

MARIA LUIZA NUNES COSTA

**AVALIAÇÃO DA DETERIORAÇÃO FÚNGICA DE GRÃOS DE SOJA E  
AMENDOIM ARMAZENADOS E SEU CONTROLE COM ÓLEO ESSENCIAL  
DE MOSTARDA**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Fitopatologia, para obtenção do título  
de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C837a  
2005

Costa, Maria Luiza Nunes, 1968-

Avaliação da deterioração fúngica de grãos de soja e amendoim armazenados e seu controle com óleo essencial de mostarda / Maria Luiza Nunes Costa.

– Viçosa : UFV, 2005.

ix, 57f. : il. ; 29cm.

Orientador: Onkar Dev Dhingra.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 37.41.

1. Grãos - Armazenamento. 2. Grãos - Deterioração - Efeito de óleos essenciais. 3. Grãos - Qualidade. 4. Fungos fitopatogênicos. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 631.568

MARIA LUIZA NUNES COSTA

**AVALIAÇÃO DA DETERIORAÇÃO FÚNGICA DE GRÃOS DE SOJA E  
AMENDOIM ARMAZENADOS E SEU CONTROLE COM ÓLEO  
ESSENCIAL DE MOSTARDA**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Fitopatologia, para obtenção do  
título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 24 de maio de 2005.

---

Profa. Lêda Rita D'Antonino Faroni  
(Co-Orientador)

---

Prof. Gulab Newandram Jham  
(Co-Orientador)

---

Dra. Fátima Chieppe Parizzi

---

Prof. Leandro Grassi Freitas

---

Prof. Onkar Dev Dhingra  
Orientador

**À Aninha e ao Paulinho,**

Que tanto tempo de suas vidas dedicaram a mim,  
Que abriram mão de seus próprios desejos e sonhos,  
Para que pudesse realizar os meus.  
Que tanto acreditaram em mim,  
E apoiaram em todos os momentos.  
E que tantas lições me ajudaram a aprender,  
Em troca apenas do meu amor.  
Todo o meu aprendizado profissional e pessoal,  
Minha gratidão e o meu amor.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por permitir executar e finalizar um projeto profissional,  
À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação do  
Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de realizar o curso.  
À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela  
concessão da bolsa de pesquisa.  
Ao Prof. Dhingra, pela orientação, ensinamentos e exigências tão importantes em  
minha formação profissional e pessoal, além da sua compreensão e seu  
carinho.  
Ao Prof. Robert Barreto, pelo apoio e conselhos demonstrados em momentos  
cruciais.  
À Dra. Fátima Parizzi, pelo apoio, sugestões e carinho dedicados à finalização deste  
trabalho.  
À Ana Clara, ao Paulinho, à minha família e aos meus amigos, que me apoiaram  
incondicionalmente.  
Sem vocês não conseguiria estar aqui hoje, demonstrando toda a minha gratidão.

## **BIOGRAFIA**

MARIA LUIZA NUNES COSTA, filha de Luiz Ferreira Costa (*in memorian*) e Maria Nunes Costa, nascida na cidade de João Monlevade, no Estado de Minas Gerais, em 12 de novembro de 1968.

No ano de 1994 concluiu o curso de Engenharia Agrônômica pela Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL).

No ano de 2000 concluiu o curso de Mestrado em Fitopatologia pela Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Em abril de 2001 iniciou na Universidade Federal de Viçosa o Doutorado em Fitopatologia, submetendo-se à defesa de tese em 24 de maio de 2005.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Deterioração de grãos.....	3
2.2 Indicadores de deterioração fúngica.....	4
2.3 Alternativas de controle da colonização fúngica durante armazenamento.....	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
3.1 Obtenção e manutenção dos isolados de <i>A. glaucus</i> , <i>A. ochraceus</i> e <i>A. flavus</i> .....	7
3.2 Efeito <i>in vitro</i> do óleo essencial de mostarda na germinação de conídios de <i>Aspergillus</i> spp.....	8
3.3 Preparo, inoculação e armazenamento dos grãos.....	8
3.4 Delineamento Experimental.....	9
3.5. Análise Estatística.....	9
3.6. Avaliações Experimentais.....	9
3.6.1. Determinação do conteúdo de água dos grãos.....	9
3.6.2 Emergência de Plântulas.....	10
3.6.3 Determinação da esporulação de fungos na superfície dos grãos.....	10
3.6.4 Determinação da colonização de grãos por <i>Aspergillus</i> spp.....	10
3.6.5 Determinação da acidez total dos grãos.....	10
3.6.6 Determinação de ácidos graxos livres.....	11
3.6.7 Determinação de ergosterol.....	11
4. RESULTADOS.....	13
4.1 Conteúdo de Água.....	13
4.2 Germinação de conídios.....	13
4.3 Emergência de Plântulas.....	14
4.4 Esporulação fúngica na superfície dos grãos.....	15
4.5 Colonização interna dos grãos.....	17
4.6 Ácidos Graxos Livres.....	20
4.7 Acidez Total dos Grãos.....	23

4.8	Conteúdo de Ergosterol.....	27
5	DISCUSSÃO.....	30
6.	CONCLUSÃO.....	36
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
	ANEXO A.....	42
	ANEXO B.....	51



## RESUMO

COSTA, Maria Luiza Nunes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2005.  
**Avaliação da deterioração fúngica de grãos de soja e amendoim armazenados e seu controle com óleo essencial de mostarda** Orientador: Onkar Dev Dhingra. Conselheiros: Gulab Newandram Jham e Lêda Rita D'Antonino Faroni.

O objetivo deste trabalho foi testar metodologia para determinação do grau de deterioração fúngica nos grãos de soja e amendoim causada por invasão de espécies de *Aspergillus* durante o armazenamento, e avaliar o uso do óleo essencial de mostarda na diminuição desta deterioração, e o seu efeito na qualidade dos grãos. Os grãos de soja e amendoim foram ajustados a 4 diferentes conteúdos de água e, em seguida os grãos de soja foram inoculados com suspensão de conídios de *A. glaucus* e *A. ochraceus*, e os grãos de amendoim inoculados com suspensão de *A. glaucus* e *A. flavus*. Amostras dos grãos inoculados, em cada conteúdo de água, foram armazenados na presença e ausência de atmosfera modificada pelo óleo essencial de mostarda (OEM), à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro. As avaliações foram realizadas com os grãos de soja aos 7, 15, 45, 75 e 135 dias de armazenamento e com os grãos de amendoim aos 15, 30, 60 e 90 dias, constando de determinação de ácidos graxos livres, acidez total dos grãos, conteúdo de ergosterol, unidades formadoras de colônias (UFC's), teste de blotter e emergência de plântulas em areia. A utilização da metodologia de quantificação dos AGL dos grãos de soja e amendoim durante o armazenamento mostrou-se viável como parâmetro indicativo de deterioração fúngica dos grãos, pois os resultados obtidos foram correlacionados com os teores de ergosterol desses grãos, que por sua vez, permitiu o conhecimento da intensidade de colonização fúngica e conseqüentemente de deterioração. Principalmente nos grãos de amendoim esses resultados foram mais evidentes devido à maior colonização interna das reservas lipídicas. A acidez total dos grãos sugerida como possível indicador de deterioração fúngica, foi então correlacionada com o conteúdo de ergosterol e com o teor de ácidos graxos livres, mostrando-se viável para separar lotes de grãos de soja deteriorados. Os ácidos graxos livres, a acidez total e o conteúdo de ergosterol foram mais acentuados nos grãos com conteúdos de água mais elevados ao longo do armazenamento. A emergência de plântulas de soja foi negativamente correlacionada com o aumento do conteúdo de água dos grãos e o tempo de armazenamento. A utilização do óleo essencial de mostarda na forma de

vapor proporcionou inibição na germinação dos conídios, mas na concentração utilizada não foi eficiente para inibir a colonização nos grãos durante o armazenamento. Concentrações mais altas do óleo essencial de mostarda podem ter maior efeito na colonização, pois poderá alcançar o interior da massa dos grãos armazenados.

## ABSTRACT

COSTA, Maria Luiza Nunes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2005.  
**Fungic deterioration of peanut and soybean grains in storage and its control with essential oil of mustard.** Adviser: Onkar dev Dhingra. Co-Advisers: Gulab Newandram Jham and Lêda Rita D'Antonino Faroni.

The objective of this work was to test methodology for determination of the degree of fungic deterioration in the peanut and soybean grains caused for invasion of species of *Aspergillus* during the storage, and to evaluate the use of the essential oil of mustard in the reduction of this deterioration, and its effect in the quality of the grains. The grains of soybean and peanut had been adjusted the 4 different water contents and, after that the soybean grains had been inoculated with suspension of conidium of *Aspergillus glaucus* and *A. ochraceus*, and the grains of peanut inoculated with suspension of *A. glaucus* and *A. flavus*. Samples of the inoculated grains, in each water content, had been stored in presence and absence of atmosphere modified for the essential oil of mustard (EOM), to the  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  of temperature, in the dark. The evaluations had been carried in grains of soybean to the 7, 15, 45, 75 and 135 days of storage and with the grains of peanut to the 15, 30, 60 and 90 days, consisting of determination of free fatty acid (FFA), total acidity of the grains, content of ergosterol, colony forming units (CFU), blotter test and emergency of seedlings in sand. The use of the methodology of quantification of the FFA of the grains of soybean and peanut during the storage revealed viable as indicative parameter of fungic deterioration of the grains, therefore the gotten results had been correlated with texts of ergosterol of these grains, that in turn, consequently allowed the knowledge of the intensity of fungic settling and of deterioration. Mainly in the peanut grains these results had been evident due to bigger internal settling of the lipidic reserve. The total acidity of the grains suggested as possible pointer of fungic deterioration, then was correlated with the content of ergosterol and the text of acid greasy free, revealing viable to separate lots of spoiled grains of soybean. Acid greasy the free ones, the total acidity and the content of ergosterol more had been accented in the grains with raised water contents more to the long one of the storage. The emergency negative of seedlings of soybean was correlated with the increase of the water content of the grains and the storage time the use of the essential oil of mustard in the vapor form provided inhibition in the germination of the conidium, but in the used concentration it was not efficient to inhibit the settling in the grains

during the storage. Higher concentrations of the essential oil of mustard can have greater effect in the settling, therefore it will be able to reach the inside of the mass of the stored grains.

# **AVALIAÇÃO DA DETERIORAÇÃO FÚNGICA DE GRÃOS DE SOJA E AMENDOIM ARMazenADOS E SEU CONTROLE COM ÓLEO ESSENCIAL DE MOSTARDA**

## **1. INTRODUÇÃO**

Perdas significativas de grãos durante o armazenamento podem ocorrer devido à deterioração dos seus tecidos, pelo envelhecimento natural, pela invasão de fungos, por insetos que além de causar perda de matéria seca disseminam fungos de um grão ao outro, além de outras perdas causadas por roedores (McGee, 1983).

Os fungos invadem os grãos devido às reservas alimentares, sendo que algumas espécies permanecem durante o armazenamento causando deterioração, comprometendo sua qualidade e vigor enquanto que outras espécies de fungos apenas sobrevivem de uma geração de plantas hospedeiras à próxima sem causar danos (Harman, 1983).

Há alguns anos acreditava-se que os fungos de armazenamento que aceleram a deterioração de grãos ocorriam apenas durante o armazenamento, mas já é sabido que a infecção dos grãos por tais fungos podem ocorrer durante o processo de formação e maturação dos grãos no campo (Christensen, 1974), chegando ao armazém com a presença destes fungos. Então, é necessário conhecer o período de tempo em que o grão possa permanecer armazenado sem que existam perdas relacionadas à deterioração fúngica.

Na literatura existem diversos relatos sobre a forma de indicar perdas de grãos por deterioração fúngica tais como determinação da atividade enzimática, teor de ergosterol, atividade respiratória dos fungos, dentre outros (Magan, 1993), mas em geral elas são inviáveis de serem executadas rotineiramente, seja pelo alto custo de detecção devido aos equipamentos ou seus resultados são demorados de serem obtidos. Os métodos de análise sanitária de grãos/sementes por métodos microbiológicos são predominantemente usados para determinar a quantidade relativa de diferentes espécies de fungos em uma amostra. No entanto, tais métodos de avaliação requerem longos períodos de incubação, seguidos de observação direta

através de microscópio, que consome períodos longos de tempo, não sendo assim adequados para testes rápidos (Williams, 1989).

Juntamente com a detecção e quantificação de microorganismos que causam deterioração, a tentativa de minimizar estas perdas durante o armazenamento de grãos também é uma busca constante, e diversos métodos alternativos são pesquisados na tentativa de diminuir a utilização de produtos químicos (Ejechi *et al.*, 1999). O mais sensato é que se trabalhe para minimizar as perdas dos produtos agrícolas de forma mais coerente, visando sempre o custo benefício das práticas adotadas (Kimati, 1995).

Na tentativa de encontrar alternativas para diminuir a dependência dos agrotóxicos e praticar uma agricultura que seja mais adequada às novas exigências de qualidade ambiental e qualidade de vida, o volume de pesquisas sobre compostos de origem natural em substituição aos fungicidas tradicionais é cada vez mais crescente revelando uma vasta gama de compostos orgânicos naturais de origem vegetal com atividade fungicida e inseticida (Bending & Lincoln, 1999; Soliman & Badeaa, 2002; Morra & Kirkegaard, 2002; Burt, 2004; Lazzeri, *et al.*, 2004). Plantas da família das brássicas possuem um composto nitrogenado denominado glicosídeo, que são hidrolisados principalmente a alilo isotiocianato (A-ITC) que possui características antimicrobianas (Chen & Andreasson, 2001).

O objetivo deste trabalho foi comparar métodos para determinação do grau de deterioração fúngica da soja e do amendoim causada por espécies de *Aspergillus* durante o armazenamento e avaliar o efeito do uso do óleo essencial de mostarda (OEM) no controle desta deterioração e na qualidade dos grãos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Deterioração fúngica dos grãos**

A alteração da qualidade fisiológica dos grãos é proveniente de fatores genéticos, características físicas, fatores ambientais, grau de maturidade, deterioração no campo, injúrias mecânicas, injúrias térmicas, condições de armazenamento e condições sanitárias. O armazenamento é a etapa final da cadeia produtiva de grãos, e nessa fase eles estão mais sujeitos à deterioração, diminuindo assim sua qualidade

fisiológica e tecnológica, sendo maiores em oleaginosas que em albuminosas (Popinigis, 1975).

Dos fatores que podem afetar a qualidade fisiológica do grão, a umidade relativa e a temperatura são considerados os mais importantes ressaltando-se a interação entre eles. A velocidade dos processos degenerativos aumenta à medida que aumenta o conteúdo de água, pois favorece a elevação da temperatura dos grãos devido aos processos respiratórios, à maior suscetibilidade dos grãos a injúrias térmicas durante a secagem, à maior atividade de microorganismos, principalmente fungos e maior atividade dos insetos (Popinigis, 1975; McGee, 1983; Harman, 1983; St. Angelo & Ory, 1983). Fungos que crescem em grãos durante o transporte e armazenamento causam diminuição da germinação, descoloração do tegumento, odores indesejáveis, endurecimento, mudanças nutricionais e químicas, e formação de micotoxinas (Sauer, 1988).

O envelhecimento dos grãos envolve mudanças degradativas que levam à sua reduzida germinação, diminuição do vigor ou morte das plântulas, e essas mudanças podem ser aceleradas por microorganismos (Christensen, 1967, Koostra, 1973; Roberts, 1973). As mudanças fisiológicas ocorrem independentemente dos microorganismos, mas estes produzem enzimas pécticas, proteases, lipases e toxinas que aumentam a taxa de deterioração dos grãos (Koostra, 1973; Roberts, 1973). A respiração dos grãos e dos fungos resulta na perda de matéria seca tanto quanto na produção de calor e água, que contribui para posterior colonização mais intensa (Sauer, 1988).

Vários microorganismos podem permanecer nos grãos e, mais tarde, com a elevação da umidade iniciar seu desenvolvimento. O armazenamento dos grãos com alta umidade resulta no início da atividade fúngica que pode levar ao significativo aquecimento da massa de grãos, associada à deterioração da qualidade e à produção de micotoxinas (Magan, 1993). A respiração do fungo libera calor, dióxido de carbono e água, isto causa ao grão um aumento na temperatura e umidade, que pode fazer o fungo crescer mais rápido. O crescimento fúngico em grãos armazenados com umidade muito alta pode proporcionar uma aglomeração dos grãos durante o armazenamento (Sauer, 1988), e em casos extremos tornar-se carbonizada, sendo tais casos mais comuns com oleaginosas (Christensen *et al*, 1973).

Em grãos armazenados, espécies de *Aspergillus* são os microorganismos dominantes (Christensen & Kaufman, 1965). *Aspergillus halophilicus* cresce em teores de umidade considerados baixos para outros fungos, mas com o aumento da umidade, *A. restrictus*, o grupo *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. ochraceus*, *Penicillium* spp. e *A. flavus* poderão colonizar os grãos armazenados (Harman, 1983).

Os fungos respondem a pequenas diferenças na umidade e temperatura dos grãos com as quais freqüentemente proporcionam grandes diferenças no crescimento. Se a umidade aumenta o fungo cresce mais rápido e causa maiores danos. Cada espécie de fungo de armazenamento requer um conteúdo mínimo de água para crescimento. Nos grãos de cereais com um conteúdo de água de 14-15% (base úmida - b.u.), *A. glaucus* e *A. restrictus* podem crescer lentamente e ainda eventualmente produzir crescimento fúngico visível a olho nu e descoloração do germe. Alguns fungos de armazenamento são mais destrutivos ao grão que *A. glaucus*, mas ele compete com outras espécies que têm menor requerimento de conteúdo de água (Sauer, 1988). Quando o conteúdo de água dos grãos de cereais é 15-16%, b.u., ou mais, *A. ochraceus* e *A. candidus* podem crescer, sendo que *A. candidus* está freqüentemente envolvido no aquecimento dos grãos.

Espécies individuais de fungos de armazenamento têm diferentes requerimentos ou tolerâncias para temperatura (Sauer, 1988). Portanto, ocorrência de uma espécie de *Aspergillus* em grãos depende da umidade nela presente. A uma baixa umidade o grão é fracamente colonizado, mas a um teor de umidade de 13% ou mais em cereais ele seria colonizado e danificado dentro de poucas semanas (Christensen & Kaufman, 1965). A mudança no valor nutricional e os outros parâmetros de qualidade são difíceis prever porque eles dependem de uma interação complexa entre temperatura, umidade, tempo de armazenamento, espécies fúngicas, tipo de grão e o histórico do armazenamento.

## **2.2 Indicadores de deterioração fúngica**

As análises de contaminação fúngica em grãos rotineiramente utilizadas são dependentes de avaliações microbiológicas que demandam tempo para obtenção de resultados. Porém, formas de verificação e quantificação de deterioração fúngica, baseadas em metabólitos produzidos por fungos ou pelo próprio grão indicando a presença do fungo e o seu desenvolvimento, vem sendo pesquisadas visando obter



uma metodologia mais apropriada. No entanto, a maior parte dos trabalhos encontrados referem-se a cereais, e no Brasil as oleaginosas são culturas de importância relevante.

Dentre os métodos mais comuns de analisar crescimento fúngico, a determinação de ergosterol, um esterol de membrana específico de fungo, tem sido mais amplamente utilizado (Naewbanij, 1984; Dhingra, *et al.* 1998; Bailly *et al.* 1999; Olsson, 2000). Ergosterol (ergosta-5-7,22-trienol), um esterol predominante dos fungos pertencentes às classes dos Ascomycetos e Deuteromicetos, é um indicador sensível da biomassa fúngica (Mille-Lindblom *et al.*, 2004). Segundo Seitz *et al.* (1977), a quantificação de ergosterol em grãos armazenados pode ser realizada por cromatografia líquida de alto desempenho (CLAD).

Alta correlação positiva entre acumulação de ergosterol e aumento do conteúdo de AGL foi observada em grãos de soja armazenados, colonizados por *Aspergillus ruber* (grupo *A. glaucus*), comprovando que o aumento de ácidos graxos dos grãos de soja podem ser usados como um sensível indicador de crescimento fúngico (Dhingra *et al.*, 1998). Também Lisker *et al.* (1985) demonstraram que durante o armazenamento o aumento de ácidos graxos livres ocorreu devido ao crescimento de fungos presentes nos grãos interna e externamente.

Os ácidos graxos são produtos da quebra dos lipídeos, constituinte básico de oleaginosas e servem de fonte de energia utilizada durante a germinação dos grãos, sendo a enzima lipase a responsável por este processo (St. Angelo & Ory, 1983; Magan, 1985; Magan, 1993). Estas reações podem ser catalizadas pelo próprio sistema endógeno de enzimas dos grãos ou por enzimas dos microorganismos (St. Angelo & Ory, 1983; Jain *et al.*, 1991), pois, a degradação fúngica dos lipídeos é também caracterizada pelo aumento dos ácidos graxos, dependendo das espécies de fungos invasores (Magan, 1993). Ainda em 1938, Zeleny & Coleman, visando desenvolver um teste e avaliar qualidade de grão, relacionaram o aumento dos valores de ácidos graxos com crescente deterioração e aquecimento dos grãos. E mais recentemente Rehman & Shah, (1999) relataram que a acidez total aumentava em grãos de trigo ao longo do armazenamento a 25 e 45 °C, e que esse aumento provavelmente ocorreu devido ao aumento dos AGL e fosfatos provenientes do processo de deterioração dos grãos, atribuída pelos autores à presença de fungos de armazenamento.

### 2.3. Alternativas de controle da colonização fúngica durante armazenamento

Uma vez estabelecido que os fungos são também responsáveis pela deterioração de grãos durante o armazenamento, considerável interesse foi desenvolvido nos últimos anos na preservação de grãos pelo uso de óleos essenciais na tentativa de retardar seu crescimento e manter a qualidade de grãos por tempo prolongado. Soliman & Badeaa (2002), Pandey *et al.* 1982, Gocho 1991, Kienholz (1959), Maruzzella *et al.* (1959), dentre outros, obtiveram resultados tratando os grãos com óleos essenciais de canela, hortelã, manjerição e tomilho para proteger grãos contra infecção por *A. flavus*, sem afetar sua germinação e crescimento. Também canela em pó foi utilizada como aditivo em alguns grãos comestíveis tais como amendoim e milho de pipoca. Soliman & Badeaa (2002), obtiveram bons resultados utilizando anis e hortelã como protetores contra fungos podendo assim serem usados como substituto para fungicidas químicos por serem naturais e não tóxicos a humanos.

A atividade antimicrobiana do vapor de óleos essenciais também foi relatada por vários pesquisadores (Kienholz, 1959; Maruzzella *et al.*, 1959; Pandey *et al.*,1982; Gocho 1991). De acordo com Inouye *et al.* (1989), alguns óleos essenciais inibiram *in vitro* a esporulação de fungos pelo contato com os vapores emanados, mas não pelo contato com o óleo essencial. Assim, sugeriram que a atividade do vapor emanado pelo óleo essencial não pode ser avaliado automaticamente pelos dados obtidos com o uso do óleo essencial em solução, mas sim através da avaliação do efeito inibidor do vapor direto de óleos essenciais contra organismos testados, por exemplo, *Trichophyton mentagrophytes*, *A. fumigatus*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) (Inouye *et al.* 2003).

Das brássicas pode ser extraído o óleo essencial que possui efeito antimicrobiano, tornando sua utilização mais prática. Esse óleo essencial contém um composto formado pela degradação de glicosinolados presentes nos tecidos das brássicas. Os glicosinolados são compostos sulfúricos formados por um grupo tioglicose, uma cadeia de carbono variável (grupo R) e um oxime sulfonado, e são denominados de acordo com a estrutura do seu grupo-R. Esses compostos são hidrolisados pela enzima mirosinase presente nos tecidos das plantas, a vários compostos, principalmente alilo isotiocianato (A-ITC), mas também outros isotiocianatos, nitrilas, epinitrilas e tiocianatos formados possuem atividade

antimicrobiana. Entre estes compostos o A-ITC é o mais ativo (Duncan, 1991) e é sintetizado comercialmente para substituir o óleo essencial natural para uso na indústria alimentícia como aromatizante. A-ITC é um composto volátil e é fungitóxico como o metil isotiocianato, um ingrediente ativo de fumigantes comerciais de solo (Lewis & Papavizas, 1971). Estudos têm demonstrado que eles podem ser usados no controle de microorganismos fitopatogênicos (Ellenby, 1951; Lewis & Papavizas, 1971; Heaney & Fenwick, 1987; Macleod & Macleod, 1990; Gamliel & Stapleton, 1993; Kirkegaard, *et al*, 1996; Mayton *et al.*, 1996; Bending & Lincoln, 1999; Olivier *et al.*, 1999; Morra & Kirkegaard, 2002; Ambrósio *et al*, 2004; Lazzeri, *et al*, 2004). Na indústria alimentícia a conservação de pães em embalagens com atmosfera modificada utilizando óleos essenciais de mostarda, orégano, cravo, canela e alho foram utilizados visando inibição do crescimento dos fungos. O óleo de mostarda mostrou maior efeito inibitório no crescimento de *Penicillium commune*, *P. roqueforti*, *Aspergillus flavus* e *Endomyces fibuliger* em embalagens de pão de arroz e pão de cachorro-quente (Nielsen & Rios, 2000).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os estudos foram realizados no laboratório da Clínica de Doenças de Plantas do Departamento de Fitopatologia e no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais do Departamento de Química, ambos na Universidade Federal de Viçosa, no período de janeiro de 2003 a fevereiro de 2005.

#### **3.1. Obtenção e manutenção dos isolados de *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus flavus***

Os isolados de *A. glaucus* e *A. ochraceus* foram obtidos dos grãos de soja, e o de *A. flavus* dos grãos de amendoim submetidos ao teste de blotter. Para obtenção de culturas puras, os fungos foram cultivados em meio de batata, dextrose, ágar (BDA), acrescido de 7% de NaCl (Dhingra & Sinclair, 1995). Após obtidas as culturas puras, os fungos foram multiplicados em arroz autoclavado para a produção massal de conídios e então armazenados em geladeira até o momento da inoculação dos grãos.

### **3.2. Efeito *in vitro* do óleo essencial de mostarda na germinação de conídios de *Aspergillus* spp.**

O efeito do óleo de mostarda (85%) na germinação de conídios foi avaliado utilizando-se o vapor emanado pelo óleo ou misturado ao meio de cultura. Utilizaram-se placas de Petri com meio ágar-água contendo óleo essencial em concentração de 10, 20, 30, 40 ou 50 µL/L. O meio sem a mistura de óleo essencial serviu de testemunha. Foram distribuídas suspensões de conídios ( $6,5 \times 10^6$ /mL) de *A. flavus*, *A. glaucus* e *A. ochraceus* na superfície do meio, em placas distintas. Para avaliar o vapor emanado pelo óleo, o mesmo foi colocado em recipientes de vidro abertos dentro de caixas seladas com filme plástico, nas mesmas concentrações do teste anterior, onde foram colocadas as placas contendo ágar-água e suspensão dos conídios. Após 24 e 48 h de incubação na temperatura de 25 °C, avaliou-se a porcentagem de germinação de conídios em microscópio ótico, com aumento de 400 X. O conídio foi considerado germinado quando o tubo germinativo atingiu o tamanho igual ou superior ao seu diâmetro.

### **3.3. Preparo, inoculação e armazenamento dos grãos.**

A soja utilizada neste ensaio foi obtida de plantio experimental da Universidade Federal de Viçosa, safra 2002/2003, e dividida em 4 lotes de 14 kg. Cada lote foi ajustado ao conteúdo de água de 11,5; 13,0; 15,0; e 17,0%, de acordo com Dhingra *et al.* (1998).

O amendoim foi obtido de plantio comercial no município de Paula Cândido/MG, safra 2003/2004, e dividido em 4 lotes de 6 kg. Cada lote foi ajustado ao conteúdo de água de 7,5; 8,2; 9,3; e 10,5%, de acordo com Dhingra *et al.* (1998).

Os grãos de soja foram inoculados com suspensão de conídios ( $1,87 \times 10^5$ /mL) de *A. glaucus* e *A. ochraceus*. A inoculação foi feita através de pulverização da suspensão nos grãos em um tambor rotatório para distribuição homogênea do inóculo. Os grãos de amendoim foram inoculados com suspensão de conídios ( $1,87 \times 10^5$ /mL) de *A. glaucus* e *A. flavus*, utilizando-se o mesmo procedimento descrito para a soja.

Amostras contendo aproximadamente 225 g de grãos inoculados, em cada conteúdo de água, foram distribuídas em frascos de vidro com capacidade de 585

mL. Para avaliar o efeito do vapor do óleo essencial de mostarda (OEM) na deterioração dos grãos, um disco de papel absorvente embebido com o produto foi inserido em cada frasco para fornecer concentração de 100 µL/L de espaço. Os frascos, com e sem o OEM, foram vedados com filme de PVC e armazenados à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro.

Os parâmetros de deterioração e de colonização por fungos em soja foram avaliados logo após a inoculação, aos 7, 15, 45, 75 e 135 dias de armazenamento, e em amendoim logo após a inoculação, aos 15, 30, 60 e 90 dias. Nas avaliações em cada período de tempo de armazenamento foram utilizados frascos individuais.

### **3.4. Delineamento Experimental**

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $2 \times 4 \times 6$  para a soja (4 conteúdos de água, 6 períodos de armazenamento, presença e ausência de OEM), e  $2 \times 4 \times 5$  para o amendoim (4 conteúdos de água, 5 períodos de armazenamento, presença e ausência de OEM). Foram utilizadas três repetições para a emergência de plântulas, UFC's, colonização fúngica dos grãos, ácidos graxos livres, acidez total titulável e ergosterol de soja e amendoim, onde cada frasco constituiu uma parcela experimental, para cada conteúdo de água e períodos de armazenamento.

### **3.5. Análise Estatística**

Os dados foram analisados, sem transformação, pelo programa SAS<sup>®</sup>. O desdobramento das interações significativas e as equações de regressão foram obtidos pela análise de regressão dos dados através do programa SAEG.

### **3.6. Avaliações Experimentais**

#### **3.6.1. Determinação do conteúdo de água dos grãos**

O conteúdo de água dos grãos foi obtido pelo método da estufa a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$ , por 24 horas, de acordo com as Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 1992).

### **3.6.2. Emergência de Plântulas**

A emergência de plântulas de soja foi determinada em bandejas com areia esterilizada, onde foram colocados 50 grãos numa profundidade de 1,0 cm (BRASIL, 1992). A irrigação foi realizada de acordo com a necessidade, sem controle da quantidade de água utilizada. O número de plântulas emergidas foi determinado 15 dias após plantio. A emergência de plântulas de amendoim não foi avaliada (RAS, Brasil).

### **3.6.3. Determinação da esporulação de fungos na superfície dos grãos**

Para avaliar a esporulação de fungos na superfície dos grãos foram retiradas três amostras de 10 grãos de cada frasco. Os grãos foram lavados sob agitação em 10 mL de água esterilizada. Da suspensão obtida foram retiradas três alíquotas de 0,2 mL e espalhadas em placas de Petri contendo meio de extrato de malte (MEA) acrescido de 7,5% de NaCl. O número de colônias formadas foi obtido após 4 a 5 dias de incubação a 25 °C, para o cálculo do número médio de unidades formadoras de colônias (UFC's) por grão (Dhingra & Sinclair, 1995).

### **3.6.4. Determinação da colonização de grãos por *Aspergillus* spp.**

A colonização interna dos grãos por *Aspergillus* spp. foi determinada pelo teste de blotter. De cada frasco foram retirados cem grãos e estes foram esterilizados superficialmente por imersão em etanol 70% por um minuto, seguido solução de NaClO (1% cloro ativo) por um minuto e lavados em água estéril. Em seguida foram colocados em blotter umedecido com solução salina (7,5% de NaCl), em caixas plásticas tipo "gerbox" esterilizadas. Os grãos foram incubados a  $25 \pm 2$  °C e depois de 5 a 7 dias os fungos observados nos grãos foram enumerados e identificados de acordo com Dhingra & Sinclair (1995).

### **3.6.5. Determinação da acidez total dos grãos.**

A acidez total titulável dos grãos foi determinada pelo uso de protocolo modificado de Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1994). Os grãos

secos foram moídos e peneirados em peneira de granulometria de 14 mesh, e 10 g da farinha foram suspensos em 120 mL de etanol/água (1:1). A suspensão foi agitada por 15 minutos, filtrada em papel de filtro para obter o filtrado limpo. O filtrado foi titulado com NaOH 0,09N, até o ponto final rosado, pela utilização de 20 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína 0,1% como indicador. A avaliação foi realizada em duas repetições por frasco. Os resultados foram expressos em mg de NaOH/g de grãos.

### **3.6.6. Determinação de ácidos graxos livres**

O percentual de ácidos graxos livres (AGL) no óleo extraído dos grãos foi determinado de acordo com o protocolo da AOAC (1998). O óleo dos grãos foi extraído com hexano segundo procedimento padrão e 2,0 g do óleo foram dissolvidos em 25 mL de álcool etílico. A solução foi titulada com NaOH 0,09N, até o ponto-final amarronzado, utilizando-se 20 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína 0,1% como indicador.

O teor de AGL foi expresso em porcentagem de ácido oléico calculado pela fórmula  $AGL = (A-B) \times N \times 28,2/m$  (onde A é o volume em mL de NaOH 0,09 N gasto para a amostra; B, o volume em mL de NaOH 0,09 N gasto para o 'branco'; m é a massa da amostra em g).

### **3.6.7. Determinação de ergosterol**

O ergosterol foi extraído dos grãos armazenados de acordo com a metodologia modificada de Seitz *et al.* (1977), utilizando-se 25 g de grãos moídos. O extrato final contendo ergosterol foi dissolvido em 2 mL de metanol/água (95:5 v/v). Injetou-se 1 µL do extrato em cromatógrafo e o conteúdo de ergosterol foi determinado.

O aparelho usado foi um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo 17 A, com injetor automático, coluna capilar com fase estacionária DB-1, 30 cm de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e um detector de ionização de chamas (FID), acoplado a um computador para integração. As condições do aparelho foram: temperatura do injetor, 260 °C; temperatura do detector, 280 °C, gás de arraste utilizado foi o N<sub>2</sub>. A injeção da amostra foi efetuada no modo splitless, com pressão

da coluna de 126 KPa, com fluxo de 1,2 mL/min., detectando o ergosterol com o tempo de retenção ( $t_r$ ) de 23,669 min..

Na curva-padrão foram injetadas 7,09; 8,26; e 12,35 ng/ $\mu$ L do ergosterol, correspondentes às razões de split de 140, 120 e 80, respectivamente. O ergosterol foi identificado nas amostras através de comparação do tempo de retenção ( $t_r$ ) com a do padrão. A quantificação foi feita através de curva de calibração (Figura 1B, Anexo B) utilizando o método de padrão externo. O teor de ergosterol foi expresso em ng/g de grãos. Foram feitas duas injeções de cada amostra.

O teor de ergosterol dos fungos *A. ochraceus*, *A. flavus* e *A. glaucus*, utilizados na inoculação do amendoim e da soja, foi determinado da mesma forma que o ergosterol dos grãos colonizados. Os fungos foram cultivados em meio líquido Czapek-Dox (Dhingra & Sinclair, 1995) por sete dias e o ergosterol foi extraído do micélio de acordo Seitz *et al.* (1977). O micélio produzido foi utilizado para estimar o peso da matéria seca e para extração de ergosterol.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Conteúdo de água

O conteúdo de água dos grãos de soja e amendoim durante o armazenamento não sofreu alteração significativa.

### 4.2. Germinação de conídios

Os resultados obtidos na avaliação do efeito *in vitro* de OEM em meio de cultura na germinação de conídios de *Aspergillus* encontram-se descritos na Figura 1, onde foi observada a inibição na germinação dos conídios de *A. ochraceus*, *A. flavus* e *A. glaucus* após 48 h, principalmente na concentração de 50 µL/L onde houve germinação máxima de 20% dos conídios de *A. flavus*, sendo a porcentagem de germinação de *A. glaucus* e *A. ochraceus* inferiores.

Houve inibição da germinação de conídios de *Aspergillus* em atmosfera de OEM (Figura 2) a partir da concentração de 10 µL/L.

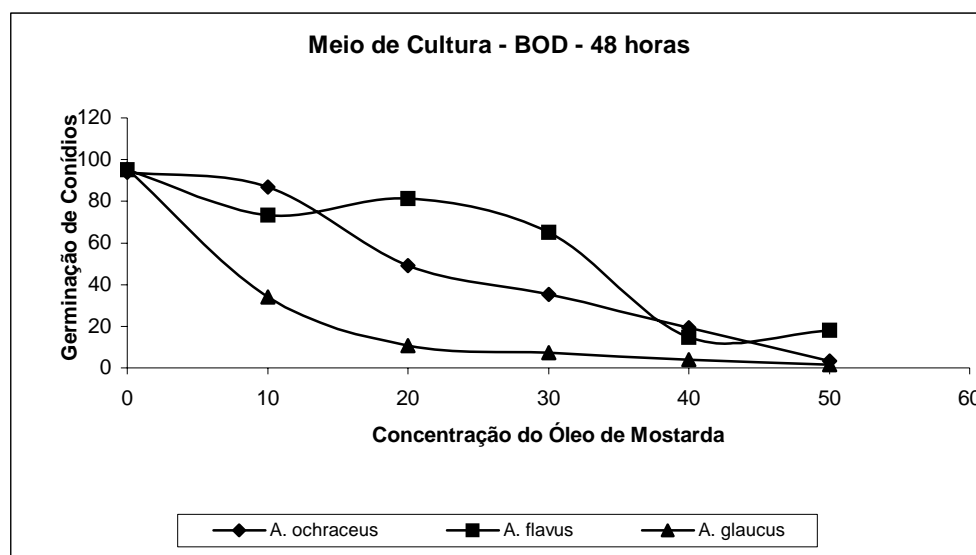


Figura 1: Germinação de conídios de *A. ochraceus* (Ao), *A. flavus* (Af) e *A. glaucus* (Ag) em ágar-água contendo OEM.

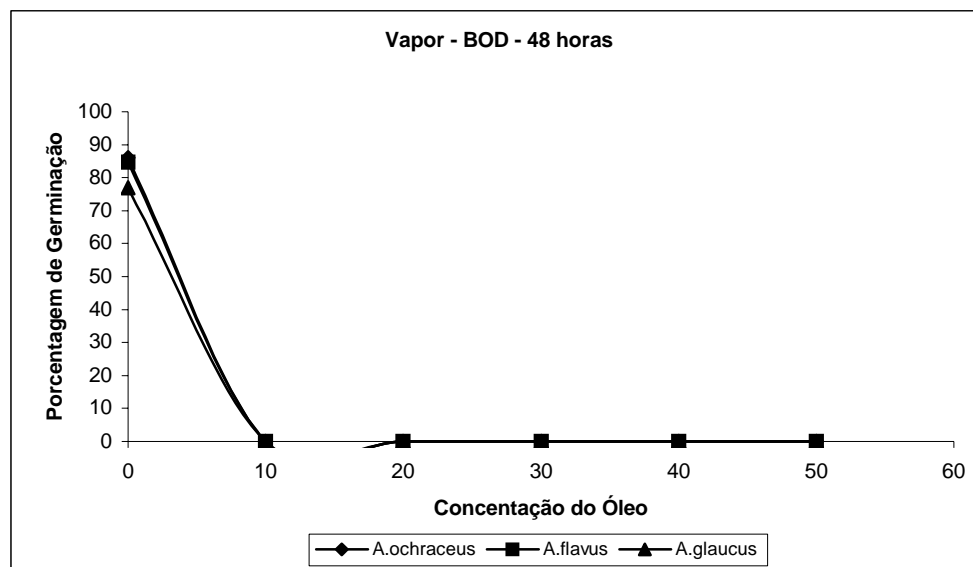


Figura 2: Germinação de esporangios de *A. ochraceus* (Ao), *A. flavus* (Af) e *A. glaucus* (Ag) em ágar-água expostos à atmosfera de OEM.

### 4.3. Emergência de plântulas

Na Figura 3 encontram-se demonstrados os resultados obtidos da avaliação da emergência de plântulas dos grãos de soja inoculados com *A. glaucus* e *A. ochraceus* e armazenados por 135 dias. A emergência das plântulas em areia declinou durante o armazenamento, apresentando uma correlação negativa ( $r = -0,67$ ) com o tempo e também com o conteúdo de água ( $r = -0,16$ ). Ressalta-se que a redução da emergência de plântulas foi mais acentuada para os grãos com maiores conteúdos de água, 15 e 17%, a partir dos 45 dias de armazenamento. Para os grãos de soja com conteúdos de água de 11,5 e 13% o declínio do percentual de emergência ocorreu a partir de 75 dias de armazenamento, independente do tratamento, ou seja, com ou sem OEM (Tabela 1A - Anexo A).

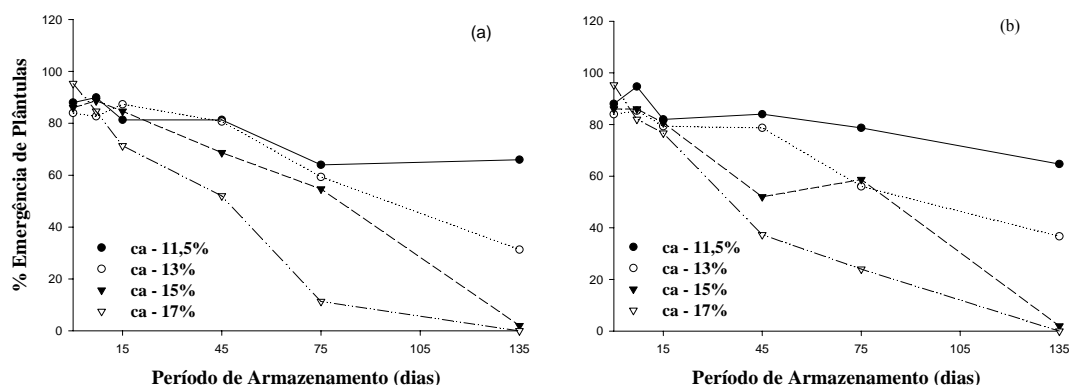


Figura 3: Porcentagem de emergência das plântulas de grãos de soja inoculados com *A. ochraceus* e *A. glaucus* armazenados em atmosfera normal (a) ou de OEM (b), em diferentes conteúdos de água (ca).

#### 4.4. Esporulação superficial de fungos

O número de UFC's dos fungos retirados da superfície dos grãos de soja e de amendoim armazenados em atmosfera normal e de OEM diferiram significativamente ( $P \leq 0,01$ ) aumentando com o armazenamento, com o conteúdo de água desses grãos e com a interação entre armazenamento e conteúdo de água (Figura 2, Tabela 2 A e 3A).

Durante o armazenamento de soja em atmosfera normal o número máximo de UFC's foi de  $3,74 \times 10^5$ /grão após 75 dias de armazenamento no maior conteúdo de água (17%) (Tabela 2A). Aos 135 dias de armazenamento somente os grãos armazenados com conteúdo de água de 15% tiveram as UFC's aumentadas, nos demais conteúdos de água ocorreu um decréscimo das UFC's (Figura 2a, Tabela 2 A).

O número de UFC's nos grãos de soja armazenados em atmosfera de OEM foi menor que nos grãos armazenados em atmosfera normal, demonstrando que o óleo foi eficiente na inibição da germinação de conídios de *Aspergillus* spp. (Tabela 2A, Figura 2b). Foram recuperadas  $9,5 \times 10^4$  UFC's/grão de soja com conteúdo de água de 15% aos 75 dias de armazenamento em atmosfera normal, enquanto que nos grãos de soja com o mesmo conteúdo de água e no mesmo período de

armazenamento, mas em atmosfera de OEM, apenas 17 UFC's/grão foram detectados.

O número de UFC's/grão de amendoim armazenado em atmosfera normal aumentou durante todo o armazenamento, independente do conteúdo de água dos grãos (Figura 2c, Tabela 3A). O número de UFC's obtidas da superfície de grãos de amendoim armazenados na atmosfera de OEM foi menor quando comparado com a UFC's de grãos de amendoim armazenados em atmosfera normal, em todos os conteúdos de água (Figura 2d, Tabela 3A). Entretanto, esta redução foi menos acentuada nos grãos com maior conteúdo de água. Apesar de haver redução das UFC's na superfície dos grãos, ela foi influenciada pelo tempo de armazenamento e pelo conteúdo de água, elevando-se a  $1,53 \times 10^4$  UFC's/grão após 90 dias de armazenamento no conteúdo de água de 17%, enquanto este número foi de  $3,75 \times 10^5$  em atmosfera normal.

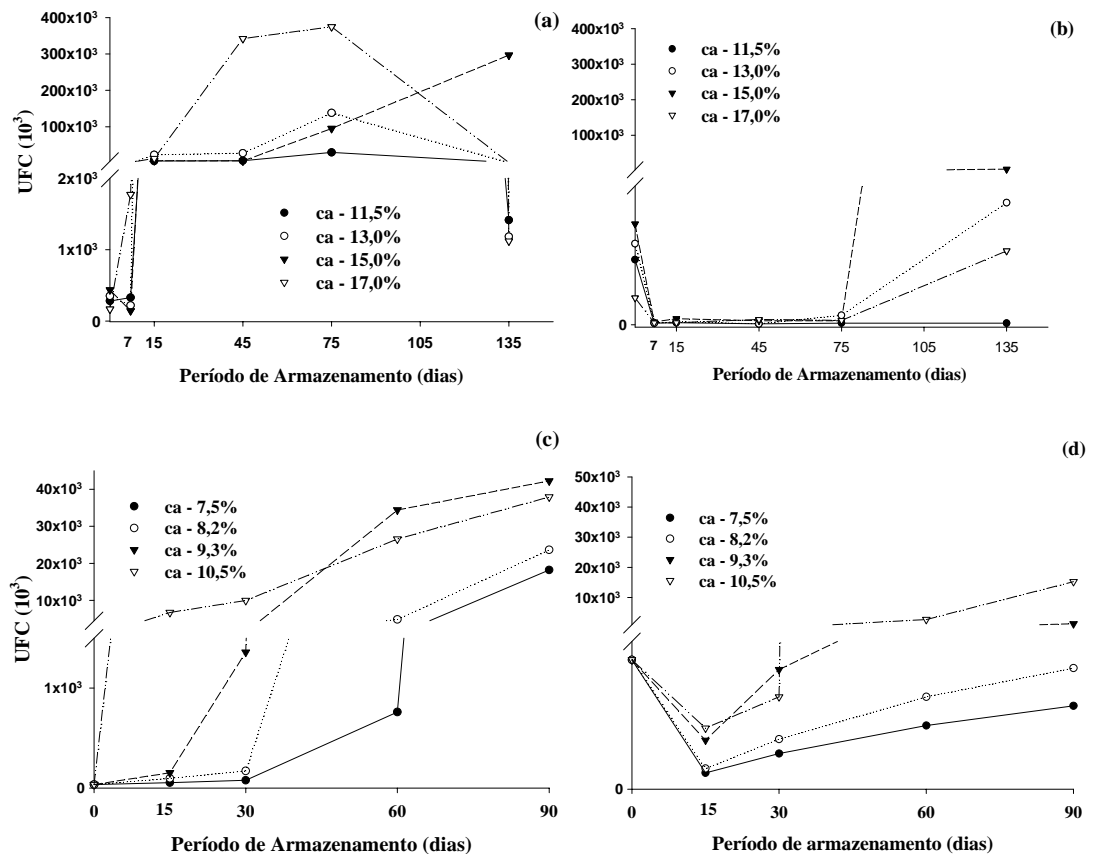


Figura 2: Unidades formadoras de colônias (UFC's) dos grãos de soja (a,b) e amendoim (c,d) inoculados e armazenados em atmosfera normal e de óleo essencial de mostarda (OEM), respectivamente, com diferentes conteúdos de água (ca).

#### 4.5. Colonização interna dos grãos

*Aspergillus ochraceus*, *A. glaucus*, *A. flavus* e *A. restrictus* foram os principais fungos presentes nos grãos de soja armazenados em atmosfera normal. A porcentagem dos grãos colonizados por *A. glaucus* e *A. restrictus* aumentou significativamente ( $P \leq 0,01$ ) ao longo do armazenamento e em cada conteúdo de água. Aos 135 dias, 87,33% dos grãos com conteúdo de água de 15% estavam colonizados com *A. glaucus* e 70% com *A. restrictus*. A colonização dos grãos por *A. ochraceus* e *A. flavus* foi inferior aos outros fungos, tendo *A. ochraceus* máxima colonização em 20% dos grãos aos 135 dias de armazenamento, nos grãos com conteúdo de água de 17%, e *A. flavus*, 22,67% aos 135 dias nos grãos com conteúdo de água de 13% (Tabela 2).

Nas observações efetuadas diretamente nos frascos com grãos de soja armazenados em atmosfera normal, e conteúdo de água de 17%, a colonização fúngica visível ocorreu inicialmente aos 30 dias sendo que aos 60 dias essa colonização se intensificou provocando formação de aglomerados de grãos. Aos 135 dias de armazenamento os grãos com conteúdo de água de 13; 15; e 17% apresentaram escurecimento do tegumento devido à colonização fúngica (Figura 3).

Em geral, a maior incidência de fungos que colonizaram os grãos de soja em atmosfera de OEM (Tabela 2) foram também *A. glaucus* e *A. restrictus*, principalmente nos grãos de soja que foram armazenados com conteúdos de água igual ou superior a 13%.

Os grãos de soja armazenados em atmosfera de OEM foram colonizados pelos mesmos fungos que os grãos armazenados em atmosfera normal, sendo que nos grãos com conteúdo de água de 11,5; 13; e 17% houve menor colonização de grãos pelos fungos *A. ochraceus*, *A. glaucus* e *A. restrictus* (Tabela 2). As observações efetuadas nos grãos armazenados em atmosfera OEM o crescimento externo dos fungos, mesmo nos grãos com pequenas trincas, foi inibido.

Tabela 2: Porcentagem de grãos de soja colonizados com *Aspergillus ochraceus* (Ao), *A. glaucus* (Ag), *A. flavus* (Af) e *A. restrictus* (Ar) durante armazenamento em diferentes conteúdos de água, em atmosfera normal e com óleo essencial de mostarda (100µl/L).

Conteúdo de Água (%)	tempo	Atmosfera normal				Atmosfera com óleo essencial de mostarda			
		Ao	Ag	Af	Ar	Ao	Ag	Af	Ar
11,5	0	1,00	1,33	1,33	0,00	1,00	1,33	1,33	0,00
	7	2,33	2,67	1,67	1,33	1,33	2,00	1,33	1,67
	15	3,00	4,00	0,67	15,33	0,00	0,00	2,00	4,33
	45	7,33	11,33	6,00	24,00	2,00	5,33	1,33	6,00
	75	9,33	18,67	1,33	38,67	1,67	7,33	3,33	8,67
	135	13,33	42,00	17,33	38,67	10,67	12,00	8,67	21,00
13,0	0	1,33	2,00	0,00	1,33	1,33	2,00	0,00	1,33
	7	2,33	2,33	2,67	6,00	0,67	1,67	1,67	2,00
	15	4,00	3,00	1,33	14,67	0,67	0,67	2,00	0,67
	45	1,33	42,67	0,67	37,33	1,67	4,00	4,00	6,00
	75	2,67	61,33	0,67	73,33	1,33	1,33	5,33	16,00
	135	15,33	62,67	22,67	26,00	4,67	53,33	70,67	13,33
15,0	0	2,00	1,00	0,00	2,67	2,00	1,00	0,00	2,67
	7	1,00	1,00	0,67	0,67	0,67	2,67	2,00	1,33
	15	0,00	4,00	0,00	16,00	0,00	0,67	2,00	7,33
	45	8,00	51,33	0,00	32,00	5,33	6,00	4,00	1,33
	75	0,00	71,33	0,00	84,67	0,00	10,00	0,67	26,67
	135	2,67	87,33	2,00	70,00	0,67	98,67	1,33	86,67
17,0	0	2,00	2,00	0,00	1,67	2,00	2,00	0,00	1,67
	7	3,33	0,00	0,00	1,33	1,33	2,33	0,67	3,33
	15	4,67	6,00	0,67	38,67	0,67	8,00	2,00	4,00
	45	3,33	46,67	0,00	42,00	0,67	88,67	0,00	86,67
	75	18,00	34,00	0,00	54,67	2,67	70,67	0,00	82,67
	135	20,00	92,00	0,00	68,67	1,33	100,00	0,00	96,67

Nos grãos de amendoim, inoculados e armazenados em atmosfera normal e em atmosfera de OEM, foram observadas apenas as espécies usadas para inoculação, *A. flavus* e *A. glaucus* (Tabela 3). A partir de 30 dias de armazenamento foi possível observar, sem auxílio de microscópio, o crescimento superficial dos fungos em aproximadamente 65% dos grãos armazenados em atmosfera normal (Figura 4). Nas avaliações realizadas após incubação dos grãos pelo teste de blotter, a porcentagem de grãos colonizados por *A. glaucus* foi elevada, sendo superior a 50% após 60 dias de armazenamento, em atmosfera normal e de OEM, nos conteúdos de água de 7,5; 9,3; e 10,5%. A colonização foi significativa ( $P \leq 0,01$ ) durante o armazenamento e nos diferentes conteúdos de água.

Tabela 3: Porcentagem de grãos de amendoim colonizados pelos fungos *A. glaucus* (*Ag*) e *A. flavus* (*Af*) durante armazenamento, em diferentes conteúdos de água, em atmosfera normal e de óleo essencial de mostarda (100µl/L).

Tempo (dias)	Atmosfera normal							
	Conteúdo de Água (%)							
	7,5%		8,2%		9,3%		10,5%	
	<i>Ag</i>	<i>Af</i>	<i>Ag</i>	<i>Af</i>	<i>Ag</i>	<i>Af</i>	<i>Ag</i>	<i>Af</i>
<b>0</b>	5,0	3,7	6,0	0,5	8,7	3,3	5,6	1,6
<b>15</b>	18,0	18,0	60,7	2,0	10,7	10,7	26,7	4,7
<b>30</b>	26,7	28,0	10,0	2,7	5,3	16,0	49,3	25,3
<b>60</b>	54,0	25,3	23,3	10,7	89,3	6,0	76,7	25,3
<b>90</b>	40,7	21,3	98,7	3,3	4,0	1,3	70,0	0,0
Tempo (dias)	Atmosfera de Óleo Essencial de Mostarda							
	7,5%		8,2%		9,3%		10,5%	
	<i>Ag</i>	<i>Af</i>	<i>Ag</i>	<i>Af</i>	<i>Ag</i>	<i>Af</i>	<i>Ag</i>	<i>Af</i>
	<b>0</b>	5,0	3,7	6,0	0,5	8,7	3,3	5,6
<b>15</b>	26.67	12.67	22.67	12.67	3.33	12.00	1.33	13.33
<b>30</b>	26.67	49.33	16.67	2.00	10.67	16.00	3.33	44.67
<b>60</b>	66.00	4.67	18.67	5.33	62.00	5.33	64.67	33.33
<b>90</b>	27.33	20.00	98.67	2.00	70.00	0.67	56.67	4.67

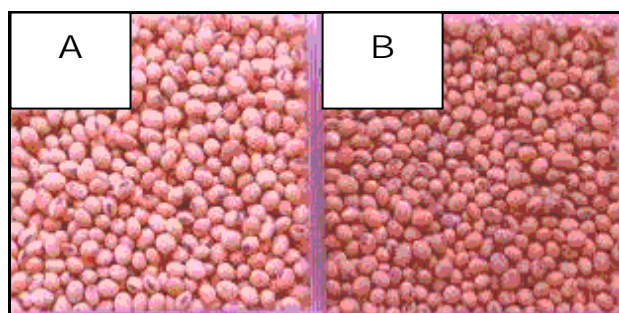


Figura 3: Grãos de soja com 135 dias de armazenamento em atmosfera normal com conteúdo de água de 11,5% (A) e 17% (B).



Figura 4: Grãos de amendoim com 60 dias de armazenamento em atmosfera normal (a) e de óleo essencial de mostarda (b) com conteúdo de água de 10,5%.

#### 4.6. Ácidos Graxos Livres

O óleo extraído dos grãos de soja e de amendoim apresentou variação de tonalidade, escurecendo com o aumento da colonização fúngica nos grãos durante o armazenamento a partir de 60 dias e também nos maiores conteúdos de água (Figura 5).

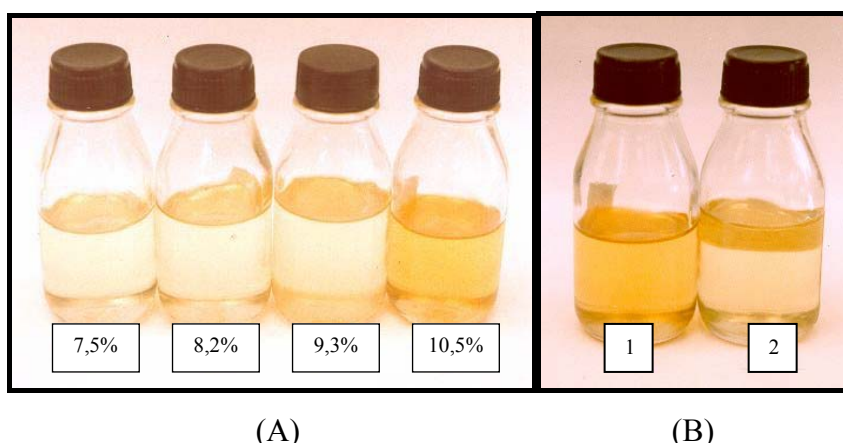


Figura 5: (A) Óleo de amendoim extraído de grãos com conteúdo de água de 7,5; 8,2; 9,3; e 10,5% aos 60 dias de armazenamento em atmosfera normal. (B) Óleo de amendoim extraído de grãos com 60 dias de armazenamento em atmosfera normal (1) e de óleo essencial de mostarda (2) e conteúdo de água de 10,5%.

Em condições de atmosfera normal a porcentagem de AGL nos grãos de soja foi crescente durante o armazenamento nos maiores conteúdos de água. Na Figura 6, as superfícies de resposta para prever as alterações ocorridas no teor de ácidos graxos livres nos grãos de soja e de amendoim, em função do conteúdo de água e dos



períodos de armazenamento. Observa-se nas Figuras 6a e 6c que os valores de AGL aumentam com o conteúdo de água e o período de armazenamento para os grãos de soja e amendoim armazenados em atmosfera normal. O aumento de AGL foi significativo ( $P \leq 0,01$ ) durante o armazenamento dos grãos de soja, de forma linear, seguindo a mesma tendência em todos os conteúdos de água (Figura 7a; Tabela 4A), sendo mais acentuado entre 75 e 135 dias. O aumento foi mais acentuado nos conteúdos de água de 17% ( $b=0,0112$ ) em comparação aos outros conteúdos de água (15%,  $b = 0,0034$ ; 13% e 11,5%  $b = 0,002$ ) alcançando percentuais de AGL de 2,18; 1,27; 1,12; e 1,02 nos conteúdos de água de 17; 15; 13; e 11,5%, respectivamente, aos 135 dias.

Nos grãos de soja armazenados em atmosfera de OEM o aumento de AGL foi menos acentuado que em atmosfera normal ( $b = 0,0019, 0,0009, 0,0028, e 0,0016$ , nos conteúdos de água de 11,5; 13; 15; e 17%, respectivamente). Ao final do período de armazenamento, 135 dias, o acúmulo de AGL nos conteúdos de água de 15 e 17% foi 50% menor para OEM quando comparado com o percentual acumulado nos grãos armazenados em ambiente normal (Figura 6a, 6b; Tabela 4A).

Na Figura 7 são apresentadas as variações dos AGL dos grãos de soja e amendoim em função do período de armazenamento, para cada conteúdo de água. Verifica-se que o teor de AGL aumentou à medida que se aumenta o período de armazenamento, para cada conteúdo de água dos grãos de soja e amendoim armazenados em atmosfera normal (Figura 7a e 7c). Todavia, para os grãos de soja e amendoim armazenados na presença do OEM, o aumento dos AGLs foi menos acentuado, independentemente do conteúdo de água.

O acúmulo de AGL no óleo extraído dos grãos de amendoim armazenados em atmosfera normal também seguiu uma tendência linear significativa ( $P \leq 0,01$ ) (Figura 7c) com o armazenamento e conteúdo de água desses grãos, sendo também significativa a interação entre conteúdo de água e o armazenamento (Figura 6c; Tabela 5A). O aumento foi mais acentuado no conteúdo de água de 10,5% ( $b=0,102$ ) em comparação aos outros conteúdos de água (9,3%,  $b = 0,0285$ ; 8,2%,  $b = 0,0096$  e 7,5%,  $b = 0,0108$ ) alcançando percentuais de AGL de 1,17; 1,17; 2,99 e 10,27 nos conteúdos de água de 7,5; 8,2; 9,3; e 10,5%, respectivamente, aos 135 dias. Durante o armazenamento em atmosfera de OEM o acúmulo de AGL foi menos acentuado quando comparado aos grãos armazenados em atmosfera normal. O efeito de OEM foi mais significativo nos grãos com conteúdo de água de 9,3% ( $b=0,0095$ ) e 10,5%

( $b=0,0226$ ) aos 90 dias de armazenamento, com percentuais de AGL de 1,08 e 2,39, respectivamente (Figura 7d, Tabela 5A).

As equações a seguir explicam as variações dos resultados de ácidos graxos livres para grãos de soja armazenados em atmosfera normal (1) e de óleo essencial de mostarda (2) e para grãos de amendoim sem (3) e com (4) atmosfera modificada:

(1) Soja/Atmosfera Normal  $AGL = -0,3418 + 8,1660 ca + 47,2073 T$  ( $R^2 = 0,60$ )

(2) Soja/Atmosfera OEM  $AGL = 0,8308 - 0,0001 ca + 0,0018 T$  ( $R^2 = 0,66$ )

(3) Soja/Atmosfera Normal  $AGL = -1,5884 + 0,1245 ca + 1,7969 T$  ( $R^2 = 0,71$ )

(4) Amendoim/Atmosfera OEM  $AGL = -1,0282 + 0,0882 ca + 0,0111 T$  ( $R^2 = 0,69$ )

Onde: AGL = Ácidos graxos livres, expresso em % de ácido oléico

ca = conteúdo de água inicial dos grãos armazenados

T = tempo de armazenamento em dias

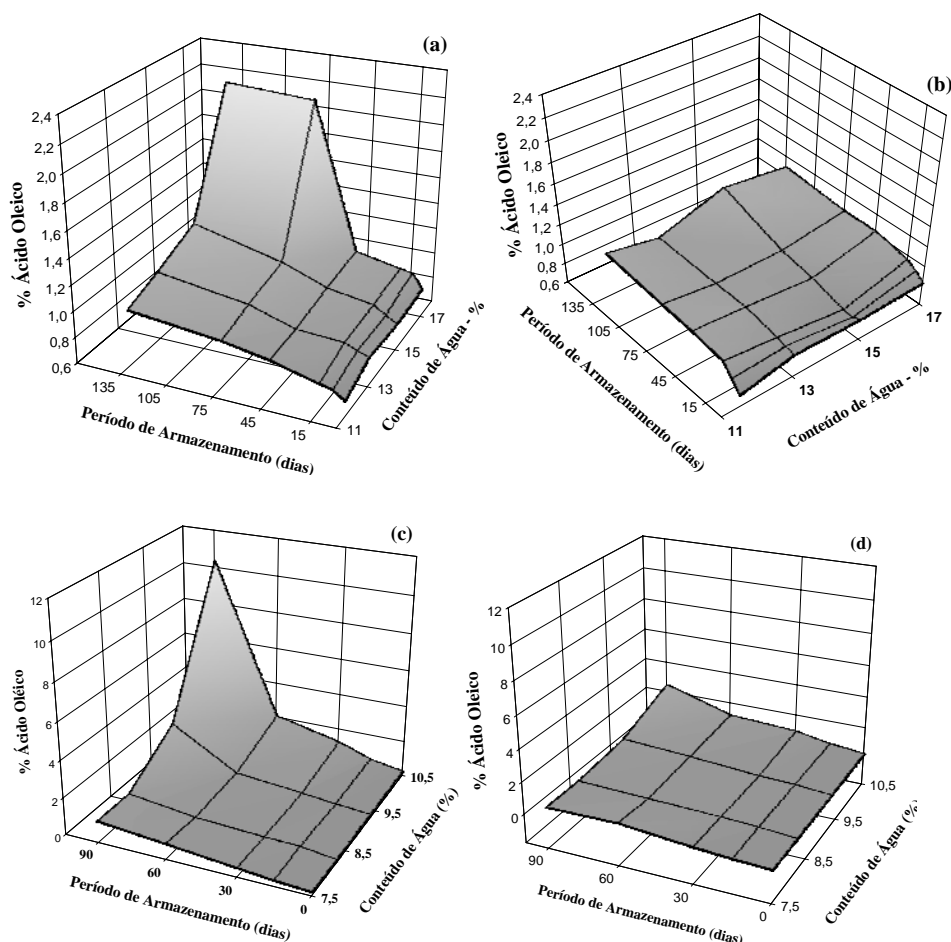


Figura 6: Ácidos graxos livres (expressos em % de ácido oléico) no óleo extraído de grãos de soja (a, b) e de amendoim (c, d) inoculados e armazenados em atmosfera normal e de óleo essencial de mostarda (OEM) em diferentes conteúdos de água.

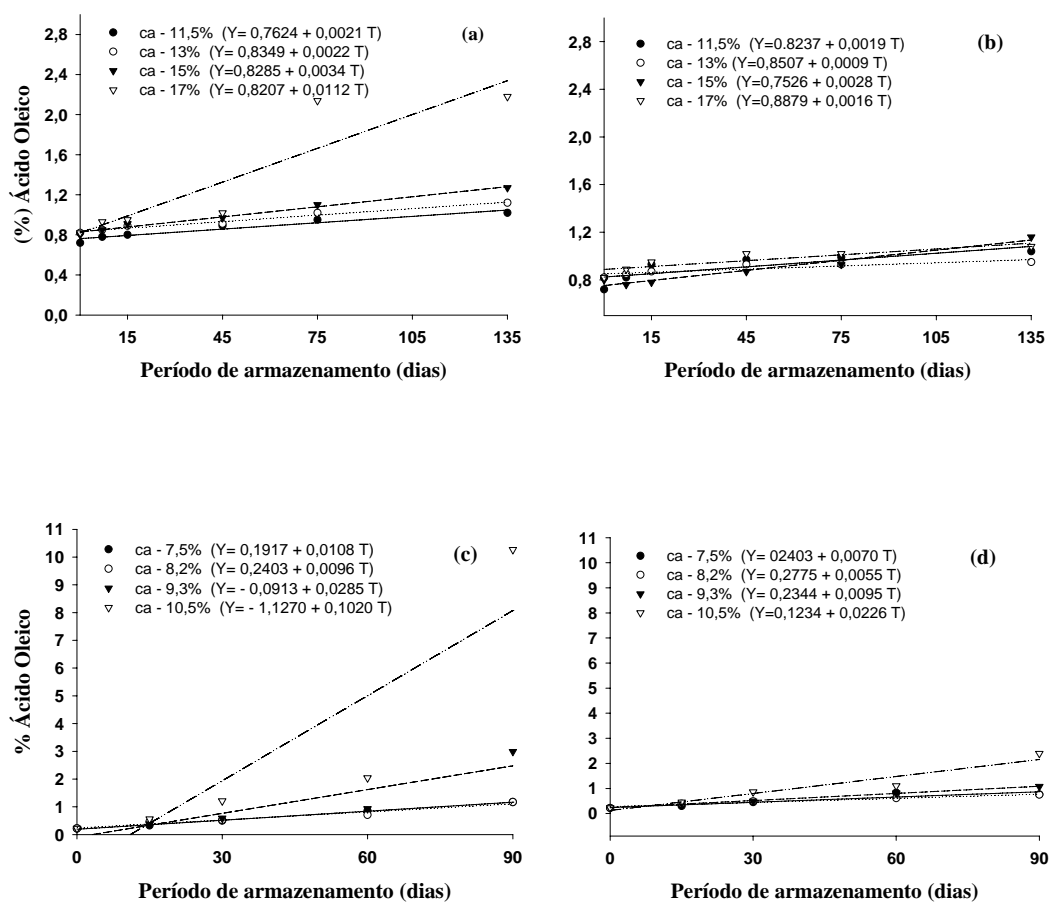


Figura 7: Ácidos graxos livres (expressos em % de ácido oléico) no óleo extraído de grãos de soja (a, b) e de amendoim (c, d) inoculados e armazenados em atmosfera normal e de óleo essencial de mostarda (OEM) em diferentes conteúdos de água (ca) e suas respectivas equações de regressão originadas do desdobramento da interação entre conteúdo de água e tempo de armazenamento.

#### 4.7. Acidez total dos grãos

As alterações na acidez total titulável dos grãos de soja armazenados em atmosfera normal foram significativas ( $P \leq 0,01$ ) no armazenamento e nos maiores conteúdos de água dos grãos (Figura 8a e 8b; Tabela 3A). O aumento de acidez total foi mais acentuado no conteúdo de água de 17% ( $b=0,722$ ) alcançando o valor de 13,25 mg NaOH/g de grão, em 135 dias de armazenamento em comparação ao conteúdo de água de 11,5 e 13%, onde acidez total alcançou aproximadamente 8 mg

de NaOH/g de grão ( $b= 0,038$ ) (Figura 9a; Tabela 6A). A tendência de aumento na acidez total dos grãos armazenados em atmosfera de OEM foi similar à dos grãos armazenados em atmosfera normal, porém foi mais lento, e manteve-se menos acentuado durante todo o período de armazenamento e nos diferentes conteúdos de água (Figura 9a, 9b). Em ambos os casos o aumento foi mais acentuado entre 75 a 135 dias de armazenamento.

A acidez total dos grãos de amendoim armazenados em atmosfera normal ou em atmosfera de OEM também aumentou com o período de armazenamento e com o aumento do conteúdo de água dos grãos. Nos grãos com maiores conteúdos de água (7,5 e 8,2%) a acidez inicial de 2,07 e 2,13 elevou-se para 2,86 e 2,87 em 90 dias de armazenamento (Tabela 7A). O aumento também foi mais acentuado nestes conteúdos de água ( $b=0,008$ ) em comparação aos conteúdos de água menores ( $b = 0,005$ ). Nos grãos armazenados em atmosfera de OEM o aumento da acidez foi menos acentuado (Tabela 7A) e com pequenas diferenças durante o tempo de armazenamento, em todas os conteúdos de água (Figura 9c, 9d).

As equações a seguir explicam a variação dos resultados de acidez total titulável em grãos de soja armazenados na atmosfera normal (5) e de óleo essencial de mostarda (6), e para grãos de amendoim sem (7) e com (8) atmosfera modificada:

$$(5) \text{ Soja/Atmosfera Normal} \quad \text{ATT} = 0,6828 + 0,1199 \text{ ca} + 5,0373 \text{ T} \quad (\text{R}^2 = 0,83)$$

$$(6) \text{ Soja/Atmosfera OEM} \quad \text{ATT} = - 0,2762 + 0,1900 \text{ ca} + 4,8832 \text{ T} \quad (\text{R}^2 = 0,91)$$

$$(7) \text{ Amendoim/Atm. Normal} \quad \text{ATT} = 1,7312 + 2,5158 \text{ ca} + 62,7104 \text{ T} \quad (\text{R}^2 = 0,82)$$

$$(8) \text{ Amendoim/Atmosfera OEM} \quad \text{ATT} = 1,8624 + 0,0130 \text{ ca} + 0,0056 \text{ T} \quad (\text{R}^2 = 0,92)$$

Onde: ATT = Acidez total titulável, expressa em mg NaOH/g grão

ca = conteúdo de água inicial dos grãos armazenados

T = tempo de armazenamento em dias

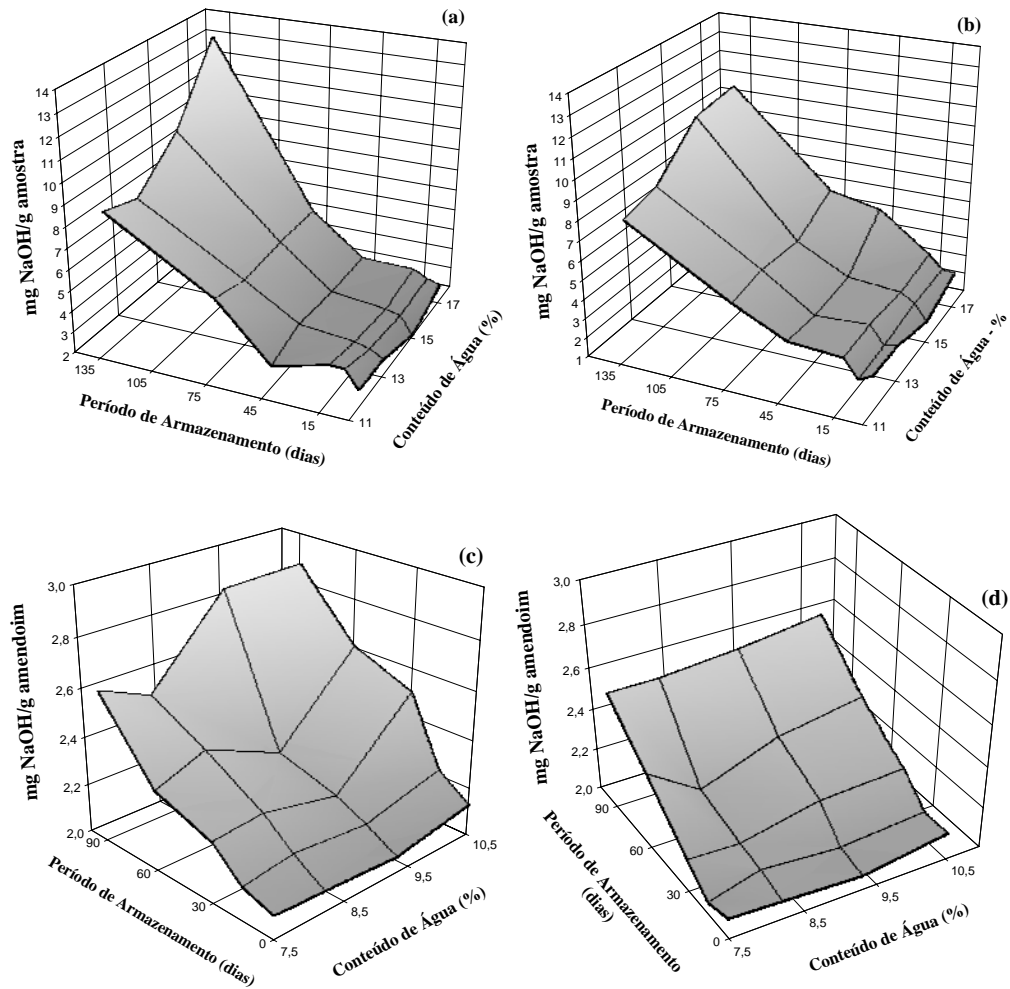


Figura 8: Acidez total titulável dos grãos de soja (a, b) e de amendoim (c, d), inoculados e armazenados na atmosfera normal ou de óleo de mostarda, nos diferentes conteúdos de água e períodos de armazenamento.

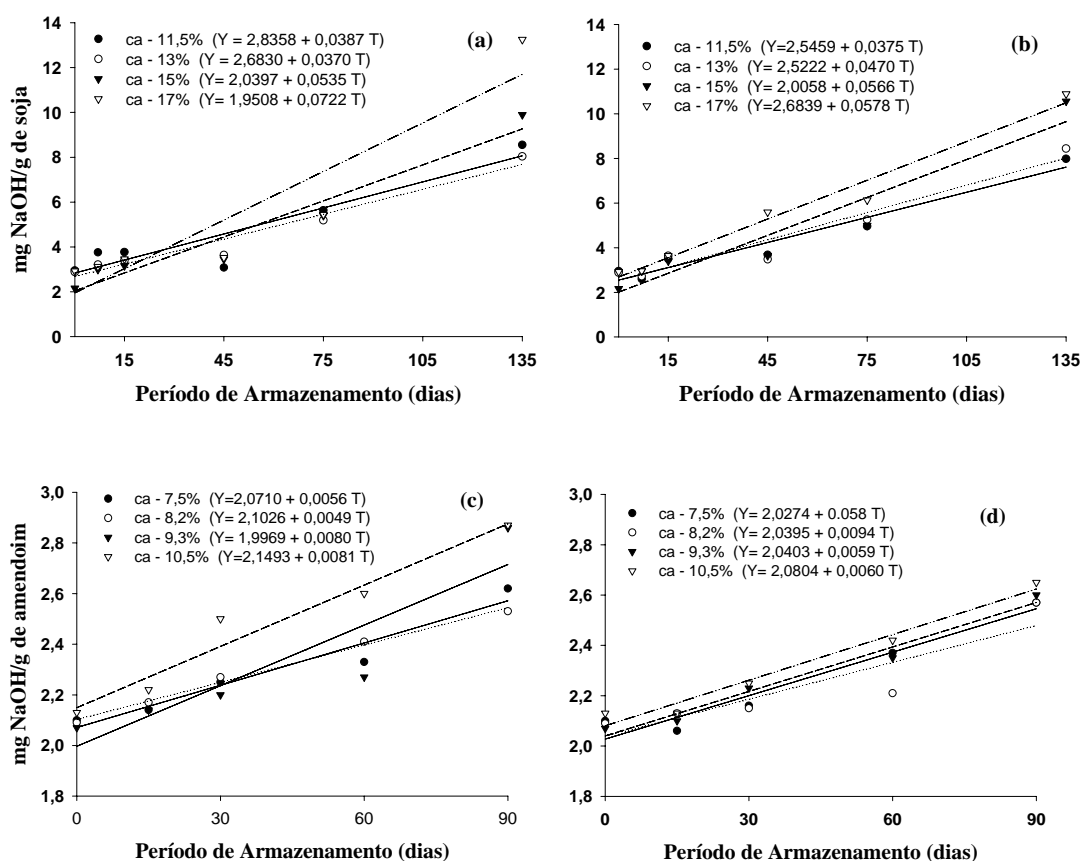


Figura 9: Acidez total titulável dos grãos de soja (a, b) e de amendoim (c, d), inoculados e armazenados em atmosfera normal ou de óleo essencial de mostarda, em diferentes conteúdos de água, e suas respectivas equações de regressão originadas do desdobramento da interação entre conteúdo de água e tempo de armazenamento.

As equações 9 e 10 a seguir descrevem a correlação entre acidez total titulável e ácidos graxos livres de grãos de soja armazenados em atmosfera normal e de óleo essencial de mostarda, e as de grãos de amendoim, 11 e 12:

$$(9) \text{ Soja/Atmosfera Normal} \quad \text{AGL} = 0,5729 + 0,0971 \text{ ATT} \quad (R^2 = 0,50)$$

$$(10) \text{ Soja/Atmosfera OEM} \quad \text{AGL} = 0,7450 + 0,0359 \text{ ATT} \quad (R^2 = 0,68)$$

$$(11) \text{ Amendoim/Atmosfera Normal} \quad \text{AGL} = - 6,1193 + 2,9967 \text{ ATT} \quad (R^2 = 0,87)$$

$$(12) \text{ Amendoim/Atmosfera OEM} \quad \text{AGL} = -3,9183 + 2,0165 \text{ ATT} \quad (R^2 = 0,64)$$

Onde: AGL = % de ácidos graxos livres, expressos como ácido oleico

ATT = acidez total titulável, expresso em mg NaOH/g da amostra

#### 4.8. Conteúdo de ergosterol

O tempo de retenção ( $t_r$ ) do padrão ergosterol foi de 23.669 minutos. Um cromatograma do padrão é demonstrado na Figura 1B (Anexo B) e um cromatograma típico obtido de uma amostra na Figura 2B.

Os teores de ergosterol de *A. flavus* foram de 1,22 mg/g de micélio, de *A. glaucus* (1,86 mg/g) e *A. ochraceus* (2,07 mg/g). O aumento no conteúdo de ergosterol dos grãos de soja armazenados na atmosfera normal e de OEM foi linear com o conteúdo de água dos grãos e o armazenamento (Figura 10a, 10b; Tabela 8A). Esse aumento foi significativo ( $P \leq 0,01$ ), variando do inicial de 156,24 para 550,8 ng/g no conteúdo de água de 17% aos 135 dias de armazenamento. O aumento foi mais acentuado nos maiores conteúdo de água, sendo  $b = 2,88, 2,53, 1,71$  e  $1,47$  no conteúdo de água 17; 15; 13; e 11,5%, respectivamente. Nos grãos armazenados em atmosfera OEM o aumento de ergosterol foi menos acentuado e no conteúdo de água de 17% o conteúdo de ergosterol chegou a apenas 342,72 ng/g aos 135 dias de armazenamento, sendo que esse aumento foi linear apenas no armazenamento (Figura 11b). Em geral o aumento no acúmulo de ergosterol foi menos acentuado em todas os conteúdos de água sendo  $b = 1,15, 1,88, 0,75$  e  $1,26$  no conteúdo de água de 17; 15; 13; e 11,5%, respectivamente (Figura 11b; Tabela 8A).

O acúmulo de ergosterol nos grãos de amendoim armazenados em atmosfera normal e em atmosfera de OEM também aumentou durante o armazenamento e com o aumento do conteúdo de água dos grãos. Nos grãos armazenados em atmosfera normal com maiores conteúdos de água (9,3 e 10,5%) o ergosterol aos 15 dias de armazenamento foi de 104 e 138 ng/g elevou-se, respectivamente, para 772,00 e 812,00 ng/g aos 90 dias de armazenamento (Tabela 9A). O aumento também foi mais acentuado nestes conteúdos de água,  $b=7,55$  e  $8,34$  respectivamente, em comparação aos conteúdos de água menores de 7,5 e 8,2% com  $b = 0,4,19$  e  $3,91$ , respectivamente (Figura 11c). Nos grãos armazenados na atmosfera de OEM o aumento foi menos acentuado com  $b = 7,81, 3,36, 1,13$  e  $1,40$ , nos conteúdos de água de 10,5; 9,3; 8,2; e 7,5%, respectivamente (Figura 11d).

As equações 13 e 14 explicam a variação dos resultados para grãos de soja armazenados na atmosfera normal e de óleo essencial de mostarda, e as equações 15 e 16 para grãos de amendoim:

- (13) Soja/Atmosfera Normal  $ERG = - 161,360 + 23,6893 ca + 2,1476 T$  ( $R^2 = 0,88$ )  
 (14) Soja/Atmosfera OEM  $ERG = 172,901 + 0,4546 ca + 1,2642 T$  ( $R^2 = 0,67$ )  
 (15) Amendoim/Atm. Normal  $ERG = - 497,095 + 37,8631 ca + 5,6048 T$  ( $R^2 = 0,75$ )  
 (16) Amendoim/Atm. OEM  $ERG = - 432,858 + 33,8700 ca + 3,4278 T$  ( $R^2 = 0,64$ )

Onde: ERG = Teor de ergosterol, expresso em ng/g de grão  
 ca = conteúdo de água inicial dos grãos armazenados  
 T = tempo de armazenamento em dias

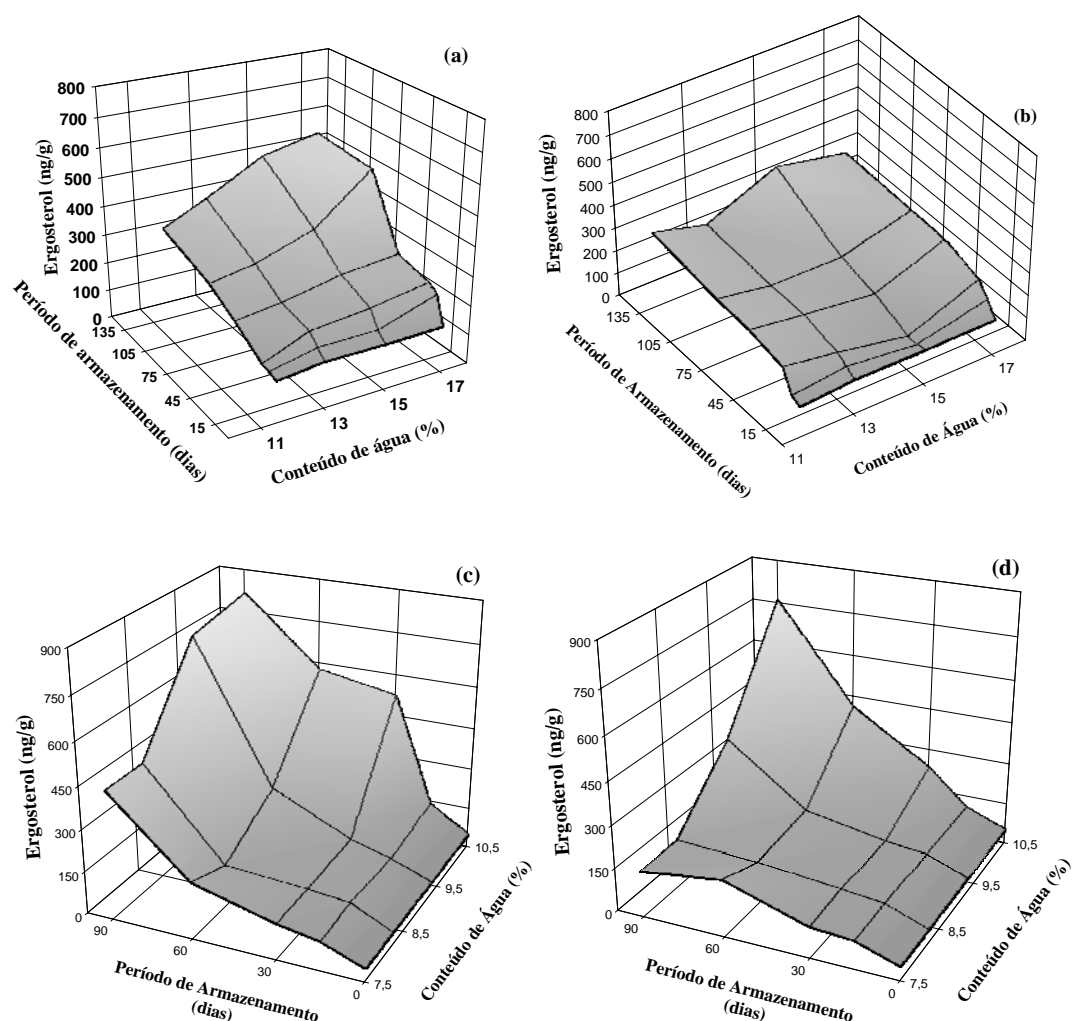


Figura 10: Conteúdo de ergosterol dos grãos nas amostras de soja (a, b) e de amendoim (c, d) inoculados e armazenados em atmosfera normal ou de óleo essencial de mostarda, com diferentes conteúdos de água.



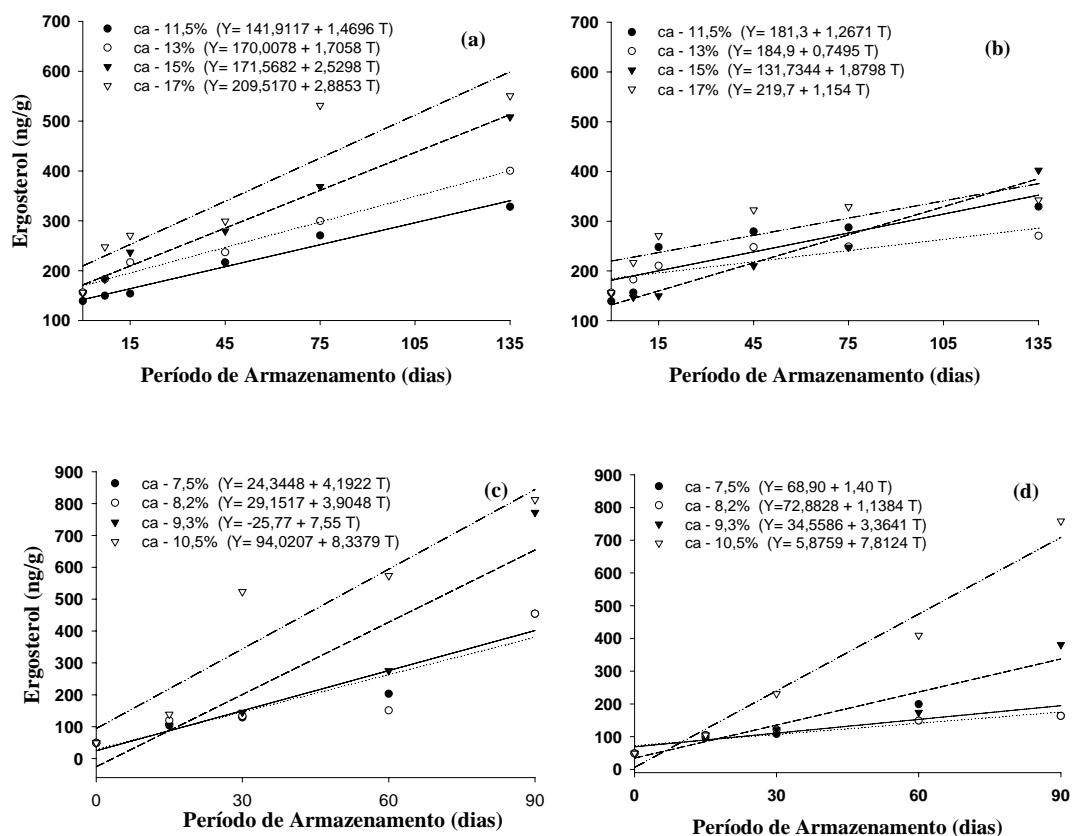


Figura 11: Conteúdo de ergosterol presente nos grãos de soja (a, b) e de amendoim inoculados e armazenados (c, d) armazenados em atmosfera normal e de óleo essencial de mostarda, com diferentes conteúdos de água (ca) e suas respectivas equações de regressão originadas do desdobramento da interação entre conteúdo de água e tempo de armazenamento.

As equações a seguir descrevem a correlação entre ergosterol e ácidos graxos livres de grãos de soja armazenados em atmosfera normal (17), e em atmosfera de óleo essencial de mostarda (18), e para grãos de amendoim sem (19) e com (20) atmosfera modificada:

(17) Soja/Atmosfera Normal

$$ERG = -792,5619 + 1513,1388 AGL - 413,9705 AGL^2 \quad (R^2 = 0,98)$$

(18) Soja/Atm. OEM

$$ERG = -383,1657 + 680,3899 AGL \quad (R^2 = 0,97)$$

(19) Amendoim/Atm Normal

$$ERG = 3,2627 + 288,6336 AGL \quad (R^2 = 0,91)$$

(20) Amendoim/Atm OEM

$$ERG = -37,4902 + 331,8992 AGL \quad (R^2 = 0,96)$$

Onde: ERG = conteúdo de ergosterol, expresso em ng/g amostra

AGL = % de ácidos graxos livres, expressos como ácido oléico

As equações a seguir descrevem a correlação entre ergosterol e acidez total titulável de grãos de soja armazenados em atmosfera normal (21) e em atmosfera de óleo essencial de mostarda (22), e para grãos de amendoim sem (23) e com (24) atmosfera modificada:

(21) Soja/Atmosfera Normal

$$\text{ERG} = 4,2809 + 71,9188 \text{ ATT} - 2,4153 \text{ ATT}^2 \quad (\text{R}^2 = 0,71)$$

(22) Soja/Atmosfera OEM

$$\text{ERG} = 13,9320 + 68,0704 \text{ ATT} - 3,396 \text{ ATT}^2 \quad (\text{R}^2 = 0,83)$$

(23) Amendoim/Atm. Normal ERG = - 1908,0156 + 927,7334 ATT (R<sup>2</sup> = 0,91)

(24) Amendoim/Atm. OEM ERG = - 1271,239 + 639,9321 ATT (R<sup>2</sup> = 0,56)

Onde: ERG = conteúdo de ergosterol, expresso em ng/g amostra

ATT = acidez total titulável, expresso em mg NaOH/g da amostra

## 5. DISCUSSÃO

Segundo Christensen & Kaufmann (1965), as boas condições de armazenamento de grãos requerem que a qualidade sanitária seja constantemente mantida pela temperatura, e assim possibilitando a redução de crescimento de fungos de armazenamento.

A baixa germinação dos grãos pode ocorrer por diversas razões, mas quando o progresso do crescimento fúngico e a porcentagem de germinação são avaliados conjuntamente durante o armazenamento é freqüente uma boa correlação entre essas variáveis (Sauer & Christensen, 1966; Tuite *et al.*, 1985; Sauer, 1988).

Os grãos armazenados com conteúdos de água maiores (15 e 17%) tiveram significativa diminuição na emergência de plântulas, chegando praticamente a zero, pois o processo de colonização fúngica foi maior devido aos maiores conteúdos de água disponível nos grãos. Segundo Bhattacharya & Raha (2002), grãos de soja com 75% de germinação antes do armazenamento declinaram rapidamente, não havendo

germinação dos grãos com 10% de conteúdo de água após 9 meses de armazenamento, devido à infecção fúngica e tempo de armazenamento. É sabido que os fungos nos grãos armazenados invadem e matam o embrião, muitas vezes sem danos aparentes (Sauer & Christensen, 1966; Seitz *et al*, 1977).

A correlação negativa entre emergência de plântulas e colonização fúngica no armazenamento ocorre sempre em estudos relacionados à sanidade de grãos. Moreno-Martinez (1981) encontrou resultados semelhantes, ou seja, nos grãos de cereais armazenados com 16% de conteúdo de água houve diminuição mais rápida da germinação que nos grãos com 9% de conteúdo de água, devido à maior colonização fúngica dos grãos armazenados.

O OEM utilizado para modificar a atmosfera de armazenamento dos grãos de soja não afetou sua germinação, pois a emergência de plântulas seguiu um comportamento semelhante ao dos grãos armazenados em atmosfera normal. Não foi observada nenhuma alteração nas plântulas e nem nos grãos não germinados que pudesse ser causada pelo OEM, portanto os vapores liberados desse óleo não foram fitotóxicos para soja ou amendoim nas condições testadas.

Para avaliar o efeito da atmosfera do OEM no comportamento dos fungos inoculados nos grãos de soja e amendoim durante o armazenamento, contou-se o número de UFC's dos fungos na superfície dos grãos durante o período de armazenamento. Foi possível verificar que o número de UFC's nos grãos armazenados em atmosfera de OEM foi menos acentuado que das UFC's em atmosfera normal. No entanto, nos grãos de soja armazenados em atmosfera normal, o número de UFC's nem sempre aumentou com o tempo de armazenamento e com o aumento do conteúdo de água dos grãos, como esperado. Nos grãos em atmosfera de OEM, o número de UFCs foi irregular, aumentando e diminuindo sem nenhuma causa aparente ao longo do tempo de armazenamento, mas sempre se mantendo mais baixo que nos grãos em atmosfera normal. Para os grãos de amendoim, entretanto, o resultado foi diferente, seguindo um comportamento previsível com o aumento crescente do número de colônias no decorrer do tempo de armazenamento e com o conteúdo de água. A tendência de aumento de colônias com o tempo de armazenamento e conteúdo de água dos grãos também se manteve nos grãos tratados com OEM, apesar de apresentarem menos colônias que nos grãos em atmosfera normal. Através desta avaliação obtêm-se apenas a esporulação dos fungos na

superfície dos grãos, que não revela a colonização interna dos grãos. Assim este parâmetro de avaliação da deterioração deve ser reavaliado.

Magan (1993) não encontrou correlação significativa entre conteúdo de ergosterol, um indicador de colonização por fungos, e unidades formadoras de colônias (UFC's) em grãos naturalmente contaminados na  $a_w$  de 0,85. Para ele UFC não é adequado para avaliar o desenvolvimento fúngico, apesar de alguns autores terem encontrado correlação positiva com sua utilização (Bailly *et al.*, 1999; Pasanen *et al.*, 1999; Tothill *et al.*, 1992).

Também Borjesson *et al.* (1990) não encontraram correlação entre UFC's e conteúdo de ergosterol em grãos de aveia armazenados por 5 dias com  $a_w$  de 0,95. Tothill *et al.* (1992) relataram significativa correlação entre ergosterol e UFC's de *Eurotium amstelodami* na  $a_w$  de 0,95, mas quando a  $a_w$  dos grãos era de 0,85 os teores de ergosterol foram aumentados, não mais correlacionando com UFC's. Entretanto para *Penicillium aurantiogriseum* ocorreu o contrário, a menor correlação entre UFC e ergosterol foi observada na  $a_w$  de 0,95.

Na execução dos experimentos relacionados à sanidade de grãos um dos problemas é a obtenção de grãos sem fungos. Neste experimento, como os grãos utilizados não passaram por nenhum tratamento de desinfestação, procurou-se, no entanto, utilizar grãos de soja e amendoim recém-colhidos e com baixa incidência de fungos. Para execução dos experimentos foram inoculados os fungos de interesse, nos grãos de soja, *Aspergillus glaucus* e *A. ochraceus*, e no amendoim, *A. glaucus* e *A. flavus*, e o comportamento desses fungos foi acompanhado durante o armazenamento, através de avaliações frequentes. Observou-se nos grãos de soja que além dos fungos inoculados, também *A. flavus* e *A. restrictus* estavam presentes nos grãos. Estes fungos são comumente encontrados em grãos durante o armazenamento, pois podem se desenvolver em substratos com baixa disponibilidade de água.

A colonização dos grãos por *A. flavus* não foi afetada pela interação do conteúdo de água e tempo de armazenamento, mas pela competição com outros fungos. Neste trabalho, a colonização *A. flavus* foi influenciado pela presença de *A. glaucus*, que colonizou 92% dos grãos de soja e 70% dos grãos de amendoim, restringindo a colonização por *A. flavus*.

A colonização dos grãos pelos fungos inoculados foi acompanhada pelo teste de blotter e foi observada a maior frequência do *A. glaucus* nos grãos de soja (84% no conteúdo de água de 13%), superando o *A. flavus* que manteve baixas

porcentagens nas umidades estudadas (25% no conteúdo de água de 17% aos 60 dias de armazenamento). Isto pode ter ocorrido devido à umidade dos grãos que favoreceu a colonização por *A. glaucus*. Nestas condições o *A. flavus* está presente, mas desenvolve menos, e no decorrer do armazenamento este fungo foi favorecido pelo aumento do tempo e umidade, havendo, além disso, competição com outros fungos.

As porcentagens de grãos colonizados por espécies de *Aspergillus* não foram obrigatoriamente proporcionais ao teor de ergosterol. Isso ocorreu devido à quantificação obtida no teste de blotter ser referente apenas ao número de grãos com o fungo e não à sua intensidade de colonização.

*Aspergillus glaucus* desenvolveu-se mais lentamente e foi observado em maiores porcentagens aos 45 dias, à temperatura de 25 °C, em todos os conteúdos de água. O percentual de colonização aumentou com o tempo de armazenamento. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Mills e Sinha (1980), os quais observaram que *A. glaucus* colonizou maiores porcentagens de grãos de canola após 50 dias, a 25 °C.

A determinação da acidez do óleo extraído dos grãos, expresso também como percentual de AGL, é um índice de avaliação da deterioração fisiológica dos grãos durante o armazenamento (St. Ângelo & Ori, 1983; Roberts *et al.*, 1987), e é também utilizado como parâmetro complementar de deterioração fúngica juntamente com avaliações de presença fúngica nesses grãos (Seitz *et al.*, 1977; Lisker *et al.*, 1985; Dhingra *et al.*, 1998; Bhattacharya & Raha, 2002). Bhattacharya & Raha, (2002), trabalhando com soja, milho e amendoim encontraram valores crescentes de ácidos graxos livres durante o armazenamento, por um ano.

O aumento dos ácidos graxos livres durante o armazenamento representa uma perda econômica no processamento de oleaginosas. Este aumento foi mais acentuado nos grãos de soja com do conteúdo de água de 15 e 17% e nos grãos de amendoim com conteúdo de água de 9,3 e 10,5%, nos maiores períodos de armazenamento (Figura 6), e isso pode ser observado pelas equações (1) e (3) que expressam a quantidade de ácidos graxos livres em função do conteúdo de água e tempo de armazenamento. O aumento dos ácidos graxos livres pode ser atribuído ao aumento da massa fúngica. As equações (17) e (19) explicam a relação entre crescimento fúngico medido pelo conteúdo de ergosterol e sugere um envolvimento direto do fungo ao aumento de ácidos graxos livres em soja e amendoim. O aumento dos AGL

nos grãos de soja foi menos acentuado que no amendoim, provavelmente devido à barreira que a casca da soja exerce na colonização interna dos grãos, produção de metabólitos próprios do grão que inibem o crescimento fúngico. O mesmo não ocorreu com o amendoim, que por apresentar a casca mais fina grãos e maior teor de lipídeos do amendoim, torna-se mais suscetível ao ataque dos fungos.

Os grãos de soja e amendoim ao serem armazenados em atmosfera de OEM apresentaram menores valores de AGL's nos diferentes conteúdos de água dos grãos e períodos de armazenamento. Pelas equações (2) e (4), pag. 21, os teores de AGL's podem ser quantificados e as equações (18) e (20), pag. 29, demonstram a relação entre AGL's em função do ergosterol em soja e amendoim armazenados na atmosfera de OEM, demonstrando claramente que o uso de OEM pode prolongar o tempo de armazenamento seguro destes grãos e provavelmente de outras espécies oleaginosas.

Dhingra *et al.* (1998) relataram a correlação do ergosterol com a acidez de óleo para relacionar a presença de fungos nos grãos e comparar quantitativamente os lotes de grãos de soja. Christensen (1967), no entanto apenas comparou ácidos graxos livres com a porcentagem de grãos invadidos pelos fungos, desconsiderando a intensidade do crescimento fúngico. Entretanto, Dhingra *et al.* (1998) evidenciaram que essa é uma forma pouco precisa para determinar a deterioração, pois a porcentagem de grãos colonizados não está relacionada com teores de ergosterol ou AGLs, devido a uma correlação quantitativa equivocada de massa fúngica com porcentagem de ácidos graxos livres.

Complementarmente avaliou-se a possibilidade de utilizar a acidez total de grãos como parâmetro de indicação de deterioração fúngica dos grãos armazenados. Rehman & Shah (1999) relataram que a acidez total em grãos de trigo aumentava ao longo do armazenamento a 25 e 45 °C e que esse aumento pode ser devido ao aumento dos AGL e fosfatos devido à deterioração dos grãos. Os autores relataram a presença de fungos de armazenamento, mas a colonização não foi quantificada simultaneamente à avaliação da acidez.

Neste trabalho foram obtidos resultados correlacionando AGL com o teor de ergosterol e com a acidez total dos grãos, o que indica a possibilidade da utilização da acidez total dos grãos como indicativo de colonização por fungos em lotes de grãos. A acidez total titulável foi avaliada para facilitar as tomadas de decisão

referentes ao armazenamento dos grãos, por ser uma metodologia simples e de baixo custo.

Pelos resultados obtidos com os grãos de amendoim, verificaram-se pequenas diferenças, embora significativas, de acidez ao longo do armazenamento e nos diferentes conteúdos de água, não permitindo assim separação de lotes de grãos com leves sinais de deterioração fúngica. Mas para os grãos de soja as diferenças entre os valores de acidez total foram maiores. Houve correlação entre os teores de acidez total e ácidos graxos livres, e também entre acidez total e ergosterol dos grãos de soja (equação 21 e 22), e para os grãos de amendoim (equação 23 e 24).

Seitz *et al.* (1977) obtiveram quantidades de ergosterol em amostras de milho que estenderam de 0,15 a aproximadamente 200 µg/g, sendo o menor nível observado em grãos recém-colhidos. Neste trabalho os teores médios de ergosterol obtidos de grãos de soja variaram de 138,96 ng/g de grão antes do armazenamento, a 550,80 ng/g de grão, em grãos armazenados por 135 dias com conteúdo de água de 17%.

De acordo com os resultados apresentados, o aumento na acidez total dos grãos acompanhou o aumento de AGL e o aumento de ergosterol, sendo que ergosterol teve sua eficácia reconhecida na quantificação de fungos concordando com os resultados obtidos em outros estudos (Seitz *et al.*, 1977; Naewbanij, 1984; Dhingra, 1998; Bailly, 1999; Olsson, 2000; Mille-Lindblom, 2004). Da mesma forma AGL é utilizada como indicativo de deterioração de grãos armazenados (Lisker *et al.*, 1985; Bhattacharya & Raha, 2002). Juntas, essas duas metodologias vem sendo utilizadas para verificar deterioração de grãos armazenados causada por fungos (Dhingra *et al.*, 1998).

## 6. CONCLUSÃO

A utilização da metodologia de quantificação dos AGL dos grãos de soja e amendoim durante o armazenamento mostrou-se viável como parâmetro indicativo de deterioração fúngica dos grãos, pois os resultados obtidos foram correlacionados com os teores de ergosterol desses grãos, que por sua vez, permite o conhecimento da intensidade de colonização fúngica e conseqüentemente da deterioração.

A acidez total dos grãos sugerida como possível indicador de deterioração fúngica, correlacionada neste trabalho com o teor de ergosterol e com o teor de AGL, mostrou-se viável para separar lotes de grãos de soja deteriorados pela colonização fúngica.

A utilização do óleo essencial de mostarda durante o armazenamento dos grãos não controlou, mas reduziu a colonização fúngica nesses grãos, sendo seu efeito verificado na esporulação dos fungos. Possivelmente, a utilização de concentrações maiores que as utilizadas neste trabalho proporcionem redução mais acentuada da colonização fúngica. Assim, sugere-se a utilização de concentrações maiores do óleo na avaliação da dispersão do seu vapor nos espaços intergranulares da massa de grãos armazenada.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC **Official Methods of Analysis**, 4<sup>th</sup> ed. 1994. 1141 p.
- ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC **Official Methods of Analysis**, 15<sup>th</sup> ed. 1998. 684 p.
- AMBRÓSIO, M.M.Q.; BUENO, C.J. & SOUZA, N.L. Sobrevivência de *Macrophomina phaseolina* em solo incorporado com brócolos seguido de solarização. **Summa Phytopathologica**, **30**, 364-370, 2004.
- BAILLY, J.D.; LE BARS, P.; PIETRI, A.; BENARD, G. LE BARS, J. Evaluation of a fluorodensitometric method for analysis of ergosterol as a fungal marker in compound feeds. **Journal of Food Protection**, **62**: 6, 686-690, 1999.
- BENDING, G.D. & LINCOLN, S.D. Characterisation of volatile sulphur-containing compounds produced during decomposition of *Brassica juncea* tissues in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, **31**, 695-703, 1999.
- BHATTACHARIA, K. & RAHA, S. Deteriorative changes of maize, groundnut and soybean seeds by fungi in storage. **Mycopathologia**. **155**, 135-141, 2002.
- BÖRJESSON, T., STÖLLMAN, U., & SCHNURER, J. Volatile metabolites and other indicators of *Penicillium aurantiogriseum* growth on different substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, **56**, 3705-3710, 1990.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food – a review. **International Journal of Food Microbiology**, **94**, 223-253, 2004.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 360 p., 1992.
- CHEN, S. & ANDREASSON, E. Update on glucosinolate metabolism and transport. **Plant Physiology and Biochemistry**, **39**, 743-758, 2001.
- CHRISTENSEN, C.M. & KAUFMANN, H.H. Deterioration of storage grains by fungi. **Annual Review of Phytopathology**, **3**, 69-89, 1965.
- CHRISTENSEN, C.M. Increase in invasion by storage fungi and in fat acidity values of commercial lots of soybeans stored as moisture contents of 13,0-14,0%. **Phytopathology**, **57**, 622-624, 1967.
- CHRISTENSEN, C.M. Loss of viability in storage: Microflora, **Seed Science & Technology**, **1**, 547-562, 1973.

- DHINGRA, O.D.; JHAM, G. & NAPOLEÃO, I.T. Ergosterol accumulation and oil quality changes in stored soybean invaded by *Aspergillus ruber* (A. *glaucus* group), **Mycopathologia**, **143**, 85-91, 1998.
- DHINGRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. 434p, 1995.
- DUNCAN, A.J. Glicosinolates. In: **Toxic substances in crop plants**. Eds. FELIX D'MELO, J.P., DUFFUS, M.C. & DUFFUS, J.H., 1991.
- ELLENBY, C. Mustard oils and control of the potato-root eelworm, *Heterodera rostochiensis* wollenweber: further field and laboratory experiments. **Annals of Applied Biology**, **38**, 859-875, 1951.
- EJECHI, B. O.; NWAFOR, O. E. & OKOKO, F. J. Growth inhibition of tomato-rot fungi by phenolic acids and essential oils extracts of pepperfruit (*Dennetia tripetala*). **Food Research International**, **32**, 395-399, 1999.
- GAMLIEL, A. & STAPLETON, J.J. Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues. **Phytopathology**, **83**, 899-905, 1993.
- GOCHO, S. Antibacterial mechanism of aroma chemical vapors. **Journal Antibacteriology Antifungic Agents**, **19**, 511-513, 1991.
- HARMAN, G.E. & NASH, G. Deterioration of stored pea seed by *Aspergillus ruber*: evidence for involvement of a toxin. **Phytopathology**, **62**, 209-212, 1972.
- HARMAN, G.E. Mechanisms of Seed Infection and Pathogenesis, **Phytopathology**, **73**:2, 1983.
- HEANEY & FENWICK, 1987
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br), 2005.
- INOUYE, S. Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts. **The International Journal of Aromatherapy**, **3**:1, 33-41, 2003.
- JAIN, P.C. LACEY, J. & STEVENS, L. Use of API-Zym strips and 4-nitrophenyl substrates to detect and quantify hydrolytic enzymes in media and grain colonized with *Aspergillus*, *Eurotium* and *Penicillium* species. **Mycological Research**, **95**:7, 834-842, 1991.
- KIENHOLZ, M. Studies on the antibacterial action of ethereal oils. **Arzneim Forsch.**, **9**, 519-521, 1959.
- KIMATI, H. Controle Químico. In: FILHO, A.B.; KIMATI, H. & AMORIM, L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia** v.1, São Paulo, Agronômica Ceres. 1995, p. 761-785.

- KIRKEGAARD, J.A.; WONG, P.T.W. & DESMARCHELIER, J.M. *In vitro* suppression of fungal root pathogens of cereals by *Brassica* tissues. **Plant Pathology**, **45**, 593-603, 1996.
- KOOSTRA, P Changes in seed ultrastructure during senescence, **Seed Science & Technology**, **1**, 417-425, 1973.
- LAZZERI, L.; LEONI, O. & MANICI, L.M. Biocidal plant dried pellets for biofumigation. **Industrial Crops and Products**, **20**, 59-65, 2004.
- LEWIS, J.A. & PAPAVIDAS, G.C. Effect of sulphur-containing volatile compounds and vapors from cabbage decomposition on *Aphanomyces euteiches*. **Phytopathology**, **61**, 208-214, 1971.
- LISKER, N.; BEN-EFRAIM, A. & HENIS, Y. Involvement of fungi in the increase of free fatty acids in stored soybeans, **Canadian Journal Microbiology**, **31**, 799-803, 1985.
- MAGAN, N., 1985
- MAGAN, N. Early detection of fungi in stored grain, **International Biodeterioration & Biodegradation**, **32**, 145-160, 1993.
- MACLEOD, G. & MACLEOD, A.J. The glucosinolates and aroma volatiles of green kohlrabi. **Phytochemistry**, **29**, 1183-1187, 1990.
- MAYTON, H.S.; OLIVIER, C.; VAUGHN, S.F. & LORIA, R. Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. **Phytopathology**, **86**, 267-271, 1996.
- MARUZZELLA, J.C. The action of perfumer oil vapours on fungi. **American Perfumer Aromatical**, **74**, 21-22, 1959.
- MC GEE, D.C. Symposium: Deterioration Mechanisms on Seeds. **Phytopathology**, **73**: 2, 1983.
- MILLE-LINDBLOM, C., WACHENFELDT, E. von & TRANVIK, L. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. **Journal of Microbiology Methods**, **59**, 253-262, 2004.
- MILLS, J.T. & SINHA, R.N. Safe storage periods for farm-stored rapeseed based on mycological and biochemical assessment. **Phytopathology**, **70**, 541-547, 1980.
- MORENO-MARTINEZ, E. Preserving the viability of stored maize seed with fungicides. **Plant Disease**, **65**, 260-261, 1981.
- MORRA, M.J. & KIRKEGAARD, J.A. Isothiocyanate release from soil-incorporated *Brassica* tissues. **Soil Biology & Biochemistry**, **34**, 1683-1690, 2002.

- NAEWBANIJ, M.; SEIB, P.A., BURROUGHS, R. & SEITZ, L.M. Determination of ergosterol using thin-layer chromatography and ultraviolet spectroscopy. **Cereal Chemistry**, **61**:5, 385-388, 1984.
- NIELSEN, P.V. & RIOS, R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, **60**, 219-229, 2000.
- OLIVIER, C.; VAUGHN, S. F., MIZUBUTI, E. S.G. & LORIA, R. Variation in allyl isothiocyanate production within brassica species and correlation with fungicidal activity. **Journal of Chemical Ecology**, **25**:12, 2687-2701, 1999.
- OLSSON, J.; BORJESSON, T.; LUNDSTEDT, T. & SCHNURER, J. Volatiles for mycological quality of barley grains: determinations using gas chromatography-mass spectrometry and electronic nose. **International Journal of Food Microbiology**, **59**, 167-178, 2000.
- PANDEY, D.K. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. **Journal of Plant Disease Protection**, **89**, 344-349, 1982.
- PASANEN, A.L.; YLI-PIETILA; PASANEN, P.; KALLIOKOSKI, P. & TARHANEN, J. Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials. **Applied and Environmental Microbiology**, **65**: 1, 138-142, 1999.
- POPINIGIS, F. Qualidade fisiológica de grãos. **Grão**, **1**: 1, 65-80, 1975.
- ROBERTS, E.H. Loss of viability: Ultrastructure and physiological aspects. **Seed Science & Technology**, **1**, 529-545, 1973.
- ROBERTS, R.G.; MORRISSON, W.H.; ROBERTSON, R. A.; HANLIN, R.T. Extracellular lipase production by fungi from sunflower seed. **Mycologia**. **79**, 265-273, 1987.
- REHMAN, ZIA-UR & SHAH, W.H. Biochemical changes in wheat during storage at three temperatures. **Plant Foods for Human Nutrition**, **54**, 109-117, 1999.
- SAUER, D.B. Effects of fungal deterioration on grain: nutritional value, toxicity, germination. **International Journal of Food Microbiology**, **7**, 267-275, 1988
- SAUER, D.B. & CHRISTENSEN, C.M. Comparison of hard red spring and winter wheats in storage. **Phytopathology**, **56**, 619-623, 1966.
- SEITZ, L. M.; MOHR, H.E.; BURROUGHS, R. & SAUER, D.B. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. **Cereal Chemistry**, **54**, 1207-17, 1977.
- SOLIMAN, K.M. & BADEAA, R.I. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology**, **40**, 1669-1675, 2002.

- ST. ANGELO, A.J. & ORY, R.L. Lipid degradation during seed deterioration, **Phytopathology**, **73**: 2, 315-317, 1983.
- WILLIAMS, A. P. Methodology developments in food mycology. **Journal of Applied Bacteriology**, Suplemento, **67**, 612S-67S, 1989.
- TOTHILL, I. E.; HARRIS, D. & MAGAN, N. The relation between fungal growth and ergosterol content of wheat grain. **Mycological Research**, **96**: **11**, 965-970, 1992.
- TUITE, J.; KNOX, K.; STROSHINE, R.; CANTONE, F.A. & BAUMAN, L.F. Effect of physical to corn kernels on the development of *Penicillium* species and *Aspergillus glaucus* in storage. **Phytopathology**, **75**, 1137-1140, 1985.
- ZELNY, L. & COLEMAN, D.A. Acidity in cereals and cereal products, its determination and significance. **Cereal Chemistry** **15**: 580-583, 1938.

Tabela 1A: Porcentagem de emergência de plântulas de grãos de soja inoculados com *A. glaucus* e *A. ochraceus*, armazenados em atmosfera normal e de óleo essencial de mostarda com diferentes conteúdos de água.

Tempo (dias)	Atmosfera normal			
	Conteúdo de Água (%)			
	11,5%	13%	15%	17%
0	88,00	84,00	86,00	95,33
7	90,00	82,67	88,67	84,67
15	81,33	87,33	84,67	71,33
45	81,33	80,67	68,67	52,00
75	64,00	59,33	54,67	11,33
135	56,00	31,33	2,00	0,00
Tempo (dias)	Atmosfera com óleo essencial de mostarda			
	11,5%	13%	15%	17%
	11,5%	13%	15%	17%
0	88,00	84,00	86,00	95,33
7	94,67	85,33	86,00	82,00
15	82,00	79,33	80,67	76,67
45	84,00	78,67	52,00	37,33
75	78,67	56,00	58,67	24,00
135	64,67	35,67	2,00	0,00

Médias significativas ( $P \leq 0.01$ )

Tratamento x tempo = ( $P \leq 0.05$ )

Tratamento x aw = ns

Tabela 2A: Unidades formadoras de colônias de grãos de soja inoculados com *A. glaucus* e *A. ochraceus*, armazenados em atmosfera normal e de óleo essencial de mostarda com diferentes conteúdos de água.

Tempo (dias)	Atmosfera normal			
	Conteúdo de Água (%)			
	11,5%	13%	15%	17%
0	281	351	436	166
7	328	217	143	1773
15	5625	22514	6222	12483
45	6194	27144	5556	342278
75	29222	137706	95000	374583
135	1412	1182	296611	1120
Tempo (dias)	Atmosfera de óleo essencial de mostarda			
	11,5%	13%	15%	17%
	11,5%	13%	15%	17%
0	281	350	435	166
7	7	7	12	8
15	9	13	26	9
45	4	4	17	23
75	7	41	17	19
135	7	528	4694	319

Médias significativas ( $P \leq 0.01$ )

Tabela 3A: Unidades formadoras de colônias de grãos de amendoim inoculados com *A. glaucus* e *A. flavus* e armazenados em atmosfera normal e de óleo essencial de mostarda (100 µL/L), com diferentes conteúdos de água.

Tempo (dias)	Atmosfera normal			
	Conteúdo de Água (%)			
	7,5%	8,2%	9,3%	10,5%
0	281	351	436	166
15	328	217	143	1773
30	5.625	22.514	6.222	12.483
60	6.194	27.144	5.556	342.278
90	29.222	137.706	95.000	374.583
Tempo (dias)	Atmosfera de óleo essencial de mostarda			
	7,5%	8,2%	9,3%	10,5%
	7,5%	8,2%	9,3%	10,5%
0	281	351	436	166
15	4,4	5,57	13,23	16,52
30	9,62	13,52	32,38	24,98
60	17,23	25,00	51,60	2.700,00
90	22,55	32,77	1.282,20	15.261,17

Médias significativas ( $P \leq 0.01$ )



Tabela 4A: Porcentagem de ácidos graxos livres presentes em grãos de soja inoculados com *A. glaucus* e *A. ochraceus* e armazenados em atmosfera normal e de óleo essencial de mostarda (100 µL/L), com diferentes conteúdos de água.

Tempo (dias)	Atmosfera normal			
	Conteúdo de Água (%)			
	11,5%	13%	15%	17%
0	0,72	0,82	0,80	0,82
7	0,78	0,85	0,85	0,93
15	0,80	0,89	0,91	0,95
45	0,89	0,91	0,97	1,02
75	0,95	1,02	1,10	2,14
135	1,02	1,12	1,27	2,18
Tempo (dias)	Atmosfera de óleo essencial de mostarda			
	11,5%	13%	15%	17%
	11,5%	13%	15%	17%
0	0,72	0,82	0,80	0,82
7	0,82	0,85	0,76	0,89
15	0,93	0,87	0,78	0,95
45	0,97	0,93	0,87	1,02
75	0,99	0,93	0,93	1,02
135	1,04	0,95	1,16	1,08

Médias significativas ( $P \leq 0.01$ )

Tabela 5A: Porcentagem de ácidos graxos livres nos grãos de amendoim inoculados com *A. glaucus* e *A. flavus* e armazenados em atmosfera normal e de óleo essencial de mostarda (100 µL/L), com diferentes conteúdos de água.

Tempo (dias)	Atmosfera normal			
	Conteúdo de Água (%)			
	7,5%	8,2%	9,3%	10,5%
0	0,22	0,22	0,22	0,22
15	0,33	0,46	0,38	0,56
30	0,50	0,52	0,59	1,21
60	0,85	0,71	0,93	2,04
90	1,17	1,17	2,99	10,27
Tempo (dias)	Atmosfera de óleo essencial de mostarda			
	7,5%	8,2%	9,3%	10,5%
	7,5%	8,2%	9,3%	10,5%
0	0,22	0,22	0,22	0,22
15	0,30	0,39	0,41	0,45
30	0,45	0,49	0,49	0,86
60	0,83	0,61	0,82	1,10
90	0,76	0,75	1,08	2,39

Médias significativas ( $P \leq 0.01$ )

Tabela 6A: Acidez total liberada em grãos de soja inoculados com *A. glaucus* e *A. ochraceus* e armazenados em atmosfera normal e de óleo essencial de mostarda (100 µL/L), com diferentes conteúdos de água.

Tempo (dias)	Atmosfera normal			
	Conteúdo de Água (%)			
	11,5%	13%	15%	17%
<b>0</b>	2,95	2,88	2,16	2,92
<b>7</b>	3,76	3,21	2,99	3,12
<b>15</b>	3,77	3,40	3,16	3,46
<b>45</b>	3,08	3,64	3,46	3,52
<b>75</b>	5,63	5,19	5,40	5,44
<b>135</b>	8,55	8,04	9,89	13,25
Tempo (dias)	Atmosfera de óleo essencial de mostarda			
	11,5%	13%	15%	17%
	11,5%	13%	15%	17%
<b>0</b>	2,95	2,88	2,16	2,92
<b>7</b>	2.59	2.72	2.96	2.96
<b>15</b>	3.50	3.64	3.40	3.64
<b>45</b>	3.68	3.48	3.64	5.59
<b>75</b>	4.96	5.26	4.99	6.13
<b>135</b>	7.98	8.44	10.56	10.88

Tabela 7A : Acidez total dos grãos de amendoim inoculados com *A. glaucus* e *A. flavus* e armazenados em atmosfera normal e de óleo essencial de mostarda (100 µL/L), com diferentes conteúdos de água.

Tempo (dias)	Atmosfera normal			
	Conteúdo de Água (%)			
	7,5%	8,2%	9,3%	10,5%
0	2,10	2,09	2,07	2,13
15	2,14	2,17	2,14	2,22
30	2,25	2,27	2,20	2,50
60	2,33	2,41	2,27	2,60
90	2,62	2,53	2,86	2,87
Tempo (dias)	Atmosfera de óleo essencial de mostarda			
	7,5%	8,2%	9,3%	10,5%
	7,5%	8,2%	9,3%	10,5%
0	2,10	2,09	2,07	2,13
15	2,06	2,13	2,10	2,13
30	2,16	2,15	2,23	2,25
60	2,37	2,21	2,35	2,42
90	2,57	2,57	2,60	2,65

Médias significativas ( $P \leq 0.01$ )

Tabela 8A: Teor de ergosterol presente nos grãos de soja inoculados com *A. glaucus* e *A. ochraceus* e armazenados em atmosfera normal e de óleo essencial de mostarda (100 µL/L), com diferentes conteúdos de água.

Tempo (dias)	Atmosfera normal			
	Conteúdo de Água (%)			
	11,5%	13%	15%	17%
0	138,96	156,24	154,08	156,24
7	149,76	182,88	182,88	247,68
15	154,08	216,72	236,88	270,72
45	216,72	236,88	279,36	299,52
75	270,72	299,52	368,64	531,36
135	328,32	400,32	508,32	550,80
Tempo (dias)	Atmosfera de óleo essencial de mostarda			
	11,5%	13%	15%	17%
	11,5%	13%	15%	17%
0	138,96	156,24	154,08	156,24
7	156,24	182,88	146,88	216,72
15	247,68	210,24	149,76	270,72
45	279,36	247,68	210,24	322,56
75	287,28	249,12	247,68	329,04
135	329,04	270,72	402,48	342,72

Tabela 9A: Teor de ergosterol presente nos grãos de amendoim inoculados com *A. glaucus* e *A. flavus* e armazenados em atmosfera normal e de óleo essencial de mostarda (100 µL/L), com diferentes conteúdos de água.

Tempo (dias)	Atmosfera normal			
	Conteúdo de Água (%)			
	7,5%	8,2%	9,3%	10,5%
0	48,80	48,80	48,80	48,80
15	104,00	119,20	104,00	138,40
30	128,80	133,60	144,80	523,20
60	203,20	151,20	275,20	573,60
90	454,4	454,4	772,00	812,00
Tempo (dias)	Atmosfera de óleo essencial de mostarda			
	7,5%	8,2%	9,3%	10,5%
	7,5%	8,2%	9,3%	10,5%
0	48,80	48,80	48,80	48,80
15	97,60	104,80	104,80	104,80
30	108,00	120,80	120,80	231,20
60	199,20	148,80	173,60	409,60
90	163,20	163,20	380,80	758,40

Médias significativas ( $P \leq 0.01$ )

## Anexo B

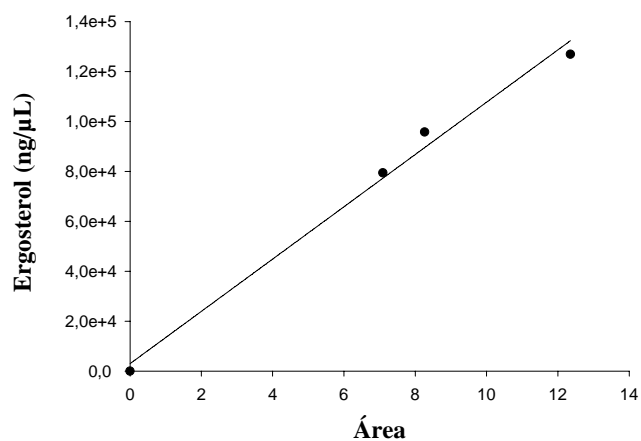


Figura 1B: Curva de calibração do ergosterol padrão.

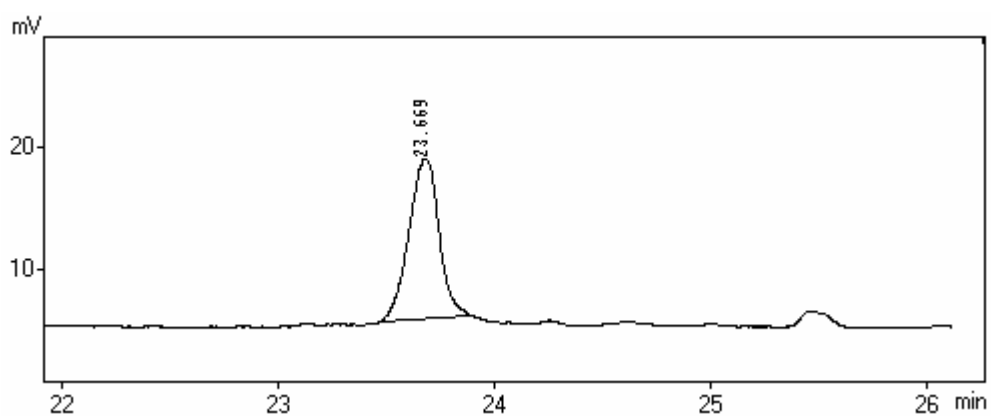


Figura 2B: Cromatograma parcial do padrão ergosterol com tempo de retenção ( $t_r = 23,669$ ).

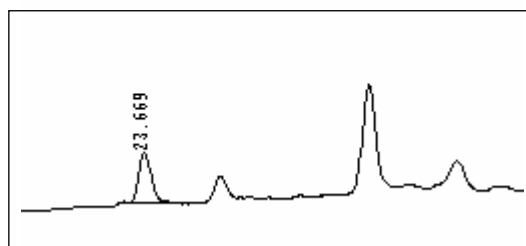


Figura 3B: Cromatograma parcial do ergosterol, com tempo de retenção ( $t_r = 23,669$ ), detectado em amostras de grãos de soja e amendoim inoculados com *Aspergillus* spp..

Tabela 1B - Resumo da análise de variância da emergência de plântulas de grãos de soja armazenados em atmosfera normal

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>
Atividade de Água - aw	3	2191,16667**
Tempo - T	5	7710,3222**
Aw * T	15	655,3889**
Resíduo	48	56,6667
c.v. (%)		11,32

\* \*\*Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 2B - Resumo da análise de variância das unidades formadoras de colônias (UFC) de grãos de soja armazenados em atmosfera normal.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>
Atividade de Água - aw	3	44832091056,9259**
Tempo - T	5	49602291163,5333**
Aw * T	15	34058594108,4592**
Resíduo	48	2334224546,38889
c.v. (%)		84,73

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F..

Tabela 3B - Resumo da análise de variância dos ácidos graxos livres dos grãos de soja armazenados em atmosfera normal.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>
Atividade de Água - aw	3	0,8251**
Tempo - T	5	0,7619**
Aw * T	15	0,20369**
Resíduo	48	0,0539
c.v. (%)		22,58

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 4B - Resumo da análise de variância da acidez total titulável dos grãos de soja armazenados em atmosfera normal.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>
Atividade de Água - aw	3	2,6471**
Tempo - T	5	89,3698**
Aw * T	15	3,0127**
Resíduo	48	0,1787
c.v. (%)		9,00

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.



Tabela 5B - Resumo da análise de variância do conteúdo de ergosterol dos grãos de soja armazenados em atmosfera normal.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>
Atividade de Água - aw	3	63984,1842**
Tempo - T	5	157817,4354**
Aw * T	15	5932,5599**
Resíduo	48	257,8230
c.v. (%)		5,93

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 6B - Resumo da análise de variância da emergência de plântulas dos grãos de soja armazenados em atmosfera de óleo essencial de mostarda.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>
Tratamento	2	245,4074*
Atividade de Água - aw	3	7598,5864**
Tempo - T	5	20996,8629**
Trat * aw	6	46,1975ns
Trat * T	10	105,6741*
Aw * T	15	1887,5494**
Resíduo	144	54,1667
c.v. (%)		10,91

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>ns</sup> não significativo

Tabela 7B - Resumo da análise de variância das unidades formadoras de colônias dos grãos de soja armazenados em atmosfera de óleo essencial de mostarda.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>
Tratamento	2	71234753319,0431**
Atividade de Água - aw	3	20784667264,7964**
Tempo - T	5	19373183154,8333**
Trat * aw	6	12925650085,1528**
Trat * T	10	1541888271,7416**
Aw * T	15	13862523558,7667**
Resíduo	144	782924985,4305
c.v. (%)		134,46

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 8B - Resumo da análise de variância dos ácidos graxos livres dos grãos de soja armazenados em atmosfera de óleo essencial de mostarda.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>
Tratamento	2	0,4049**
Atividade de Água - aw	3	0,4473**
Tempo - T	5	0,9019**
Trat * aw	6	0,2187**
Trat * T	10	0,0995**
Aw * T	15	0,0756**
Resíduo	144	0,0289
c.v. (%)		18,06

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 9B - Resumo da análise de variância da acidez total titulável dos grãos de soja armazenados em atmosfera de óleo essencial de mostarda.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>
Tratamento	2	0,0467 <sup>ns</sup>
Atividade de Água - aw	3	7,0299**
Tempo - T	5	234,1266**
Trat * aw	6	0,4747**
Trat * T	10	0,7957**
Aw * T	15	4,2353**
Resíduo	144	0,1292
c.v. (%)		7,68

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>ns</sup> não significativo

Tabela 10B - Resumo da análise de variância do conteúdo de ergosterol dos grãos de soja armazenados em atmosfera de óleo essencial de mostarda.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>
Tratamento	2	34548,6397**
Atividade de Água - aw	3	50848,4624**
Tempo - T	5	255076,4793**
Trat * aw	6	19446,4618**
Trat * T	10	10829,9377**
Aw * T	15	5656,1215**
Resíduo	144	86,28
c.v. (%)		3,78

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 11B - Resumo da análise de variância das unidades formadoras de colônias dos grãos de amendoim armazenados em atmosfera normal.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>
Atividade de Água - aw	3	631266816,6763**
Tempo - T	4	2044759601,0603**
Aw * T	12	166301065,8118**
Resíduo	40	15985620,5582
c.v. (%)		38,57

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 12B - Resumo da análise de variância dos ácidos graxos livres dos grãos de amendoim armazenados em atmosfera normal.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>
Atividade de Água - aw	3	17,2792**
Tempo - T	4	27,1659**
Aw * T	12	10,1563**
Resíduo	40	0,0266
c.v. (%)		12,77

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 13B - Resumo da análise de variância acidez total titulável dos grãos de amendoim armazenados em atmosfera normal.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>
Atividade de Água - aw	3	0,1060**
Tempo - T	4	0,7145**
Aw * T	12	0,0267**
Resíduo	40	0,0059
c.v. (%)		3,30

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 14B - Resumo da análise de variância do conteúdo de ergosterol dos grãos de amendoim armazenados em atmosfera normal.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>
Atividade de Água - aw	3	183635,6693**
Tempo - T	4	598442,1707**
Aw * T	12	37914,4693**
Resíduo	40	0,6507
c.v. (%)		0,30

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 15B - Resumo da análise de variância das unidades formadoras de colônias dos grãos de amendoim armazenados em atmosfera de óleo essencial de mostarda.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>
Tratamento	1	2640572344,4901**
Atividade de Água - aw	3	450997334,4166**
Tempo - T	4	1303790729,9374**
Trat * aw	3	226433663,7156**
Trat * T	4	779613270,8598**
Aw * T	12	109429866,3761**
Resíduo	80	8293574,9639
c.v. (%)		50,76

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 16B - Resumo da análise de variância dos ácidos graxos livres dos grãos de amendoim armazenados em atmosfera de óleo essencial de mostarda.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>
Tratamento	1	11,7437**
Atividade de Água - aw	3	12,9170**
Tempo - T	4	21,3342**
Trat * aw	3	5,2208**
Trat * T	4	7,7900**
Aw * T	12	6,9338**
Resíduo	80	0,0349
c.v. (%)		19,38

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 17B - Resumo da análise de variância da acidez total titulável dos grãos de amendoim armazenados em atmosfera de óleo essencial de mostarda.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>
Tratamento	1	0,1505**
Atividade de Água - aw	3	0,0981**
Tempo - T	4	1,2188**
Trat * aw	3	0,0247*
Trat * T	4	0,0147ns
Aw * T	12	0,0173**
Resíduo	80	0,0065
c.v. (%)		3,49

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>ns</sup> não significativo

Tabela 18B - Resumo da análise de variância do conteúdo de ergosterol dos grãos de amendoim armazenados em atmosfera de óleo essencial de mostarda.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>
Tratamento	1	217294,3413**
Atividade de Água - aw	3	301218,3093**
Tempo - T	4	720835,7653**
Trat * aw	3	4358,7040**
Trat * T	4	63256,5813**
Aw * T	12	63744,4160**
Resíduo	80	0,6453
c.v. (%)		0,36

\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.