.

KREIBICH, H., MOECKE, E. O. E., & SCUSSEL, V. Stereo and scanning electron microscopy of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.): part two - fungi spoilage susceptibility. **Microscopy and Imaging Science: Practical Approaches to Applied Research and Education**; Méndez-Vilas, A., Ed, 329-336, 2017b.

JORDÃO, Alexandre Luis. **Guia de pragas agrícolas: para manejo integrado no estado do Amapá**. Holos Editora, 2006.

MANFIO, Daniel; RODRIGUES, Manuel NF; SAVI, Geovana D. Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* HBK) Selenium Distribution and Physical Chemical Characteristics of Shell, Brown Skin and Edible Part from Two Amazon Regions. **Asian Journal of Agriculture and Rural Development**, v. 2, n. 2, p. 287-293, 2012.

MELLO, Fernanda Robert; SCUSSEL, Vildes Maria. Development of physical and optical methods for in-shell Brazil nuts sorting and aflatoxin reduction. **Journal of agricultural Science**, v. 1, n. 2, p. 3, 2009.

MORAES, Eurico A. et al. Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 229-236, 2010.

PEREIRA, Tiago B. et al. In vitro and in vivo anti-malarial activity of limonoids isolated from the residual seed biomass from *Carapa guianensis* (andiroba) oil production. **Malaria Journal**, v. 13, p. 1-8, 2014.

PINTO, Adriana Araújo et al. Seed predation of crabwood [*Carapa guianensis* Aubl. and *Carapa procera* DC.(Meliaceae)] by insects in Amazon. **Revista Árvore**, v. 37, p. 1115-1123, 2013.

SANTOS, M. T.; AQUINO, M. G. C.; ROCHA, J. S.; BRAGA, B. A.; MAESTRI, M. P. Biometria de sementes de Andiroba de duas diferentes áreas. In: **Congresso Internacional das Ciências Agrárias**, 3. Anais, 2018.

SAVI, GD, SCUSSEL, VM. Características Microscópicas da Castanha do Brasil e sua Relação com Contaminação. In : Kluczkovski, A ; Scussel, VM. Gerenciamento de risco da castanha-do-Brasil, Chap 2.1, Blumenau, **Nova Letra**, ed.,81-120, 2015.

SCUSSEL, Vildes M. et al. Stereoscopy and scanning electron microscopy of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) Shell, brown skin, and edible part: part one—healthy nut. **Journal of food science**, v. 79, n. 7, p. H1443-H1453, 2014.

SCUSSEL, Vildes Maria et al. Effect of oxygen-reducing atmospheres on the safety of packaged shelled Brazil nuts during storage. **International journal of analytical chemistry**, v. 2011, 2011.

SCUSSEL, Vildes M. et al. Stereo and Scanning Electron Microscopy of In-Shell Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* HBK): Part Two—Surface Sound Nut Fungi Spoilage Susceptibility. **Journal of food science**, v. 79, n. 11, p. H2392-H2403, 2014.

SILVA, B. A.; SCUSSEL, V. M. Characteristics and Effects of the Amazonian Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) Oil Against Living Organisms—A Review. **IOSR J. Biotechnol. Biochem.(IOSR-JBB)**, v. 6, p. 31-47, 2020.

SILVEIRA, D. et al. Botanical characterisation, geographical distribution and phytochemistry analysis of *manilkara huberi* (ducke) stanhl autochthonous in amapa state, Brazil. **ия наук Беларуси**, p. 1, 2011.

SOUSA, Sara Freitas et al. Análise física e avaliação do efeito antifúngico dos óleos de andiroba, coraíba e pinhão-manso. **Floresta**, v. 48, n. 2, p. 153-162, 2018.

TSUKAMOTO, Yuuta et al. Guianofruits C–I from fruit oil of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae). **Tetrahedron**, v. 75, n. 9, p. 1149-1156, 2019.

## CAPÍTULO 4

### **CARACTERIZAÇÃO DE GRÃOS DE MILHO (*Zea mays* L.) E POSSÍVEIS LOCAIS SUSCEPTÍVEIS A INFESTAÇÃO POR FUNGOS E ORGANISMOS VIVOS POR MICROSCOPIAS ESTEREOSCÓPICA E ELETRÔNICA DE VARREDURA**

Parte das informações fornecidas no 4º Capítulo da Tese foram publicadas em:

Silva, B.A.; Scussel, V.M. Characterization of Maize Grains (*Zea mays* L.) and Their Living Organisms Entrance Sites by Scanning Electron Microscopy. Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology, vol. 14, issue 7, p. 53-57, agosto 2020 – em Anexo.

DOI: 10.9790/2402-1407035357

<https://www.iosrjournals.org/iosr-jestft/papers/Vol14-Issue7/Series-3/G1407035357.pdf>

**RESUMO**

Microestruturas do grão de milho (*Zea mays* L.) foram investigadas quanto a pontos de susceptibilidade a contaminação e acesso a organismos vivos (microrganismos e seus vetores – insetos, ácaros), os quais podem causar danos e deterioração, tanto, por viabilizar entrada de umidade quanto acesso a esporos de fungos (possíveis produtores de micotoxinas). Através de técnica de microscopia avançada, foi possível alcançar e visualizar características da superfície / camadas internas / células amiláceas / formato dos grânulos de amido, os quais constituem a microestruturas da anatomia do milho. Podendo auxiliar com esses dados o desenvolvimento de métodos para prevenção e controle mais eficientes. A partir das informações obtidas por microscopia estereoscópica (ME), cortes estratégicos de pontos susceptíveis e próximos deles foram preparados (cobertos com camada de ouro, sob vácuo) e avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Dessa forma, a organização microestrutural do grão de milho (pericarpo / endosperma-vítreo & farináceo / gérmen-plântula, radícula / pedúnculo-união a espiga), bem como registros detalhados de possíveis locais de acesso a contaminantes foi registrado na parte comestível / amilácea. Foram observados nos cortes longitudinais e transversais diversas microestruturas e detalhes dos dois tipos de endosperma (a) VÍTREO – denso, com grânulos de amido poliédricos, compactados, envolvidos em membrana proteica e (b) FARINÁCEO – espaçado, tecido esfarelado, com grânulos soltos em formato esférico. No *pericarpo*, formado de células alongadas, ordenadas – estrias longitudinais. Os principais locais e microestruturas relacionadas a susceptibilidade, ou seja, que viabilizam entrada de esporos de fungos, bem como de outros organismos vivos responsáveis por deterioração do grão, foram: **PEDÚNCULO** (túbulos e traqueídeos, vias que adentram o grão, transportando água e nutrientes), **GÉRMEN** (células altamente ricas em nutrientes, onde esporos / conídios encontram substrato, se fixam, desenvolvendo colônias - produzindo o efeito *blue eyes* - manchas escuras / azuladas perceptíveis no exterior do grão), **FISSURAS** e **DANOS MECÂNICOS / INSETOS** no **PERICARPO** que abrem caminho para entrada de umidade e diversos organismos vivos para o interior do **ENDOSPERMA**. Estudos detalhados e aprofundados no conhecimento dos grãos e seus interstícios, vias de contaminação, podem permitir a escolha de procedimentos, bem como aprimorar, métodos de prevenção em aplicação mais eficiente como gases (atmosfera modificadas), micro películas fluídas, e submersão.

**Palavras-Chave:** fungos; milho; amido; microscopia; caracterização

#### 4.1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta herbácea, monóica, caracterizada como planta anual por ter seu ciclo completo de 4 a 5 meses (Pons; Bresolin, 1981). Esses grãos são geralmente de cor amarela ou branca, podendo apresentar outras cores, do vermelho, roxo ao preto. Sua composição média em base seca é de 72; 9,5; 9 e 4% de amido, proteínas, fibras e óleo, respectivamente (Paes, 2006).

Na botânica, a anatomia do grão de milho compreende o pericarpo (camada externa, fibrosa que envolve a estruturas internas, comumente denominada de casca), o endosperma (que diferem na composição química e organizacional dentro do grão) e o gérmen (rico em proteínas e óleo) (Magalhães, 2002). O pericarpo é derivado da parede do ovário e pode ser incolor, vermelho, marrom ou variegado (Magalhães, 2002). O endosperma representa aproximadamente 83% do peso seco do grão, organizado na forma de grânulos com formatos poliédricos e esféricos/arredondados. Já o gérmen representa 11% do peso total. (Paes, 2006).

O endosperma é classificado em dois tipos (com base na distribuição dos grânulos de amido e da matriz proteica): FARINÁCEO e VÍTREO (Paes, 2006; Dernadin; Silva, 2008). Essas designações referem-se a visualização do endosperma nos grãos quando submetidos à luz. No endosperma FARINÁCEO, os espaços vagos permitem a passagem da luz, conferindo opacidade ao material. Por outro lado, o VÍTREO representa a ausência de espaços entre os grânulos de amido e a matriz proteica promove a reflexão da luz, resultando em aspecto vítreo ao endosperma observado nessas condições (Shotwell; Larkins, 1989; Paes, 2006; Dernadin; Silva, 2009).

Em termos nutricionais, o grão de milho abrange quase todos os aminoácidos conhecidos, com exceção da lisina e do triptofano. Devido à sua elevada composição em carboidratos (amido) e lipídios (óleo) é considerado um alimento energético para dietas humanas e animais (Imform, 1993; Matos, 2007). O óleo de milho possui na sua composição ácidos graxos, de grande importância para a dieta humana, principalmente para a prevenção de doenças cardiovasculares e combate ao colesterol sérico elevado (Strecker et al, 1990; Matos, 2007).

Outro aspecto importante dos lipídios no milho está relacionado ao conteúdo de carotenoides e tocoferóis (vitamina E). Devido ao conteúdo ligno-celulósico do grão de milho verde e dos derivados integrais do grão seco, estes produtos são considerados fontes indispensáveis de fibras, principalmente do tipo insolúvel (hemicelulose, celulose e lignina) (Liebenow, 1986). Essas características o tornam recomendado na dieta humana para controle

do colesterol, melhora da constipação intestinal, prevenção do câncer de intestino e diverticulite, possuindo, portanto, importante valor funcional (Paes, 2006).

Independente das qualidades e vantagens nutricionais do milho, esse, quando exposto a condições inadequadas, de plantio e/ou armazenagem, pode viabilizar a entrada e contaminação por diferentes organismos vivos levando a sua deterioração. Apenas alguns estudos tem sido realizados quanto a grãos de milho e sua deterioração através de microscopias avançadas como a eletrônica de varredura (MEV) e raro apresentam suas nuances ultramicroscópicas, bem como, possíveis deteriorações / contaminações. Considerando que o MEV possibilita o conhecimento, através da observação em ampliações de até 7.500 x, da estrutura de um alimento, bem como viabiliza a percepção da presença de contaminantes, invisíveis ao olho nu e/ou ao microscópio óptico, este trabalho objetiva investigar, por MEV, a organização estrutural do grão de milho, assim como os principais locais de possíveis contaminantes (acesso às partes comestíveis por organismos vivos).

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 MATERIAL**

#### **4.2.1.1 Amostra**

Grãos de milho (1 kg), (a) saudáveis, gentilmente cedidos pela Companhia Integrada de Desenvolvimento Agropecuário de Santa Catarina – CIDASC (obtidos seguindo protocolo de coleta do Ministério da Agricultura – MAPA, 2007). Além de grãos saudáveis, (b) uma amostra de milho (apresentando deterioração nos grãos, visível a olho nu) foi também adquirida.

#### **4.2.1.2 Equipamentos**

Estereoscópio, modelo OPTZTS, 180 x, Opticam (Toquio, Kt., Japao); máquina de folheamento de ouro, modelo EM-Scd500, Leica (Leider, III., EUA); microscópio eletrônico de varredura, modelo JSM-6390LV, Jeol (Peabody, Mass., EUA) [7500x].

#### **4.2.1.3 Outros Materiais**

Formaldeído e etanol, grau analar, Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil); stubs (pequenos blocos metálicos, 9 mm, diâmetro e 10 mm, altura), Leica (Leider, III., EUA); bisturi de aço inoxidável, GS Mtronix (SP, Brasil); fita de carbono dupla face, Electron Microscopy Sciences (Leider, Illinois, EUA), serra, Ticotico (São Paulo, SP, Brasil); pinças, bisturi de aço inoxidável.

## 4.2.2 MÉTODOS

### 4.2.2.1 Preparo Das Amostras

Seu preparo para as análises microscópicas foi realizado no Laboratório de Micotoxinas e Contaminantes de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. Consistiu na separação de partes dos grãos através de cortes/secções.

Grãos inteiros (saudáveis e com deterioração) foram separados e seccionados – longitudinal e transversalmente em diferentes Planos (1,2,3 e 4) (Figuras 1). Para análise por ME, foram seccionados diretamente (Figura 2), já para MEV, foram previamente desidratados e desengordurados.

Também seções específicas de suas partes: tegumento (área externa e interna), endosperma (vítreo e farináceo), gemem e pedúnculo, foram preparadas para análise de ambas microscopias ME e MEV (assim, identificação das principais estruturas, tecidos e células, incluindo susceptibilidades, presença e dano causados por organismos vivos - conforme relatado por Scussel et al. 2014a).

Figura 1 - Grão de milho (*Zea mays* L.): (a) inteiro, sinalizando as direções dos cortes

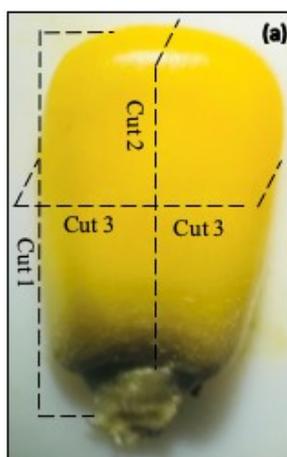
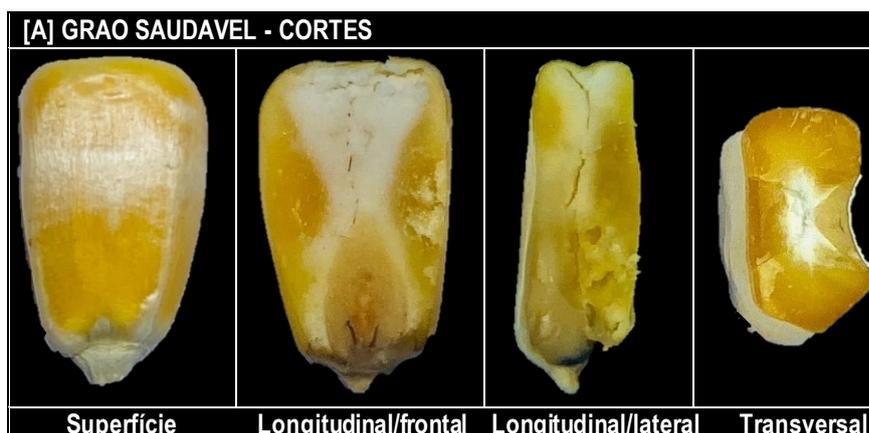


Figura 2 - Grãos de milho (*Zea mays* L.) inteiros e seccionados, preparados para análise estereoscópica (a) grão saudável e (b) grãos deteriorados



#### 4.2.2.2 Microscopia Estereoscópica - ME

Após o grão ser seccionado Planos 1 e 2 (longitudinal/frontal e longitudinal/lateral, respectivamente) por meio de uma serra fina, bem como Plano 3 (transversal - esses tiveram também seu pericarpo (casca) e endosperma (VÍTREO & FARINÁCEO) destacados e seccionados usando um bisturi para posterior observação individual de superfícies. Cada superfície (externa/interna) e metades (seções longitudinal e transversal) da casca e endosperma foram observadas através de microscópio estereoscópico para determinar cada estrutura e sua morfologia em diferentes ampliações [7,1-115X]. Micrografias foram registradas através de software de captura de imagem. Detalhes morfo-histológicos observados por ME, foram posteriormente elucidados por MEV (Scussel et al. 2014a).

#### 4.2.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

A partir do preparo na Secção 4.2.2.1, foi realizada um preparo específico para análise de MEV realizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina.

A casca foi seccionada em pequenos cubos (aproximadamente 3,0x3,0x2,0 mm de largura/comprimento/espessura, respectivamente), incluindo partes apresentando características especiais – área da aleurona, deterioração, rachaduras. Partes do endosperma (vítreo e farináceo) também foram especificamente seccionadas (espessura de 3,0 a 4,0 mm) em diferentes pontos (incluindo a área próxima ao germe e pedúnculo).

Os cubos foram fixados em suportes contendo fita adesiva de carbono dupla face e revestidos com uma camada (40 nm) de ouro (Au) sob vácuo em uma Base Planetária. Cada área de interesse da amostra, previamente revestida com ouro, foi escaneada utilizando microscópio de eletrônico e suas características observadas em diferentes ampliações [até 7.600X] (Scussel et al. 2014a; Kreibish et al. 2017a).

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das características morfo-histológicas obtidas por ME & MEV dos grãos de milho, foram registrados locais e microestruturas susceptíveis, tanto à absorção de umidade quanto à invasão por organismos vivos (ovos de insetos, esporos de fungos e bactérias). As Figuras 3 (ME) e 4-6 (MEV), apresentam estruturas características de tecidos e células do pericarpo e do endosperma (VÍTREOS e FARINÁCEO) e a Figura 6.a, seus diferentes grânulos de amido (conferem texturas específicas dessas duas partes que constituem a maior área do grão). As Figuras 7 e 8 apresentam as microestruturas do gérmen e pedúnculo, bem como microestruturas de esporos de fungos, ovos de insetos, aglomerados de grânulos em aumentos de até 7.600x, respectivamente.

#### 4.3.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO GRÃO DE MILHO – ME

##### 4.3.1.1 Pericarpo

(a) **Grão saudável** - (Figura 3.a) superfície homogênea apresentando camada lisa e brilhante (com película de cera), depressão característica da área do gérmen e seu pedúnculo (ligação a espiga). Em corte transversal, estão camadas fibrosas relacionadas a proteção. Já, no (b) **grão deteriorado** - (Figura 3.b) danos por insetos são observados com perfurações diversas (a serem discutidas na próxima Seção de MEV), atravessando as camadas da casca, alterações na cor por ação de microrganismos (colônias de fungos e seus esporos), bem como rachaduras próximo ao pedúnculo.

##### 4.3.1.2 Endosperma

(a) **Grão saudável** (Figuras 3.a) - FARINÁCEO- área esbranquiçada, opaca, que esfarela facilmente (desprendimento dos grânulos de amido) localizado na parte centro-longitudinal do

grão, e (b) VÍTREO - área translúcida, densa, de cor amarelo escuro, tecido compacto, que envolve principalmente as laterais (centrais) do grão como um todo. Por outro lado, o **(b) grão deteriorado** (Figuras 3.b) - FARINÁCEO - como esse, está localizado próximo ao gérmen (rico em nutrientes) e pedúnculo (acesso à umidade e nutrientes, que atravessam a região sentido interior do grão / gérmen – apresenta cor escurecida (deterioração) com proliferação de fungos e resíduos de insetos). VÍTREO – embora o grão esteja bastante deteriorado, a parte do endosperma que corresponde ao VÍTREO não foram registrados danos significativos nem nos grânulos ou membrana – provavelmente devido a sua dureza / alta densidade (sem dúvidas, ele é chamado também de endosperma córneo).

#### 4.3.1.3 Pedúnculo e Gérmen

Foi registrado, tanto no grão saudável quanto no deteriorado, o pedúnculo apresentando rachaduras (Figuras 3a e 3b). Isso ocorre, devido à pressão ao se destacar o grão da espiga. Diferente do primeiro, o pedúnculo do grão deteriorado apresentou tecido altamente alterado, sendo visível colônia de fungos e seus micélios. De fato, a contaminação por fungos geralmente ocorre na base do grão (pedúnculo) que segue através dos túbulos que transportam a água e nutriente para o interior do grão. (conexão pedúnculo – endosperma - via gérmen). Cabe salientar que, o grão saudável provavelmente veio de silos com temperatura e umidade controladas – o que preserva o grão mesmo se este apresentar algumas rachaduras provenientes de secagem.

#### 4.3.2 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E DISTRIBUIÇÃO DAS CAMADAS TECIDUAIS DO GRÃO DE MILHO – MEV

Quando as partes da anatomia do grão de milho foram investigadas mais aprofundadamente (100/500 a 7600x) através de imagens de MEV, foi possível observar com detalhes suas características histológicas e susceptibilidades a infestação (insetos, ácaros) e infecção (fungos, bactérias) por organismos vivos. As Figuras 4-8 apresentam detalhes das micrografias obtidas.

Figura 3 - Microscopia estereoscópica de grão de milho (*Zea mays* L.) apresentando características de sua anatomia (pericarpo, distribuição interna dos endospermas farináceo e vítreo, bem como posição do gérmen e pedúnculo em grão (a) saudável e (b) danificado. Seccionados no Plano 1 (longitudinal frontal), Plano 2 (longitudinal lateral); Plano 3 (transversal) [7,1 a 15 X]



### 4.3.2.1 Pericarpo

No pericarpo (camada protetora) às demais estruturas do interior do grão, através do MEV, foi possível registrar sua superfície externa - como uma estrutura homogênea, espessa, semi-lisa, com ondulações (semelhante a estrias, no ME), que se estendem perpendiculares a partir da *coroa* (topo do grão) ao *pedúnculo*, com células alongadas (pouca distinção de contornos) provavelmente pela película de cera que as cobrem. Em corte transversal é formada por diversas camadas de tecidos com células como segue (da superfície ao início do endosperma): 1. *Epiderme* (membrana mais externa coberta com fina camada de cera), 2. *Mesocarpo*, 3. *Células cruzadas* e 4. *Tubulares/testae* (Figura 4,5), e 5. *Testae* - camada próxima aos grânulos denominada *aleurona*. Essa proteína separa, grupo de grânulos e, é quem reveste o endosperma (Germaniet al. 1993, Britannica, 1996).

Figura 4.a - Micrografias do grão de milho (*Zea mays* L.): PERICARPO (casca) por Microscopia Eletrônica de Varredura - TRANSVERSAL [100-1000X]

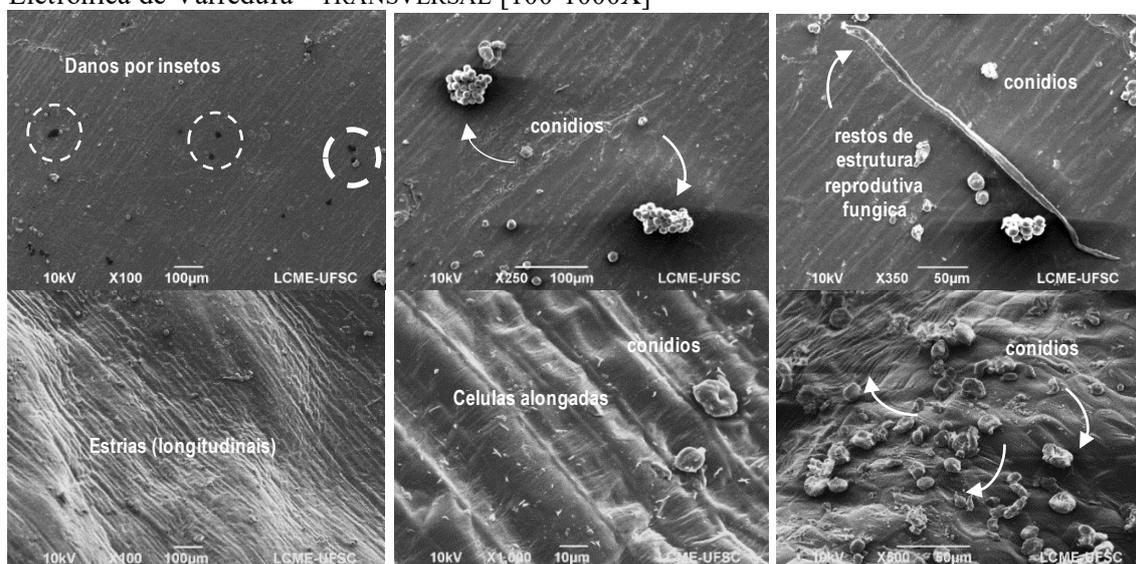


Figura 4.b - Micrografias do grão de milho (*Zea mays* L.): PERICARPO (casca) por Microscopia Eletrônica de Varredura - CORTE TRANSVERSAL [100-500X]

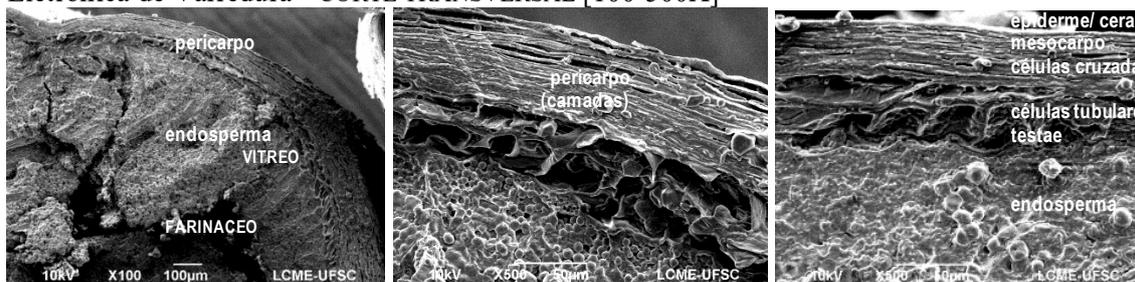
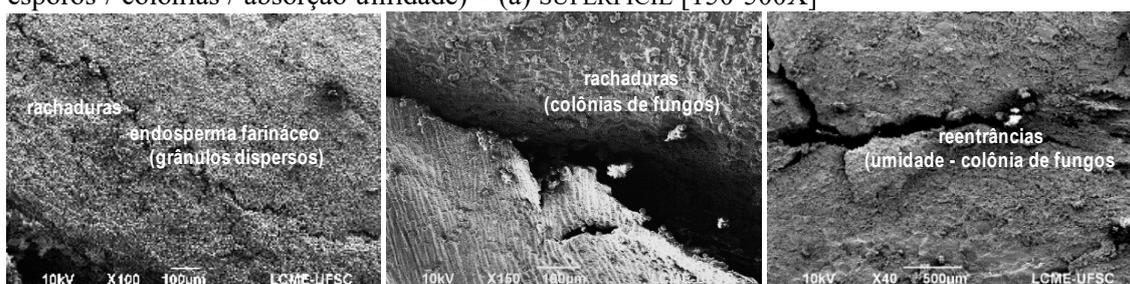


Figura 5 - Micrografias do grão de milho (*Zea mays* L.): (a) PERICARPO (b) ENDOSPERMA por Microscopia Eletrônica de Varredura - FISSURAS, VALES E REENTRÂNCIAS (pontos de deposição de esporos / colônias / absorção umidade) – (a) SUPERFÍCIE [150-500X]



#### 4.3.2.2 Endosperma

Como esperado na área do endosperma, o amido de milho apresentou uma diversificação no formato de seus grânulos - predominantemente poliédricos e também arredondados, dependendo da área dentro do grão (Figura 6a,b). Foi observado que a superfície dos grânulos era plana, exceto por algumas estrias, conforme características dos modelos propostos por Oates (1997) e Sujka, Jamrow (2009).

Quanto as microestruturas dos 2 tipos de endosperma distribuídos em diferentes regiões do grão se dividem em: (a) FARINÁCEO: onde os grânulos de amido se apresentam mais soltos, em um formato arredondado e disperso. Embora, haja matriz proteica circundando grandes grupos desses grânulos, estão frouxamente acomodados à membrana proteica (Figura 6) e (b) VÍTREO: os grânulos estão firmemente compactados e estruturados. Essa característica, promove uma compactação e formatação poliédrica e imprimindo cicatrizes também poliédricas, não deixando espaços entre as estruturas na membrana proteica (e que os envolve em grupos).

Figura 6.a - Micrografias do grão de milho (*Zea mays* L.): ENDOSPERMA: por Microscopia Eletrônica de Varredura – corte TRANSVERSAL [100-7.600X]

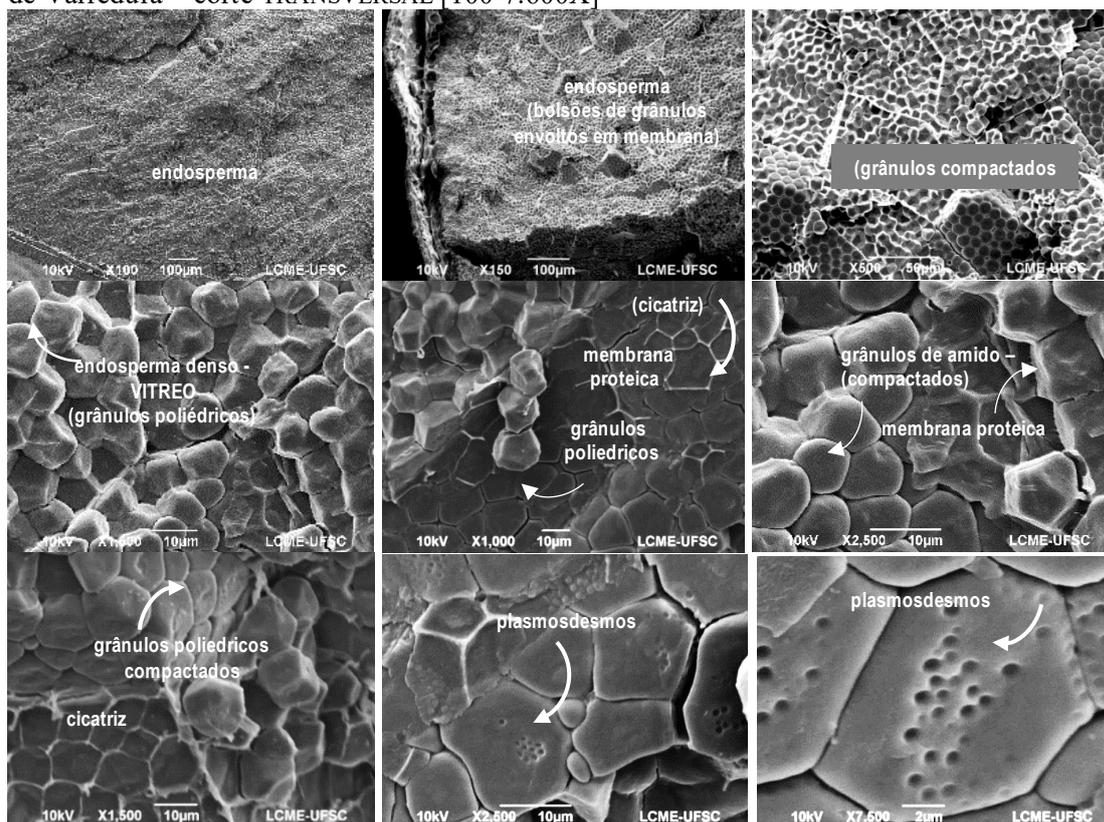
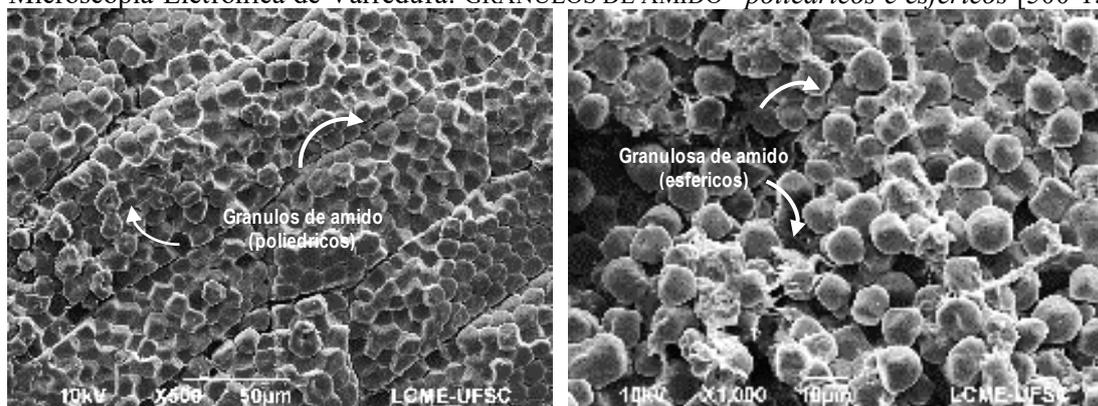


Figura 6.b - Micrografias do grão de milho (*Zea mays* L.): ENDOSPERMA (a) Vítreo e (b) Farináceo por Microscopia Eletrônica de Varredura: GRANULOS DE AMIDO - *polidricos e esféricos* [500-1.000X]



(a) Endosperma VÍTREO

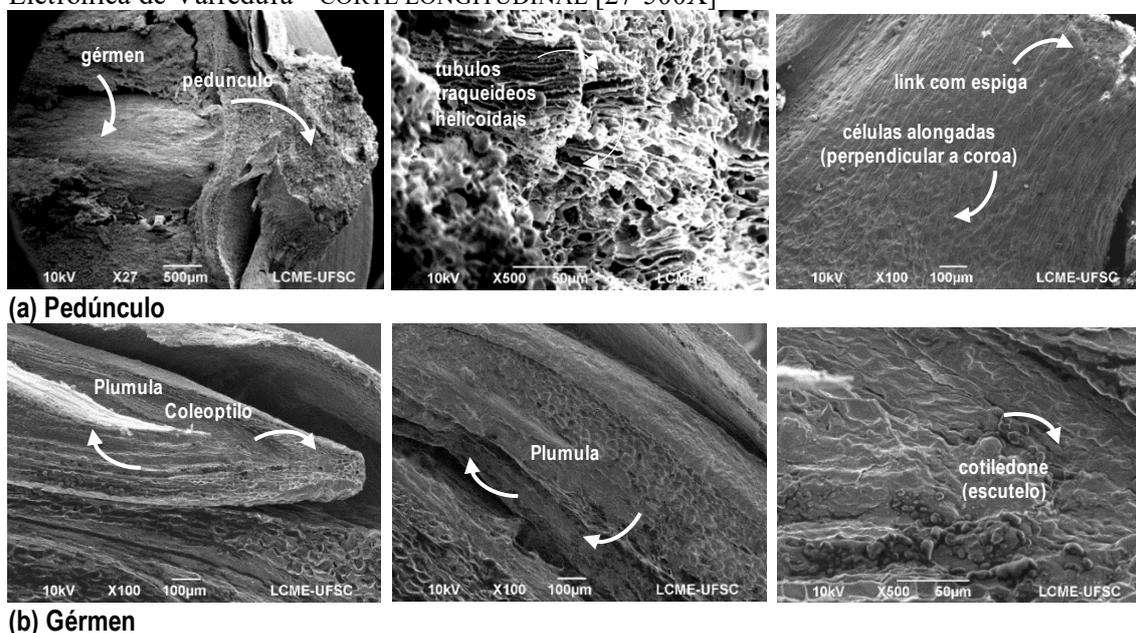
(b) Endosperma FARINÁCEO

#### 4.3.2.3 Pedúnculo e Gérmen

Foram registradas microestruturas do gérmen com suas camadas de células sequenciais formando a plúmula (planta embrionária) e pelo escutelo (folha da semente). Através dos cortes e posterior observação por MEV foi possível observar o coleóptilo, radícula e plúmula do gérmen no grão de milho (Figura 7). A plúmula é o conjunto da gema apical e das folhas

primárias, e é protegida por uma bainha, o coleóptilo. A radícula está localizada na parte inferior do gérmen e é a raiz primária da nova planta (Mahanna et al. 2014).

Figura 7 - Micrografias do grão de milho (*Zea mays* L.): PEDUNCULO e GÉRMEN por Microscopia Eletrônica de Varredura - CORTE LONGITUDINAL [27-500X]



#### 4.3.3 SUSCEPTIBILIDADES A DANOS E CONTAMINAÇÃO

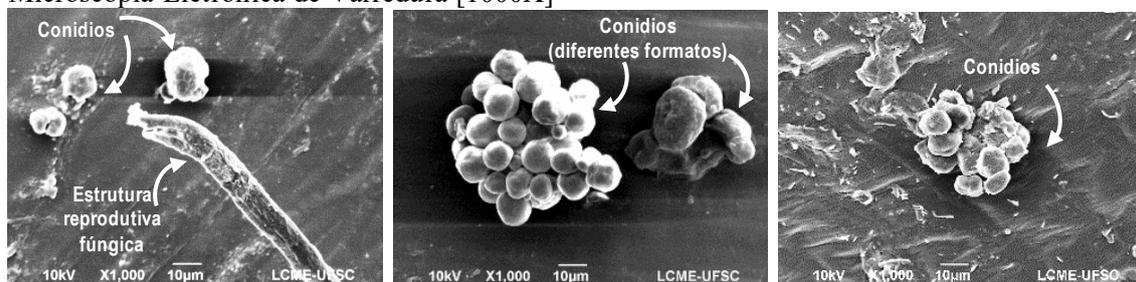
Quanto aos possíveis locais suscetíveis à contaminação, foi observada presença de fungos (esporos, estruturas reprodutivas) no **PERICARPO** próximo ao pedúnculo do grão e em fissuras, que proporcionam assim seu acesso à parte interna do grão (Figuras 4,5,8).

A contaminação por fungos no grão de milho geralmente ocorre nessa camada externa, e na base do grão (**PEDÚNCULO**), registrada no presente estudo - onde a umidade pode se acumular, bem como através de danos causados à sua estrutura (na sua junção com a espiga). Os fungos podem penetrar através das fissuras (**PERICARPO**), as quais ocorrem durante condições de armazenamento inadequadas (altas temperaturas de secagem, com resfriamento rápido - condensação). Essas condições podem formar/causar rachadura/*cracks* na casca, bem como formar gotículas de umidade (Figuras 4,5), condições para esporos se instalar (Zhang et al. 2021), bem como serem transportados para o **ENDOSPERMA**, fonte rica em amido e outros nutrientes (Guo et al. 2019). Pode também degradar o gérmen (alta concentração de óleos, proteínas e vitaminas).

Fungos como os do gênero *Fusarium*, *Penicillium* são conhecidos por causarem **PODRIDÃO DO GÉRMEN** (Figura 7), levando à sua deterioração, resultando na perda de valor

nutricional do grão, incluindo perda de produção, e se o fungo for toxigênico levará a produção de toxinas (quando exposto a condições adequadas) prejudiciais à saúde humana e animal (Stumpf et al. 2013; da Silva, et al, 2020).

Figura 8 - Micrografias de resíduos de organismos vivos em tecidos do grão de milho (*Zea mays* L.) por Microscopia Eletrônica de Varredura [1000X]



#### 4.4 CONCLUSÃO

Através das imagens micrografias, foi possível observar a caracterização detalhada da anatomia e microestruturas do grão (pericarpo, endosperma, gérmen e pedúnculo), bem como os pontos de susceptibilidade a invasão por organismos vivos.

Foram registrados diferenciação nos formatos de grânulos de amido *versus* seus respectivos endospermas (vítreo ou farináceo). Grânulos de amido arredondados e dispersos - formando o endosperma **FARINÁCEO**, e grânulos poliédricos e densamente compactados - formando o endosperma **VÍTREO**).

Os principais locais e microestruturas morfo-histológicas relacionadas a susceptibilidade, ou seja, que viabilizam entrada de esporos de fungos, bem como de outros organismos vivos responsáveis por deterioração do grão, foram: **PEDÚNCULO** (túbulos e traqueídeos, vias que adentram o grão, transportando água e nutrientes), **GÉRMEN** (células altamente ricas em nutrientes - esporos encontram substrato, se fixam, desenvolvendo colônias, produzindo o efeito *blue eyes*- manchas escuras/azuladas perceptíveis no exterior do grão), **FISSURAS** e **DANOS MECÂNICOS / INSETOS** no **PERICARPO** que abrem caminho para entrada de umidade e diversos organismos vivos para o interior do **ENDOSPERMA**.

#### REFERÊNCIAS

BEDFORD, Michael Richard; PARTRIDGE, Gary G. **Enzymes in farm animal nutrition**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2001.

CARVALHO, NM de; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção, Campinas. **Fundação Cargill**, 326p, 1980.

DENARDIN, Cristiane Casagrande; SILVA, Leila Picolli da. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, p. 945-954, 2009.

ERICKSON, David R. et al. Edible fats and oils processing basic principles and modern practices. 1990.

GERMANI, R. et al. Curso para laboratoristas da indústria moageira do trigo. **Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA**, 1993.

GUO, E.; CHARKOWSKI, A.J.; BLUHM B.H. Fungal Infection of Grains During Development: An Underestimated Cause of Preharvest Loss in Grain Crops. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Volume 32, Issue 1, Pages 52-64, 2019.

KLUCZKOVSKI, A.M.; SCUSSEL, V.M. **Gerenciamento de risco da castanha-do-Brasil**. Nova Letra Gráfica & Editora, 2015.

MAGALHAES, P. C., DURAES, F. O., CARNEIRO, N. P., & PAIVA, E. Fisiologia do milho. **EmbrapaMilho e Sorgo**. Circular Técnica, 2002.

MAHANNA, Bill et al. Silage zone manual. **Du Pont Pioneer. Johnston, IA**, 2014.

MATOS, E. H. S. F. Cultivo do milho verde. **Dossiê técnico. Serviço brasileiro de respostas técnicas**, 2007.

OATES, Christopher G. Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 11, p. 375-382, 1997.

PAES, Maria Cristina Dias. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. 2008.

PONS, A.; BRESOLIN, M. A cultura do milho. Trigo e Soja. Porto Alegre, n. 57, p. 6- 31, 1981.

SHOTWELL, Mark A. The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. **The biochemistry of plants, a comprehensive treatise**, v. 15, p. 297-345, 1989.

SILOTO, Romildo Cássio. **Danos e biologia de Spodoptera frugiperda (JE Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho**. 2002. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

STUMPF, Raquel et al. Fusarium species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 89-95, 2013.

SUJKA, M., & JAMROZ, J.  $\alpha$ -Amylolysis of native potato and corn starches—SEM, AFM, nitrogen and iodine sorption investigations. **LWT-Food Science and Technology**, 42(7), 1219-1224, 2009.

SUJKA, Monika; JAMROZ, Jerzy.  $\alpha$ -Amylolysis of native potato and corn starches–SEM, AFM, nitrogen and iodine sorption investigations. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 7, p. 1219-1224, 2009.

ZHANG, Q.; DING, W.; WANG, Z.; WANG, F.; YANG, S.; YUAN, R. Mycotoxin contamination and control strategy in food and feed: A case of corn, *Food Science and Food Safety*, Volume 20, Issue 1, Pages 793–820, 2021.

## CAPÍTULO 5

### **EFEITO DO ÓLEO DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl.) NO CONTROLE DE FUNGOS EM GRÃOS DE MILHO (*Zea mays* L.) E CAPACIDADE GERMINATIVA**

Parte das informações fornecidas no 5º Capítulo da Tese foram publicadas em:

Silva, B.A.; Silva, N.C.; Runtzel, C. L.; Aquino, C. M.; Scussel, V.M. Effect of Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) Oil for Fungi Control in Maize (*Zea Mays* L.) Grain. Journal of Agriculture and Veterinary Science, vol. 12, issue 9, p. 26-32, setembro 2019 – em Anexo.

DOI: 10.9790/2380-1209022632

<https://www.iosrjournals.org/iosr-javs/papers/Vol12-issue9/Series-2/F1209022632.pdf>

## RESUMO

A cultura de milho (*Zea mays* L.) tem sido sujeita à contaminação por fungos, causando graves perdas e danos, sendo estes de campo ou armazenagem. Estratégias alternativas de descontaminação fúngica, que sejam eficientes e mais brandas, assim reduzindo aplicação de fungicidas sintéticos, vêm sendo amplamente estudadas. Dentre estas, surge o interesse pela utilização de óleos / extratos de plantas. Com o objetivo de avaliar a suscetibilidade de gêneros fúngicos contaminantes de grãos de milho por tratamento com Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) – OA, foram utilizadas amostras de milho, onde (a) foi analisado o crescimento micelial dos gêneros fúngicos *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, isolados do grão, em meios de cultura contendo diferentes níveis de OA (Controle [sem OA]; e Tratado [0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1; 2; 3; 5; 10; 20; 30 e 40%]), seguindo para a (b) semeadura direta de grãos de milho tratados com óleo, e avaliados para parâmetros como (c) sua capacidade germinativa (pós-tratamento) e susceptibilidades / resistência de gênero. Dos grãos de milho testados naturalmente contaminados, foram isolados os gêneros mais frequentes para o estudo (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Mucor*). Quando replicados em meios de cultura específicos/adequados (BDA, MEA, G<sub>25</sub>N e CAM) para cada fungo/gênero e para avaliar seu comportamento dos fungos isolados, foi registrado algum crescimento em diferentes intensidades, exceto *Penicillium* e *Mucor*. Com relação à inibição do OA no diâmetro das colônias foi observada diferença estatística ( $p < 0,5$ ) no seu desenvolvimento para o fungo de campo (*Fusarium*) e de armazenagem (*Aspergillus* e *Penicillium*) quando comparada com o Controle (5, 2 e 40% de OA, respectivamente). Acerca do crescimento micelial total, os melhores resultados obtidos se deram nas porcentagens de OA de 3 a 40% (2,56 a 0,30 cm), 2 a 40% (0,26 a 0,30 cm), e 10 a 40% (0,50 a 0,23 cm), respectivamente para *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, respectivamente. Como esperado, para todos os gêneros, foi observado uma redução de velocidade de crescimento micelial mais acentuada nas maiores concentrações de OA. Quando o grão, foi tratado com diferentes níveis de OA foi observado variação na capacidade antifúngica. Das amostras utilizadas (10x) contendo diferente níveis de carga fungica, o OA mostrou efetividade com 3 amostras com redução fúngica (46,7 e 6,7%). A aplicação do OA interferiu na qualidade fisiológica das sementes dos grãos de milho, impedindo e / ou retardando a germinação. Importante enfatizar, considerando o milho para consumo, que o retardamento ou impedimento da germinação e' desejável na armazenagem de

grãos, principalmente no topo dos silos. Se faz necessário o desenvolvimento de novos estudos que busquem tratamentos mais efetivos frente a prevenção / descontaminação fúngica em grãos.

**Palavras-Chave:** região amazônica; Óleo de Andiroba; segurança alimentar; fungos; grãos de milho

## 5.1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta monocotiledônea, pertencente à família *Poaceae*, subfamília *Panicoidae* (gênero *Zea*, espécie *Zea mays* L.), sendo produzida em quase todos os continentes (Magalhães, 2002). É de extrema importância econômica pelas suas variadas formas de aplicação, que vão desde rações para animais até produtos de alta tecnologia para humanos (Munirah et al. 2015). Além de fonte de energia (carboidratos), é rico em lipídios, vitaminas (complexo A e B) e minerais (ferro, fósforo e cálcio) (Oliveira et al. 2004; Paes, 2006). Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2017), o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, crescendo em diferentes regiões do país, sob diferentes condições edafoclimáticas, com uma média de 74,0 milhões de toneladas por ano.

Os fungos que invadem os grãos são geralmente divididos em dois grupos: campo e armazenamento (Magan, Aldred, 2006; Pitt, Hocking, 2009; Scussel et al. 2018). Os principais gêneros de fungos de campo são *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Alternaria* e *Cladosporium* que afetam grãos e outros vegetais durante o amadurecimento, onde são observados danos antes da colheita (Scussel et al. 2018; Bullerman, Bianchini, 2009). Porém, fungos de armazenamento, como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor*, necessitam de menos umidade e são encontrados em silos, moinhos, equipamentos e locais onde os grãos são manuseados e ou processados (Scussel et al. 2018; Bullerman, Bianchini, 2009).

Apesar das condições convencionais para controlar fungos, são necessários métodos alternativos para controlá-los (Savi et al. 2014). Vários métodos verdes têm sido relatados, destacando-se a sua descontaminação (inativação de fungos/espores), devido ao interesse mundial em utilizar produtos menos agressivos ao meio ambiente e mais saudáveis (Savi et al. 2014; Christ et al. 2016). Dentre esses produtos, há grande interesse na utilização de óleos extraídos de plantas, principalmente da região amazônica, que se mostram eficientes no controle de microrganismos (Lima et al. 2009). Alguns têm ganhado destaque como o líquido da casca da castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.), o extrato de guaraná (*Paullinia cupana*

Kunth), o óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) e o Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) – OA (Sousa et al. 2012; Martins, 2014).

A Andiroba pertence à Família *Meliaceae* e seu óleo é conhecido popularmente na região Amazônica (Lorenzi, 2002; Farias et al. 2016), como produto cicatrizante (antiparasitário/malárico/inflamatório) (MacKinnon et al. 1997; Orellana et al. 2004; Roy, Saraf, 2006; Souza et al. 2006; Nayak et al. 2010; Silva, 2018). É rico em ácidos graxos essenciais (ácidos linoléico e linolênico) e componentes não gordurosos (triterpenos, taninos e alcalóides - carapina) (Souza et al. 2006; Silva, 2018). Enquanto as propriedades antiparasitárias e antimaláricas são atribuídas à presença de gedunina, um componente da meliacina (MacKinnon et al. 1997), as propriedades anti-inflamatórias e repelentes de insetos são atribuídas à andirobina, do grupo dos limonóides (Orellana et al. 1997). al. 2004; Roy, Saraf, 2006; Nayak et al. 2010). O OA tem sido estudado como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em pimenta (*Capsicum baccatum*), bem como em *Botrytis*, *Cladosporium* e *Rhizopus*, e nos fungos toxigênicos *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* em feijão (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Apesar disso, ainda existem poucos estudos sobre a sua utilização na alimentação (Sousa et al. 2012; Farias et al. 2016).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o possível efeito do OA contra esporos de fungos de diferentes gêneros que contaminam grãos de milho, suas diferentes suscetibilidades, e sua capacidade germinativa pós tratamento. É fundamental realizar pesquisas que busquem métodos alternativos menos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde da população, uma vez que o uso de substâncias químicas sintéticas está associado a danos à saúde humana, animal e ambiental.

## **5.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.2.1 MATERIAL**

#### **5.2.1.1 Amostra**

Foram utilizadas 10 amostras (1 kg) de grãos naturalmente contaminados, coletados pela CIDASC (Companhia Integrada de Desenvolvimento Agropecuário do Estado de Santa Catarina), utilizando o método de amostragem oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2007) e gentilmente doados para esta pesquisa.

### **5.2.1.2 Óleo de Andiroba**

Produto comercial (1 L)\* adquirido da cidade de Belém, Estado do Pará (região Norte do País), extraído e comercializado pela empresa Distriol.

\* acondicionado em frasco de vidro âmbar.

### **5.2.1.3 Meio de Cultura, Químicos e Outros**

Meios de cultura: ágar batata dextrose - PDA, Neogen (Michigan, EUA), extrato de malte - MEA e peptona bacteriana, Himedia, (Mumbai, Índia), czapek – CYA e ágar nitrato de glicerol 25% - G25N, Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); ágar coco - CAM, preparado com leite de coco, Serigy, FRUTEB S/A (Seará, Brasil). Químicos: cloranfenicol, Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), placas de Petry (90x15 mm), Kasvi (Santa Catarina, Brasil). Outros: pratos de porcelana (cor branca); peneira de aco inox (diâmetro 20 cm); formulário para teste Sensorial; painelistas voluntários (total: 8; idade: 17 a 86 anos; sexo: 5 feminino e 3 masculino).

### **5.2.1.4 Equipamentos**

Câmara de fluxo laminar, Veco (Campinas, Brasil); autoclave, Phoenix (Araraquara, Brasil); forno bacteriológico, Fanem (São Paulo, Brasil); escala analítica (variação de 0,01 -210 g), Ohaus, (Parsippany, NJ, EUA); microscópio óptico, Olympus CX22, (Tóquio, Japão); estereoscópico, Opticam (São Paulo, Brasil); Stomacker, Marconi (Piracicaba, Brasil); paquímetro naalógico (0,05 a 150 mm), Starrett (Massachusetts, EUA). Aspirador de pó, Electrolux (Curitiba, Brasil); aparelho de atividade de água, Gehaka G2000 (São Paulo, Brasil).

## **5.2.2 MÉTODOS**

Os testes micológicos foram realizados a partir de porções (25 g) de cada amostra de grãos de milho, pesadas assepticamente. Já, para os estudos de germinação e sensorial foram utilizadas amostras como apresentadas no comércio.

### **5.2.2.1 Contagem Total de Fungos**

As porções foram transferidas para sacos de polietileno e adicionadas de água peptonada (0,1%) seguida de homogeneização (2 min no Stomacker); em seguida, um volume (100 µl) de cada amostra diluída ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) foi inoculado na superfície do PDA contendo cloranfenicol (100 mg/L) em uma cabine de fluxo laminar (n=3) e incubado a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  durante 7 dias (Silva et al. 2013; APHA, 2015). Sua contagem total foi lida usando a contador de colônias e registrada como unidades formadoras de colônias (UFC/g). Foram contadas apenas as mesmas placas de diluição que tinham de 15 a 150 colônias.

O isolamento foi realizado por replicações sucessivas em 4 meios de cultura diferentes (MEA, PDA,  $G_{25}N$  e CAM) (n=3) seguido de sua identificação, sendo realizada pela técnica de microcultivo (Weber, Pitt, 2000), onde uma porção de cada colônia (apresentando morfologia diferente) foi colhida e inoculada em meio ágar Czapek (n=2) e incubada a  $22-25^\circ\text{C}$  por 5 dias, seguido de identificação por microscopia óptica (características morfológicas, incluindo as estruturas reprodutivas). A partir da observação das características macro e microscópicas, foi realizada a identificação dos gêneros fúngicos segundo as chaves de identificação de Frisvad, Samson (2004).

\*Nota: verificação da contaminação por fungos do OA –também o OA foi submetido a teste micológico (carga total de fungos), aplicando-o no BDA para contagem total de fungos, a fim de certificar sua inocuidade para posterior aplicação no estudo de descontaminação.

#### **5.2.2.2 Gêneros Fúngicos Isolados de Grãos de Milho e Expostos a OA**

O tratamento foi realizado seguindo a metodologia proposta por Sousa et al. (2012) com adaptações, onde o óleo foi adicionado ao meio de cultura BDA (OA-PDA: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 2; 3; 5; 10; 20; 30 e 40% de OA para 20 mL de meio de cultura), homogeneizado e vertido em placas de Petri. O Grupo Controle consistiu de um disco de fungos isolados dos grãos de milho - gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, em meio BDA sem óleo. Já para o Grupo Tratado, o disco com cada colônia, foi transferido para OA-PDA, retirando-se um cilindro (colônia de disco + ágar) de cada uma (0,5 cm de diâmetro), colocados no centro de ágar (n=3) e incubados a  $22-25^\circ\text{C}$  durante 3 dias (Sousa et al. 2012). Durante o período de incubação foram investigados diferentes parâmetros quanto ao comportamento de cada colônia frente ao meio OA-PDA (0,2 a 40%). A medição do diâmetro do disco (inóculo – 0,5 cm) do OA Controle e Tratado foi realizada diariamente por paquímetro e registrada.

A avaliação do crescimento micelial total (CMT) consistiu na medição diária do diâmetro das colônias em duas direções perpendiculares, com auxílio de um paquímetro, obtendo-se uma média para cada repetição de cada tratamento. Utilizando a média dos resultados obtidos, foi determinado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) (Maia et al. 2011) conforme a seguinte equação.

$$\text{IVCM} = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$$

D - diâmetro médio atual da colônia;  
 D<sub>a</sub> - diâmetro médio da colônia no dia anterior;  
 N - número de dias após a inoculação

### 5.2.2.3 Efeito Antifúngico do OA no Grão de Milho – Semeadura Direta

#### 5.2.2.3.1 Preparo das Amostras

Os grãos de milho (total: 10) foram separados em dois grupos principais: Grupo Controle (GC: sem OA) e Grupo Tratado (GT<sub>OA</sub>: contendo fina camada de OA) para cada amostra de grãos obtidos pela CIDASC.

#### 5.2.2.3.2 Tratamento dos Grãos de Milho com OA

Os grãos do GT (100 g, n=3) foram tratados com OA puro (saco estéril contendo 20 mL de óleo, correspondendo a 18,4 g), homogeneizados, retirados, deixados escorrer sobre papel de filtro esterilizado e distribuídos (5 grãos) em placas (n = 3 em duplicata) contendo meio de cultura (BDA) - GT, assim como o GC - sem tratamento (método descrito por Berjak (1984), como semeadura direta. \*Depois da semeadura, o saco com resíduo de OA foi pesado e o volume de óleo aderido a superfície do grão calculado (15,07 mL de óleo / 100 g de milho ou 13,87 g de óleo / 100 g de milho), considerando a diferença das massas adicionada e residual. Após o tratamento com OA, as amostras (GC & GT) foram incubadas por 5 dias, com acompanhamento de possível crescimento fúngico.

#### 5.2.2.3.3 Avaliação do Efeito Antifúngico e Identificação de Gêneros - Grupos GC & GT

Após o tratamento com OA, as amostras (GC & GT) de grãos de milho foram incubadas por 5 dias, com acompanhamento de possível crescimento fúngico, seguido por contagem do total número de grãos/placa (GC & GT) que apresentavam crescimento fúngico. Os resultados foram expressos como porcentagem do total de grãos inoculados e infectados. *Microcultivo*: foram realizadas repetições sucessivas em meio de cultura BDA (n = 3) seguidas de identificação, utilizando a técnica de microcultura (Weber & Pitt, 2000), onde uma porção

de cada colônia (apresentando morfologia diferente) foi colhida e inoculada em ágar Czapek (n = 2) e incubados a 22-25 °C (5 dias), seguido de identificação por microscopia óptica (características morfológicas, incluindo estruturas reprodutivas). A partir da observação das características macro e microscópicas, foi realizada a identificação dos gêneros fúngicos segundo as chaves de identificação de Frisvad & Samson (2004).

#### 5.2.2.4 Efeito Antifúngico do OA no Grão - em Condições de Armazenagem Comercial

O comportamento dos grãos tratados com antifúngico, foi acompanhado os submetendo à armazenagem. Essa foi reproduzida com as etapas do procedimento comercial, contudo em escala laboratorial como segue:

Inicialmente os grãos de milho, secos, foram submetidos a:

**(a) Preparo dos grãos para armazenagem: (a.1) limpeza** - retirada de poeira superficial através de movimentação por peneiramento e aspiração, seguido do preparado dos **(a.2) grupos e silos** - após conferir o teor de umidade inicial (3,04%), os **(a.2.1) grãos** – foram separados em porções (200g) e divididos em GC (Controle - não tratado, n=3, total 600 g) e GT (Tratado - com OA, n=6, total 1.200 g). Grãos GT, tiveram o OA aplicado seguindo o procedimento descrito na Seção 5.2.2.3.2), e os **(a.2.2) silos** – previamente preparados por esterilização das paredes metálicas com água fervente, deixados secar completamente.

**(b) Armazenamento:** os grãos (GC & GT) foram carregados em silos piloto (n=3 & n=6) de metal - reproduzindo condições de silos de armazenagem comercial (com fechamento no topo - e pequena abertura para aeração - mantidos à temperatura de 19 °C) durante 4 semanas. Além de 19 °C, foi mantido um GC a temperatura ambiente  $\pm 25$  °C.

**(c) Coleta de amostras e análises:** a coleta dos grãos foi realizada a cada 7 dias (porções: 50 g) para avaliar sua qualidade ao longo da armazenagem quanto a **(c.1) variações nos grãos** - através de Classificação Oficial com base na Instrução Normativa (IN) 60 de 22 de dezembro de 2011 (MAPA, 2011) enfatizando parâmetros relacionados a deterioração fúngica (ardidos, fermentados, mofados), **(c.2) possível desenvolvimento de colônias fúngicas**, bem como **(c.3) variação no teor de umidade (%)** através de aparelho Medidor de Umidade automático. Todas coletas: n=3. Cabe salientar que as análises foram realizadas no Setor de Classificação de Produtos de Origem Vegetal, do órgão oficial do Estado, a Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina.

### 5.2.2.5 Efeito na Capacidade Germinativa

A capacidade germinativa de CG e TG foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelas Normas para Análise de Sementes (Brasil 1992) com modificações. A germinação foi realizada com duas folhas de papel filtro embebidas em água destilada (as folhas foram pesadas e o valor multiplicado por dois, o resultado obtido foi a quantidade de água destilada colocada nas folhas). Os grãos (25 unidades) foram distribuídos em um dos papéis de germinação (n = 3). Após a acomodação dos grãos, colocou-se o segundo papel sobre as sementes, seguido da adição de água. Os papéis foram incubados a 25-27°C (5 dias). A porcentagem de grãos germinados após imersão em óleo de andiroba foi calculada pela razão entre a quantidade de grãos germinados e a quantidade de grãos semeados para germinação (25 grãos) (Equação 1).

$$\text{Grãos Germinados \%} = \left(\frac{DK}{IK}\right).100$$

DK - quantidade de grãos germinados após o tratamento;  
IK - quantidade inicial de grãos

### 5.2.2.6 Efeito Antifúngico do OA no grão - Análise Sensorial

Amostras de milho, seco (umidade: 13,04%), foram submetidas a análise sensorial para avaliar o grau de aceitação visual do grão (sob tratamento com OA) de acordo com o método oficial da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1993; 1998) como segue:

**(a) Preparo das amostras:** grupos de grãos foram divididos em GC (Controle: sem OA) e GT (Tratado: com AO - método descrito na Secção: 5.2.2.3.2) e submetidos a análise sensorial.

**(b) Método sensorial:** as amostras (GC & GT) foram apresentadas (20 g de grãos) para cada painelistas em pratos brancos, a temperatura ambiente, sob iluminação uniforme, codificadas com números de três dígitos. Em paralelo foi apresentado para preenchimento um *Formulário*, contendo os atributos padrões sensoriais (de percepção visual e olfato), cujo grau de aceitabilidade e/ou rejeição são definidos através de números: **(b.1) padrões sensoriais** - COR, AROMA e APARÊNCIA. Os atributos foram colocados em escalas estruturadas com números de 1 a 7, sendo o extremo: 1 relacionado ao pior padrão/percepção (rejeição) e o extremo 7: o melhor padrão (aceitação), ABNT (1993; 1998). **(b.2) graus de percepção** - para cada atributo a ser avaliado pelos painelistas voluntários (total: 8; idade: de 16 a 85 anos; sexo: 3 do sexo masculino e 5 do sexo feminino), os níveis foram enumerados (de 1 a 7):

- ✓ COR: em escuro (1), amarronzado (2), amarelo forte (3), amarelo (4), amarelo claro (5), amarelo muito claro (6) e claro (7);
- ✓ AROMA: em muito indesejável (1), indesejável (2), ligeiramente indesejável (3), indiferente (4), ligeiramente desejável (5), desejável (6) e muito desejável (7);
- ✓ APARÊNCIA: em muito indesejável (1), indesejável (2), ligeiramente indesejável (3), indiferente (4), ligeiramente desejável (5), desejável (6) e muito desejável (7).

Após o preenchimento do formulário por cada painalista, os dados obtidos para cada parâmetro/atributo foram computados, o grau de aceitação das amostras avaliado e dispostos em gráficos.

### **5.2.2.7 Análise Estatística**

Todos os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e Tukey como pós-teste no software Statistica Release 7. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## **5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.3.1 CARGA FÚNGICA**

Como esperado, a carga total de esporos obtida nas amostras de milho contaminado naturalmente com fungos foi bastante elevada e diversificada, variando de 0,1 a  $0,5 \times 10^4$  UFC/g (Tabela 1).

A presença de fungos no milho, principalmente se forem de cepas toxigênicas, além da deterioração são indícios do risco de contaminação por micotoxinas (Valmorbida et al. 2018). Tal como outros cereais, o milho está frequentemente exposto à contaminação por fungos, tendo a sua proliferação iniciado no campo (durante o desenvolvimento da planta) e estendendo-se por toda a sua cadeia produtiva (armazenamento / transporte / indústria / consumidor). A contaminação pode ocorrer devido à presença de fragmentos de micélio e esporos no solo, restos de plantas e sementes ou pode ser transportada pelo vento, chuva ou insetos (Scussel et al. 2018).

Durante o armazenamento, os grãos devem ser mantidos em condições adequadas para evitar danos e desenvolvimento de novas infecções fúngicas (Pezzini et al. 2005; Kumar, Kalita, 2017). As principais colônias, ou seja, aquelas que cresceram em maior número e tiveram presença consistente nas amostras, foram isoladas - a serem discutidas a seguir. Quanto à

possível contaminação fúngica no OA (a ser utilizado nos experimentos), não houve desenvolvimento significativo nas placas durante o período de incubação, portanto, capaz de ser aplicado no presente estudo.

Tabela 1 - Avaliação da carga de esporos de fungos dos grãos de milho (*Zea mays* L.) e Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) a serem utilizados no estudo de descontaminação

Amostra		Carga total de fungos*	
Tipo	n.	Umidade	10 <sup>-3</sup>
Milho	01	13,7 ± 0,2%	0,4 x 10 <sup>4</sup>
	02	13,1 ± 0,1%	0,3 x 10 <sup>4</sup>
	03	13,9 ± 0,1%	0,5 x 10 <sup>4</sup>
	04	13,8 ± 0,2%	0,4 x 10 <sup>4</sup>
	05	12,7 ± 0,1%	0,2 x 10 <sup>4</sup>
	06	13,1 ± 0,2%	0,3 x 10 <sup>4</sup>
	07	14,2 ± 0,1%	0,5 x 10 <sup>4</sup>
	08	12,3 ± 0,1%	0,1 x 10 <sup>4</sup>
	09	14,1 ± 0,2%	0,5 x 10 <sup>4</sup>
	10	12,8 ± 0,1%	0,2 x 10 <sup>4</sup>
Óleo	OA <sup>a</sup>	4,29 ± 0,68 %	NA <sup>b</sup>

\*média - n=3 (UFC/g) <sup>a</sup>Óleo de Andiroba <sup>b</sup>não se aplica

### 5.3.2 PRINCIPAIS GÊNEROS FÚNGICOS ISOLADOS DE MILHO *versus* MEIO DE CULTURA

O isolamento e identificação das colônias de fungos (obtidas após a carga total) inoculadas em diferentes meios de cultura (BDA, MEA, G<sub>25</sub>N e CAM), mostrou que todas as amostras de grãos estavam contaminadas, principalmente por 4 gêneros, sendo 3 deles, de possível toxigênicidade (*Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*) e um atoxigênico (*Mucor*) (Figura 1). Através da aplicação desses meios foi possível observar suas características de crescimento, bem como corroborar a presença de contaminação nas amostras de milho.

Vários autores relataram que os gêneros *Fusarium* (fungo de campo) e *Aspergillus* & *Penicillium* (fungos de armazenamento) têm sido os mais isolados no milho e seus produtos (Marques et al. 2009; Domenico et al. 2015). *Fusarium* - gênero mais importante no milho proveniente do campo, também preocupa quando suas espécies são toxigênicas (micotoxinas: fumonisinas, desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona). Suas toxinas podem persistir contaminando toda a cadeia alimentar, pois são resistentes a altas temperaturas (Gabriel et al. 2008; Scussel et al. 2018).

A contaminação dos grãos de milho pelas espécies *Fusarium* pode ser explicada pelo fato deste fungo infectar extensivamente certas porções do grão, principalmente o gérmen, além

dos tecidos externos do grão (Lazzari, 1997). Por outro lado, *Aspergillus* – suas espécies são consideradas iniciadoras de armazenamento de sementes e deterioração de grãos, podendo crescer com baixo teor de umidade (mc), seguido pelo *Penicillium* que necessita de mc um pouco maior (devido à atividade metabólica dos primeiros invasores). Ambos os gêneros de fungos são potencialmente toxigênicos (toxinas: aflatoxinas, ocratoxina A, citrinina, ácidos penicílico/ciclopiazônico) e a sua presença nas amostras de milho também é considerada preocupante, dada a possibilidade de produção dessas toxinas (Scussel et al. 2018). Quanto ao *Mucor* – geralmente está presente no solo, grãos, frutas e vegetais e são contaminantes comuns de locais onde os produtos são processados. Isso explica a presença deste gênero nas amostras (Scussel et al. 2018; Santos, 2018).

Figura 1 - Principais genótipos de fungos isolados de grãos de milho (*Zea mays* L.) naturalmente contaminados e suas características: (a) *Fusarium*, (b) *Aspergillus*, (c) *Penicillium* e (d) *Mucor*



Com referência aos diferentes meios de cultura utilizados *versus* comportamento dos fungos (Tabela 2), foi observado que somente os gêneros *Fusarium* e *Aspergillus* se desenvolveram em todos os meios. Já *Penicillium* e *Mucor* não foram capazes de se desenvolver no G<sub>25</sub>N e CAM (contendo nitrato de glicerol e coco em sua composição, respectivamente). Estudos realizados por Mezzomo et al. (2018) também relataram crescimento micelial de *Fusarium* isolado em MEA, além desse meio, Nelson et al. (1983) registraram a eficiência dos meios G<sub>25</sub>N e BDA para esse gênero. Foi observado que o *Fusarium* se desenvolveu também em meio de cultura CAM (mais comumente utilizado e específico para fungos de armazenamento - produtores de aflatoxina), inferindo-se que este meio também pode fornecer condições para o desenvolvimento desse fungo de campo. Samson et al. (2014) e Pitt, Hocking (2000) relataram que *Aspergillus* também cresce nos quatro meios utilizados no trabalho atual. Pitt e Hocking (2000) observaram que para o *Penicillium*, MEA e G<sub>25</sub>N forneceram nutrientes adequados para o seu crescimento, corroborando nosso estudo.

Tabela 2 - Comportamento de gêneros fúngicos de campo e armazenamento isolados de amostras de milho (*Zea mays* L.) em diferentes meios de cultura

Fungo isolado		Crescimento de fungos de milho em meio de cultura*			
Origem	Gênero	BDA <sup>a</sup>	G <sub>25</sub> N <sup>b</sup>	MEA <sup>c</sup>	CAM <sup>d</sup>
Campo	<i>Fusarium</i>	✓ <sup>e</sup>	✓	✓	✓
Armazenagem	<i>Aspergillus</i>	✓	✓	✓	✓
	<i>Penicillium</i>	✓	x	✓	x
	<i>Mucor</i>	✓	x	✓	x

<sup>a</sup>batata dextrose agar <sup>b</sup>czapek-dox 25% nitrato de glicerol <sup>c</sup>extrato de malte agar <sup>d</sup>agar de cocô <sup>e</sup>creceu <sup>f</sup>não creceu  
\*n=3

### 5.3.3 CONTROLE DO OA NO CRESCIMENTO FÚNGICO (DIÂMETRO)

Para o estudo do efeito antifúngico do OA contra os principais gêneros isolados de grãos de milho, foram selecionadas apenas os principais e abundantes fungos dos gêneros - *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Sua variação de diâmetro sob a presença de OA mensurato durante o período de crescimento das colônias e o seu índice de velocidade de crescimento micelial são apresentados na Tabela 3.

Quanto à ação inibitória do OA no diâmetro das colônias de fungos (a partir do disco central de 0,5 cm - ponto de inoculação), após as 72 h (3 dias de incubação) de crescimento, observamos uma diferença estatística ( $p < 0,5$ ) de crescimento para colônias do fungo de campo (*Fusarium*) quando comparada com o Controle a partir de 5% de óleo (Controle: 3,18 cm; Tratado: 5 = 2,90; 10 = 2,10; 20 = 1,80; 30 = 1,45 e 40% = 0,80 cm).

Para o fungo de armazenagem (*Aspergillus*), foram observadas diferenças estatísticas ( $p > 0,5$ ) com a quantidade de OA presente a partir de 2% de OA (GT: 2 = 0,76; 3 e 5 = 0,73; 10, 20, 30 e 40% = 0,80 cm) quando comparados ao Controle (GC: 3,43 cm). O gênero *Penicillium* por sua vez, apresentou diferença estatística apenas na porcentagem de 40% de OA (Controle: 1,00; Tratado: 40% = 0,77 cm).

Quanto ao CMT ao final das 72 h, foi possível observar que o mesmo sofreu variações. Para *Fusarium*, o crescimento total do Controle foi de 2,68 cm, sofrendo variações conforme as porcentagens de óleo. Os melhores resultados obtidos se deram na faixa de porcentagem de 3 a 40% (2,56 – 0,30 cm, respectivamente). O gênero *Aspergillus*, obteve resultado similar ao *Fusarium*, tendo os melhores resultados nas porcentagens de 2 a 40% (0,26 a 0,30 cm, respectivamente). Por outro lado, o *Penicillium* teve grande variações, porem as mais eficientes foram de 10 a 40% (0,50 a 0,23 cm, respectivamente).

Para todos os gêneros, foi observado uma diminuição de velocidade de crescimento micelial mais acentuada nas maiores concentrações de OA.

Farias et al. (2016) observaram efeito fungitóxico sobre o fungo *Periconia*, sugerindo que o OA pode substituir eficientemente o fungicida no controle deste fungo. Silva e outros. (2019) utilizaram cepas de *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* sp., como resultado tiveram redução em todas as concentrações testadas (10, 20, 30 e 40% de OA) para *Fusarium* e *Penicillium* sp. quando comparado ao Controle. Esses achados se assemelham aos nossos resultados. Menezes et al. (2009) e Oliveira (2012) realizaram estudos com OA, onde não conseguiram demonstrar atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* em nenhuma das concentrações (100, 32, 16, 8, 4 e 2%) estudado.

Diniz et al. (2005) avaliaram a atividade antifúngica do óleo contra o *Sclerotinia minor*. Os resultados demonstraram que o OA foi capaz de inibir o crescimento do fungo somente na concentração mínima de 200 µL/ 10 mL de meio. Sousa et al. (2012) avaliaram a atividade antifúngica do óleo contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* nas concentrações (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0%). Os resultados demonstraram que o OA apresentou capacidade de inibir o crescimento do fungo à medida que sua concentração foi aumentada, apresentando resultados significativos a 1%. Hora (2009) avaliou a atividade antifúngica do óleo contra o fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Os resultados demonstraram que todas as soluções do óleo testadas inibiram significativamente a germinação de conídios.

Quanto à formação de novas colônias por esporos aéreos, da mesma forma que nosso experimento, Silva et al. (2019) observaram que apenas os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* apresentaram resistência com desenvolvimento de novas colônias. O comportamento de crescimento de novas colônias entre os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* sp. pode ser explicado por suas diferenças nas características morfológicas e comportamento de suas colônias (contidas ou se espalhando). Embora *Fusarium* tenha um micélio altamente desenvolvido e felpudo, seus conidióforos são finos, simples e curtos, ramificados irregularmente. Por outro lado, *Aspergillus* possuem micélio septado e ramificado, seus conidióforos são simples, eretos e unicelulares com conídios esféricos. *Penicillium* também possui micélio septado semelhante ao *Aspergillus*, com conidióforos aéreos septados, que podem ou não ser ramificados (com conídios unicelulares) (Scussel et al. 2018). Como a característica das colônias de *Aspergillus* e *Penicillium* são aveludadas e filamentosas, podem se espalhar com mais facilidade (formando novas colônias longe do ponto de inoculação),

corroborando o resultado obtido. Pelo contrário, o *Fusarium* é filamentosos como o algodão, os seus conídios não se espalham tão facilmente por uma grande área.

A descontaminação de grãos, sementes e frutos é importante para reduzir a contaminação por patógenos e microrganismos toxigênicos. Dentre os tratamentos, determinados óleos de plantas medicinais são uma alternativa viável para o controle de patógenos sem resíduos químicos ou efeitos deletérios ao meio ambiente e ao produto. Neste estudo, o efeito do OA apresentou resultados significativos a 1% em relação às demais concentrações utilizadas, ou seja, o OA inibe o crescimento do fungo à medida que sua concentração é aumentada.

Vários estudos tem sido realizados com extratos e óleos, obtendo excelentes resultados. Contudo, nem todos os óleos essenciais se comportam como inibidores diretos de algumas estirpes fúngicas. Embora produzam camada protetora física sobre o grão, não necessariamente confere efeito fungistático ou fungitóxico sobre estes fungos (Sousa et al. 2012).

Tabela 3 - Crescimento micelial\* e Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos fungos *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* tratados com diferentes concentrações de Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.)

Origem	Fungo	Tratamento OA (%)	Crescimento micelial (cm)					
			Tempo (horas)					
	Gênero		Início	24	48	72	CMT*	IVCM**
<b>CAMPO</b>								
	<i>Fusarium</i>	GC	0,50 <sup>aD</sup>	1,10 <sup>aC</sup>	2,15 <sup>aB</sup>	3,18 <sup>abA</sup>	2,68 <sup>b</sup>	0,89 <sup>a</sup>
		0,2	0,50 <sup>aD</sup>	1,06 <sup>aC</sup>	2,26 <sup>aB</sup>	3,35 <sup>abA</sup>	2,29 <sup>d</sup>	0,95 <sup>a</sup>
		0,4	0,50 <sup>aD</sup>	1,05 <sup>aC</sup>	2,23 <sup>aB</sup>	3,40 <sup>aA</sup>	2,90 <sup>a</sup>	0,96 <sup>a</sup>
		0,6	0,50 <sup>aD</sup>	1,10 <sup>aC</sup>	2,30 <sup>aB</sup>	3,40 <sup>aA</sup>	2,90 <sup>a</sup>	0,96 <sup>a</sup>
		0,8	0,50 <sup>aD</sup>	1,10 <sup>aC</sup>	2,21 <sup>aB</sup>	3,38 <sup>abA</sup>	2,88 <sup>a</sup>	0,96 <sup>a</sup>
		1,0	0,50 <sup>aD</sup>	1,11 <sup>aC</sup>	2,20 <sup>abB</sup>	3,26 <sup>abA</sup>	2,76 <sup>b</sup>	0,92 <sup>a</sup>
		2,0	0,50 <sup>aD</sup>	0,63 <sup>bC</sup>	2,30 <sup>aB</sup>	3,10 <sup>abA</sup>	2,69 <sup>b</sup>	0,86 <sup>a</sup>
		3,0	0,50 <sup>aD</sup>	0,65 <sup>bC</sup>	1,80 <sup>bcB</sup>	3,06 <sup>abA</sup>	2,56 <sup>c</sup>	0,85 <sup>a</sup>
		5,0	0,50 <sup>aD</sup>	0,63 <sup>bC</sup>	1,70 <sup>cB</sup>	2,90 <sup>bA</sup>	2,40 <sup>d</sup>	0,80 <sup>a</sup>
		10,0	0,50 <sup>aC</sup>	0,80 <sup>bB</sup>	0,80 <sup>dB</sup>	2,10 <sup>cA</sup>	1,60 <sup>e</sup>	0,53 <sup>b</sup>
		20,0	0,50 <sup>aC</sup>	0,75 <sup>bB</sup>	0,80 <sup>dB</sup>	1,80 <sup>cdA</sup>	1,30 <sup>f</sup>	0,43 <sup>b</sup>
		30,0	0,50 <sup>aC</sup>	0,70 <sup>bB</sup>	0,80 <sup>dB</sup>	1,45 <sup>dA</sup>	0,95 <sup>g</sup>	0,31 <sup>b</sup>
	40,0	0,50 <sup>aB</sup>	0,70 <sup>bA</sup>	0,70 <sup>dA</sup>	0,80 <sup>eA</sup>	0,30 <sup>h</sup>	0,10 <sup>b</sup>	
Total de amostras: 10								
<b>ARMAZENAGEM</b>								
	<i>Aspergillus</i>	GC	0,50 <sup>aD</sup>	1,08 <sup>aC</sup>	2,33 <sup>aB</sup>	3,43 <sup>aA</sup>	2,93 <sup>b</sup>	0,97 <sup>a</sup>
		0,2	0,50 <sup>aD</sup>	0,89 <sup>bcC</sup>	2,38 <sup>aB</sup>	3,16 <sup>abA</sup>	2,66 <sup>c</sup>	0,88 <sup>a</sup>
		0,4	0,50 <sup>aD</sup>	0,94 <sup>abC</sup>	2,20 <sup>abB</sup>	2,90 <sup>bA</sup>	2,40 <sup>d</sup>	0,80 <sup>a</sup>
		0,6	0,50 <sup>aD</sup>	0,90 <sup>bcC</sup>	2,16 <sup>abB</sup>	3,16 <sup>abA</sup>	2,66 <sup>c</sup>	0,88 <sup>a</sup>
		0,8	0,50 <sup>aD</sup>	0,90 <sup>bcC</sup>	2,26 <sup>abB</sup>	3,53 <sup>aA</sup>	3,03 <sup>a</sup>	1,01 <sup>a</sup>
		1,0	0,50 <sup>aD</sup>	0,90 <sup>bcC</sup>	2,08 <sup>bB</sup>	3,58 <sup>aA</sup>	3,08 <sup>a</sup>	1,02 <sup>a</sup>
		2,0	0,50 <sup>aB</sup>	0,70 <sup>deA</sup>	0,66 <sup>cA</sup>	0,76 <sup>cA</sup>	0,26 <sup>f</sup>	0,08 <sup>b</sup>
		3,0	0,50 <sup>aB</sup>	0,68 <sup>deA</sup>	0,70 <sup>cA</sup>	0,73 <sup>cA</sup>	0,23 <sup>f</sup>	0,07 <sup>a</sup>

	5,0	0,50 <sup>aB</sup>	0,77 <sup>dA</sup>	0,70 <sup>cA</sup>	0,73 <sup>cA</sup>	0,23 <sup>f</sup>	0,07 <sup>a</sup>
	10,0	0,50 <sup>aC</sup>	0,75 <sup>cdeB</sup>	0,75 <sup>cB</sup>	0,80 <sup>cA</sup>	0,30 <sup>e</sup>	0,10 <sup>b</sup>
	20,0	0,50 <sup>aC</sup>	0,70 <sup>deB</sup>	0,75 <sup>cB</sup>	0,80 <sup>cA</sup>	0,30 <sup>e</sup>	0,10 <sup>b</sup>
	30,0	0,50 <sup>aB</sup>	0,60 <sup>eA</sup>	0,70 <sup>cA</sup>	0,80 <sup>cA</sup>	0,30 <sup>e</sup>	0,10 <sup>b</sup>
	40,0	0,50 <sup>aB</sup>	0,60 <sup>eA</sup>	0,70 <sup>cA</sup>	0,80 <sup>cA</sup>	0,30 <sup>e</sup>	0,10 <sup>b</sup>
Total de amostras: 10							
<i>Penicillium</i>	GC	0,50 <sup>aD</sup>	0,81 <sup>aC</sup>	0,91 <sup>aB</sup>	1,00 <sup>abcA</sup>	0,50 <sup>e</sup>	0,16 <sup>b</sup>
	0,2	0,50 <sup>aD</sup>	0,66 <sup>bC</sup>	0,78 <sup>abcdB</sup>	0,90 <sup>bcdA</sup>	0,40 <sup>g</sup>	0,13 <sup>b</sup>
	0,4	0,50 <sup>aD</sup>	0,68 <sup>bC</sup>	0,80 <sup>abcdB</sup>	0,93 <sup>bcdA</sup>	0,43 <sup>f</sup>	0,14 <sup>b</sup>
	0,6	0,50 <sup>aD</sup>	0,63 <sup>bC</sup>	0,85 <sup>abcB</sup>	1,01 <sup>abA</sup>	0,51 <sup>d</sup>	0,17 <sup>b</sup>
	0,8	0,50 <sup>aD</sup>	0,58 <sup>bC</sup>	0,86 <sup>abB</sup>	1,03 <sup>abA</sup>	0,53 <sup>c</sup>	0,17 <sup>b</sup>
	1,0	0,50 <sup>aD</sup>	0,58 <sup>bC</sup>	0,91 <sup>aB</sup>	1,16 <sup>aA</sup>	0,66 <sup>a</sup>	0,22 <sup>a</sup>
	2,0	0,50 <sup>aD</sup>	0,66 <sup>bC</sup>	0,90 <sup>abB</sup>	1,05 <sup>abA</sup>	0,55 <sup>b</sup>	0,18 <sup>b</sup>
	3,0	0,50 <sup>aD</sup>	0,60 <sup>bC</sup>	0,95 <sup>aB</sup>	1,16 <sup>aA</sup>	0,66 <sup>a</sup>	0,22 <sup>a</sup>
	5,0	0,50 <sup>aD</sup>	0,66 <sup>bC</sup>	0,90 <sup>abB</sup>	1,00 <sup>abcA</sup>	0,50 <sup>e</sup>	0,16 <sup>b</sup>
	10,0	0,50 <sup>aB</sup>	0,70 <sup>abA</sup>	0,70 <sup>bcdA</sup>	0,80 <sup>cdA</sup>	0,30 <sup>h</sup>	0,10 <sup>c</sup>
	20,0	0,50 <sup>aC</sup>	0,65 <sup>bB</sup>	0,75 <sup>abcdB</sup>	0,80 <sup>cdA</sup>	0,30 <sup>h</sup>	0,10 <sup>c</sup>
	30,0	0,50 <sup>aC</sup>	0,60 <sup>bB</sup>	0,60 <sup>dB</sup>	0,80 <sup>cdA</sup>	0,30 <sup>h</sup>	0,10 <sup>c</sup>
	40,0	0,50 <sup>aC</sup>	0,65 <sup>bB</sup>	0,65 <sup>cdB</sup>	0,77 <sup>dA</sup>	0,23 <sup>i</sup>	0,09 <sup>c</sup>
Total de amostras: 10							

letras verticais minúsculas e horizontais maiúsculas iguais não diferem significativamente no teste de Tukey a 5%  
GC = Grupo Controle (sem OA)

### 5.3.4 EFEITO OA EM FUNGOS DO GRÃO DE MILHO

A Tabela 4 apresenta os dados referentes ao efeito do OA aplicado diretamente no grão, quanto ao controle de crescimento de fungos nos grãos de milho naturalmente contaminados. Como esperado, os GCs (sem tratamento com OA) apresentaram grãos de milho altamente embolorados após o período de incubação quando comparado com os GTs. No GC, os grãos de todas as amostras apresentaram crescimento fúngico (correspondendo a 100% dos grãos). Nos GTs, por sua vez, foi registrado redução de crescimento em 3 das 10 amostras utilizadas (correspondendo a 30%). As amostras de nº 5 e 10 apresentaram 93,3% de crescimento, já a amostra nº 8 obteve efeito antifúngico parcial, onde 53,3% dos seus grãos apresentando proliferação fúngica.

A aplicação de tratamentos com óleos em grãos, representa uma forma branda e, cada vez mais indispensável no controle de patógenos. Dentre os tratamentos, o uso de determinados óleos de plantas medicinais tem se mostrado uma alternativa viável, apresentando potencial de controle de fitopatógenos, sem deixar resíduos químicos ou efeitos deletérios ao meio ambiente. Estudos indicam que o OA tem sido eficiente na prevenção / descontaminação de algumas cepas fúngicas, no entanto não apresentando tanta eficiência para outras. Sugerindo assim, que determinados gêneros e/ou espécies fúngicas apresentam diferentes graus de resistência ou susceptibilidade frente a tratamentos com este óleo e condições aplicadas.

Tabela 4 - Efeito do Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) sobre o crescimento fúngico em grãos de milho (*Zea mays* L.) naturalmente contaminados, sua redução fúngica e gêneros fúngicos resistentes / susceptíveis ao tratamento

Grão de milho		Efeito antifúngico do OA			Gêneros fúngicos (pós-tratamento)		
Nº	Umidade (%)	$\bar{x}^*$ e DP**		Redução fúngica (%)	Resistentes		Susceptíveis
		GC <sup>a</sup>	GT <sup>b</sup>				
01	13,7 ± 0,2%	100±0,00 <sup>a</sup>	100±0,00 <sup>a</sup>	SR***	Campo	<i>Fusarium</i>	NI <sup>c</sup>
					Armazenagem	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Rhizopus</i>	NI NI NI
02	13,1 ± 0,1%	100±0,00 <sup>a</sup>	100±0,00 <sup>a</sup>	SR	Campo	<i>Fusarium</i>	NI
					Armazenagem	<i>Aspergillus</i>	NI
03	13,9 ± 0,1%	100±0,00 <sup>a</sup>	100±0,00 <sup>a</sup>	SR	Campo	<i>Fusarium</i>	NI
					Armazenagem	<i>Aspergillus</i> <i>Rhizopus</i>	NI NI
04	13,8 ± 0,2%	100±0,00 <sup>a</sup>	100±0,00 <sup>a</sup>	SR	Campo	<i>Aspergillus</i>	NI
					Armazenagem	<i>Mucor</i> -	NI <i>Penicillium</i>
05	12,7 ± 0,1%	100±0,00 <sup>a</sup>	93,3±1,15 <sup>b</sup>	6,7	Campo	<i>Aspergillus</i>	NI
					Armazenagem	<i>Rhizopus</i> -	NI <i>Penicillium</i>
06	13,1 ± 0,2%	100±0,00 <sup>a</sup>	100±0,00 <sup>a</sup>	SR	Campo	<i>Fusarium</i>	NI
					Armazenagem	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Rhizopus</i>	NI NI NI
07	14,2 ± 0,1%	100±0,00 <sup>a</sup>	100±0,00 <sup>a</sup>	SR	Campo	<i>Aspergillus</i>	NI
					Armazenagem	<i>Mucor</i> -	NI <i>Rhizopus</i>
08	12,3 ± 0,1%	100±0,00 <sup>a</sup>	53,3±1,15 <sup>c</sup>	46,7	Campo	<i>Fusarium</i>	NI
					Armazenagem	<i>Aspergillus</i> -	NI <i>Rhizopus</i>
09	14,1 ± 0,2%	100±0,00 <sup>a</sup>	100±0,00 <sup>a</sup>	SR	Campo	<i>Fusarium</i>	NI
					Armazenagem	<i>Penicillium</i> -	NI <i>Mucor</i>
10	12,8 ± 0,1%	100±0,00 <sup>a</sup>	93,3±1,15 <sup>b</sup>	6,7	Campo	NI	<i>Fusarium</i>
					Armazenagem	NI	<i>Aspergillus</i>
Total d amostras: 10						-	

\*média \*\*desvio padrão \*\*\*sem redução fúngica <sup>a</sup>Grupo Controle <sup>b</sup>Grupo Tratado <sup>c</sup>não identificado  
letras horizontais minúsculas iguais não diferem significativamente no teste de Tukey a 5%

Com relação a identificação dos fungos isolados, a presença de cinco diferentes gêneros foram registrados, sendo eles de Campo (*Fusarium*), de armazenagem (*Aspergillus*, *Penicillium*), dentre outros (*Mucor* e *Rhizopus*). Os mesmos mostraram ser resistentes ao tratamento, porém com menor crescimento micelial.

Cabe salientar que, a presença dos gêneros – *Mucor* e *Rhizopus*, dificultou a identificação e observação do efeito do OA frente aos demais fungos, visto que as suas colônias algodonosas e altas se espalham rapidamente pelo substrato, dificultando a observação das outras colônias.

Algumas espécies dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* podem produzir metabólitos secundários que possuem propriedades tóxicas, conhecidos como micotoxinas (Welke et al. 2009). A ingestão destas substâncias tóxicas mesmo em pequenas quantidades de forma contínua pode levar ao seu acúmulo no organismo causando uma intoxicação (Scussel; Savi; Kluczkovvki, 2018). Pode afetar muitos órgãos e sistemas, principalmente o fígado, rins, sistema nervoso, endócrino e imunitário (Freire et al. 2007). Dentre algumas das toxinas produzidas por algumas espécies dos gêneros fúngicos presentes, estão as aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas, tricotecenos e zearalenona (Scussel; Savi; Kluczkovvki, 2018).

A presença de *Aspergillus* provavelmente se deve às condições de armazenamento (temperatura ambiente) do grão, que o predispõe ao ataque destes fungos (Mondego et al. 2014). Como o *Aspergillus* 'é considerado fungo *overlapping* – cresce tanto na pre- quanto na pos-colheita (transporte, armazenagem) ele poderia ter se desenvolvido durante o percurso, antes de chegar aos silos. Em geral, por serem fungos de armazenagem, os mesmos causam deterioração das sementes, resultando na redução da germinação e vigor, apodrecimento, modificação da cor bem como enrugamento (Riverberi et al. 2010).

Em sementes, o *Fusarium*, é também tido como responsável pela redução da germinação, descoloração, formação de manchas, apodrecimentos, mofos e alterações bioquímicas, inclusive. É responsável por causar doenças como a podridão do colo e raízes, uma vez que reduz drasticamente a produção (Gomes et al. 2008; Silva et al. 2014).

É importante enfatizar que, os esporos fúngicos estudados (resistência e susceptibilidade ao OA) foram colocados em condições ideais para seu desenvolvimento. Ou seja, em meio de cultura típico para fungos em geral (BDA) e oferecidas condições ideais de desenvolvimento (alta umidade no meio e temperatura de incubação, além de ambiente fechado em placa e estufa). Porém, quando os grãos secos são armazenados na prática (armazenagem comercial), esses estão sob umidade controladas, recebem aeração e estão em temperaturas baixas.

### 5.3.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM OA NO GRÃO – CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM COMERCIAL

As características dos grãos de milho (grupos: GC & GT) e sua relação ao tratamento antifúngico durante a armazenagem (sob condições comerciais, por quatro semanas), foi avaliada de acordo com as Normas oficiais (IN60, MAPA, 2011).

Entre os vários parâmetros estabelecidos pela Classificação de Grãos, estão itens relacionados a possível desenvolvimento de microrganismos (fungos / bactérias), tais como: grãos ardidos, mofados, fermentados, incluindo o teor de umidade. As Figuras 4 e 5 apresentam os dados obtidos pela Classificação de Grãos para teor de umidade (%) e parâmetros dos grãos relacionados ao desenvolvimento / formação de fungos (presença de colônias / germinação de esporos), respectivamente, e sua relação com o tratamento antifúngico NATURAL (GC & GT).

Quanto ao efeito da armazenagem no teor de umidade durante 30 dias para o GC, essa variou de 13,04 a 12,25%. Por outro lado, como esperado, devido provavelmente a micro-camada de Óleo, no GT, a umidade se manteve, com pequena variação (13,04 a 13,62%) até final do período de armazenagem. A IN 60/2011 estabelece teor de umidade máximo 14% (MAPA, 2011).

Efeito da armazenagem na qualidade dos grãos e fungos: embora, os parâmetros da Classificação de Grãos incluam a identificação de diversos outros DEFEITOS (grãos quebrados, carunchados, chochos, imaturos, matérias estranhas, impurezas) além dos diretamente relacionados a presente pesquisa – foram separados para avaliação os dados associados a deterioração. A Figura 5 apresenta a porcentagem de grãos mofados, fermentados e ardidos ao longo do tempo.

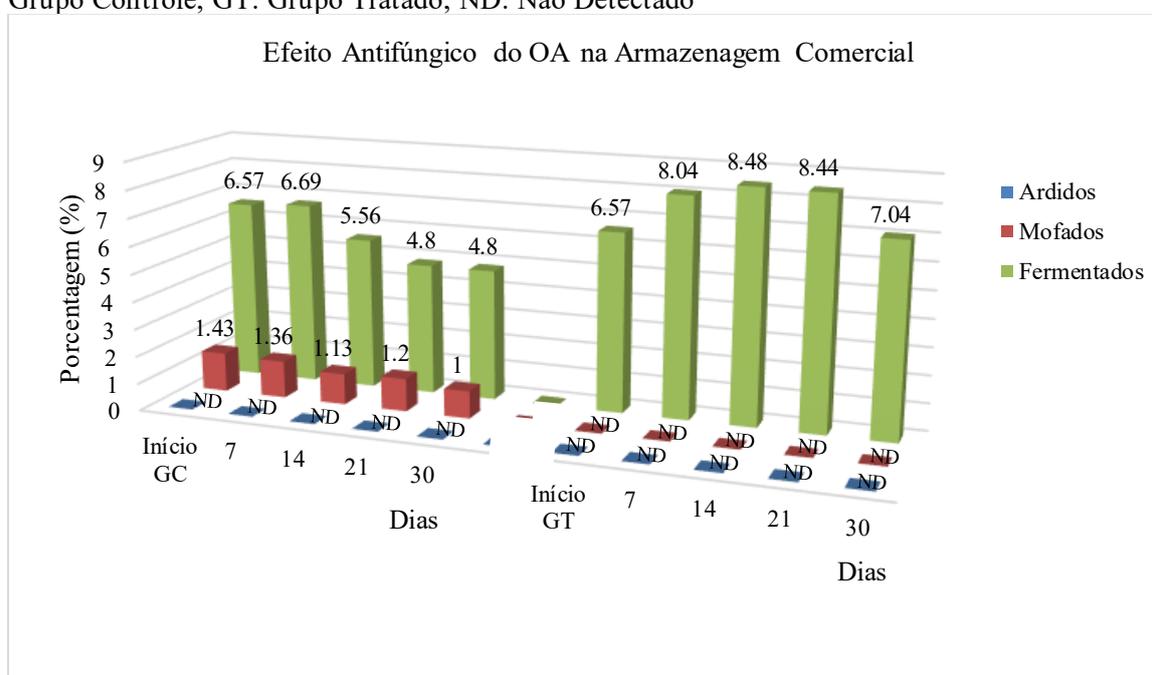
Segundo IN60/2011 (MAPA, 2011), sobre o padrão oficial de classificação de milho, segue definições: (a) **ardido**: grãos ou pedaços de grãos que apresentam escurecimento total (por ação de calor, umidade ou fermentação avançada) atingindo a totalidade da massa de grãos. (b) **Fermentado**: grãos ou pedaços de grãos que apresentam escurecimento parcial do gérmen ou do endosperma provocado por processo fermentativo, sendo também considerado como fermentado a plúmula roxa – *não são considerados grãos defeituosos*. (c) **Mofado**: grãos ou pedaços de grãos que apresentam **contaminação fúngica** (mofo ou bolor) visíveis a olho nu.

As condições controladas da armazenagem, incluindo temperatura baixa 19°C (juntamente com a proteção antifúngica e envoltório da micro-camada lipídica do AO) levou a manutenção de sua qualidade (Oliveira; Lima, 2015).

Figura 2 – Variação no teor de **UMIDADE** de grãos de milho (*Zea mays* L.) seco, sob condições de armazenagem comercial tratados com o antifúngico Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). GC: Grupo Controle, GT: Grupo Tratado



Figura 5 - Avaliação da **QUALIDADE** de grãos de milho (*Zea mays* L.) seco, sob condições de armazenagem comercial tratados com o antifúngico Oleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). GC: Grupo Controle, GT: Grupo Tratado, ND: Não Detectado

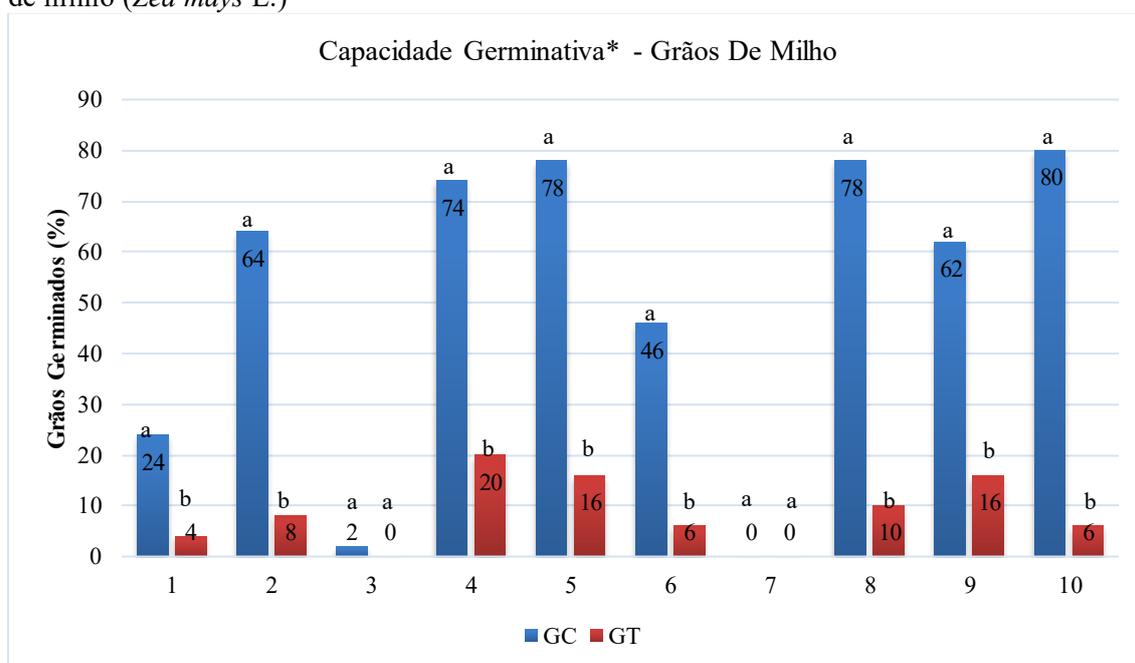


### 5.3.6 EFEITO DO TRATAMENTO COM OA NO GRÃO - CAPACIDADE GERMINATIVA

A aplicação do OA interferiu na qualidade fisiológica das sementes dos grãos de milho, especialmente em oito das amostras (1, 2, 4, 5, 6, 8, 9 e 10 - GC: 24, 64, 74, 78, 46, 78, 62 e 80% de grãos germinados; GT: 4, 8, 20, 16, 6, 10, 16 e 6% de grãos germinados) como apresentado na Figura 2. No processo germinativo, podem penetrar, com a umidade local,

algumas substâncias alelopáticas capazes de inibir ou retardar a multiplicação ou crescimento das células, podendo assim retardar a germinação (Gonzalez et al. 2002), dessa maneira, os dados do presente trabalho corroboram com os dados do referido autor. Por outro lado, Silva et al. (2016) avaliaram a eficiência de óleos no controle *in vitro* de fungos fitopatogênicos do milho. Sobre a germinação das sementes, foi observado diferença de comportamento entre os fatores e a testemunha. Para os tratamentos com o OA à 5%, não houve diferença significativa. Farias et al. (2016) também não foi observado interferência do óleo na qualidade fisiológica de feijão macassar.

Figura 4 - Efeito do Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) na capacidade germinativa de grãos de milho (*Zea mays* L.)



\*média

letras horizontais minúsculas iguais não diferem significativamente no teste de Tukey a 5%

Os efeitos específicos dos óleos na germinação de grãos podem variar dependendo do tipo de óleo, da concentração utilizada e das condições ambientais em que as sementes estão sendo germinadas (Benevides; Lopes, 2017; Duarte; Menezes, 2015). Alguns óleos essenciais podem promover a germinação, enquanto outros podem inibir ou retardar esse processo. A capacidade dos óleos essenciais de influenciar a germinação de sementes está relacionada à sua composição química e concentração (Singh et al. 2020; Pavela; Benelli, 2016). Alguns componentes dos óleos podem ter efeitos estimulantes na germinação, como alguns monoterpenos e sesquiterpenos, que são encontrados em óleos essenciais de plantas como hortelã-pimenta e manjeriço. Por outro lado, certos compostos presentes em óleos essenciais,

como aldeídos fenólicos e fenóis, podem ter propriedades inibitórias sobre a germinação (Fiorini et al. 2013; Zheljzakov et al. 2013).

Não há evidências claras na literatura de que o óleo de andiroba tenha efeitos diretos na germinação de grãos de milho. A germinação de sementes, como as de milho, é um processo complexo que pode ser influenciado por vários fatores, incluindo temperatura, umidade, luz, nutrientes e presença de substâncias químicas no ambiente. Embora o OA possa ter efeitos sobre organismos como fungos e insetos que podem afetar indiretamente a germinação das sementes, não há estudos específicos que demonstrem sua interferência direta na germinação de grãos de milho.

### 5.3.7 EFEITO DO TRATAMENTO COM OA NO GRÃO - ATRIBUTOS SENSORIAIS

Os dados obtidos pelos painelistas na avaliação sensorial (atributos: cor, aroma e aparência - de 1 a 7), dos grãos de milho para os grupos GC e GT estão na Figura 3, e a média com desvio padrão dos resultados na Tabela 5. Os resultados revelaram variações na percepção dos painelistas entre os dois grupos, com uma inclinação positiva para certos atributos.

A média de cor para os grãos do GC foi de 3,75, indicando uma tendência para o amarelo, enquanto para o GT foi de 3,00, sugerindo uma cor mais intensa de amarelo. Isso aponta para uma consistência comparável nas respostas dos painelistas em ambos os grupos.

Em relação ao aroma, os grãos do GC tiveram uma média de 4,25, indicando um aroma predominantemente indiferente, enquanto o GT teve uma média de 3,50, apontando para uma leve tendência a aromas indesejáveis. Isso sugere uma maior variabilidade nas percepções de aroma no grupo tratado.

Quanto à aparência, os grãos do GC apresentaram uma média de 4,13, próximo de "indiferente", enquanto os do GT tiveram uma média de 5,13, indicando uma leve preferência pelos grãos tratados em termos de aparência. Isso sugere uma avaliação mais consistente da aparência no grupo tratado.

Os resultados indicam que o tratamento com óleo de andiroba influenciou as percepções sensoriais dos painelistas em relação à cor, aroma e aparência dos grãos de milho. Houve uma intensificação da cor, um leve desvio no aroma e uma preferência sutil na aparência em comparação com o grupo controle. Essas mudanças podem ser atribuídas às interações entre o óleo de andiroba e os grãos de milho, afetando tanto a aparência visual quanto as características organolépticas dos grãos (Costa; Silva, 2017; Silva; Sousa, 2018). Vale ressaltar que as percepções variaram entre os painelistas, com diferentes idades e critérios de avaliação,

desde adolescentes até pessoas mais experientes. Esses resultados são relevantes para considerar o uso de óleo de andiroba em grãos de milho sem comprometer suas características sensoriais, o que pode impactar na aceitação pelo consumidor e em potenciais aplicações industriais.

Figura 5 - Avaliação SENSORIAL dos atributos (a) cor, (b) aroma e (c) aparência de grãos de milho (*Zea mays* L.) seco, tratados com antifúngico Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) - GC: Grupo Controle e GT: Grupo Tratado \*Nota: milho denticado, Grupo semiduro, Classe amareloa, Tipo 2

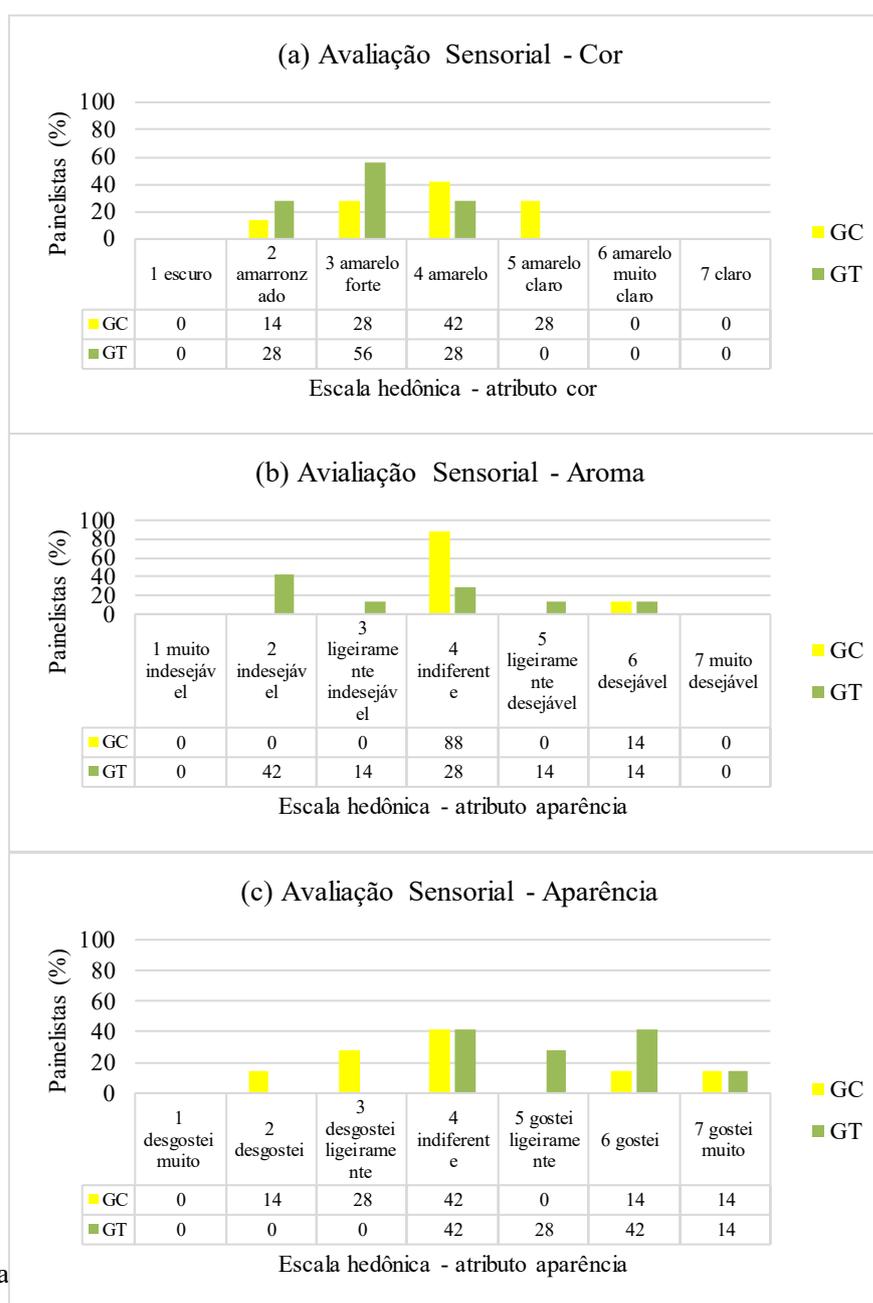


Tabela 5 - Avaliação

milho (*Zea mays* L.) seco, tratados com antifúngico Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.)

Atributo	$\bar{x}^*$ e DP**	
	GC	GT
Cor	3,75±0,84 <sup>a</sup>	3,00±0,76 <sup>a</sup>

<b>Aroma</b>	4,25±0,71 <sup>a</sup>	3,50±1,51 <sup>a</sup>
<b>Aparência</b>	4,13±1,65 <sup>a</sup>	5,13±1,13 <sup>a</sup>

\*média \*\*desvio padrão \*\*\*letras horizontais minúsculas iguais não diferem significativamente no teste de Tukey a 5%

## 5.4 CONCLUSÃO

Dos grãos de milho testados (naturalmente contaminados) os gêneros mais frequentes isolados foram os classificados como fungos de campo (*Fusarium*) e armazenagem (*Aspergillus*, *Penicillium* e *Mucor*).

Como esperado, quanto aos diferentes meios de cultura (selecionados para avaliar o OA em meio específico para cada gênero) e comportamento desses fungos, todos se desenvolveram em BDA, MEA, G<sub>25</sub>N e CAM, exceto *Penicillium* e *Mucor* (cresceram apenas em BDA e MEA)

Com relação à inibição do OA no diâmetro das colônias de fungos foi observada diferença estatística ( $p < 0,5$ ) de crescimento da colônia para o fungo de campo *Fusarium* quando comparado com o Controle a partir de 5% de óleo (Controle: 3,18 cm; Tratado: 5 = 2,90; 10 = 2,10; 20 = 1,80; 30 = 1,45 e 40% = 0,80 cm). Já para os fungos de armazenagem *Aspergillus* e *Penicillium*, foi observada diferenças estatísticas ( $p > 0,5$ ) a partir de 2% (Controle: 3,43 cm; Tratado: 2 = 0,76; 3 e 5 = 0,73; 10, 20, 30 e 40% = 0,80 cm) e 40% (Controle: 1,00; Tratado: 40% = 0,77 cm) de OA quando comparados com o controle, respectivamente. Acerca do crescimento micelial total, ao final das 72h, foram observadas variações: para *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, os melhores resultados obtidos se deram nas porcentagens crescentes de 3 a 40% (2,56 a 0,30 cm), 2 a 40% (0,26 a 0,30 cm), e 10 a 40% (0,50 a 0,23 cm), respectivamente. Para todos os gêneros, foi observado redução de IVC, mais acentuada nas maiores concentrações de OA.

O tratamento com OA diretamente sobre o grão de milho, não obteve os resultados esperados, tendo apenas 3 amostras com redução fúngica chegando próximo da metade (de 6,7 a 46,7 %). Porém, é importante enfatizar que, os esporos fúngicos estudados, foram colocados em condições ideais para seu desenvolvimento (meio de cultura típico para fungos em geral, alta umidade no meio e temperatura de incubação, além de ambiente fechado em placa e estufa), já quando os grãos secos são armazenados comercialmente, esses estão sob umidade controladas, recebem aeração e estão em temperaturas baixas. Quanto à susceptibilidade, o

efeito antifúngico do Óleo sobre o grão, não apresentou efeito inibitório frente a algumas cepas de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* e *Rhizopus*. A ineficácia observada neste estudo não anula a possibilidade de ação do OA em outros microrganismos, fungos filamentosos ou leveduras e até mesmo outras espécies dos fungos utilizados, assim como outras possíveis formas de aplicação.

A adição de óleo de andiroba aos grãos armazenados comercialmente manteve a umidade e preservou a qualidade durante 30 dias, devido à microcamada de óleo presente no GT. A aplicação do OA interferiu na capacidade germinativa das sementes de milho, impedindo e / ou retardando a germinação. Contudo, essa qualidade é esperada em SEMENTES, porém, quando considerada para o GRÃO utilizado como alimento ou matéria prima para processamento, a germinação é considerada desnecessária, inclusive reduz qualidade do milho no topo de silos para futura comercialização.

Os resultados sensoriais indicaram que o tratamento com OA influenciou as percepções dos painelistas, onde ocorreu uma intensificação da cor, um leve desvio no aroma e uma preferência sutil na aparência em comparação com o grupo controle. Esses resultados são relevantes para considerar o uso de óleo de andiroba em grãos de milho sem comprometer suas características sensoriais, o que pode impactar na aceitação pelo consumidor e em potenciais aplicações industriais.

Se faz necessário o desenvolvimento de trabalhos futuros que busquem detalhar a logística e a implementação desses métodos em escala piloto em Armazéns ou Entrepósitos de comercialização de grãos, bem como aprimoramento para sua aplicação em produtos orgânicos.

## REFERÊNCIAS

APHA, American Public Health Association (2015). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5ª ed. Ed: Salfinger e Tortorello. MAPA, Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Decree No. 6,268, of November 22, 2007, of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Regulates Law No. 9,972 of May 25, 2000, which institutes the classification of plant products, their by-products and wastes of economic value, and other measures. Official Diary of the Union, 2007.

BERJAK, P. Report of the seed storage committee working group on the effects of storage fungi on seed viability. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 12, p. 233-253, 1984.

BENEVIDES, C. M. J.; LOPES, P. S. N. Influence of essential oils on seed germination and seedling growth. **International Journal of Environmental & Agriculture Research**, 3(5), 78-85, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 365p, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle de pragas durante o armazenamento de milho**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Food safety issues and the microbiology of cereals and cereal products. **Microbiologically safe foods**, p. 315-335, 2009.

CHRIST, D.; SAVI, G. D.; SCUSSEL, V. M. Effectiveness of ozone gas in raw and processed food for fungi and mycotoxin decontamination—a review. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 326-348, 2016.

COSTA, C. F.; SILVA, J. P. Impacto de óleos vegetais na coloração de alimentos. **Journal of Food Science**, 42(3), 122-130, 2017.

DINIZ SPSS, UTUMI H, BONZANINI F, BUENO MS. Bioatividade de plantas medicinais no controle de Sclerotinia isolado de Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 2005;7(2):22-5.

DOMENICO, A. S. D. et al. Análise de trilha da contaminação por aflatoxinas em grãos de milho armazenados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, p. 441-449, 2015.

DUARTE, M. C.; MENEZES, F. S. Evaluation of the effects of essential oils on the germination and growth of agricultural crops. **Agricultural Sciences**, 6(10), 103-112, 2015.

FARIAS, O., NASCIMENTO, L. C., OLIVEIRA, F. S., SANTOS, M. D. R., & BRUNO, R. L. A. Óleo essencial de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf) sobre a sanidade e fisiologia de sementes de feijão macassar (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 18, n. 3, p. 629-635, 2016.

FIORINI, D., et al. Essential oils: Their potential use in agriculture and prospects for bioactivity against plant pathogenic fungi and germination. **Acta Horticulturae**, 1002, 177-182, 2013.

FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in mycology**, v. 49, n. 1, p. 1-174, 2004.

GABRIEL, L. C. et al. Evaluation of resistance of popcorn maize genotypes to fumonisin accumulation and fusarium ear rot. **Summa Phytopathologica**, v. 44, p. 286-288, 2018.

GOMES, D.P. et al. Qualidade fisiológica e incidência de fungos em sementes de feijão caupi produzidas do estado do Ceará. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.21, n.2, p.165-171, 2008.

GONZALEZ, H. R.; MEDEROS, D.; SOSA, H. I. Efectos alelopáticos de restos de diferentes espécies de plantas medicinales sobre la albahaca (*Ocimum basilicum* L.) em condiciones de laboratorio. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Havana, v. 7, n. 2, p. 67-72, 2002.

HORA, B.R. Ação de óleos essenciais no controle de Sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) de bananeiras (*Musa* sp) **Dissertação**. Botucatu - SP: Universidade Estadual Paulista; 2009.

KUMAR, D.; KALITA, P. Reducing postharvest losses during storage of grain crops to strengthen food security in developing countries. **Foods**, v. 6, n. 1, p. 8, 2017.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Ed. do autor, 1997.

LIMA, R. K. et al. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae). **Acta amazônica**, v. 39, p. 377-382, 2009.

LORENZI, H. et al. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 1992.

MACKINNON, S. et al. Antimalarial activity of tropical Meliaceae extracts and gedunin derivatives. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 4, p. 336-341, 1997.

MAGALHÃES, PC. **Fisiologia do milho**. CEP, 35701, 970.6, 2002.

MAGAN, N, &ALDRED, D. Microbial spoilage management in cereals and bakery products. EmC. De Black burn (Ed.), Food spoilage microorganisms (pp. 194 – 212). Cambridge, Reino Unido: **Wood head Publishing Ltd**, 2006.

MAIA, F. G. M. et al. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Biosci. j.(Online)**, p. 205-210, 2011.

MAPA, Ministry of Agriculture, Livistock and Supply. Decree No. 6,268, of November 22, 2007, of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Regulates Law No. 9,972 of May 25, 2000, which institutes the classification of plant products, their by-products and wastes of economic value, and other measures. **Official Diary of the Union**. 2007.

MARQUES, O. J. et al. Fungal incidence and mycotoxins in grains of commercial corn hybrids as a function of crop moisture content. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, p. 667-675, 2009.

MARTINS, M. et al. Métodos naturais de detoxificação de micotoxinas em alimentos Amazônicos: guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) e castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* HBK). 2014.

MENEZES, T. O. et al. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 3, p. 184-91, 2009.

MEZZOMO, R. et al. Mycelial growth and sporulation of *Fusarium* spp. Pathogenic to *Ilex paraguariensis* in different culture media and under exposure to different light levels. **Scientia Agraria**, v. 19, n. 1, p. 14-19, 2018.

MONDEGO, J.M. et al. Controle alternativo da microflora de sementes de *Pseudobombax marginatum* com óleo essencial de copaíba (*Copaifera* sp.). **Bioscience Journal**, v.30, n.2, p.349-355, 2014.

MUNIRAH, N, KHAIRI, M, NOZULAI, M, & JAHAN, M. The effects of zinc application on physiology and production of corn plants. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, 9(2), 362-367, 2015.

NAYAK, B. S. et al. Investigation of the wound healing activity of *Carapa guianensis* L.(Meliaceae) bark extract in rats using excision, incision, and dead space wound models. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 5, p. 1141-1146, 2010.

NELSON, P. E. *Fusarium* species. **An illustrated manual for identification.**, 1983.

OLIVEIRA, A. B., & LIMA, R. C. Preservation of rice grain moisture using vegetable oils. **Journal of Agricultural Science**, 58(2), 120-128, 2015.

OLIVEIRA, F. D. S. et al. Atividade antifúngica do óleo de *Carapa guianensis* (MELIACEAE) frente a cepas padrões de *Candida* spp. 2012.

OLIVEIRA, JPD, CHAVES, L, DUARTE, JB, BRASIL, EM, FERREIRA JUNIOR, LT, & RIBEIRO, KDO. Grain protein content in high protein maize populations and their crossings. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 2004.

ORELLANA, BJP, KOBAYASHI, EDS, & LOURENÇO, GDM. Alternative Therapy Using *Andiroba*. **Lato & Sensu**, 5(1), 136-41, 2004.

PAES, MCD. Physical, Chemical and Technological aspects of corn grain. Sete Lagoas, MG: **Embrapa Milho e Sorgo**, 2006.

PAVELA, R.; BENELLI, G. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. **Trends in Plant Science**, 21(12), 1000-1007, 2016.

PEZZINI, V.; VALDUGA, E.; LUIS CANSIANI, R. Incidence of fungi and mycotoxins in stored corn under different conditions. **R. Inst. Adolfo Lutz**, p. 91-96, 2005.

PITT, J. I. et al. **Fungi and food spoilage**. New York: Springer, 2009.

RIVERBERI, M. et al. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.87, p.899-911, 2010.

ROY, Amit; SARAF, Shailendra. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 2, p. 191-201, 2006.

SAMSON, Robert A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 78, n. 1, p. 141-173, 2014.

SANTOS, M. T.; AQUINO, M. G. C.; ROCHA, J. S.; BRAGA, B. A.; MAESTRI, M. P. Biometria de sementes de Andiroba de duas diferentes áreas. In: **Congresso Internacional das Ciências Agrárias**, 3. Anais, 2018.

SAVI, Geovana D. et al. Mycoflora and deoxynivalenol in whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) from Southern Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 7, n. 3, p. 232-237, 2014.

SCUSSEL, V.M.; SAVI, G.D; KLAUMAN, T.; TONON, K.M. Micotoxinas em grãos armazenados e seus limites máximos tolerados. In: LORINI, I.; MIIKE, L.H.; SCUSSEL, V.M; FARONI, L.R.D. **Armazenagem de grãos**. Jundiaí: Instituto BioGeneziz, p. 759-831, 2018.

SCUSSEL, Vildes M. et al. Stereoscopy and scanning electron microscopy of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) Shell, brown skin, and edible part: part one—healthy nut. **Journal of food science**, v. 79, n. 7, p. H1443-H1453, 2014.

SCUSSEL, VM; SAVI, GD & KLUCZKOVSKI, AM. Fungi and Mycotoxins associated with stored grains. **Armazenagem de grãos**, Cap. V, 735-758, 2018.

SILVA, B. A. da et al. Effect of Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) oil for fungi control in maize (*Zea mays* L.) grains. **J. Agric. Vet. Sci.**, 2019.

SILVA, M. R.; SOUSA, A. P. Características organolépticas de alimentos embebidos em óleos essenciais. **Food Chemistry**, 211, 303-310, 2018.

SILVA, G.C.; SANTOS, C.C.; GOMES, D.P. Incidência de fungos e germinação de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) tratadas com óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.4, p.850-855, 2014.

SILVA, JC; CARLOS, DS; VELOSO, RA; LEÃO, EU; LIMA, FSO; SANTOS, GR. Eficácia de óleos fixos e essenciais no controle in vitro de fungos fitopatogênicos do milho (*Zea mays*). **Informações gerais**, p. 15. 2016.

SILVA, Leirson Rodrigues. Physico-chemical properties and profile of andiroba oil fatty acids. 2018.

SILVA, N.; TANIWAKI, M. H.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; NASCIMENTO, M. S. F.; GOMES, R. A. R. Métodos microbiológicos de análise em alimentos e água: Manual de laboratório. Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas, SP, Brasil. CRC Press / Balkema, **Taylor & Francis Grupo**, Londres: Reino Unido, 484p, 2013.

SINGH, M., et al. Essential oils and their nanoformulations as green preservatives to boost food safety against mycotoxin contamination. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 19(4), 2159-2182, 2020.

SOUSA, Rosa Maria Souto de; SERRA, Ilka Marcia Ribeiro de Souza; MELO, Thiago Anchieta de. Effect of essential oils as an alternative in the control of *Colletotrichum gloesporioides* in pepper. **Summa Phytopathologica**, v. 38, p. 42-47, 2012.

SOUZA, C.R.; de AZEVEDO, C.P.; ROSSI, L. Andiroba (*Carapa guianenses* Aubl.). **Embrapa Amazônia Ocidental-Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.

VALMORBIDA, Roberta et al. Quality and safety of maize (*Zea mays* L.) from Rondônia state storage units, Northern Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 11, n. 1, p. 54-63, 2018.

WEBER, Roland WS; PITT, Dennis. Teaching techniques for mycology: 11. Riddell's slide cultures. **Mycologist**, v. 14, n. 3, p. 118-120, 2000.

ZHELJAZKOV, V. D., et al. Effect of basil, peppermint, and sage essential oils on seed germination and seedling growth. **Industrial Crops and Products**, 47, 246-250, 2013.

## CAPÍTULO 6

### **EFEITO DO PLASMA FRIO SOBRE GRÃOS DE MILHO (*Zea mays* L.): INATIVAÇÃO DE FUNGOS, ESTABILIDADE DA MICROESTRUTURA E CAPACIDADE GERMINATIVA**

As informações fornecidas no 7º Capítulo da Tese foram enviadas como resumo para:

Silva, B. A.; Laroque, D. A.; Galvão, A.; Scussel, V. M.; Carciofi, B. A. M.; Tribuzi, G. Effect of Cold Plasma on Corn Grains (*Zea Mays* L.): Fungal Inactivation, Microstructure Stability, and Germination Capacity. Conference of Food Engineering – CoFE, abril 2024 – em Anexo.

#### **RESUMO**

A contaminação fúngica, particularmente no caso do milho (*Zea mays* L.), coloca desafios significativos para os setores alimentar e agrícola. Devido as considerações ambientais e de saúde, a popularidade das medidas convencionais de controle de fungos, tais como pesticidas (fungicidas e/ou inseticidas), diminuiu. Conseqüentemente, há um interesse crescente no desenvolvimento de métodos ecologicamente corretos, seguros e sustentáveis para a descontaminação fúngica do milho. Neste estudo, grãos de milho naturalmente contaminados, com teores de umidade de 11,42%, 12,72% e 17,96%, foram expostos ao Plasma Frio (PF) em um reator de barreira de descarga dielétrica. Os parâmetros do PF utilizados foram: frequência 130 Hz, tensão 30 kV, energia  $100 \pm 5$  mJ, distância entre eletrodos de 0,8 cm, pressão atmosférica e ar como gás ionizante. Os tempos de exposição testados foram: 0, 2, 5, 7, 10, 15 e 20 minutos. O efeito do tratamento com PF e do tempo de exposição foi avaliado na inativação fúngica, microestrutura e capacidade de germinação dos grãos. Uma redução significativa na contaminação fúngica foi observada em tratamentos superiores a 5 minutos. A maior redução logarítmica da contaminação fúngica, variando de 0,75 a 1,4 log, ocorreu nos tratamentos de 10, 15 e 20 minutos. Os diferentes teores de umidade do milho não influenciaram significativamente a eficácia do tratamento PF. Em comparação com as amostras controle, a superfície do milho (endosperma) desenvolveu uma textura enrugada, com a rugosidade aumentando com tempos de exposição mais longos. Os tratamentos com PF de 15 e 20 minutos causaram atraso mais pronunciado (maior que 2,5 vezes) na capacidade germinativa. Porém, tratamentos inferiores a 10 minutos não apresentaram diferença estatística neste parâmetro em relação à amostra não tratada. Estes resultados sugerem que, com um tempo de exposição de cerca de 10 minutos, o tratamento com CP tem potencial para reduzir a contaminação fúngica nos grãos de milho sem comprometer a capacidade de germinação.

**Palavras-chave:** Grão de milho; antifúngico; tecnologia não térmica; capacidade germinativa

## 6.1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é a terceira cultura alimentar mais importante do Brasil (Conab, 2018), dominando o mercado nacional e internacional (Artuzo et al. 2019). Geralmente é a principal fonte de produção de ração animal, destinada aos segmentos de aves, suínos e bovinos (Alves, Amaral, 2011), e seu uso representa a maior parte do consumo no mundo (Artuzo et al. 2019). Dentre os fatores que podem prejudicar a qualidade dos grãos e, conseqüentemente, a economia a partir deles gerada, devem ser observados os fungos.

A incidência de doenças no milho tem se tornado mais frequente ao longo dos anos, indicando a vulnerabilidade dos híbridos (Prestes et al. 2019). A contaminação por fungos geralmente ocorre na pré-colheita, causando podridão das espigas, ou na pós-colheita, gerando grãos mofados durante o armazenamento e processamento, e configura-se como a principal causa de danos aos grãos armazenados em todo o mundo, perdendo apenas para os insetos (Verga e Teren, 2005). Eles podem inibir/atrasar a germinação e causar deterioração dos grãos armazenados (Halloin, 1983) por descoloração, diminuindo o valor nutricional, causando odores indesejados, apodrecimento e desenvolvimento de metabólitos secundários (toxinas) (Selcuk et al. 2008). Dentre os fungos produtores de toxinas no campo e armazenamento, os mais importantes são os gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, que devem ser controlados (Scussel et al. 2018).

Em todo o mundo, as infecções fúngicas ameaçam a nossa segurança alimentar, reduzindo o rendimento das plantas agrícolas ou mesmo causando a deterioração completa das plantas. Os métodos tradicionais de inativação de fungos aplicados durante o armazenamento e na indústria são os pesticidas (fungicidas e/ou inseticidas) e os tratamentos térmicos. No entanto, estes métodos deixam resíduos e podem afetar negativamente o ambiente e a saúde e, por isso, estão a tornar-se menos populares e aceitáveis entre os consumidores (Sharma et al. 2019). Consequentemente, a demanda por processos de descontaminação fúngica novos, fáceis de usar, naturais e ecologicamente corretos ou tecnologias seguras e sustentáveis está aumentando (Fisher et al. 2022). Esses processos não devem gerar compostos que apresentem toxicidade ou modifiquem as propriedades nutricionais e a palatabilidade do grão e seus derivados (Eman, 2010; Savi et al. 2014).

Plasma Frio Atmosférico (PFA) é um estado parcialmente ionizado da matéria que contém elétrons, íons, moléculas excitadas, radicais livres e fótons, existindo a temperaturas relativamente baixas, próximas à temperatura ambiente. O PFA é produzido ao energizar um gás sob condições atmosféricas, promovendo a ionização e excitação das moléculas sem elevar significativamente a temperatura do gás (Afshari & Hosseini, 2014). Esta característica torna os plasmas não térmicos adequados para o tratamento de objetos sensíveis ao calor ou materiais biológicos (Laroussi, 2009). O PFA opera a temperaturas moderadas (30-60°C) e utiliza gases não tóxicos, minimizando assim os danos químicos e térmicos ao substrato (Sladek & Stoffels, 2005). Além disso, o PFA proporciona esterilização e assepsia eficientes em poucos segundos ou minutos (Heinlin et al., 2011).

PFA é considerado um processo inovador, em particular, no que diz respeito à descontaminação de microorganismos (Yinxin et al., 2022) e melhora a germinação de sementes (Nwabor et al., 2022; Shelar et al., 2022). No entanto, sua eficácia depende de vários parâmetros, como fatores ambientais (temperatura e umidade relativa), propriedades dos alimentos (teor de umidade, pH, composição do produto, propriedades da superfície e relação área superficial/volume), parâmetros de processamento (tensão, frequência, composição do gás, taxa de fluxo, tempo de tratamento, tipo de eletrodo, lacuna entre os eletrodos, espaço de cabeça e tempo de exposição) (Feizollahi et al., 2021; Liao et al., 2017), e características dos microorganismos (tipo, cepa, fase de crescimento e contagem inicial) (Amini & Ghoranneviss, 2016; Feizollahi et al., 2021). Além disso, o tamanho e a geometria do sistema de plasma são fatores essenciais que alteram a eficácia antimicrobiana do PFA (Laroque et al., 2022).

O objetivo do estudo foi investigar a eficácia do PFA para a descontaminação de grãos de milho naturalmente contaminados com diferentes níveis de umidade. A influência do tratamento com PFA na estrutura do pericarpo e na capacidade germinativa também foi examinada

## **6.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.2.1 MATERIAL**

#### **6.2.1.1 Amostra**

Os grãos de milho (naturalmente contaminados) foram adquiridos de uma cooperativa em Florianópolis (2 lotes de 5 kg cada), Brasil (27,69436° S, 48,67188° W) e armazenados em ambiente seco e escuro à temperatura ambiente (umidade: 11,42%; temperatura: 20±5 °C) até a data dos experimentos.

#### **6.2.1.2 Meio de Cultura e Outros**

Batata dextrose ágar - BDA, Neogen (Michigan, EUA), peptona bacteriana, Himedia, (Mumbai, Índia), czapek - CYA, Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Outros: Cloranfenicol, Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), placas de Petry (90x15 mm), Kasvi (Santa Catarina, Brasil). Formaldeído e etanol, grau analar, Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil); stubs (pequenos blocos metálicos, 9 mm de diâmetro e 10 mm de altura), Leica (Leider, III., EUA); bisturi de aço inoxidável, GS Mtronix (SP, Brasil); Captura de imagem SM software, modelo OPTHD 14000,

Opticam Microscopy Technology (Doral, Fl., EUA); fita de carbono dupla face, Electron Microscopy Sciences (Leider, Illinois, EUA), serra, Ticotico (São Paulo, SP, Brasil); pinças, aço inoxidável.

#### **6.2.1.5 Equipamentos**

Câmara de fluxo laminar, Veco (São Paulo, Brasil); autoclave, Phoenix (São Paulo, Brasil); estufa, Fanem (São Paulo, Brasil); microscópio óptico, Olympus CX22, (Tóquio, Japão), aparelho de atividade de água, modelo AQUALAB, Meter Group (São Paulo, Brasil). Máquina de folheamento de ouro, modelo EM-Scd500, Leica (Leider, Ill., EUA), estéreo microscópio, modelo OPTZTS, Opticam (Tóquio, Japão) [180x] e microscópio eletrônico de varredura, modelo JSM-6390LV, Jeol (Peabody, EUA) [7000x]. Reator (barreira de descarga dielétrica - DBD), com dois eletrodos maciços de aço inoxidável medindo 64 mm (inferior) e 50 mm (superior) de diâmetro e duas prateleiras de poliacetal. Reator conectado a uma fonte de descarga elétrica pulsada de alta tensão (modelo Pulse 0130, Inergiae, Florianópolis, Brasil) desenvolvido no trabalho de Muller et al. (2022), com tensão máxima de saída de 30 kV, frequência de 1,0 kHz e potência de 100W, o que equivale a 500 pulsos por segundo.

### **6.2.2 MÉTODOS**

#### **6.2.2.1 Preparo da Amostra**

Três condições foram selecionadas para avaliar o efeito da umidade dos grãos na inativação de fungos pelo PF com base na legislação brasileira IN 60/2011 (Brasil, 2011), que recomenda umidade máxima de 14% para o milho armazenado. As umidades selecionadas foram 11,42, 12,72 e 17,96% (d.m.).

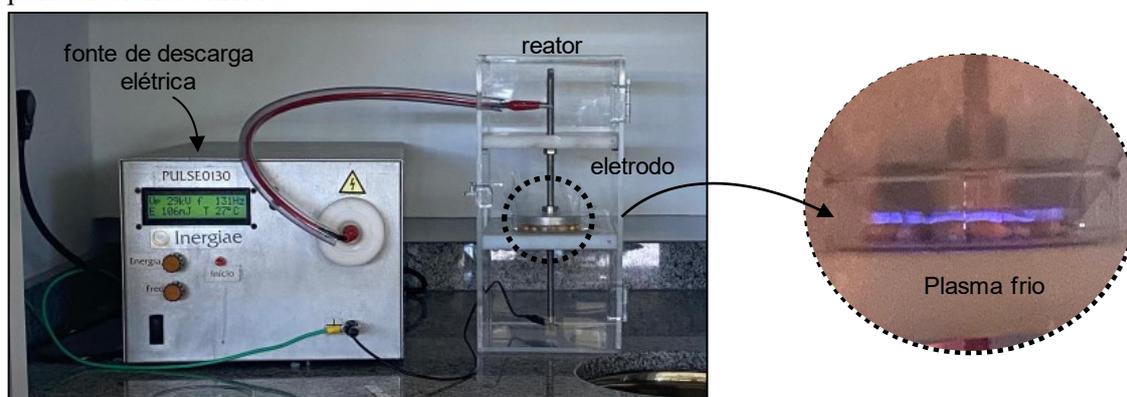
Em condições ambientais, a umidade do milho foi de  $12,72 \pm 0,1\%$  e a atividade de água ( $a_a$ ) de  $0,66 \pm 0,01$ . Para umidade de  $11,42 \pm 0,2\%$ , o milho foi armazenado em recipientes lacrados com solução salina de nitrato de sódio a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  até atingir o equilíbrio, obtendo  $a_a$  de  $0,57 \pm 0,01$ . Para umidade de  $17,96 \pm 0,2\%$ , 0,1 mL de água destilada por grama de milho foi adicionado sobre os grãos e armazenados em recipientes fechados sob refrigeração ( $6 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ ) até o equilíbrio, obtendo  $a_a$  de  $0,97 \pm 0,01$ . A  $a_a$  foi determinada em aparelho de atividade de água, e a umidade em estufa a  $105\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 6.2.2.2 Tratamento com Plasma Frio

As condições de aplicação do PF foram previamente selecionadas, com base em análise visual, na qual foram testadas diferentes combinações de frequência e tensão, e a condição selecionada foi aquela que obteve um PF uniforme e intenso.

Dez grãos de milho foram colocados em uma placa de Petri de vidro com 9 mm de diâmetro e enviados ao reator de plasma. O eletrodo superior foi coberto com filme de polietileno de baixa densidade (PEBD) (0,100 mm de espessura), atuando em conjunto com a placa de Petri como barreira dielétrica durante a aplicação do PF. Os parâmetros selecionados foram: frequência de 130 Hz, tensão de 30 kV, energia de  $100 \pm 5$  mJ, intervalo de 0,8 cm (distância entre eletrodos), pressão atmosférica, ar como gás ionizante e diferentes tempos de tratamento (0, 2, 5, 7, 10, 15 e 20 minutos). Os experimentos foram realizados em amostras triplicadas e experimentos duplicados.

Figura 1 - Reator de Plasma (DBD), com dois eletrodos, conectado a uma fonte de descarga elétrica pulsada de alta tensão



### 6.2.2.1 Contagem Total de Fungos

Porções (Grupos Tratados e Grupo Controle ~ 10 g) de cada amostra foram transferidas para sacos de polietileno e adicionadas de água peptonada (0,1%), seguida de homogeneização em Stomacker (diluição:  $10^{-1}$ ) e preparo das diluições seguindo. De cada amostra diluída, 100  $\mu$ L foram inoculados na superfície do meio Ágar Batata Dextrose contendo cloranfenicol (100 mg/L) em capela de fluxo laminar (n=3). As placas foram incubadas a  $25 \pm 1$  °C durante 7 dias (Silva et al. 2013; Apha, 2015). Placas contendo 15 a 150 unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas e os resultados foram expressos em  $\log$  UFC.g<sup>-1</sup> de milho.

### 6.2.2.2 Isolamento e Identificação

Após a contagem total, colônias características foram isoladas por subcultura em triplicata e, posteriormente, submetidas à identificação ao nível de gênero utilizando a técnica de microcultura. Para isso, uma porção de cada colônia (mostrando morfologia diferente) foi colhida, inoculada (n=2) em Caldo Czapek Dox e incubada a  $23 \pm 2$  °C por 5 dias, seguida de identificação em microscópio óptico - características morfológicas, incluindo estruturas reprodutivas. A partir da observação das características macro e microscópicas, a identificação dos gêneros fúngicos foi realizada de acordo com as chaves de identificação (Weber & Pitt, 2000; Samson et al. 2006).

### 6.2.2.3 Capacidade Germinativa

25 grãos (n=4) (amostra controle e amostra tratada) foram distribuídos entre duas folhas de papel substrato adequado para germinação, conforme exigências do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2009) com adaptações. O substrato de papel foi pesado e o volume de água foi calculado (2,0-3,0 vezes o peso do substrato) e incubado a  $25 \pm 5$  °C por até 8 dias. A contagem do número total de plântulas em cada gerbox, adotando-se a protrusão visível da radícula como critério de germinação, foi avaliada a cada 2 dias. Com os dados obtidos foram calculados o Índice de Germinação (IG) (Equação 1), Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (Equação 2), Tempo Médio de Germinação (GMT) (Equação 3), Velocidade Média de Germinação (VGM) (Equação 4) e radícula. crescimento médio (GR) (Equação 5) (Maguire, 1962; Carvalho, Carvalho; 2009).

$$GI = \left(\frac{N}{A}\right) \times 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

$$GSI = \left(\frac{N2}{D2} + \dots + \frac{N8}{D8}\right) \quad \text{(Equação 2)}$$

$$GMT = \left(\frac{\sum ni}{\sum ti}\right) \quad \text{(Equação 3)}$$

$$GMV = \frac{1}{t} \quad \text{(Equação 4)}$$

$$RG = \left(\frac{M}{N}\right) \quad (\text{Equação 5})$$

Onde: N = número de sementes germinadas; A = número de sementes da amostra (A = 25); D = número de dias após a semeadura em que foi realizada a contagem; D = 2 a 8 dias, ni = número de sementes germinadas por dia; ti = tempo de incubação; i = 2 a 8 dias, t = tempo médio de germinação, M = tamanho médio da radícula.

Unidades: %, adimensional, dias, dias-1, cm, respectivamente.

#### **6.2.2.4 Microscopia Estereoscópica - ME**

Variações nas estruturas morfológicas externas dos grãos (pericarpo) foram observadas através de micrografias com ME [aumento de X0,67 – 9,49X].

#### **6.2.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV**

Segundo método de Kluczkowski, Scussel (2015) com adaptações. O milho foi fixado com pedaços de fita adesiva dupla face totalmente de carbono em stubs, com a superfície de contato do plasma voltada para cima, e revestido com uma camada (40 nm) de ouro (Au) com auxílio de vácuo em base planetária, as micrografias foram realizadas utilizando um MEV [aumento de 1.000X] localizado no Laboratório Central de Microscópio Eletrônico (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### **6.2.2.6 Análise Estatística**

Todos os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e Tukey como pós-teste no software Statistica Release 7. Valores de P <0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

### **6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **6.3.1 EFEITO ANTIFÚNGICO DO PF**

Os resultados (Tabela 1) dos tratamentos com PF mostraram eficácia antifúngica nos tempos de exposição de 5 a 20 min, com maior redução logarítmica durante 15 e 20 min (redução de 0,9 a 1,4) para 11,42 e 12,72% de umidade, e 5 a 20 min (redução de 0,9 a 1,1)

para 17,96% de umidade. Nos tempos de 10 a 20 min não foram observadas diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos nas diferentes umidades.

Tabela 1 - Contagem total de fungos após tratamentos de grãos\* de milho (*Zea mays* L.) por Plasma Frio\*\*

Tempo de exposição (min)	Contagem total de fungos (log UFC.g <sup>-1</sup> )		
	11,42%	12,72%	17,96%
GC <sup>a</sup>	4.00±0.41 <sup>aB</sup>	4.39±0.63 <sup>aA</sup>	4.35±0.36 <sup>aAB</sup>
2	0.39±0.54 <sup>abB</sup>	-0.04±0.36 <sup>aA</sup>	0.41±0.61 <sup>aB</sup>
5	0.70±0.22 <sup>bcB</sup>	0.59±0.69 <sup>bA</sup>	0.96±0.29 <sup>bB</sup>
7	0.64±0.51 <sup>bcB</sup>	0.38±0.45 <sup>abA</sup>	1.07±0.47 <sup>bB</sup>
10	0.75±0.55 <sup>bcA</sup>	0.71±0.72 <sup>bA</sup>	1.11±0.46 <sup>bA</sup>
15	0.91±0.69 <sup>cA</sup>	1.44±0.48 <sup>cA</sup>	1.11±0.49 <sup>bA</sup>
20	0.94±0.42 <sup>cA</sup>	1.46±0.53 <sup>cA</sup>	0.94±0.81 <sup>bA</sup>

\*Parâmetros dos grãos: umidade - 11,42; 12,72 e 17,96%.

\*\*Parâmetros do PF: frequência - 130 Hz, tensão - 30 kV e potência - 100 ± 5 mJ. Tempos de exposição: 0, 2, 5, 7, 10, 15 e 20.

<sup>a</sup>Grupo Controle.

\*\*\*Médias e desvios-padrão seguidos da mesma letra minúscula verticalmente não diferem significativamente a 5% de probabilidade para os diferentes momentos de aplicação da PF pelo teste de Tuckey. \*\*\*\* Médias e desvios padrão seguidos da mesma letra maiúscula horizontal não diferem significativamente a 5% de probabilidade para diferentes aa pelo teste de Tuckey.

Como visto na Tabela 1, o tratamento com PFA em apenas 5 minutos foi capaz de reduzir significativamente a contagem total de fungos. No entanto, resultados mais satisfatórios foram alcançados com o aumento do tempo de exposição ao PFA. Comportamento similar foi observado em outros estudos sobre alimentos expostos a períodos mais longos de tratamento com PFA, mostrando uma redução mais significativa ou inibição total dos microrganismos (Suhem et al., 2013). O aumento da redução microbiana com o aumento do tempo de tratamento com PFA pode resultar da reação das espécies reativas geradas pelo plasma com os microrganismos, incluindo oxigênio singlete, oxigênio atômico, radicais hidroxila, ozônio, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), bem como espécies reativas de nitrogênio como óxido nítrico e nitrogênio atômico. Essas espécies reativas podem danificar várias estruturas celulares dos microrganismos, como membranas celulares, proteínas e ácidos nucleicos (DNA e RNA), levando à inativação ou morte celular (Scholtz et al., 2015; Brandenburg et al., 2007).

Silva et al. (2020) conduziram um experimento envolvendo grãos de milho naturalmente contaminados tratados com CP. Eles utilizaram um sistema de CP composto por

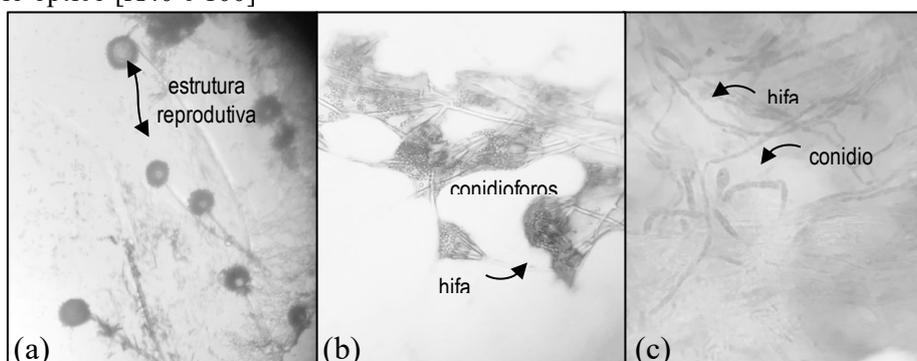
um reator (câmara de vidro com tamanho de 11,5x10,5 cm) equipado com uma tampa de silicone e entrada de gás oxigênio, juntamente com um jato de plasma de barreira dielétrica. O sistema também incluía uma fonte de corrente alternada de alta voltagem ( $\pm 17$  kV, 30 mA) e um transformador VARIAC ATV-215-MP (220-240V; 60 Hz; 6.3 A; 1-1.5 kVA) para controle de voltagem. Os grãos foram dispostos em placas de Petri previamente preparadas contendo PDA e submetidos ao tratamento com CP em níveis de potência de 240 e 360 W, com intensidade de 8 kV, por durações de exposição de 10, 20 e 30 minutos. Os efeitos antifúngicos do CP foram avaliados monitorando o crescimento fúngico (formação/redução de micélio) ao longo do tempo para avaliar a eficiência de inativação em comparação com o grupo controle (GC). Após o tratamento com CP, foi observada inibição total do crescimento fúngico no 5º dia de incubação sob condições de potência de 360 W e 30 minutos de exposição. Vale notar que, apesar do uso da mesma matéria-prima (grãos de milho), houve diferenças nas geometrias dos equipamentos (especialmente em relação ao eletrodo), nas condições de tratamento (frequência, energia, tempos), metodologias (semeadura direta versus contagem total de fungos) e cargas fúngicas iniciais, tornando as comparações diretas desafiadoras.

Para Thirumdas, Sarangapani e Annapure (2015), a eficiência da inativação microbiana pelo plasma está intimamente ligada à presença de água, facilitando a eliminação de microrganismos úmidos em comparação aos secos. As principais espécies reativas formadas pelo plasma frio atmosférico incluem oxigênio e nitrogênio eletronicamente e vibracionalmente excitados, formas ativas de oxigênio como oxigênio atômico, oxigênio singlete, ânion superóxido e ozônio, bem como espécies reativas de nitrogênio como nitrogênio atômico e óxido nítrico. Quando há presença de umidade, espécies adicionais como  $H_2O^+$ ,  $OH^-$ , radical  $OH$  e  $H_2O_2$  também podem se formar (Scholtz et al., 2015). No entanto, nosso estudo não encontrou uma correlação direta entre o conteúdo de umidade e a eficácia do plasma na redução da carga fúngica. Isso sugere que outros fatores podem ter influenciado a eficácia do plasma, incluindo a geração de radiação ultravioleta (UV), que possui propriedades germicidas que podem contribuir para a inativação fúngica ao danificar seu DNA e interromper seu ciclo reprodutivo, e/ou a interação química de radicais, espécies reativas ou partículas carregadas com as membranas celulares (Moisan et al., 2002).

Nos gêneros fúngicos isolados (Figura 2), foram identificados os fungos de campo *Fusarium* (em maior quantidade) e os fungos de armazenamento *Aspergillus* e *Penicillium*. Não foram observadas alterações no tipo de microbiota após o tratamento, apenas redução de fungos. Zahoranová et al. (2018) relatam que a percentagem total de micobiota na superfície do milho

naturalmente contaminada é *Aspergillus* spp. (55%), *Fusarium* e *Penicillium* spp. (15%), *Cladosporium* spp. (10%) e *Verticillium* spp. (5%), dados que corroboram com os achados desse trabalho.

Figura 2 - Gêneros de fungos isolados de grãos de milho (*Zea mays* L.) naturalmente contaminados em amostras tratadas com controle e plasma frio: (a) *Aspergillus*, (b) *Penicillium* e (c) *Fusarium* por microscópio óptico [X40 e 100]



Na Figura 3 podemos observar que à medida que aumenta o tempo de tratamento, a quantidade de UFC diminui, quando comparada ao controle, em ambos os níveis de umidade na diluição  $10^{-1}$ . Além disso, também é visível que os gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* presentes nas amostras Controle permaneceram nas amostras mesmo após o tratamento, mas em menos colônias.

### 6.3.2 EFEITO DO PF NAS CARACTERÍSTICAS MICROESTRUTURAIS DA SUPERFÍCIE DO GRÃO

As características microestruturais da superfície dos grãos de milho com e sem a aplicação de PFA foram registradas por microscopia simples (SM) (Figura 4) e microscopia eletrônica de varredura (SEM) (Figura 5). As características microestruturais das superfícies dos grãos de milho, com e sem aplicação de PFA, foram examinadas usando tanto SM (Figura 4) quanto SEM (Figura 5). Mudanças na superfície dos grãos de milho após o tratamento com PFA foram observadas em todos os conteúdos de umidade das amostras (Figura 4). Grãos tratados com PFA exibiram enrugamento em comparação com as amostras de controle após 5 minutos de exposição para conteúdos de umidade de 12,7% e 18,0%, e após 7 minutos para um conteúdo de umidade de 11,4%. Alterações similares foram documentadas por Rüntzel et al. (2019) em feijões pretos e por Dhayal et al. (2006) em sementes de cártamo submetidas ao tratamento com plasma frio.

O PFA tem o potencial de induzir alterações físicas em várias superfícies de materiais, incluindo o pericarpo de grãos, sementes e oleaginosas. Essas alterações podem se manifestar como rugosidade, enrugamento ou até a formação de microestruturas na superfície do pericarpo. O efeito preciso depende de vários fatores, como a potência do plasma, a duração da exposição, a distância entre a fonte de plasma e o material, entre outros. Em certos casos, o enrugamento do pericarpo pode resultar do calor gerado pelo plasma ou de reações químicas induzidas pelo plasma na superfície do material (Dhayal et al., 2006).

Nas imagens de SEM (Figura 5), as características de superfície dos grãos de controle mostraram diferenças quando variado o conteúdo de umidade da amostra, ou seja, o enrugamento diminuiu à medida que a água disponível na matriz aumentou. A redução do enrugamento do pericarpo do grão com o aumento do conteúdo de umidade pode ser atribuída à maior presença de água na matriz do grão. A água pode atuar como um meio para dissipar a energia do plasma, reduzindo assim a incidência de mudanças físicas na superfície do grão (Rüntzel et al. 2019). Por outro lado, o aumento do tempo de exposição ao tratamento levou a um maior enrugamento da superfície da amostra tratada em comparação com o controle em todos os níveis de umidade avaliados. Este aumento no enrugamento pode ser atribuído à maior interação entre o plasma e a superfície do grão ao longo do tempo, levando a mudanças físicas mais pronunciadas. Este resultado é consistente com estudos que investigaram os efeitos do tempo de exposição ao plasma na morfologia superficial de diferentes materiais (Dhayal et al., 2006).

Erosões/queimaduras podem ocorrer durante a aplicação do plasma devido à sua preferência pelos pontos mais altos da amostra. Dado que os grãos variam em tamanho e altura, a formação de arcos elétricos, que podem danificar a superfície do grão, é uma explicação plausível para este fenômeno (Saranpagani et al., 2016).

Nas imagens de MEV (Figura 6), as características superficiais dos grãos não tratados apresentaram diferenças quando comparadas às diferentes umidades, mostrando que o enrugamento diminuiu à medida que aumenta a água disponível na matriz.

À medida que aumentou o tempo de exposição ao tratamento (2-20 min), a casca apresentou maior enrugamento quando comparada ao controle nos 3 níveis de umidade testados. Achados semelhantes foram relatados por Stolarik et al. (2015) que utilizaram reator de plasma de descarga coplanar difusa por barreira (DCSBD) em sementes de ervilha por 1 a 10 min e Runtzel et al. (2019) em feijão preto exposto por até 30 min exposto em reator tipo Tip plane. Zahoranová et al. (2018), por outro lado, observaram que o tratamento com plasma

DCSBD não causa nenhum dano significativo à superfície do milho, degradação, erosão ou arranhões, mesmo após tempos de exposição mais longos, de 5 min.

Conforme mostrado pelo SM (Figura 4), foram observadas erosões apenas nos tratamentos de umidade 12,7 e 18,0% expostos por 7 min ao PF. No caso do presente estudo, o fato de as erosões/queimaduras terem ocorrido apenas nas condições citadas pode estar relacionado à preferência do plasma pelos pontos mais altos da amostra. Como os grãos não seguem tamanho e/ou altura padrão, uma possível explicação para essa ocorrência é a formação de arcos elétricos que resultaram em danos à superfície dos grãos. Sarangapani et al. (2016), observaram que após exposição ao tratamento com plasma de baixa pressão, por 5 e 10 min, nas potências de 30 e 40 W, o MEV revelou trincas e depressões na superfície do arroz basmati. Ukuku et al. (2019) também observaram alterações em maçãs tratadas com combinação de antimicrobiano e jato de plasma. Os pesquisadores relataram que a PF alterou as estruturas superficiais da maçã, mas não a estrutura da célula bacteriana. Diferenças semelhantes, como erosões e rupturas no tecido epidérmico, também foram relatadas por Grzegorzewski et al. (2011) em folhas de alface usando PF.

As diferenças nos resultados podem ser explicadas devido a fatores que afetam a penetração do plasma na matriz alimentar, como a constituição do reator e intensidade do plasma, composição, água livre disponível, porosidade, distância entre a fonte de plasma e a superfície dos alimentos e espécies reativas (Misra et al. 2016).

Figura 3 - Redução visível de fungos através da contagem total de fungos em grãos de milho (*Zea mays* L.) em diferentes umidades (11,42; 12,72 e 17,96%) na diluição 10-1 após exposição ao tratamento com Plasma Frio (frequência - 130 H) durante os períodos de 0, 2, 5, 7, 10, 15 e 20 min

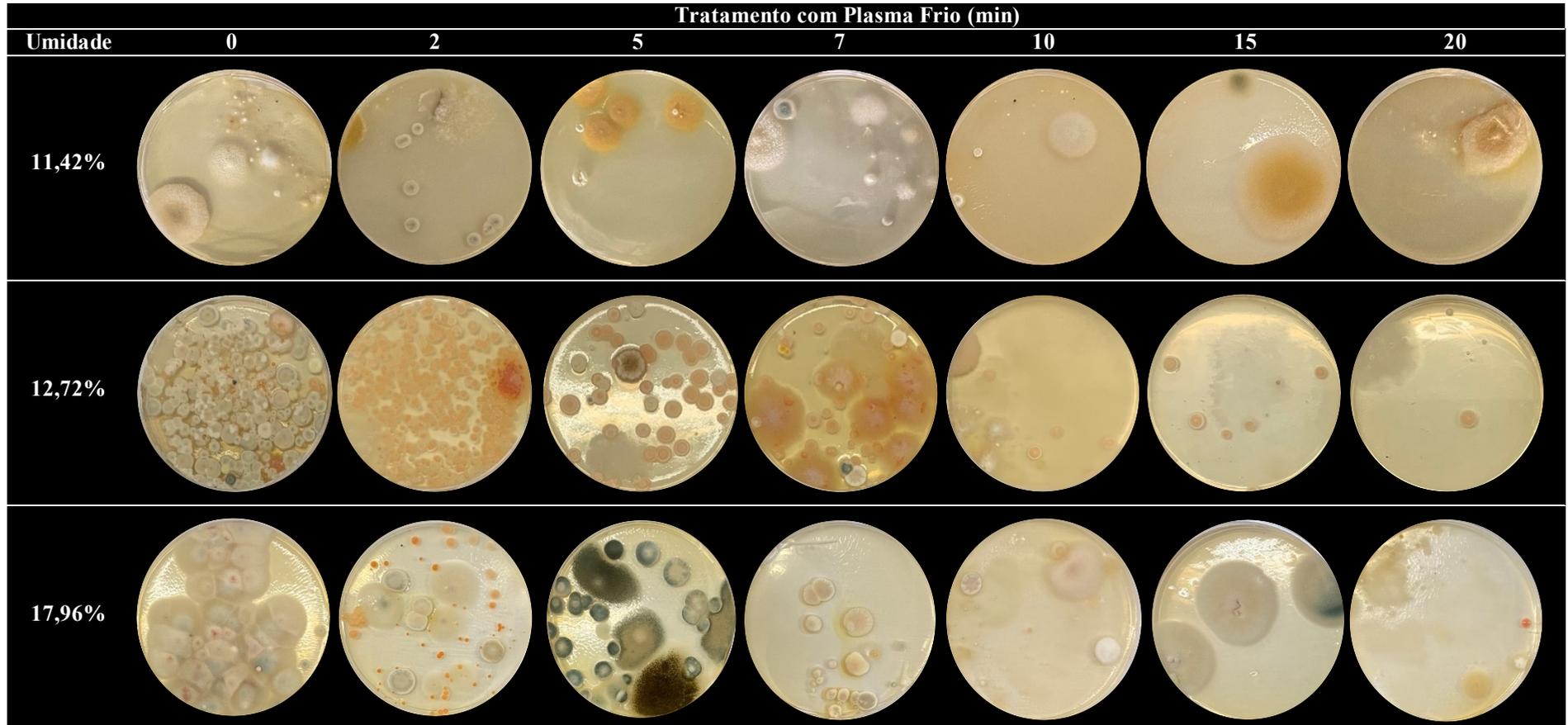


Figura 4 - Microscopia Estereoscópica [X0,67] da superfície dos grãos de milho (*Zea mays* L.), umidade (11,42; 12,72 e 17,96%), após exposição ao tratamento com Plasma Frio (frequência - 130 Hz) durante tempos de 0, 2, 5, 7, 10, 15 e 20 min

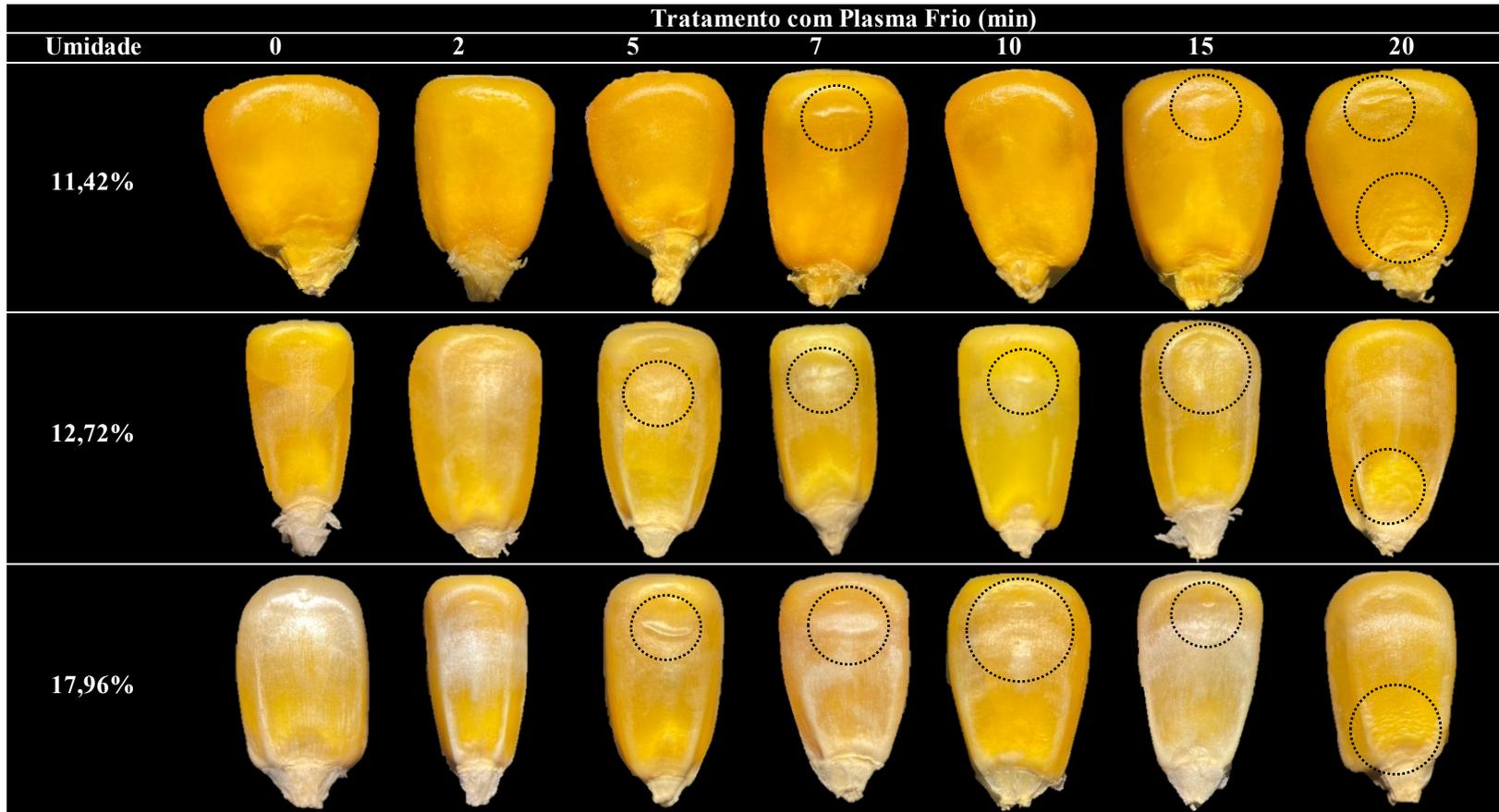
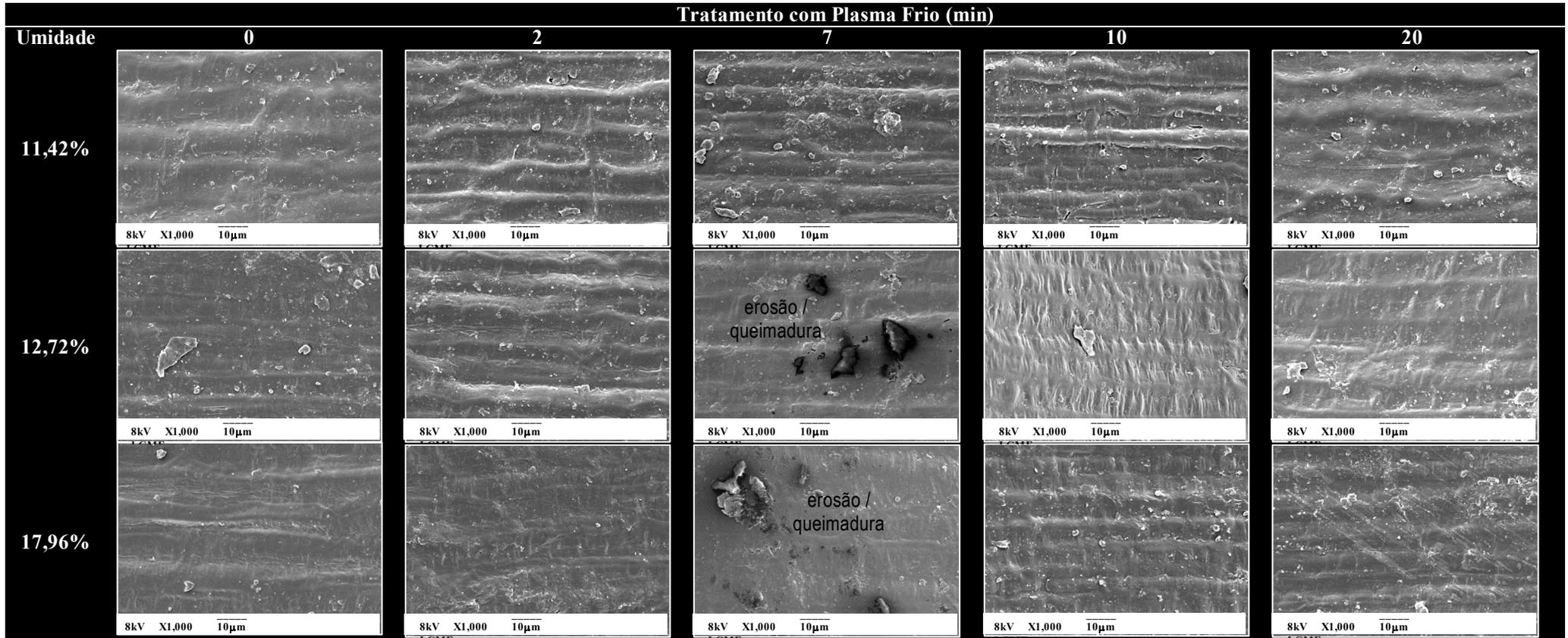


Figura 6 - Microscopia Eletrônica de Varredura [X1.000] da superfície de grãos de milho (*Zea mays* L.) em diferentes umidades (11,42; 12,72 e 17,96%), após exposição



### 6.3.3 CAPACIDADE GERMINATIVA

Para os testes de capacidade germinativa, a germinação ocorreu apenas nos grãos com umidade de 12,72%. A água é um dos fatores que mais influenciam o processo de germinação das sementes (Rego et al. 2011). A baixa disponibilidade de água provoca uma redução no crescimento, causada pela diminuição da expansão e alongamento celular devido à diminuição do turgor (Yasseys Alomary, 1994).

Por outro lado, Borges e Rena (1993) afirmam que o excesso de umidade geralmente provoca diminuição da germinação, pois impede a penetração do oxigênio e reduz todo o processo metabólico resultante. Além da disponibilidade hídrica, as sementes dormentes apresentam dificuldades de germinar mesmo quando expostas a condições ambientais favoráveis (Costa et al, 2010). Esses fatos corroboram as conclusões. Para o milho com umidade de 11,42%, a água adicionada (2,0-3,0 vezes o peso do substrato) para o teste de germinação não foi suficiente para sua germinação. Já para o milho com umidade de 17,96%, além do já elevado teor de umidade, a adição de mais água para a prova afetou sua germinação, fazendo com que, além de não germinar, as colônias de fungos proliferassem e provocassem a podridão dos grãos.

O efeito do tratamento PF na germinação dos grãos de milho variou com o tempo de tratamento conforme mostrado na Tabela 2. De acordo com os dados obtidos, os tratamentos de 2 a 10 min por PF não causaram efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de germinação, enquanto para os tempos de 15 e 20 min houve redução de 65,98 e 75,25%, respectivamente, sendo a porcentagem de germinação influenciada negativamente ( $p < 0,05$ ). Resultados semelhantes foram encontrados para GSI, GMT e GMS. A diminuição da taxa de germinação possivelmente ocorreu devido a possíveis danos às estruturas germinativas em um longo período de exposição à PF (Runtzel et al. 2019). As alterações nas características dos alimentos após a exposição ao PF podem ser explicadas pela ação das espécies reativas nos tecidos causando expansão além da quebra das membranas celulares (Pasquali et al. 2016)

Tabela 2 - Porcentagem, índice de velocidade, tempo e velocidade média de germinação de grãos de milho (*Zea mays* L.) com 12,72% de umidade tratados com Plasma Frio\* nos tempos de 0, 2, 5, 7, 10, 15 e 20 min

Tempo de exposição (min)	IG <sup>a</sup> (%)	IVG <sup>b</sup>	TMG <sup>c</sup> (dias)	VMG <sup>d</sup> (dias <sup>-1</sup> )
GC <sup>e</sup>	0	97.0±0,88 <sup>a</sup>	89.7±3.55 <sup>a</sup>	2.31±0.15 <sup>a</sup>
2	2	95.0±0,71 <sup>a</sup>	87.0±3.75 <sup>a</sup>	2.32±0.15 <sup>a</sup>
5	5	96.0±1,69 <sup>a</sup>	62.6±14.51 <sup>b</sup>	3.56±0.74 <sup>a</sup>
7	7	96.5±0,83 <sup>a</sup>	71.7±11.15 <sup>b</sup>	3.05±0.51 <sup>a</sup>
10	10	98.0±0,53 <sup>a</sup>	62.9±15.47 <sup>b</sup>	3.58±0.75 <sup>a</sup>
15	15	33.0±0,70 <sup>b</sup>	10.5±5.63 <sup>c</sup>	6.38±3.57 <sup>b</sup>
20	20	24.5±0,83 <sup>c</sup>	6.12±3.06 <sup>c</sup>	8.00±4.00 <sup>b</sup>

\*Frequência - 130 Hz, tensão - 30 kV e energia - 100 ± 5 mJ.

<sup>a</sup>Índice de germinação; <sup>b</sup>Índice de velocidade de germinação; <sup>c</sup>Tempo médio de germinação; <sup>d</sup>Velocidade média de germinação; <sup>e</sup>Grupo Controle.

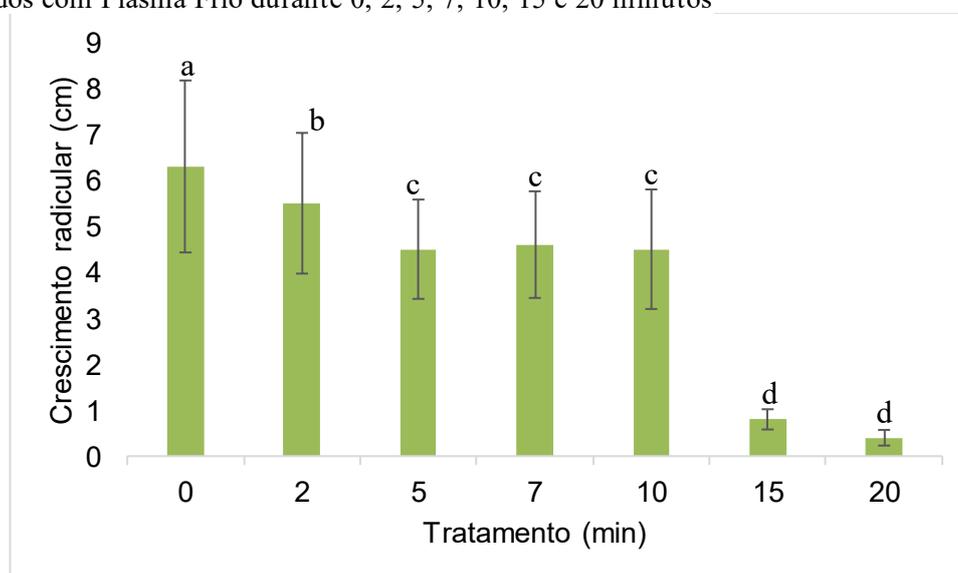
\*\*Médias e desvios-padrão seguidos da mesma letra minúscula verticalmente não diferem significativamente a 5% de probabilidade para os diferentes momentos de aplicação da PF pelo teste de Tuckey.

De acordo com os achados de Runtzel et al. (2019), após tratamento com PF (tensão de 8 kV e potência de 510 W) nos tempos de 5 e 10 min, o feijão preto (*Phaseolus vulgaris*) manteve seu poder germinativo, mas quando exposto a tempos maiores (20 e 30 min) não desenvolver a radícula, tendo sua germinação inibida, resultado semelhante ao encontrado.

Vários autores constataram que a PF estimulou o processo de germinação, como Mitra et al. (2014) em grão de bico (*Cicer arietinum*) (até 5 min de exposição ao PF), onde a porcentagem total de germinação das sementes aumentou para tempos de tratamento com PF de até 3 min em comparação com o controle. Ling et al. (2014) em sementes de soja (*Glycine max*) (15 s de exposição ao PF) a 0, 60, 80, 100 e 120 W. Os resultados mostraram que os tratamentos com PF afetaram positivamente a germinação das sementes e o crescimento das plântulas, enquanto o tratamento com 80 W teve o maior estímulo efeito. Zahoranová et al. (2018) não observaram alteração significativa na germinação de grãos de milho (*Zea mays* L.) após tratamento com PF (potência de 400 W) por 1 e 2 min quando comparado ao Controle, mas quando submetidos a uma exposição de 4 e 5 min, a germinação a taxa caiu para 83 e 7%, respectivamente. Šerá et al. (2009), em que a velocidade de germinação do trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) foi retardada com o aumento do tempo de tratamento, resultando em diminuição da germinação em tempos superiores a 1 min, e Mravlje et al. (2021), que também tiveram a taxa de germinação do trigo afetada por exposições mais longas (exposições mais curtas (até 45 s) foram aplicadas com segurança).

O tratamento plasmático dos grãos de milho afetou o crescimento das plântulas, como podemos observar na Figura 7, todos os tratamentos diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do controle, com menor crescimento de radícula. Este resultado pode ter sido gerado devido ao atraso na velocidade de germinação dos grãos pós-tratamento.

Figura 7 - Média e desvio padrão (cm) do crescimento radicular de grãos de milho (*Zea mays* L.) tratados com Plasma Frio durante 0, 2, 5, 7, 10, 15 e 20 minutos



\*Médias e desvio padrão seguidas da mesma letra minúscula não diferem significativamente a 5% de probabilidade para os diferentes momentos de aplicação da PF pelo teste de Tuckey.

Zahoranová et al. (2018) obtiveram resultados satisfatórios com milho para tratamento com PF, onde 60 s de exposição estimularam o crescimento radicular em 12% e o comprimento da parte aérea em 35% em relação ao controle, mas quando o tempo de exposição ao tratamento foi aumentado, houve inibição de todo o crescimento. parâmetros. Runtzel et al. (2019) obtiveram aumento de 33% (16 mm) no comprimento das estruturas que dão origem aos caules e folhas do feijão preto durante uma exposição de 5 min quando comparado ao controle (12 mm). Por outro lado, o crescimento da sua radícula foi visualmente inferior quando exposto por 10 min (8 mm).

Alguns experimentos sobre o tratamento PF de sementes de milho indicam que tratamentos mais curtos (40–80 s) têm um efeito positivo na germinação (Henselová et al. 2012), enquanto outros autores não encontraram mudanças significativas na germinação do milho em tratamentos mais curtos (60–80 s). 120 s) (Zahoranová et al. 2018). Por outro lado, aceita-se que uma exposição mais prolongada à PC provoca uma diminuição significativa na germinação e subsequente inibição dos parâmetros de

crescimento em sistemas de PF (Volin et al. 2000; Henselová et al. 2012; Filatova et al. 2013; Zahoranová et al. 2016; Zahoranová et al. 2018). Todos estes estudos confirmam que a eficácia do tratamento com plasma para a germinação das sementes pode variar com o tipo e condição das sementes e fatores ambientais como clima, condições do solo e disponibilidade de água (Randeniya, 2015).

## 6.4 CONCLUSÃO

Neste estudo, o tratamento com plasma frio em grãos de milho, considerado uma das principais culturas agrícolas, foi verificado como um método alternativo suave, que se mostrou promissor na descontaminação fúngica. Os tratamentos demonstraram eficácia antifúngica em todas as umidades a partir de 5 min de tratamento, concluindo que o tratamento é eficaz logo após a colheita, bem como após a secagem do grão.

Quanto à estabilidade das microestruturas, observou-se que o tratamento provocou enrugamento da superfície da casca em todos os tempos de exposição. Esse enrugamento aumentou à medida que o tempo de exposição aumentou.

Para os testes de capacidade germinativa, houve germinação das sementes apenas nos tratamentos de grãos com 12,72% de umidade. Os tratamentos de 2 a 10 min com plasma frio não causaram efeitos significativos na capacidade de germinação e crescimento radicular, enquanto que para os tempos de 15 e 20 min houve redução.

Portanto, os resultados indicam que o tratamento com plasma frio em grãos de milho pode ser uma nova alternativa para descontaminar grãos fúngicos. No entanto, a tecnologia precisa ser otimizada para uso comercial.

## REFERÊNCIAS

AFSHARI, Roya; HOSSEINI, Hedayat. Non-thermal plasma as a new food preservation method, its present and future prospect. **Archives of Advances in Biosciences**, v. 5, n. 1, 2014.

ALVES, Hellen Cristina Rodrigues; AMARAL, Renata Firmino do. Produção, área colhida e produtividade do milho no Nordeste. 2011.

AMINI, Maryam; GHORANNEVISS, Mahmood. Effects of cold plasma treatment on antioxidants activity, phenolic contents and shelf life of fresh and dried walnut (*Juglans regia* L.) cultivars during storage. **Lwt**, v. 73, p. 178-184, 2016.

APHA, American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 5<sup>a</sup> ed. Ed: Salfinger e Tortorello, 2015.

ARTUZO, Felipe Dalzotto et al. O potencial produtivo brasileiro: uma análise histórica da produção de milho. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 12, n. 2, p. 515-540, 2019.

BORGES, EE de L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, p. 83-136, 1993.

BRANDENBURG, R. et al. Antimicrobial treatment of heat sensitive materials by means of atmospheric pressure Rf-driven plasma jet. **Contributions to Plasma Physics**, v. 47, n. 1-2, p. 72-79, 2007.

BRASIL. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Secretary of Agricultural Defense. **Rules for seed analysis**, 2009.

BRASIL. Normative Instruction No. 29, of June 8, 2011. Provides for mandatory technical requirements for grain storage. Brasília, DF: **Official Gazette of the Union**, 2011.

CARVALHO, Denise Bruginski de; CARVALHO, Ruy Inacio Neiva de. Qualidade fisiológica de sementes de guaxuma sob influência do envelhecimento acelerado e da luz. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, p. 489-494, 2009.

CHAIWAT, Weerawut et al. Argon plasma treatment of tapioca starch using a semi-continuous downer reactor. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, p. 1125-1134, 2016.

CONAB. National Supply Company. **Historical series**. 2018. Available at: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras>>. Access in: May, 2018.

COSTA, Pedro Alves et al. Quebra de dormência em sementes de *Adenanthera pavonina* L. **Pesquisa agropecuária tropical**, v. 40, n. 1, p. 83-88, 2010.

DEVI, Yamuna et al. Influence of cold plasma on fungal growth and aflatoxins production on groundnuts. **Food Control**, v. 77, p. 187-191, 2017.

DHAYAL, Marshal; LEE, Sook-Young; PARK, Sang-Un. Using low-pressure plasma for *Carthamus tinctorium* L. seed surface modification. **Vacuum**, v. 80, n. 5, p. 499-506, 2006.

EMAN - European Mycotoxin Awareness Network. **Decontamination of mycotoxin contaminated raw materials**, 2010. Disponível em <<http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=64>>. Access: March, 2023.

FEIZOLLAHI, Ehsan; MISRA, N. N.; ROOPESH, M. S. Factors influencing the antimicrobial efficacy of dielectric barrier discharge (DBD) atmospheric cold plasma

- (ACP) in food processing applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 4, p. 666-689, 2021.
- FILATOVA, I. et al. The effect of plasma treatment of seeds of some grain and legumes on their sowing quality and productivity. **Rom. J. Phys.**, v. 56, p. 139-143, 2011.
- FILATOVA, I. et al. Plasma seeds treatment as a promising technique for seed germination improvement. In: **Proceeding of the 31st International Conference on Phenomena in Ionized Gases**, 2013.
- FISHER, Matthew C. et al. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nature reviews microbiology**, v. 20, n. 9, p. 557-571, 2022.
- GRZEGORZEWSKI, Franziska et al. Treating lamb's lettuce with a cold plasma– Influence of atmospheric pressure Ar plasma immanent species on the phenolic profile of *Valerianella locusta*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2285-2289, 2011.
- HALLOIN, J. M. et al. Deterioration resistance mechanisms in seeds. **Phytopathology**, v. 73, n. 2, p. 335-339, 1983.
- HEINLIN, Julia et al. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, n. 1, p. 1-11, 2011.
- HENSELOVÁ, Mária et al. Growth, anatomy and enzyme activity changes in maize roots induced by treatment of seeds with low-temperature plasma. **Biologia**, v. 67, p. 490-497, 2012.
- HERTWIG, Christian et al. Inactivation of *Salmonella* Enteritidis PT30 on the surface of unpeeled almonds by cold plasma. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 44, p. 242-248, 2017.
- KLUCZKOVSKI, Ariane M.; SCUSSEL, Vildes M. (Ed.). **Gerenciamento de risco da castanha-do-Brasil**. Nova Letra Gráfica & Editora, 2015.
- KONOPKA, James B. et al. One health: fungal pathogens of humans, animals, and plants. 2019.
- LAROQUE, Denise Adamoli et al. Cold plasma in food processing: Design, mechanisms, and application. **Journal of Food Engineering**, v. 312, p. 110748, 2022.
- LAROUSSE, Mounir. Low-temperature plasmas for medicine?. **IEEE Transactions on plasma science**, v. 37, n. 6, p. 714-725, 2009.
- LIAO, Xinyu et al. Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. **Food control**, v. 75, p. 83-91, 2017.
- LING, Li et al. Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean. **Scientific reports**, v. 4, n. 1, p. 5859, 2014.

MAGUIRE, James D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. 1962.

MISRA, N. N. et al. Cold plasma interactions with enzymes in foods and model systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 55, p. 39-47, 2016.

MITRA, Anindita et al. Inactivation of surface-borne microorganisms and increased germination of seed specimen by cold atmospheric plasma. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 645-653, 2014.

MRAVLJE, Jure et al. Cold plasma affects germination and fungal community structure of buckwheat seeds. **Plants**, v. 10, n. 5, p. 851, 2021.

MÜLLER, Leidiani et al. Cold atmospheric plasma for producing antibacterial bilayer films of LLDPE/cassava starch added with ZnO-nanoparticles. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 34, p. 100988, 2022.

NWABOR, Ozioma Forstinus et al. A cold plasma technology for ensuring the microbiological safety and quality of foods. **Food Engineering Reviews**, v. 14, n. 4, p. 535-554, 2022.

PANKAJ, Shashi Kishor et al. Effect of high voltage atmospheric cold plasma on white grape juice quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 12, p. 4016-4021, 2017.

PASQUALI, Frederique et al. Atmospheric cold plasma process for vegetable leaf decontamination: A feasibility study on radicchio (red chicory, *Cichorium intybus* L.). **Food control**, v. 60, p. 552-559, 2016.

PRESTES, Isabele D. et al. Principais fungos e micotoxinas em grãos de milho e suas consequências. **Scientia Agropecuaria**, v. 10, n. 4, p. 559-570, 2019.

RANDENIYA, Lakshman K.; DE GROOT, Gerard JJB. Non-thermal plasma treatment of agricultural seeds for stimulation of germination, removal of surface contamination and other benefits: a review. **Plasma Processes and Polymers**, v. 12, n. 7, p. 608-623, 2015.

REGO, Suelen Santos et al. Estresse hídrico e salino na germinação de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Veloso) Brenan. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 4, p. 37-42, 2011.

RÜNTZEL, Cristina Link et al. Effect of cold plasma on black beans (*Phaseolus vulgaris* L.), fungi inactivation and micro-structures stability. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, p. 864-873, 2019.

SAMSON, Robert A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 78, n. 1, p. 141-173, 2014.

SARANGAPANI, Chaitanya et al. Effect of low-pressure plasma on physico-chemical and functional properties of parboiled rice flour. **LWT-Food Science and Technology**, v. 69, p. 482-489, 2016.

SAVI, Geovana D. et al. Mycoflora and deoxynivalenol in whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) from Southern Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 7, n. 3, p. 232-237, 2014.

SCHOLTZ, Vladimir et al. Nonthermal plasma—A tool for decontamination and disinfection. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 1108-1119, 2015.

SCUSSEL, VM; SAVI, GD; KLUCZKOVSKI, AM. Fungi and Mycotoxins associated with stored grains. *Armazenagem de grãos*, Cap. V, 735-758, 2018.

SELCUK, Meral; OKSUZ, Lutfi; BASARAN, Pervin. Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. **Bioresource technology**, v. 99, n. 11, p. 5104-5109, 2008.

ŠERÁ, Božena et al. Does cold plasma affect breaking dormancy and seed germination? A study on seeds of Lamb's Quarters (*Chenopodium album* agg.). **Plasma science and technology**, v. 11, n. 6, p. 750, 2009.

SHARMA, Anket et al. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. **SN Applied Sciences**, v. 1, p. 1-16, 2019.

SLADEK, R. E. J.; STOFFELS, Eva. Deactivation of *Escherichia coli* by the plasma needle. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 38, n. 11, p. 1716, 2005.

SHELAR, Amruta et al. Emerging cold plasma treatment and machine learning prospects for seed priming: a step towards sustainable food production. **RSC advances**, v. 12, n. 17, p. 10467-10488, 2022.

SILVA, B. et al. Effect of Cold Plasma treatment on fungi inactivation and germination of maize grains (*Zea mays* L.). **IOSR-JAVS**, v. 13, n. 7, p. 28-32, 2020.

SILVA, N; TANIWAKI, MH; JUNQUEIRA, VCA; SILVEIRA, NFA; NASCIMENTO, MS; GOMES, RAR. *Microbiological Methods of Analysis in Food and Water: Laboratory Manual*. Institute of Food Technology - ITAL, Campinas, SP, Brazil. CRC Press / Balkema, *Taylor & Francis Group*, London, United Kingdom, 484p, 2013.

SOUŠKOVÁ, H. et al. The survival of micromycetes and yeasts under the low-temperature plasma generated in electrical discharge. **Folia Microbiologica**, v. 56, p. 77-79, 2011.

SRUTHI, N. U. et al. Impacts of cold plasma treatment on physicochemical, functional, bioactive, textural, and sensory attributes of food: A comprehensive review. **Food Chemistry**, v. 368, p. 130809, 2022.

STOLÁRIK, Tibor et al. Effect of low-temperature plasma on the structure of seeds, growth and metabolism of endogenous phytohormones in pea (*Pisum sativum* L.). **Plasma Chemistry and Plasma Processing**, v. 35, p. 659-676, 2015.

SUHEM, Kitiya et al. Inhibition of *Aspergillus flavus* on agar media and brown rice cereal bars using cold atmospheric plasma treatment. **International journal of food microbiology**, v. 161, n. 2, p. 107-111, 2013.

UKUKU, Dike O.; NIEMIRA, Brendan A.; UKANALIS, Joseph. Nisin-based antimicrobial combination with cold plasma treatment inactivate *Listeria monocytogenes* on Granny Smith apples. **Lwt**, v. 104, p. 120-127, 2019.

VARGA, J.; TÓTH, B.; TÉREN, J. Mycotoxin producing fungi and mycotoxins in foods in Hungary in the period 1994-2002. **Acta alimentaria**, v. 34, n. 3, p. 267-275, 2005.

VOLIN, John C. et al. Modification of seed germination performance through cold plasma chemistry technology. **Crop science**, v. 40, n. 6, p. 1706-1718, 2000.

WEBER, Roland WS; PITT, Dennis. Teaching techniques for mycology: 11. Riddell's slide cultures. **Mycologist**, v. 14, n. 3, p. 118-120, 2000.

YASSEEN, Bassam Taha; AL-OMARY, Saif Sami. An analysis of the effects of water stress on leaf growth and yield of three barley cultivars. **Irrigation Science**, v. 14, p. 157-162, 1994.

YINXIN, Liu et al. Effect of cold atmospheric plasma on the gray mold rot of postharvest mulberry fruit. **Food Control**, v. 137, p. 108906, 2022.

YUSAF, Talal; AL-JUBOORI, Raed A. Alternative methods of microorganism disruption for agricultural applications. **Applied energy**, v. 114, p. 909-923, 2014.

ZAHORANOVÁ, A. et al. Effect of cold atmospheric pressure plasma on the wheat seedlings vigor and on the inactivation of microorganisms on the seeds surface. **Plasma Chemistry and Plasma Processing**, v. 36, p. 397-414, 2016.

**ÓLEO DE ANDIROBA *versus* PLASMA FRIO**

EFEITOS NO GRÃO		MÉTODO ANTIFÚNGICO			
GRUPO	PARÂMETROS	NATURAL - Óleo de Andiroba		INSTRUMENTAL - Plasma Frio	
		Vantagem	Desvantagem	Vantagem	Desvantagem
Físico	• Superfície	Envolve toda superfície do grão	-	-	Distribuição localizada
	• Reentrâncias	Preenche todas as lacunas	-	-	-
	• Estrutura / tecidos	Não altera estrutura	-	Não altera internamente	Altera superfície
BIOLÓGICO	• Resíduos	Presente / saudável	-	Não	-
	• Efeito antifúngico	Membrana celular - destrói	-	Espécies reativas de O <sub>2</sub> e N <sub>2</sub> - produz	-
		Crescimento fúngico - inibição	-	Membrana celular - danos	-
		Estresse oxidativo - causa	-	Material genético - interação	-
		Enzimas - inibição	-	Parede celular - efeito	-
		-	Estresse oxidativo - causa	-	
	• Esporos	Germinação - inibição	-	Espécies reativas de O <sub>2</sub> e N <sub>2</sub> ;	-
		Desestabilização da parede celular	-	Parede celular - danos	-
		Crescimento e reprodução - inibição	-	Permeabilização membrana & DNA/RNA - danos	-
		Estrutura da parede esporulada - dano	-	Enzimas e proteínas - inativa	-
			-	Organelas internas - danos	-
			-	Efeito térmico localizado - produz	-
			-	Efeito físico (erosão e desgaste superficial);	-
			-	Desidratação - causa	-
			-	Alteração do Potencial de Membrana.	-
			-		-
QUÍMICO	• Germinação	-	Interfere	-	Interfere
	• Bloqueio de O <sub>2</sub>	Protege da oxidação de tecidos e nutrientes	-	-	-
	• Sensorial	-	Aroma sutil	-	Altera textura

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No decorrer das últimas décadas, o milho alcançou o patamar de maior cultura agrícola do mundo. Ao mesmo tempo que, possui uma grande importância em termos de produção, a cultura ainda se sobressai pela diversidade do seu uso. Destacando a sua importância na alimentação humana e, principalmente, animal, é preciso ter maior consciência e planejamento para amenizar os possíveis danos na produção da safra, e na saúde do consumidor.

Por mais que exista legislações específicas quanto carga fúngica e limites de micotoxinas em grãos de milho, a inspeção por parte dos órgãos responsáveis é insuficiente, assim como, a indústria ainda carece de procedimentos adequados para identificação da qualidade de matéria prima, acarretando grandes prejuízos econômicos, na saúde humana e animal. Vale salientar que, micotoxinas são cumulativas nos organismos, desencadeando as micotoxicoses. A contínua atualização e formação dos profissionais que trabalham nas lavouras, no armazenamento e processamento de grãos (desde o campo, até o armazenamento, e posteriormente no processamento), também representa um aspecto primário na prevenção da infecção fúngica.

Sabendo da importância econômica do milho e da preocupação quanto a contaminação fúngica (deterioração e/ou presença de toxinas), é de extrema importância a conscientização quanto a implementação de potenciais métodos brandos para seu controle. Estes devem ser de fácil utilização, não devem gerar compostos tóxicos, ou que modifiquem as propriedades nutricionais e a palatabilidade do grão e respectivos derivados, além de serem econômicos e capazes de diminuir ou eliminar os fungos, assim como degradarem as micotoxinas presentes nos grãos antes de serem comercializados.

- Através da caracterização das microestruturas da semente de Andiroba amazônica e do grão de milho, foram identificados os locais susceptíveis à agressões por fungos e outros organismos vivos. Nas sementes de Andiroba, os resíduos placentários (ricos em nutrientes), a superfície irregular (depósitos de esporos) e as células altamente porosas foram identificadas como os principais pontos de entrada para os microrganismos.
- No caso do grão de milho, o pericarpo e suas fissuras, assim como o pedúnculo, mostraram-se vulneráveis à infestação. O gérmen, rico em nutrientes, e continuidade do

canal de ligação do grão ao pedúnculo apresentaram-se com foco dos esporos a promover deterioração (colônias e danos nos tecidos do grão).

- Quanto ao método antifúngico NATURAL desenvolvido, os gêneros fúngicos isolados do grão de milho foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Mucor*, (todos cresceram em BDA, MEA, G<sub>25</sub>N e CAM, exceto *Penicillium* e *Mucor*). Com relação à inibição do OA, foi observado diferença estatística de crescimento (diâmetro -  $\varnothing$ ) das colônias dos fungos de campo *Fusarium* e armazenagem *Aspergillus* e *Penicillium* quando comparados ao Grupo Controle a partir de 5, 2 e 40% de OA, respectivamente. Para todos os gêneros, foi observado redução do IVCN mais acentuada nas maiores concentrações de OA. Quando o OA foi aplicado nos grãos em semeadura direta, o comportamento inibitório, foi observado em 30% das amostras. Quanto ao efeito do agente antifúngico natural na germinação, a aplicação do OA interferiu na qualidade fisiológica enquanto SEMENTES, retardando e / ou impedindo a germinação - o que é esperado para o GRÃO na armazenagem tradicional, bem como sua utilização como alimentos. Os resultados sensoriais indicaram que o tratamento com OA influenciou as percepções dos painelistas, onde ocorreu uma intensificação da cor, um leve desvio no aroma e uma preferência sutil na aparência em comparação com o grupo controle. Esses resultados são relevantes para considerar o uso de óleo de andiroba em grãos de milho sem comprometer suas características sensoriais, o que pode impactar na aceitação pelo consumidor e em potenciais aplicações industriais. A adição de óleo de andiroba aos grãos armazenados comercialmente manteve a umidade e preservou a qualidade durante 30 dias, devido à microcamada de óleo presente no GT.

- O tratamento INSTRUMENTAL com PF mostrou-se promissor na redução da contaminação fúngica dos grãos. Os grãos de milho naturalmente contaminados, com teores de umidade de 11,42; 12,72 e 17,96%, expostos ao PF por 2; 5; 7; 10; 15 e 20 min, obtiveram uma redução significativa na contagem fúngica em tratamentos superiores a 5 min (maior redução logarítmica da contaminação fúngica, variando de 0,75 a 1,4 log, ocorreu nos tratamentos de 10; 15 e 20 min). Os diferentes teores de umidade do milho não influenciaram significativamente a eficácia do tratamento com PF. Em comparação com o GC, a superfície do milho (pericarpo) tratado com PF desenvolveu uma textura enrugada, aumentando com tempos de exposição mais longos. Aplicando tempo de exposição de 10 min, o tratamento com PF teve potencial para reduzir a contaminação fúngica nos grãos sem comprometer a capacidade germinativa.

Esses resultados indicam que os tratamentos com métodos brandos podem ser alternativas viáveis para o controle da contaminação fúngica em grãos de milho, preservando suas propriedades intrínsecas e externas. A aplicação desses métodos durante o manuseio dos grãos, seja por meio de sprays de OA ou com a utilização de equipamentos de PF, pode ser uma estratégia eficaz. No entanto, são necessários estudos futuros para detalhar a logística e a implementação desses métodos em escala piloto em Armazéns ou Entrepostos de comercialização de grãos.

## ANEXOS

### [A] ARTIGOS PUBLICADOS

1. Characteristics and Effects of the Amazonian Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) Oil Against Living Organisms – A Review
2. Characteristics of Maize (*Zea mays* L.) Grains and Their Living Organisms Entrance Sites by Scanning Electron Microscopy
3. Effect of Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) Oil for Fungi Control in Maize (*Zea mays* L.) Grains
4. Effect of Cold Plasma Treatment on Fungi Inactivation and Germination of Maize (*Zea mays* L.) Grains

### [B] ARTIGOS SUBMETIDOS

1. Stereo and Scanning Electron Microscopy of the Amazonian Andiroba (*Carapa Guianensis* Aubl.)
2. Stereo and Scanning Electron Microscopy of the Amazonian *Andiroba* (*Carapa Guianensis* Aubl.) Seed: Fungi Spoilage Susceptibility Sites
3. Effect of Cold Plasma on Maize (*Zea Mays* L.) Grains: Inactivation of Fungi, Microstructure Stability and Germination Capacity

**[A] ARTIGOS PUBLICADOS**

## Characteristics and Effects of the Amazonian Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) Oil Against Living Organisms – A Review

Silva, B.A.<sup>1</sup>; Scussel, V.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants - LABMICO, Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC Brazil.

### Abstract:

The andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) tree is a native Meliaceae family species from the Amazon region that has an important socioeconomic function due to its (wood / bark / leaf / seeds) several applications for the indigenous population. Its seed has one of the most healing oils known in that region. The andiroba oil (AO) applications vary from anti-living organisms (bacteria / fungi / insect / parasite) attack, to diseases (itching / fever / asthma / sore throat / wound) symptoms healing / cure. This review gathers literature information regarding AO characteristics related to tree and seed botany, oil extraction procedures, sensory specifics, physical and chemical composition, apart from its effects against different living organisms and their susceptibilities. Also, information regarding its health and food applications, including possible toxicity and seed residues utilization.

**Key Word:** Andiroba; Oil; Decontamination; Fungi; Food; Amazon.

Date of Submission: 26-07-2020

Date of Acceptance: 09-08-2020

### I. Introduction

The Amazonian forest (Central America and Northern part of South America) is a source of a quite broad diversity of native plants that have multiple applications, especially the trees. Among them, there is the *Carapa guianensis* Aubl, known throughout the Amazon region as *Andirobeira* (Pennington et al., 1981; Fisch et al., 1995). The *andiroba* term, in Brazil, is derived from the Tupi-Guarani (indigenous language) word *and* that means oil, and *rob* for bitter (Silva et al., 2005).

Thus, *andiroba* means bitter oil, a flavor conferred to the high level of phenolic compounds, which apart from the seeds, are also reported in the branches and trunks (da Silva et al., 2009). It is also called, *andirobinha*, *landiroba*, *andiroba branca*, *andiroba-do-igapó*, *carape*, *landiroba* and *penalvain* Brazil. On the other hand, in different languages / countries it is called *roba-mahogany* (United States of America), *karapa*, *british-guiana-mahogany* (Guiana), *bois-caille*, *carape-blanc*, *carape-rouge*, *andiroba-carapa* (French Guiana), *crabwood* (England), *cedro-bateo* (Panama), *andiroba* (Paraguay / Uruguay), *krappa* (Suriname) and *cedro macho* (Cuba) (Horn, 1918, Gerry et al., 1957, Kukachka, 1962, Andrade et al., 2001, Ferrari et al., 2007; Barros et al., 2012).

Its wood is of high quality, either for housing construction, furniture manufacturing and vessels interior. The bark, leaves, flowers and seeds can also be used for tea and oil extraction for different treatment applications (Hammer & Johns, 1993; Andrade, 2001; Silva, 2002; Ambrozin et al., 2006; Farias, 2007; Mendonca & Ferraz, 2007; Tappin, 2007; Andrade, 2008; Tappin et al., 2008; Pessoa, 2009; Chicaro, 2010; Gomes, 2010; Miranda, 2010; Barros, 2011; Tanaka et al., 2012). Despite that, the seeds oil (*andiroba* oil – AO) is the most known and utilized by the indigenous groups and other natives for a quite broad healing applications either for disease symptoms healing (snake bites/insect stings & repellent, microorganisms – bacteria / fungi infection) and other living organisms (protozoa, parasites) (Silva, 2002; Silva et al., 2009; Gomes, 2010; Lima, 2009; Miranda et al., 2012). The oil can also be applied in the manufacture of soaps and repellent candles.

This review gathers information on AO characteristics (tree botany / physical-chemical / sensorial / composition) regarding its effect against living organisms and its applications.

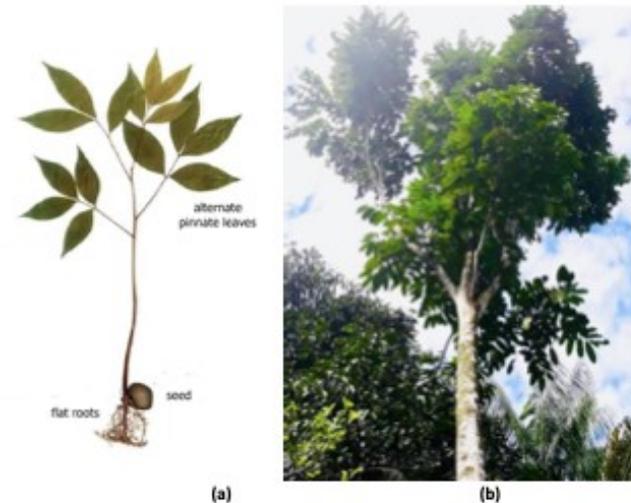
### II. The Andiroba Tree

#### • Botany

The species *Carapa guianensis* Aubl., Sapindales order, *Carapa* genus belongs to the Meliaceae family (alternate pinnate leaves, no stipules with flowers borne in panicles, cymes, spikes or clusters) (Barros et al., 2012). It is a monoecious tree of medium to large size with cylindrical and straight trunk. It can reach up to 55 m in height, (usually reaching 25-35 m). It has a cylindrical and straight shaft of 20-30 m, and may present sapopemas (flat roots). Its crown is of medium size, dense and composed of erect branches or with a slight

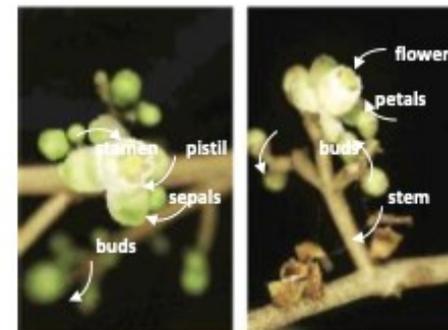
curvature. Its bark is thick and bitter and has a reddish color, but it can also be grayish (Ferraz et al., 2003). Figure 1 shows *andiroba* tree characteristics.

The branches (30-90 cm in length) tend to stand upright, with large leaves (composed, alternated and paripinnate), with a trace of a terminal, tomentose and glandular leaflet (Ferraz et al., 2002). Opposite or subopposite leaflets of 3-10 pairs, 10-50 cm long and 4-18 cm wide. They have full margins and a shiny dark green collar on the upper surface and glabrous on the lower surface with simple and sparse trichomes in the central vein. Also present extra-floral nectaries at the leaf tips (Lorenzi, 1992; Ferraz et al., 2003).



**Figure 1.** Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.): (a) seed germination parts and (b) adult tree (Ferraz et al., 2003 and current authors, respectively).

Its flowers are small (Figure 2), with petals no more than 8 mm long, unisexual, sessile or sub-sessile, glabrous, slightly fragrant white to cream and are predominantly 4-merous, with 4 sepals, 8 petals and 16 stamens (Rizzini & Mors, 1976; Pennington et al., 1981). The *andiroba* tree flowering occurs during the *rain* season (from January-February to August-September) and *dry* season with fruiting between autumn (from June-July to February-March). Its fructification starts 10 years after planting (Ferraz et al., 2003; Lima, 2010).



**Figure 2.** Details of the andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) flower (Embrapa-modified).

The fruit (Figure 3) is a capsule, formed of 4 valves, globous or subglobous (5-11 cm diameter), when ripe opens and releases from 4 to 12 seeds (Loureiro et al., 1979; Pennington et al., 1981; Cavalcante, 1991; Lorenzi, 1992; Proffiro et al., 2012). It is dark yellow in color, weighing 90 and 540 g for shell and seeds respectively (corresponding to 24 and 66% of the total fruit) (D'Alessandro, 2008).

The *andiroba* seed, which provides large amounts of oil, has a brown color, with rather large variation in shape and size. Their weight can vary from 1 to 70 g (average 21 g) and length from 10 to 60 mm (Ferraz et al., 2003). Its sides are angled due to seeds mutual compression (in the pod). Its tree can produce from 180 to 200 kg / year of seeds containing approximately 60% of AO (Lorenzi, 1992).

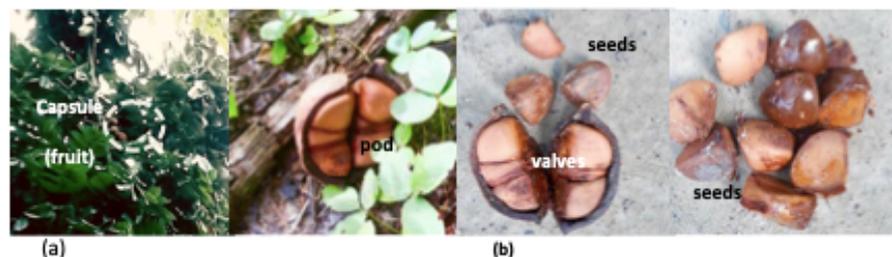


Figure 3. Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl) characteristics of the: (a) fruit and (b) seeds (their distribution in the pod).

• **Distribution and climate**

The native species are distributed from Central America to the Northern region of South America (British and French Guiana, Trinidad, along the Caribbean Coast, Venezuela, Ecuador, Colombia, Peru and Brazil). Apart from those countries, andiroba is also found in West India and South Africa (Ferraz& Camargo, 2003, Qi et al., 2003, Qi et al., 2004, Ambrozin et al., 2006, Duminil et al., 2006, Farias et al., 2007, Ferrari et al., 2007).

In Brazil, it occurs in the Northern (Acre, Amazonas, Amapá and Pará) and Northeast (Maranhão) regions (Sakuragui et al., 2012). It is found mainly in floodplains and swamps along the water streams. Although, it also grows on hillsides in well-drained soils and is widely cultivated on land, where it reaches smaller size (Lima & Azevedo, 2005).

Regarding climate, andiroba trees occur in regions with humid tropical climate (precipitations between 1,800 and 3,500 mm annually). Temperatures can range 17 to 30°C and relative humidity from 70 to 90%. The species is best developed in clay and muddy soils (not soaked) and abundant organic matter (Revilla, 2001).

**III. Andiroba oil**

Throughout the history of the Amazon, AO has played an important role in the regional economy and continues to be highly appreciated, especially in popular medicine. Compared to logging, the collection of seeds requires little investment and is not tree destructive. AO production can ensure an annual economic return for the local population. Oil and its by-products, such as soaps and candles, are generally found at street markets.

• **Oil extraction**

The AO can be extracted both by *traditional* (small portions) and *commercial* (large scale) procedures / processes. The Figure 4 summarizes the extraction steps of the *traditional* and *commercial* method.

**Traditional:** this extraction method is quiet utilized by the natives (indigenous communities and *caboclas* of the Northern Region), where it is divided into: seed collection & selection, mass preparation and oil extraction (Mendonca & Ferraz, 2007). It consists of boiling the seeds in water (2-3 h), then leaving them to rest (in the shade / few days) (Figure 4.a). After that period of time, the seeds are peeled and crushed in a pestle. When this material is totally crushed, it is sun exposed that gradually releases the oil by dripping. The yield of the traditional process is estimated of 4% of total seed (40 g of oil / kg). From the oil extraction, the remaining seed meal can be utilized for insects repellent (candles) (Ferraz&Camargo, 2003; Embrapa-Acre, 2002).

**Commercial / industrial:** the process starts from break the seeds into small pieces, then drying in an oven at 60-70°C until reaching 8% moisture content (mc) followed by pressing (at 90°C) in hydraulic presses. The double-pressed industrial yield rarely exceeds 30% of the weight of the seeds (with 8% mc) (Ferraz& Camargo, 2003; EMBRAPA Acre, 2002).

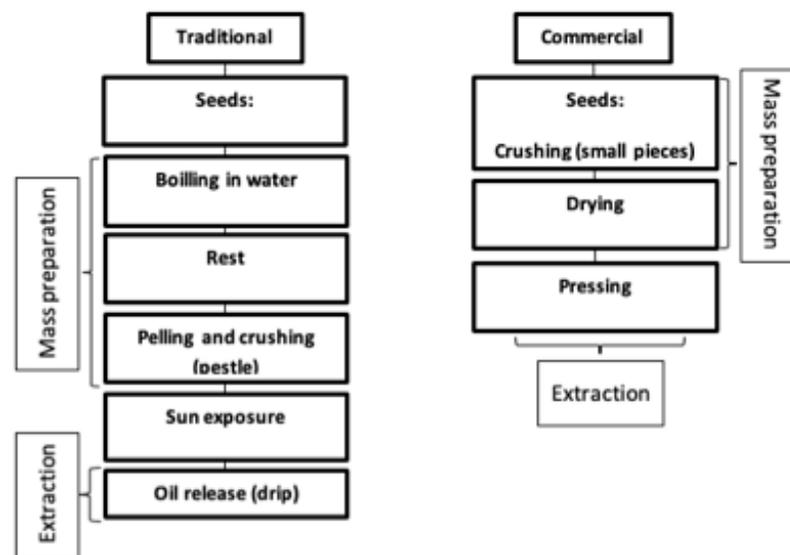


Figure 4. Flowchart of the (a) Traditional and (b) Commercial extraction processes of andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) oil.

• **Physicochemical properties and sensory characteristics**

The AO extracted from the andiroba seed is light yellow and has a very bitter taste (Figure 5). When subjected to temperatures below 25°C, it solidifies, acquiring a consistency similar to that of petroleum jelly (Farias, 2007, Menezes, 2008). After extraction, it quickly becomes profitable (Andrade, 2008; Gomes, 2010).



Figure 5. Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) oil extracted from seeds.

The oil can also be dark and fast flowing, when extracted from species that occur on dry land, or light and viscous, when extracted from species that occur in lowland areas (Senhorini, 2010).

Table 1 shows the oil physical-chemical properties. As physical characteristics, andiroba oil has a viscosity of 46.6 mm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> and a density of 0.92 g ltr<sup>-1</sup>. With respect to chemical parameters, the oil has an iodine index ranging from 65 to 75 g of I<sub>2</sub>g<sup>-1</sup>, an acidity level of 2.3 mg KOH g<sup>-1</sup>, a refractive index of 1.459, in addition to 7.13 h of Oxidativestability, PetroOxy, saponification index between 190 to 210 mg KOH g<sup>-1</sup>, fusion point of 22 °C and unsaponifiable matter 3 to 5%. Seeds contain lipids, fiber, minerals and fatty acids. According to the

following composition in the oil: Moisture, Protein, Lipid, Crude Fiber, ash and Carbohydrates of 40.2, 6.2, 33.9, 12.0, 1.8 and 6.1% (Melo et al., 2008; Pinto, 2007).

**Table 1.** Physicochemical properties of the andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) oil.

Parameter		
Physical	Values	Unit
Viscosity	46.6	mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
Density 15 °C	0.92	gr ltr <sup>-1</sup>
Chemical		
Iodine index	65 - 75	g of I <sub>2</sub> g <sup>-1</sup>
Acidity level	2.30	mg KOH g <sup>-1</sup>
Refractive index	1.459	
Oxidativestability, PetroOxy	7.13	h
Saponification index	190 - 210	mg KOH g <sup>-1</sup>
Fusion point	22.0	°C
Unsaponifiable matter	3 - 5	%
Proximate Composition		
Moisture	40.2	%
Protein	6.2	%
Lipid	33.9	%
Crude Fiber	12.0	%
Ash	1.8	%
Carbohydrates	6.1	%

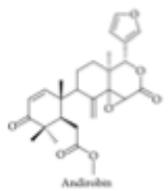
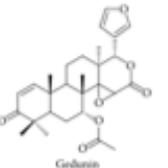
Melo et al., 2008, Pinto, 2007.

**• Chemical Composition**

Regarding the AO composition (Table 2), several compounds present in this species are reported. Among them, andirobin, gedunine and its derivatives known as 7-deacetoxy-7-oxogedunine, 6 $\alpha$ -acetoxygedunine, 11 $\beta$ -acetoxygedunine, 6 $\alpha$ , 11 $\beta$ -acetoxygedunine, 6 $\alpha$ -hydroxygedunine, 6 $\beta$ , 11 $\beta$ diacetoxygedunine, 1,2-dihydro-3 $\beta$ -hydroxy-7-deacetoxy-7-oxo-gedunine,  $\alpha$ -acetoxygedunine,  $\beta$ -acetoxygedunine and dihydrogedunine (Marcelle & Mootoo, 1975; Hammer & Johns, 1993; Andrade et al., 2001; Sarria et al., 2011; Tanaka et al., 2011; Arrebola et al., 2012; Inoue et al., 2012).

Other components are also present of 6 $\alpha$ -acetoxy-epoxiazadiradione, 1,3-di-benzene carbo amino-2-octadecyl acyl-glyceride, triacontanoic acid, 2,6-dihydroxy-methyl-benzoate, 3,4-dihydroxy-methyl-benzoate, tetratriacontanoic acid, naringenin, scopoletina, 2,3-dihydroxy-glyceride hexacosanoic acid, epoxyazadiradione, methyl angolensate, 4-epoxiazadiradione, methyl angolensatedin, 4,4,8-trimethyl-17-furanylsteroid, carapanolides limonoids A and B, 3 $\beta$ -deacetylflissinolideo, ocotilloneo,  $\beta$ -photogedunine, cabraleadiol,  $\alpha$ -dihydroxyterpene,  $\alpha$ -11- $\beta$ -trihydroxyterpene and 6 $\beta$ -acetoxygedunine (Andrade et al., 2001; Sarria et al., 2011; Tanaka et al., 2011; Arrebola et al., 2012; Inoue et al., 2012).

**Table 2.** Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl) oil composition regarding andirobin and gedunine derivatives and other components.

Andirobin and gedunine AO composition	Others
Andirobin	
	$\alpha$ -dihydroxyterpene
Gedunine	
	$\alpha$ -11- $\beta$ -trihydroxyterpene
7-deacetoxy-7-oxogedunine 6 $\alpha$ -acetoxygedunine	6 $\alpha$ -acetoxy-epoxiazadiradione triacontanoic acid

11 $\beta$ -acetoxygedunine	2,6-dihydroxy-methyl-benzoate
6 $\alpha$ , 11 $\beta$ -acetoxygedunine	3,4-dihydroxy-methyl-benzoate
6 $\alpha$ -hydroxygedunine	tetratriacontanoic acid
6 $\beta$ , 11 $\beta$ -diacetoxygedunine	cabraleadiol
1,2-dihydro-3 $\beta$ -hydroxy-7-deacetoxy-7-oxo-gedunine	2,3-dihydroxy-glyceride hexacosanoic acid
$\beta$ -acetoxygedunine	scopoletina
dihydrogedunine	3 $\beta$ -deacetylflissinolideo
6 $\beta$ -acetoxygedunine	epoxy-azadiradione
$\alpha$ -acetoxygedunine	methyl angolensate
$\beta$ -photogedunine	4-epoxiazadiradione
	methyl angolensatedin
	4,4,8-trimethyl-17-furanylsteroid
	carapanolides limonoids A and B
	naringenin
	ocotilloneo
	1,3-di-benzene carbo amino-2-octadecyl acyl-glyceride

Andiroba oil consists of fatty acids and an unsaponifiable fraction (2 to 5%). This is composed of bitter substances, called meliacins or limonoids (Ambrozim, 2000; Ambrozim et al., 2006).

The presence of oleic, palmitic, stearic, arachidic, myristic and linoleic acids has been reported, in addition to  $\alpha$ -cubelene,  $\alpha$ -copaene, ethyl palmitate, karyophylene,  $\alpha$ -karyophylene, olein, palmitine and glycerin (Diniz et al., 2005; Penido et al., 2005; Penido et al., 2006; Costa-Silva et al., 2007; Costa-Silva et al., 2008; Carvalho et al., 2012; Souza et al., 2012).

Among the fatty acids present in AO (Table 3), oleic acid (46.8-52%) and palmitic acid (28-39%) are the major compounds. Other fatty acids were also quantified, such as stearic acid (1.7-7.8%),  $\alpha$ -cubelene (0.5%),  $\alpha$ -copaene (2.3%), arachidic acid (1.2%) and ethyl palmitate 0.9% in small / lower percentage though (Penido et al., 2005; Penido et al., 2006; Costa-Silva et al., 2007; Costa-Silva et al., 2008; Souza et al., 2012).

**Table 3.** Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl) oil fatty acids composition

Composition of fatty acids	
Fatty acids	Composition (%)
<b>Saturated</b>	
Myristic	0.33
Palmitic	28 - 39
Stearic	1.7 - 7.8
Ethyl palmitate	0.9
<b>Unsaturated</b>	
Oleic	46.8 - 52
Linoleic	11.03
Linolemic	1.35
Archaic	1.2
$\alpha$ -cubelene	0.5
$\alpha$ -copaene	2.3
Behenic	0.34

The bitterness of andiroba oil is attributed to a group of terpenes called meliacins, which are very similar to bitter antimalarial chemicals. Recently, one of these meliacins, called gedunine, has been documented with antiparasitic and antimalarial properties with an effect similar to quinine (Mackinnon et al., 2002). Chemical analysis of andiroba oil identified the anti-inflammatory, healing and insect-repellent properties that are attributed to the presence of limonoids, named andirobin (Roy & Saraf, 2006). Limonoids are the compounds responsible for the antiseptic, anti-inflammatory, healing and insecticidal activity of oil and bark of andiroba (Barros, 2011).

In the unsaponifiable fraction (Table 4) glyceride 1,3-di-benzene carbonamine-2-octadecylic acid, 2,6-dihydroxymethylbenzoate, 3,4-dihydroxymethylbenzoate, naringenin, tetratriacontanoic acid, triacontanoic acid, ursolic acid, scopoletina, 2,3-dihydroxy-glyceride hexacosanoic acid, 6 $\alpha$ -acetoxyepoxiazadiradione, 6 $\alpha$ -hydroxygedunine, epoxyazadiradione, 7-deacetoxy-7-oxogedunine, andirobin, gedunina, methyl angolensate, 6 $\alpha$ -acetoxygedunina, 6 $\beta$ -acetoxygedunine, 6 $\alpha$ , 11 $\beta$ -diacetoxygedunina, 6 $\beta$ , 11 $\beta$ -diacetoxygedunina, 11 $\beta$ acetoxygedunina, 1,2-dihydro-3 $\beta$ -hydroxy-7-deacetoxy-7-oxogedunine, 17 $\beta$ hydroxyazadiradione, xylocensin k, deacetylgedunina and 7- deacetylgedunin (Ambrozim et al., 2006; Costa-Silva et al., 2007; Costa-Silva et al., 2008; Ferrari et al., 2011; Miranda Júnior et al., 2012).

The unsaponifiable fraction of andiroba oil (2% to 5%) presents as major compounds tetranortriterpenoids (or limonoids), of which 6 $\alpha$ -acetoxygedunine (7%), 7-deacetoxy-7-oxo-gedunine (7 %), andirobin (4%), gedunin (3%) and methyl angolensate (6%) (Ferrari et al., 2011).

**Table 4.** Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) oil fatty acids composition

Unsaponifiable fraction	
glyceride 1,3-di-benzene carbonamine-2-octadecylic acid	1,2-dihydro-3β-hydroxy-7-deacetoxy-7-oxogedunine
2,6-dihydroxymethylbenzoate	6β, 11β-diacetoxypedunine
3,4-dihydroxymethylbenzoate	11β-acetoxypedunine
naringenin	6α, 11β-diacetoxypedunine
tetrahydroxymethylbenzoic acid	17β-hydroxyazadiradione
triacetate acid	xylocensin k
ursolic acid	deacetylpedunine
scopoletina	7- deacetylpedunin
2,3-dihydroxy-glyceride hexacosanoic acid	andirobin
6α-acetoxypedunine	gedunine
6α-hydroxygedunine	methyl angolensate
epoxiazadiradione	6α-acetoxypedunine
7-deacetoxy-7-oxogedunine	6β-acetoxypedunine

**IV. Andiroba Applications**

• **Plant parts**

The plant parts of the species *Carapa guianensis* Aubl., as well as their derivatives, have been used by traditional inhabitants of the Amazon rainforest for many years for different purposes, being used in isolation or associated with other plant / derivative drugs for the prevention and treatment of illnesses. The andirobeira bark is used as cicatrizant and vermifuge (Ferraz&Mendonça 2006).

Although the AO (extracted from seeds) of this species is the one with the highest number of citations regarding its popular use in the literature, the use of tea or decoction of the stem bark, leaves, flowers and flowers oil extracted from stands out, with the popular medicinal indication being similar to that attributed to oil extracted from the seed, as shown in (Table 5).

In the researched literature, reports were found that the caboclos, traditional inhabitants of the Amazon rainforest who live on the river bank, make a medicinal soap containing crude andiroba oil, wood ash and cocoa skin residues. This soap is especially recommended for the treatment of skin diseases. In addition, andiroba oil can be applied directly to the joints to relieve arthritis pain, and when mixed with hot water and human milk, it is used in drops for ear infections (Hammer & Johns, 1993; Nayak et al., 2010; Nayak et al., 2011).

**Table 5.** Applications of andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) on health healing

Used part	Popular medical indication
<b>Bark</b>	<b>Analgesic:</b> relief of pain in cases of uterine cancer arthritis and rheumatism
	<b>Anti-inflammatory:</b> throat inflammation, contusions, skin inflammations and splenitis
	<b>Antipyretic</b>
	<b>Healing:</b> used in general wounds in insects bites
	<b>Antiseptic</b>
	<b>Against infections:</b> respiratory tract infections, skin infections, ear infections, bacterial infections and hepatitis
	<b>Insect repellent and insecticide</b>
	<b>Anti-helminthic / antiparasitic:</b> worms and scabies (canin)
	<b>Antianemic</b>
	<b>Antidiarrheal</b>
<b>Leaf</b>	<b>Reduces the level of blood glucose (diabetes)</b>
	<b>Digestive stimulant</b>
	<b>Analgesic:</b> relief of pain in cases of rheumatism
	<b>Skin problems</b>
	<b>Contusions</b>
	<b>Antipyretic</b>
	<b>Healing</b>
<b>Pharyngitis</b>	
<b>Seed</b>	<b>Against intestinal worms</b>
	<b>Insect repellent</b>
	<b>Analgesic:</b> relief from pain in cases of arthritis
	<b>Anti-inflammatory:</b> contusions
	<b>Antipyretic</b>
	<b>Healing:</b> used in cuts and bites of insects
	<b>Emollient</b>
	<b>Against bacterial infections</b>
<b>Insect repellent</b>	
<b>Flower</b>	<b>Vermifuge</b>
	<b>Analgesic</b>

<b>Flower oil</b>	<b>Bronchitis</b>
	<b>Antipyretic</b>
	<b>Against infections:</b> respiratory tract infections and bacterial infections
	<b>Anthelmintic:</b> worms
	<b>Antidiarrheal</b>
	<b>Antianemic</b>
	<b>Against tumors</b>
	<b>Healing:</b> used in general wounds
	<b>Prevention of skin diseases</b>
	<b>Insect repellent</b>

Ministry of Health and ANVISA, 2015.

• **Andiroba oil**

In the Amazon region, this oil has an important commercial value. Used by the pharmaceutical and cosmetic industry, it has numerous health benefits. In the extraction process, there are two residues: the seed husk and the mass. Because it has insecticidal properties, the shells are burned to keep mosquitoes away. The residue of the pasta is used as food for cattle and in the homemade manufacture of andiroba soap (Mendonça & Ferraz, 2007).

**Pharmaceuticals:** In folk medicine, AO is widely used for cough and sore throat treatments, also for muscle bruises, skin lesions (Penido et al, 2006; Nayak et al., 2011). Used to relieve bruises, edema and healing due to its excellent penetration into the skin (Penido et al., 2006). Some studies suggest that other pharmacological activities, such as antitumor, insecticide and microbial, are also explored by the industry. As a repellent, to remove mosquitoes, leftovers from oil extraction, andiroba bagasse balls are burned or can also be applied in a mixture with annatto (*Bixaorellana*) to form a paste that protects the body against mosquito bites. The andiroba candle is used as an effective repellent for the *Aedes aegypti* mosquito, a vector of yellow fever and dengue. When burned, it exhales an active agent that inhibits mosquito hunger and, consequently, reduces its need to injure people. Research has shown a 100% efficiency in repelling mosquitoes, a result never found in any other product on the market for mosquito control. In addition to this characteristic, the candle is completely non-toxic, does not produce smoke and does not contain perfume. The external use of andiroba oil is indicated as a repellent, against parasites and itching in general, as wound healing and to remove spongy flesh from the eyes. Due to its good penetration into the skin, it is often used in massages to relieve swelling, dislocations, arthritis and rheumatism, also acting as a skin soothing and lightening of superficial spots. The internal use is recommended mainly to combat flu, fever, asthma, sore throat and even to decrease the level of glucose in the blood (diabetes). A mixture of AO and salt is widely used to prevent ticks in cattle (Mendonça & Ferraz, 2007).

**Cosmetics:** widely used in the manufacture of shampoos, as they strengthen and beautify hair and soaps to combat pimples and acne. These pharmacological properties are attributed to the presence of tetranortriterpenoids known as limonoids (Penido 2006). The Amazonian oil of andiroba is successfully applied in massage and is usually used for many diseases and skin conditions, including psoriasis. Sun protection creams with andiroba have excellent emollient properties and, due to their high concentration of unsaponifiable substances, they add the ability to repel insects to the sunscreen. Strengthens and beautifies hair and in the form of soap is a miracle cure in the fight against acne and pimples. This oil combined with another oil called copaiba, forms a natural ingredient extremely effective in controlling dandruff, besides providing shine to the hair. It also has anti-inflammatory property that reduces itching and treats the scalp.

Generally speaking, it is an oil with insect repellent properties and used to treat diseases such as arthritis, muscle strains, skin tissue disorders, rheumatism, malaria, kidney infection, hepatitis, cough, flu, pneumonia, bronchitis, severe ulcers, mycosis, protozoa and snake, scorpion and bee stings (Ferraz, 2003; Lima, 2010). Much sought after by the cosmetic and pharmaceutical industries due to its antiseptic, anti-inflammatory, curative and emollient properties (Revilla, 2001; Lorenzi, 2002; Ferraz& Camargo, 2003; Ferraz, 2003; Lima, 2010).

**Table 5.** Applications of andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) oil on health healing

<b>Seed oil</b>	<b>Analgesic:</b> pain relief in uterine cancer, rheumatism, arthritis and torticollis
	<b>Anti-inflammatory:</b> throat inflammation, contusions and skin inflammation including psoriasis
	<b>Antithermic</b>
	<b>Healing:</b> used in general wounds, insect bites and ulcers
	<b>Bactericide and fungicide</b>
	<b>Against infections:</b> respiratory tract infections, skin infections, ear infections and bacterial infections
	<b>Insect repellent and insecticide</b>
	<b>Anti-helminthic / antiparasitic:</b> lice and tick
	<b>Antidiarrheal</b>

Reduces the level of blood glucose (diabetes)

Ministry of Health and ANVISA, 2015.

**V. Andiroba oil effect on living microorganisms**

The effects of AO regarding living organism's control / inactivation specially against microorganisms and others (insects / parasites / protozoa) are shown in Tables 6 and 7, respectively.

**• Against microorganisms**

The living organisms regarding andiroba oil effect reported in the literature are mainly for bacteria, fungi and, in less, extent for yeast (Table 6).

**BACTERIA**

(a) *Xanthomonas axonopodis* - Pires et al. (2015) conducted a study to verify the ability of AO to inhibit the bacterium *Xanthomonas axonopodis* sp. *Passiflora*. Authors used pure AO in three concentrations (1, 2 and 3% for the bacteria). AO had a significant effect on the inhibition of bacterial growth at all concentrations used, being the higher concentration more efficient on inhibiting bacterial growth than the Control.

(b) *Klebsiella pneumoniae*- Two studies reported in the literature the AO effect on *Klebsiella pneumoniae*. Meccia et al. (2013) applied oil extracted from andiroba leaf. The antimicrobial activity of the oil was tested using the diffusion method described by Velasco et al. (...). Filter paper discs impregnated with 10 µL of oil were placed on the agar surface. Paper discs impregnated with antimicrobial solutions were added. Inhibition halos were measured. To perform MIC determination, oil solutions ranging from 10 to 450 µg / mL were prepared using DMSO (dimethylsulfoxide) as solvent. The antimicrobial activity of the oil was determined using the disk diffusion assay. No antimicrobial activity was found for this bacterium. Already Silva and Almeida (2014) used the modified Kirby-Bauer method (Charles, 2009), using the disk diffusion test with *Klebsiella pneumoniae* strains and standardized antibiotics, andiroba peel ethanolic crude extract was used in concentrations 25, 50 and 100 mg/mL. Even its highest concentration showed low antimicrobial activity against *K. pneumoniae* strains.

(c) *Staphylococcus aureus* - As for the *Klebsiella pneumoniae*, two studies were found in the literature for *S. aureus*. The methodologies used were the same as those performed in (b), varying only the results. Meccia et al. (2013) observed activity against *S. aureus* only for oil at a minimum inhibitory concentration of 400 µg / mL. Already Silva and Almeida (2014) found no antimicrobial activity against the strain of this strain.

(d) *Escherichia coli* -As for the *Klebsiella pneumoniae*, two studies were found in the literature. The methodologies used were the same as those performed in (b), varying only the results. Meccia et al. (2013) observed activity against *E. coli* only for oil at a minimum inhibitory concentration of 400 µg / mL. Already Silva and Almeida (2014) found no antimicrobial activity against the strain of this strain.

(e) *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhi* - The methodology used was the same performed by Meccia et al. (2013) in (b), varying only the result. No antimicrobial activity was found for these bacteria.

**YEAST**

(a) *Candida albicans* and *Candida krusei*- Meccia et al. (2013) utilized oil extracted from andiroba leaf. The antimicrobial activity of the oil was tested using the diffusion method described by Velasco et al. (...). Filter paper discs impregnated with 10 µL of oil were placed on the agar surface. Paper discs impregnated with antimicrobial solutions were added. Inhibition halos were measured. To perform MIC determination, oil solutions ranging from 10 to 450 µg / mL were prepared using DMSO (dimethylsulfoxide) as solvent. The antimicrobial activity of the oil was determined using the disk diffusion assay. No antimicrobial activity was found for these yeasts.

(b) *Pseudomonas aeruginosa* - The methodology used was the same performed by Meccia et al. (2013) in (a), varying only the result. No antimicrobial activity was found for *P. aeruginosa* bacteria.

**FUNGI**

(a) *Colletotrichum gloeosporioides* - Two studies on the effect of AO on fungus (*C. gloeosporioides*) were found in the literature. Sousa et al. (2012) performed two tests, the first was an *in vitro* test to inhibit *C. gloeosporioides* growth and the second was the anthracnose. Control in postharvest pepper fruits with AO. In the first assay, the following oil concentrations 0.2 were added to the PDA culture medium; 0.4; 0.6; 0.8 and 1.0%. The Control consisted of a disc of the fungus grown in BDA medium without the oil. To evaluate the different concentrations of the oil in the mycelial growth of *C. gloeosporioides*, a culture medium disc (5 mm in diameter) was transferred to each Petri dish center. The evaluation of mycelial growth consisted of daily measurement of colony diameter. To Control anthracnose in postharvest pepper fruits, red pepper fruits were immersed for 5 min in a oil solution prepared in the highest concentration, used in the *in vitro* experiment, and

added to these Tween 20 (0.02% v / v). The inoculum consisted of 5mm diameter mycelium discs taken from colonies. Inoculation was performed using a wound method and depositing the inoculum on the fruit surface. The fruits were then placed in plastic trays, lined with filter paper and kept in a humid chamber at room temperature. For the analysis of lesion development, four measurements were made with a 48-hour interval, measuring the size of the lesion. AO was able to inhibit fungal growth as its concentration was increased, differing from the control from 1.0%. This fact suggests that increased oil concentration may have an inhibitory effect on fungal growth. The results observed for postharvest Control, using 1% concentration, showed oil efficiency on inhibiting the development of anthracnose lesion. Machado et al. (2013) conducted a study to verify the ability of andiroba oil for fungus inhibition. In order to study the effect of andiroba oil on the fungus, two different tests were foreseen. In the first, the oil was previously tested to pre-select for the next step. For this purpose, 9 cm diameter petri dishes were used, and about 15 mL of BDA medium containing 200 µL of the oil (adapted from OLIVEIRA et al, 2008) were added, in addition to the control treatment. After BDA solidification, a 1 cm diameter disc from the 7 day-old *C. gloeosporioides* culture edge was traced to the center of each plate. The evaluation of mycelial growth was verified daily by measurements. The oil was not efficient in this strain, therefore it did not pass to the second test.

(b) *Sclerotium rolfsii*- Souza et al. (2019) conducted an experiment using andiroba and copaiba oil, which was carried out in a completely randomized design, in a 7 x 5 factorial design, the first factor being the two individual oils and five different combinations. And the second concentration 25, 50, 75 and 100 µL, for the pathogen *S. rolfsii*, and a control. Oil concentrations were diluted in (BDA), poured into Petri dishes. 0.5 cm diameter mycelium discs were transferred to the plates. The oils of andiroba and copaiba had significant control potential for the fungus *S. rolfsii*.

(c) *Postioplacenta, Trametes versicolor* -Sousa et al. (2018) performed a toxicity assay on culture medium with brown and white rot fungi. For this assay, the method described by Medeiros et al. (2016). This method consists of placing the oil in a 0.6 cm diameter well, drilled in the center of the Petri dish, containing culture medium, for the development of the fungus. To this end, 20 mL of medium was added to each plate prepared by dissolving 15 g of agar and 20 g of maltose in 1 L of distilled water according to the methodology described in the American Society for Testing and Materials - ASTM D - 1413 (2018) 0.5% of the oil was added to each plate. The oil was incorporated pure or I<sub>2</sub> enriched in the proportions of 1, 3 and 5% by volume of oil. The 1 x 1 cm inocula were arranged at two opposite ends of the Petri dish. For the fungus *Trametes versicolor*, the greatest inhibition was andiroba oil with 1% I<sub>2</sub>. For *Postia placenta*, the greatest inhibition was andiroba oil with 5% I<sub>2</sub>.

**Table 6.** Characteristics of andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) oil applications against microorganisms reported in the literature.

Microorganism Group/Scientific name	Andiroba oil application conditions			
	Substrate	Concentration	Effect (inhibition)	References
<b>Bacteria</b>				
<i>Xanthomonas axonopodis</i> *	Passion fruit root	1, 2, 3%	High	Pires et al., 2015
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PDA	10 - 450 µg/mL	No	Meccia et al., 2013
		25, 50, 100 mg/mL	Low	Silva & Almeida, 2014
<i>Staphylococcus aureus</i>	Biofilm	10 - 450 µg/mL	High	Meccia et al., 2013
		25, 50, 100 mg/mL	No	Silva & Almeida, 2014
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Biofilm	10 - 450 µg/mL	No	Meccia et al., 2013
		10 a 450 µg/mL	High	Meccia et al., 2013
<i>Escherichia coli</i>	PDA	25, 50, 100 mg/mL	No	Silva & Almeida, 2014
<i>Enterococcus faecalis</i>	PDA	10 - 450 µg/mL	No	Meccia et al., 2013
<i>Salmonella typhi</i>	PDA	10 - 450 µg/mL	No	
<b>Yeast</b>				
<i>Candida albicans</i>	PDA	10 a 450 µg/mL	No	Meccia et al., 2013
<i>Candida krusei</i>	PDA	10 a 450 µg/mL	No	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PDA	10 - 450 µg/mL	No	
<b>Fungi</b>				
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Chili pepper	0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0%	High	Sousa et al., 2012
	PDA	200 µL	Inhibition of the development of injurie	Machado et al., 2013
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Tomato	25, 50, 75, 100 µL	High	Souza et al., 2019
		0.5, 0.5+1% I*		
<i>Postia placenta</i>	PDA	0.5+3% I	High	Sousa et al., 2018
		0.5+5% I		
<i>Trametes versicolor</i>	PDA	0.5 %, 0.5% + 1% I,	High	Sousa et al., 2018
		0.5% + 3% I, 0.5% + 5% I		

\*pv. *Passiflorae*\*iodine

- **Against insects, parasites and protozoa**

For the living organisms regarding AO effect reported in the literature, they are mainly for insects and parasites (and in less, extent protozoa) (Table 6).

**INSECT**

(a) *Sitophilus zeamais* Motschulsky – Coitinho et al. (2006) used two methodologies to perform the tests. The first was the *no choicetest*, where the oil was tested at a dose of 50 µL / 20g of corn kernels. The grains were placed inside plastic containers and impregnated with each oil, with the aid of an automatic pipettor and stirred containers. Each 20g portion of grains was placed in a plastic container, with a perforated lid, allowing gas exchange with the outside infested with eight adults from *S. zeamais* aged zero to 15 days old. After 5 days of confinement, the live and dead insects were counted, and then discarded. The andiroba oil caused 90% mortality. In the *no choicetest*, AO is effective in terms of mortality and in reducing the emergence of adults of *S. zeamais* in corn kernels.

The second methodology was the *free choicetest*, where the oil was tested in arenas consisting of two plastic containers, symmetrically connected to a central box by two plastic tubes. In one of the boxes, 20 g of untreated corn grains were placed and in the other the same amount of grains treated with each oil. In the central box, 16 adults from *S. zeamais* aged zero to 15 days old were released. Each experiment was carried out two treatments (oil and control) and 10 repetitions. After 24 h, the insects contained in each container were counted, to assess repellency and replaced in the arenas, where they remained for another 4 days. AO showed 68.6% repellency. In *free choicetest*, the oil is effective in reducing the emergence of adults in *S. zeamais*.

(b) *Anastrepha fraterculus* Wiedemann–Rosa's et al. (2013) treatments consisted of andiroba oil in concentrations of 0.5, 1 and 2%, in association with 5% hydrolyzed protein. 5% hydrolyzed protein was the control treatment. The attractive solutions were placed in the yellow traps at a dose of 200 mL per trap. The traps were placed on the plants. The captured insects were separated from the attractive solution through a fine mesh plastic sieve and then washed in pure water and placed in 80 mL pots containing 70% alcohol, where the species were screened, counted, sexed and identified. The different doses of AO mixed with hydrolyzed protein significantly reduced the capture potential of *A. fraterculus*. The treatments containing a mixture with 0.5, 1.0, and 2.0% of AO captured 32.8, 9.1 and 6.8% of the total of flies collected, respectively.

(c) *Pseudohypocera kerteszi*– Freire et al. (2013) collected adult individuals of forids present in hives of *M. compressipes manaosensis* naturally infested. The insects were kept in a wooden box lined with white sulfite paper and covered with PVC plastic film with small enough holes to allow ventilation. The box was kept at room temperature, where they were monitored until the insects died. The experiments consisted of monitoring the posture of the female phorids in plastic pots covered with beeswax. Six boxes (repetitions) were used. In each box, three substrates were offered: a) pot containing pollen (diluted in water 3:1), b) pot containing honey and c) pot containing pollen mixed with andiroba oil (60 mL). It was observed that the females of phorids performed laying on all types of substrates, indicating that the pollen substrate was preferably used for oviposition. Females did not use the pollen pot mixed with andiroba for laying (inhibition of up to 100% of posture). From these results, andiroba oil was tested in 25 colonies of *M. compressipes manaosensis* bees that were naturally infested with forids. With the help of absorbent paper, a thin layer of oils was passed on the inner walls of the trash can and the lid of these hives as well as around the entrance orifice. After 3 days, the presence of adult forids and larvae indicating the oil repellent action. No changes were observed in the development of bees from the colonies treated in this experiment.

(d) *Chrysomya megacephala*, *Haematobia irritans*– Klauck et al. (2014) performed the *in vitro* repellency tests using a device with different compartments. In compartments 1 and 2, cotton wool soaked in 2 mL of oil or citronella was used (positive repellent Control); in compartments 3 and 4 there was cotton soaked in distilled water and triton (2 mL). There were interconnections between compartments with transparent tubes of 1.8 cm in diameter, which allowed the free movement of the fly. The flies selected for the test (90 samples each) were separated into 18 groups of 10 insects each. Later flies were exposed to andiroba, and 5.0% tea tree oils and citronella oil (positive repellent control). The test started when the flies were placed in compartment 1, together with the cotton wool that contained the test solution. Then, compartments 2, 3 and 4 were opened to allow free movement of the fly. To assess the repellent effect, after treatment, all flies were counted in each compartment at predetermined intervals. The effect of AO was 75% for *Chrysomya megacephala*. An important result to be reported was the death of the flies that remained in the compartments with andiroba oil. AO also had a repellent effect for *Haematobia irritans*.

(f) *Tenebrio molitor* – Lima et al. (2015) used larvae of the 4th instar of *Tenebrio molitor* as a model insect. The formulations based on AO and alcoholic extract of the tegument consisted of 50 ml of the product

and 20 ml of liquid soap. For each plant extract, bioassays were performed at concentrations of 1 and 10%, considering the lowest and highest limit dose for biological response for each formulation, in addition to a control treatment with distilled water. The exposure to treatments was through topical application on the insect. After applying the treatments, the insects were kept in air-conditioned chambers. The mortality of the insects studied was evaluated over 5 days after their exposure to the insecticides tested. Formulation based on AO, at a concentration of 1%, presented increasing mortality rates of 67.5% (1<sup>st</sup> day), 77.5% (2<sup>nd</sup> day), 82.5% (3<sup>rd</sup> day), 85% (4<sup>th</sup> day) and 90% (5<sup>th</sup> day). At the 10% concentration, the mortality rates were 97.5% (1<sup>st</sup> day) and 100% on the other days. Treatment with a formulation based on AO showed higher mortality rates at concentrations of 1% and 10%, compared to treatment based on alcoholic extract of the tegument. In addition, the action time in the case of oil formulation was shorter for concentrations of 1% and 10%, with mortality rates of 67.5% and 97.5% on the first day of evaluation.

**PARASITE**

(a) *Aedes aegypti* – Two studies on the effect of andiroba oil on the parasites *Aedes aegypti* were found in the literature. Silva et al. (2006) evaluated the larvicidal effect of AO, against two strains of *Aedes aegypti*. After 8 h after exposure to oil. The values of lethal concentrations (LC) 90 and LC95 for the larvae of the GCZ strain (resistant to temefos) were 80 and 86 ppm (1<sup>st</sup> instar), 98 and 106 (2<sup>nd</sup> instar), 166 and 182 (3<sup>rd</sup> instars) and 192 and 202 ppm (4 instars), respectively. The LC<sub>50</sub> and LC<sub>95</sub> values for Rockefeller line larvae were 164 and 182 ppm (1<sup>st</sup> instar), 212 and 224 (2<sup>nd</sup> instar), 210 and 226 (3<sup>rd</sup> instar) and 450 and 490 ppm (4 instar), respectively. To evaluate the sublethal effect of *C. guianensis* oil in the development of *A. aegypti* concentrations corresponding to CL<sub>50</sub>, CL<sub>20</sub>, and CL<sub>10</sub> were used. For AO, the concentrations were LC<sub>50</sub>, 140 mg/L; CL<sub>20</sub>, 60 mg/L; and CL<sub>10</sub>, 40 mg/L. Three replicates were prepared, each containing 500 mL of solution in plastic containers with a capacity of 1,000 ml. For larvae feeding, puppy food was crushed (0.36 g) in each replica. Three hundred larvae of late third and early fourth instar were placed in each replica, totaling 900 larvae per bioassay. Larval behavior, such as feeding, phase changes, alteration in mobility, weakness, and mortality, as well as emergence of adults were daily checked. Every 96 h, food was added to the treated and Control group. To evaluate the sublethal effect of AO on the development of *A. aegypti* concentrations corresponding to CL<sub>50</sub>, CL<sub>20</sub> and CL<sub>10</sub>. Proffiro et al. (2012) used concentrations of LC<sub>50</sub>, 140 mg / L; CL<sub>20</sub>, 60 mg / L; and CL<sub>10</sub>, 40 mg / L of andiroba oil. Three replicates were prepared, each containing 500 mL of solution in plastic containers with a capacity of 1,000 mL. In each replica, three hundred larvae were placed at the end of the third and beginning of the fourth initial stage, totaling 900 larvae per bioassay. The lethal effect started 1 h after exposure, but between the first 2 and 3 h, larvae mortality was more expressive. When concentrations of 1,400 mg/L of *C. guianensis* were used, all larvae were active with normal movements of zigzag in the first 5 min of exposure. After this time, behaviors such as slow movements, tremors, convulsions followed by paralysis and death were observed in most larvae exposed to the solutions. The larvicidal effect of solutions containing AO remained with total efficiency (100% mortality) until the 12<sup>th</sup> day. Then it decreased from 97 to 92% on the 13<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days, respectively. No more larval mortality was observed after the 32<sup>nd</sup> day. When using LC<sub>50</sub>, 140 mg/L of *C. guianensis*, 100% of mortality in 72 h was observed. In the same way, CL<sub>20</sub>, 60 mg/L, 100% mortality in 96 h was observed. It was observed that in both concentrations (LC<sub>50</sub> and CL<sub>20</sub>), mortality continued after the larval molt. Pupae and adult emergence were not observed in this treatment. CL<sub>10</sub>, 40 mg/L induced 99.7% mortality after 1 week of treatment. With this concentration, from 900 exposed larvae, only three emerged to become an adult after 10 days, apparently without alterations. In the control groups, no mortality within 24 h of exposure was observed.

(b) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Anocentor nitens* – Farias et al. (2012) Andiroba oil was tested on engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Anocentor nitens*. Engorged females were cleaned with absorbent paper and separated based on aspects of normal appearance and motility, intact body and maximum engorgement (Leite et al., 1995), distributed in a Petri dish in a group of ten, weighed on an analytical scale and submitted the immersion test recommended by Drummond et al. (1971, 1973). Five dilutions of andiroba seed oil (20, 10, 5, 2.5 and 1.25%) were used using distilled water and tween 80 as dispersant, with three repetitions per treatment, forming, still, a control group, a negative control only with distilled water, and another positive control with the chemical acaricide based on cypermethrin. To evaluate the effectiveness of andiroba oil on non-fed larvae, the "sandwich" technique recommended by Shaw (1966) adapted by Milk (1988) was used. Ten days after the start of laying, the eggs were separated into one-gram batches and packed in adapted 20ml plastic syringes, sealed with cotton wool and incubated in a climate-controlled chamber for B.O.D. hatching of the larvae destined for the test. Six dilutions of andiroba seed oil (20, 10, 5, 2.5, 1.25 and 0.75%) were prepared using distilled water and tween 80 as dispersant, and a control group with distilled water and another with tween 80 and distilled water. Approximately 100 larvae from 14 to 21 days of age were placed between two pieces of filter paper impregnated with dilutions of andiroba seed oil. Then this set was placed in a filter paper envelope and sealed

with adhesive tape and kept in a climate-controlled chamber for B.O.D. until reading its feasibility. The registration of live and dead larvae was performed 24h after the test. In the tests performed on the oviposition of engorged females, an IC50 of 4.332 was obtained; 4,850 and 4,903 for *R. (B.) microplus*, *A. nitens* and *R. sanguineus* respectively. AO seed oil, at a dilution of 1.25%, inhibited oviposition by 10% for *R. (B.) microplus*, 6.67% for *A. nitens* and 10% for *R. sanguineus*, reaching a tick-effectiveness of 27.82%, 20.01% and 18.01%, respectively, with better efficacy demonstrated in concentrations greater than 5%. The mortality of engorged females ranged from 10 to 100% for *R. (B.) microplus* and *Rhipicephalus sanguineus* and from 6.67 to 100% for *A. nitens*.

(c) *Trichostrongylus sp.*, *Haemonchus sp.*, *Oesophagostomum sp.*, *Strongyloides sp.* – Moraes et al. (2010) applied hexane extract from the seed of *Carapa guianensis*. Fecal samples from goats and sheep were used, which were collected directly from the rectal ampoule of animals naturally infected by helminths, where they were processed to determine the number of eggs per gram of feces according to the technique of Gordon & Whitlock (1939), interpreting them the degree of infection according to Ueno & Gonçalves (1998). From each animal species, fecal samples were selected, forming a homogenate for the cultivation of larvae, according to the technique described by Robert & O'Sullivan (1950). Each cultivation was subjected to 5 concentrations of AO (100, 50, 30, 25 and 10%), using tween 80 as a dispersant. The cultivation of gastrointestinal nematode larvae of the caprine species in the Control groups (C1 and C2) revealed infectious larvae of the genus *Haemonchus*, *Oesophagostomum* and *Trichostrongylus*, with predominance of the genus *Haemonchus*.

Analyzing the reduction percentage in the goat species, considering the negative Control C1, a highly effective reduction was demonstrated for the treatments of 100, 50 and 30% and positive Control for the *Haemonchus* and *Oesophagostomum* genera, and in the total number of larvae and moderately effective for the genus *Trichostrongylus* in all treatments. The ovicidal activity against gastrointestinal nematodes of goats and sheep in vitro, demonstrated by the AO shows the anthelmintic activity of this herbal medicine and the possibility as an alternative for the control of gastrointestinal nematodes of goats and sheep.

**PROTOZOA**

(a) *Trypanosoma evansi* – Baldissera et al. (2013) used pure oil in the concentration of 0.5, 1.0 and 2.0% against *T. evansi*. Subsequently, the same tests were carried out, using nanoemulsion oils in concentrations of 0.5 and 1.0%. the number of parasites was quantified at 1, 3 and 6 hours after the start of the study. A dose-dependent reduction in the number of parasites was observed in the forms of the two oils tested after 1 h. The parasite concentration was significantly reduced at low concentrations after 3 h, and at 6 h, no live parasites were observed for the tested oils. AO (in conventional and nanoemulsion forms) has high activity against *T. evansi* in vitro, suggesting that this oil can be applied as an alternative treatment for this disease.

(b) *Plasmodium falciparum* – Junior et al. (2012) performed the antiplasmodial activity of AO and its fraction rich in limonoids in 96-well tissue culture plates, as previously described (Rieckmann, 1980; Carvalho et al., 1991; Mitaine-Offer et al., 2002). Twofold serial dilutions of limonoid-rich fraction dissolved in sterile methanol, and AO dissolved in DMSO solution, were placed in micro titer plates and diluted with the culture medium. A suspension of parasitized erythrocytes (0.5–1% parasitaemia, 2.5% hematocrit) containing mainly trophozoites was added to the wells to reach a final volume of 100 mL. For AO were used the concentrations 820, 82, 8.2, 0.82 and 0.082 mg/mL, while for limonoid-rich fraction the concentrations were 100, 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.125 mg/mL. Andiroba oil and its limonoid-rich fraction inhibited the growth of W2 clone in 100%, between 24 and 72 h, at concentrations of 8.2 and 3.1 mg/mL, respectively. For the limonoid-rich fraction the inhibition of Dd2 clone was 56% (IC50 2.8 mg/mL) at 24 h, 64% (IC50 2.4 mg/mL) at 48 h and 82% (IC50 0.4 mg/mL) after 72 h. For Dd2 clone, in both experiments with AO and limonoid-rich fraction, the final response at 72 h (IC50 8.4 mg/mL and IC50 0.4 mg/mL) was more positive than the initial response of 24 h (IC50 4.82 mg/mL and IC50 2.8 mg/mL). Pereira et al. (2014) used the following compounds isolated from AO: 6a-acetoxypoxyazadiradione (1), andirobin (2), 6a-acetoxylgedunin (3) and 7-deacetoxy-7-oxogedunin (4) (all isolated from residual pressed seed material using extraction and chromatography techniques). They also studied: 6a-hydroxy-deacetylgedunin (5) (prepared from 3) were evaluated using the micro test on the multi-drug-resistant *Plasmodium falciparum* K1 strain. The efficacy of limonoids 3 and 4 was then evaluated orally and subcutaneously in BALB/c mice infected with chloroquine-sensitive *Plasmodium berghei* NK65 strain in the 4-day suppressive test. In vitro, limonoids 1-5 exhibited median inhibition concentrations (IC50) of 20.7-5.0 µM, respectively. 6a-acetoxylgedunin is an abundant natural product present in AO residual seed materials that exhibits significant in vivo anti-malarial properties.

**Table 7.** Characteristics of andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) oil applications against insects, parasites and protozoa reported in the literature

Living organism Group / Scientific name	Andiroba oil application conditions	References
--	-------------------------------------	------------

Insect	Common name	Concentration	Effect	
<i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky	Corn weevil	50 µL/ 20 g com	Insecticide	Coitinho et al., 2006
<i>Anastrepha fraterculus</i> Wiedemann	Fruit fly	0.5, 1, 2%	Repellency	Rosa et al., 2013
<i>Pseudohypocera kerteszi</i>	Hive	60mL	Repellency	Freire et al., 2006
<i>Chrysomyamegacephala</i>	Oriental latrine fly	5%	Repellency	Klauck et al., 2014
<i>Haematobia irritans</i>	Hom fly	5%	Repellency	Klauck et al., 2014
<i>Tenebrio molitor</i>	Flour larva	1, 10%	Insecticide	Lima et al., 2015
<b>Parasite</b>				
<i>Aedes aegypti</i>	Dengue mosquito	-	Acaricidal / larvicidal	Silva et al., 2006; Prophiro et al., 2012
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Tick (ox)	1.25, 2.5, 5, 10, 20%	Acaricidal	Farias, et al., 2012
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Tick (dogs & horses)	-	-	-
<i>Anocentor nitens</i>	Tick (dogs & horses)	-	-	-
<i>Trichostrongylus sp.</i>	Goats & sheep	10, 25, 30, 50, 100%	Anthelmintic	Mornes et al., 2010
<i>Haemonchus sp.</i>	Goats & sheep	-	-	-
<i>Oesophagostomum sp.</i>	Goats & sheep	-	-	-
<i>Strongyloides sp.</i>	Goats	10, 25, 30, 50, 100%	Anthelmintic	Mornes et al., 2010
<b>Protozoa</b>				
<i>Trypanosoma evansi</i>	Ill of chairs	0.5, 1, 2%	Anti-parasitic	Baldissera, 2013
<i>Plasmodium falciparum</i>	Malaria	820, 82, 8.2, 0.82, 0.082 mg / mL	Antiplasmodial Anti-malarial	Junior et al., 2012; Pereira et al., 2014

**VI. Conclusion**

This oil affects some microorganisms, such as bacteria, fungi and yeasts, as well as insects, parasites and protozoa, serving as a light and promising method of decontamination.

AO has much of its use as a natural insect repellent. And for its insecticidal action, it is widely used in the production of aromatizing candles, in order to ward off insects and make soap, helping in the treatment of itches and stings, due to its curative property.

It can also be applied to furniture and wood, preserving and protecting them from termites, in addition to increasing durability.

In the cosmetics industry, it is widely used due to its emollient property, which provides hydration and nutrition to the skin and hair.

It has curative and anti-inflammatory action, which is improved when massaged, relaxing the muscles and relieving muscle pain and inflammation. On the skin, it helps to fight cellulite and to disappear blemishes and scars, besides providing smoothness.

Due to this anti-inflammatory property, it also affects bruises, bumps, rheumatism and skin diseases. It assists in the regeneration of inflamed tissue and softens the skin when rubbed over the injured area.

**References**

[1] Ambrózim ARP. (2000). Química e atividade inseticida do óleo de *Carapa guianensis* e das folhas de *Canavalia ensiformis* [Dissertação]: Universidade Federal de São Carlos;

[2] Ambrózim ARP, Leite AC, Bueno FC, Vieira PC, Fernandes JB, Bueno OC. (2006). Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*;17(3):542-7.

[3] Andrade EH, ZoghbiM&G, Maia JG. (2001). Volatiles from the leaves and flowers of *Carapa guianensis* Aubl. *Journal of Essential Oil Research*. 13:436-8.

[4] Andrade FFd. (2008). *Desenvolvimento e avaliação de cristais líquidos obtidos em emulsões O/A a base de óleo de andiroba e ésterfosfórico* [dissertation], Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo.

[5] Araújo, L. A. (2008). *Estudo das Propriedades Físicas, Químicas e Termofísicas de Óleos Regionais e Suas Misturas* (Doctoral dissertation, Tese. Universidade Federal do Pará, Brasil).

[6] Arrebola DFA, Fernández LAR, Roche LD, Laurencio AA, Fernández YES, Novoa AV. (2012). Genotoxic assessment of the *Carapa guianensis* Aublet seed oleaginous extract in Balb/c mice micronucleus assay. *RETEL: Revista de Toxicologia e Linza*.39:1-13

[7] Baldissera, M. D. (2016). Avaliação da atividade de três compostos do óleo de melaleuca sobre o *trypanosomaevasnsi*.

[8] Barros FNd, Farias MPO, Tavares JPC, Alves LC, Faustino MAdG. (2012) In vitro efficacy of oil from the seed of *Carapa guianensis* (andiroba) in the control of *Felicia subrostratus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.;22(5):1130-3.

[9] Barros FNd. (2011). *Avaliação da atividade do óleo da semente de andiroba (Carapa guianensis Aubl.) contra ectoparasitos de felinos domésticos* [dissertation]. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco.

[10] Carvalho CO, Chagas ACS, Cotinguiba F, Furlan M, Brito LG, Chaves FCM (2012). The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Veterinary Parasitology*.;183(3-4):260-8.

[11] Cavalcante, F.J.B.; Fernandes, N.P.; Alencar, J.C. & Silva, M.F. (1986). Pesquisa e identificação de espécies oleaginosas nativas da Amazônia. *Relatório Técnico*. Convênio Codesa/INPA, Manaus, Amazonas.

- [12] Chicaro CF. (2009). *Análise da expressão da proteína NF-KappaB antes e depois do tratamento com Dexametazona e os óleos de Copaíba e Andiroba em cultura de células de Carcinoma Epidermóide Boca*[Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo.
- [13] Coitinho, R. L. B. D. C., Oliveira, J. V. D., Gondim Júnior, M. G. C., & Câmara, C. A. G. D. (2010). Persistência de óleos essenciais em milho amarelo, submetido à infestação de gorgulho do milho. *Ciência Rural*, 40(7), 1492-1496.
- [14] Costa-Silva JH, Lima CR, Silva EJR, Araújo AV, Fraga MCCA, Ribeiro e Ribeiro A (2008). Acute and subacute toxicity of the Carapa guianensis Aublet (Meliaceae) seed oil. *Journal of Ethnopharmacology*. 116(3):495-500.
- [15] Costa-Silva JH, Lyra MMA, Lima CR, Arruda VM, Araújo AV, Ribeiro Are (2007). A toxicological evaluation of the effect of Carapa guianensis Aublet on pregnancy in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*.112(1):122-6.
- [16] D'Alessandro WB. (2008). *Avaliação da atividade de acaricidas químicos sintéticos, extrato botânico sobre Rhipicephalus sanguineus e ação dos óleos essenciais sobre Amblyomma cajennense*[Dissertação]. Goiás: Universidade Federal de Goiás.
- [17] Diniz SPSS, Utami H, Bonzanini F, Bueno MS. (2005). Biotividade de plantas medicinais no controle de Sclerotinia isolado de Steviabaudiana (Bert.) Bertonii. *Revista Brasileira de Plantas Medicinadas*.7(2):22-5.
- [18] Dumnil J, Caron H, Scotti I, Cazal S-O, Petit RJ. (2006). Blind population genetics survey of tropical rainforest trees. *Molecular Ecology*. 15(12):3505-13.
- [19] EMBRAPA ACRE. (2002). Andiroba. Rio Branco. *Folde*.
- [20] Farias MPO, Sousa DP, Arruda AC, Arruda MSP, Wanderley AG, Alves LC (2007). Eficácia in vitro do óleo da Carapa guianensis Aubl. (andiroba) no controle de *Boophilumicroplius* (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinadas*. 9(4):66-71.
- [21] Farias MPO. (2007). *Avaliação in vitro da atividade ectoparasiticida e anti -helmintica da andiroba (Carapa guianensis Aubl.)* [Dissertação]. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- [22] Farias, M. P. O., Wanderley, A. G., Alves, L. C., & Faustino, M. A. G. (2012). Cálculo da CI50 (concentração inibitória média) e CL50 (concentração letal média) do óleo da semente de andiroba (*Carapaguianensis*, Aubl.) sobre *Rhipicephalus(Boophilus) microplius* (Canestrini, 1887), *Anacontonotivum* (Neumann, 1897) e *Rhipicephalusanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, 79(2), 255-261.
- [23] Ferrari FK, Rodrigues R, da Silva VP, Figueiredo R, Penido C, Henriques MdGMO. (2011). Modulation of T lymphocyte and eosinophil functions in vitro by natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis*Aublet. *International Immunopharmacology*. 11(1):1-11.
- [24] Ferrari M, Oliveira MSC, Nakano AK, Rocha-Filho PA. (2007). Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro e in vivo de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). *Revista Brasileira de Farmacognosia*.17:626-30.
- [25] Ferraz IDK, Camargo JLC, Sampaio PTB. (2003). *Manual de sementes da Amazônia Carapa guianensis Aubl e Carapa procera D C*.
- [26] Ferraz, LD.K.; CAMARGO, J.L.C. (2003). Andiroba, *Carapa guianensis* Aubl., *Carapa procera*D.C., Meliaceae. Manaus: INPA, 6 p. (*Manual de sementes da Amazônia*, 1).
- [27] Ferraz, IDK, Camargo, JLC, Sampaio, PTB. (2002). Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa guianensis procera*D.C.): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. *Acta Amazonica*, v. 32, n. 4, p. 647-661.
- [28] Fisch, S.T.V.; Ferraz, LD.K. & Rodrigues, W.A. (1995). Distinguishing *Carapa guianensis* Aubl. from *Carapa procera*D.C. (Meliaceae) by morphology of young seedlings. *Acta Amazonica* 25(3/4): 193-200.
- [29] Freire, D. D. C. B., Brito-Filha, C. R. D. C., & Carvalho-Zilse, G. A. (2006). Efeito dos óleos vegetais de andiroba (*Carapa* sp.) e Copaíba (*Copaifera* sp.) sobre formídeo, pragas de colméias,(Diptera: Phoridae) na Amazônia Central. *Acta Amazonica*, 36(3), 365-368.
- [30] Gerry E, Kryn JM, Laboratory FP. (1957). *Crabwood: Carapa guianensis* Aubl. : Family: Meliaceae. Madison, Wis.: U.S. Dept. of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory.
- [31] Gomes HSR. (2010). *Estrutura populacional e produção de andiroba em ambiente de terra firme e várzea no sul do Amapá* [dissertation]. Macapá: Universidade Federal do Amapá.
- [32] Hammer MLA, Johns EA. (1993). Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó island, Pará (Brazil). *Journal of Ethnopharmacology*.40(1):53-75.
- [33] Horn EF. (1918). *Properties and uses of some of the more important woods grown in Brazil*. Madison, Wis.: U.S. Dept. of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory.
- [34] Inoue T, Nagai Y, Mitooka A, Ujike R, Murakoa O, Yamada T. (2012)Carapanolides A and B: unusual 9,10-seco-mexicanolides having a 2R,9S-oxygen bridge from the seeds of *Carapa guianensis*. *Tetrahedron Letters*.53(49):6685-8.
- [35] Kenfack D. (2011). Resurrection in Carapa (Meliaceae): a reassessment of morphological variation and species boundaries using multivariate methods in a phylogenetic context. *Botanical Journal of the Linnean Society*.165(2):186-221.
- [36] Klauk, V., Pazinato, R., Radavelli, W. M., Volpato, A., Stefani, L. M., & da Silva, A. S. (2015). In vitro repellent effect of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and andiroba (*Carapa guianensis*) oils on Haematobia irritans and Chrysomyamegacephala flies. *Trop Biomed*, 32(1), 33-39.
- [37] Kukachka BF. (1962). *Crabwood: Carapa* spp., Meliaceae. Madison, Wis.: U.S. Dept. of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory.
- [38] Lewkowitch J. (1908). *Carapa* oil. *Analyst*. 33(386):184-7.
- [39] Lima, R.M.B. de; Azeredo, C.P. (2005). Desenvolvimento inicial de espécies florestais estabelecidas em consórcio com aplicações de fungos micorrízicos e adubação. In: discharges. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 38, n.2, p. R1-R24.
- [40] Lima, RK, Cardoso, MG, Moraes, JC, Melo, BA, Rodrigues, VG, & Guimarães, PL. (2009). Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodopterafrugiperda* (JE Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae). *Acta amazônica*, 39(2), 377-382.
- [41] Lorenzi, H. (1992). Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo. *Edt. Plantarum*, 368p.
- [42] Loureiro, A.A.; Silva, M.F. & Alencar, J.C. (1979). Essências madeiras da Amazônia. Vol. II. *INPA/SUFRAMA*, Manaus, AM, Brasil.
- [43] Machado, R.M.A. (2013). Avaliação de óleos essenciais sobre o crescimento in vitro do fungo *colletotrichumgloeosporioides*. *Perspectivas online*, v.08, n.03, p.64-75.
- [44] Mackinnon, S.; Durst, T.; Amason, J.T.; Angerhofer, C.; Pezuto, J.; Magalhães, P.C. (2002). *Fisiologia do milho*. CEP, v. 35701, p. 970.
- [45] Marcelle GB, Mootoo BS. (1975). Tetranortriterpenoids from the heartwood of *Carapa guianensis*. *Phytochemistry*.14(12):2717-8.

- [46] Meccia, G., Quintero, P., Rojas, L. B., Usabillaga, A., Velasco, J., Diaz, T., ... & Toro, M. (2013). Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Carapa guianensis* collected from Venezuelan Guayana and the antimicrobial activity of the oil and crude extracts. *Natural Product Communications*, 8(11), 1934578X1300801135.
- [47] Mendonça AP, Ferraz IDK. (2007). Óleo de andiroba : processo tradicional da extração , uso e aspectos sociais no estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*.37(3):353-64.
- [48] Mendonça, AP, Ferraz, IDK. (2007). Óleo de andiroba: processo tradicional da extração, usos e aspectos sociais no Estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, v. 37, n.3, p. 353-364.
- [49] Miranda Júnior RNC. (2010) *Avaliação da atividade antiplasmodica in vi tro dos óleos de Andiroba (Carapa guianensis Aubl.) e Pimenta-de-macaco (Piper aduncum L.)*. [dissertation]. Belém: Universidade Federal do Pará.
- [50] Miranda Júnior, R. N. C., Dolabela, M. F., Silva, M. N. D., Póvos, M. M., & Maia, J. G. S. (2012). Antiplasmodial activity of the andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) oil and its limonoid-rich fraction.
- [51] Moraes, E. A., Bianchin, I., Silva, K. F. D., Catto, J. B., Honer, M. R., & Paiva, F. (2010). Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(3), 229-236.
- [52] Nachtigal GC. (2011). *Avaliação in vitro da atividade antiproliferativa de extratos das plantas Jodinarhombifolia Hook et Arn. e Carapa guianensis Aubl. sobre células HL-60, Linfoma Daudi e fibroblastos NIH-3T3* [dissertation]. Pelotas: Universidade Católica de Pelotas.
- [53] Nayak BS, Kanhai J, Milne DM, Pereira LP, Swanson WH. (2011). Experimental evaluation of ethanolic extract of *Carapa guianensis* L leaf for its wound healing activity using three wound models. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.
- [54] Nayak BS, Kanhai J, Milne DM, Swanson WH, Mayers S, Eversley M. (2010). Investigation of the wound healing activity of *Carapa guianensis* L (Meliaceae) bark extract in rats using excision, incision, and dead space wound models. *Journal of Medicinal Food*. 13(5):1141-6.
- [55] Penido C, Conte FP, Chagas MSS, Rodrigues CAB, Pereira JFG, Henriques MGMO. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis*Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflammation Research*. 2006;55(11):457-64.
- [56] Penido C, Conte FP, Chagas MSS, Rodrigues CAB, Pereira JFG, Henriques MGMO (2006). Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflam Res* 55: 457-464.
- [57] Penido C, Costa KA, Costa MFds, Pereira JdFG, Siani AC, Henriques MdGMO. (2006). Inhibition of allergen-induced eosinophil recruitment by natural tetranortriterpenoids is mediated by the suppression of IL-5, CCL11/eotaxin and NFkB activation. *International Immunopharmacology*. 6(2):109-21.
- [58] Penido C, Costa KA, Pennaforte RJ, Costa MFS, Pereira JFG, Siani AC. (2005). Antiallergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis*Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. *Inflammation Research*.54(7):295-303.
- [59] Pennington, T.D.; Stales, B.T. & Taylor, D.A.H. (1981). Meliaceae. *Flora Neotropica* 28: 406-419.
- [60] Pereira, T. B., & Silva, L. F. R., Amorim, R. C., Melo, M. R., de Souza, R. C. Z., Eberlin, M. N., Pöhli, A. M. (2014). In vitro and in vivo anti-malarial activity of limonoids isolated from the residual seed biomass from *Carapa guianensis* (andiroba) oil production. *Malaria Journal*, 13(1), 317.
- [61] Pessoa MCP. (2009). *Avaliação da toxicidade de extrato contendo nim (Azadirachta indica L.), andiroba (Carapa guianensisAublet) e cana de açúcar (Saccharumofficinarum L.) em ratos wistar* [dissertation]. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- [62] Pires, H. C. G., Lameira, O. A., Ishida, A. K. N., Medeiros, A. P. R., & De Assis, R. M. A. (2016). Efeito de diferentes concentrações de andiroba na inibição do crescimento in vitro da bactéria *Xanthomonasaxonopodispv. passiflorae*. *Cadernos de Agroecologia*, 10(3).
- [63] Prophiro JS, Silva MAN, Kanis LA, Silva BM, Duque-Luna JE, Silva OS. (2012). Evaluation of time toxicity, residual effect, and growth-inhibiting property of *Carapa guianensis* and *Copaifera*sp. in *Aedes aegypti*. *Parasitology Research*.110(2):713-9.
- [64] Prophiro, J. S., da Silva, M. A. N., Kanis, L. A., da Rocha, L. C. B., Duque-Luna, J. E., & da Silva, O. S. (2012). First report on susceptibility of wild *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) using *Carapa guianensis* (Meliaceae) and *Copaifera*sp.(Leguminosae). *Parasitology research*, 110(2), 699-705.
- [65] Qi S-H, Wu D-G, Ma Y-B, Luo X-D. A novel flavanonefrom*Carapa guianensis*. *Acta*
- [66] Qi SH, Wu DG, Zhang S, Luo XD. (2004). Constituents of *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae). *Pharmazie*.59(6):488-90.
- [67] Revilla, J. (2001). Plantas da Amazônia: Plantas da Amazônia: Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis. Manaus: SEBRAE/AM.
- [68] Rizzini, C.T. & Mors, W.B. (1976). Botânicaeconômica brasileira. *EPUSP*, São Paulo. 207p.
- [69] Rosa, J. D., Boff, M. I. C., Gonçalves, P. A., Boff, P., & Nunes, M. Z. (2013). Andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl) in the capture of the fruit fly (*Anastrephafraterculus* Wiedemann) in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). *Ideias*, 3(3), 97-102.
- [70] Roy, A. & Saraf, S (2006). Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(2), 191-201.
- [71] Senhorini, GA. (2010). *Micropartículas poliméricas de PHBV e emulsões contendo extrato vegetal de Carapa guianensis: desenvolvimento, caracterização e aplicação* [dissertation]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.
- [72] Sakuragui CM, Stefano MV, Calzans LSB. *Lista de Espécies da Flora do Brasil*.
- [73] Santos RCV, Alves CFDS, Schneider T, Lopes LQS, Aurich C, Giongo JL (2012). Antimicrobial activity of Amazonian oils against *Paenibacillus*species. *Journal of Invertebrate Pathology*.109(3):265-8.
- [74] Sarria AL, Soares MsFau - Matos AP, Matos Ap Fau - Fernandes JB, Fernandes JbFau - Vieira PC, Vieira Pc Fau - da Silva MFdGF, da Silva MF. (2011).Effectoftriterpenoidsandlimonoidsisolatedfrom*Cabralea canjerana* and*Carapa guianensis* (Meliaceae) against*Spodopterafrugiperda*(J. E. Smith). *Zeitschrift für Naturforschung C*. 66(5-6):245-50.
- [75] Silva RBL. (2002). *Aletnobotânica de plantasmedicinadas da comunidadedequilombola de Curiaú , Macapá, Brasil*. Belém: Universidade Federal Rural da Amazônia.
- [76] Silva Vpd, Oliveira RR, Figueiredo MR. (2009). Isolation of Limonoids from seeds of *Carapa guianensis*Aublet (Meliaceae) by high-speed countercurrent chromatography. *Phytochemical Analysis*.20(11):77-81.
- [77] Silva, F. R. P.; Almeida, S.S.M.S. (2014). Análisefitoquímica e microbiológica da stividade do extratobrutetoamílico da Andiroba, *Carapa guianensis* Aubl. *Biota Amazonia (Biote Amazonia, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, 4(4), 10-14.
- [78] Silva, K.F.S.; Santos, K.K.; Ribeiro Júnior, K.A.L.; Sant'ana, A.E.G. (2005). Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*, Amsterdam, v. 76, Issues 7-8, December, Pages 629-636.

- [79] Silva, O. S., Prophiro, J. S., Nogared, J. C., Kanis, L., Emerick, S., Blazius, R. D., & Romão, P. R. (2006). Larvicidal effect of andiroba oil, *Carapa guianensis* (Meliaceae), against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(4), 699-701.
- [80] Sousa, R. M. S., Serra, I. D. S., & de Melo, T. A. (2012). Effect of essential oils as an alternative in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* in pepper. *Summa Phytopathologica*, 38(1), 42-47.
- [81] Sousa, S. F., Paes, J. B., Arantes, M. D. C., Lopez, Y. M., & Brocco, V. F. (2018). Análise Física E Avaliação Do Efeito Antifúngico Dos Óleos De Andiroba, Copaíba E Pinhão-Manso. *FLORESTA*, 48(2), 153-162.
- [82] Souza Chagas AC, Barros LD, Cotinguiba F, Furlan M, Giglioti R, Sena Oliveira MC (2012). In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. 110(1):295-303.
- [83] Tanaka Y, Sakamoto A, Inoue T, Yamada T, Kikuchi T, Kajimoto T. (2012). Andiroloides H-P from the flower of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae). *Tetrahedron*, 68(18):3669-77.
- [84] Tanaka Y, Yamada T, In Y, Muraoka O, Kajimoto T, Tanaka R. Absolute stereostructure of Andiroloides A-G from the flower of *Carapa guianensis* (Meliaceae).
- [85] Tappin MRR, Nakamura MJ, Siani AC, Lucchetti L. (2008). Development of an HPLC method for the determination of tetranortriterpenoids in *Carapa guianensis* seed oil by experimental design. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 48(4):1090-5.
- [86] Tappin MRR. (2007). *Desenvolvimento de metodologia analítica para a quantificação de tetranortriterpenóis de óleo de "andiroba"* [dissertation]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz.

Silva, B.A, et. al. "Characteristics and Effects of the Amazonian andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) oil against living organisms – A Review." *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry (IOSR-JBB)*, 6(4), (2020): pp. 31-47.

## Characterization of Maize Grains (*Zea mays* L.) And Their Living Organisms Entrance Sites By Scanning Electron Microscopy

SILVA, Bruna Aparecida<sup>1</sup>; SCUSSEL, Vildes Maria<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Food Science and Technology, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina - UFSC, Av. Admar Gonzaga, 1346, Florianópolis, SC, Brazil.

### Abstract:

Microscopy techniques are used for of grains / seeds characterization, and can also be applied to assess damages caused by microorganisms / insects for a more efficient control methods application. The aim of the work was to obtain information by scanning electron microscopy (SEM) of the structural organization of maize grain (*Zea mays* L.), as well as possible sites of contaminants (living organisms) access to edible parts by SEM. Longitudinal and transversal cuts fixed on stubs and coated with a gold layer were SEM observed. It was registered the dominant vitreous & starch endosperms morpho-histology (hard texture rich in starch granules). Also, the pericarp (external / internal layers), peduncle (the maize to cob link) and the germ structures including the main region of organism's proliferation especially fungi spores and hyphae.

**Key Word:** Fungi; Maize; Starch; Insects; Characterization

Date of Submission: 25-07-2020

Date of Acceptance: 09-08-2020

### I. Introduction

Maize is a monocotyledonous, belonging to the family *Poaceae*, Subfamily *Panicoidae*, genus *Zea* and species *Zea mays* L. (Siloto, 2002). It is an herbaceous, monoecious plant, characterized in an annual plant for having its complete cycle of 4 to 5 months (Pons; Bresolin, 1981). These grains are generally yellow or white in color, and may have other colors, from red, purple to black. Its average composition on a dry basis is 72; 9.5; 9 and 4% of starch, proteins, fiber and oil (Paes, 2006).

Maize seed consists of pericarp (fiber layer surrounding the seed), germ (rich in protein and oil) and endosperm, which differ in chemical and organizational composition within the grain (Magalhaes, 2002). The endosperm represents approximately 83% of the dry weight of the grain, organized in the form of granules (Paes, 2006). The pericarp (outer layer) is derived from the wall of the ovary and can be colorless, red, brown or variegated (Magalhaes, 2002).

Based on the distribution of starch granules and protein matrix, the endosperm is classified into two types: flourey and vitreous (Paes, 2006; Dernadin; Silva, 2008). These designations refer to the appearance of the endosperm in the grains when subjected to light. In the flourey endosperm, the vacant spaces allow the passage of light, giving the material opacity. Conversely, the vitreous represents the absence of spaces between the starch granules and the protein matrix promotes the reflection of light, resulting in a vitreous aspect to the endosperm observed in these conditions (Shotwell; Larkins, 1989; Paes, 2006; Dernadin; Silva, 2009).

This food covers almost all known amino acids, with exceptions to lysine and tryptophan, due to its high composition of carbohydrates (starch) and lipids (oil) it is considered an energetic food for human and animal diets (Imform, 1993; Matos, 2007). Maize oil has in its composition fatty acids, of great importance for the human diet, mainly for the prevention of cardiovascular diseases and the fight against high serum cholesterol (Strecker et al, 1990; Matos, 2007).

Another important aspect of lipids in maize is related to the content of carotenoids and tocopherols (vitamin E). Due to the lignocellulosic content of the green maize grain and in the whole derivatives of the dry grain, these products are considered indispensable sources of fibers, especially of the insoluble type (hemicellulose, cellulose and lignin) (Liebenow, 1986). These characteristics make it recommended in the human diet for cholesterol control, improvement of intestinal constipation, prevention of bowel cancer and diverticulitis, therefore having important functional value (Paes, 2006).

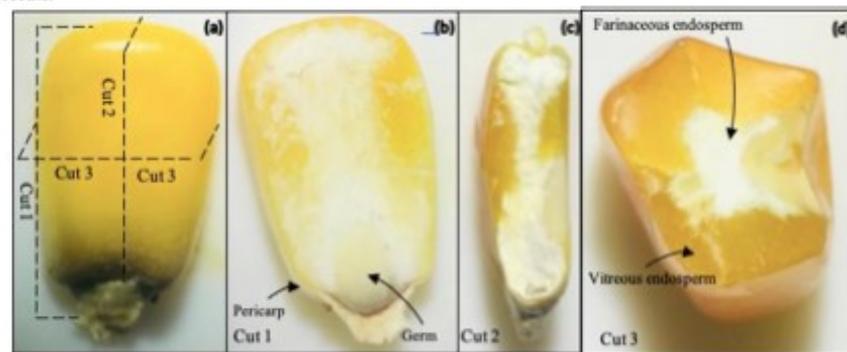
Only a few studies have been carried out for maize grains by scanning electron microscopy (SEM). Considering that the SEM enables knowledge through observation in amplifications of up to 5,000 times, the structure of a food, as well as the perception of the presence of contaminants, invisible to the naked eye and / or light microscope, this work aimed to investigate the structural organization of the maize grain (endosperm and germ) as well as the main sites of possible contaminants (access to edible parts by living organisms) by SEM.

### II. Material And Methods

The maize grains (Figure 1) were collected and kindly provided by the Integrated Agricultural Development Company of Santa Catarina - CIDASC, following the Ministry of Agriculture (MAPA) collection protocol (2007).

Its preparation for the microscopic analysis was carried out at the Laboratory of Mycotoxins and Food Contaminants at the Federal University of Santa Catarina. It consisted of the separation of parts of the grains through cuts (a) longitudinal and (b) transverse (Figure 1) following the protocol for processing samples for SEM according to the method of Kluczkowski and Scussel (2015), with subsequent fixation in stubs and coating with layer (40 nm) gold with the aid of vacuum on a planetary basis carried out at the Central Laboratory of Electronic Microscopy (LCME) of UFSC. After coating with gold, the grain was observed in SEM in different amplification.

**Figure 1** – Maize grain (*Zea mays* L.): (a) whole and after going through the (b/c) longitudinal, (b) and (c) crosscuts.

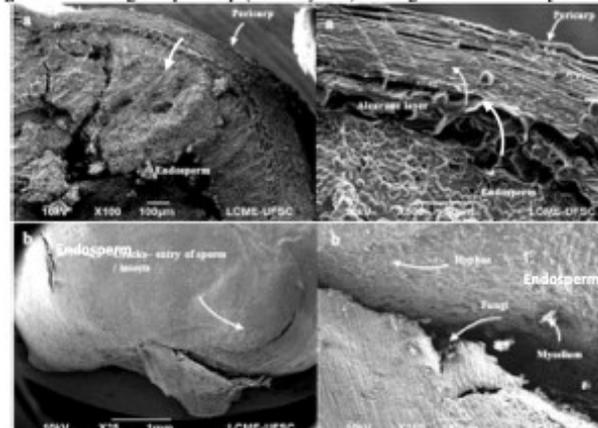


### III. Result And Discussion

The maize kernels morpho-histological characteristics are shown in Figures 2 - 5, below (with its pericarp, dominant vitreous & starch endosperms (hard & dusty textures) and germen, including peduncle.

**(1) Pericarp (Figure 2):** through SEM images, it was possible to observe the pericarp, a structure that protects the other structures of the grain. Through the images we can observe a thick structure, which is formed by the epidermis, mesocarp, crossed and tubular cells (Britannica, 1996). In addition to the pericarp, the aleurone layer, a protein that covers the endosperm, was observed (Germaniet al., 1993).

**Figure 2** -Maize grain pericarp (*Zea mays* L.) in longitudinal section [25-500X].

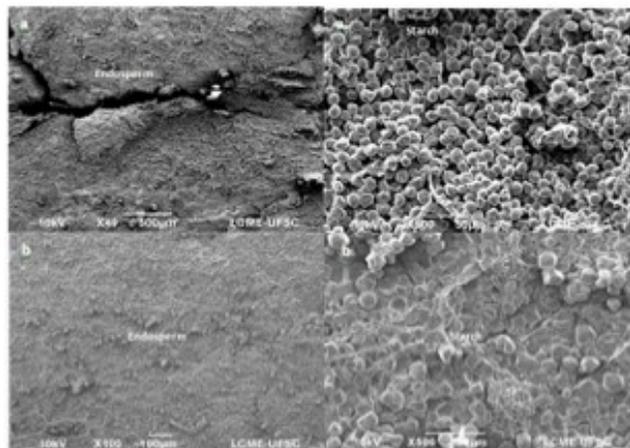


(2) **Endosperm:** as expected, maizestarch showed a combination of granules of varied sizes, predominantly rounded. It was observed that the surface of the granules is shown to be flat, except for some striations in granules, according to the characteristics of the models proposed by Oates (1997) and Sujka&Jamrow (2009), referred to as a "billiard ball hairy", that is, the surface of the starch granule is not smooth, but with ridges projected outwards.

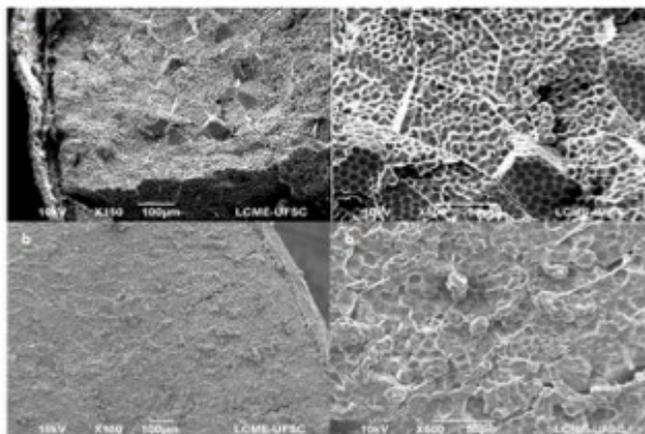
(a) *Starch (Figure 3):* it can be seen that in this type of endosperm the starch granules are rounded and dispersed, with no protein matrix surrounding these structures, that is, the starch granules are loosely associated with the protein matrix.

(b) *Vitreous (Figure 4):* for this type of endosperm, a dense protein matrix was observed, where the starch granules are densely compacted within the protein matrix, with structured protein bodies, which involve polygonal starch granules, not allowing spaces between these structures.

**Figure 3** –SEM micrographs of maize(*Zea mays* L.) starch endosperm: (a) longitudinal and (b) cross sections [40-500 X].



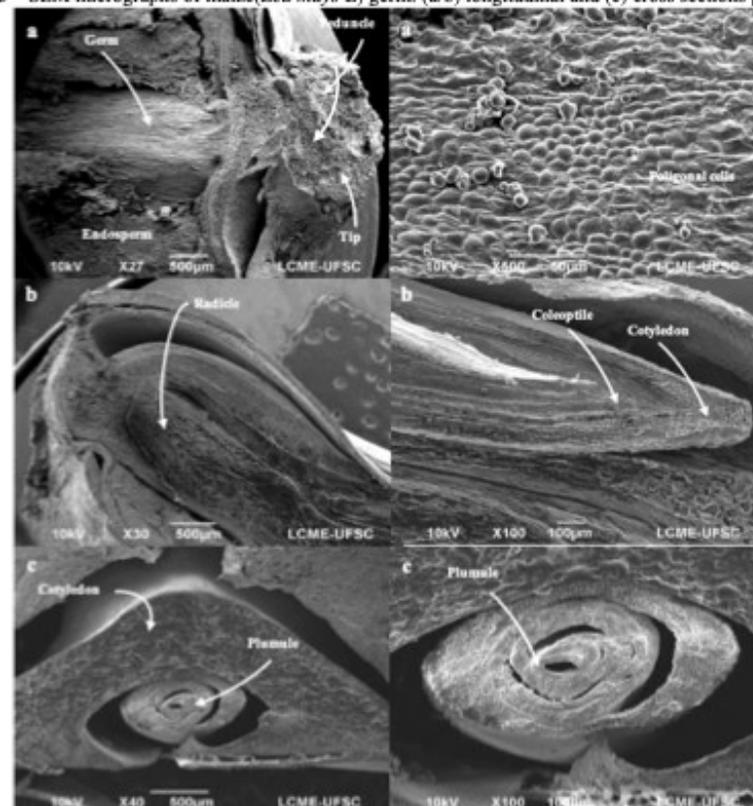
**Figure 4** – SEM micrographs of maize(*Zea mays* L.) starch endosperm: (a) longitudinal and (b) cross sections [100-500X].



(3) **Germ (Figure 5):** the embryo makes up 11% of the total weight of the seed and consists of a plumule (embryonic plant) and the scutellum (cotyledon or seed leaf). Through the cuts and subsequent observation by

SEM it was possible to observe the cotyledon, coleoptile, radicle and plumule of the maizegrain. According to Mahanna et al. (2014), the cotyledon is responsible for the first embryonic leaves. The plumule is the set of the apical bud and the primary leaves, and is protected by a sheath, the coleoptile. The radicle is located at the bottom of the germ, and is the primary root of the new plant.

**Figure 5** – SEM micrographs of maize(*Zea mays* L.) germ: (a/b) longitudinal and (c) cross sections [27-500X].



Regarding possible contaminants, contamination by fungi was observed. through MEV we are able to observe fungal spores, hyphae and mycelia at the tip of the grain and in cracks, thus providing access to the internal part of the grain by these microorganisms.

#### IV. Conclusion

The microstructural (pericarp, endosperm and germ) characterization of the internal layers/cell were possible to observe and so the main site for living organism's entrance / infection register – (which leads to deterioration). Therefore, allowing to choose / select prevention methods for more efficient application such as segregation type and modified atmosphere.

#### References

- [1] Bedford, M. R., & Partridge, G. G. (Eds.). (2001). *Enzymes in farm animal nutrition*. Cabi.
- [2] Carvalho, N. D., & Nakagawa, J. (1980). *Sementes ciência, tecnologia e produção*. Campinas: Fundação Cargill.
- [3] Denardin, C. C., & Silva, L. P. D. (2009). Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. *Ciência Rural*, 39(3), 945-954.
- [4] Erickson, D. R. (1990). Edible Fats and Oils Processing Basic Principles and Modern Practices. In *World Conference on Edible Fats and Oils Processing: Basic principles and Modern Practices Oct 1-2, 1989Maastricht-Holanda* (No. L-0200). AOCS.
- [5] Erickson, D. R. (1990). Edible Fats and Oils Processing Basic Principles and Modern Practices. In *World Conference on Edible Fats and Oils Processing: Basic principles and Modern Practices Oct 1-2, 1989Maastricht-Holanda* (No. L-0200). AOCS.

- [6] Germani, R., Benassi, V., Carvalho, J., Torrezan, B., Campos, J., & Mazzari, M. (1993). Curso para laboratoristas da indústria moageira do trigo. *Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA*.
- [7] Inform. (1993). World fats, oils disappearance should continue to rise. 4.(8): 902-906.
- [8] Kluczkowski, A. M., & Scussel, V. M. (Eds.). (2015). *Gerenciamento de risco da castanha-do-Brasil*. Nova Letra Gráfica & Editora.
- [9] Liebenow, R. C. (1986). Corn Oil, Corn Refiners Association, *INC*. Washington.
- [10] Magalhães, P. C., Duraes, F. O., Carneiro, N. P., & Paiva, E. (2002). Fisiologia do milho. *Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica*.
- [11] Mahanna, B., Seglar, B., Owens, F., Dennis, S., & Newell, R. (2013). Silage zone manual. *Du Pont Pioneer. Johnston, IA*.
- [12] Matos, E. H. S. F. (2007). Cultivo do milho verde. *Dossiê técnico*. Available in: [Access: 20.07. 2020].
- [13] Oates, C. G. (1997). Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends in Food Science & Technology*, 8(11), 375-382.
- [14] Paes, M. C. D. (2006). Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. *Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.
- [15] Pons, A.; Bresolin, M. (1981). A cultura do milho. *Trigo e Soja. Porto Alegre*, n. 57, p. 6- 31.
- [16] Shotwell, M. A., & Larkins, B. A. (1989). The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. *The Biochemistry of plants: a comprehensive treatise (USA)*.
- [17] Siloto, R. C. (2002). *Danos e biologia de Spodoptera frugiperda (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- [18] Siloto, R. C. (2002). *Danos e biologia de Spodoptera frugiperda (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- [19] Sujka, M., & Jamroz, J. (2009).  $\alpha$ -Amylolysis of native potato and corn starches—SEM, AFM, nitrogen and iodine sorption investigations. *LWT-Food Science and Technology*, 42(7), 1219-1224.

SILVA, Bruna Aparecida, et al. "Characterization of Maize Grains (*Zea mays L.*) And Their Living Organisms Entrance Sites By Scanning Electron Microscopy." *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology (IOSR-JESTFT)*, 14(7), (2020): pp 53-57.

## Effect of Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) Oil for Fungi Control in Maize (*Zea Mays L.*) Grains

SILVA, Bruna A. da<sup>1</sup>; SILVA, Neyeli C. da<sup>1</sup>; RUNTZEL, Cristina L.<sup>1</sup>;  
AQUINO, Clarissa M. de<sup>1</sup>; SCUSSEL, Vildes M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Santa Catarina – UFSC, Department of Food Science and Technology, Agrarian Sciences Center, Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi – 88034-000 – Florianópolis/SC, Brazil  
Corresponding Author: SILVA, Bruna Aparecida da

**Abstract:** The andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) oil (AO) antifungal effect was evaluated in strains of *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* isolated from naturally contaminated maize (*Zea mays L.*). They were exposed to AO (10 to 40%), incubated and the antifungal effectiveness evaluated. AO had the best effectiveness at 40% for *Fusarium* and *Penicillium* (inhibition: 83.8 and 89.3%, respectively) genera, being *Aspergillus* not as efficient (6.2%) under the condition. Regarding new colonies formation, AO inhibited 100 and 75% of *Aspergillus* and *Penicillium* at its highest concentration. Further studies will be carried out in order to check sensory possible alterations.

**Keywords:** Amazon region, andiroba oil, food security, fungi, maize grains

Date of Submission: 06-09-2019

Date of Acceptance: 21-09-2019

### I. Introduction

Maize (*Zea mays L.*) is a monocotyledonous plant, that belongs to the Family *Poaceae*, Subfamily *Panicoidae* (genus *Zea*, species *Zea mays L.*) and is produced in almost all continents (Magalhães, 2002). It is of extreme economic importance through its varied forms of application, ranging from feed for animals to high technological products for humans (Munirah et al., 2015). In addition to energy (carbohydrates) source, it is rich in lipids, vitamins (A and B complex) and minerals (iron, phosphorus and calcium) (Oliveira et al., 2004; Paes, 2006). According to the United States Department of Agriculture (USDA, 2017), Brazil is the third world largest maize producer, growing in different regions of the country, under different soil and climatic conditions, with an average of 74.0 million tons per year.

Fungi that invade grains are generally divided into two groups: field and storage (Magan & Aldred, 2006; Pitt & Hocking, 2009; Scussel et al., 2018). The main field fungi genera are *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Alternaria* and *Cladosporium* that affect grains and other vegetables during ripening, where damage is observed before harvest (Scussel et al., 2018; Bullerman & Bianchini, 2009). However, storage fungi, such as *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* and *Mucor*, require less moisture and are found in silos, mills, equipment and places where grains are handled and/or processed (Scussel et al., 2018; Bullerman & Bianchini, 2009).

Despite the conventional conditions to control fungi, alternative methods to control them are necessary (Savi et al., 2014). Several green methods have been reported, highlighting their decontamination (fungi / spores inactivation), due to the worldwide interest on using products that are less aggressive to the environment and healthier (Savi et al., 2014; Christ et al., 2016). Among these products, there is a great interest in the use of oils extracted from plants, mainly from the Amazon region, which are proved to be efficient in the control of microorganisms (Lima et al., 2009). Some have been highlighted such as the cashew nut (*Anacardium occidentale L.*) shell liquid, guaraná (*Paullinia cupana Kunth*) extract, copaiba (*Copaifera langsdorffii Desf.*) oil and the andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) oil – AO (Sousa et al., 2012; Martins, 2014).

Andiroba belongs to the *Meliaceae* Family and its oil is popularly known in the Amazon region (Lorenzi, 2002; Farias et al., 2016), as a healing product (anti-parasitic / malarial / inflammatory) (MacKinnon et al., 1997; Orellana et al., 2004; Roy & Saraf, 2006; Souza et al., 2006; Nayak et al., 2010; Silva, 2018). It is rich in essential fatty acids (linoleic and linolenic acids) and non-fatty components (triterpenes, tannins and alkaloids - carapine) (Souza et al., 2006; Silva, 2018). While the anti-parasitic and -malarial properties are attributed to the presence of gedunin, a meliacin component (MacKinnon et al., 1997), the anti-inflammatory and insect repellent properties are attributed to the andirobin, from the limonoids group (Orellana et al., 2004; Roy & Saraf, 2006; Nayak et al., 2010). AO has been studied as an alternative in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* in pepper (*Capsicum baccatum*), as well as in *Botrytis*, *Cladosporium* and *Rhizopus*, and in

toxigenic fungi *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* in bean (*Vigna unguiculata L.* Walp.). Despite that, there are still only a few studies of its use in food (Sousa et al., 2012; Farias et al., 2016).

Therefore, the present work aimed to evaluate the possible AO effect against fungi spores from different genera that contamination maize grains - and their different susceptibilities.

### II. Material And Methods

#### Material

(a) **Sample:** maize grains (1 kg) naturally contaminated, kindly provided by the Integrated Company of Agricultural Development (CIDASC) from Santa Catarina Estate, Southern Brazil.

(b) **Andiroba oil:** commercial product (50 ml) purchased in the city of Belém, State of Pará (North Region of the country).

(c) **Culture medium and others:** potato dextrose agar - PDA, Neogen (Michigan, USA), malt extract - MEA and bacterial peptone, Himedia, (Mumbai, India), czapek - CYA and glycerol nitrate agar 25% - G25N, Vetec (Rio de Janeiro, Brazil); coconut agar - CAM, prepared with coconut milk, Serigy, FRUTEB S/A (Seará, Brazil). Others - cloranfenicol, Vetec (Rio de Janeiro, Brazil), Petry dishes (90x15 mm), Kasvi (Santa Catarina, Brazil).

(d) **Equipment:** laminar flow chamber, Veco (Campinas, SP, Brazil); autoclave, Phoenix (Araraquara, SP, Brazil); bacteriological oven, Fanem (São Paulo, SP, Brazil); analytical scale (range 0.01-210 g), Ohaus, (Parsippany, NJ, USA); light microscope, Olympus CX22, (Tokyo, Japan); stereoscopic, Opticam (São Paulo, Brazil); stomacher, Marconi (Piracicaba, SP); analog pachymeter (0.05 to 150 mm), Starrett (Massachusetts, USA).

#### Methods

(a) **Sample collection:** maize samples (total: 3 - G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> and G<sub>3</sub>), were collected by CIDASC, applying the Brazilian Ministry of Agriculture sampling official method (MAPA, 2007).

(b) **Mycota from maize grains:** the mycological tests were carried out from portions (25 g) of each maize sample (G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> and G<sub>3</sub>)\* aseptically weighed as follows. (b.1) **total fungi count** - portions were transferred to polyethylene bags and added peptone water (0.1%) followed by homogenization (2 min at stomacher); then, a volume (100 µl) of each diluted sample (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> and 10<sup>-5</sup>) was inoculated on PDA surface containing chloramphenicol (100 mg/L) in a flow laminar cabinet (n=3) and incubated at 25±1°C for 7 days (Silva et al., 2013; APHA, 2015). Their total count was read using the colony count and recorded as colonies forming units (CFU/g). Only the same dilution plates that had 15 to 150 colonies were counted. (b.2) **isolation and identification - (b.2.1) isolation** - by successive replications in 4 different culture medium (MEA, PDA, G25N and CAM) (n=3) followed by their (b.2.2) **identification** - it was performed by the microculture technique (Weber & Pitt, 2000), briefly, a portion of each colony (presenting different morphology) was picked and inoculated onto Czapek agar medium (n=2) and incubated at 22-25°C for 5 days, followed by light microscopy identification (morphological characteristics, including the reproductive structures). From the macro and microscopic characteristics observation, the identification of the fungal genera was carried out according to the identification keys of Frisvad & Samson (2004). \*Note: AO fungi contamination checking - the AO was also submitted to mycological test (total fungi load) by applying it on PDA for total fungi count (Section a.1) in order to certify its innocuity for further application in the decontamination study.

(c) **Maize fungi genera isolated exposure to AO: (c.1) preparation of culture medium with AO** - Petry dishes were added of PDA (20 ml) which were previously autoclaved and cooled (at 45-50°C), followed by AO addition at increasing volumes (AO-PDA: 2-20, 4-20, 6-20 and 8-20 ml), corresponding to 10, 20, 30 and 40%, respectively, then homogenized and solidified; (c.2) **maize fungi colonies inoculation** - the isolated colonies identified per genera at Sections b.2.1&b.2.2, were transferred to AO-PDA, by taken a cylinder (disc colony + agar) of each one (7 mm diameter), placed in the agar center (n=3) and incubated at 22-25°C for 7 days (Sousa et al., 2012). (c.3) **evaluation of the AO antifungal effect** - during the incubation period, different parameters were investigated regarding each colony behavior against the AO-PDA medium (10 to 40%). (c.3.1) **development of the original colony** - measurement of the disc diameter (inoculum - 7 mm) of the AO treated and Control were carried out each they day by pachymeter and registered (n=3). (c.3.2) **aerial spores formation** - the number / intensity of new colonies (through aerial spores) formed away from the disc inoculation point were also registered and their intensity reported by a code (cross: +) and (c.3.3) **colonies development variation versus AO exposure** - it was carried out by comparing their development versus the AO percentages and incubation times (from Day Zero to the 3<sup>rd</sup> to 7<sup>th</sup>) to Controls.

### III. Result And Discussion

From the results obtained using different AO concentrations as a fungal inactivation agent, variations were observed. They were both, on the colonies growth rate and fungi genera susceptibility. Figures 1-2 and Tables 1-3 show the characteristics of the isolated colonies from maize, antifungal AO effect as well the total load.

#### FUNGI LOAD AND ISOLATED GENERA FROM MAIZE GRAINS

##### (a) Fungi load

As expected, the total fungi spores load obtained from maize samples (G1, G2 and G3) was rather high and varied, ranging from 0.2 to  $0.4 \times 10^4$  CFU/g. It was possible to be enumerated only at dilution  $10^{-3}$ . Samples G1 and G2, mainly showed uncountable numbers of fungal colonies in the dilutions  $10^{-1}$  and  $10^{-2}$  (Table 1).

The presence of fungi in maize, especially whether they are from toxigenic strain, apart from deterioration are indication of the risk of mycotoxin contamination (Valmorbidia et al., 2018). As other cereals, maize is often exposed to fungi contamination, with its proliferation starting from field (during plant development) and extending throughout its production chain (storage / transport / industry / consumer). The contamination can occur due to mycelial fragments and spores presence in the soil, plant and seeds remains or can be transported by wind, rain or insects (Scussel et al., 2018). During storage, the grains should be kept in adequate conditions to prevent damage and development of new fungal infections (Pezzini et al., 2005; Kumar & Kalita, 2017). The main, the colonies i.e., ones that grew in highest numbers and had consistent presence in the samples, were isolated - to be discussed in (b). Regarding the possible fungi contamination in the OA (to be utilized in the experiments), there was no significant development on the plates during the incubation period, thus able to be applied in the current study.

**Table 1.** Evaluation of fungi spores load from maize (*Zea mays* L.) grains and andiroba oil (*Carapa gualanensis* Aubl.) to be utilized for the decontamination study

Maize (code)	Total fungi load* (CFU / g) / dilution		
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$
G1	CL <sup>a</sup>	CL	$0.4 \times 10^4$
G2	CL	$9.4 \times 10^3$	$0.3 \times 10^4$
G3	$4.3 \times 10^2$	$1.0 \times 10^3$	$0.2 \times 10^4$
AO <sup>b</sup>	$0.3 \times 10^2$	NG <sup>c</sup>	NG

<sup>a</sup> countless    <sup>b</sup> andiroba oil    <sup>c</sup> no growth.    \* average (n=3)

##### (b) Main fungi genera isolated from maize versus culture medium

The isolation and identification of the fungi colonies (obtained after the total load) inoculated in different culture medium (PDA, MEA, G25N and CAM), showed that all grain samples were contaminated, mainly by 4 genera, being 3 of them, of possible toxigenics (*Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*), and one (*Mucor*) atoxigenic (Figure 1). Through those medium application, it was possible to observe their growth characteristics as well as to corroborate their contamination presence in the maize samples. Several authors have reported that the genera *Fusarium* (field fungus) and *Aspergillus* & *Penicillium* (storage fungi) have been the most often isolated in maize and its products (Marques et al., 2009; Di Domenico et al., 2015). *Fusarium* - the most important fungus genera in maize coming from the field, is also of concern when its species are toxigenic (mycotoxins: fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone). Their toxins can persist contaminating throughout the food chain as they are high temperature resistant (Gabriel et al., 2008 Scussel et al., 2018). The contamination of maize grains by *Fusarium* species can be explained by the fact that this fungus infects extensively certain portions of the grain, mainly the germin, apart from the external and internal grain tissues (Lazzari, 1997). On the other hand, *Aspergillus* - its species are considered storage initiators of seeds and grains deterioration, being able to grow with low moisture content (mc), followed by the *Penicillium* that needs somewhat higher mc (due to the metabolic activity of the first invaders). Both fungi genera are potentially toxigenic (toxins: aflatoxins, ochratoxin A, citrinine, penicillic / cyclopiazonic acids) and their presence in the maize samples is considered of concern too, given those toxins production possibility (Scussel et al., 2018). Regarding *Mucor* - it is usually present in the soil, grains, fruits and vegetables and are common contaminants of places where products are processed. That explains the presence of this genera in the samples (Scussel et al., 2018; Santos, 2018).

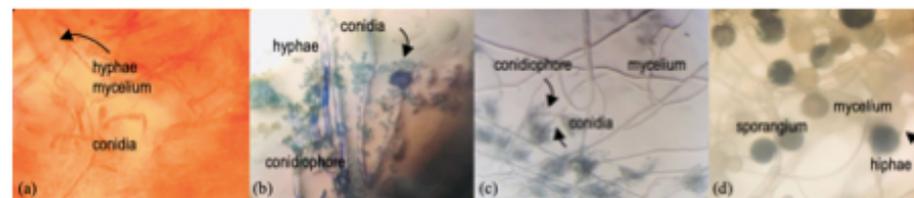
As far as the different culture media utilized versus fungi behavior are concerned (Table 2), it was observed that only the *Fusarium* and *Aspergillus* genera developed in all media. *Penicillium* and *Mucor* were not able to develop in the G25N and CAM (containing glycerol nitrate and coconut in their composition, respectively). Studies carried out by Mezzomo et al. (2018) also reported mycelial growth of *Fusarium* isolated in MEA medium. Nelson et al. (1983) registered the efficiency of G25N and PDA medium for that genus. It was

observed that the *Fusarium* developed on CAM culture medium (most commonly used and specific for aflatoxin-producing - storage fungi), inferring that this medium may also provide conditions for the development of that - field genera. Samson et al. (2014) and Pitt & Hocking (2000) reported *Aspergillus* grown in the four-medium utilized in the current work too. Pitt and Hocking (2000) observed that for the *Penicillium*, MEA and G25N provided adequate nutrients for their growth, corroborating our study.

**Table 2.** Behavior of field and storage fungal genera isolated from maize (*Zea mays* L.) samples in different culture medium

Fungi genera	Culture medium			
	PDA <sup>a</sup>	G25N <sup>b</sup>	MEA <sup>c</sup>	CAM <sup>d</sup>
<b>FIELD</b>				
<i>Fusarium</i>	G <sup>e</sup>	G	G	G
<b>STORAGE</b>				
<i>Aspergillus</i>	G	G	G	G
<i>Penicillium</i>	G	G	G	NG <sup>f</sup>
<i>Mucor</i>	G	NG	G	G

<sup>a</sup> potato dextrose agar    <sup>b</sup> czapek-dox 25% glycerol nitrate    <sup>c</sup> malt extract agar    <sup>d</sup> coconut agar    <sup>e</sup> growth    <sup>f</sup> no growth \* n=3



**Figure 1.** Major fungal genotypes isolated from maize (*Zea mays* L.) grains naturally contaminated and their characteristics: (a) *Fusarium*, (b) *Aspergillus*, (c) *Penicillium* and (d) *Mucor*.

#### ANTIFUNGAL EFFECT OF ANDIROBA OIL AGAINST ISOLATED GENERA FROM MAIZE

For the study of the AO antifungal effect against the main genera isolated from maize grains, there were selected only the toxigenic strains (*Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*) i.e., the potential mycotoxins producers. Their (a) diameters variation under AO presence measured during the colonies growth (from the application center point) period and the (b) new colonies formation (from the aerial spores) data (up to Days 3 and 7 of incubation) are shown in Table 3 and Figure 2.

From the data obtained it was possible to observe the AO antifungal effect on colonies diameters (inoculation point) and emergent colonies growth reduction in all the AO tested when compared to Control, its variation percentages wise as follows.

##### (a) AO control on fungi growth (diameter)

Regarding the AO inhibition on fungi colonies diameter (from 7 mm disc - the inoculation point), *Fusarium* and *Penicillium* showed reduction in all the tested concentrations (10, 20, 30 and 40%) when compared to Control (18 and 26.2 mm respectively). Therefore, registered the AO highest efficiency at 40% with 83.8 and 89.3% reduction (Table 3).

*Fusarium* (Control: 18 mm at Day 3) and *Penicillium* sp. (Control: 26.2 mm at Day 3) - their treated colonies diameter increased from original 7 to only 9.9 and 9.8 mm up to Day 3, keeping those dimensions still, until Day 7.

*Aspergillus* (Control: 3 mm at Day 7) - on the other hand, for *Aspergillus* no such an alteration was observed on its diameters in all PDA+AO medium (10-40%), throughout the whole experiment. It behaved similarly under AO exposure, growing only 3 mm by Day 3, reaching 10 mm diameter, then remained stable until Day 7 compared to Control. It is worth noting that the genus *Aspergillus* was the one that presented the highest new colonies growth since the 3<sup>rd</sup> days of incubation to be discussed in the next Section (Figure 2).

**Table 3.** Andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl.) antifungal effect on field and storage colonies development rate at different concentrations and incubation times\*

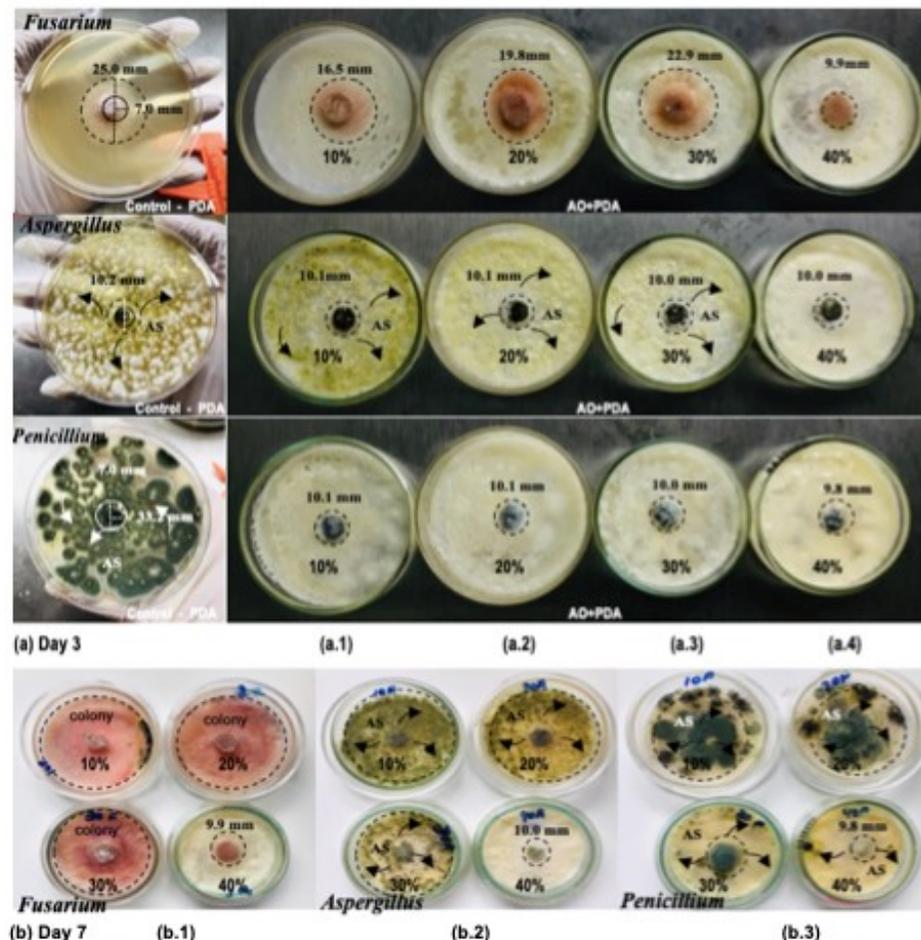
Fungus	Incubation time (Day)	Colony development rate** versus AO concentration (%)									
		Control		10		20		30		40	
		Diameter (mm)	AS <sup>a</sup>	Diameter (mm)	AS						
<b>FIELD</b>											
<i>Fusarium</i>	0 <sup>b</sup>	7.0	NG <sup>c</sup>	7.0	NG	7.0	NG	7.0	NG	7.0	NG
	1	8.2	NG	10.1	NG	9.6	NG	9.0	NG	8.9	NG
	2	12.1	NG	10.2	NG	10.0	NG	10.0	NG	8.9	NG
	3	25.0	NG	16.5	NG	19.8	NG	22.9	NG	9.9	NG
	7	CL <sup>d</sup>	NG	CL	NG	CL	NG	CL	NG	9.9	NG
	Total growth	18.0	NA <sup>e</sup>	9.5	NA	12.8	NA	15.9	NA	2.9	NA
AO reduction (%)	NA	NA	47.2	NA	28.8	NA	11.6	NA	83.8	NA	
<b>STORAGE</b>											
<i>Aspergillus</i>	0	7.0	NG	7.0	NG	7.0	NG	7.0	NG	7.0	NG
	1	7.8	+ <sup>f</sup>	9.5	NG	9.5	NG	9.1	NG	8.9	NG
	2	9.2	+++	9.5	++	9.5	+	9.2	NG	9.1	NG
	3	10.2	++++	10.1	+++	10.1	++	10.0	+	10.0	NG
	7	CL	++++	CL	++++	CL	+++	CL	++	10.0	NG
	Total growth	3.2	CL	3.1	90.0	3.1	75.0	3.0	50.0	3.0	NG
AO reduction (%)	NA	NE <sup>g</sup>	3.1	10.0	3.1	25.0	6.2	50.0	6.2	100	
<i>Penicillium</i>	0	7.0	NG	7.0	NG	7.0	NG	7.0	NG	7.0	NG
	1	11.2	+	9.3	NG	8.4	NG	8.2	NG	8.5	NG
	2	31.3	++	9.3	NG	9.3	NG	8.2	NG	8.5	NG
	3	33.2	+++	10.1	NG	10.1	NG	10.0	NG	9.8	NG
	7	CL	++++	CL	++++	CL	+++	CL	++	9.8	+
	Total growth	26.2	CL	3.1	90.0	3.1	75.0	3.0	50.0	2.8	25.0
AO reduction (%)	NA	NE	88.1	10.0	88.1	25.0	88.5	50.0	89.3	75.0	

\* aerial spores (emerging / new colonies formation) <sup>b</sup> Day zero (colony disc: inoculation and incubation) <sup>c</sup> no growth <sup>d</sup> countless <sup>e</sup> not applicable <sup>f</sup> formation of new colonies (number of +: corresponds to the intensity of colonies formed) <sup>g</sup> no AO effect \* mainly at Day 3 and 7 \*\* average

**(b) AO effect on aerial spores (emerging colonies)**

Only *Aspergillus* and *Penicillium* genera presented new colonies development (through AS) since Day 3 (*Aspergillus*) from 10 to 30% AO exposure (in decreasing order – Table 3) reaching total inhibition at Day 7. On the other hand, *Penicillium* AS started to spread and their colonies formed at Day 7. AO showed total efficiency (100% AS reduction / control) at 40% (no growth) for *Aspergillus* (Figure 2: a.1-a.4). No *Fusarium* genera presented similar behavior (AS).

The growth behavior of new colonies among *Aspergillus* / *Penicillium* genera and *Fusarium*, can be explained by their differences morphological characteristics. While FIELD FUNGI - *Fusarium* has its mycelium with cottony appearance and quite developed, its conidiophores are thin, simple and short, irregularly branched. STORAGE FUNGI - (a) *Aspergillus* has septate, branched mycelium, its conidiophores are simple erect and unicellular with spherical conidia. (b) *Penicillium* also has septate mycelium similar to *Aspergillus*, with aerial conidiophores, septates and may be branched or not, (with unicellular conidia) (Scussel et al., 2018). As the characteristic of the *Aspergillus* and *Penicillium* colonies are velvety and filamentous, they can spread more easily (forming new colonies away from the inoculation point), corroborating the achieved in the current result. On the contrary, *Fusarium* is cottony filamentous, its conidia doesn't spread across a broad area so easily.

**Figure 2.** Andiroba oil - AO (*Carapa guianensis* Aubl.) antifungal effect on *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* colonies development\* and aerial spores - AS (new colonies formation) at: (a) Day 3 – diameter and AS (Control versus 10, 20, 30 and 40% AO) and (b) Day 7 – inhibition efficiency (Control versus 10, 20, 30 and 40% AO [\*PDA, 25°C, original disc diameter: 7 mm / inoculum point])**IV. Conclusion**

From the tested maize grains naturally fungi contaminated, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Mucor*, where the most frequent genera isolated. Regarding the different culture medium and the isolated fungi behavior, all of them grew on PDA, MEA, G25N and CAM except *Penicillium* and *Mucor*. It was observed a positive AO antifungal effect against the fungi isolated from maize as follows *Penicillium*>*Fusarium*>*Aspergillus* with 89.3, 83.8 and 6.2% growth reduction, mainly at 40% AO. Further studies will be carried out on AO mechanism of action on fungi, as well as sensorial evaluation, in order to check whether it interferes on food taste.

**References**

- [1]. APHA, American Public Health Association (2015). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 5<sup>th</sup> ed. Ed: Salfinger e Tortorella.
- [2]. MAPA, Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (2007). Decree No. 6.268, of November 22, 2007, of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Regulates Law No. 9.972 of May 25, 2000, which institutes the classification of plant products, their by-products and wastes of economic value, and other measures. *Official Diary of the Union*.

- [3]. Bullerman, LB, & Bianchini, A (2009). Food safety issues and the microbiology of cereals and cereal products. *Microbiologically Safe Foods*, 315.
- [4]. Christ, D, Savi, GD, & Scussel, VM (2016). Effectiveness of ozone gas in raw and processed food for fungi and mycotoxin decontamination—a review. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 6, 326-348.
- [5]. Di Domenico, AS, Danner, MA, Busso, C, Christ, D, & Coelho, SRM (2015). Análise de trilha da contaminação por aflatoxinas em grãos de milho armazenados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 50(6), 441-449.
- [6]. FAEP – Federation of Agriculture of the State of Paraná (2017). Available em: <http://www.sistemafnep.org.br/usda-janeiro-2017.html>Acess: February de 2018.
- [7]. Farias, O, Nascimento, L, Oliveira, F, Santos, M, & Bruno, R (2016). Óleo essencial de andiroba (*Carapaguianensis* Aubl.) e copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) sobre a sanidade e fisiologia de sementes de feijão macassar (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Rev. Bras. Pl. Med.*, 18(3), 629-635.
- [8]. Frisvad, JC, & Samson, RA (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne trertericillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49(1), 1-174.
- [9]. Gabriel, LC, Pereira, CB, Bavia, GP, Coan, M, Donel, AA, Tessmann, D. J., & Scapim, C. A. (2018). Evaluation of resistance of popcorn maize genotypes to fumonisin accumulation and *Fusarium* ear rot. *Summa Phytopathologica*, 44(3), 286-288.
- [10]. Kumar, D, & Kalita, P (2017). Reducing postharvest losses during storage of grain crops to strengthen food security in developing countries. *Food*, 6(1), 8.
- [11]. Lazzari, FA (1997). Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações. *Ed. do autor*.
- [12]. Lima, RK, Cardoso, MG, Moraes, JC, Melo, BA, Rodrigues, VG, & Guimarães, PL (2009). Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidum* var. C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae). *Acta amazônica*, 39(2), 377-382.
- [13]. Lorenzi, H (2002). Árvores brasileiras manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil (No. C/582.1609 L6).
- [14]. MacKinnon, S, Durst, T, Arnason, JT, Angerhofer, C, Pezzuto, J, Sanchez-Vindas, PE, & Gbeassor, M (1997). Antimalarial activity of tropical Meliaceae extracts and gedunin derivatives. *Journal of Natural Products*, 60(4), 336-341.
- [15]. Magalhães, PC (2002). Fisiologia do milho. CEP, 35701, 970.6
- [16]. Magan, N, & Aldred, D (2006). Microbial spoilage management in cereals and bakery products. EmC. De Black burn (Ed.), *Food spoilage microorganisms* (pp. 194 – 212). Cambridge, Reino Unido: Wood head Publishing Ltd.
- [17]. Marques, OJ, Vidigal Filho, S, Dalpasquale, VA, Scapim, CA, Pricinotto, LF, & Machinski Júnior, M (2009). Fungal incidence and Mycotoxin contamination in grains of comercial coen hybrids as a function of harvest moisture. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 31(4).
- [18]. Martins, M (2014). Natural methods of detoxification of mycotoxins in Amazonian foods: guarana (*Paullinia cupana* Kunth) and Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* HBK). *Monography*.
- [19]. Mezzomo, R, Rolim, JM, Poletto, T, de Oliveira, MB, Lazarotto, M, & Muñiz, MFBMB (2018). Mycelial growth and sporulation of *Fusarium* spp. Pathogenic to *Ilex paraguariensis* in different culture media and under exposure to different light levels. *Scientia Agraria*, 19(1), 14-19.
- [20]. Mumrah, N, Khairi, M, Nozulaidi, M, & Jahan, M (2015). The effects of zinc application on physiology and production of corn plants. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 9(2), 362-367.
- [21]. Nayak, BS, Kanhai, J, Milne, DM, Swanson, WH, Mayers, S, Eversley, M, & Rao, AC (2010). Investigation of the wound healing activity of *Carapaguianensis* L. (Meliaceae) bark extract in rats using excision, incision, and dead space wound models. *Journal of Medicinal Food*, 13(5), 1141-1146.
- [22]. Nelson, PE, Toussoun, TA, & Marasas, WFO (1983). *Fusarium* species: an illustrated manual for identification.
- [23]. Oliveira, JPD, Chaves, L, Duarte, JB, Brasil, EM, Ferreira Junior, LT, & Ribeiro, KDO (2004). Grain protein contents in high protein maize populations and their crossings. *Pesquisa Agropecuária Tropical*.
- [24]. Orellana, BJP, Kobayashi, EDS, & Lourenço, GDM (2004). Alternative Therapy Using Andiroba. *Lato & Senzu*, 5(1), 136-41.
- [25]. Paes, MCD (2006). Physical, Chemical and Technological aspects of corn grain. Sete Lagoas, MG: *Embrapa Milho e Sorgo*.
- [26]. Pezzini, V, Valduga, E, & Cansiani, RL (2005). Incidence of fungi and mycotoxins in stored corn under different conditions. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, 64(1), 91-96.
- [27]. Pitt, JI, & Hocking, AD (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519). New York: Springer.
- [28]. Roy, A, & Saraf, S (2006). Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(2), 191-201.
- [29]. Samson, RA, Visagie, CM, Houbbraken, J, Hong, SB, Hubka, V, Klaassen, CH, & Varga, J (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 78, 141-173.
- [30]. Santos, GC (2018). Contaminating microbiota and occurrence of aflatoxins in pre-cooked flaked cornmeal sold in diferente municipalities of Bahia State. *Monography*.
- [31]. Savi, GD, Piacentini, KC, Tibola, CS, & Scussel, VM (2014). Mycoflora and deoxynivalenol in whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) from southern Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 7(3), 232-237.
- [32]. Scussel, VM; Savi, GD & Kluczkowski, AM (2018). Fungi and Mycotoxins associated with stored grains. *Armazenagem de grãos*, Cap. V, 735-758.
- [33]. Silva, LR (2018). Physico-chemical properties and profile of andiroba oil fatty acids. *Nativa: Pesquisas Agrárias e Ambientais*, 6(2), 147-152.
- [34]. Silva, N; Taniwaki, MH; Junqueira, VCA; Silveira, NFA; Nascimento, MS; Gomes, RAR (2013). Microbiological Methods of Analysis in Food and Water: Laboratory Manual. Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas, SP, Brasil. CRC Press / Balkema, Taylor & Francis Grupo, Londres: Reino Unido, 484p.
- [35]. Sousa, RMS, Serra, IMRS, & Melo, TA (2012). Effect of essential oil as na alternative to control *Colletotrichum gloeosporioides*, in pepper. *Summa Phytopathologica*, 38(1), 42-47.
- [36]. Souza, CR, de Azevedo, CP, & Rossi, L (2006). Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). *Embrapa Amazônia Ocidental-Docmentos (INFOTECA-E)*.
- [37]. Valmorbidia, R, Savi, GD, Silva, JR, Yanez, MM, Soares, CE, Runtzel, C, Scussel, & VM (2018). Quality and safety of maize (*Zea mays* L.) from Rondônia state storage units, Northern Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 11(1), 54-63.
- [38]. Weber, RW, & Pitt, D (2000). Teaching techniques for mycology: 11. Riddell's slide cultures. *Mycologist*, 14(3), 118-120.

## Effect of Cold Plasma treatment on fungi inactivation and germination of maize grains (*Zea mays L.*)

SILVA, B.A.<sup>1</sup>; SILVA, J.R.<sup>1</sup>; MOECKE, E.S.<sup>2</sup>; SCUSSEL, V.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Food Science and Technology, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina - UFSC, Av. Admar Gonzaga, 1346, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Environmental and Sanitary Engineering, University of Southern Santa Catarina - UNISUL, Av. Pedra Branca, 25, Palhoça, SC, Brazil.

### Abstract:

Cold plasma (CP) technology is one of the most promising technique. This study investigated the efficiency of CP treatment to inactivate fungus - contaminated maize grains and their effect on germination. The grains were exposed to CP at two different potencies for 10, 20 and 30 min. Antifungal effect was observed only for the grains treated with CP submitted to the higher potency and longer period of exposure. In relation to the germination of maize grains, the CP was not efficient. CP has been shown to be a safe decontamination procedure that can be applied sustainably to maize during storage (whose germination is not necessary).

**Key Word:** Maize; Cold Plasma; Germination; Inactivation; Fungi.

Date of Submission: 13-06-2020

Date of Acceptance: 28-07-2020

### I. Introduction

Plasma is a partially ionized neutral gas, also known as the 4<sup>th</sup> state of matter that is highly energized containing ions, electrons and neutral reactive species (radicals, excited atoms and molecules). It also includes ultraviolet (UV) radiation with enough energy to break covalent bonds and/or initiate several reactions (Moisan et al., 2002; Niemira et al., 2002; Niemira, 2012; Sen et al., 2012; Bourke et al., 2018).

As far as CP food applications are concerned, due to its non-thermal characteristics, it has been utilized (as a heat treatment substitute) for vegetables (fruits / grains) and animal origin proteins, such as grain cooking time reduction, different types starch modifications, as well as to keep shelf life longer. It is also applied for enzyme and microorganisms inactivation (Niemira, 2012; Schnabel et al., 2014; Hertwig et al., 2014). There are three main mechanisms by which CP inactivates microorganisms i.e., through (a) chemical interaction of radicals, reactive species or cell membrane loaded species; (b) damage to membranes and internal cellular components by UV radiation and (c) UV DNA strand breaks generated during a recombination of plasma species. The mode of action may be more significant in one product than another and the greater sanitizing effectiveness results from CP with multiple antimicrobial mechanisms (Moisan et al., 2002; Bolshkov et al., 2004; Gallagher et al., 2007).

Cereals comprise of a quite diversity of crops and supplies, where more than 50% is aimed for human consumption (Poutanen et al., 2014). CP technology, one of the most promising non-thermal techniques utilized in the cereal industries (Mir et al., 2016). Maize (*Zea mays L.*) is one of the world's major cereals, with a production of 1,1 billion tons annually. The United States, China and Brazil are the largest producers, accounting for 70% of world production (Conab, 2019). Maize grains have their quality changed when they are infected by fungi, which are potential mycotoxins producers. That contamination causes damages to human and animal health due to its toxic activity (Kumar et al., 2008; Scussel et al., 2018). The field and storage fungi that contaminate maize are mainly species from genus *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* (Scussel et al., 2018).

In order to control / prevent fungal spoilage / contamination, new technologies that, do not generate toxic compounds / modify the nutritional properties or palatability of the grain and its products, have been developed (Eman, 2010). Several green methods have been studied, including gases (ozone, carbon dioxide, nitrogen), plant extracts (jucá - *Caesalpinhaferrea L.*, guarana - *Paullinia cupana K.*, andiroba (*Carapa gualanensis* Aubl.) and CP (Scussel et al., 2010; Martins, 2014; Savi et al., 2014; Silva et al., 2018b; Runtzel et al., 2018a,b).

Therefore, this study investigated the efficiency of CP technology application to inactivate fungi naturally contaminated maize grains at different conditions and its effect on germination.

### II. Material And Methods

#### 2.1 Material

(a) **Sample:** Maize grains (total: 1 Kg), naturally contaminated (total load- $0.4 \times 10^4$  CFU/g), kindly provided by the Integrated Company of Agricultural Development of Santa Catarina - CIDASC, Brazil.

(b) **Culture medium and other material:** Potato dextrose agar (PDA), Kasvi (Santa Catarina, Brazil), chloramphenicol, Vetec (Rio de Janeiro, Brazil), Petri dishes/plates (60mm diameter), Kasvi (Santa Catarina, Brazil); Drigalski loop, Prolab (São Paulo, Brazil).

(c) **Equipment:** Stomacher, Marconi (Piracicaba, SP); colony counter, Phoenix (São Paulo, Brazil); autoclave, Phoenix (Araraquara, SP, Brazil); bacteriological oven, Fanem (São Paulo, SP, Brazil); drying oven, Quimis (Diadema, SP, Brazil); analytical scale (0.01-210 g), Ohaus (Parsippany, NJ, USA); laminar flow chamber, Veco (Campinas, SP, Brazil). CP system - a reactor (glass chamber - size: 11.5x10.5 cm, with silicone cap and oxygen gas input) with dielectric barrier plasma jet. One high voltage ( $\pm 17$  kV) alternating current source 30 mA was employed to generate 240 and 360 W plasma. A high voltage source was connected to a VARIAC ATV-215-MP transformer (220-240V; 60 Hz; 6.3 A; 1-1.5 kVA) which is used to control the voltage supplied. The generation of CP occurs in the reactor, by electric current - alternating - induces the breakdown of gas molecules. The process generates electrons accelerated by an electric field, forming the CP.

#### 2.2 Methods

(a) **Mycota from maize grains (total fungi count):** The mycological tests were carried out from portion (25 g) of maize sample aseptically weighed as follows: The portion were transferred to polyethylene bag and added peptone water (0.1%) followed by homogenization (2 min at stomacher); then, a volume (100  $\mu$ l) of each diluted sample ( $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$  and  $10^{-3}$ ) was inoculated (n=3) on PDA surface containing chloramphenicol (100 mg/L) in a flow laminar cabinet and incubated at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  for 7 days (Silva et al., 2013; APHA, 2015). Their total count was read using the colony count and recorded as colonies forming units (CFU/g). Only the same dilution plates that had 15 to 150 colonies were counted.

(b) **Preparation of maize Groups:** Grains were arranged on previously prepared petri dishes with PDA - one grain / dish (Figure 1). They were divided into two main groups: Control group (GC - without CP treated) and treated group (GT<sub>1</sub> and GT<sub>2</sub> - CP treated at 240 and 360 W power, respectively) for 10, 20 and 30 min of CP exposure. The analyses were performed in triplicates for GC and GTs. (c) **Treatment with CP:** The GT plates were placed into the reactor (glass chamber), followed by sealing (silicone cover) and electrode positioning, then applied the power parameters of 240 and 360 W, at intensity of 8 kV and different exposure times (10, 20 and 30 min). After CP application on the grains, both groups (GTs and GCs) were evaluated for (1) **fungi growth inhibition:** Plates were incubated at  $25^\circ\text{C}$  for 5 days and the possible antifungal CP effects were monitored through fungi growth evaluation (mycelia formation / reduction) versus time of exposure for inactivation efficiency (compared to GC) and (2) **post-treatment grains characteristics:** The germination capacity was evaluated by monitoring their embryo tissues changes through the development of the coleoptile and primary root (radicle) and compared to the control behavior.



Figure 1. Cold plasma (CP) experiment: (a) maize grain (*Zea mays L.*) arranged on PDA Petri dish center for further CP treatment and (b) CP equipment with maize grain inside reactor.

### III. Result

The data obtained from maize (naturally contaminated) treated with CP at different power parameters (240 and 360 W) and exposure times (10, 20 and 30 min), showed its efficiency, with variations, depending the conditions applied. Table 1 shows the CP (a) antifungal and (b) germination effect on grains, respectively.

#### 3.1 CP antifungal effect

Regarding the antifungal effect, after treating grains with CP, it was observed on the 5<sup>th</sup> day of incubation that only the GT<sub>2</sub> group (power: 360 W, exposure: 30 min) had total fungal growth inhibition (33.33% inactivation) (Table 1). The other treatment conditions, regardless the exposure times (10, 20 and 30 min), allowed fungi growth (100%).

Some studies have reported the CP treatment effectiveness against fungi in grains and pulses. Lee et al. (2016) and Devi et al. (2017) observed that a reduction in the microbiota (bacterium and fungi) in rice (*Oryza sativa L.*) and peanuts (*Arachis hypogaea L.*), as well as Pizá (2018b), on infected soybean (*Glycine max L.*) seeds. In addition, Balestrasse (2016) achieved 100% germination and vigor recovery. In wheat (*Triticum aestivum L.*), it was reported that *Fusarium nivale* was more sensitive to CP treatment, reaching a total growth inhibition (100%) in only 2 min.

However, for *Aspergillus flavus*, Zahoranová et al. (2015) reported that total inhibition only was achieved by applying twice the time for *Fusarium* i.e., 4 min. The efficacy of CP against filamentous fungi on wheat seeds surface decreased in the following order: *F. nivale* > *F. culmorum* > *A. flavus* > *A. clavatus*. According to Pizá (2018a), active plasma agents (such as ions, free radicals and UV radiation, among others) react with biomolecules and destroy them, making the pathogenic microorganisms and toxins harmless, by weakening their cell membrane, resulting in their inactivation.

The data obtained in the current study, corroborated partially with those authors findings. It is important to emphasize that the study materials utilized (apparatus / samples type) were not the same, as the CP equipment (each equipment has a different operation and may vary the results from one equipment to another) making it somewhat difficult to compare. In addition, its fungi load may be higher and / or the fungi genera present more resistant to the CP technique in parameters (the voltages and times) applied. Regarding, fungi load, it also plays a role in the effectiveness of treatment (especially whether the infection attacks the surface or interior of the maize grain (germ tissue - blue eyes).

**Table 1.** Evaluation of cold plasma (CP) effect\* on naturally contaminated maize grains (*Zea mays L.*) for antifungal and germination by applying different power intensities and exposure times [\*at Day 7<sup>th</sup> incubation]

CP POWER (W)	CONTROL (no CP)	CP TREATMENTS EFFECT versus EXPOSURE TIME (min)		
		10	20	30
<b>(a) ANTIFUNGAL</b>				
240 (GT <sub>1</sub> )				
360 (GT <sub>2</sub> )				
<b>(b) GERMINATION</b>				
240 (GT <sub>1</sub> )				
360 (GT <sub>2</sub> )				

### 3.2 Maize grains CP effect on germination

Germination is a grain particularity that has been reported being related to the CP technology and seed quality. Despite that, there are some controversies related to it (Stolairi et al., 2006; Randeniya & De Groot,

2015; Bormashenko et al., 2015; Matias et al. 2017). In the current study, germination by CP application did not show to be that effective. Only, the GT at the lower power applied (240 W) and time (at 30 min) kept the germination capacity (33.3%).

Some studies have shown that plasma is able to favor not only seed germination, but also the development of plants (Randeniya & De Groot, 2015; Bormashenko et al., 2015). According to Silva et al. (2018a), the treatment of *Hybanthus calceolaria* seeds with CP for 1 min favored its germination. Jiafeng et al. (2014) observed that treatments at 80 W power significantly improved the potential and germination rate in wheat when compared to Control. However, Matias et al. (2017) obtained unsatisfactory results for the germination of melon seeds.

In seeds, germination is of extreme importance, as it is the initiation process of the plant growth. In the case of the current study, the grains are aimed (for consumption to (a) produce flour for food processing or (b) sell as whole grain in the retail market. Therefore, its non-germination is an advantage (especially during their storage) for the industry, considering that the consumer has no interest in buying germinated grains.

It is worth noting that each researcher uses a different CP equipment. That factor ends up influencing the final result, since, variations can occur from one equipment to another. Also referring to the gas used, power, electrodes types, reactor geometry, energy applied, among other possible oscillations (Silva et al., 2018b). In the case of maize, the non-germination may have been induced by the long exposure time and/or high power, damaging the structure responsible for germination, or by factors related to equipment differences. Despite that, if the aim of the CP treatment is to prevent / control fungi growth in stored grains (for flour production mills), lack of germination will not be a problem, but a solution. In addition, maize grain may be more sensitive to treatment than other grains interfering in its germination capacity.

## IV. Conclusion

The CP treatment showed a potential to reduce fungal load on maize grains being the best condition: 360 W power for 30 min exposure. Regarding germinating, it affected grain behavior, as it inhibited its performance. More studies on the CP effects on maize need to be carried out utilizing other conditions, including sensorial evaluated.

## References

- Aapha - (American Public Health Association (2015). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5<sup>th</sup> ed. Ed: Salfinger e Tortorello.
- Bolshakov, A.A.; Cruden, B.A.; Mogul, R.; RAO, M.; Sharma, S.P.; Khare, B.N.; Meyyappan, M. (2004). Radio-frequency oxygen plasma as a sterilization source. *ALAA Journal*. 42: 823-832.
- Bormashenko, E., Shapira, Y., Grymyov, R., Whyman, G., Boemashenko, Y., & Drooi, E. (2015). Interaction of cold radiofrequency plasma with seeds of beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Experimental Botany*, 66(13): 4013-4021.
- Bourke, P.; Zuzina, D.; Boehm, D.; Cullen, P.J.; Keener, K. (2018). The potential of cold plasma for safe and sustainable food production. *Trends in Biotechnology*. 1-12.
- Conab - National Supply Company (2019). Grains, harvest 2018/2019. *Agricultural Monitoring Bulletin*. January, 2019. Available in: <[https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/24482\\_d92975f6745f6745e578b78](https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/24482_d92975f6745f6745e578b78)> Access: 30 de março de 2019.
- Devi, Y., Thirumdas, R., Sarangapani, C., Deshmukh, R.R., Annappure, U.S. (2017). Influence of cold plasma on fungal growth and aflatoxin production on groundnuts. *Food Control*, 77: 187-191.
- Eman, 2010. - European Mycotoxin Awareness Network (2010). Decontamination of mycotoxin contaminated raw materials. Available in: <<http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=64>>. Access: march, 2019.
- Gallagher, M.K.; Vaze, N.; Gangoli, S.; Vasilets, V.N.; Gutsol, A.F.; Milovanova, T.N. (2007). Rapid inactivation of airborne bacteria using atmospheric pressure dielectric barrier grating discharge. *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 35:1501-1510.
- Hertwig, C.; Reineke, K.; Ehlbeck, J.; BelginErdog, B.; Rauh, C.; Schlüte, O.(2014). Impact of remote plasma treatment on natural microbial load and quality parameters of selected herbs and spices. *Journal of Food Engineering*, 167, 12-17.
- Jiafeng, J., Xin, H., Ling, L. I., Jiangang, L., Hanliang, S., Qilai, X., & Yuanhua, D. (2014). Effect of cold plasma treatment on seed germination and growth of wheat. *Plasma Science and Technology*, 16(1): 54.
- Kumar, V., Basu, M. S., & Rajendran, T. P. (2008). Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection*, 27(6): 891-905.
- Lee, K.H.; Kim, H.J.; Woo, S., Jo, C., Kim, J., Sae, K., Park, Y., Oh, S., Kim, W.H. (2016). Evaluation of cold plasma treatments for improved microbial and physicochemical qualities of brown rice. *LWT*, 73: 442-447.
- Martins, M.; Kluczkowski, A. M.; Souza, T. P.; Savi, G. D.; Scussel, V. M. (2014). Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by Guarana (*Paullinia cupana*) and Juca (*Libidibia ferrea*) extracts. *African Journal of Biotechnology*, v. 13, p. 131-137.
- Matias, J. K. S., Junior, C. A., Oliveira Vitoriano, J., & Holanda, I. S. A. (2017) Effects of DBD plasma treatment on germination and water absorption in melon seeds. In *II Condis*.
- Mir, S. A., Shah, M. A., & Mir, M. M. (2016). Understanding the role of plasma technology in food industry. *Food and Bioprocess Technology*, 9(5): 734-750.
- Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M. C., Pelletier, J., Philip, N., & Saoudi, B. (2002). Plasma sterilization. Methods and mechanisms. *Pure and Applied Chemistry*, 74(3): 349-358.
- Niemira, B. A. (2012). Cold plasma decontamination of foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3: 125-142.
- Pizá, M. C. P., Prevosto, L., Zilli, C., Cejas, E., Kelly, H., & Balestrasse, K. (2018a). Effects of non-thermal plasmas on seed-borne *Diaporthe/Phomopsis* complex and germination parameters of soybean seeds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 49: 82-91.

- [19] Pizá, P.; Cocilia, M.; Prevosto, L.; Zilli, C.; Cejas, E.; Héctor, K.; Balestrasse, K.(2018b). Improving the quality of semillas and soybean yield through the use of non-thermal plasma. *Jornadas de Jovens Investigadores AUGM*. Agroalimentario 27.
- [20] Poutanen, K., Sozer, N., & Della Valle, G. (2014). How can technology help to deliver more of grain in cereal foods for a healthy diet? *Journal of Cereal Science*, 59(3), 327e336.
- [21] Randeniya, L. K., & de Groot, G. J. (2015). Non-thermal plasma treatment of agricultural seeds for stimulation of germination, removal of surface contamination and other benefits: A review. *Plasma Processes and Polymers*, 12(7): 608-623.
- [22] Runtzel, C.L., Soares, C.E.S., Silva, B.A., Dutra, M.O., Ferreira, B.C.F., Marques, J.P., Scussel, V.M. (2018a). Germination Effect of bean (*Phaseolus vulgaris L.*) stored in natura through ozone gas treatment. In: *VII Brazilian Post Harvest Conference*, 1: 1051-1056.
- [23] Runtzel, C.L., Soares, C.E.S., Silva, B.A., Marques, J.P., Aquino, C.M., Silva, N.C., Scussel, V.M. (2018b). Inactivation of fungi in beans (*Phaseolus vulgaris L.*) stored in natura through ozone gas treatment. In: *VII Brazilian Post Harvest Conference* 1: 1044-1050.
- [24] Savi, GD, Piacentini, KC, Tibola, CS, & Scussel, VM (2014). Mycoflora and deoxynivalenol in whole wheat grains (*Triticum aestivum*L.) from southern Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 7(3): 232-237.
- [25] Schabel, U.; Niquet, R.; Schultzer, O.; Ehlbeck, J. (2014). Decontamination and sensory properties of microbiologically contaminated fresh fruits and vegetables by microwave plasma processed air (PPA). *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 653-662.
- [26] Scussel, V. M., Tanello, A. C., Giordano, B. N., Manfio, D., Galvão, S., & Rodrigues, M. N. F. (2010). Effect of oxygen reducing atmospheres on the quality and safety of stored shelled Brazil nut packs. *Julius-Kühn-Archiv*, (425): 560.
- [27] Scussel, V. M.; Lorini, I; Miike, L. H.; Faroni, L. R. D. (2018). *Grain Storage*. Cap. V – Fungi and Micotoxins and stored grains, 733-898.
- [28] Şen, Y., Bağcı, U., Güleç, H. A., & Mutlu, M. (2012). Modification of food-contacting surfaces by plasma polymerization technique: reducing the biofouling of microorganisms on stainless steel surface. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1): 166-175.
- [29] Silva, D. L. S., de Lima Farias, M., de Oliveira Vitoriano, J., Júnior, C. A., & Torres, S. B. (2018a). Use of atmospheric plasma in germinating seeds (*Hybanthus calceolaris L.*) Schulze-Menz. *Revista Caatinga*, 31(3): 632-639.
- [30] Silva, J. R., Cubas, A. L. V., Moecke, E. H., & Scussel, V. M. (2018b). Effect of diferente non-thermal reactors plasma on fungal decontamination in extruded feed for naturally contaminated dogs. *Archives of Veterinary Science*, 23:3-4 (1Esp).
- [31] Silva, N; Taniwaki, MH; Junqueira, VCA; Silveira, NFA; Nascimento, MS; Gomes, RAR (2013). Microbiological methods of analysis in food and water: laboratory manual. Food Technology Institute - ITAL, Campinas, SP, Brasil. CRC Press / Balkema, Taylor & Francis Grupo, Londres: Reino Unido, 484p.
- [32] Stolarik, T., Henselová, M., Martinka, M., Novák, O., Zahoranová, A., & Černák, M. (2015). Effect of low-temperature plasma on the structure of seeds, growth and metabolism of endogenous phytohormones in pea (*Pisum sativum L.*). *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 35(4): 659-676.
- [33] Zahoranová, A., Henselová, M., Hudcová, D., Kaliňáková, B., Kováčik, D., Medvecká, V., & Černák, M. (2016). Effect of cold atmospheric pressure plasma on the wheat seedlings vigor and on the inactivation of microorganisms on the seeds surface. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 36(2): 397-414.

Bruna Aparecida da Silva, et. al. "Effect of Cold Plasma treatment on fungi inactivation and germination of maize grains (*Zea mays L.*)" *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)*, 13(7), 2020, pp. 28-32.

**[B] ARTIGOS SUBMETIDOS**

*Submetido a Revista Acta Amazonica*

**STEREO AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF THE AMAZON ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl.)**

Knowledge on morpho-histological characteristics of andiroba seed is important to understand its deterioration susceptibilities for further applications on prevention and control procedures to improve andiroba, either, raw material and oil quality and safety. The morpho-histological characteristics of whole andiroba seed (*Carapa guianensis* Aubl.) were obtained by stereo and scanning electron microscopies. The shell (tegument), a thick lignin-rich, protective wall structure, varies on tissue layers (type and number), with cells (polygonal and long shaped) presenting pores (plasmodesmata). The different three faces of andiroba seeds' top junction form tips, in one of these junctions there is the formation is the site located in a relatively tight small cavity, the micropyle, rich in vascular bundles of helically and tracheid-shaped vessels. An interchange channel (from pod - through the micropyle - to the inner seed) is formed between the shell and a tinny brown skin towards cotyledons. On its surface, residues of dry placental tissues can be detected adhered all over the shell faces. The andiroba seed cotyledons (cross and longitudinal sections), present different cell layers (containing lipids droplets) randomly distributed. It was identified that some seed features such as corner/tip surfaces, that are highly wavy/uneven, present lumps which produce recesses/deep valleys that may allow fungi conidia deposition and/or moisture absorption, which leads to fungi spoilage.

**Key words:** crabwood, roba-mahogany, *cedro-bateo*; morphology; SEM

**INTRODUCTION**

The Amazon forest is abundant and diverse, representing the largest vegetation cover in the world (Cardoso *et al.* 2017), with plants rich in bioactive compounds, the rational exploitation of which contributes to the sustainable development of the region (Cabral *et al.* 2013). Among many other plant species, the andiroba stands out for its versatility and varied purposes (Dias *et al.* 2023). The andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) has high economic value due to its multiple uses, from the use of its wood, which has high value for solid products, including furniture manufacturing, construction, wooden sheets and plywood (Firmino *et al.* 2019). The oil extracted from its seeds is known for its herbal benefits. It is of great importance for the local economy and is considered an important non-timber forest product for the state. Produced mainly by amazonian traditional communities, andiroba oil represents a sustainable way for economic development. It is also highly sought after for medicinal and cosmetic use, and also for biodiesel production (Mendonça and Ferraz 2007; Kenfack 2011; Correa *et al.*

2020). Due to the great interest of the market, the oil production chain is increasingly required to present the quantity and quality required by consumers (Correa *et al.* 2020).

It produces roundish fruits (pods) with brown seeds (Tsukamoto *et al.* 2019). These seeds have angled (polygonal to irregular) shape (with several faces) due to mutual compression, and can vary in size, even though they are from the same fruit (Silva and Scussel 2020). It can contain 4-6 valves, measuring around 4.7, 3.9 and 3.1 cm for length, width and thickness, respectively, with seeds weighing around 21 g (Lorenzi *et al.* 2002).

The andiroba oil is extracted and solidifies at temperatures below 25°C (Tsukamoto *et al.* 2019). It has several properties and applications (Silva and Scussel 2020), from health healing to living organisms inactivation and controls such as insects (Klauk *et al.* 2015), mites, parasites (Moraes *et al.* 2010), protozoa (Pereira *et al.* 2014), fungi (Sousa *et al.* 2018; Silva *et al.* 2019), among others.

Reports on seed (raw material) spoilage and oil quality reduction, which lead to economic losses to the andiroba oil industry, have been published (Crawley and Gillman 1989; Pinto 2007). Regarding morpho-histological information by applying microscopies, some studies have been carried out. However, only on the leaves and leaf anatomy of seedlings, through light, scanning electron and force microscopies (Aragao *et al.* 2014; Matos *et al.* 2021). Despite that, there is a lack of studies on the morpho-histology characteristics of whole seed and its parts, including finding out and understanding its susceptibility to biological spoilage. Considering the lack of information on whole andiroba seed characteristics (tissues, layers, cells and special characteristics details), the present study investigated the morpho-histological characteristics structures (shell / cotyledons - outer / inner surfaces) and tissues, by stereo microscopy (SM) and scanning electron microscopy (SEM). By knowing the morpho-histological characteristics of andiroba seed, it is possible to understand its susceptibilities to prevent and control both raw material deterioration and oil extraction quality. In the best of our knowledge, this is the first work reporting morpho-histology of *Carapa guianensis* Aubl. seeds.

**MATERIAL AND METHODS**

**Material**

Andiroba seeds (350 g) were donated by an artisanal producer in Ramal do Branco (2°46'46.5"S 59°22'01.9" W), Rio Preto da Eva - Amazonas State, Northern Region of Brazil.

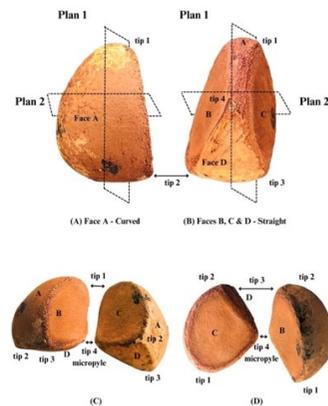
**Methods**

The andiroba seeds (whole), previously prepared (dehydrated and defatted), were sectioned - whole and its detached parts (tegument-shell and cotyledon-oil extracting part) for stereo microscopy (SM) and Scanning electron microscopy (SEM) analysis (main structures, tissues and cells identification - as reported by Scussel *et al.* (2014a). Andiroba seed parts: morphology - SM (OPTZTS, Opticam - Tokyo, Kt., Japan): seed was sectioned into halves

at plans 1 and 2 (longitudinal and cross sections, respectively - Figure 1 [A-B]) using a fine saw and also had the shell (including tinny brown skin) and cotyledon detached and sectioned by using stainless steel scalpel for further SM individual surface/cross observation. Morpho-histology - SEM (JEOL JSM-6390LV - Peabody, Mass., USA): shell was cut into small cubes (about 3.0x3.0x2.0 mm in width / length / thickness, respectively), including special features – such as seed Tip 4 at the locule in testae. The cotyledons were sliced (3.0 to 4.0 mm) at different points (including the area close to the junction of the two cotyledons - the embryo). Stub mounting and gold coating (EM-Scd500, Leica - Leica, III., USA): the andiroba cubes were fixed on stubs containing double-sided carbon tape and coated with a layer (40 nm) of gold (Au) under vacuum on a planetary basis. That was carried out at the Electronic Microscopy Laboratory Center at UFSC, for SEM analysis (Kreibich *et al.* 2017a).

SM and SEM observation: SM – each andiroba seed shell and cotyledon surfaces (outer / inner surfaces) and halves (longitudinal and cross sections) were observed through a stereo microscope to determine each structure and its morphology under different amplifications [7.1 to 115 X]. The morpho-histology details observed by SM were further elucidated next by SEM (Scussel *et al.* 2014a); SEM – each area of interest of the andiroba sample previously Au coated, was scanned and its characteristics observed at different magnifications [up to 3,000 X] (Scussel *et al.* 2014a, Kreibich *et al.* 2017a).

**Figure 1** – Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) seeds for SM and SEM microscopies observation: diagrams for the sectioning parts procedure (longitudinal and transverse/cross sections - Plans 1 and 2, respectively); (A) curved Face A view - seed face to pod contact and (B) straight Faces B, C, D view - seed faces contact to each other, in the pod, and Andiroba seed samples presenting details on its main Faces and Tips distribution: at (C) front and (D) back views, by stereo microscopy faces [x0.67].



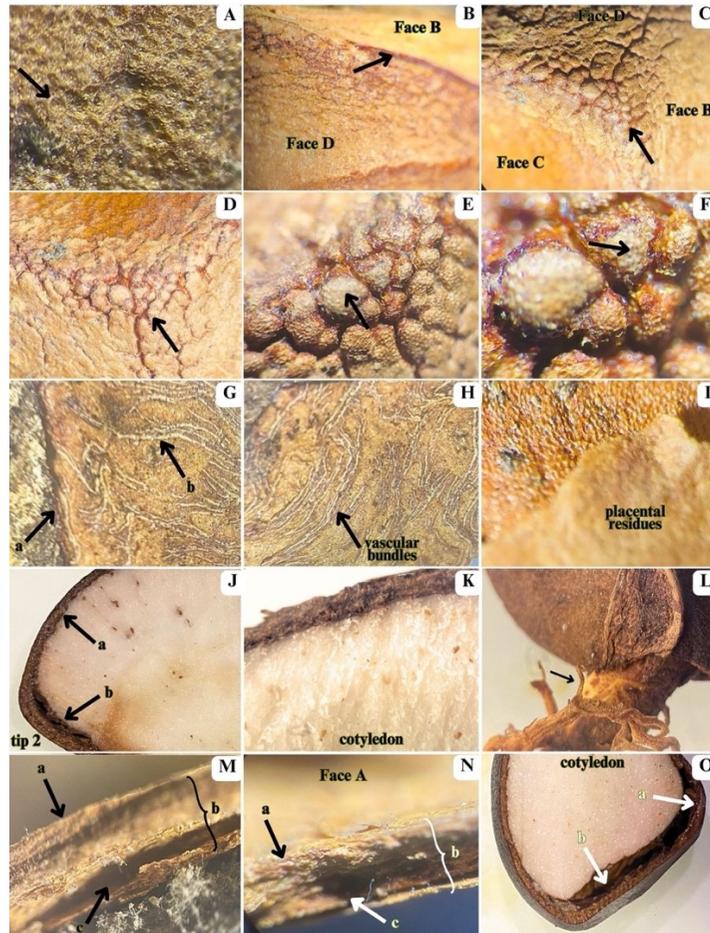
## RESULTS

From the halves of whole andiroba seed sectioned, the slices/cubes of each seed part (shell and cotyledons), and surfaces (inner and outer), their tissue layers and main characteristics were identified by SM and SEM. As expected, each andiroba seed part had different tissue layers composed of different cell shapes and sizes, including vascular bundles. Figure 1 show seed Faces/Tips/micropyle and Figures 2 to 7 show the whole and sectioned seed characteristics (through the tissue layers distribution and their cells differentiations) by SM and SEM, respectively.

### Andiroba seed whole and parts morphology characteristics – SM

Due to the irregular shape of the andiroba seeds, they present multiple faces varying in sizes (forming at each 2 of them, a linkage – the corners) and tips (links among each 3 faces top). Therefore, Faces and Tips positions were established to allow a better discussion of the SM and SEM histological characteristics findings. Figure 1 illustrates the faces (Faces: A to D) and tips (Tips: 1 to 4) position/location on the seed (its most regular seed format). Face A is the main face presenting a curved shape. It is the face that gets direct contact to the pod. Faces B and C have straight/plan shapes (seeds contact each other). The micropyle is a quite tight opening feature located at the top of Faces B, C and D junction – at Tip 4 (Figure 1 [B and C]). Through SM micrographs of the andiroba seed characteristics, color / layers / vascular bundles positioning / tissue sequence were identified. They are shown in Figure 2 (surfaces – inner/outer - cross and longitudinal sections).

**Figure 2** - Stereo microscopy photographs of andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) seed characteristics: (A-I) shell (A-F) surface - (outer) central face region (polygonal/hexagonal shaped cells – A: arrow); shell tips and tissues positioning as tissues at linkage (B-D: arrows), recesses and bumps, lobe like (E and F: arrows) and inner surface (G and H) with vascular bundles across the entire surface (G: arrow a - brown skin and arrow b - vascular bundles) and placental surface (outer) adhered to the shell (I). (J-O) whole seed (J-L) seed tissues layers - cross section (J-L): (J) external shell (arrow a) and layers of spongy like (arrow b), (K) cotyledon, (L) seed germination, longitudinal section (M-O): external surface of shell (M-N: arrow a), shell layers (M-N: arrow b), brown skin (M-N: arrow c) and (O) cotyledon link (arrow a) and micropyle channel (arrow b) - [7.1 to 115 X].



**(a) Shell (tegument):** the andiroba seed does not present a homogeneous shape (due to the pressure inside the pod/valves) - the highly lignified protective seed shell structure comprises mainly of **4 faces** (A, B, C and D) linked to each other [which give the seed an angled shape]; thus forming the **faces corners** [each two shell faces thicker linkage]; the **4 seed tips** [to where 3 shell faces top connects to each other]; and the **locule** [the seed navel - which links the seed

to the pod / valves center and is located at the faces B,C and D top linkage] also called **micropyle** (Figure 1 [C and D]). All faces have histological differences with tissue layer numbers, colors, and types depending on which part of the seed shell structure they are located in (face / faces corner / faces tip / micropyle) (Figure 2). Regarding morphology characteristics: **(a.1) Surface:** shell (outer/inner) presents from a rough to smooth waxy surface throughout most of the seed (Figure 2 [A-F]). That depends on the faces' type, i.e., the Face A, has a rough, velvet tough like (with some placental residues layer often attached) surface (Figure 2 [I]). On the other hand, Faces B, C and D are rather smooth; however, presenting at their edges a more consistent corrugated (lobes like/recesses shaped), rather uneven imprint differentiation (the 2 faces linkage region, both, corners and tips) (Figure 2 [B-F]). That occurs, especially forming the Tip 4 (Face D with Faces B, C), which indicates the site of seed connection to pod center - the micropyle (Figure 2 [C and D]). **(a.2) Cross and longitudinal sections:** as far as tissue shell layer numbers, thicknesses and colors from the cross section seed halves are concerned (Figures 2 [J-O]), they vary in layers numbers - according to the shell feature and location i.e., at corner/tips or along face plan area (Figure 2 [M and N]). Regarding the layer thicknesses throughout the shell, as expected, the faces (B, C and D) are thinner than Face A and the Tips 1-3 are thinner than Tip 4 (to where the micropyle is located) (Figure 2 [O]). Most shell layers are brown in color, only one layer differs from that color (white to light creamy) (Figure 2 [J, K and O]).

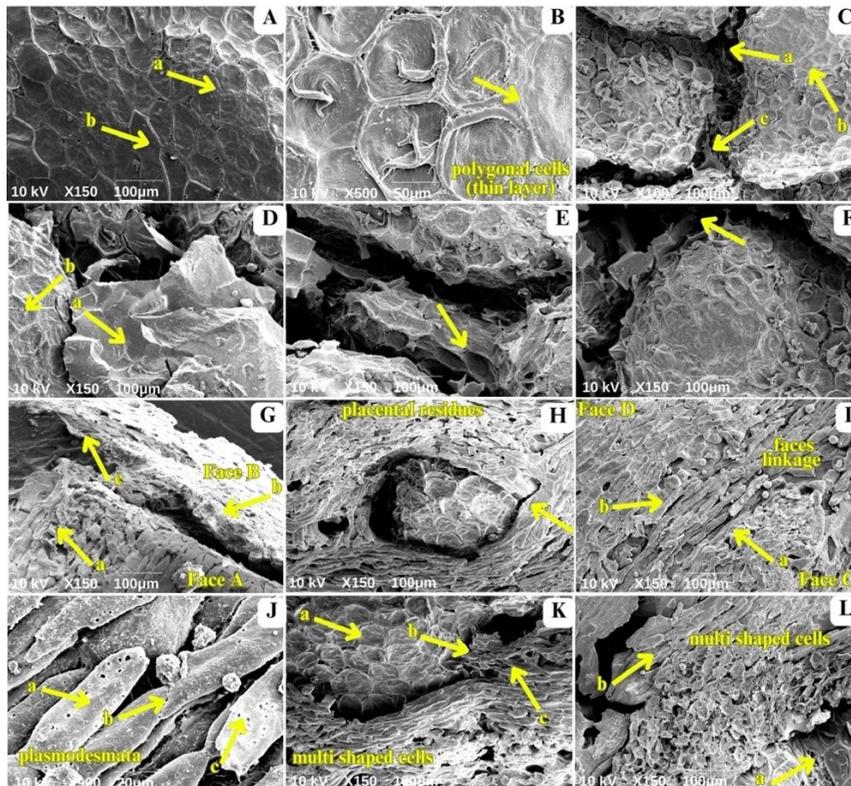
On the other hand, from the whole seed half (longitudinal section), apart from similar seed (layers distribution, thicknesses and color) seen at cross section, it was also possible to visualize details of the channel beneath the faces' corner (B, C and D linkage) starting from Tip 4 those straight seed faces, the locule site (Figure 2 [O]). However, it occurs in the other corners with a much more compact channel (Figure 2 [J, K and O]). In the germination process, we can observe the white, cylindrical, smooth and glabrous radicle and the primary roots (Figure 2 [L]).

**(b) Cotyledons:** as expected it was not possible to clearly detect by SM the number and details of seed tissue layers despite the sections (cross or longitudinal) and the amplification applied nor the two cotyledons or embryo region as they are too close to each other. Regarding color, the seed cotyledons tissue presents an all-white to light creamy color (Figure 2 [J, K and O]).

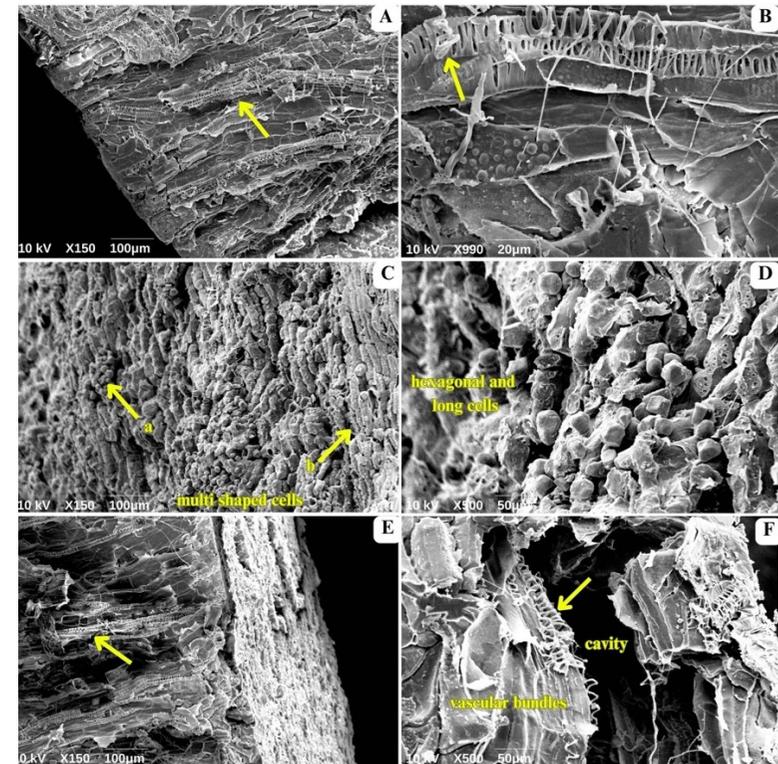
#### Andiroba seed tissue layers distribution and histology characteristics - SEM

More detailed histological characteristics of the andiroba seed parts, tissue location and sequence previously registered by SM, were identified by SEM (Figures 3-7).

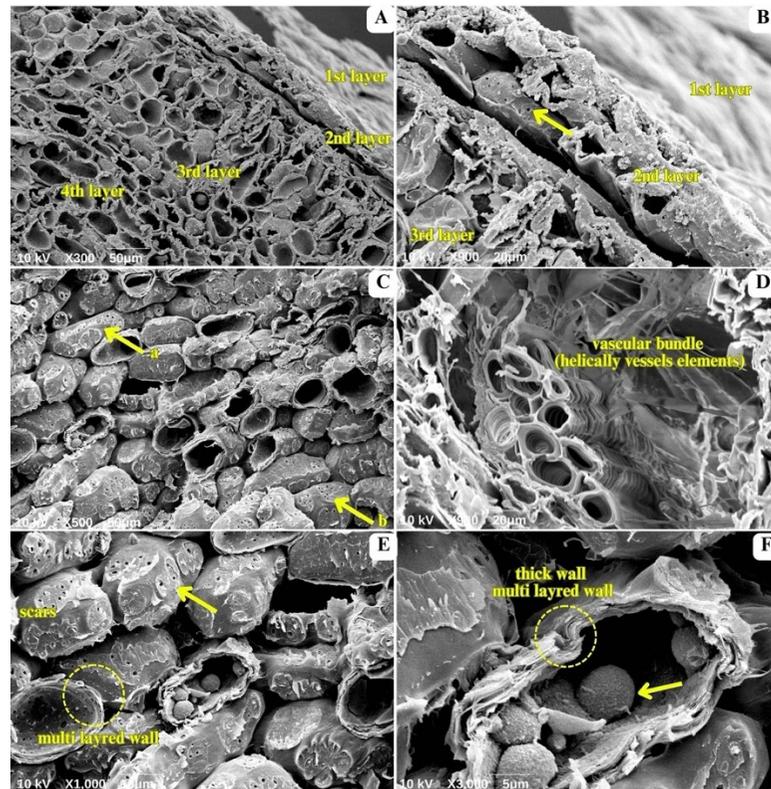
**Figure 3** - Scanning electron microscopy of andiroba (*Carapa guianensis* L.) shell – Surfaces: (outer) (A AND B) Faces of the tissue of the main area polygonal/hexagonal cells shapes (arrow a) and plain surface with homogeneous tissue – wax (arroz b), (C and D) Corners and Tips tissue – (C) uneven / rough forming like lobes (arroz b) with deep valleys (arroz a) and placental tissues residues adhered (arrow c), (D) placental residues (arrow a) deposited in between and, in the valleys/inside the shell rough surface of the shell, and hexagonal cells (arrow b), (E and F) at the locule in testae tissue – entry into the site of the micropyle with a rough surface like protrusions/lobes (arrows); Shells – faces corner link and micropyle: (G) linkage polygonal shaped cells (arrow a), amorphous shaped cells (arrow b) and of two faces corner link, (H) multiple cells' types near tips and polygonal cells with a thin waxy membrane (arrow), (I) linkage surface tissue with long cells (arrow a) and multiformed cells (arrow b), (J) long shaped porous cells (arrow a), scars (arrow b) and pores (arrow c), (K and L) corners multi-tissue polygonal (arrow a) and long cells tissue (arrow b) with placental residues adhered onto surface (arroz c) - [150-900X]



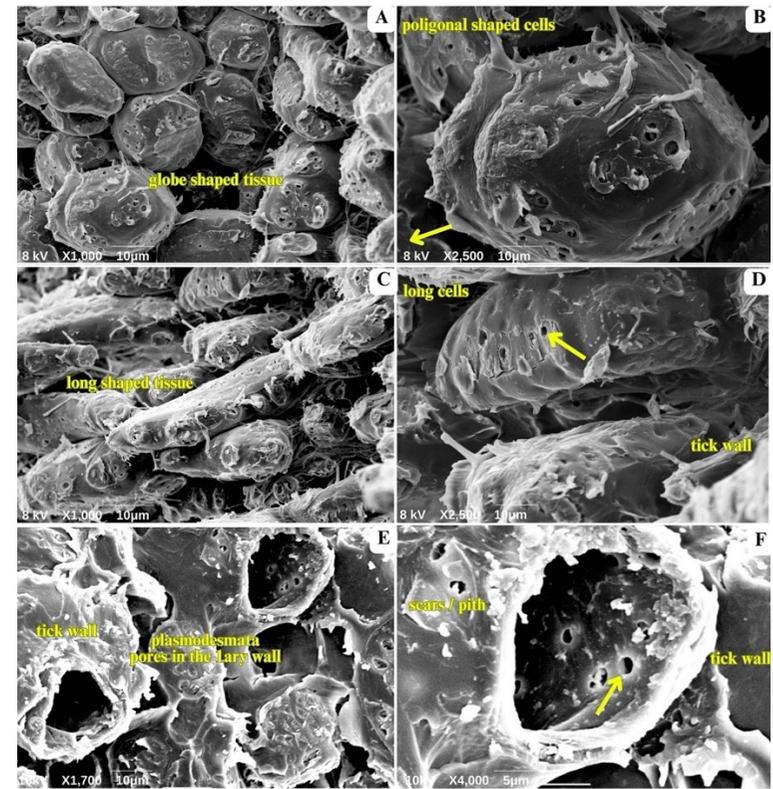
**Figure 4** - Scanning electron microscopy of andiroba (*Carapa guianensis* L.) shell – pod/valve seed connection (cross section): (A and B) Micropyle (A), whole micropyle – inner view, vascular bundles (arrow), (B) vascular bundles formed by helical tubes (trackeids wall tickening), (C and D) Inner shell tissue, (C) hexagonal (arrow a) and long (arrow b) cells, thick walls, (D) mass of polygonal cells and long cells, (E and F) Vascular system (E) System of vessels (arrow) with vascular bundles (helical tubes), (F) channel with helical and tracheid's tubes (arrow) - [150-900X].



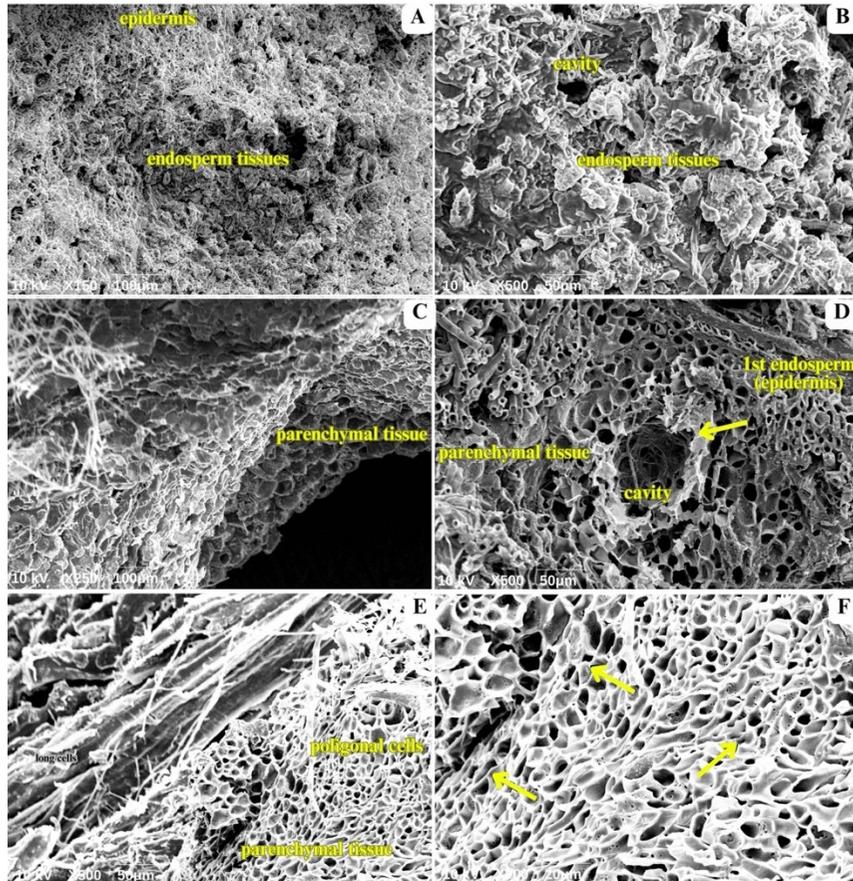
**Figure 5** - Scanning electron microscopy of andiroba (*Carapa guianensis* L.) shell - (cross section): (A and B) Layers (A) from outer to inner surfaces, (B) surface main layers, (C and D) tissue layers cells (C) with globe and long cell shapes (arrow a), thick walls with pores and scars (arrow b), (D) region with vascular bundles rich with helical tubes, (E and F) plasmodesmata (E) cell tissue presenting globe cells with pores and scars (arrow), (F) cell wall layers details and content cell (arrow) - [300-3000X].



**Figure 6** - Scanning electron microscopy of andiroba (*Carapa guianensis* L.) shell – tissues characteristics (shape/wall and plasmodesmata): (A and B) 1ary tissue – porous globe cell shaped tissue with placental residue adhered (B: arrow), (C and D) 2ary tissue – porous long cell shaped tissue with plasmodesmata (pores (D: arrow) in the 1ary wall for specialized cell-to-cell communication), (E and F) thick wall layers with pores distribution (F: arrow) - [1000-4000 X].



**Figure 7** - Scanning electron microscopy of andiroba (*Carapa guianensis* L.) Cotyledon - surface and cross section: (A and B) endosperm tissue with cavities (epidermis), (C and D) endosperm and parenchymal tissues, polygonal/round cell shapes, (E and F) Cotyledon tissue layers – thin wall, and polygonal/globe parenchymal cells (F: arrow) - [150-900X].



**(a) Shell:** the tissues and cells characteristics observed either on shell surfaces (both outer / inner and the micropyle) and through the shell *cross* sections (faces, faces' corners / tips /

micropyle) are shown in Figures 3-6. Most shell tissues comprise thick-walled protective cells (sclerenchyma and collenchyma).

**(a.1) Shell surfaces:** the outer surface throughout the whole seed faces (A/B/C/D), and the micropyle (at B, C and D faces Tip 4) are shown as rather amorphous, waxy mass (thin tissue) cells with polygonal shape, a thick wall with no clear/visible distinction between them – the cuticle (Figure 3 [A and B]). Despite that, the surface relief varies, i.e., the face's center - is plain, and at the corners, tips are wavy and bumpy (with protrusions and recesses) (Figure 3 [C-F]). The cavity - a locule in testae (the micropyle)- presents similar surface tissue cells covering the underneath layer (to be seen in cross section). As Faces linkage forms a small bump (with several bumps, lobes-like) ending into a rather closed cavity space that shows helically tubes (xylem and phloem vascular bundles) filling part of it (Figure 4 [A, B, E and F] and Figure 5 [D]). That is the entrance connection between the external environment and cotyledon through the channel filled of vascular cambium. On the other hand, as the faces thickness (at corner/tip) the surface becomes highly wavy/uneven, presenting lumps like lobes which produce recesses/deep valleys (to where fungi conidia can get trapped) (Figure 3 [E and F]). The face A have linkage polygonal shaped cells, face B amorphous shaped cells (Figure 3 [G]), and face C linkage surface tissue with long cells and multiformed cells (Figure 3 [I]). The long shaped porous cells have scars and pores (Figure 3 [J]). As far as the inner surface is concerned, the cells have more delimited shape with polygonal shape with a thin brown skin stick to it. Vascular bundles are distributed/ spread all over the inner surface (Figure 4 [C and D]).

**(a.2) Shell cross sectioned:** shell comprises mainly four tissue layers at seed faces. Faces tissues - present the 1<sup>st</sup> layer (long cells with a thick porous wall), the 2<sup>nd</sup> layer with cells of globous/hexagonal shape (Figure 5 [A and B]), also presenting pores - the plasmodesmata (Figure 3 [J] and Figure 6 [E]). They are specialized on cell-to-cell communication (through microscopic channels that traverse cell walls - enabling transport between them). Figure 6 [A-F] shows cell wall scars produced by cell detaching from each other and/or pits (depressions / thin areas formed as the wall does not thicken further). On the other hand, at the faces' corners - as the layers thicken (to confer shell high resistance for cotyledon protection), it is possible to see the additional layer of a different (spongy like) tissue. It is an area with a mix of cells irregularly shaped / free disposal (mainly polygonal and long shaped) together (Figure 4 [C and D]) with vascular bundles (helically-shape structures). It is important to emphasize that at the junction of B, C and D faces (the broadest corner that holds the locule in *testae*), it is possible to visualize the micropyle and the channel with conducting / vascular tissues (transport of water and nutrients). They form the vascular bundles of protoxylem and phloem (Figure 4 [A, B, E and F]).

**(b) Cotyledons:** The andiroba seed cotyledon part tissues and cells, beneath the brown skin testae in cross section by SEM are shown in Figure 7. **(b.1) Endosperm tissue** - the protective tissue is composed of an epidermis layer of a series of thick walls bi and tri palisade cells arranged with the long diameter at right angles to a median plane (Figure 7 [A and B]). **(b.2) Parenchymal tissue** - next to the epidermis, there are 2 large tissue layers of thin walls,

irregular shape and size, with cells relatively unspecialized (with protein and oil bodies) - the storage parenchymal tissues, which make up most of the oils extracting tissue. The first parenchymal cells may have more functional activity potential than storage, as they are shorter and vary in width with smaller size and wall somewhat thicker cells, than the second - the main parenchymal tissue. That has larger and more globoid/polygonal, wall thinner cells (which fills most of the cotyledons towards the seed center) (Figure 7 [C and D]). The cortex and medullary tissues, respectively. In between both parenchymal layers, there is the tinny ring of **(b.3) Meristematic tissue** - layers of small, uniform size, long chape cells - the provascular tissue (Figure 7 [E and F]). Along which, rudimentary vascular bundles, are arranged at tissue's intervals.

As observed in our study, the shell surface has a quite uneven relief, allowing humidity, settling and/or absorption into those valleys (including also conidia concentrations). Cracks (that occur during pods falling onto the ground) and micro-cracks (during dehydrations) also play a role in the deterioration conditions as reported for Brazil nuts and cocoa beans (Scussel *et al.* 2014a-b; Kreibich and Scussel, 2015).

The climate of the Amazon rainforest is very humid, reaching 80% relative humidity, 40 °C temperatures and an abundant rainy season. Those conditions favor the natural proliferation of fungi and other living organisms – among them, insects, such as flies, moth and termites (Segovia *et al.* 2011). The andiroba pods, still on the trees, are targets of birds, rodents and monkeys attack, which can leave microbial inoculum (feces, regurgitation, saliva and even from the soil with their paws). Also, it can come from insects, especially those of the genus *Hypsipyla* (Guariguata *et al.* 2000; Plowden 2004), which contribute to the richness of the contaminant microbiota (Almeida *et al.* 2009). Seed predation by insects directly damages seed quality and can alter species regeneration, as predated seeds have reduced germination potential (Pinto 2007; Santos *et al.* 2016). Furthermore, seed predation can directly compromise oil production due to quantitative seed losses and, indirectly, affecting the oil quality (Santos *et al.* 2016).

After the fruit / pod falls on the muddy soil, the valves start to open by the time of seeds collection. They are covered of dust, solid matters and moist. Reaching the factory seeds are cleaned, dried and stored (Silva and Scussel, 2020).

The characteristics of the seed's outer shell in this study were similar to those reported by Kenfack (2011), who states that the seed entrance region (to where the locule is located), its structural characteristics, the hilum of the seed is a larger area and does not have a delimiting protrusion and also has residues of attached placental tissues. Due to the shell surface being rather uneven with lobes formation at the tips and corners, placental tissues settle into those shell valleys around lumps - thus keep them trapped - becoming an ideal food concentration to accommodate microorganisms to grow.

As reported, shell comprises mainly four tissue layers at seed faces, and the number increases as they link to each other and form the faces' corners, similar to those registered for in-shell Brazil nut (Scussel *et al.* 2014a,b). It was not possible to clearly detect the number and details

of seed tissue layers nor the two cotyledons or embryo region as they are too close to each other. A similar observation was also reported in andiroba seed by Ferraz *et al.* (2002).

In our study, the observed shell tissues comprise thick-walled protective cells (sclerenchyma and collenchyma), which provide rigid and flexible support properties to the shell's layers with a filtering mechanism (special cells). They act as a pressure vessel preventing over-expansion when water enters the porous cells (Scussel *et al.* 2014a; Kreibich *et al.* 2017a). Indeed, the external morphology of the seed coat provides and regulates the exchange of gases and water between the seed and the environment, serving as protection.

Internally, as in the Brazil nut, andiroba seed has helical tubes (primary xylem and phloem vascular bundles), which form an input connection between the external environment and the endosperm, through a channel full of vascular bundles (cambial system), whose function is the transport and distribution of nutrients and water to the seed, when it is still in the tree (Scussel *et al.* 2014a).

Micropyle, by definition, is the seed opening area where the tegument does not completely close and it is characterized as a cavity closer to the hilum region (Camargo *et al.* 2008). During dehydration, the seeds micropyle, a small aperture (the pod/valves to seed connection) becomes hollower, facilitating the interference of external factors. Thus, suggesting that, together with its channel (micropyle to inner seed), are the main entrance for microorganisms and moisture in nuts (Scussel *et al.* 2014b).

Most shell layers are brown, with only one layer that differs from those color (white to light creamy) similar also to in-shell Brazil nuts (Scussel *et al.* 2014a,b). The cotyledons form a single reserve mass, as they are fused, making it impossible to perceive and separate the two parts (Scussel *et al.* 2014a). The embryonic axis is tiny and located within the cotyledonary tissue close to the micropyle (Ferraz *et al.* 2002). Although the lipids are found in the whole cotyledons, they are in higher concentration closer to embryonic axis and the endosperm (Carvalho and Nakagawa 2000).

To control and/or prevent attacks insects and fungi proliferation, thus leading to seed deterioration, several procedures should be applied since pods fall from trees. Some of them can be similar to those recommended for andiroba seed (Ferraz *et al.* 2002; Jordao and Silva 2006) and Brazil nuts (Manfio *et al.* 2012) as follows. To set a suspended net (around the tree trunks) for pod collection (avoiding them falling on the muddy ground). That prevents cracks formation, reduces humidity, no mud/dust adsorption and no ground insect's attack. Therefore, reducing problems at the factories' cleaning procedures. Packaging them in jute bags prior to forest sites to board on the boats, ventilation and/or adequate exhaustion in the boats storage room (during river transport) will control humidity and living organisms' proliferation. Direct to cleaning and drying as soon as reaching the processing facility also adds to prevention of proliferation. After immersing the seeds in water for at least 24 hours to eliminate the larvae by drowning and deshelling, to be stored dry and seed bags expedited as soon as possible to oil industries for further oil extraction.

## CONCLUSION

Through SM and SEM it was possible to verify that the shell had the main morpho-histological structures and cells characteristics related to fungi spoilage susceptibility. Apart from the placental residues, the uneven andiroba seed surface, the shell locule with the channel and the porous rich cells (with plasmodesmata), cracks and microcracks, in addition to insect and rodent attacks, may be the main sites responsible for either microorganism's entrance and humidity absorption to the inner seed parts leading to deteriorations. Some preventive measures can be taken to maintain the seed's quality and, consequently the oil's quality, such as installing suspended nets around the trunks, controlling seed moisture, cleaning, drying and sending the seeds as quickly as possible for oil extraction. This is the first study showing the different structures of the andiroba seed cells by SM and SEM.

## REFERENCES

- Aragao, D.D.S.; Lunz, A.M.P.; Oliveira, L.C.D.; Raposo, A.; Fermio Junior, P.C.P. 2014. Efeito do sombreamento na anatomia foliar de plantas jovens de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). *Revista Árvore*, 38, 631-639.
- Camargo, J.L.C.; Ferraz, I.D.K.; Mesquita, M.R.; Santos, B.A.; Brum, H.D. 2008. *Guia de Propágulos e Plântulas da Amazônia* - Volume 1 (ISBN 978-85-211-0041-6).
- Carvalho, N.M.; Nakagawa, J. 2000. *Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção*, 4º Ed, FUNEP, Jaboticabal, SP, 588p.
- Correa, J.; Silva, P.C.; Guabiraba, I.; Maciel, S.; Lira-Guedes, A.C. 2020. *Boas práticas para o manejo e extração artesanal de óleo de andiroba, no Afiúá, PA*. available in: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1127775/1/CPAF-AP-2020-Boas-praticas-para-o-manejo.pdf>>
- Crawley, M.J.; Gillman, M.P. 1989. Population dynamics of cinnabar moth and ragwort in grassland. *The Journal of Animal Ecology*, 1035-1050.
- Ferrari, M.; Oliveira, M.S.C.; Nakano, A.K.; Rocha-Filho, P.A. 2007. Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro e in vivo de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17,626-30.
- Ferraz, I.D.K.; Camargo, J.L.C.; Sampaio, P.D.T.B. 2002. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* DC): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. *Acta amazônica*, 32, 647-647.
- Guariguata, M.R.; Adame, J.J.R.; Finegan, B. 2000. Seed removal and fate in two selectively logged lowland forests with contrasting protection levels. *Conservation biology*, 14(4), 1046-1054.
- Jordão, A.L.; Silva, R.A. 2006. *Guia de pragas agrícolas para o manejo integrado no estado do Amapá*. Holos Editora.
- Kenfack, D. 2011. A synoptic revision of *Carapa* (Meliaceae). *Harvard Papers in Botany*, 16(2), 171-231.
- Klauck, V.; Pazinato, R.; Radavelli, W.M.; Volpato, A.; Stefani, L.M.; Silva, A.S. 2015. *In vitro* repellent effect of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and andiroba (*Carapa guianensis*) oils on *Haematobia irritans* and *Chrysomya megacephala* flies. *Trop Biomed*, 32(1), 33-39.
- Kreibich, H.H.; Moecke, E.O.E.; Scussel, V.M. 2017a. Stereo and Scanning Electron Microscopy of Whole Post-Fermentation Dry Cocoa (*Theobroma cacao* L.): Part one – Healthy Beans. *Microscopy and Imaging Science: Practical Approaches to Applied Research and Education*; Microscopy Book Series, Méndez-Vilas, A., ed., Badajoz, Spain, 337-347.
- Kreibich, H.H.; Moecke, E.O.E.; Scussel, V.M. 2017b. Stereo and scanning electron microscopy of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.): Part two - fungi spoilage susceptibility. *Microscopy and Imaging Science: Practical Approaches to Applied Research and Education*; Microscopy Book Series, Méndez-Vilas, A. ed., Badajoz, Spain, (7), 329-336.
- Lorenzi, H. 2002. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa. *Instituto Plantarium*, ed. 4, 384 p.
- Manfio, D.; Beirao, L.H.; Damian, C.; Savi, G.D.; Scussel, V.M. 2012. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) brown skin characterization — a waste product generated from shelled dry nut factories of Amazon region. *Agricultural Sciences Research J* 2:253–60.
- Matos, R.S.; Tălu, Ş.; Mota, G.V.; Pinto, E.P.; Pires, M.A.; Abraçado, L.G.; Ferreira, N.S. 2021. Correlating structure and morphology of andiroba leaf (*Carapa guianensis* Aubl.) by microscopy and fractal theory analyses. *Applied Sciences*, 11(13), 5848.
- McHargue, L.A.; Hartshorn, G.S. 1983. Seed and seedling ecology of *Carapa guianensis*. *Turrialba*, 33(4), 399-404.
- Mendonça, A.P.; Ferraz, I.D.K. 2007. Óleo de andiroba: processo tradicional da extração, uso e aspectos sociais no estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 37, 353-364.
- Moraes, E.A.; Bianchin, I.; Silva, K.F.D.; Catto, J.B.; Honer, M.R.; Paiva, F. 2010. Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(3), 229-236.
- Pereira, T.B.; Silva, L.F.R.; Amorim, R.C.; Melo, M.R.; Souza, R.C.Z.; Eberlin, M.N.; Pohlit, A.M. 2014. *In vitro* and *in vivo* anti-malarial activity of limonoids isolated from the residual seed biomass from *Carapa guianensis* (andiroba) oil production. *Malaria journal*, 13(1), 317.
- Pinto, A.A. 2007. Avaliação de danos causados por insetos em sementes de Andiroba [(*Carapa guianensis* Aubl.) e Andirobinha (*C. procera* DC.) (Meliaceae)] na Reserva Florestal Adolpho Ducke em Manaus, AM, Brasil.
- Plowden, C. 2004. The ecology and harvest of andiroba seeds for oil production in the Brazilian Amazon. *Conservation and Society*, 251-272.
- Santos, R.S.; Pellicciotti, A.S. 2016. Ocorrência de *Hypsipyla ferrealis* Hampson (Lepidoptera: Pyralidae) em andiroba no estado do Acre. *Ciência Florestal*, 26, 995-998.
- Scussel, V.M.; Manfio, D.; Savi, G.D.; Moecke, E.H. 2014a. Stereoscopia and scanning electron microscopy of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) shell, brown skin, and edible part: Part one -healthy nut. *Journal of Food Science*, 79(7), H1443-H1453.
- Scussel, V.M.; Manfio, D.; Savi, G.D.; Moecke, E.H.S. 2014b. Stereo and scanning electron microscopy of in-shell Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) Part two-surface sound nut fungi spoilage susceptibility. *Journal Food Science*. 79(7), H2392 – H2403.
- Segovia, J.F.O.; Oliveira, V.L.; Gonçalves, M.C.A.; Resck, I.S.; Silva, C.A.M.; Silveira, D.; Kanzaki, L.I.B. 2012. Botanical characterisation, geographical distribution and phytochemistry analysis of *Manilkara Huberi* (Ducke) stahl autochthonous in Amapá State, Brazil. *Embrapa Amapá-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Silva, B.A.; Silva, N.C.; Runtzel, C.L.; Aquino, C.M.; Scussel, V.M. 2019. Effect of Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) Oil for Fungi Control in Maize (*Zea Mays* L.) Grains. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, v. 12, p. 26-36.
- Silva, B.A.; Scussel, V.M. 2020. Characteristics and effects of the Amazonian andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) oil against living organisms – A Review. *Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6(4), 31-47.
- Sousa, S.F.; Paes, J.B.; Arantes, M.D.C.; Lopez, Y.M.; Brocco, V.F. 2018. Análise física e avaliação do efeito antifúngico dos óleos de andiroba, copaiba e pinhão-manso. *Floresta*, 48(2), 153-162.
- Tsukamoto, Y.; Oya, H.; Kikuchi, T.; Yamada, T.; Tanaka, R. 2019. Guiano fruits C-I from fruit oil of andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.)Meliaceae. *Tetrahedron*, 75(9), 1149-1156.

*Aceito para Publicação na Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana*

**STEREO AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF THE AMAZONIAN ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl.) SEED: FUNGI SPOILAGE SUSCEPTIBILITY SITES**

**Abstract**

Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), an Amazonian oil-rich seed, had its tegument (shell) and cotyledons (nut) morpho-histological susceptible sites for living organism proliferation investigated by stereo (SM) and scanning electron microscopies (SEM). It was registered the shell, throughout its tissues, presents characteristics features that give conditions for fungi proliferation, leading to seed (outer /inner) spoilage. They were identified, apart from the placental residues (highly hydrophilic and nutrients rich substrate); as being the shell surface uneven relief, including micro-cracks (lead to conidia trapping/moist absorption); the micropyle & inner channel (external environment to inner seed inter-connection); the cells porosity (multi-layered porous membranes – the nutrients and water exchange among neighbor cells - plasmodesmata); and seed faces' corners (mix of vascular bundles and soft tissue). Regarding nut spoilage susceptibility sites, they are mainly at the nut surface's contact area to the shell (either at micropyle, cracks, the channel and/or faces corners). All of them lead to living organisms' spoilage entrance, targeting the nut parenchymal nutrient-rich tissues. A variety of mycelia with their conidia were registered and shown through SEM micrographs, including insects' shell damages (fungi reproductive structures' vector). To prevent/control deterioration, apart from forest seeds collection improvement (thus avoiding damages and living organisms' contact/infection), moisture control procedures should be applied (throughout the Amazon River and its tributaries boat's transport up to the factory), among others. Thus, reducing losses of raw material for andiroba oil extraction and resulting in better final product quality.

**Key words:** crabwood, roba-mahogany, *andiroba*, spoilage; fungus; contamination

**1. INTRODUCTION**

The andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) tree is a native Meliaceae family species from the Amazon region. Also called crabwood, it has an important socioeconomic function due to several applications (wood/bark/leaf/seeds) for the indigenous population. Its seed has one of the most healing oils known in that region (Silva & Scussel, 2020). The andiroba oil properties and applications vary from living organisms' inactivation and healthy properties (Moraes et al. 2010; Pereira et al. 2014; Klauk et al. 2015; Sousa et al. 2018; Tsukamoto et al. 2019).

The amazon rainforest has a climate of high humidity (80% relative humidity) and temperatures (40 °C), and rainy periods. These circumstances contribute to the natural reproduction of fungi and other living organisms, such as termites, flies, borers, moths, among other insects (Segovia et al. 2011). When they are still on trees, andiroba pods are the target of birds, insects, monkeys and rodent's attacks which can leave microbial inoculum (feces, regurgitation, saliva, and even from the soil) (Almeida et al. 2009).

After the pod falls on the moist soil, the valves start to open by the time of seeds collection. They are covered of moist, dust and solid matter. Reaching the factory, seeds are cleaned, dried, and stored (Silva & Scussel, 2020). During dehydration, the seeds micropyle, the pod/valves to seed connection, becomes hollower, facilitating the interference of external contaminations. It and its channel (micropyle to inner seed), are the main entrance for microorganisms and moisture in nuts (Scussel et al. 2014b).

Reports on seed (raw material) spoilage and oil quality (final product) reduction, which lead to economic losses to the *andiroba* oil industry have been published (Crawley and Gillman, 1989; Pinto, 2013). However, there is a lack of studies on the morpho-histology of whole seed regarding the spoilage susceptible parts. Despite that, as far as deterioration is concerned, there are only a few published studies on insects (Pinto et al. 2013). Therefore, there is a need to find out and understand seeds susceptibility to fungi infections that directly interfere to oil quality and reduce seeds raw material acceptability by the factories and further oil products industries.

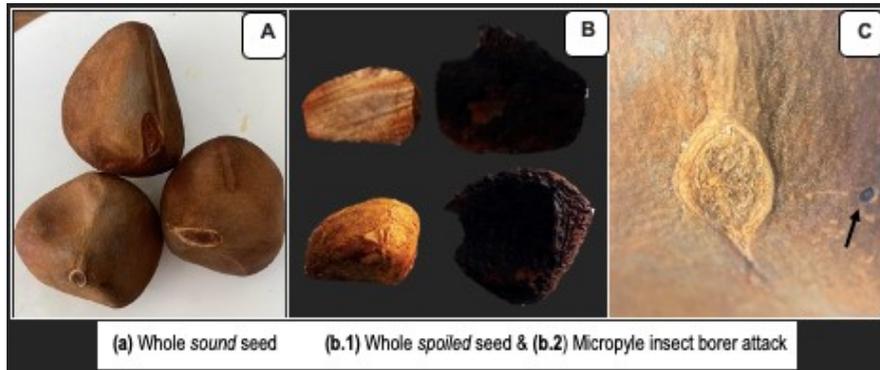
Due to the lack of information on *andiroba* fungi spoilage that should help to develop methods for prevention & control, this work investigated its morpho-histological susceptible sites and tissue characteristics by applying stereo (and scanning electron microscopies). Some infected fungi tissues detected (with their mycelia and reproductive structures) in selected spoiled seed parts will also be reported.

**2. MATERIAL AND METHODS**

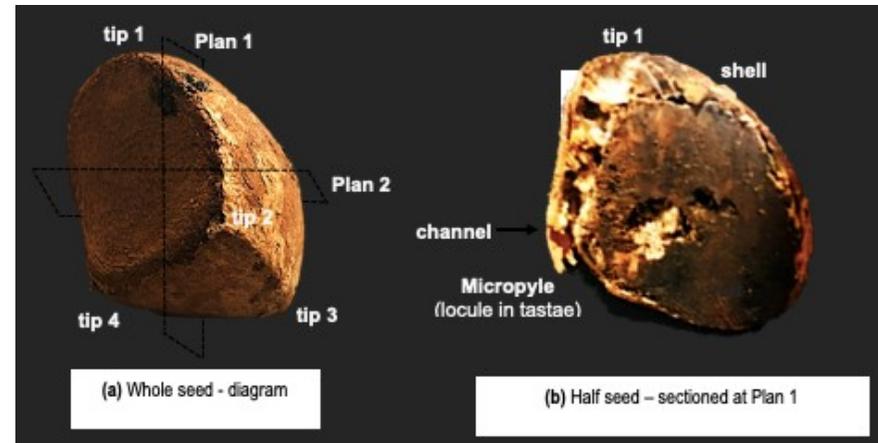
**2.1 Material**

**(a) Sample:** selected in-shell *andiroba* (350 g) sound and spoiled (fungi deteriorated) seeds obtained from Belém city, Para State, Northern Region of Brazil (Figure 1).

**Figure 1 -** Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) seed samples: **(A)** sound (in-shell), **(B)** spoiled (shelled) and **(C)** seed attacked by insect / borer for SM & SEM analysis.



**Figure 2** - Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) seed (in-shell) preparation for SM & SEM microscopies observation: (a) whole - diagram for the sectioning parts procedure (longitudinal and cross sections, Plans 1 and 2, respectively) and (b) half seed sectioned at Plan 1 showing the intercommunication channel and cotyledon fungi spoiled.



**(b) Equipment:** (b.1) gold plating machine - model EM-Scd500, Leica (Leider, Ill., USA) and (b.2) stereo microscope - model OPTZTS, Opticam (Tokyo, Kt., Japan) [180x] and (b.3) scanning electron microscope - model JSM-6390LV, Jeol (Peabody, Mass., USA) [7000x].  
**(c) Other materials:** formaldehyde and ethanol, analar grade, Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil); stubs (small metal blocks, 9 diameter and 10 mm height), Leica (Leider, Ill., USA); stainless steel scalpel, GS Mtronix (SP, Brazil); SM-Image-Capture software, model OPTHD 14000, Opticam Microscopy Technology (Doral, Fl., USA); double-sided carbon tape, Electron Microscopy Sciences (Leider, Ill., USA), saw, Ticotico (Sao Paulo, SP, Brazil); twizers, stainless steel.

## 2.2 Methods

**(a) Sample preparation:** the *sound* and selected *spoiled* in-shell *andiroba* seed (after being dehydrated and defatted) were sectioned into halves (whole), slices (shell / edible) and small cubes (shell surface, micropyle and channel regions) for SM and SEM investigation (sites of vulnerability for living organisms' entrance, tissue spoilage affected, cells special wall layers / membranes characteristics to moisture absorption) as reported by Scussel et al. (2014a).  
**(a.1) andiroba whole seed halves sections - SM:** in-shell seed were sectioned into halves (cross & longitudinal sections – Plan 1 & Plan 2, respectively) by means of a fine saw - Figure 2. Also, *andiroba* parts surface, fungi spoiled, were cut into small portions for SM;  
**(a.2) andiroba seed parts slices / cubes - SEM:** shell and cotyledons were sliced and cut into small cubes (around 3.0 mm) with a scalpel (Manfio et al. 2012a). All that carried out at the Central Laboratory of Electron Microscopy (LCME) at UFSC;  
**(a.3) stubs mounting and gold coating:** the samples stub mounting was carried out as reported by Scussel et al (2012a). Briefly, *andiroba* seed cubes were fixed on the stubs containing carbon double-sided tape and vacuum gold coated - by placing them onto the Planetary Gold Coater stubs holder, vacuum applied and then coated with a 40 nm gold layer.

**(b) SM and SEM observation:** (a) *SM* – each *andiroba* seed (sound and spoiled) surface and halves (Plan 1 and 2 sections) were observed on stereoscope [from 7.1 to 115x] to determine the locations of each structure (on shell, inner skin and cotyledons) regarding fungi (entrance/conidia) susceptibility. Micrographics were saved using SM-Image-Capture software. The selected *spoiled* seed parts (outer and inner surfaces) had their fungi colonies registered for further fungi characteristics (reproductive structures / mycelia) elucidation, (b) *SEM* – each area of interest of each sample was scanned and its morpho-histological characteristics susceptible to fungi colonies and their structures observed and registered at different magnifications [up to 7000x].

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

From the surfaces and slices of fungi *spoiled* and *sound* whole *andiroba* seed obtained for morpho-histological (SM & SEM) observation, it was possible to register several shell susceptible characteristics leading to nut (oil-rich) tissue deterioration - which may affect raw material disponibility and so oil quality. They were mainly the remaining *placental* residues; *shell* morphology specifics with cracked surface and its inner layers *cells porosity*. For the *cotyledons*, the main susceptibility was its outer surface (parenchyma nutrients rich

tissue) *contact* to the contaminated *inter-communication system* (locule to channel). Figures 3 to 7 show the main susceptible morpho-histological sound and spoilage sites and fungi tissues (mycelia / hyphae / reproductive structures) of visibly spoiled *andiroba* seed by both microscopies.

### 3.1. SOUND *andiroba* seeds spoilage susceptible sites

The characteristics related to seed structures, which allow living organisms proliferation and humidity absorption to the inner seed parenchymal tissues, were identified as follows.

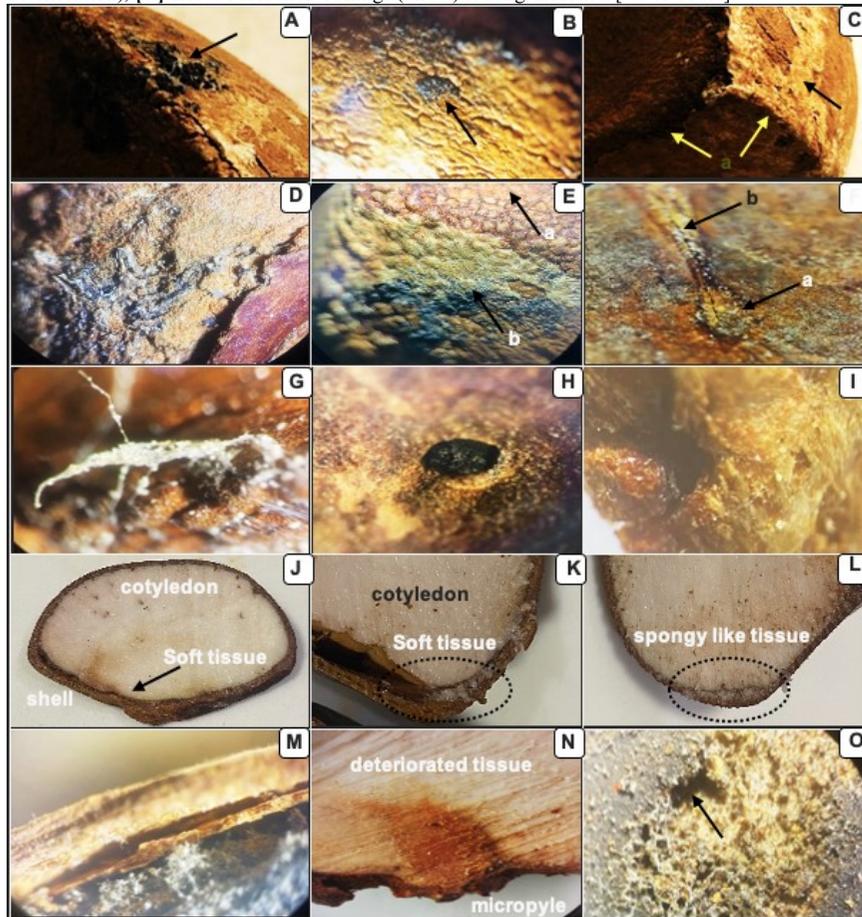
**(a) PLACENTAL RESIDUES:** the highly hydrophilic and nutritious rich tissue that remains on seed shell plays a role on deterioration. It settles when they are detached/extracted from pod valves. Figure 3 [A-I] and 4 [A-F] show presence of placental residues by SM and SEM, respectively. Those residues are utilized as a rich substrate by the living organisms (fungi & bacteria) proliferation and so can attract insect. Due to the shell surface being rather uneven with lobes formation at the tips and corners, placental tissues settle into those shell valleys around lumps - thus keep them trapped - becoming an ideal food concentration to accommodate microorganisms to grow.

**(b) SHELL:** Apart from its surface characteristics, it was registered tissues with cell layers that provided conditions for moisture absorption to the inner seed. Figures 3 and 4 show those characteristics by SM and SEM, respectively. **(b.1) Surface:** it has a quite *uneven* relief - that goes from somewhat smooth faces main areas (velvet-like tissue) to lumpy, with lobes which are formed mainly at the *corners* (each two faces links) and *tips* (three faces linkage). That allows humidity to settle and/or absorb into those valleys (including also conidia concentrations). *Cracks* (that occur during pods falling onto the ground) and *micro-cracks* (during dehydrations) also play a role in the deterioration conditions as reported for Brazil nuts and cocoa beans (Scussel et al. 2014a-b; Kreibich & Scussel, 2015). **(b.2) Locule *in testae* & channel:** locule, i.e., the micropyle, is the seed navel or the cavity formed during seed detaching from pods which is located at the junction of three faces at Tip 4. Figures 1, 2 and 3 [F-H], 4 [J-L] show *andiroba* seed micropyle and channel locations. It allows nut first contact to the seed external environment. The locule is connected to the seed channel (where the vascular cambium system is located). It has the function of water and nutrients transport and distribution throughout the inner seed (Scussel et al. 2014). After the seed detaching from the pods (collected on the wet muddy ground) and stored either, still in the forest environment - that channel system becomes more opened (Figure 2), making it easier the connection between the external environment (that surrounds the seed) and the inner seed (thin brown skin tissue & nut). **(b.3) Cell walls porosity:** when going deeply into details of the main shell histological features, which also allows water absorption and fungi proliferation, it was observed a specific characteristic of its tissues cells. Most of them (despite their different shapes) are made of multi-layered, porous-rich membranes. Those cells have a quite varied number of wall layers with several pores distributed which cross the membranes all over,

forming inter-communication tubes. Figure 4 [A-I] show SEM micrographs of some shell layers (palisade & polygonal) with their cell different number of walls and pores distribution. That system is called plasmodesmata – tubes system, i.e., microscopic channels that traverse the cell walls and allows water and nutrients interchange. They facilitate the movement of molecules between adjacent cells ranging from small molecules to large proteins and mRNA. **(b.4) Soft tissue:** a mix of soft/loose round/polygonal cells and vascular (helically and tracheid's shaped) bundles, concentrated at the faces linkage (*corners*) responsible for nutrients/water seed distribution. It also allows fungi spore proliferation by trapping them into the spongy-like and moist tissue (Figure 3 [J-O]). **(c) NUT:** regarding the seed's embryo (bears two cotyledons) spoilage susceptible sites, they are located mainly where the shell inner surface contacts each other. It occurs first at the area located closer to the shell *micropyle*, then at *channel* and through the helically tubes at *corners* (spongy like tissues). Next, the spoilage targets the parenchymal nutrient-rich tissues carrying organisms (conidia / fungi / including insects) and moisture to the inner seed structures. Figures 2 (half seed) and 3 [M-O] show in detail the path from the locule to the inner cotyledon.

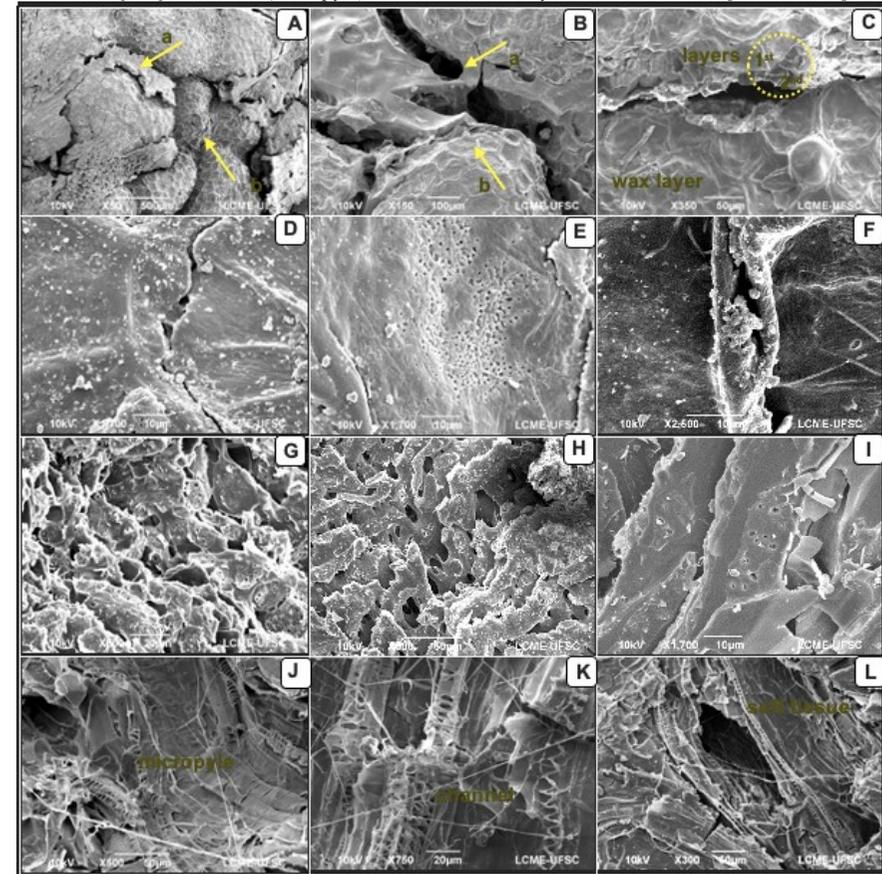
**Figure 3** - Stereo Microscopy Photographs of *Andiroba* (*Carapa guianensis* Aubl.) seed - **susceptible sites versus fungi spoilage: shell surface** [A-I] – [A] fungi colonies; [B] seed with surface lobes / lumpy relief with placental residues with fungi colonies adhered; [C] placental residues, uneven surface (velvet like), tip and faces corners (lobes and valleys) and surface relief (arrow a); [D] surface layers fungi

infected and cracks; [E] rough surface (arrow a) and fungi colonies (arrow b); [F] micropyle (conidia entrance)(arrow a) with hilum site (arrow b); [G] insect infestation on micropyle; [H] shell damage by insect / borer with fungal infection; [I] placental thick layer; **whole seed (cross section) [J-O] – [J-L] corners soft tissue nutrient rich; [M and N] fungi infected at soft tissue & micropyle region (nut deterioration); [O] insect borer shell damage (arrow) & fungi infection [7.1 to 110X].**



**Figure 4 -** Scanning Electron Micrographs of Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) sound seed – susceptible sites: **placental residues [A-F] – [A and B] placental residues (arrow a) & shell surface (lobes) (arrow b); [C] primary and secondary layers, cracks and wax layer; shell surface [D-F] – [D] hyaline (thin layer) and cracks; [E] porous membranes; [F] intercell membranes (conidia); [G-I] cell different**

shapes, cell walls' porosity – plasmodesmata – [G] globous cells; [H] multi shaped cell; [I] long cells; **inner shell [J-L] – entrance (micropyle) / inner shell and cotyledon corner areas [50 to 2500X].**

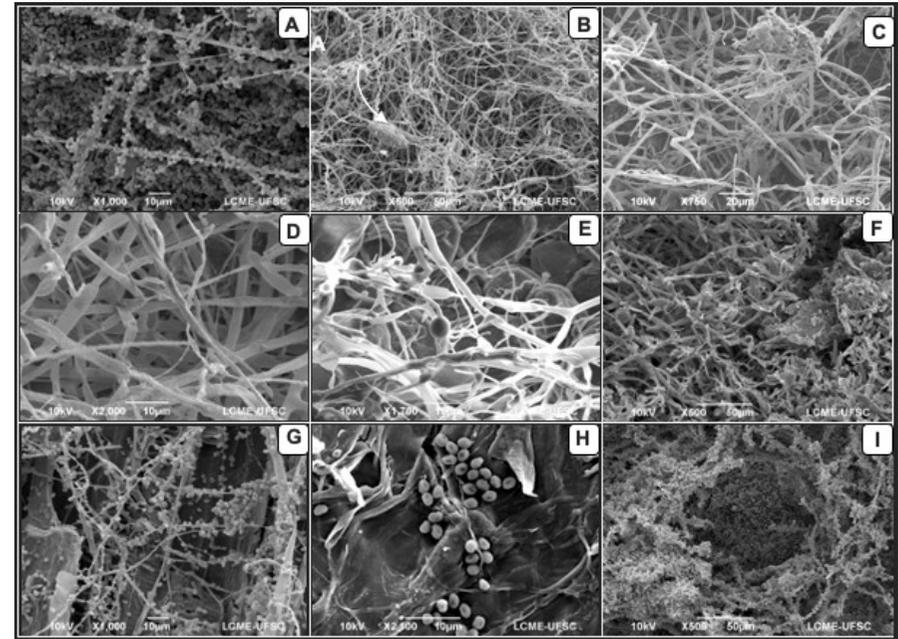


### 3.2. SPOILED andiroba seeds fungi infection

As far as spoiled seeds are concerned, the main signs of fungi presence (apart from tissues visibly deteriorated) are their surface color & texture alteration. Depending on the

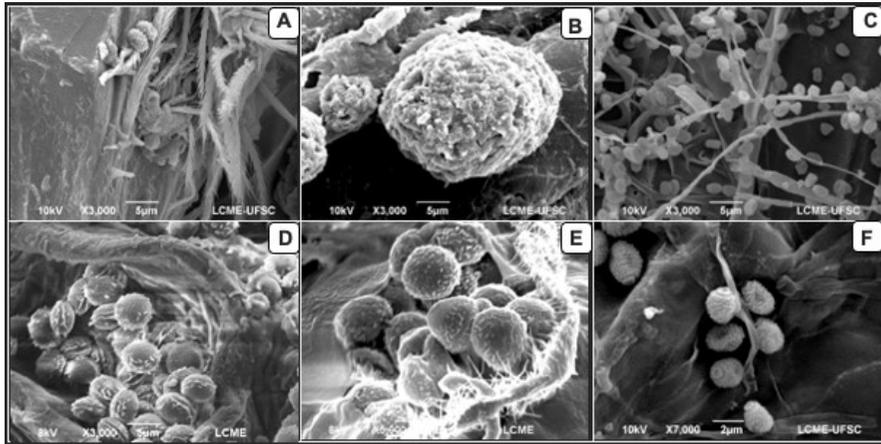
infection intensity and the extent of affected area, fungi colonies with their mycelia and reproductive structures, can be observed, allowing genera and species identification. That can be achieved by their morphology direct visualization by microscopy (SM / LIGHT / SEM) and/or through mycology tests (Scussel et al 2014a, Savi, Scussel 2015). Depending on genera and species isolated, mycotoxins can be produced.

In the current study, by utilizing the selected spoiled andiroba seeds, it was possible to register a variety of fungi colonies formation at the susceptible sites (Section 3.1). Details of fungi mycelia on *spoiled* andiroba that spread further deeply into the tissues (from shell to nut) are shown through SEM micrographs on Figures 5, 6 with the diversity of mycelia (hyphae and reproductive structures) infection throughout the seed tissues. Figure 6 [A-F] shows a closer view of the reproductive structures, where conidia differences in shapes, surfaces and sizes can be observed. The sporangium and sporangiophores of *Rhizopus* spp. and/or *Mucor* spp. are seen hidden at sites such as shell cracks valleys and on the placental residues with their characteristics shapes. *Rough* and *smooth* conidia special surfaces and rather small sizes (500, 7000 X) are some of the specifics that allow identification. Whether the andiroba seeds environment surrounding conditions are adequate and nutrients are available for those conidia further and their proliferation can highly intensify.



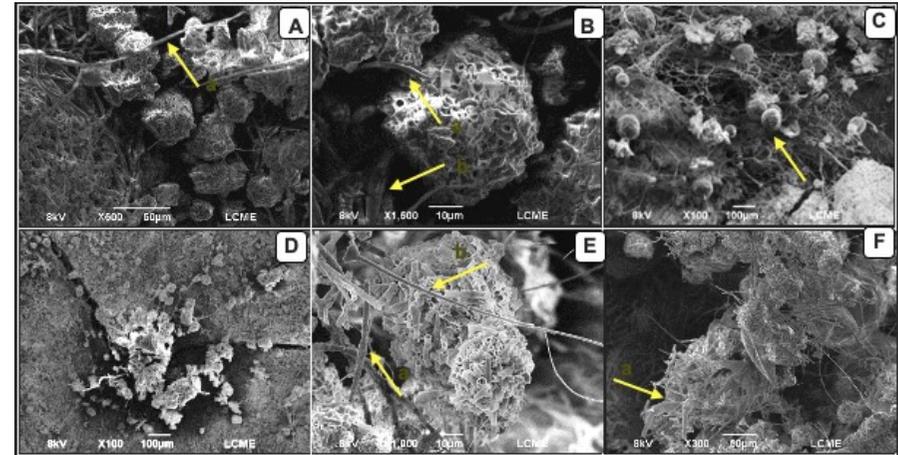
**Figure 5** - Scanning Electron Micrographies of Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) spoiled seed fungi infected: mycelia, conidia and hyphae on tissue sites: [A-D] nut surface; [E] shell hyaline thin layer; [F] shell micro-cracks; [G] vascular bundles; [H] inner shell surface; [I] cavity fungi infection [500 to 2500x].

**Figure 6** - Scanning Electron Micrographies of Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) spoiled seed – fungi reproductive structures: [A-C] different types / shapes, sizes / sites; [D-F] smaller sizes and surface characteristics [3000 to 7000X].



Insects: apart from deterioration caused by fungi, also insect's damages and eggs layed on the *spoiled* seed samples utilized for the current investigation were registered. Figure 7 shows their presence, among fungi colonies, causing shell damages. It was possible to identify fragments of their antenna/hair and legs (tarsus, claws) including eggs. They are considered conidia vectors to inner seed.

**Figure 7** - Scanning Electron Micrographs of Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) spoiled seed – **other living organisms** – [A and B] insect hair (arrow a) and leg (arrow b); [C] insect eggs (arrow); [D] crack; [E and F] insect leg (arrow a) and antenna (arrow b) [100 to 2500X].



### 3.3 PREVENTION & CONTROL SUGGESTED METHODS

To prevent and/or control the deterioration of andiroba seeds by fungi, some procedures can be applied during the seed production stage. Manfio et al. (2012) reported procedures for this purpose in Brazil nuts, as follows: a net suspended around the tree trunks prevents the pods from falling into the muddy soil, preventing the formation of cracks, reducing the absorption of moisture and dirt, as well as attack by terrestrial insects. Humidity control during transport using jute bags for storage, adequate ventilation and/or exhaustion during transport. Sending the raw material as soon as possible for cleaning and drying processing also contributes to the prevention of fungal proliferation. Ferraz et al. (2002) and Jordao and Silva (2006), worked with andiroba seeds, where they reported that immersing the seeds in water for at least 24 hours eliminates the larvae by drowning and peeling, in addition to storing the dry seeds, and sending them to the oil industry as soon as possible to extract the oil.

### 4 CONCLUSIONS

Andiroba seed in-shell, although somewhat visibly sound, showed to be highly spoiled inside. Through SM & SEM it was possible to verify that the shell had the main morpho-histological structures and cells characteristics related to fungi spoilage susceptibility. Apart from the *placental* residues, the uneven *andiroba* seed surface, the shell *locule* with the *channel* and the *porous* rich cells (with plasmodesmata) were the main sites

responsible for either microorganism's entrance and humidity absorption to the inner seed parts leading to deteriorations. Depending on infection extension, it can reach the nut, leading to deterioration of fungi, thus compromising oil quality.

This is the first study able to identify, through SM and SEM, the fungi spoilage morphologically susceptible structures of *andiroba*, including the seed infection spoilage mycelia/conidia characteristics.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** authors thank the CAPES (Higher Education Personnel Improvement Coordination) for providing a scholar grant and the Laboratory of Electron Microscopy Centre (LCME) of UFSC for technical support.

## REFERENCES

- Almeida, S. S.; Sousa, D. G.; do Vale, N. C. (2009). História natural, ecologia e técnicas de manejo em castanhas nativas do sul do Amapá. In: Kanzaki, Luis Isamu Barros (Org.). Desenvolvimento sustentável em áreas de extrativismo da castanha-do-brasil no sul do Amapá. Belém: *Banco da Amazônia*, p. 11-48.
- Crawley, M. J.; Gillman, M. P. (1989). Population dynamics of cinnabar moth and ragwort in grassland. *Journal of Animal Ecology*, v.58, n.3, 1035-1050.
- Ferraz, I.D.K.; Camargo, J.L.C.; Sampaio, P.D.T.B. 2002. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* DC): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. *Acta amazônica*, 32, 647-647.
- Klauck, V., Pazinato, R., Radavelli, W. M., Volpato, A., Stefani, L. M., & da Silva, A. S. (2015). In vitro repellent effect of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and andiroba (*Carapa guianensis*) oils on *Haematobia irritans* and *Chrysomya megacephala* flies. *Trop Biomed*, 32(1), 33-39.
- Kreibich, H. H., Savi, G. D., Soares, C. E., Moecke, E. H. S., & Scussel, V. M. Post-Fermentation Standard and Premium Types Dry Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.) Quality: living organisms and toxins. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, p. 58-67.
- Kreibich, H., Moecke, E. O. E., & Scussel, V. (2017). Stereo and Scanning Electron Microscopy of Whole Post-Fermentation Dry Cocoa (*Theobroma cacao* L.): Part one – Healthy Beans. *Microscopy and Imaging Science: Practical Approaches to Applied Research and Education; Méndez-Vilas, A., Ed*, 337-347.
- Kreibich, H., Moecke, E. O. E., & Scussel, V. (2017). Stereo and scanning electron microscopy of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.): part two - fungi spoilage susceptibility. *Microscopy and Imaging Science: Practical Approaches to Applied Research and Education; Méndez-Vilas, A., Ed*, 329-336.
- Jordão, A.L.; Silva, R.A. 2006. *Guia de pragas agrícolas para o manejo integrado no estado do Amapá*. Holos Editora.
- Manfio, D., Beirao, LH, Damian, C., Savi, GD, Scussel, VM. (2012). Brazil nut (*Bertholletia excels* H.B.K.) brown skin characterization — a waste product generated from shelled dry nut factories of Amazon region. *Agricultural Sciences Research J* 2:253–60.
- Mello, F. R., & Scussel, V. M. (2009). Development of physical and optical methods for in-shell Brazil nuts sorting and aflatoxin reduction. *Journal of agricultural Science*, 1(2), 3.
- Moraes, E. A., Bianchin, I., Silva, K. F. D., Catto, J. B., Honer, M. R., & Paiva, F. (2010). Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(3), 229-236.
- Pereira, T. B., e Silva, L. F. R., Amorim, R. C., Melo, M. R., de Souza, R. C. Z., Eberlin, M. N., Pohlit, A. M. (2014). *In vitro* and *in vivo* anti-malarial activity of limonoids isolated from the residual seed biomass from *Carapa guianensis* (andiroba) oil production. *Malaria Journal*, 13(1), 317.
- Pinto, A. A., Teles, B. R., Anjos, N. D., & Couceiro, S. R. M. (2013). Seed predation of crabwood [*Carapa guianensis* Aubl. and *Carapa procera* DC.(Meliaceae)] by insects in Amazon. *Revista Árvore*, 37, 1115-1123.
- Santos, M. T.; Aquino, M. G. C.; Rocha, J. S.; Braga, B. A.; Maestri, M. P. (2018). Biometria de sementes de Andiroba de duas diferentes áreas. In: *Congresso Internacional das Ciências Agrárias*, 3. Anais.
- Savi, GD, Scussel, VM. (2015). Características Microscópicas da Castanha do Brasil e sua Relação com Contaminação. In: Kluczkovski, A ; Scussel, VM. Gerenciamento de risco da castanha-do-Brasil, Chap 2.1, Blumenau, *Nova Letra* ed.,81-120.
- Silva, B. A.; Scussel, V. M. (2020). Characteristics and Effects of the Amazonian andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) oil against living organisms: A Review. *Journal of Biotechnology and Biochemistry*, v. 6, 31-47.
- Scussel, V. M., Manfio, D., Savi, G. D., & Moecke, E. H. (2014). Stereoscopy and scanning electron microscopy of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) shell, brown skin, and edible part: part one—healthy nut. *Journal of Food Science*, 79(7), H1443-H1453.
- Scussel, VM, Giordano, BN, Simao, V., Manfio, D., Galvao, S., Rodrigues, MNF. (2011). Effect of Oxygen-Reducing Atmospheres on the Safety of Packaged Shelled Brazil Nuts during storage. *International Journal of Analytical Chemistry*, 1-9.
- Scussel, VM, Manfio, D., Savi, GD, Moecke, EHS. (2014b). Stereo and scanning electron microscopy of in-shell Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) Part two—surface sound nut fungi spoilage susceptibility. *Journal Food Science* 79, H2392 – H2403.
- Segovia, J. F. O.; Oliveira, V. L.; Gonçalves, M. C. A.; Resck, I. S.; Silva, C. A. M.; Silveira, D.; Kanzaki, L. I. B. (2012). Botanical characterisation, geographical distribution and phytochemistry analysis of *Manilkara Huberi* (Ducke) stahl autochthonous in Amapa State, Brazil. *Embrapa Amapá-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Silva, B. A., Scussel, V. M. (2020). Characteristics and effects of the Amazonian andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) oil against living organisms – A Review. *Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6(4), 31-47.
- Sousa, S. F., Paes, J. B., Arantes, M. D. C., Lopez, Y. M., & Brocco, V. F. (2018). Análise física e avaliação do efeito antifúngico dos óleos de andiroba, copaíba e pinhão-manso. *Floresta*, 48(2), 153-162.
- Tsukamoto, Y., Oya, H., Kikuchi, T., Yamada, T., & Tanaka, R. (2019). Guianofruits C–I from fruit oil of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae). *Tetrahedron*, 75(9), 1149-1156.

## EFFECT OF COLD PLASMA ON MAIZE (*Zea mays* L.) GRAINS: INACTIVATION OF FUNGI, MICROSTRUCTURE STABILITY AND GERMINATION CAPACITY

## Abstract

Fungal contamination, particularly in the case of corn (*Zea mays* L.), poses significant challenges for the food and agriculture sectors. Due to environmental and health considerations, conventional fungal control measures, such as pesticides (fungicides and/or insecticides), have declined in popularity. Consequently, there is increasing interest in developing ecologically friendly, safe, and sustainable methods for fungal decontamination of corn. In this study, naturally contaminated corn grains, with moisture levels of 11.42%, 12.72%, and 17.96%, were exposed to Cold Plasma (CP) in a dielectric discharge barrier reactor. The CP parameters used were: frequency 130 Hz, voltage 30 kV, energy  $100 \pm 5$  mJ, distance between electrodes of 0.8 cm, atmospheric pressure, and air as ionizing gas. Exposure times tested were: 0, 2, 5, 7, 10, 15, and 20 minutes. The effect of CP treatment and exposure time was assessed on fungal inactivation, microstructure, and grain germination capacity. A significant reduction in fungal contamination was observed in treatments longer than 5 minutes. The highest fungal contamination logarithmic reduction, ranging from 0.75 to 1.4 log, occurred in treatments of 10, 15, and 20 minutes. The different moisture content of the corn did not significantly influence the effectiveness of the CP treatment. Compared to the control samples, the surface of the corn husk developed a wrinkled texture, with the roughness increasing with longer exposure times. The CP treatments of 15 and 20 minutes caused a more pronounced delay (greater than 2.5-fold) in germination capacity. However, treatments shorter than 10 minutes did not show a statistical difference in this parameter compared to the untreated sample. These results suggest that, with an exposure time of about 10 minutes, CP treatment has the potential to reduce fungal contamination in corn grains without compromising germination capacity.

Keywords: Corn grain; Antifungal; Non-thermal technology; Germinative ability.

## INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) is the third most important food crop in Brazil (Conab, 2018), dominating the national and international market (Artuzo et al. 2019). It is generally the main source of animal feed production, destined for the poultry, pig, and cattle segments (Alves & Amaral, 2011), and its use represents most of the consumption in the world (Artuzo et al. 2019). Among the factors that can impair the quality of the grains and, consequently, the economy generated from them, fungi must be observed.

The incidence of diseases in maize has become more frequent over the years, indicating the vulnerability of hybrids (Prestes et al. 2019). Contamination by fungi usually occurs in the pre-harvest, causing ear rot, or in the post-harvest, generating moldy grains during storage and processing, and configures as the main cause of damage to grains stored throughout the world, second only to insects (Verga & Teren, 2005). They can inhibit/delay germination and cause deterioration of stored grains (Hallowin, 1983) by discoloration,

decreasing nutritional value, causing unwanted odors, rotting, and developing secondary metabolites (toxins) (Selcuk et al. 2008). Among the toxin-producing fungi in the field and storage, the most important are the genera *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium*, which must be controlled (Scussel et al. 2018).

Around the world, fungal infections threaten our food security by reducing agricultural plant yields or even causing complete plant decay. Traditional fungal inactivation methods applied during storage and in industry are pesticides (fungicides and/or insecticides) and heat treatments. However, these methods leave residues and can negatively affect the environment and health and are therefore becoming less popular and acceptable among consumers (Sharma et al. 2019). Consequently, the demand for new, easy-to-use, natural, and ecologically correct fungal decontamination processes or safe and sustainable technologies is increasing (Fisher et al. 2022). These processes should not generate compounds that present toxicity or modify the nutritional properties and the palatability of the grain and its derivatives (Eman, 2010; Savi et al. 2014).

Cold plasma (CP), also called non-thermal or low-temperature plasma, is defined as a gas formed by multi-components such as electrons, atoms, neutral and highly excited molecules, ions, radicals, photons, and neutral particles (Afshari & Hosseini, 2014). In this type of plasma, only the electrons are heated, thus, they are at a higher temperature level than the ions and heavy uncharged particles. The difference in mass is so large that the electrons can be at high temperatures, while the entire plasma remains close to room temperature. Due to this aspect, non-thermal plasmas are used to treat heat-sensitive objects or biological matter (Laroussi, 2009). These plasmas operate at moderate temperatures and use non-toxic gases, therefore, chemical and thermal damage to the substrate is restricted (Sladek & Stoffels, 2005), in addition to providing efficient sterilization and asepsis in a few seconds/minutes (Heinlin, et al. 2011).

Is considered an innovative process with an emphasis on the decontamination of microorganisms (Yinxin et al. 2022), and improves seed germination (Nwabor et al. 2022; Shelar et al. 2022). However, its effectiveness depends on several parameters, such as environmental factors (temperature and relative moisture), food properties (moisture content, pH, product composition, surface properties, and surface area/volume ratio), processing parameters (strain, frequency, gas composition, flow rate, treatment time, electrode type, gap between electrodes, headspace and exposure time) (Feizollahi et al. 2021; Liao et al. 2017), and characteristics of microorganisms (type, strain, growth phase, and initial count) (Amini & Ghoranneviss, 2016; Feizollahi et al. 2021). In addition, the size and geometry of the plasma system are essential factors that alter the antimicrobial efficacy of CP (Laroque et al. 2022).

In food agriculture, CP application can reduce pathogens, decontaminate post-harvest grains, decontaminate biologically active fruit surfaces, and stimulate seed germination and plant growth (Yusaf & Al-Juboori, 2014). The plasma inactivation mechanism is the result of the action of highly energetic plasma species, such as its ultraviolet (UV) photons, electrons, positive and negative ions, free radicals, excited molecules, and

atoms (WAGHMARE, 2021). According to Moisan et al. (2002), there are three main mechanisms by which PF inactivates microorganisms: chemical interaction of radicals, reactive species, or charged particles with cell membranes; damage to membranes and internal cellular components by UV radiation and breakage of DNA chains by UV generated during recombination of plasma species.

Therefore, this work evaluated the CP treatment on maize grains naturally contaminated storage at different moisture for (a) efficiency in inactivating fungal spores, (b) its effect on grain resistance/susceptibility (external microstructure) related to quality and finally, (c) germination capacity.

## MATERIAL AND METHODS

**Sample preparation:** maize grains (fully transgenic) were purchased from a cooperative in Florianópolis, Brazil (27.69436° S, 48.67188° W) and stored in a dry and dark environment at room temperature (moisture: 11.42%; temperature: 20±5 °C) until the date of the experiments.

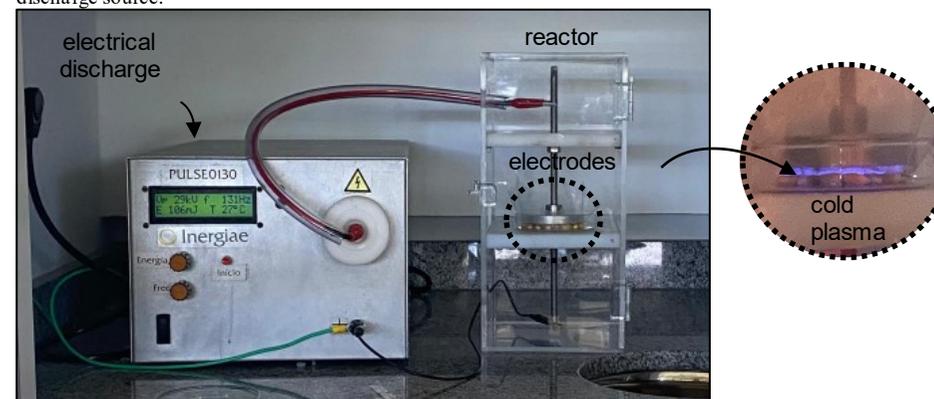
Three conditions were selected to evaluate the effect of grain moisture on the fungi inactivation by CP based on Brazilian legislation IN 29/2011 (Brazil, 2011), which recommends maximum moisture of 13% for the stored maize. The moistures selected were 11.42, 12.72, and 17.96% (d.m.).

Under ambient conditions, maize moisture was 12.72±0.1%, and water activity ( $a_w$ ) of 0.66±0.01. To moisture of 11.42±0.2%, the maize was stored in sealed containers with the saline solution of sodium nitrate at 25 °C until reaching equilibrium, obtaining  $a_w$  of 0.57±0.01. To moisture of 17.96±0.2%, 0.1 mL of distilled water per gram of maize was added over the grains and stored in sealed containers under refrigeration (6±2 °C) until equilibrium, obtaining  $a_w$  of 0.97±0.01. The  $a_w$  was determined in a water activity tester (aqualab 4TE DUO), and the moisture in an oven at 105 °C.

**Cold plasma treatment:** Reactor (dielectric discharge barrier - DBD) (Figure 1), with two solid stainless steel electrodes measuring 64 mm (bottom) and 50 mm (top) in diameter and two polyacetal shelves. Reactor connected to a high voltage pulsed electrical discharge source (model Pulse 0130, Inergiae) developed in the work of Muller et al. (2022), with a maximum output voltage of 30 kV, frequency of 1.0 kHz and power of 100W, which is equivalent to 500 pulses per second. The CP application conditions were previously selected, based on visual analysis, in which different frequency and voltage combinations were tested, and the selected condition was the one that obtained a uniform and intense CP. Ten grams of maize kernels were placed in a 9 mm diameter glass Petri dish and sent to the plasma reactor. The upper electrode was covered with a low-density polyethylene (LDPE) film (0.100 mm thick), acting together with the Petri dish as a dielectric barrier during the CP application. The selected parameters were: frequency of 130 Hz, voltage of 30 kV, energy of 100 ± 5 mJ, interval of 0.8 cm (distance between electrodes), atmospheric pressure, air as ionizing gas,

and different treatment times (0, 2, 5, 7, 10, 15, and 20 minutes). The experiments were performed in triplicate samples and duplicate experiments.

**Figure 1** – Plasma reactor (DBD), with two electrodes, connected to a pulsed high voltage electrical discharge source.



**Total fungi count:** portions (Treated Groups and Control Group ~ 10 g) of each sample were transferred to polyethylene bags and added with peptone water (0.1%), followed by homogenization in a stomacher (dilution: 10<sup>-1</sup>) and preparation of dilutions following. From each diluted sample, 100 µL was inoculated onto the surface of Potato Dextrose Agar medium containing chloramphenicol (100 mg/L) in a laminar flow hood (n=3). The plates were incubated at 25±1 °C for 7 days (Silva et al. 2013; Apha, 2015). Plates containing 15 to 150 colony-forming units (CFU) were counted, and the results were expressed in CFU/g of maize.

**Isolation and identification:** the characteristic colonies were isolated by subculture in triplicate and subsequently submitted to identification at the genus level using the microculture technique, where a portion of each colony (showing different morphology) was harvested and inoculated in medium (n=2) and incubated at 23±2 °C for 5 days, followed by identification by optical microscope (morphological characteristics, including reproductive structures). From the observation of the macro and microscopic characteristics, the identification of fungal genera was carried out according to the identification keys (Weber & Pitt, 2000; Samson et al. 2006).

**Germination capacity:** 25 grains (n=4) (Control and treated sample) were distributed between two sheets of paper substrate suitable for germination, according to the requirements of the Ministry of Agriculture, Livestock, and Supply (Brazil, 2009) with adaptations. The paper substrate was weighed, and the volume of water was calculated (2.0-3.0 times the weight of

the substrate) and incubated at 25±5 °C for up to 8 days. The counting of the total number of seedlings in each gerbox, adopting the visible protrusion of the radicle as a germination criterion, was evaluated every 2 days. With the data obtained were calculated Germination index (GI) (Equation 1), Germination speed index (GSI) (Equation 2), Germination mean time (GMT) (Equation 3), Germination mean speed (GMV) (Equation 4) and Radicle mean growth (RG) (Equation 5) (Maguire, 1962; Carvalho & Carvalho; 2009).

$$GI = \left(\frac{N}{A}\right) \times 100 \quad (\text{Equation 1})$$

$$GSI = \left(\frac{N1}{D1} + \frac{N2}{D2} + \dots + \frac{Nn}{Dn}\right) \quad (\text{Equation 2})$$

$$GMT = \left(\frac{\sum ni}{\sum ti}\right) \quad (\text{Equation 3})$$

$$GMV = \frac{1}{t} \quad (\text{Equation 4})$$

$$RG = \left(\frac{M}{N}\right) \quad (\text{Equation 5})$$

Where:  $N$  = number of germinated seeds;  $A$  = number of seeds in the sample ( $A = 25$ ),  $D$  = number of days after sowing in which the count was performed;  $D = 2$  to 8 days,  $ni$  = number of germinated seeds per day;  $ti$  = incubation time;  $i = 2$  to 8 days,  $t$  = germination mean time,  $M$  = radicle mean size.

Unit: %, dimensionless, days, days<sup>-1</sup>, cm, respectively.

*Stereo Microscope (SE)*: variations in the grains external morphological structures (pericarp) were observed through micrographs with a EM (Opticam OPZTS [increase of X0.67 – 9.49X]).

*Scanning Electron Microscope (SEM)*: SEM according to the method of Kluczkovski & Scussel (2015) with adaptations. The maize was fixed with pieces of full carbon double-sided adhesive tape on stubs, with the plasma contact surface facing upwards, and coated with a layer (40 nm) of gold (Au) with the aid of a vacuum on a planetary basis, the micrographs were performed using a SEM (JEOL JSM-6390LV [increase of 1.000X]) located at the Central Electron Microscope Laboratory (LCME) of Federal University of Santa Catarina.

*Statistical analysis*: All data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Tukey as post-test in Statistica Release 7 software. P-values <0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

### CP antifungal effect

The results (Table 1) of the treatments with CP showed antifungal effectiveness in the exposure times of 5 to 20 min, with a greater logarithmic reduction during 15 and 20 min (reduction of 0.9 to 1.4) for 11.42 and 12.72% moisture, and 5 to 20 min (reduction of 0.9 to 1.1) for 17.96% moisture. In the times of 10 to 20 min, no statistical differences ( $p < 0.05$ ) were observed between treatments at different moisture.

**Table 1** – Total fungus count after maize (*Zea mays* L.) kernels treatments (moisture - 11.42; 12.72 and 17.96%) by cold plasma (frequency - 130 Hz, voltage - 30 kV and power - 100 ± 5 mJ) at times of 0, 2, 5, 7, 10, 15, and 20 minutes plated immediately after treatment.

Treatment (min)	Total count (log UFC.g <sup>-1</sup> )		
	11.42%	12.72%	17.96%
0	4.00±0.41 <sup>aB</sup>	4.39±0.63 <sup>aA</sup>	4.35±0.36 <sup>aAB</sup>
2	3.61±0.54 <sup>abB</sup>	4.43±0.36 <sup>aA</sup>	3.94±0.61 <sup>aB</sup>
5	3.30±0.22 <sup>bcB</sup>	3.82±0.69 <sup>ba</sup>	3.39±0.29 <sup>bb</sup>
7	3.36±0.51 <sup>bcB</sup>	4.01±0.45 <sup>abA</sup>	3.28±0.47 <sup>bb</sup>
10	3.25±0.55 <sup>bcA</sup>	3.68±0.72 <sup>ba</sup>	3.24±0.46 <sup>ba</sup>
15	3.09±0.69 <sup>ca</sup>	2.95±0.48 <sup>ca</sup>	3.24±0.49 <sup>ba</sup>
20	3.06±0.42 <sup>ca</sup>	2.93±0.53 <sup>ca</sup>	3.41±0.81 <sup>ba</sup>

\*Means and standard deviations followed by the same lowercase letter vertically do not differ significantly at 5% probability for the different times of CP application by Tuckey's test. \*\* Means and standard deviation followed by the same horizontal capital letter do not differ significantly at 5% probability for different a<sub>w</sub> by Tuckey's test.

As seen in Table 1, treatment of just 5 min would be enough for some fungal reduction, however, more satisfactory results are achieved with increasing the time of exposure to CP, as observed in other studies on foods that are exposed to longer periods of CP treatment showing greater significant reduction or total inhibition of microorganisms (Suhem et al. 2013; Selcuk et al. 2008). Increased microbial reduction with an increase in CP treatment time could be a result of its reaction with reactive species like atomic oxygen, singlet oxygen, and hydroxyl radicals (Brandenburg et al. 2007).

Runtzel et al. (2019) analyzed the fungal inactivation efficacy of CP treatment on naturally contaminated black beans (previous natural contamination of 1.1x10<sup>3</sup> CFU/g), class Negra. The beans were exposed to CP (voltage of 8 kV and power of 510 W) at different times (5, 10, 20 and 30 min). The treatment, under the CP Type (Tip Plane) and conditions

applied showed to be effective on fungal inactivation (100% reduction) throughout all the exposure times (10-30 min).

Silva et al. (2020) subjected naturally contaminated maize kernels to CP (dielectric barrier plasma jet) treatment for 5, 10, 20, and 30 minutes comparing different powers (240 and 360 W and voltage of 8 kV) to investigate the effectiveness of their decontaminating power. Even with long treatment times, the authors achieved only 33% fungal reduction at 360 W power for 30 min.

Zahoranova et al. (2018) investigated the effectiveness of ambient air plasma treatment with cold atmospheric pressure generated by Diffuse Coplanar Surface Barrier Discharge (DCSBD) in terms of pathogens such as *Aspergillus flavus* ( $1.6 \times 10^4$  CFU/g), *Aspergillus alternata* ( $1.7 \times 10^3$  CFU/g) and *Fusarium culmorum* ( $6.0 \times 10^3$  CFU/g) on the surface of maize kernels. The plasma treatment of seeds was realized at an input power of 400 W up to 300 s. The plasma treatment efficiency was estimated as a reduction of 3.79 log (CFU/g) in *F. culmorum* after a 60 s, 4.21 log (CFU/g) in *A. flavus*, and 3.22 log (CFU/g) in *A. alternata* after a 300 s.

Soušková et al. (2011) studied the fungicidal effect of stabilized positive flashing corona discharge and its influence on the growth dynamics of three species of micromycete species in aqueous suspension. The conidia of fungal species *Aspergillus oryzae*, *Cladosporium sphaerospermum*, and *Penicillium crustosum* were studied, and exposed to CP for up to 30 min. The *A. oryzae* spores reduction was from  $10^5$  to  $10^2$  CFU/mL. In the case of *C. sphaerospermum*, the total inactivation took approximately 20 min. *P. crustosum* was completely inactivated after 30 minutes of exposure.

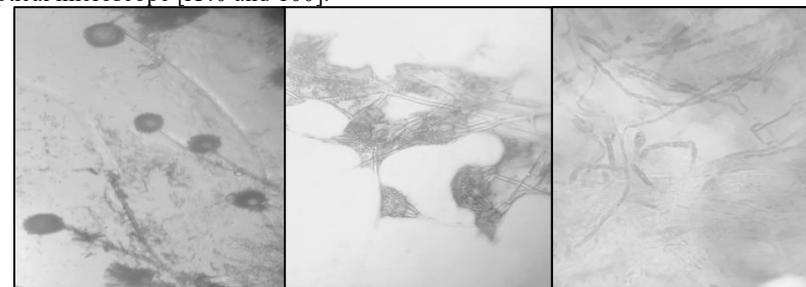
In general, several studies have shown a partial or total reduction of the microorganisms load by the CP. Operating conditions and CP type are different in each study, and what influences the result of inactivation, such as the application parameters, the reactor geometry, the initial fungal load (especially if the infection attacks the surface or inside the maize kernel), and/or the presence of different species/genera (Grzegorzewski et al. 2011; Suhem et al. 2013; Chaiwat et al. 2016). Also, the direct application of CP (used in this work) provides a greater range of relative species interaction with the microorganisms when compared to the indirect one (Hertwig et al. 2015). It is worth mentioning that the sensitivity to plasma treatment is different, and each pathogen type requires an exposure time for complete inhibition. The surface topology, roughness and cracks on the seed surface can harbor fungal spores and protect them against plasma treatment and the presence of at least one viable fungal spore in the maize kernel can result in the emergence of a fungal infection (Zahoranova et al. (2018).

The plasma treatment is effective right after harvesting when the maize still has a high moisture content, such as after the grain has dried. For Thirumdas, Sarangapani and Annapure (2015), the efficiency of microbial inactivation by plasma is closely linked to the presence of water, making it easier to eliminate wet microorganisms than dry microorganisms. The main reactive species formed by cold atmospheric plasma are: electronically and vibrationally excited oxygen and nitrogen; active forms of oxygen such as

atomic oxygen, singlet oxygen, superoxide anion and ozone; reactive nitrogen species such as atomic nitrogen and nitric oxide; and when moisture is present, species such as  $H_2O^+$ ,  $OH^-$ ,  $OH$  radical and  $H_2O_2$  can also be formed (Scholtz et al. 2015).

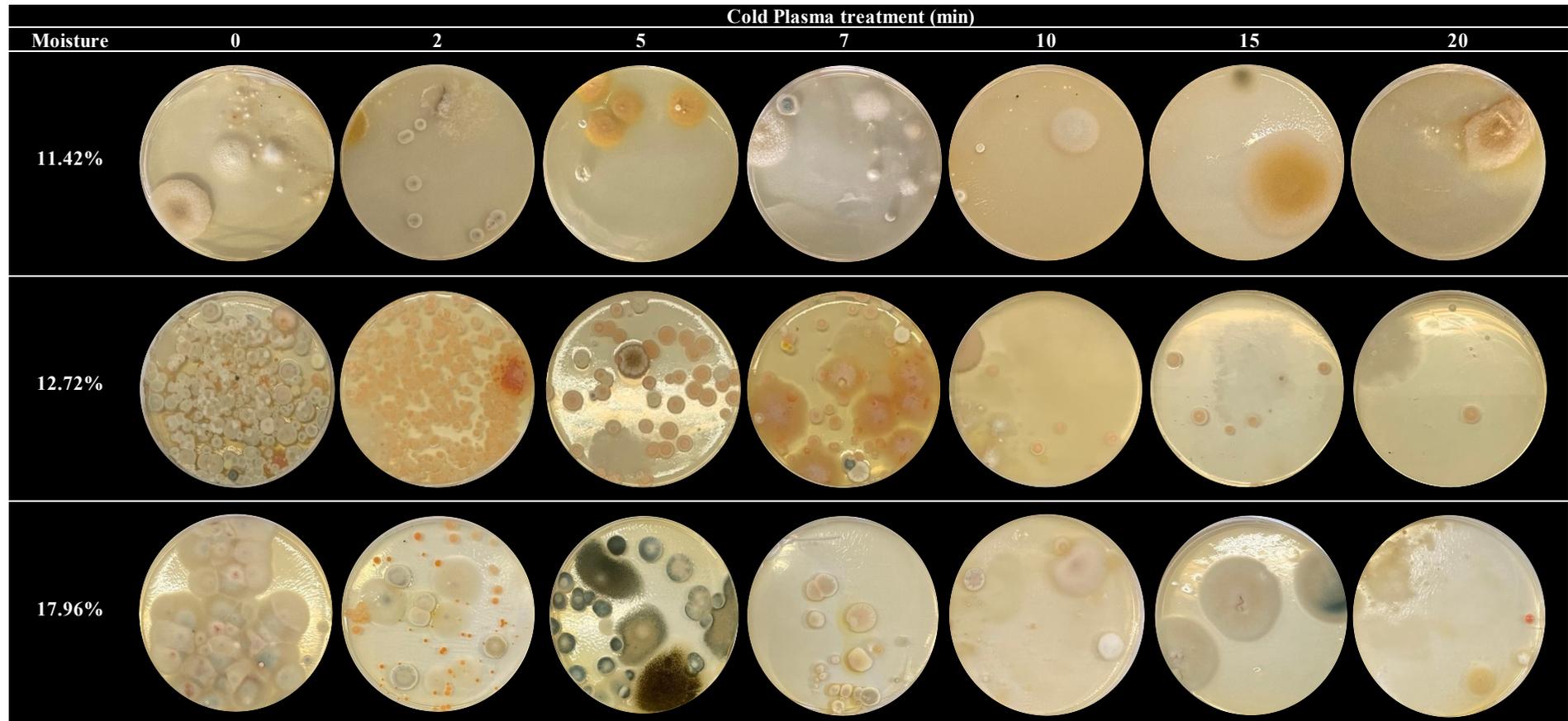
In the isolated fungal genera (Figure 2), the field fungi *Fusarium* (in greater quantities) and the storage fungi *Aspergillus* and *Penicillium* were identified. No changes were observed in the type of microbiota after treatment, only fungal reduction. Zahoranová et al. (2018) report that the total percentage of mycobiota on the naturally contaminated maize surface is *Aspergillus* spp. (55%), *Fusarium* and *Penicillium* spp. (15%), *Cladosporium* spp. (10%) and *Verticillium* spp. (5%).

**Figure 2:** Fungal genera isolated from maize (*Zea mays* L.) kernels naturally contaminated in Control and Cold Plasma Treated samples: *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* by optical microscope [X40 and 100].



In Figure 3, we can observe that as the treatment time increases, the amount of UFC decreases, when compared to the control, in both moisture levels at the  $10^{-1}$  dilution. Furthermore, it is also visible that the genera *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* present in the Control samples remained in the samples even after treatment, but in fewer colonies.

**Figure 3:** Visible fungal reduction through total fungal count in maize (*Zea mays* L.) kernels at different moisture (11.42; 12.72 and 17.96%) at  $10^{-1}$  dilution after exposure to Cold Plasma treatment (frequency - 130 H) during times of 0 , 2, 5, 7, 10, 15 and 20 minutes.



### Effect of CP on Microstructural characteristics of the grain surface

The microstructural characteristics of the maize grains surface after CP application were recorded through SM and SEM, Figures 4 and 5, respectively.

Changes in the maize grains peel could be seen (Figure 4) in all moisture conditions in which they were submitted before CP treatment. The peel developed a wrinkled texture compared to the control, which was smooth, from 5 min (moisture: 17.96 and 12.72) and 7 min of exposure (moisture: 11.42) to the treatment.

Similar changes were reported by Runtzel et al. (2019) in black beans subjected to CP treatment for up to 30 min and by Dhayal et al. (2006) in safflower seeds.

In SEM images (Figure 6), the surface characteristics of the untreated grains showed differences when compared to the different moisture, showing that wrinkling decreases as the water available in the matrix increases.

As the time of exposure to the treatment increased (2-20 min), the peel showed greater wrinkling when compared to the control at the 3 moisture levels tested. Similar findings were reported by Stolárik et al. (2015) who used diffuse coplanar barrier discharge (DCSBD) plasma reactor in pea seeds for 1 to 10 min and Runtzel et al. (2019) in black beans exposed for up to 30 min exposed in reactor Tip plane type. Zahoranová et al. (2018) on the other hand, observed that DCSBD plasma treatment does not cause any significant damage to the maize surface, degradation, erosion or scratching, even after longer exposure times of 5 min.

As shown by SM (Figure 4), erosions were observed only in the moisture treatments 12.7 and 18.0% exposed to 7 min to CP. In the case of the present study, the fact that erosions/burns occurred only under the conditions mentioned may be related to the plasma's preference for the highest points of the sample. As the grains do not follow a standard size and/or height, a possible explanation for this occurrence is the formation of electrical arcs that resulted in damage to the grain surface of the. Sarangapani et al. (2016), observed that after exposure of low-pressure plasma treatment, for 5 and 10 min, at powers of 30 and 40 W, SEM revealed cracks and depressions on the surface of basmati rice. Ukuku et al. (2019) also observed changes in apples treated with a combination of antimicrobial and plasma jet. The researchers reported that CP altered the surface structures of the apple, but not the structure of the bacterial cell. Similar differences, such as erosions and ruptures in the epidermal tissue, were also reported by Grzegorzewski et al. (2011) on lettuce leaves using CP

The differences in results can be explained due to factors that affect the penetration of plasma into the food matrix, such as the constitution of the reactor and plasma intensity, composition, available free water, porosity, distance between the plasma source and the surface of the food and reactive species (Misra et al. 2016).

### Germination capacity

For the germination capacity tests, the germination was only in the grains with moisture of 12.72%. Water is one of the factors that most influence the seed germination process (Rego et al. 2011). The low availability of water causes a reduction in growth, caused by the decrease in cell expansion and elongation due to the decrease in turgor (Yasseen & Alomary, 1994).

On the other hand, Borges and Rena (1993) state that excess moisture generally causes a decrease in germination since it prevents oxygen penetration and reduces the entire resulting metabolic process. In addition to water availability, dormant seeds present difficulties in germinating even when exposed to favorable environmental conditions (Costa et al, 2010). These facts corroborate the findings. For maize with moisture of 11.42%, the water added (2.0-3.0 times the weight of the substrate) for the germination test was not enough for its germination. As for maize with a moisture of 17.96%, in addition to its already high moisture content, the addition of more water for the test affected its germination, causing, in addition to not germinating, fungal colonies to proliferate and cause grain decay.

The effect of CP treatment on maize kernel germination varied with treatment time as shown in Table 2. According to the data obtained, the treatments of 2 to 10 min per CP did not cause significant effects ( $p < 0.05$ ) in the percentage of germination, while for the times of 15 and 20 min, there was a reduction of 65.98 and 75.25%, respectively, with germination percentage being negatively influenced ( $p < 0.05$ ). Similar results were found for GSI, GMT and GMS. The decrease in the germination rate possibly occurred due to possible damage to the germinal structures in a long period of exposure to CP (Runtzel et al. 2019). The food characteristics changes after CP exposure can be explained by the reactive species action on tissues causing expansion apart from the breaking down of cell membranes (Pasquali et al. 2016).

**Table 2** – Percentage, speed index, time, and mean speed of germination of maize (*Zea mays* L.) grains at 12.72% moisture treated with Cold Plasma (frequency - 130 Hz, voltage - 30 kV and energy -  $100 \pm 5$  mJ) at times of 0, 2, 5, 7, 10, 15 and 20 minutes.

Treatment (min)	GP <sup>a</sup> (%)	GSI <sup>b</sup>	GMT <sup>c</sup> (days)	GMS <sup>d</sup> (days <sup>-1</sup> )
0	97.00 <sup>a</sup>	89.66 <sup>a</sup>	2.31 <sup>a</sup>	0.43 <sup>a</sup>
2	95.00 <sup>a</sup>	87.00 <sup>a</sup>	2.32 <sup>a</sup>	0.43 <sup>a</sup>
5	96.00 <sup>a</sup>	62.58 <sup>b</sup>	3.56 <sup>a</sup>	0.28 <sup>ab</sup>
7	96.50 <sup>a</sup>	71.66 <sup>b</sup>	3.05 <sup>a</sup>	0.33 <sup>ab</sup>
10	98.00 <sup>a</sup>	62.91 <sup>b</sup>	3.58 <sup>a</sup>	0.28 <sup>ab</sup>
15	33.00 <sup>b</sup>	10.47 <sup>c</sup>	6.38 <sup>b</sup>	0.16 <sup>b</sup>

20                      24.50<sup>c</sup>                      6.12<sup>c</sup>                      8.00<sup>b</sup>                      0.12<sup>b</sup>

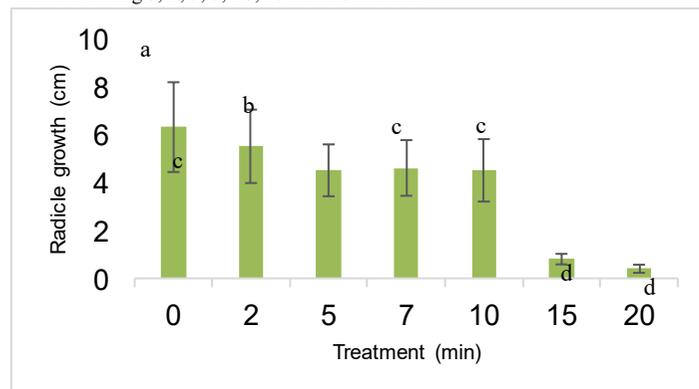
<sup>a</sup>Germination index; <sup>b</sup>Germination speed index; <sup>c</sup>Germination mean time; <sup>d</sup>Germination mean speed;  
<sup>\*</sup>Means and standard deviations followed by the same lowercase letter vertically do not differ significantly at 5% probability for the different times of CP application by Tuckey's test.

According to the findings of Runtzel et al. (2019), after treatment with CP (voltage of 8 kV and power of 510 W) at times of 5 and 10 min, the black bean maintained its germinative power, but when exposed to longer times (20 and 30 min) it did not develop the radicle, having its germination inhibited, a similar result to the found.

Several authors found that CP stimulated the germination process, such as Mitra et al. (2014) in chickpeas (up to 5 min of exposure to CP), where the total percentage of seed germination increased to CP treatment times up to 3 min compared to with control. Ling et al. (2014) in soybean seeds (15 s of exposure to CP) at 0, 60, 80, 100, and 120 W. The results showed that CP treatments positively affected seed germination and seedling growth, whereas the 80 W treatment had the greatest stimulatory effect. Zahoranová et al. (2018) did not observe any significant change in the germination of maize kernels after treatment with CP (power of 400 W) for 1 and 2 min when compared to the Control, but when subjected to an exposure of 4 and 5 min, the germination rate dropped to 83 and 7%, respectively. Šerá et al. (2009), in which the germination speed of buckwheat was delayed with increasing treatment time, resulting in a decrease in germination in times greater than 1 min, and Mravlje et al. (2021), who also had wheat germination rate affected by longer exposures (shorter exposures (up to 45 s) were safely applied).

Plasma treatment of maize grains affected seedling growth, as we can see in Figure 7, all treatments differed statistically ( $p < 0.05$ ) from the control, with lower radicle growth. This result may have been generated due to the delay in the germination speed of post-treatment grains.

**Figure 7** – Mean and standard deviation (cm) of radicle growth of maize (*Zea mays* L.) grains treated with Cold Plasma during 0, 2, 5, 7, 10, 15 and 20 minutes



<sup>\*</sup>Means and standard deviation followed by the same lowercase letter do not differ significantly at 5% probability for the different times of CP application by Tuckey's test.

Zahoranová et al. (2018) obtained satisfactory results with maize for treatment with CP, where 60 s of exposure stimulated root growth by 12% and shoot length by 35% compared to the control, but when the treatment exposure time was increased, there was inhibition of all growth parameters. Runtzel et al. (2019) had a 33% increase (16 mm) in the length of the structures that give rise to stems and leaves in black beans during a 5 min exposure when compared to the control (12 mm). On the other hand, its radicle growth was visually inferior when exposed for 10 min (8 mm).

Some experiments on CP treatment of maize seeds indicate that shorter treatments (40–80 s) have a positive effect on germination (Henselová et al. 2012), while other authors did not find significant changes in maize germination in shorter treatments (60–120 s) (Zahoranová et al. 2018). On the other hand, it is accepted that longer exposure to CP causes a significant decrease in germination and subsequent inhibition of growth parameters in CP systems (Volin et al. 2000; Henselová et al. 2012; Filatova et al. 2013; Zahoranová et al. 2016; Zahoranová et al. 2018). All these studies confirm that the effectiveness of plasma treatment for seed germination may vary with the type and condition of the seeds and environmental factors such as climate, soil conditions, and water availability (Randeniya, 2015).

## CONCLUSION

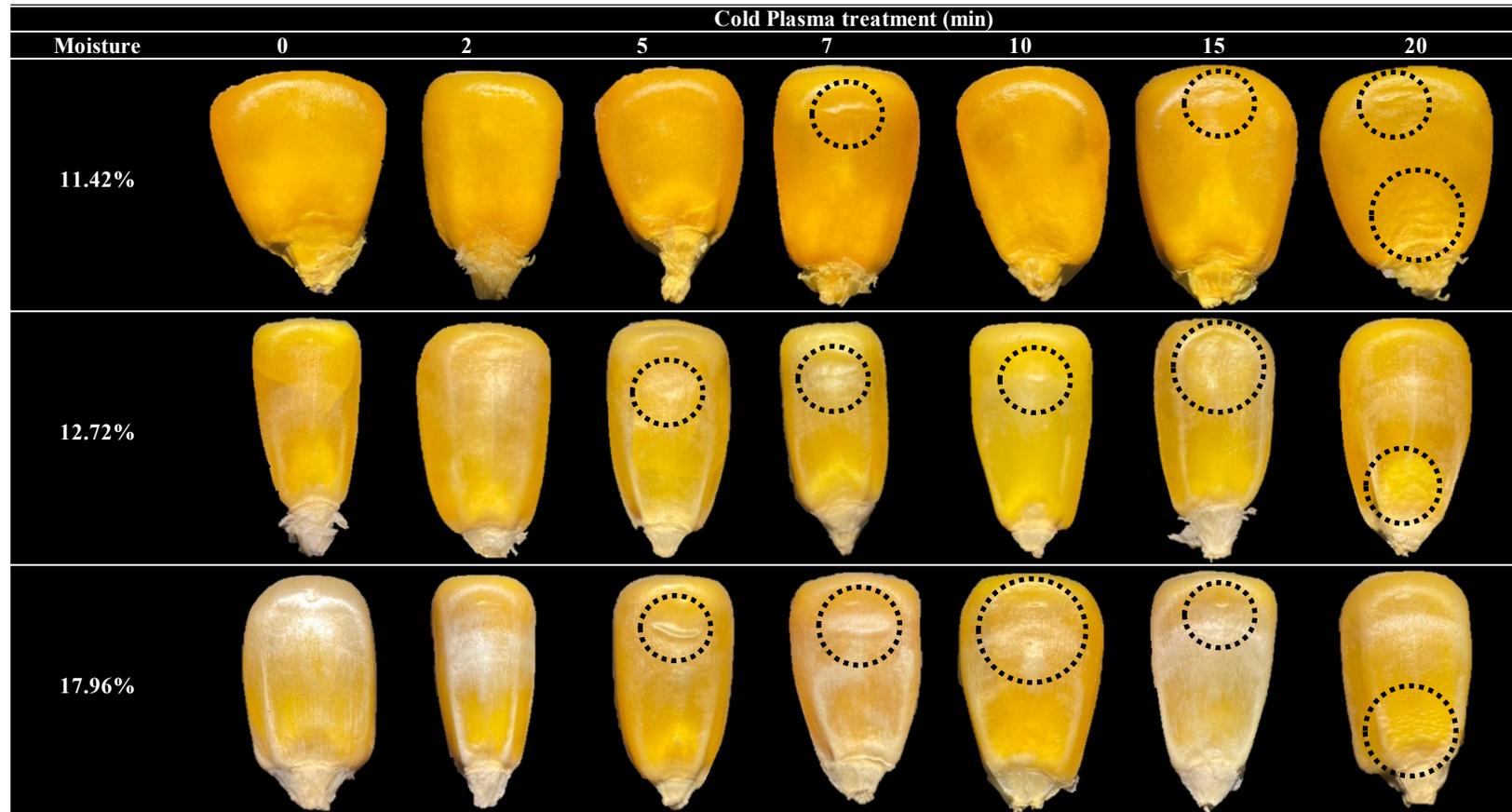
In this study, cold plasma treatment on maize grains, considered one of the main agricultural crops, was verified as a mild alternative method, which showed promise in fungal decontamination. The treatments showed antifungal efficacy in all moistures from 5 min of treatment, concluding that the treatment is effective right after harvesting, as well as after drying the grain.

Concerning the stability of the microstructures, it was observed that the treatment caused wrinkling of the surface of the peel at all exposure times. This wrinkling increased as the exposure time increased.

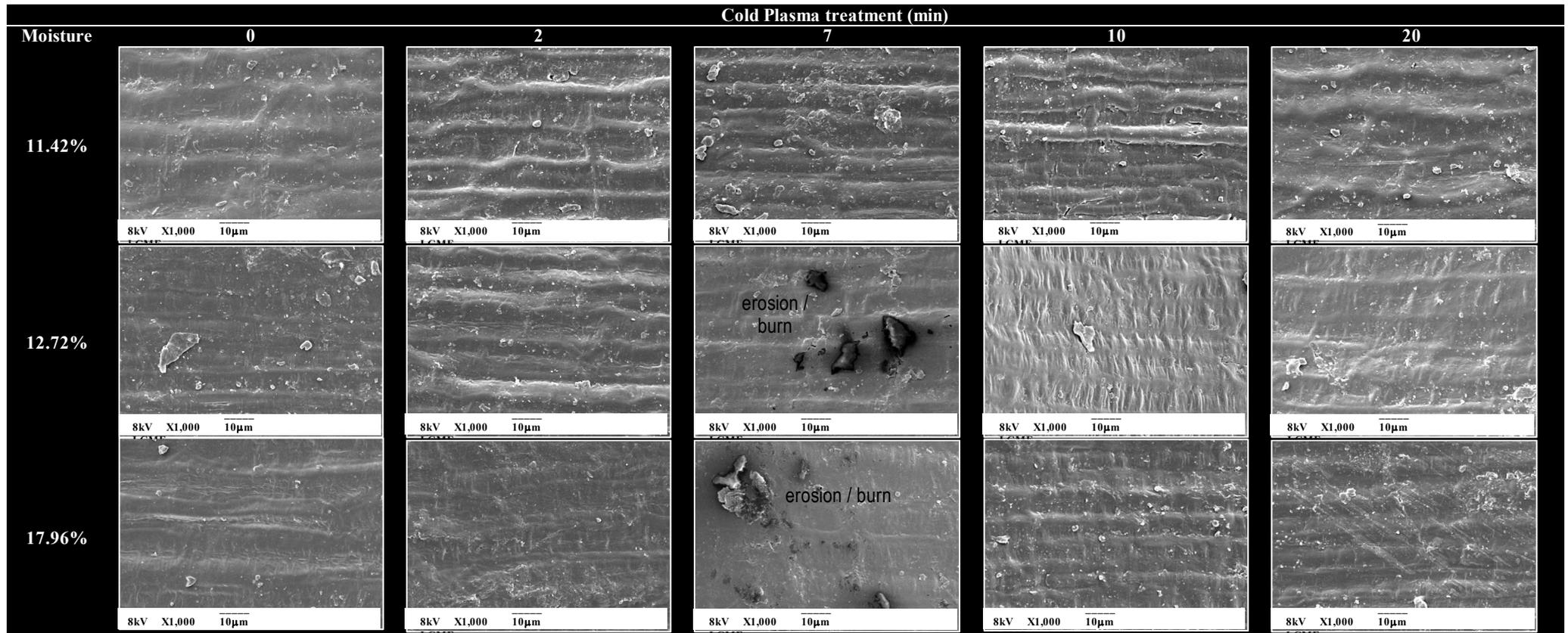
For the germination capacity tests, there was seed germination only in grain treatments with 12.72% moisture. Treatments from 2 to 10 min by cold plasma did not cause significant effects on germination capacity and root growth, while for times of 15 and 20 min, there was a reduction.

Therefore, the results indicate that cold plasma treatment on maize grains may be a new alternative to decontaminating fungal grains. However, the technology needs to be optimized for commercial use.

**Figure 4:** Stereo Microscope [X0.67] of the maize (*Zea mays* L.) grains surface, moisture (11.42; 12.72 and 17.96%), after exposure to Cold Plasma treatment (frequency - 130 Hz) during times of 0, 2, 5, 7, 10, 15 and 20 minutes.



**Figure 6:** Scanning Electron Microscope [X1,000] of the surface of maize (*Zea mays* L.) grains at different moisture (11.42; 12.72 and 17.96%), after exposure to Cold Plasma treatment (frequency - 130 H) during times of 0, 2, 7, 10 and 20 min



## ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank the CAPES (Higher Education Personnel Improvement Coordination) for providing to Silva, B.A. a scholar grant and the Central Electron Microscope Laboratory (LCME) of Federal University of Santa Catarina for charring the equipment and technical support.

## REFERENCES

- Afshari, R., & Hosseini, H. (2014). Non-thermal plasma as a new food preservation method, its present and future prospect. *Archives of Advances in Biosciences*, 5(1).
- Alves, H. C. R.; Amaral, R. F. (2011). Produção, área colhida e produtividade do milho no Nordeste. *Banco do Nordeste*. Fortaleza: Informe Rural Etene.
- Amini, M., & Ghoranneviss, M. (2016). Effects of cold plasma treatment on antioxidants activity, phenolic contents and shelf life of fresh and dried walnut (*Juglans regia* L.) cultivars during storage. *Lwt*, 73, 178-184.
- Apha, American Public Health Association (2015). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 5<sup>th</sup> ed. Ed: Salfinger e Tortorello.
- Artuzo, F. D., Foguesatto, C. R., Machado, J. A. D., de Oliveira, L., & de Souza, Â. R. L. (2019). O potencial produtivo brasileiro: uma análise histórica da produção de milho. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, 12(2), 515-540.
- Borges, E. D. L., Rena, A. B. (1993). Germinação de sementes. *Sementes florestais tropicais*. Brasília: ABRATES, 83-136.
- Brandenburg, R., Ehlbeck, J., Stieber, M., v. Woedtke, T., Zeymer, J., Schlüter, O., & Weltmann, K. D. (2007). Antimicrobial treatment of heat sensitive materials by means of atmospheric pressure RF-driven plasma jet. *Contributions to Plasma Physics*, 47(1-2), 72-79.
- Brazil (2009). Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Secretary of Agricultural Defense. *Rules for seed analysis*.
- Brazil (2011). Normative Instruction No. 29, of June 8, 2011. Provides for mandatory technical requirements for grain storage. Brasília, DF: *Official Gazette of the Union*.
- Carvalho, D. B. D., Carvalho, R. I. N. D. (2009). Qualidade fisiológica de sementes de guanxuma sob influência do envelhecimento acelerado e da luz. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 31, 489-494.
- Chaiwat, W., Wongsagonsup, R., Tangpanichyanon, N., Jariyaporn, T., Deeyai, P., Suphantharika, M., Dangtip, S. (2016). Argon plasma treatment of tapioca starch using a semi-continuous downer reactor. *Food and Bioprocess Technology*, 9, 1125-1134.
- Conab (2018). National Supply Company. Historical series. 2018. Available at: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras>>. Access in: May, 2018.
- Costa, P. A., da Silva Lima, A. L., Zanella, F., de Freitas, H. (2010). Quebra de dormência em sementes de *Adenanthera pavonina* L. *Pesquisa agropecuária tropical*, 40(1), 83-88.
- Devi, Y., Thirumdas, R., Sarangapani, C., Deshmukh, R. R., Annature, U. S. (2017). Influence of cold plasma on fungal growth and aflatoxins production on groundnuts. *Food Control*, 77, 187-191.
- Dhayal, M., Lee, S. Y., Park, S. U. (2006). Using low-pressure plasma for *Carthamus tinctorius* L. seed surface modification. *Vacuum*, 80(5), 499-506.
- Eman, 2010. - European Mycotoxin Awareness Network. Decontamination of mycotoxin contaminated raw materials. Available in: <<http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=64>>. Access: March, 2023.
- Feizollahi, E., Misra, N. N., Roopesh, M. S. (2021). Factors influencing the antimicrobial efficacy of dielectric barrier discharge (DBD) atmospheric cold plasma (ACP) in food processing applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(4), 666-689.
- Filatova, I., Azharonok, V., Kadyrov, M., Beljavsky, V., Gvozdo, A., Shik, A., Antonuk, A. (2011). The effect of plasma treatment of seeds of some grain and legumes on their sowing quality and productivity. *Rom. J. Phys*, 56, 139-143.
- Filatova, I.; Azharonok, V.; Lushkevich, V.; Zhukovsky, A.; Gadzhieva, G.; Spasi, K. Plasma Seeds Treatment as a Promising Technique for Seed Germination Improvement. 31st ICPIG. 2013, pp. 4-7. Available in: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Plasma-seeds-treatment-as-a-promising-technique-for-Filatova-Azharonok/5e455f0a890d8e65a4936292d55173fddddd6c95>>. Access: May, 2023.
- Fisher, M. C., Alastruey-Izquierdo, A., Berman, J., Bicanic, T., Bignell, E. M., Bowyer, P., Verweij, P. E. (2022). Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. *Nature reviews microbiology*, 20(9), 557-571.
- Grzegorzewski, F., Ehlbeck, J., Schlüter, O., Kroh, L. W., Rohn, S. (2011). Treating lamb's lettuce with a cold plasma—Influence of atmospheric pressure Ar plasma immanent species on the phenolic profile of *Valerianella locusta*. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10), 2285-2289.
- Halloin, J. M. (1983). Deterioration resistance mechanisms in seeds. *Phytopathology*, 73(2), 335-339.
- Heinlin, J., Isbary, G., Stolz, W., Morfill, G., Landthaler, M., Shimizu, T., & Karrer, S. (2011). Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25(1), 1-11.
- Henselová, M., Slovácová, L., Martinka, M., Zahoranová, A. (2012). Growth, anatomy and enzyme activity changes in maize roots induced by treatment of seeds with low-temperature plasma. *Biologia*, 67, 490-497.
- Hertwig, C., Leslie, A., Meneses, N., Reineke, K., Rauh, C., Schlüter, O. (2017). Inactivation of *Salmonella* Enteritidis PT30 on the surface of unpeeled almonds by cold plasma. *Innovative food science & emerging technologies*, 44, 242-248.
- Kluczkovski, A. M., Scussel, V. M. (Eds.). (2015). *Gerenciamento de risco da castanha-do-Brasil*. Nova Letra Gráfica e Editora.
- Konopka, J. B., Casadevall, A., Taylor, J. W., Heitman, J., Cowen, L. (2019). One health: fungal pathogens of humans, animals, and plants. Available in: <<https://asm.org/Reports/One-Health-Fungal-Pathogens-of-Humans-Animals--an>>. Access: May, 2023.
- Laroque, D. A., Seo, S. T., Valencia, G. A., Laurindo, J. B., Carciofi, B. A. M. (2022). Cold plasma in food processing: Design, mechanisms, and application. *Journal of Food Engineering*, 312, 110748.
- Laroussi, M. (2009). Low-temperature plasmas for medicine?. *IEEE Transactions on plasma science*, 37(6), 714-725.
- Liao, X., Liu, D., Xiang, Q., Ahn, J., Chen, S., Ye, X., Ding, T. (2017). Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. *Food control*, 75, 83-91.
- Ling, L., Jiafeng, J., Jiangang, L., Minchong, S., Xin, H., Hanliang, S., Yuanhua, D. (2014). Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean. *Scientific reports*, 4(1), 5859.
- Maguire, J. D. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.*, 2, 176-177.
- Misra, N. N., Pankaj, S. K., Segat, A., Ishikawa, K. (2016). Cold plasma interactions with enzymes in foods and model systems. *Trends in Food Science & Technology*, 55, 39-47.
- Mitra, A., Li, Y. F., Klämpfl, T. G., Shimizu, T., Jeon, J., Morfill, G. E., Zimmermann, J. L. (2014). Inactivation of surface-borne microorganisms and increased germination of seed specimen by cold atmospheric plasma. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 645-653.
- Mrvljje, J., Regvar, M., Starič, P., Mozetič, M., Vogel-Mikuš, K. (2021). Cold plasma affects germination and fungal community structure of buckwheat seeds. *Plants*, 10(5), 851.
- Müller, L., Zanghelini, G., Laroque, D. A., Laurindo, J. B., Valencia, G. A., da Costa, C., & Carciofi, B. A. (2022). Cold atmospheric plasma for producing antibacterial bilayer films of LLDPE/cassava starch added with ZnO-nanoparticles. *Food Packaging and Shelf Life*, 34, 100988.
- Nwabor, O. F., Onyeaka, H., Miri, T., Obileke, K., Anumudu, C., & Hart, A. (2022). A cold plasma technology for ensuring the microbiological safety and quality of foods. *Food Engineering Reviews*, 14(4), 535-554.
- Pankaj, S. K., Wan, Z., Colonna, W., & Keener, K. M. (2017). Effect of high voltage atmospheric cold plasma on white grape juice quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(12), 4016-4021.
- Pasquali, F., Stratakos, A. C., Koidis, A., Berardinelli, A., Cevoli, C., Ragni, L., ... & Trevisani, M. (2016). Atmospheric cold plasma process for vegetable leaf decontamination: A feasibility study on radicchio (*red chicory*, *Cichorium intybus* L.). *Food control*, 60, 552-559.
- Prestes, I. D., Rocha, L. O., Nuñez, K. V., Silva, N. C. (2019). Principais fungos e micotoxinas em grãos de milho e suas consequências. *Scientia Agropecuaria*, 10(4), 559-570.

- Randeniya, L. K., Groot, G. J. (2015). Non-thermal plasma treatment of agricultural seeds for stimulation of germination, removal of surface contamination and other benefits: a review. *Plasma Processes and Polymers*, 12(7), 608-623.
- Rego, S. S., Ferreira, M. M., Nogueira, A. C., Grossi, F., de Sousa, R. K., Brondani, G. E., Nogueira, A. C. (2011). Estresse hídrico e salino na germinação de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 2(4), 37-42.
- Rüntzel, C. L., da Silva, J. R., da Silva, B. A., Moecke, E. S., Scussel, V. M. (2019). Effect of cold plasma on black beans (*Phaseolus vulgaris* L.), fungi inactivation and micro-structures stability. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 864-873.
- Samson, RA, Visagie, CM, Houburken, J, Hong, SB, Hubka, V, Klaassen, CH, Varga, J (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 78, 141-173.
- Sarangapani, C., Thirumdas, R., Devi, Y., Trimukhe, A., Deshmukh, R. R., Annapure, U. S. (2016). Effect of low-pressure plasma on physico-chemical and functional properties of parboiled rice flour. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 482-489.
- Savi, GD, Piacentini, KC, Tibola, CS, Scussel, VM (2014). Mycoflora and deoxynivalenol in whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) from southern Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 7(3), 232-237.
- Scholtz, V., Pazlarova, J., Souskova, H., Khun, J., & Julak, J. (2015). Nonthermal plasma—A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnology advances*, 33(6), 1108-1119.
- Scussel, VM; Savi, GD; Kluczkovski, AM (2018). Fungi and Mycotoxins associated with stored grains. *Armazenagem de grãos*, Cap. V, 735-758.
- Selcuk, M., Oksuz, L., Basaran, P. (2008). Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. *Bioresource technology*, 99(11), 5104-5109.
- Šerá, B., Šerý, M., Štraňák, V., Špatenka, P. (2009). Does cold plasma affect breaking dormancy and seed germination? A study on seeds of Lamb's Quarters (*Chenopodium album* agg.). *Plasma science and technology*, 11(6), 750.
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G. P. S., Handa, N., Thukral, A. K. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 1, 1-16.
- Sladek, R. E. J., & Stoffels, E. (2005). Deactivation of *Escherichia coli* by the plasma needle. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 38(11), 1716.
- Shelar, A., Singh, A. V., Dietrich, P., Maharjan, R. S., Thissen, A., Didwal, P. N., ... & Patil, R. (2022). Emerging cold plasma treatment and machine learning prospects for seed priming: a step towards sustainable food production. *RSC advances*, 12(17), 10467-10488.
- Silva, B., Silva, J., Moecke, E., Scussel, V. (2020). Effect of Cold Plasma treatment on fungi inactivation and germination of maize grains (*Zea mays* L.). *IOSR-JAVS*, 13(7), 28-32.
- Silva, N; Taniwaki, MH; Junqueira, VCA; Silveira, NFA; Nascimento, MS; Gomes, RAR (2013). *Microbiological Methods of Analysis in Food and Water: Laboratory Manual*. Institute of Food Technology - ITAL, Campinas, SP, Brazil. CRC Press / Balkema, Taylor & Francis Group, London, United Kingdom, 484p.
- Soušková, H., Scholtz, V., Julák, J., Kommová, L., Savická, D., Pazlarová, J. (2011). The survival of micromycetes and yeasts under the low-temperature plasma generated in electrical discharge. *Folia Microbiologica*, 56, 77-79.
- Sruthi, N. U., Josna, K., Pandiselvam, R., Kothakota, A., Gavahian, M., Khaneghah, A. M. (2022). Impacts of cold plasma treatment on physicochemical, functional, bioactive, textural, and sensory attributes of food: A comprehensive review. *Food chemistry*, 368, 130809.
- Stolárik, T., Henselová, M., Martinka, M., Novák, O., Zahoranová, A., Černák, M. (2015). Effect of low-temperature plasma on the structure of seeds, growth and metabolism of endogenous phytohormones in pea (*Pisum sativum* L.). *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 35, 659-676.
- Suhem, K., Matan, N., Nisoa, M., Matan, N. (2013). Inhibition of *Aspergillus flavus* on agar media and brown rice cereal bars using cold atmospheric plasma treatment. *International journal of food microbiology*, 161(2), 107-111.
- Ukuku, D. O., Niemira, B. A., Ukanalis, J. (2019). Nisin-based antimicrobial combination with cold plasma treatment inactivate *Listeria monocytogenes* on Granny Smith apples. *Lwt*, 104, 120-127.
- Varga, J., Tóth, B., Téren, J. (2005). Mycotoxin producing fungi and mycotoxins in foods in Hungary in the period 1994-2002. *Acta alimentaria*, 34(3), 267-275.
- Volin, J. C., Denes, F. S., Young, R. A., Park, S. M. (2000). Modification of seed germination performance through cold plasma chemistry technology. *Crop science*, 40(6), 1706-1718.
- Weber, R. W., Pitt, D. (2000). Teaching techniques for mycology: 11. Riddell's slide cultures. *Mycologist*, 14(3), 118-120.
- Yasseen, B. T., Al-Omary, S. S. (1994). An analysis of the effects of water stress on leaf growth and yield of three barley cultivars. *Irrigation Science*, 14, 157-162.
- Yinxin, L., Can, Z., Menglu, H., Cui, S., Jinping, C., Jingyu, W., Huang, L. (2022). Effect of cold atmospheric plasma on the gray mold rot of post-harvest mulberry fruit. *Food Control*, 137, 108906.
- Yusaf, T., Al-Juboori, R. A. (2014). Alternative methods of microorganism disruption for agricultural applications. *Applied Energy*, 114, 909-923.
- Zahoranová, A., Henselová, M., Hudecová, D., Kaliňáková, B., Kováčik, D., Medvecká, V., Černák, M. (2016). Effect of cold atmospheric pressure plasma on the wheat seedlings vigor and on the inactivation of microorganisms on the seeds surface. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 36, 397-414.
- Zahoranová, A., Hoppanová, L., Šimončicová, J., Tučeková, Z., Medvecká, V., Hudecová, D., Černák, M. (2018). Effect of cold atmospheric pressure plasma on maize seeds: enhancement of seedlings growth and surface microorganisms inactivation. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 38, 969-988.