



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

**SOBREVIVÊNCIA DE PATÓGENOS EM GRÃOS DE MILHO TRATADOS COM PRODUTOS NATURAIS**

Lenise **Rossetto**<sup>1a</sup>, Deborah Menocci **Larios**<sup>2b</sup>, Rodrigo Fernandes **Castanha**<sup>2b</sup>, Lília Aparecida Salgado de **Morais**<sup>3c</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Meio Ambiente, Laboratório de Produtos Naturais

**Nº 13418**

**RESUMO** – Diante da propriedade inibitória da canela (*Cinnamomum zeylanicum*) para gêneros fúngicos, este trabalho teve por objetivo avaliar a ação da canela em diferentes formas e dois tipos de aplicação na sanidade de grãos de milho naturalmente infectados com *Penicillium spp.*, *Rhizopus sp.*, *Fusarium spp.* e *Aspergillus spp.* Utilizaram-se oito tratamentos com extratos de canela em duas concentrações, duas formas de aplicação em dois lotes comerciais de grãos de milho. Os tratamentos foram T1: Testemunha absoluta, T2: Extrato aquoso de canela 5% (T0h) aplicado diretamente no papel germitest, T3: Extrato aquoso de canela 5% (T24h) aplicado diretamente no papel germitest, T4: Extrato etanólico de canela 1% aplicado diretamente no papel germitest, T5: Testemunha-imersão, T6: Extrato aquoso de canela 5% (T0h)-imersão, T7: Extrato aquoso de canela 5% (T24h)-imersão, T8: Extrato etanólico de canela 1%-imersão. Os tratamentos que apresentaram melhores resultados para *Penicillium spp.* foram os que utilizaram os extratos aquosos de canela. O contato direto da canela em pó com o milho pode ocasionar a redução da incidência deste fungo em grãos armazenados. Para *Fusarium spp.*, o extrato aquoso de canela a 5% aplicado em imersão reduziu em 52% incidência fúngica. O mesmo extrato em maiores concentrações poderá conferir um percentual maior de inibição, podendo alcançar a inibição total. Novos testes com número maior de lotes e concentrações do extrato são necessários para que os resultados sejam confirmados.

**Palavras-chave:** Zea mays, *Cinnamomum zeylanicum*, *Fusarium*, *Penicillium*.



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

**ABSTRACT-** *The aim of this work was to evaluate the effect of cinnamon extracts, at two technical of application on healthy of maize grains naturally infected with *Penicillium spp.*, *Rhizopus sp.*, *Fusarium spp.* and *Aspergillus spp.*. Eight treatments using two kinds of cinnamon extracts on two concentrations, two application types on two commercial maize lots. Treatments used were T1: witness (distilled water), T2: cinnamon aqueous extract 5% (T0h) applied directly on Gernitest paper; T3: cinnamon aqueous extract 5% (T24h) applied directly on Gernitest paper 24 hours after its prepare; T4: ethanolic cinnamon extract 1% applied directly on Gernitest paper; T5: witness (distilled water - immersion), T6: cinnamon aqueous extract 5% (T0h) – immersion; T7: cinnamon aqueous extract 5% (T24h) – immersion; T8: ethanolic cinnamon extract 1% - immersion. Treatments that showed better results for *Penicillium spp.* were the aqueous cinnamon extracts. Direct contact of cinnamon powder with maize grains can reduce the incidence of this fungus on stored grains. For *Fusarium spp.*, cinnamon aqueous extract 5% applied by immersion reduced the incidence of this fungus at 52%. The same extract, on higher concentrations can result a higher inhibition perceptual and can obtain total inhibition of *Fusarium spp.* on maize grains Another tests with higher number of lots and extracts concentrations are need to confirm these results.*

**Keywords:** *Zea mays*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Fusarium*, *Penicillium*.

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) é uma das mais difundidas no mundo, tanto para alimentação humana quanto animal. Sua importância econômica e agrícola o torna responsável por uma grande demanda no cenário de produção comercial.

Atualmente o milho é produzido em quase todos os continentes, sendo sua importância econômica caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vão desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia, como a produção de filmes e embalagens biodegradáveis. Cerca de 70% da produção mundial de milho é destinada à alimentação animal, podendo atingir 85% em países desenvolvidos. Em contrapartida, apenas 15% de toda a produção mundial destina-se ao consumo humano, de forma direta ou indireta (PAES, 2006).

A rede armazenadora de grãos é um sistema destinado para receber a produção de grãos, conservá-los em condições adequadas e redistribuí-los. O armazenamento de grãos em sacos, nos



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

armazéns, apresenta algumas desvantagens como ficar sujeito à variação de temperatura e à infestação de fungos e pragas, que podem provocar perdas de até 10% ao ano (PUZZI, 2000).

À medida que aumenta a utilização do milho para finalidades especiais como a alimentação humana, a qualidade do grão de milho se torna cada vez mais importante. A qualidade do grão começa com a adoção de um conjunto de práticas que devem ser instituídas e monitoradas até a colheita (TERRA, 2005).

O milho possui uma vulnerabilidade a gêneros fúngicos produtores de metabolitos secundários tóxicos denominados micotoxinas, dentre os quais os mais habituais são *Fusarium* (fumonisinas, deoxinivalenol, toxina T-2 e zearalenona), *Aspergillus* (aflatoxinas e ocratoxina) e *Penicillium* (ocratoxina) (KAWASHIMA; SOARES, 2006). As doenças de podridão de espigas podem ocorrer praticamente em todas as regiões onde se cultiva milho e, tem como principais agentes causadores às espécies de fungos dos gêneros citados acima. As aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, deoxinivalenol, nivalenol, toxina T-2 e a zearalenona são de ocorrência frequente em grãos de milho nos estados do sul do Brasil (SANTIN, 2001).

Espécies de fungos desses gêneros ocorrem em sementes de milho durante e/ou após a maturação e, dependendo das condições de temperatura e umidade, podem se desenvolver e provocar danos durante o armazenamento, reduzindo a germinação e o vigor dessas sementes e a qualidade dos grãos, situação essa que requer a adoção de medidas de controle (TANAKA et al., 2001). Na literatura tem-se verificado o registro da eficiência de extratos vegetais, obtidos de diversas espécies botânicas, como é o caso da arruda, melão de São Caetano, eucalipto (CELOTO et al., 2008), canela (VIEGAS et al., 2005), na promoção da inibição do desenvolvimento de vários fitopatógenos de natureza fúngica. Considera-se ainda, que a diversidade dessas substâncias poderia possibilitar a utilização direta pelo produtor, seja no campo ou no armazenamento, por meio do cultivo da planta possuidora dos compostos secundários, preparo e aplicação direta do extrato nas culturas comerciais (CELOTO et al., 2008), como o milho.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo verificar a ação da canela em diferentes formas e dois tipos de aplicação na sanidade dos grãos de milho naturalmente infectados.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais (LPN) e no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA) da Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna-SP.

Foram utilizados dois lotes comerciais de grãos de milho obtidos no comércio local (lojas de produtos agropecuários). Para cada lote, foram realizados oito tratamentos diferentes para as concentrações de canela em pó (*Cinnamomum zeylanicum*) adquirida no mercado. Os tratamentos consistiram de: T1) Testemunha absoluta (água destilada esterilizada pipetada em papel Germitest); T2) Extrato aquoso de canela 5% aplicado diretamente no papel Germitest imediatamente após o preparo (Tempo 0h); T3: Extrato aquoso de canela 5% aplicado diretamente no papel Germitest 24 horas após o seu preparo (Tempo 24h), T4: Extrato etanólico de canela 1% aplicado no papel; T5: Testemunha em imersão, T6: Extrato aquoso de canela 5% (Tempo 0h) em imersão, T7: Extrato aquoso de canela 5% (Tempo 24h) em imersão, T8: Extrato etanólico de canela 1% em imersão.

Em cada teste utilizaram-se 200 sementes, distribuídas em 20 repetições de dez sementes, montadas em placas de Petri descartáveis (90 mm x 15 mm) utilizando-se três folhas de papel Germitest umedecido três vezes o peso do papel (3 ml de solução para cada tratamento). Para todos os tratamentos realizou-se a técnica do *Blotter test* (NEERGAARD, 1979).

Foram utilizados 22 g de pó de canela misturados com 440 ml de água destilada esterilizada, sendo imediatamente aplicados 3 ml da suspensão no papel Germitest (T0h). Para o teste de imersão, os grãos ficaram imersos por 2 minutos na suspensão (T0h), na mesma concentração, secos por duas horas em temperatura ambiente. Nos tratamentos denominados T24, utilizou-se a mesma metodologia, porém a suspensão foi preparada com 24 h de antecedência (T24h).

O extrato etanólico da canela foi preparado utilizando-se a técnica de extração a frio em sistema aberto. Adicionou-se, inicialmente, 20 g de canela em pó em 68 ml de etanol PA. Foram realizadas filtrações diárias com o auxílio de bomba a vácuo (TECNAL TE O581) até o esgotamento da amostra, totalizando-se cinco dias. A cada filtração, foram adicionados à canela em pó mais 68 ml de etanol. O extrato resultante de cada filtragem foi acondicionado em um Erlenmeyer vedado, em ambiente protegido de luz e calor, até o momento da evaporação. Esta foi



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

realizada em evaporador rotativo (Buchi RE 121) e o extrato resultante (7,1421 g) foi armazenado em geladeira até o momento de sua utilização. Deste extrato, foram usadas 2,48 g em 248 ml de água destilada esterilizada, tanto para o tratamento de aplicação direta no Germitest, quanto para o tratamento de imersão.

Para o crescimento dos fungos (teste de sanidade), as placas foram incubadas por sete dias em câmara BOD (Biofoco - BF2 CGFP 275) em fotoperíodo automático (12 horas luz/12 horas escuro) e temperatura de  $25^{\circ} \pm 1$ . Observaram-se a presença de estruturas fúngicas por meio de lupa e anotados distintamente cada gênero. Foram feitos isolamentos dos fungos observados nos grãos, visando posterior identificação da espécie.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 (lotes) x 2 (tipos de aplicação) x 4 (tratamentos) com 20 repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

### 3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Foram encontrados nos grãos de milho, após a realização do teste de sanidade os patógenos *Penicillium* spp (92 e 87% respectivamente para os lotes 1 e 2 ), *Fusarium* spp. (58 e 79%), *Rhizopus* sp (15 e 6%) e *Aspergillus* spp (13 e 3% ). Devido ao baixo percentual de contaminação verificado para os dois últimos fungos, apenas serão apresentados os resultados referentes à *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp.

Para o fungo *Penicillium* spp, os melhores resultados foram encontrados para os tratamentos que utilizaram os extratos aquosos de canela (T2 e T3) nos dois lotes independentemente do tempo de preparo (Tabela 1). No primeiro lote, observou-se uma redução do percentual de incidência do fungo de 92% na testemunha (T1) para 7% e 18% nos tratamentos T2 e T3 respectivamente, quando utilizada aplicação direta no papel. Isto pode ser um indicativo que a aplicação direta do pó da canela nos sacos de armazenamento do milho pode reduzir a incidência de *Penicillium* spp. Novos ensaios serão realizados para fins de verificação de curva dose-resposta. Estes resultados vão ao encontro dos dados obtidos por De Carli et al. (2010), na qual houve certa tendência na redução do crescimento micelial de *Penicillium* em testes realizados com extratos aquosos de canela. Os tratamentos aplicados através de imersão apresentaram



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

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

percentual de incidência de *Penicillium* superior à testemunha (T5), não havendo diferença estatística significativa para o primeiro lote.

**Tabela 1.** Médias dos percentuais de incidência de *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. em grãos de milho submetidos aos tratamentos com extratos de canela sob aplicação direta ou imersão

<i>FUSARIUM</i>								
Lotes	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
	%	%	%	%	%	%	%	%
Lote 1	58 aB	48 aBC	52 aBC	79 aA	79 aA	38 aC	63 aAB	77 aA
Lote 2	62 aA	57 aA	50 aAB	48 bAB	37 bB	49 aAB	45 bAB	49 bAB
CV% = 34,19%								
dms colunas = 1.1894 dms linhas = 1.8451								
<i>PENICILLIUM</i>								
Lotes	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
	%	%	%	%	%	%	%	%
L 1	92 aA	7 bB	18 bB	83 aA	87 aA	93 aA	96 aA	95 aA
L 2	61 bBC	42 aD	50 aCD	71 bAB	72 bAB	83 bA	79 bA	79 bA
CV% = 20,05%								
dms colunas = 0.8673 dms linhas = 1.3455								

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

T1: Testemunha absoluta

T2: Extrato aquoso de canela 5% (Tzero) aplicado diretamente no papel germitest

T3: Extrato aquoso de canela 5% (T24h) aplicado diretamente no papel germitest

T4: Extrato etanólico de canela 1% aplicado diretamente no papel germitest

T5: Testemunha em imersão

T6: Extrato aquoso de canela 5% (Tzero) em imersão

T7: Extrato aquoso de canela 5% (T24h) em imersão

T8: Extrato etanólico de canela 1% em imersão

Os dados observados para *Fusarium* spp. demonstraram que o melhor tratamento foi o T6 (extrato aquoso 5% imersão - 38%) (Tabela 1), para o primeiro lote, quando comparado à testemunha submetida à imersão (T5 – 79%), o que representa uma redução de 52% de incidência de *Fusarium*. A redução do percentual de incidência foi alta, porém estes valores ainda não são os



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

desejados. O primeiro lote apresentou qualidade sanitária inferior ao segundo, o qual apresentou 37% de incidência de *Fusarium* spp. no tratamento T5 (testemunha submetida à imersão). O inverso foi observado no tratamento T1 (testemunha absoluta), para os quais os percentuais foram 58% para o primeiro lote e 62% para o segundo. A realização de novos testes com número maior de lotes e concentrações dos produtos faz-se necessária, para confirmação dos resultados.

A alta incidência de *Fusarium* spp. observada neste ensaio corrobora com os resultados apresentados por RAMOS et al. (2008). Os autores relataram a maior ocorrência deste fungo em sementes de milho doce em dois dos três lotes analisados, mesmo após aplicação de produtos fungicidas sintéticos, o que evidencia a dificuldade de manutenção da qualidade sanitária de grãos e sementes de milho.

Pereira et al., (2006) realizaram ensaios *in vitro* com os óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), cebola (*Allium cepa* L.), manjerição (*Ocimum basilicum* L.), menta (*Mentha piperita* L.) e orégano (*Origanum vulgari* L.), nas concentrações de 500, 1000, 1500 e 2000 mg/ml de óleo essencial em meio de cultura, sobre o crescimento micelial de *Fusarium* sp.. Os autores relataram que não houve inibição do crescimento fúngico com nenhum dos óleos essenciais em nenhuma das concentrações testadas.

#### 4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados pode-se concluir que, nas condições em que foi realizado o experimento, para *Penicillium* spp., o extrato aquoso de canela a 5% reduziu o percentual de incidência fúngica em grãos de milho, de 92% na testemunha para 7% e 18%, independentemente do tempo de preparo do extrato, quando utilizada aplicação direta no papel.

O tratamento de imersão não foi adequado para o controle de pode ocasionar a redução da incidência de *Penicillium* spp. nas condições em que foram desenvolvidos estes ensaios.

Para *Fusarium* spp., o extrato aquoso de canela a 5% aplicado em imersão reduziu em 52% incidência fúngica. O mesmo extrato em maiores concentrações poderá conferir um percentual maior de inibição, fazendo-se necessária a realização de novos testes com número maior de lotes e diferentes concentrações do extrato para que os resultados sejam confirmados.



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

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J. **Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides***. Acta Scientiarum, Maringá, v.30, n.1, p.1-5, 2008.
- DE CARLI, M.; FARIA, C. M. D. R.; BALDIN, I.; FARIA, M. V.; RESENDE, J. T. V. Extrato de canela no controle *in vitro* de patógenos pós-colheita. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 2, julho, 2010.
- FERREIRA D. F. 2000. **Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0**. Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, São Carlos, Programas e Resumos 255-258.
- KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. V. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.3, p. 516-521, 2006.
- NEERGAARD, P. 1979. **Seed Pathology**. V.1, 2. ed. London: MacMillan Press. 839 p.
- PAES, M.C.D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. EMBRAPA Milho e Sorgo. Sete Lagoas, MG, 2006.
- PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N.; PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 731-738, jul/ago., 2006.
- PUZZI, D. **Abastecimento e armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensinos Agrícolas, 2000. 666 p.
- RAMOS, N. P.; FILHO, J. M.; GALLI, J. A. Tratamento Fungicida em Semente de Milho Super-Doce. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 30, n.1, p.24-31, 2008.
- SANTIN, J.A. **Fungos de pré e pós-colheita e a qualidade do grão de milho**. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2001.
- TANAKA, M.A.S.; MAEDA, J.A.; PLAZAS, I.H.A.Z. Microflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento. **Sci. Agric.**, July/Sept. 2001, vol.58, n. 3, p.501-508.
- TERRA, B. **Mantendo a qualidade do grão durante a colheita**. **Informativo Pioneer. Administração Rural**. Ano IX, n 20, p. 10-2, 2005.
- VIEGAS, E. C.; SOARES, A.; CARMO, M. G. F.; ROSSETTO, C. A. V. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p.915-919, 2005.