

LUCAS HENRIQUE FIGUEIREDO PRATES

DIFUSÃO DO EUGENOL EM ARROZ COM CASCA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P912d Prates, Lucas Henrique Figueiredo, 1993-
2018 Difusão do eugenol em arroz com casca / Lucas Henrique
Figueiredo Prates. – Viçosa, MG, 2018.
ix, 38f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Lêda Rita D'Antonino Faroni.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.31-38.

1. Pragas - Controle integrado. 2. Difusão. 3. Essências e
óleos essenciais. 4. Cravo-da-índia. 5. Cromatografia a gás .
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia
Agrícola. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola.
II. Título.


CDD 22. ed. 632.9504

LUCAS HENRIQUE FIGUEIREDO PRATES


DIFUSÃO DO EUGENOL EM ARROZ COM CASCA


Dissertação apresenta à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2018.


Adalberto Hipólito de Sousa


Ernandes Rodrigues de Alencar


Maria Eliana L. Ribeiro de Queiroz
(Coorientadora)


Lêda Rita D'Antonino Faroni
(Orientadora)

“Knowledge is of two kinds. We know a subject ourselves, or we know where we can find information upon it. When we enquire into any subject, the first thing we have to do is to know what books have treated of it. This leads us to look at catalogues, and at the backs of books in libraries.”

Samuel Johnson

“If we could change ourselves, the tendencies in the world would also change. As a man changes his own nature, so does the attitude of the world change towards him. ... We need not wait to see what others do.”

Mahatma Ghandi

“Go confidently in the direction of your dreams! Live the life you’ve imagined.”

Autor desconhecido

Aos meus amados pais, Luciene e Honorato,

ao meu amado irmão, Diego

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da Vida, minha saúde, sabedoria, persistência e paciência. Sem Ele não seria possível sonhar e lutar pelos meus sonhos. À minha família, em especial aos meus amados pais e irmão, Honorato, Luciene e Diego, pelo amor incondicional, dedicação para que eu pudesse sonhar mais alto, apoio nas horas difíceis e compreensão pelos momentos ausentes.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Departamento de Engenharia Agrícola (DEA) e especialmente aos colegas do Área de Armazenamento pela possibilidade e apoio em conciliar o trabalho com o desenvolvimento desse projeto. Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola pela oportunidade e confiança em desenvolver esse trabalho. À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço à Professora Dra. Lêda Rita D'Antonino Faroni pela oportunidade, orientação, dedicação, amizade, exemplo, compreensão e, acima de tudo, pela confiança fortalecida durante a execução desse projeto. Às minhas coorientadoras Dra. Fernanda Fernandes Heleno e Professora Dra. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz pelo conhecimento transmitido, conselhos, dicas, ajuda, confiança, convivência, prontidão em ajudar e amizade. Ao meu coorientador Professor Dr. Marcio Arêdes Martins pela disposição em ajudar no desenvolvimento deste projeto. Ao Prof. Adalberto Hipólito de Souza pela disponibilidade em ouvir e pelos conselhos. Aos membros da banca pelas valiosas sugestões e considerações.

Agradeço a todos os funcionários e professores da UFV que de alguma forma colaboraram com este projeto, em especial à técnica de laboratório Liany Divina Lima Miranda (LAQUA/DEQ) pelo tempo, recursos, equipamentos, confiança, conhecimento, amizade e, é claro, pelo cafezinho amigo nos árduos dias de trabalho. Agradeço aos colegas e amigos do DEA e DEQ com quem tive o prazer de conviver desde o início da minha jornada por toda a ajuda, companheirismo, ensinamentos, amizade e pelos cafezinhos! Aos amigos que fiz aqui em Viçosa pelo companheirismo, ajuda e amizade que resiste ao *stress* diário, ao tempo e aos desencontros.

Agradeço à todos que contribuíram para realização deste trabalho e para meu crescimento pessoal e profissional.

MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

Lucas Henrique Figueiredo Prates, filho de Honorato Prates Neto e Luciene Lacerda de Figueiredo Prates, nasceu em 15 de janeiro de 1993 em Uberaba – Minas Gerais.

Em julho de 2013, tomou posse como assistente de laboratório do Setor de Armazenamento do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Em janeiro de 2016, graduou-se como Engenheiro Químico pela UFV.

Em março de 2016, iniciou o Mestrado em Engenharia Agrícola na área de concentração de Engenharia de Processamento de Produtos Agrícolas, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2018.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Óleos essenciais	2
2.2. Difusão	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1. Reagentes e soluções.....	8
3.2. Quantificação do eugenol.....	9
3.3. Difusão	10
3.4. Caracterização por CG-EM do eugenol em diferentes fases	12
3.5. Bioensaio de mortalidade.....	13
3.6. Análises estatísticas.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1. Otimização e validação do método para quantificação do eugenol	15
4.2. Difusão do eugenol na massa de grãos	19
4.3. Caracterização do eugenol, do óleo essencial de cravo e suas fases voláteis....	24
4.4. Efeito da difusão de eugenol na mortalidade de <i>S. zeamais</i>	28
5. CONCLUSÕES.....	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

RESUMO

PRATES, Lucas Henrique Figueiredo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Difusão do eugenol em arroz com casca.** Orientadora: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Coorientadores: Fernanda Fernandes Heleno, Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e Marcio Arêdes Martins.

O uso de bioinseticidas, como os óleos essenciais e seus compostos, no manejo integrado de pragas tem sido efetivamente avaliado nos últimos anos. Entretanto, poucos trabalhos avaliaram a difusão desses compostos na massa de grãos. Com a difusão destes compostos, é necessário avaliar o seu efeito inseticida quando aplicados em uma massa de grãos. O objetivo desse trabalho foi determinar o coeficiente de difusão do eugenol em meio contendo grãos de arroz com casca a partir da fase líquida de eugenol com elevada pureza e a partir do óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllata* Thunberg (Myrtaceae)); caracterizar as fases líquida, volátil e após a difusão; avaliar a mortalidade de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: curculionidae) após fumigação com eugenol com elevada pureza e óleo essencial de cravo. Otimizou-se e validou-se o método de microextração em fase sólida (MEFS) associado à análise em cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama (CG/DIC) para quantificação do eugenol. A determinação do coeficiente de difusão foi realizada em uma adaptação do protótipo da célula de diafragma de Stokes. Para caracterização das diferentes fases, associou-se a técnica de MEFS à análise em cromatógrafo à gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM). A mortalidade de *S. zeamais* foi avaliada após fumigação por 4 e 7 dias com eugenol com elevada pureza e óleo essencial de cravo no protótipo de difusão com aproximadamente 5,5 kg de grãos. O método MEFS – CG/DIC para quantificação do eugenol apresentou boa resposta analítica, com limite de detecção e quantificação de 0,82 e 2,48 $\mu\text{L L}^{-1}$, respectivamente. Não houve diferença estatística ($\alpha = 0,05$) entre o coeficiente de difusão do eugenol calculado a partir do eugenol 99% e a partir do óleo essencial de cravo. O coeficiente de difusão foi de $1,09 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. A caracterização do óleo essencial de cravo utilizado confirmou a presença do eugenol como componente majoritário (75,89%). Observou-se uma diferença na composição das diferentes fases avaliadas. A mortalidade de *S. zeamais* submetido à fumigação com eugenol 99% alcançou em torno de 40% após

7 dias. Apesar de haver diferença significativa na mortalidade dos insetos submetidos à fumigação com eugenol 99% ou óleo essencial de cravo, não houve diferença estatística entre a mortalidade de insetos colocados em diferentes posições ao longo da coluna de grãos para o mesmo tratamento.

ABSTRACT

PRATES, Lucas Henrique Figueiredo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Diffusion of eugenol in rice.** Adviser: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Co-advisers: Fernanda Fernandes Heleno, Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz and Marcio Arêdes Martins.

The use of biopesticides, like essential oils and their compounds, in integrated pest management has been effectively evaluated in recent years. However, few studies have evaluated the diffusive behavior of these compounds through the grains. Given the diffusion of these compounds, it is necessary to reassess their insecticidal effect when applied in grains. This work aimed to determine the diffusion coefficient of eugenol through rice grains using the liquid phase as high purity eugenol or clove essential oil (*Eugenia caryophyllata* Thunberg (Myrtaceae)) as source of volatile eugenol; characterize the liquid, volatile, and after diffusion phases; to evaluate the mortality of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: curculionidae) after fumigation with high purity eugenol and clove essential oil. To quantify eugenol, the solid phase micro extraction (SPME) method associated to gas chromatographic analysis with flame ionization detector (GC/FID) was optimized and validated. The determination of the diffusion coefficient was performed in an adaptation of the Stokes diaphragm cell's prototype. To characterize the different phases, the optimized and validated SPME method was associated to the analysis in gas chromatograph coupled to mass spectrometer (GC-MS). The mortality of *S. zeamais* was evaluated after fumigation for 4 and 7 days with high purity eugenol and clove essential oil in the diffusion prototype with approximately 5.5 kg of grains. The SPME - GC/FID method presented good analytical response for quantification of eugenol, with limit of detection and quantification of 0.82 and 2.48 $\mu\text{L L}^{-1}$, respectively. There was no statistical difference ($\alpha = 0.05$) between the diffusion coefficient of eugenol calculated from eugenol 99% and from clove essential oil. The diffusion coefficient was $1.09 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. The characterization of clove essential oil confirmed the presence of eugenol as the major component (75.89%). A difference in the composition of the distinct phases evaluated was observed. Mortality of *S. zeamais* submitted to fumigation with eugenol 99% reached around 40% after 7 days. Although there was a significant difference in

the mortality of insects submitted to fumigation with eugenol 99% or clove essential oil, there was no statistical difference between the mortality of the insects placed at distinct positions along the grain column for the same treatment.

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos grãos de maior produção e consumo no mundo. Em 2016 a produção mundial de arroz foi de aproximadamente 740 milhões de toneladas, sendo os países China, Índia e Indonésia os maiores produtores (FAOSTAT, 2018). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção brasileira para a safra 2017/2018 é estimada em aproximadamente 12 milhões de toneladas (CONAB, 2018).

O armazenamento de grãos, especialmente daqueles de elevado consumo, como o arroz, é uma importante ferramenta para tentar regular a oferta de produto durante os períodos entre safras. Entretanto, durante o armazenamento o produto está sujeito a perdas qualitativas, quantitativas e nutricionais devido a, entre outros fatores, o ataque de insetos (Cogburn, 1977; Boxall, 2001; Zhou et al., 2002; Parfitt et al., 2010).

Dentre os principais insetos praga que atacam grãos armazenados, destacam-se como potenciais causadores de danos e, portanto, insetos de maior interesse científico para estudo e controle, espécies dos gêneros *Sitophilus*, *Tribolium* e *Rhyzopertha*, dentre os quais, *Sitophilus* e *Rhyzopertha* são muito relevantes no armazenamento de arroz (Ferreira, 1998; Dal Bello et al., 2001; Batta, 2004; Daglish et al., 2014; Buteler et al., 2015; Collins et al., 2017). Como alternativa para o controle dessas pragas, tem-se a fumigação com produtos à base de fosfina (PH_3) para tratamento curativo e o uso de agrotóxicos organofosforados e piretróides para tratamento preventivo (BRASIL, 2017). No entanto, o uso constante desses produtos tem sido associado à resistência dos insetos praga (Pimentel et al., 2009; Daglish et al., 2014; Collins et al., 2017).

Como alternativa ao uso dos inseticidas, alguns produtos têm sido avaliados quanto às suas eficácias no controle de pragas de grãos armazenados. Destacam-se, entre outros, o gás ozônio como fumigante (Isikber e Athanassiou, 2015; Silva et al., 2016; Sousa et al., 2016) e os óleos essenciais extraídos de vegetais como fumigante e/ou de contato (Viteri Jumbo et al., 2014; Abdelgaleil et al., 2015; Correa et al., 2015; Haddi et al., 2015; Hernandez-Lambrano et al., 2015; Souza et al., 2018). Além de avaliar a composição e os efeitos inseticidas dos óleos essenciais e seus componentes, faz-se necessário conhecer a difusão desses compostos no meio em que serão utilizados.

Embora as pesquisas sobre o potencial inseticida dos bioinseticidas, que inclui os metabólitos secundários de plantas, tenham crescido nos últimos anos (Isman, 2015), poucos trabalhos têm avaliado o transporte difusivo dessas substâncias em grãos armazenados. Considerando o potencial inseticida do óleo essencial de cravo, bem como do seu componente majoritário, o eugenol, como fumigantes no controle de insetos praga de grãos armazenados, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o comportamento difusivo do eugenol a partir de um produto de alta pureza e do eugenol presente no óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllata* Thunberg (Myrtaceae)) em grãos de arroz com casca, caracterizar as fases líquida, volátil e após a difusão; e avaliar a mortalidade de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: curculionidae) após fumigação com eugenol com elevada pureza e óleo essencial de cravo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Óleos essenciais

O uso de óleos essenciais e extratos vegetais como bioinseticidas tem sido encorajado uma vez que, em geral, é efetivo em quantidades pequenas e afeta apenas os organismos-alvo ou semelhantes (Khater, 2012). Os óleos essenciais podem apresentar atividade inseticida e alterar efeitos comportamentais de insetos, além de atividade antifúngica, antiviral e antibacteriana (Diao et al., 2014; Gilling et al., 2014; González et al., 2014; Kedia et al., 2014; You et al., 2014; Bougherra et al., 2015; Zhang et al., 2016).

Além do estudo da eficácia desses óleos, a composição química e o efeito dos seus principais componentes no controle de pragas têm sido avaliados (Ogendo et al., 2008; Viteri Jumbo et al., 2014; Shukla et al., 2016). Apesar da possibilidade de extração de óleo de diversas espécies vegetais, os óleos de cravo e canela têm ganhado destaque devido às múltiplas possibilidades de aplicação como agente antimicrobiano, antioxidante e inseticida (López et al., 2005; Tomaino et al., 2015; Correa et al., 2015). Embora possa haver variações na composição química dos óleos relacionadas à espécie vegetal utilizada, ao processo de extração e outros fatores, destaca-se, na composição química dos óleos essenciais extraídos dos gêneros *Syzigium* e *Eugenia* (cravo), *Cinnamomum* (canela) e *Ocimum*

(manjerição), a presença em comum do componente majoritário, isto é, em maior quantidade, o eugenol (4-Alil-2-metoxifenol) (Figura 1) (Tabela 1). Diversos trabalhos indicam a eficiência do uso dos óleos essenciais de cravo, de canela e do próprio componente majoritário eugenol para controle de insetos-praga de grãos armazenados (Tabelas 2). Entretanto, até o presente momento, os trabalhos foram realizados na ausência ou com pequenas quantidades de grãos, por exemplo, o suficiente para servir de alimento para os insetos (Lee et al., 2001). Dessa forma, não é possível avaliar o transporte de massa do óleo essencial, seus componentes e a eficiência da fumigação com maior quantidade de grãos.

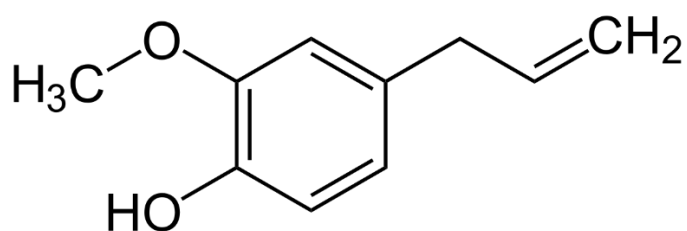


Figura 1. Eugenol C₁₀H₁₂O₂ (4-Alil-2-metoxifenol).

Tabela 1. Presença de eugenol nos óleos essenciais de cravo, canela e manjerição

Origem	% eugenol	Referência
Folhas de <i>Syzygium aromaticum</i>	94,41	Raina et al., 2001
<i>Syzygium aromaticum</i> L	92,94	Viteri Jumbo et al., 2014
Brotos de <i>Eugenia caryophyllata</i> L. Merr. & Perry (Myrtaceae)	88,6	Chaieb et al., 2007a
<i>Syzygium aromaticum</i> L.	85,85	Viuda-Martos et al., 2007
<i>Eugenia caryophyllata</i>	82,6	Tomaino et al., 2005
Brotos de <i>Syzygium aromaticum</i> de Madagascar	82,6	Srivastava et al., 2005
<i>Syzygium aromaticum</i>	82,0	López et al., 2005
Folhas de <i>Syzygium aromaticum</i> de Madagascar	82,0	Srivastava et al., 2005

Origem	% eugenol	Referência
Folhas de <i>Syzygium aroinaticurit</i>	78,1	Pino et al., 2001

Tabela 1. Presença de eugenol nos óleos essenciais de cravo, canela e manjeriço (continuação)

Origem	% eugenol	Referência
<i>Syzygium aromaticum</i>	78,0	Prashar et al., 2006
Folhas de <i>Eugenia caryophyllus</i>	76,8	Jirovetz et al., 2006
Folhas de <i>Syzygium caryophyllatum</i> L.	74,28	Bhuiyan et al., 2010
Brotos de <i>Syzygium aromaticum</i> da Índia	70,0	Srivastava et al., 2005
Brotos de <i>Syzygium aroinaticurit</i>	69,8	Pino et al., 2001
Brotos de <i>Syzygium caryophyllatum</i>	49,71	Bhuiyan et al., 2010
Brotos de <i>E. caryophyllata</i> Thunb	48,82 – 58,2	Guan et al., 2007
Folhas de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	79,75	Wang et al., 2009
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	67,0	López et al., 2005
Folhas de <i>Cinnamomum pauciflorum</i>	54,74	Wang et al., 2009
Folhas de <i>Cinnamomum burmannii</i>	17,62	Wang et al., 2009
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	6,72	Tomaino et al., 2005
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	93,9	Sartoratto et al., 2004
<i>Ocimum basilicum</i> L.	14,2	Tomaino et al., 2005

Tabela 2. Estudos de óleo essencial de cravo, canela e eugenol para insetos pragas de grãos armazenados

Composto avaliado	% eugenol	Grão	Inseto	Dose	DL ₅₀	DL ₉₅	Mortalidade alcançada	Aplicação	Referência
Óleo essencial de cravo	ND	Arroz	<i>S. oryzae</i>	ND	>150 $\mu\text{L L}^{-1}_{\text{ar}}$	ND	ND	F	Lee et al., 2001
Eugenol	ND	Arroz	<i>S. oryzae</i>	ND	50,7 $\mu\text{L L}^{-1}_{\text{ar}}$	129 $\mu\text{L L}^{-1}_{\text{ar}}$	ND	F	Lee et al., 2001
Óleo essencial de cravo	92,94	200 g Feijão	<i>Acanthoscelides obtectus</i> Say	ND	43,6 $\mu\text{L kg}^{-1}$	196,6 $\mu\text{L kg}^{-1}$	ND	C	Viteri Jumbo et al., 2014
Óleo essencial de canela	90,40	200 g Feijão	<i>Acanthoscelides obtectus</i> Say	ND	46,8 $\mu\text{L kg}^{-1}$	160,7 $\mu\text{L kg}^{-1}$	ND	C	Viteri Jumbo et al., 2014
Eugenol	98,0	250 g Milho e trigo	<i>S. granarius</i> , <i>S. zeamais</i> , <i>T. castaneum</i> , <i>P. truncatus</i>	0 a 10 $\mu\text{L kg}^{-1}$	ND	ND	100%	C	Obeng-Ofori e Reichmuth, 1997

ND: Não disponível. F: Fumigante. C: Contato

Tabela 2. Estudos de óleo essencial de cravo, canela e eugenol para insetos pragas de grãos armazenados (continuação)

Óleo essencial de cravo	ND	100 g Trigo	<i>S. oryzae</i> , <i>R. dominica</i>	25 a 200 ppm	ND	ND	100%	C	Sighamony et al., 1986
Eugenol	ND	Trigo e grão de bico	<i>S. oryzae</i> , <i>R. dominica</i> , <i>T. castaneum</i> , <i>O. surinamensis</i> , <i>C. chinensis</i>	0 a 10 $\mu\text{L L}^{-1}_{\text{ar}}$	ND	ND	100%	F	Ogendo et al., 2008

ND: Não disponível. F: Fumigante. C: Contato

2.2. Difusão

A difusão é o fenômeno de transferência de massa que ocorre devido ao gradiente de concentração da espécie de interesse no ambiente, ou seja, o gradiente de concentração de uma espécie em um ambiente é o potencial motriz para transporte dessa espécie (Cremasco, 2002; Wankat, 2011). A evaporação natural da água para o ar seco é um exemplo típico de difusão. Situações em que há um movimento mecânico atuando para a movimentação global das massas, por exemplo, um ventilador em uma sala forçando a circulação do ar, fogem do escopo da difusão (Incropera et al., 2008).

A modelagem do fenômeno de difusão, em geral, baseia-se nas leis e considerações fundamentais da difusão, desenvolvidas por Adolf Fick. (Fick, 1855; Fick, 1995). A partir das formas mais gerais das Leis de Fick (Equação 1 - conhecida como 1ª Lei de Fick e Equação 2 – conhecida como 2ª Lei de Fick), outras equações foram propostas para descrever os fenômenos de difusão observados em diferentes situações ao longo da história.

$$J_1 = A j_1 = -AD \frac{\partial c_1}{\partial z} \quad \text{Eq. 1}$$

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c_1}{\partial z^2} + \frac{1}{A} \frac{\partial A}{\partial z} \frac{\partial c_1}{\partial z} \right) \quad \text{Eq. 2}$$

Em que J_1 é o fluxo total unidimensional, A é a área da seção transversal ao fluxo da difusão, j_1 é o fluxo por unidade de área, c_1 é a concentração, z é a distância, t é o tempo e D é o coeficiente de difusão.

Conhecer o comportamento difusivo de um possível agente inseticida é importante para determinar o sucesso ou falha do tratamento. O comportamento da fosfina (PH_3) e do brometo de metila, produtos tradicionalmente utilizados como fumigantes no armazenamento de grãos, é bem descrito na literatura (Banks, 1990; Mills et al., 2000; Ridley et al., 2011). Quando os parâmetros de difusão dos fumigantes são bem determinados, os *softwares* de simulação podem ser úteis para modelagem desses fumigantes na massa de grãos. Considerando o coeficiente de difusão da fosfina e outros parâmetros determinados previamente, Isa et al. (2016) realizaram a simulação do comportamento da fosfina em silos cilíndricos não herméticos. A descoberta do potencial de outros compostos para fumigação de

grãos armazenados tem motivado a busca por determinar o comportamento dessas novas alternativas, como o ozônio (Santos, 2008).

Embora diversos trabalhos indiquem a eficiência como fumigante dos óleos essenciais e seus componentes, apenas o transporte de isotiocianato alilo (AITC), componente majoritário do óleo essencial de mostarda, em grãos de milho foi avaliado por Paes et al. (2011), concluindo que o transporte de AITC através da massa de grãos é lento devido ao seu baixo coeficiente de difusão. De fato, há uma lacuna de conhecimento na aplicação de óleos essenciais para segurança alimentar. É preciso avançar na ciência aplicada de segurança alimentar com óleos essenciais e avaliar, em condições próximas a realidade, a sua eficiência (Isman 2017; Koutsaviti et al., 2018).

A maior parte dos bioensaios realizados para avaliar a eficiência como fumigante tem sido realizada na ausência ou com pequena quantidade de grãos, o que negligencia a interação entre os óleos essenciais e seus constituintes com os grãos (Tabela 2).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pós-Colheita do setor de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola e no Laboratório de Química Analítica (LAQUA), do Departamento de Química, localizados no campus Viçosa da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.1. Reagentes e soluções

Foram utilizados eugenol ReagentPlus® 99% (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), óleo essencial de cravo extraído mediante destilação a vapor das folhas de *Eugenia caryophyllata* T. adquirido do Mundo dos Óleos (Brasil) e acetonitrila Chromasolv® $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

3.2. Quantificação do eugenol

Para quantificação e caracterização do eugenol, utilizou-se a técnica de microextração em fase sólida (MEFS) associada à análise em cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama (CG/DIC) (GC2014, Shimadzu, Japão).

Para otimização do método MEFS-CG/DIC, avaliou-se a afinidade do eugenol com cinco diferentes fibras recobertas com os seguintes materiais: divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) *stableflex* de 50/30 μm , PDMS/DVB de sílica fundida de 65 μm , PDMS de sílica fundida de 7 μm , poliacrilato (PA) de sílica fundida de 85 μm e PDMS de sílica fundida de 100 μm (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Para avaliação da capacidade de extração, as cinco fibras foram expostas, por 120 s ao eugenol, posteriormente quantificado em CG/DIC. Após a adsorção, a fibra de MEFS foi imediatamente inserida no injetor do cromatógrafo. A operação das fibras foi realizada com auxílio de um amostrador manual para MEFS (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

As condições cromatográficas para quantificação do eugenol foram: coluna capilar DB-5 de 30 m de comprimento com 0,25 mm de diâmetro interno e espessura de filme de 0,10 μm , nitrogênio como gás de arraste com fluxo de 2,03 mL min^{-1} , temperatura do injetor de 220 $^{\circ}\text{C}$ e do detector por ionização em chama de 270 $^{\circ}\text{C}$. Temperatura inicial da coluna de 40 $^{\circ}\text{C}$ com aumento de 30 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 240 $^{\circ}\text{C}$ e mantida nessa temperatura por 1 min. O tempo total de análise foi de 8 min. Após cada análise, as fibras foram mantidas no injetor para a dessorção térmica garantir que não houvesse analito adsorvido que pudesse interferir nas leituras seguintes.

Para validação da técnica de microextração em fase sólida para determinação do eugenol, avaliou-se os parâmetros de linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

Para quantificação do eugenol, a curva analítica do método foi construída a partir de nove diferentes concentrações de eugenol em acetonitrila (0,39 - 4142,58 $\mu\text{L L}^{-1}$) e suas respostas cromatográficas, avaliadas em duplicata. Quando necessário, as diluições do eugenol foram realizadas em acetonitrila, em *vials* de 20,0 mL, com agitação em *vórtex* por 1 min e imediata exposição da fibra após a agitação. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de determinação obtido a partir da regressão linear dos pontos da curva analítica. Os limites de detecção (LD) e

quantificação (LQ) foram calculados a partir do desvio padrão do coeficiente linear da equação (s) e do coeficiente angular da curva analítica (S) (Equações 3 e 4). A precisão foi avaliada através do coeficiente de variação (CV) e repetitividade em três diferentes níveis de concentração com seis repetições. A exatidão foi avaliada a partir de ensaios de recuperação com seis repetições em três diferentes níveis de concentração (Ribani et al., 2004).

$$LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad \text{Eq. 3}$$

$$LQ = 10 \frac{s}{S} \quad \text{Eq. 4}$$

Em que s é o desvio padrão do coeficiente linear e S é o coeficiente angular da curva analítica.

3.3. Difusão

A difusão do eugenol através de 5,5 kg de grãos de arroz em casca (*O. sativa*) cultivar BRS MG Rubelita (EPAMIG, Brasil) foi avaliada a partir do eugenol 99% e a partir do óleo essencial de cravo.

Para determinação da difusão, utilizou-se uma adaptação do protótipo da célula de diafragma de Stokes proposto por Cussler (1997) (Figura 2). Além de ressaltar a importância da sensibilidade do método a ser escolhido para quantificar a variação da concentração da substância em estudo (e não necessariamente o valor da concentração em si), uma das condições necessárias para aplicação do modelo matemático para determinação do coeficiente de difusão é que a concentração da substância na base do protótipo seja constante e conhecida. A difusão do eugenol em grãos de arroz foi avaliada a partir de duas fases líquidas: eugenol (99%) (EUG) e óleo essencial de cravo (OEC). Na base da coluna de difusão foi adaptado um kitassato, com septo de borracha na entrada lateral, ligado à coluna de difusão através de uma válvula tipo bola. Ao kitassato, foram adicionados 15 mL de eugenol 99% ou do óleo essencial de cravo e uma barra magnética para agitação. Esse procedimento foi realizado para garantir uma atmosfera com concentração constante de eugenol e que a volatilização do eugenol não fosse cineticamente limitante para a difusão através da coluna de grãos. Além disso, a concentração do eugenol imediatamente antes da câmara de difusão foi monitorada ao longo do

experimento. Com o sistema em agitação e fechado, a saturação do kitasato com eugenol foi avaliada medindo-se regularmente a concentração de eugenol através do septo de borracha na entrada lateral do kitasato. Os experimentos foram realizados em ambiente climatizado com controle de temperatura em $21 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

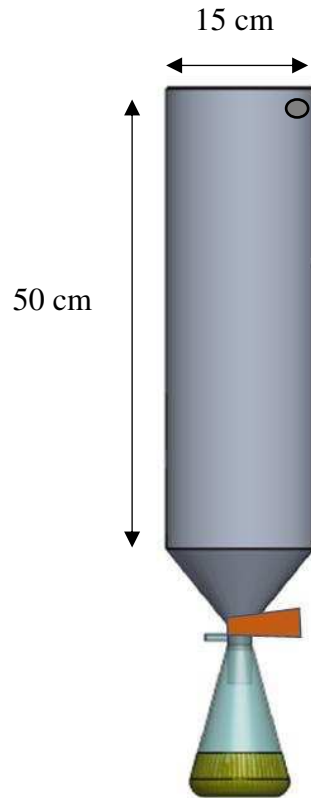


Figura 2. Adaptação do protótipo da célula de diafragma de Stokes para difusão do eugenol.

Após saturação do interior do kitasato com eugenol, a válvula de ligação entre o kitasato e a câmara de difusão foi aberta para possibilitar a passagem do eugenol através da coluna de grãos. A partir desse momento, a concentração do eugenol foi avaliada, utilizando-se o método MEFS-CG/DIC previamente otimizado e validado, no topo da coluna de grãos. Para determinação do coeficiente de difusão, partiu-se da segunda Lei de Fick (Equação 5), resolvida para o protótipo da célula de diafragma de Stokes proposto por Cussler (1997) (Equações 6 e 7).

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left[D \frac{\partial C}{\partial x} \right] \quad \text{Eq. 5}$$

em que C é a concentração, t é o tempo, D é o coeficiente de difusão e x é a espessura da camada pela qual ocorre a difusão.

$$D = \frac{1}{\beta t} \ln \left(\frac{C_{1,\text{base}}^0 - C_{1,\text{topo}}^0}{C_{1,\text{base}} - C_{1,\text{topo}}} \right) \quad \text{Eq. 6}$$

$$\beta = \frac{A}{l} \left(\frac{1}{V_{\text{base}}} + \frac{1}{V_{\text{topo}}} \right) \quad \text{Eq. 7}$$

Em que D é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{min}^{-1}$), $C_{1,\text{base}}^0$ é a concentração de eugenol no instante inicial na base do protótipo (mg L^{-1}), $C_{1,\text{topo}}^0$ é a concentração de eugenol no instante inicial no topo do protótipo (mg L^{-1}), $C_{1,\text{base}}$ é a concentração de eugenol na base do protótipo ao longo do tempo (mg L^{-1}), $C_{1,\text{topo}}$ é a concentração de eugenol no topo do protótipo ao longo do tempo (mg L^{-1}), t é o tempo (min), β é a constante geométrica do protótipo ($3,66 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-2}$), A é a área da seção transversal ao fluxo da difusão ($176,71 \text{ cm}^2$), l é altura da camada de grãos através da qual ocorre a difusão (50 cm), V_{base} é o volume da base do protótipo ($1068,52 \text{ cm}^3$) e V_{topo} é o volume da parte superior do protótipo ($9984,37 \text{ cm}^3$).

Para confirmação do composto quantificado, analisou-se, em cromatógrafo à gás Agilent 7820A acoplado ao espectrômetro de massas 5977B (CG-EM), a fibra de SPME exposta às fases líquida e volátil no kitassato e após a difusão pela massa de grãos.

3.4. Caracterização por CG-EM do eugenol em diferentes fases

Para caracterizar as fases líquida, volátil e após a difusão pela massa de grãos, analisou-se a fibra de MEFS por CG-EM. A fibra foi exposta às diferentes fases do eugenol 99% e do óleo essencial de cravo e, imediatamente após, desorvidas termicamente no injetor do cromatógrafo a gás. As condições cromatográficas para caracterização foram: coluna capilar HP-5ms de 30 m de comprimento com 0,25 mm de diâmetro e espessura de 0,25 μm , hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura do injetor de $220 \text{ }^\circ\text{C}$. A temperatura inicial da coluna foi de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ com aumento de $25 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $250 \text{ }^\circ\text{C}$ e mantida nessa temperatura por 1 min. O cromatógrafo foi operado em modo *full scan* com razão de *split* de 1:20. O tempo total de análise foi de 10 min. Após cada leitura as fibras foram continuamente submetidas à desorção térmica até garantir que não houvesse analito adsorvido que pudesse interferir nas leituras seguintes.

3.5. Bioensaio de mortalidade

Para avaliar o efeito da difusão da fase volátil do eugenol 99% e do óleo essencial de cravo sobre a mortalidade de *S. zeamais*, avaliou-se a mortalidade dos insetos expostos aos períodos de 4 e 7 dias. Para cada unidade experimental, 50 insetos adultos com até três semanas de vida foram colocados nas gaiolas com grãos de arroz e dispostos em duas camadas verticais no protótipo de difusão (Figura 3). Cada gaiola com os grãos e insetos foi considerada como uma repetição, sendo usadas três repetições para cada posição ao longo da coluna de grãos. Os espaços entre as gaiolas foram preenchidos com grãos de arroz livres de insetos. As gaiolas em formato cilíndrico, com base e topo perfurados e comprimento de 20 cm, foram colocadas verticalmente no protótipo, ocupando as posições de 1 a 21 cm (base) e 22 a 42 cm (topo) a partir da base do protótipo.

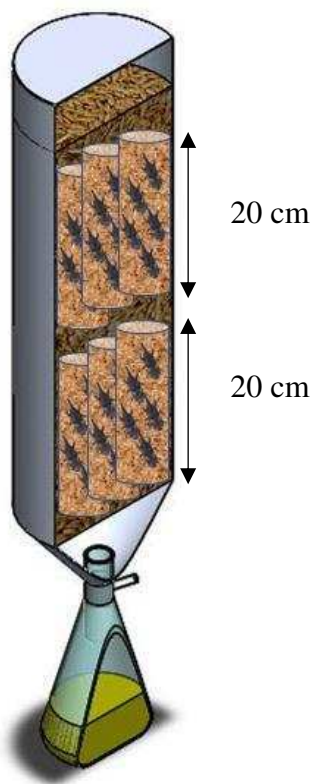


Figura 3. Protótipo de difusão do eugenol através de gaiolas preenchidas com arroz infestado com *S. zeamais*.

Foram adicionados 15 mL da fase líquida em estudo, eugenol 99% ou óleo essencial de cravo, ao kitasato e conectado ao protótipo de difusão com a válvula imediatamente acima ainda fechada. O controle foi realizado com a válvula aberta

para livre difusão de ar ambiente. A fase líquida foi mantida em agitação com a válvula fechada por 10 e 30 min, para o eugenol 99% e óleo essencial de cravo, respectivamente, para garantir homogeneidade da concentração de eugenol no interior do kitasato. Após, a válvula foi aberta para permitir a difusão da fase volátil. Ao fim dos períodos de 4 e 7 dias de exposição, as gaiolas foram retiradas e avaliou-se a mortalidade de *S. zeamais*.

3.6. Análises estatísticas

As respostas cromatográficas de cada fibra de MEFS exposta ao eugenol foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey ($p > 0,05$). Para avaliar o perfil de tempo de extração, as respostas cromatográficas após exposição da fibra por 30, 120, 240, 300 e 360 s ao eugenol foram submetidas à ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p > 0,05$). O *software* SigmaPlot (Systat Software Inc., San Jose, EUA) foi utilizado para avaliação dos dados.

Os dados obtidos com a saturação do kitasato por eugenol foram avaliados com o modelo *plateau* quadrático com auxílio do *software* R (R Core Team, Viena, Áustria).

Os coeficientes de difusão do eugenol a partir do eugenol 99% e do óleo essencial de cravo foram estatisticamente comparados através da análise dos coeficientes das equações de regressão dos dados de difusão (Meier e Zünd, 2005). Em resumo, duas equações de regressão escritas genericamente pelas Equações 8 e 9, a hipótese nula do teste será dada pela igualdade entre os coeficientes angulares, ou seja, $H_0: \beta_{11} = \beta_{12}$.

$$Y_1 = \beta_{01} + \beta_{11}X + E \quad \text{Eq. 8}$$

$$Y_2 = \beta_{02} + \beta_{12}X + E \quad \text{Eq. 9}$$

em que E são os erros independentes e identicamente distribuídos como uma $N(0, \sigma^2)$.

A estatística do teste é dada pela Equação 10, que deve ser comparada ao $t_{\text{crítico}} = t_{\alpha/2,df}$, em que $df = N_1 + N_2 - 4$ (N_1 e N_2 são o número de pontos utilizados em cada um dos modelos de regressão).

$$t_{\text{calc}} = \frac{|\beta_{11} - \beta_{12}|}{\sqrt{S_{\beta_{11}}^2 + S_{\beta_{12}}^2}} \quad \text{Eq. 10}$$

Para o caso em que $t_{\text{calc}} < t_{\text{crítico}}$, a hipótese nula H_0 não deve ser rejeitada e um estimador $\hat{\beta}_1$, comum às duas equações de regressão ($\hat{\beta}_1 = \beta_{11} = \beta_{12}$) é calculado pela Equação 11.

$$\hat{\beta}_1 = \frac{(n_1 - 1)S_{\beta_{11}}^2\beta_{11} + (n_2 - 1)S_{\beta_{12}}^2\beta_{12}}{(n_1 - 1)S_{\beta_{11}}^2 + (n_2 - 1)S_{\beta_{12}}^2} \quad \text{Eq. 11}$$

A mortalidade de *S. zeamais* tratados com diferentes tempos de exposição e fumigante foi corrigida pela fórmula de Abbott (1925) e submetida à ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização e validação do método para quantificação do eugenol

A escolha da fibra de microextração em fase sólida com maior capacidade de extração do eugenol baseou-se na análise da área da resposta cromatográfica de cada fibra exposta por 2 min ao analito (Figura 4). Imediatamente após a exposição da fibra ao eugenol, o analito foi termicamente desorvido por meio de injeção e exposição da fibra de MEFS no injetor do cromatógrafo a gás (Shimadzu GC2014, Japão). A fibra que apresentou resposta com maior área cromatográfica quando exposta ao eugenol, e menor coeficiente de variação entre as triplicatas (3,27%), foi a fibra recoberta com divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) *stableflex* de 50/30 μm .

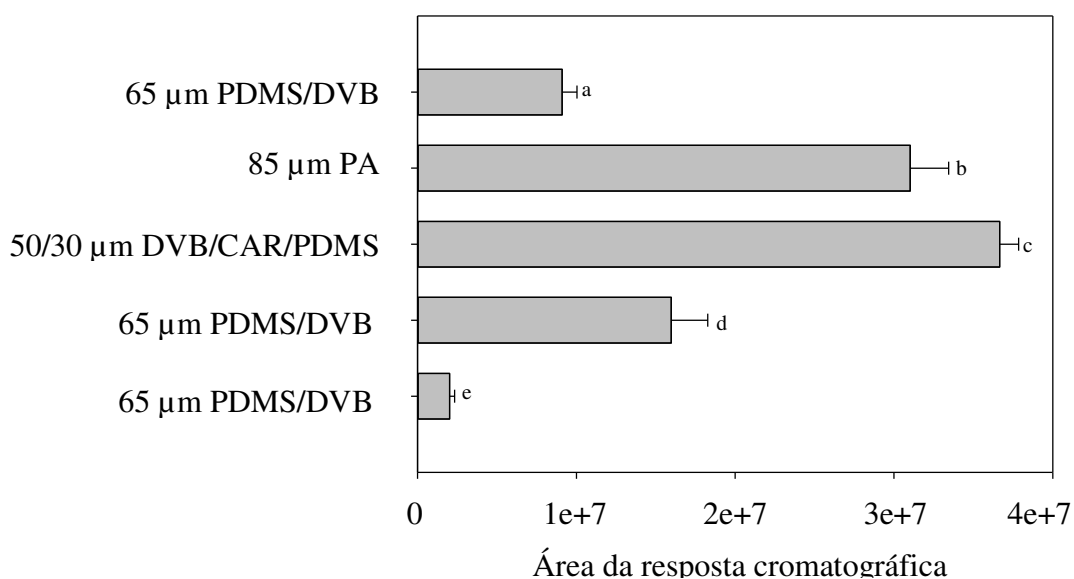


Figura 4. Resposta cromatográfica para as cinco diferentes fibras de MEFS expostas ao eugenol. A barra de erro representa o desvio padrão entre três repetições.

O tempo de exposição da fibra ao analito foi escolhido com base no perfil de resposta cromatográfica (Figura 5). A resposta cromatográfica para o tempo de exposição de 2 min foi equivalente a 97,7% da resposta máxima observada. Dessa forma, a escolha do tempo de 120 s de exposição garante a praticidade e boa resposta analítica necessárias para a aplicação do método.

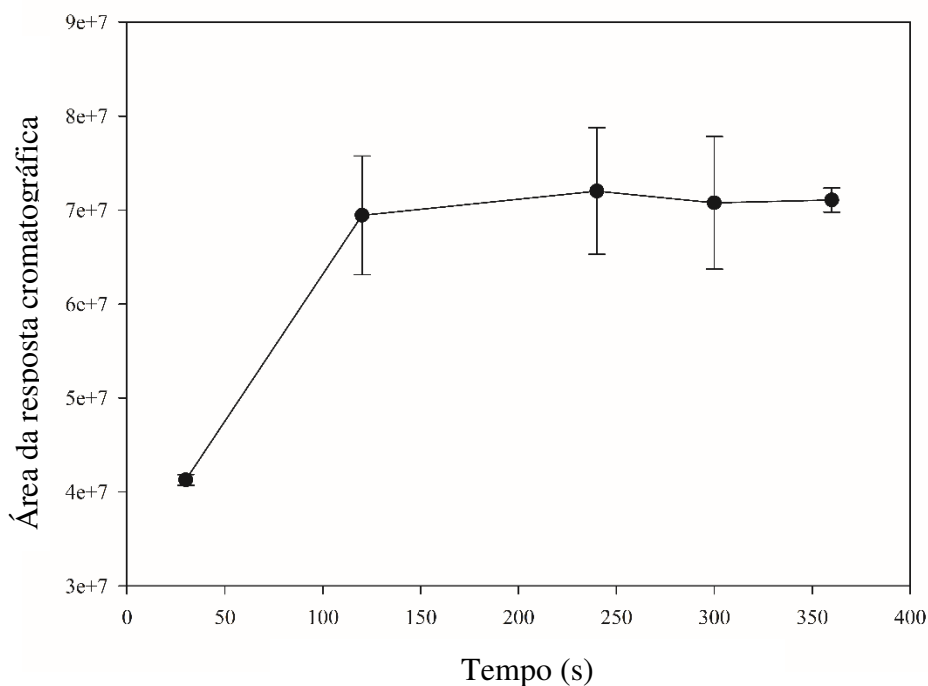


Figura 5. Perfil de resposta cromatográfica da fibra de MEFS recoberta com divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) *stableflex* de 50/30 µm exposta por diferentes períodos ao eugenol.

A curva analítica do eugenol empregando a fibra recoberta com divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) *stableflex* de 50/30 µm foi obtida a partir da exposição desta por 2 min à nove diferentes concentrações de eugenol (0,39; 1,16; 3,85; 7,69; 15,37; 139,67; 271,02; 1.094,62; 4.142,58 µL L⁻¹) em duplicatas (Figura 6).

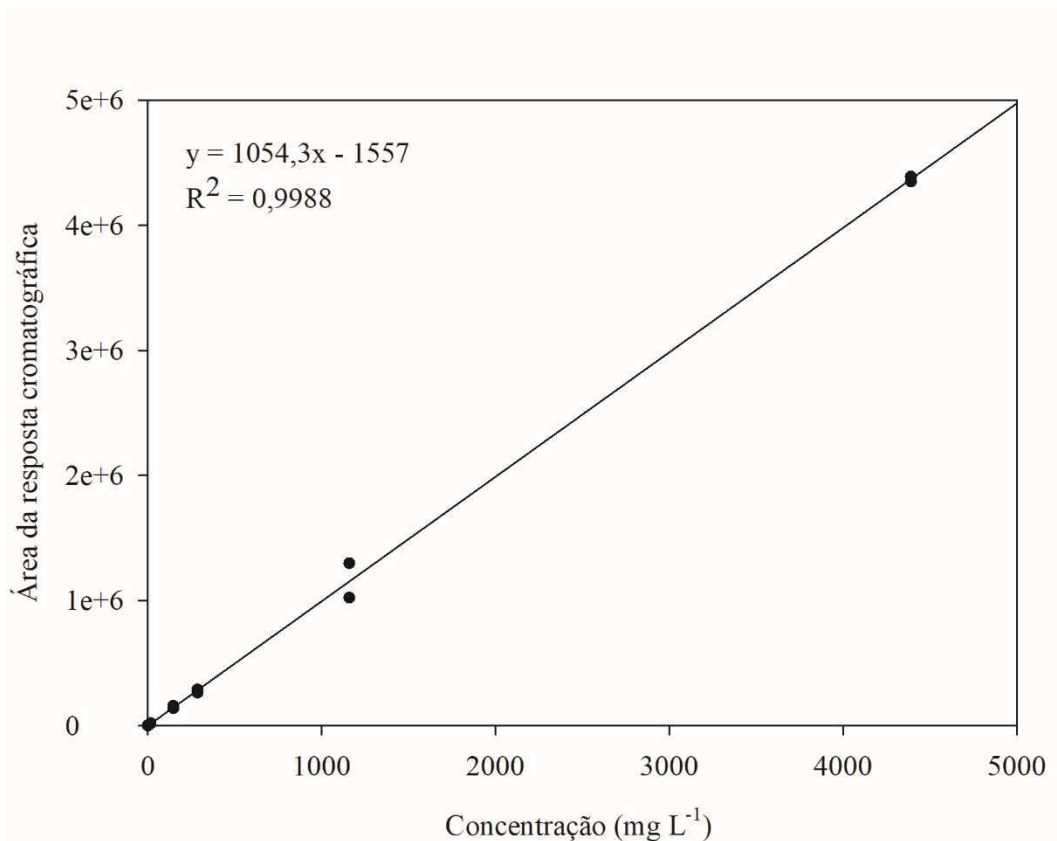


Figura 6. Curva analítica da resposta cromatográfica em função da concentração de eugenol em $\mu\text{L L}^{-1}$.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), calculados de acordo com Ribani et al. (2004) foram de 0,82 e 2,48 $\mu\text{L L}^{-1}$, respectivamente. A faixa de linearidade do método foi de 2,48 a 4.216,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ ($R^2 = 0,9988$). A precisão e exatidão foram avaliadas nos níveis de 139,67, 271,02 e 1.094,62 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Tabela 3). Para os três níveis de concentração avaliados, a recuperação média variou de 97,86 a 101,88%, estando dentro dos padrões aceitáveis para métodos cromatográficos (70 – 120%) (Ribani et al., 2004). O método apresentou bons níveis de recuperação, próximos a 100%, e boa precisão, com coeficientes de variação inferiores a 8,30%. Para a análises cromatográficas em baixas concentrações, são aceitos coeficientes de variação até 20% com recuperação entre 70 e 120% (Ribani et al., 2004).

Tabela 3. Precisão e exatidão do método de SPME-GC/FID para quantificação de eugenol

Concentração ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Recuperação média (%)	Concentração média ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Desvio padrão	C.V. (%)
139,67	97,86	136,68	4,37	3,20
271,02	101,88	276,12	22,91	8,30
1.094,62	99,26	1.086,50	89,93	8,28

C.V.: coeficiente de variação.

4.2. Difusão do eugenol na massa de grãos

A difusão do eugenol em arroz com casca foi avaliada utilizando-se uma adaptação com um kitasato ao protótipo da célula de diafragma de Stokes (Cussler, 1997) (Figura 7).



Figura 7. Adaptação do protótipo da célula de diafragma de Stokes para determinação do coeficiente de difusão do eugenol em arroz com casca

Foram avaliadas duas fases líquidas como fontes de eugenol volátil: eugenol 99% (EUG) e óleo essencial de cravo (OEC). Ao utilizar o eugenol com alta pureza, a saturação da fase volátil ocorreu com 6,05 min, e concentração de 4.067,24 mg L⁻¹ de eugenol (Figura 8a). Para o óleo essencial de cravo como fase líquida, a saturação do kitasato com eugenol ocorreu com 29,09 min e concentração de 3.844,95 mg L⁻¹ (Figura 8b). Para garantir a concentração constante de eugenol na fase volátil antes de iniciar a difusão, a fase líquida (15 mL de EUG ou 15 mL de OEC) foi colocada no kitasato e mantida em agitação, com a válvula fechada, por 10 e 30 min para o eugenol e óleo essencial de cravo, respectivamente.

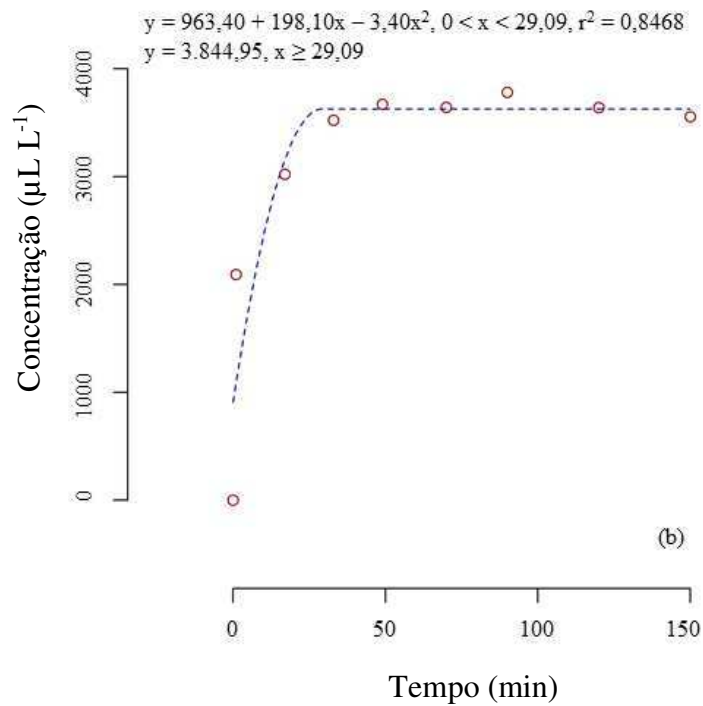
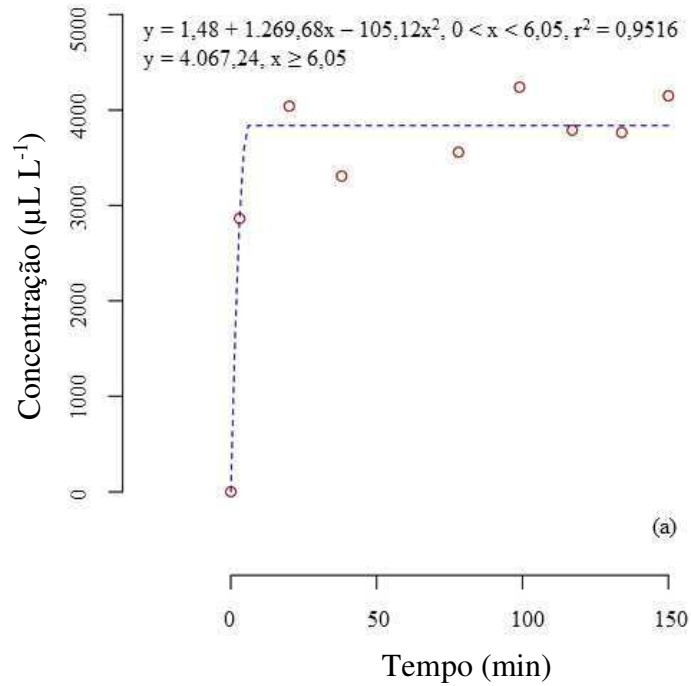


Figura 8. Saturação do kitasato com eugenol para as fases líquidas: (a) eugenol 99% e (b) óleo essencial de cravo.

Os valores dos coeficientes angulares da Equação 6 ajustada para a difusão do eugenol a partir do eugenol 99% (Figura 9a) e a partir do óleo essencial de cravo (Figura 9b) foram $2,40 \times 10^{-4}$ e $2,22 \times 10^{-4}$, respectivamente. A partir da relação

com a constante geométrica do protótipo, obteve-se os coeficientes de difusão do eugenol a partir do eugenol 99% ($D_{\text{eug(EUG)}} = 6,55 \times 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ min}^{-1}$) e a partir do óleo essencial de cravo ($D_{\text{eug(OEC)}} = 6,06 \times 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ min}^{-1}$).

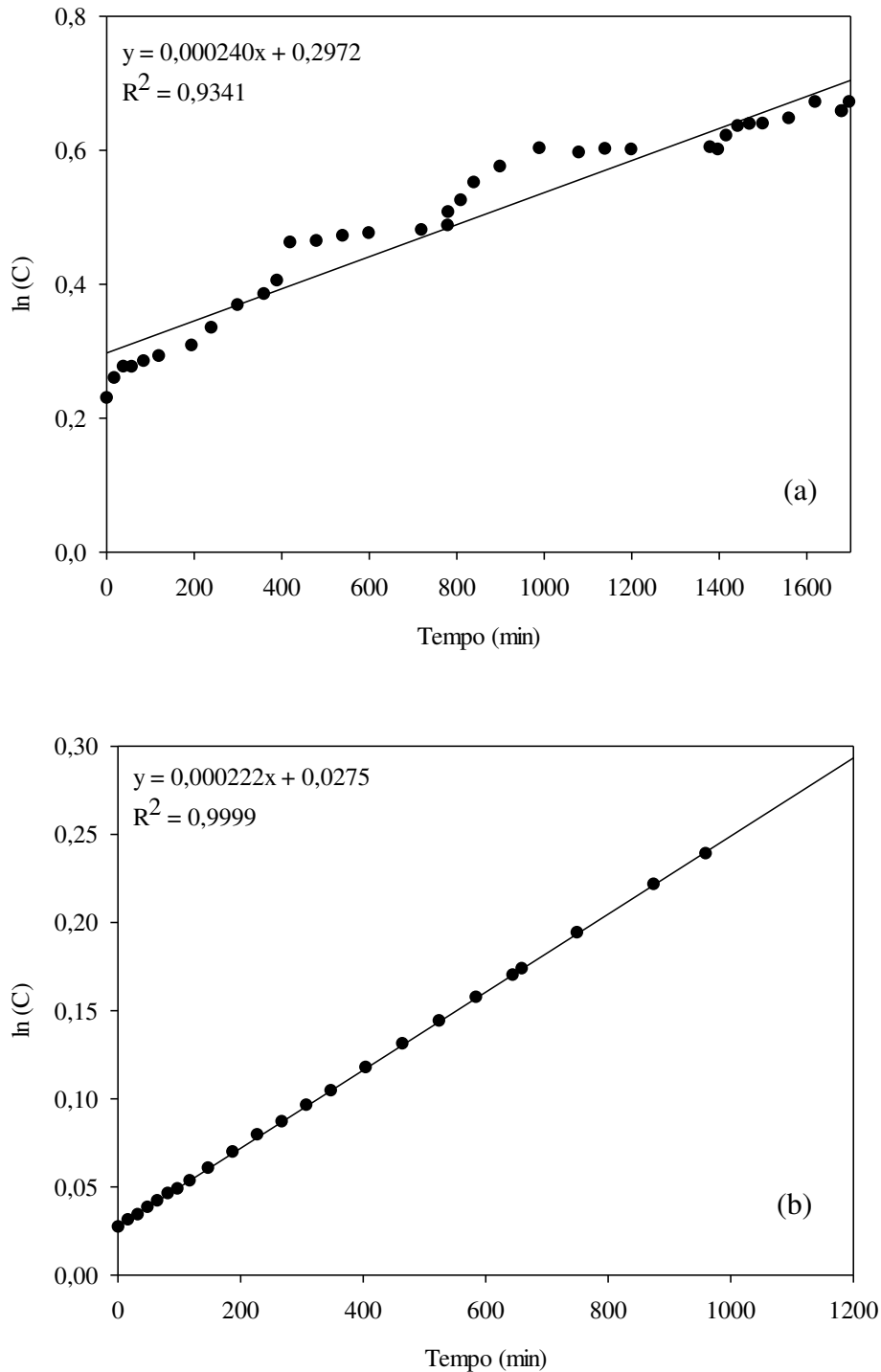


Figura 9. Curva de ajuste da equação de difusão linearizada para os dados de (a) eugenol 99% e (b) óleo essencial de cravo. No gráfico, o termo $\ln(C)$ representa o termo da Equação 6.

Dada a proximidade entre os valores dos coeficientes angulares das equações de regressão ajustadas, utilizou-se o teste de paralelismo das equações de regressão para comparação dos coeficientes angulares. Para as equações de regressão de EUG e OEC, obteve-se $t_{\text{calc}} = 1,66$ e $t_{\text{crítico}} = 2,00$ ($\alpha = 0,05$). Assim, como $t_{\text{calc}} < t_{\text{crítico}}$, a hipótese nula H_0 não deve ser rejeitada. Utilizou-se a Equação 11 para cálculo do estimador $\hat{\beta}_1$, comum às duas equações de regressão ($\hat{\beta}_1 = \beta_{11} = \beta_{12}$).

Assim, como não há diferença estatística ($\alpha = 0,05$) entre os coeficientes angulares das equações de regressão da difusão do eugenol a partir do eugenol 99% e a partir do óleo essencial de cravo, não há diferença estatística entre os coeficientes de difusão do eugenol a partir do EUG e do OEC. Utilizando-se o estimador $\hat{\beta}_1 = 2,39 \times 10^{-4}$ como coeficiente angular da equação de regressão ajustada, obteve-se o coeficiente de difusão efetivo do eugenol em arroz de $D = 6,53 \times 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ min}^{-1}$ ($1,09 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).

Em comparação ao coeficiente de difusão do isotiocianato alilo (AITC), observou-se que, embora apresentem a mesma ordem de grandeza, o eugenol apresentou coeficiente de difusão inferior. Como observado por Paes et al. (2011) ao comparar o AITC com o dióxido de carbono (CO_2), a ordem de grandeza do coeficiente de difusão do AITC foi 10 vezes inferior ao do CO_2 . Quando comparado à fosfina (PH_3), o coeficiente de difusão do eugenol foi aproximadamente 145 vezes inferior (Tabela 4).

Tabela 4. Coeficiente de difusão e propriedades físico-químicas de fosfina, isotiocianato alilo e eugenol

Composto	Coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	Massa molar (g mol^{-1})	Densidade (g cm^{-3})	Referência
PH_3	$1,59 \times 10^{-1}$	33,00	1,18	Mills et al., 2000
AITC	$7,20 \times 10^{-3}$	99,15	1,01	Paes et al., 2011
Eugenol	$1,09 \times 10^{-3}$	164,20	1,06	

4.3. Caracterização do eugenol, do óleo essencial de cravo e suas fases voláteis

Para avaliação qualitativa do eugenol e do óleo essencial de cravo utilizados, bem como dos voláteis presentes na atmosfera promovida por esses produtos, realizou-se a análise destes pelo método MEFS/CG-EM otimizado e validado. Avaliou-se a composição i) do eugenol com alto teor de pureza (99%); ii) da fase volátil do eugenol; iii) do ponto imediatamente acima da coluna de grãos de arroz após difusão do eugenol; iv) do óleo essencial de *E. caryophyllata*; v) da fase volátil do óleo essencial de cravo; vi) do ponto imediatamente acima da coluna de grãos após difusão do óleo essencial de cravo (Figuras 10 e 11). A identificação dos compostos foi realizada a partir da comparação do espectro de massa com o banco de dados NIST 2.2 (Agilent Technologies, Estados Unidos).

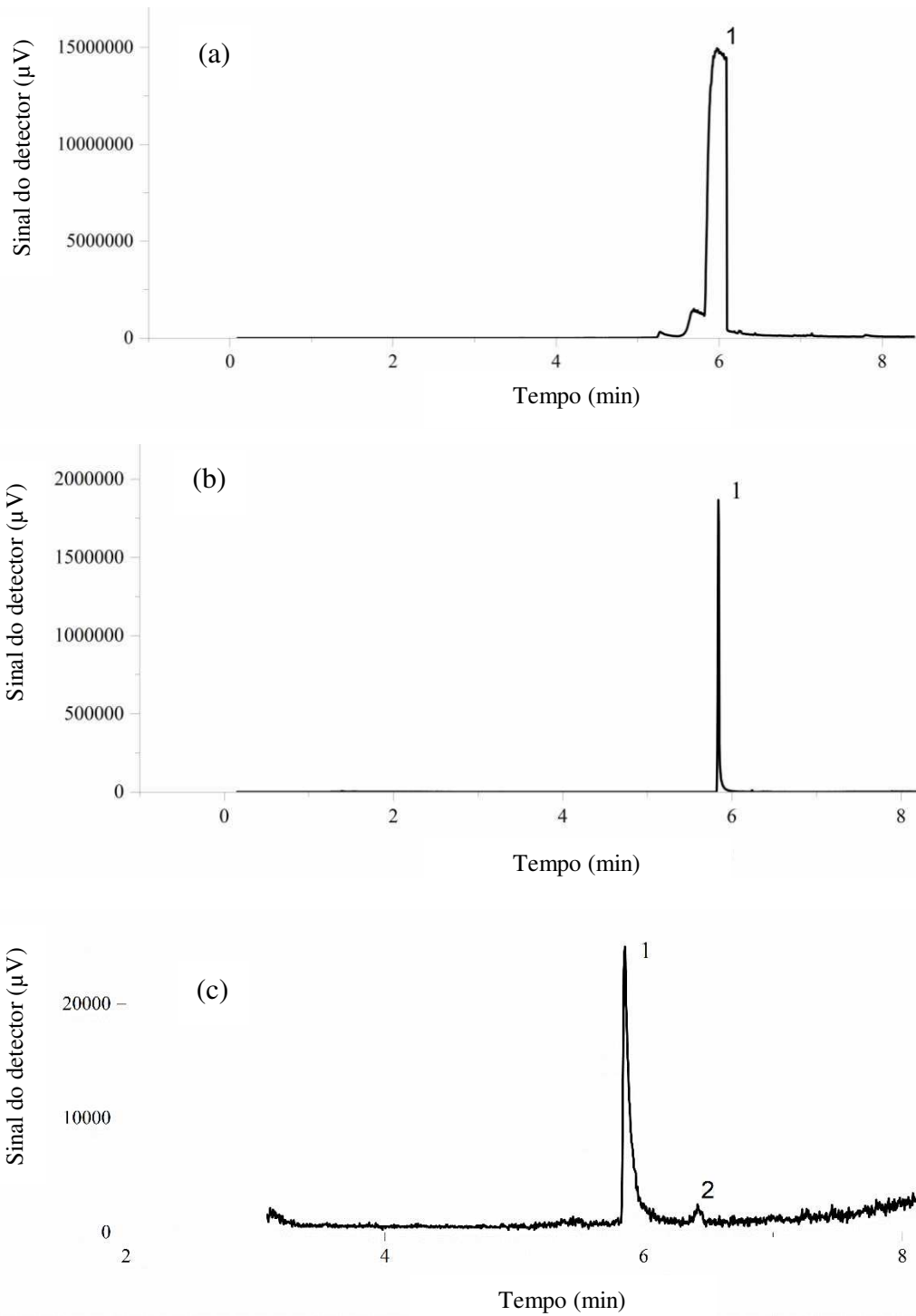


Figura 10. Cromatogramas obtidos no CG-EM para identificação dos componentes das fases (a) líquida, (b) volátil e (c) após difusão de eugenol 99%. 1: Eugenol ($t_R = 5.8$ min), 2: α -cariofileno ($t_R = 6.4$ min).

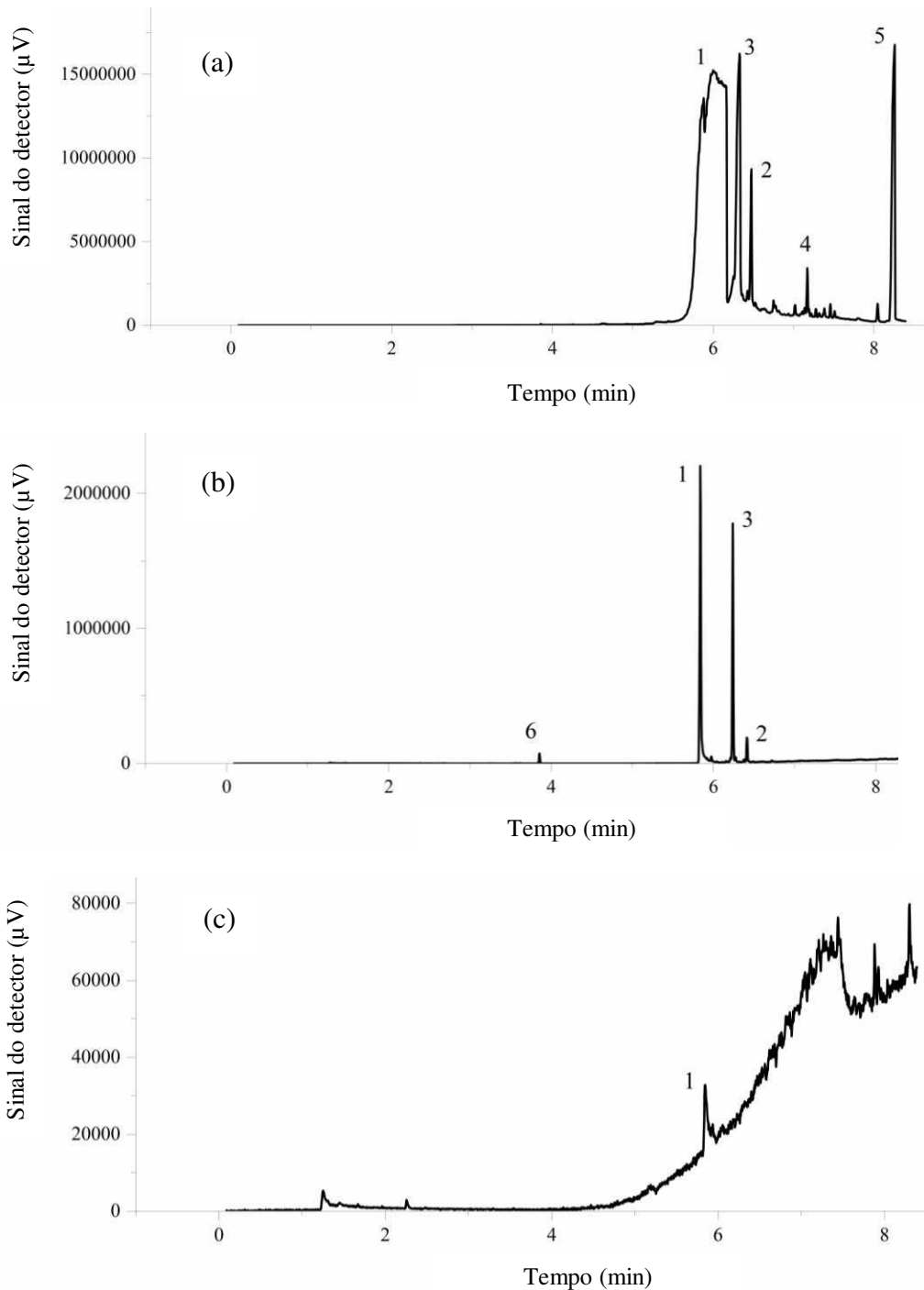


Figura 11. Identificação por CG-EM dos componentes das fases (a) líquida, (b) volátil e (c) após difusão do óleo essencial de cravo. 1: Eugenol ($t_R = 5.8$ min), 2: α -cariofileno ($t_R = 6.4$ min), 3: Cariofileno ($t_R = 6.3$ min), 4: Óxido de cariofileno ($t_R = 7.1$ min), 5: Ácido octanóico ($t_R = 8.2$ min), 6: d-limoneno ($t_R = 3.8$ min).

Embora a fase líquida do óleo essencial de cravo utilizado apresentasse 75,89% de eugenol, na fase volátil observou-se uma redução para 57,53%. O segundo constituinte mais abundante foi o cariofileno, também conhecido como β -

cariofileno. Atividades anti-carcinogênica, antioxidante, anti-diabética e antimicrobiana tem sido associadas ao cariofileno (Basha e Sankaranarayanan, 2016; Dahham et al., 2015; Legault e Pichette, 2007). Apenas na fase volátil foi observada a presença de d-limoneno proveniente do OEC. Apesar de outros compostos terem sido identificados nas fases líquidas e volátil, apenas o eugenol foi identificado após a difusão pela massa de grãos utilizando o OEC. Para o eugenol 99%, apenas o eugenol foi identificado na fase líquida e volátil. Entretanto, após a difusão pela massa de grãos observou-se a ocorrência de α -cariofileno (Tabela 5). Todos os constituintes encontrados já foram relatados no óleo essencial de cravo ou em sua fase volátil (Chaieb et al., 2007b; Wenqiang et al., 2007; Jairoce et al., 2016).

Tabela 5. Identificação dos componentes das fases líquida, volátil e após difusão de eugenol 99% e óleo essencial de cravo

Composto	Eugenol 99%			Óleo essencial de cravo		
	Fase líquida	Fase volátil	Após difusão	Fase líquida	Fase volátil	Após difusão
Eugenol	100,00%	100,00%	95,25%	75,89%	57,53%	100,00%
α -cariofileno	-	-	4,75%	0,58%	4,02%	-
Cariofileno	-	-	-	13,87%	37,03%	-
Óxido de cariofileno	-	-	-	0,90%	-	-
Ácido octanóico (ácido cáprico)	-	-	-	8,76%	-	-
d-limoneno	-	-	-	-	1,42%	-

4.4. Efeito da difusão de eugenol na mortalidade de *S. zeamais*

A mortalidade de *S. zeamais* foi avaliada após 4 e 7 dias de exposição (Figura 12). Para o tempo de exposição de 4 dias, não foram observadas diferenças estatísticas entre à fumigação com o óleo essencial de cravo, eugenol 99% e o tratamento controle com ar ambiente. Entretanto, a fumigação por 7 dias com EUG foi capaz de alcançar aproximadamente 40% de mortalidade de *S. zeamais*. Para o uso de OEC, pelo mesmo período de tratamento, a mortalidade de *S. zeamais* foi reduzida a aproximadamente 16%.

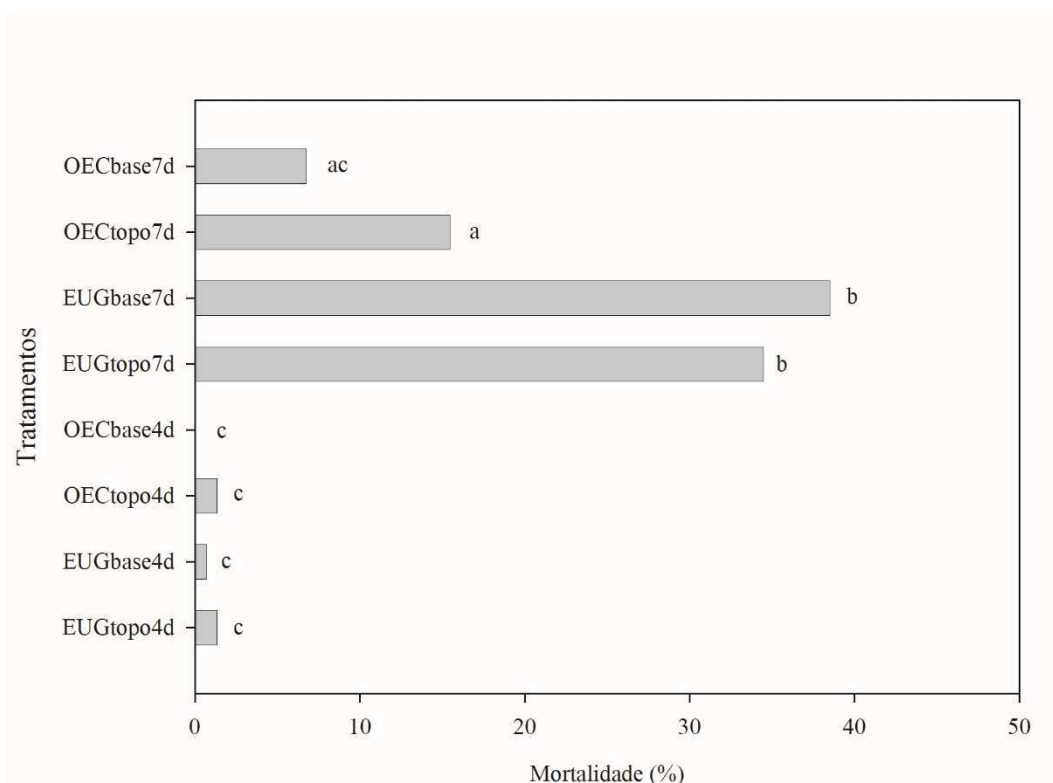


Figura 12. Mortalidade de *S. zeamais* submetido à fumigação com eugenol 99% e óleo essencial de cravo no protótipo de difusão. Barras seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância. EUG: eugenol 99%, OEC: óleo essencial de cravo.

A redução do efeito inseticida entre o composto puro e o óleo essencial já havia sido observada por Lee et al. (2001) ao verificar que a DL_{50} do óleo essencial de cravo foi $> 150 \mu\text{L L}^{-1}$ e para eugenol a DL_{50} foi de $50,7 \mu\text{L L}^{-1}$. Além disso, não se verificou diferenças estatísticas ao avaliar a mortalidade dos insetos, para a mesma fase líquida e período de exposição, em posições diferentes da massa de grãos.

O óleo essencial de cravo e seus constituintes têm importantes efeitos comportamentais e fisiológicos em pragas de grãos armazenados. O consumo de alimento por adultos de *S. zeamais* foi significativamente reduzido quando os insetos foram expostos a doses subletais de eugenol. Além disso, a taxa de crescimento, o consumo de alimentos e a utilização de alimentos por larvas e adultos de *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) também foram reduzidos (Huang et al., 2002). A toxicidade fisiológica do eugenol pode ter inibido a alimentação em adultos de *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae), *T. castaneum* e *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) (Kanda et al., 2017). Ainda, o número total de *S. zeamais* emergentes da geração parental exposta a concentrações sub-letais de óleo essencial de cravo diminuiu com o aumento da concentração do óleo (Silva et al., 2017). De fato, o sistema octopaminérgico parece mediar a atividade inseticida do eugenol (Enan, 2001).

5. CONCLUSÕES

O coeficiente de difusão do eugenol foi determinado a partir de duas fases líquidas como fontes de eugenol volátil: eugenol 99% e óleo essencial de cravo. O coeficiente de difusão do eugenol foi de $1,09 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, independente da fase líquida.

Confirmou-se o eugenol como componente majoritário do óleo essencial de cravo utilizado (75,89%). Entretanto, a proporção de eugenol e os demais componentes do óleo essencial de cravo nas fases líquida e volátil foi diferente. Após a difusão, apenas o eugenol foi identificado na fase volátil.

A mortalidade de *Sitophilus zeamais* submetidos à fumigação com o eugenol 99% e com óleo essencial de cravo alcançou aproximadamente 40% após sete dias de tratamento, independentemente das posições em relação à injeção do eugenol.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265-267, 1925.

ABDELGALEIL, S.A.M.; BADAWY, M.E.I.; SHAWIR, M.S.; MOHAMED, M.I.E. Chemical composition, fumigant and contact toxicities of essential oils isolated from egyptian plants against the stored grain insects; *Sitophilus oryzae* L. and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v.25, n.3, p.639-647, 2015.

BANKS, H.J. Behaviour of gases in grain storages. In: CHAMP, B.R.; HIGHLEY, E.; BANKS, H.J. (Eds.), Fumigation and controlled atmosphere storage of grain: **Proceedings of International Conference**, Singapore, 14–18 February 1989, ACIAR Proceedings No. 25. p. 96–107, 1990.

BASHA, R.H.; SANKARANARAYANAN, C. β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v.245, p.50-58, 2016.

BATTA, Y.A. Control of rice weevil (*Sitophilus oryzae* L., Coleoptera: Curculionidae) with various formulations of *Metarhizium anisopliae*. **Crop Protection**, v.23, n.2, p.103-108, 2004.

BHUIYAN, M.N.I.; BEGUM, J.; AKTER, F. Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzigium caryophyllatum* (L.) Alston). **African Journal of Plant Science**, v.4, n.11, p.451-454, 2010.

BOUGHERRA, H.H., BEDINI, S., FLAMINI, G., COSCI, F., BELHAMEL, K., CONTI, B. *Pistacia lentiscus* essential oil has repellent effect against three major insect pests of pasta. **Industrial Crops and Products**, v.63, p.249-255, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons [Acessado em Maio de 2017]

BOXALL, R.A. Post-harvest losses to insects - a world overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.48, p.137-152, 2001.

BUTELER, M.; SOFIE, S.W.; WEAVER, D.K.; DRISCOLL, D.; MURETTA, J.; STADLER, T. Development of nanoalumina dust as insecticide against *Sitophilus*

oryzae and *Rhyzopertha dominica*. **International Journal of Pest Management**, v.61 n.1, p.80-89, 2015.

CHAIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A.B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherapy Research**, v.21, n.6, p.501-506, 2007a.

CHAIEB, K.; ZMANTAR, T.; KSOURI, R.; HAJLAOUI, H.; MAHDOUANI, K.; ABDELLEY, C.; BAKHROUF, A. Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species. **Mycoses**, v.50, p.403-406, 2007b.

COGBURN, R.R. Susceptibility of varieties of stored rough rice to losses caused by storage insects. **Journal of Stored Products Research**, v.13, n.1, p.29-34, 1977.

COLLINS, P.J.; FALK, M.G.; NAYAK, M.K.; EMERY, R.N.; HOLLOWAY, J.C. Monitoring resistance to phosphine in the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*, in Australia: A national analysis of trends, storage types and geography in relation to resistance detections. **Journal of Stored Products Research**, v.70, p.25-36, 2017.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos – Safra 2017/18**. v.5, n.4. Brasília: Conab. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_01_11_09_53_59_graos_4o_levantamento.pdf [Acessado em janeiro, 2018].

CORREA, Y.D.C.G.; FARONI, L.R.A.; HADDI, K.; OLIVEIRA, E.E.; PEREIRA, E.J.G. Locomotory and physiological responses induced by clove and cinnamon essential oils in the maize weevil *Sitophilus zeamais*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.125, p.31-37, 2015.

CREMASCO, M.A. **Fundamentos de Transferência de massa**. 2ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2002. 725 p.

CUSSLER, E.L., 1997. **Diffusion: mass transfer in fluid systems**. New York: Cambridge University Press. 525 p.

DAGLISH, G.J.; NAYAK, M.K.; PAVIC, H. Phosphine resistance in *Sitophilus oryzae* (L.) from eastern Australia: Inheritance, fitness and prevalence. **Journal of Stored Products Research**, v.59, p.237-244, 2014.

DAHAM, S.S.; TABANA, Y.M.; IQBAL, M.A.; AHAMED, M.B.K.; EZZAT, M.O.; MAJID, A.S.A.; MAJID, A.M.S.A. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v.20, p.11808-11829, 2015.

DAL BELLO, G.; PADIN, S.; LASTRA, C.L.; FABRIZIO, M. Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. **Journal of Stored Products Research**, v.37, n.1, p.77-84, 2001.

DIAO, W.R.; HU, Q.P.; ZHANG, H.; XU, J.G. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food Control**, v.35, p.109-116, 2014.

ENAN, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology**, v.130, p.325-337, 2001.

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> [Acessado em Janeiro, 2018].

FERREIRA, E. 1998. **Manual de identificação de pragas do arroz**. Santo Antônio do Goiás: EMBRAPA-CNPAP. 110 p.

FICK, A. Ueber Diffusion. **Annalen der Physik und Chemie**, v.94, p.59-86, 1855.

FICK, A. On liquid diffusion. **Journal of Membrane Science**, v.100, p.33-38, 1995.

GILLING, D.H.; KITAJIMA, M.; TORREY, J.R.; BRIGHT, K.R. Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. **Journal of Applied Microbiology**, v.116, p.1149-1163, 2014.

GONZÁLEZ, J.O.W.; GUTIÉRREZ, M.M.; FERRERO, A.A.; BAND, B.F. Essential oils nanoformulations for stored-product pest control – Characterization and biological properties. **Chemosphere**, v.100, p.130-138, 2014.

GUAN, W.; LI, S.; YAN, R.; TANG, S.; QUAN, C. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. **Food Chemistry**, v.101, n.4, p.1558-1564, 2007.

HADDI, K.; OLIVEIRA, E.E.; FARONI, L.R.A.; GUEDES, D.C.; MIRANDA, N.N. Sublethal exposure to clove and cinnamon essential oils induces hormetic-like responses and disturbs behavioral and respiratory responses in *Sitophilus zeamais*

(Coleoptera: Curculionidae). **Journal of economic entomology**, v.108, n.6, p.2815-2822, 2015.

HERNANDEZ-LAMBRAÑO, R.; PAJARO-CASTRO, N.; CABALLERO-GALLARDO, K.; STASHENKO, E.; OLIVERO-VERBEL, J. Essential oils from plants of the genus *Cymbopogon* as natural insecticides to control stored product pests. **Journal of Stored Products Research**, v.62, p.81-83, 2015.

HUANG, Y.; HO, S.H.; LEE, H.C.; YAP, Y.L. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.38, p.403-412, 2002.

ISIKBER, A.A.; ATHANASSIOU, C.G. The use of ozone gas for the control of insects and micro-organisms in stored products. **Journal of Stored Products Research**, v.64, p.139-145, 2015.

INCROPERA, F.P.; DEWITT, D.P.; BERGMAN, T.L.; LAVINE, A.S. **Fundamentos de Transferência de Calor e de Massa**. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 644 p.

JAIROCE, C.F.; TEIXEIRA, C.M.; NUNES, C.F.; NUNES, A.M.; PEREIRA, C.M.; GARCIA, F.R. Insecticide activity of clove essential oil on bean weevil and maize weevil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.20, p.72-77, 2016.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; STOILOVA, I.; STOYANOVA, A.; KRASTANOV, A.; SCHMIDT, E. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.17, p.6303-6307, 2006.

KANDA, D.; KAUR, S.; KOUL, O. A comparative study of monoterpenoids and phenylpropanoids from essential oils against stored grains insects: acute toxins of feeding deterrents. **Journal of Pest Science**, v.90, p.531-545, 2017.

KEDIA, A.; PRAKASH, B.; MISHRA, P.K.; DUBEY, N.K. Antifungal and antiaflatoxic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. **International Journal of Food Microbiology**, v.168, p. 1-7, 2014.

KHATER, H.F. Prospects of Botanical Biopesticides in Insect Pest Management. **Pharmacologia**, v.2, n.12, p.641-656, 2012.

LEE, B.H.; CHOI, W.S.; LEE, S.E.; PARK, B.S. Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). **Crop Protection**, v.20, n.4, p.317-320, 2001.

LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.59, p.1643-1647, 2007.

LÓPEZ, P.; SANCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERIN, C. Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.17, p.6939-6946, 2005.

MEIER, P.C.; ZÜND, R.E. **Statistical methods in analytical chemistry**. New York: John Wiley & Son, 2005. 424 p.

MILLS, K.A.; WONTNER-SMITH, T.J.; BARTLETT, D.I.; HARRAL, B.B., 2000. A new positive pressure system for combating dilution during phosphine fumigation of bulk grain. Em: Donahaye, E.J.; Navarro, S.; Leesch, J.G. (eds). **Proceedings International Conference Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products**, 29 Oct – 3 Nov. 2000. Fresno, CA. Executive Printing Services, Clovis, CA, EUA. pp.405-420.

OBENG-OFORI, D.; REICHMUTH, C.H. Bioactivity of eugenol, a major component of essential oil of *Ocimum suave* (Wild.) against four species of stored-product Coleoptera. **International Journal of Pest Management**, v.43, n.1, p.89-94, 1997.

OGENDO, J.O.; KOSTYUKOVSKY, M. RAVID, U.; MATASYOH, J.C.; DENG, A.L.; OMOLO, E.O.; KARIUKI, S.T.; SHAAAYA, E. Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. oil and two of its constituents against five insect pests attacking stored food products. **Journal of Stored Products Research**, v.44, n.4, p.328-334, 2008.

PAES, J.L.; FARONI, L.R.A.; MARTINS, M.A.; DHINGRA, O.D.; SILVA, T.A. Diffusion and sorption of allyl isothiocyanate in the process of fumigation of maize. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, n.3, p.296-301, 2011.

PARFITT, J.; BARTHEL, M.; MACNAUGHTON, S. Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050. **Philosophical**

Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v.365, n.1554, p.3065-3081, 2010.

PINO, J.A.; MARBOT, R.; AGÜERO, J.; FUENTES, V. Essential oil from buds and leaves of clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry) grown in Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v.13, n.4, p.278-279, 2001.

PIMENTEL, M.A.G.; FARONI, L.D.A.; GUEDES, R.N.C.; SOUSA, A.H.; TÓTOLA, M.R. Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.45, n.1, p.71-74, 2009.

PRASHAR, A.; LOCKE, I.C.; EVANS, C.S. Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cells. **Cell Proliferation**, v.39, n.4, p.241-248, 2006.

RAINA, V.K.; SRIVASTAVA, S.K.; AGGARWAL, K.K.; SYAMASUNDAR, K.V.; KUMAR, S. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. **Flavour and Fragrance Journal**, v.16, n.5, p.334-336, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIDLEY, A.W.; BURRILL, P.R.; COOK, C.C.; DAGLISH, G.J. Phosphine fumigation of silo bags. **Journal of Stored Products Research**, v.47, p.349-356, 2011.

SANTOS, J.E., 2008. **Difusão e cinética de decomposição do ozônio no processo de fumigação de grãos de milho (*Zea mays*)**. Tese de Doutorado. Viçosa: UFV. 49f.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.4, p.275-280, 2004.

SILVA, G.N; FARONI, L.R.A; CECON, P.R.; SOUSA, A.H.; HELENO, F.F. Ozone to control *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) in stored wheat grains. **Journal of Stored Products and Postharvest Research**, v.7, p.37-44, 2016.

SILVA, S.M.; HADDI, K.; VITERI JUMBO, L.O.; OLIVEIRA, E.E. Progeny of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*, is affected by parental exposure to clove and cinnamon essential oils. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.163, p.220-228, 2017.

SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRAKASH, B.; DUBEY, N.K. Assessment of essential oil of *Acorus calamus* L. and its major constituent β -Asarone in post harvest management of *Callosobruchus chinensis* L. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.19, n.3, p.542-552, 2016.

SIGHAMONY, S.; ANEES, I.; CHANDRAKALA, T.; OSMANI, Z. Efficacy of certain indigenous plant products as grain protectants against *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rhyzopertha dominica* (F.). **Journal of Stored Products Research**, v.22, n.1, p.21-23, 1986.

SILVA, G.N., FARONI, L.R.A.; CECON, P.R.; SOUSA, A.H.O.; HELENO, F.F. Ozone to control *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) in stored wheat grains. **Journal of Stored Products and Postharvest Research**, v.7, n.4, p.37-44, 2016.

SRIVASTAVA, A.K.; SRIVASTAVA, S.K.; SYAMSUNDAR, K.V. Bud and leaf essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from India and Madagascar. **Flavour and Fragrance Journal**, v.20, n.1, p.51-53, 2005.

SOUSA, A.H.; FARONI, L.D.A.; PIMENTEL, M.A.G.; SILVA, G.N.; GUEDES, R.N.C. Ozone toxicity to *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) populations under selection pressure from ozone. **Journal of Stored Products Research**, v.65, p.1-5, 2016.

SOUZA, L.P., FARONI, L.R.A., LOPES, L.M., SOUSA, A.H., PRATES, L.H.F., 2018. Toxicity and sublethal effects of allyl isothiocyanate to *Sitophilus zeamais* on population development and walking behavior. **Journal of Pest Science**. doi: doi.org/10.1007/s10340-017-0950-0

TOMAINO, A.; CIMINO, F.; ZIMBALATTI, V.; VENUTI, V.; SULFARO, V.; DE PASQUALE, A.; SAIJA, A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, v.89, n.4, p.549-554, 2005.

VITERI JUMBO, L.O.; FARONI, L.R.A.; OLIVEIRA, E.E.; PIMENTEL, M.A.; SILVA, G.N. Potential use of clove and cinnamon essential oils to control the bean

weevil, *Acanthoscelides obtectus* Say, in small storage units. **Industrial Crops and Products**, v.56, p.27-34, 2014.

VIUDA-MARTOS, M.; RUÍZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. Chemical composition of the essential oils obtained from some spices widely used in Mediterranean region. **Acta Chimica Slovenica**, v.54, n.4, p.921, 2007.

WANG, R.; WANG, R.; YANG, B. Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.10, n.2, p.289-292, 2009.

WANKAT, P.C. **Separation process engineering: includes mass transfer analysis**. 3rd ed. Massachusetts: Pearson Education, 2011.

WENQIANG, G.; SHUGEN, L.; RUIXIANG, Y.; SHAOKUN, T.; CAN, Q. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. **Food Chemistry**, v.101, p.1558-1564, 2007.

YOU, C.X.; YANG, K.; WU, Y.; ZHANG, W.J.; WANG, Y.; GENG, Z.F.; CHEN, H.P.; JIANG, H.Y.; DU, S.S.; DENG, Z.W.; LIU, Z.L. Chemical composition and insecticidal activities of the essential oil of *Perilla frutescens* (L.) Britt. aerial parts against two stored product insects. **European Food Research and Technology**, v.239, p.481-490, 2014.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Ageing of stored rice: changes in chemical and physical attributes. **Journal of Cereal Science**, v.35, n.1, p.65-78, 2002.

ZHANG, Y.; LIU, X.; WANG, Y.; JIANG, P.; QUEK, S.Y. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v.59, p.282-289, 2016.